



Institut für Biotechnologie

***Glukoselimitierung als Strategie zur
Steigerung der Produktion von MUC1 und
anderen rekombinanten Glykoproteinen
mit CHO-Zellen***

Thomas Link

***Glukoselimitierung als Strategie zur
Steigerung der Produktion von MUC1 und
anderen rekombinanten Glykoproteinen
mit CHO-Zellen***

Thomas Link

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4112

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4112

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung:

Eine Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten beschäftigt sich mit Glukose-limitierten Perfusionskulturen um den Stoffwechsel von Säugerzellkulturen zu verbessern. Ziel ist dabei eine effizientere Nutzung von Substraten sowie eine reduzierte Bildung cytotoxischer Metabolite (z.B. Laktat).

Diese Arbeit zeigt die Entwicklung eines sehr gut reproduzierbaren Glukose-limitierten Perfusionsprozesses mit einer rekombinanten CHO Zelllinie, welche humanes MUC-1 Glykoprotein produziert (derzeit ein Kandidat zur Immuntherapie gegen Brustkrebs). Im Rahmen der Prozessentwicklung wurden ein Standard Rührkessel Bioreaktor mit Zellrückhaltung über Spinfilter sowie ein Protein freies Kulturmedium verwendet. Die Strategie zeichnet sich durch einfache Durchführbarkeit aus und bedarf nicht einer online Glukose-Analytik oder anderer invasiver Messverfahren, was sie sehr unanfällig gegenüber Störeinflüssen macht. Unter Nutzung dieser Strategie konnte die Glukoseverbrauchsrate erheblich gesenkt werden. Dabei fällt und verbleibt die Restkonzentration an Glukose im Bioreaktor unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zellen bilden keinerlei Laktat mehr und die zellspezifische Produktivität sowie die Raum Zeit Ausbeute steigen um den Faktor 5 bzw. Faktor 4 an (250mg/L/Tag). Die Lebendzelldichte bleibt mit $1-2 \cdot 10^7$ sehr hoch bei Prozesslaufzeiten von über 1000h. Weiterhin konnte mittels detaillierter Glykoanalytik gezeigt werden, dass die Produktglykosylierung durch die neue Prozessstrategie nicht verändert wird.

Basierend auf erste Ergebnisse durch Substratbilanzierungen und ^{13}C -Laktat Fütterungsexperimente, welche ein Umschwenken des Stoffwechsels zu gesteigerter Citratzyklusaktivität zeigen und auf Glukoneogenese hindeuten, konnte ein Stoffwechselmodell aufgestellt werden. Dieses wird im Detail diskutiert.

Schließlich konnte die Strategie auf eine zweite rekombinante CHO Zelllinie, welche ein anderes Mucin produziert, erfolgreich übertragen werden.

Abstract:

Many researchers are interested in glucose-limited perfusion culture in order to improve cellular metabolism towards more efficient substrate consumption and reduced production of cytotoxic metabolites (e.g. lactate).

This work presents the development of a highly reproducible glucose-limited perfusion process using a recombinant CHO cell line producing human MUC-1 glycoprotein (currently under evaluation for immunotherapy of breast cancer) in a standard stirred vessel bioreactor with cell retention by spin filter using serum-free medium. The strategy is easy to perform and does not need any online glucose or other invasive measurement making the process highly stable against disturbances. Using this strategy, glucose consumption rate decreases, glucose concentration in the bioreactor drops and remains below detectable levels and the cells do not longer produce any lactate, while cell specific productivity and space time yield increase 5-fold and 4-fold respectively (250mg/L/day). Viable cell density remains very high at $1-2 \cdot 10^7$ cells/mL. Process time can easily be extended to more than 1000h. The glycosylation pattern of the product is unaffected, as shown by detailed glycoanalysis.

Based on preliminary results from substrate balancing and ^{13}C -lactate feeding experiments which prove a switch in metabolism towards an increased TCA-cycle activity and which indicate gluconeogenesis, a metabolic model has been set up and is discussed in detail.

Finally this process strategy has been transferred successfully to a second recombinant CHO cell line secreting another mucin

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Christian Wandrey für die Übernahme des Hauptreferates, die Gewährleistung hervorragender Arbeitsbedingungen, seine wertvollen Anregungen und sein stetes Interesse an meiner Arbeit und daran, dass diese in Einklang mit Familie ist.

Herrn Professor Dr. Volker Herzog für die Übernahme des Korreferates und sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Thomas Noll für die interessante Aufgabenstellung, die immerwährende Bereitschaft zur Diskussion, die Schaffung einer offenen und freundlichen Arbeitsatmosphäre in der Gruppe, sowie die Durchsicht der Arbeit.

Frau Dipl. Ing. Ruth Essers und Frau Dipl. Ing. Kerstin Zörner für Ihr großes Engagement bei der Durchführung Ihrer Diplomarbeiten und die Unterstützung im Rahmen des Projektes.

Herrn Jochem Gätgens für seine tägliche aufopfernde Unterstützung bei der Realisierung von Experimenten und für die Weitergabe seines großen Erfahrungsschatzes, sowie Frau Cornelia Herfurth, Frau Nadine Körfer, Frau Alexandra Reinel Frau Bianca Schwartzkopff und Herrn Nils Hersch für die wertvolle Mithilfe im Labor.

Herrn Andreas Franz für die Unterstützung bei der Etablierung des Prozessleitsystems, Herrn Holger Gieren für die ständige Bereitschaft zur Hilfe bei der Produktaufarbeitung, allen Mitarbeitern der Werkstätten und der Verwaltung, sowie Frau Marianne Hess für die ständige und kompetente Hilfsbereitschaft bei allem, was besonders dringend und wichtig erscheint oder ist.

Herrn Dr. deGraaf für die Kooperation in der Durchführung der NMR-Messungen.

Prof. Dr. Gunnar Hansson and Dr. Malin Bäckström for the very successful, pleasant and interactive collaboration.

Den Korrekturlesern Frau Ruth Essers und Ralf Herbolt für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik alias Zelly-Family für soviel Spaß und Hilfe.

Meinem Vater, Norbert Link, der mich schon früh für die Biotechnologie begeistert und mir auch durch ständige wirtschaftliche Information über die Wachstumsbereiche der Biotechnologie den Weg zur Zellkulturtechnologie zeigte. Meinem Schwiegervater, Werner Lichius, der mit seiner Sichtweise eines Managers immer um meine persönliche Förderung bemüht war.

Überhaupt meiner ganzen Familie, die mit Ihrer Liebe und unermüdlicher Unterstützung in jeglicher Hinsicht Studium und Promotion mitgetragen haben.

Alexandra, danke für unsagbar viel Unterstützung, Verständnis und Liebe.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	C
Tabellenverzeichnis.....	D
Verzeichnis der Mini-Reviews.....	D
Abkürzungen.....	E
1 Aufgabenstellung und Konzept der Arbeit.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 MUC1 und Brustkrebs	3
2.1.1 Das Protein MUC1	3
2.1.2 MUC1-Glykosylierung.....	3
2.1.3 MUC1 als potentielles Immuntherapeutikum.....	4
2.2 Produktion von rekombinantem MUC1 mit CHO-K1 Zellen	6
2.2.1 Das Fusionsprotein MUC1-IgG2a.....	6
2.2.2 CHO-Zellen als Expressionssystem	7
2.3 Säugerzellkulturen	8
2.3.1 Industrielle Bedeutung von Säugerzellkulturen.....	8
2.3.2 Zentralstoffwechsel in Säugerzelllinien	8
2.3.3 Anforderungen an die Bioprozessentwicklung mit Säugerzellen.....	12
2.4 Bioverfahrenstechnische Grundlagen.....	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Kultivierung von Säugerzellen.....	15
3.2 Prozessleitsystem	24
3.3 Analytische Methoden.....	25
3.4 Mathematische Methoden	35
4 Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von MUC1-IgG2a nach herkömmlicher Verfahrensweise.....	41
4.1 Allgemeine Anforderungen an die Bioprozessentwicklung	41

4.2 Optimierung von Kulturparametern	49
4.2.1 Kulturmedium und Suspensionskultur	50
4.2.2 Kultivierungstemperatur	55
4.2.3 Gelöstsauerstoffkonzentration	56
4.2.4 pH	61
4.2.5 Ergebnisse der Optimierung der Kulturparameter	63
4.3 Übertragung der optimierten Bedingungen auf kontinuierliche Perfusionkultur	65
4.3.1 Produktqualität in kontinuierlicher Perfusionkultur	70
4.3.2 Beobachtungen zum Zellstoffwechsel in Perfusionkultur	73
4.3.3 Ergebnisse der Übertragung auf kontinuierliche Perfusionkultur	76
4.4 Untersuchungen zum Glukose-Laktat Stoffwechsel	77
4.4.1 Einfluss der Glukosekonzentration	77
4.4.2 Einfluss der Laktatkonzentration	82
4.4.3 Ergebnisse zum Glukose- und Laktatstoffwechsel	83
5 Entwicklung eines metabolisch optimierten Bioprozesses zur Herstellung von MUC1-IgG2a	85
5.1 Glukoselimitierung in unterschiedlichen Verfahrensweisen	89
5.1.1 Glukose limitierte Perfusionkultur mit konstanter Glukosezufütterung	89
5.1.2 Perfusionkultur mit Glukoselimitierung durch closed-loop Glukose Regelung	98
5.1.3 Repetitive Fed-Batch Kultur mit Glukoselimitierung	100
5.1.4 Einfluss der Glukoselimitierung auf die Glykosylierung von MUC1-IgG2a	103
5.1.5 Ergebnisse aus den Verfahrensweisen mit Glukoselimitierung	105
5.2 Prozesskinetische Charakterisierung und Diskussion von Wachstum und Stoffwechsel unter Glukoselimitierung	106
5.2.1 Glukose-, Aminosäurestoffwechsel und Produktbildung	106
5.2.2 O ₂ - und CO ₂ -Stoffwechsel	110
5.2.3 Wachstum und Erhaltungsstoffwechsel	113
5.3 Weiterführende Untersuchungen zum Zentralstoffwechsel unter Glukoselimitierung	121
5.4 Bedeutung der Verfahrensweise für die Produktivität der Kultur unter Glukoselimitierung	128
6 Übertragung der metabolisch optimierten Verfahrensweise auf eine andere CHO-Zelllinie	12931
7 Zusammenfassung der Arbeit	134
8 Ausblick	136
Anhang	I
Literatur	

Abbildungsverzeichnis

Aufgabenstellung und Konzept

Abbildung A 1: Konzept der vorliegenden Arbeit.	2
--	---

Theoretische Grundlagen

Abbildung TG 1: Glykosylierung von MUC1 in gesunden Zellen und Krebszellen.	4
Abbildung TG 2: Theorie zum immunologischen Wirkmechanismus der „prime-boost“ Impfstrategie.	5
Abbildung TG 3: Struktur des MUC1-IgG2a Fusionsproteins.	6
Abbildung TG 4: Vereinfachte Darstellung des Zentralstoffwechsels von Säugerzelllinien.	9
Abbildung TG 5: Hypothetischer Mechanismus des Crabtree-Effekts.	10
Abbildung TG 6: Energiebilanzen der Glykolyse.	11
Abbildung TG 7: Vereinfachte Darstellung der Glutaminolyse in Säugerzelllinien	11
Abbildung TG 8: Energiebilanzen der Glutaminolysereaktionen.	12

Material und Methoden

Abbildung M 1: Schematische Darstellung der cellferm-pro [®] -Anlage. (Quelle: DASGIP)	18
Abbildung M 2: Spinnergefäß für die Nutzung in der cellferm-pro [®] -Anlage. (Quelle: DASGIP)	19
Abbildung M 3: Schematische Darstellung eines Rührkesselprozesses mit Maximalkonfigurierung.	20
Abbildung M 4: Foto eines Rührkesselprozesses mit Maximalkonfigurierung in Betrieb, ohne schnelle Zellprobenahme.	23
Abbildung M 5: Beispiel für die Ermittlung der Standardgeraden im Ammoniumtest.	29
Abbildung M 6: Beispiel für die Auswertung des ELISA.	32
Abbildung M 7: Beispiel für die Ermittlung der Standardgerade beim Fluoreszenztest.	33

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1: MUC1-IgG2a Konzentration (A), Produktqualität (B) und Vitalität (C) in Batch Kultur.	44
Abbildung 2: Charakterisierung der MUC1 O-Glykosylierung mittels Immunoblotting.	46
Abbildung 3: Zellwachstum und Produktivität nach schneller Adaptierung auf proteinfreie Suspensionskultur in ProCHO4-CDM.	50
Abbildung 4: Vergleich der Kulturüberstände aus Serum enthaltender und proteinfreier Kultur (SDS-PAGE, Coomassie Färbung).	52
Abbildung 5: Verstoffwechselung ausgewählter Aminosäuren in Batch Kultur.	53
Abbildung 6: Einfluss der Kultivierungstemperatur auf Wachstum und Produktivität.	55
Abbildung 7: Einfluss des pO ₂ auf Zellwachstum, Stoffwechsel und Produktivität.	57
Abbildung 8: Verlauf der volumetrischen OUR über die Zeit bei verschiedenen pO ₂	59
Abbildung 9: Vergleich von Wachstum, Produktivität und OUR bei unterschiedlichen pO ₂ zum Zeitpunkt maximaler OUR.	59
Abbildung 10: Einfluss des pH auf Zellwachstum und Produktivität.	61
Abbildung 11: Steigerung der Produktbildung durch Regelung und Optimierung von Kulturparametern.	63
Abbildung 12: Verfahrensweise der nicht glukoselimitierten Perfusionskultur.	66
Abbildung 13: Vitale Zellzahl und Raum-Zeit Ausbeute in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	67
Abbildung 14: Vitale Zellzahl und Produktbildung in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	68
Abbildung 15: Vitalität und Produktqualität in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	71
Abbildung 16: Glykosylierung von MUC1-IgG2a aus Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	72
Abbildung 17: Glukose- und Laktatstoffwechsel in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	74
Abbildung 18: Vergleich von Raum-Zeit Ausbeute und spezifischer Produktivität in Batch und Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.	76
Abbildung 19: Einfluss der Glukoseanfangskonzentration auf Wachstum und Produktkonzentration.	78
Abbildung 20: Einfluss der Glukoseanfangskonzentration auf die spezifische Produktivität.	79
Abbildung 21: Glukose- und Laktatstoffwechsel bei 20mmol l ⁻¹ Glukoseanfangskonzentration.	80
Abbildung 22: Spezifische Produktivität und DGL bei unterschiedlichen Glukoseanfangskonzentrationen.	81
Abbildung 23: Einfluss der Laktatanfangskonzentration auf Wachstum und Produktkonzentration.	82
Abbildung 24: Vergleich von Durchflussrate und Glukosekonzentration zwischen Perfusionskulturen mit.	89
Abbildung 25: Vergleich von vitaler Zellzahl und Vitalität zwischen Perfusionskulturen mit und ohne	

Glukoselimitierung.....	90
Abbildung 26: Vergleich von Glukosekonzentration und zellspezifischer Glukoseaufnahme zwischen Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	91
Abbildung 27: Vergleich von Laktatkonzentration und zellspezifischer Laktatbildungsrate zwischen Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	91
Abbildung 28: Vergleich von DGL und zellspezifischer Produktivität zwischen Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	92
Abbildung 29: Vergleich der zellspezifischen Wachstumsrate μ zwischen Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	93
Abbildung 30: Vergleich von Produktkonzentration und Raum-Zeit Ausbeute zwischen Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	94
Abbildung 31: Produktkonzentration und spezifische Wachstumsrate μ in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung. Verifizierung durch SDS-PAGE.....	95
Abbildung 32: OUR und spezifische Produktivität in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung.....	96
Abbildung 33: CPR und spezifische Produktivität in Glukose limitierter Perfusionsskultur.....	96
Abbildung 34: Zellzahl und MUC1-IgG2a Konzentration in Perfusionsskultur mit Glukose Regelung.....	99
Abbildung 35: Glukose-, Laktatkonzentration, Wachstumsrate (aus Gründen graphischer Darstellung in d^{-1} angegeben) und Produktivität in Perfusionsskultur mit closed-loop Glukose Regelung.....	99
Abbildung 36: Vergleich von Wachstum und Laktatkonzentration zwischen Batch und Fed-Batch.....	101
Abbildung 37: Vergleich von DGL und spezifischer Produktivität zwischen Batch und Fed-Batch.....	101
Abbildung 38: Produktbildung und Wachstumsrate in Glukose limitierter Fed-Batch Kultur.....	102
Abbildung 39: Vergleich der Glykosylierung von MUC1-IgG2a aus Perfusionsskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.....	104
Abbildung 40: Raum-Zeit Ausbeuten und Produktivitäten bei unterschiedlichen Verfahrensweisen.....	105
Abbildung 41: Zusammenhänge zwischen respiratorischem Quotienten, Wachstum und Produktivität.....	112
Abbildung 42: Zusammenhang zwischen spezifischer Produktivität und Wachstumsrate.....	114
Abbildung 43: Die spezifische Glukoseverbrauchsrate aufgetragen gegen die spezifische Wachstumsrate.....	117
Abbildung 44: Reversibilität des unter Glukoselimitierung veränderten Stoffwechsels.....	118
Abbildung 45: Stoffwechsel von Laktat, NH_4^+ , Alanin und Glukose in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung.....	121
Abbildung 46: Vereinfachtes Modell des Zentralstoffwechsels unter Glukoseüberschuss und bei $RQ > 1$	124
Abbildung 47: Vereinfachtes Modell des Zentralstoffwechsels unter Glukoselimitierung und bei $RQ < 1$	125
Abbildung 48: Schematische Darstellung des Einflusses der prozesskinetischen Eigenschaften von Perfusionsskultur und Chemostat auf den hochproduktiven Stoffwechsel unter Glukoselimitierung.....	127
Abbildung 49: Zusammenhang zwischen Zellrückhalterate, Durchflussrate und RZA in Perfusionsskultur.....	128
Abbildung 50: Wachstum sowie Glukose- und Laktatstoffwechsel der CHO-MUC2-GFP-Cterm Zelle in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung.....	129
Abbildung 51: Einfluss der Glukoselimitierung auf die spezifische Produktivität der CHO-MUC2-GFP-C-term Zelle.....	130
Abbildung 52: Leistungsdaten der durchgeführten Bioprozessentwicklung.....	132
Abbildung 53: Genkarte des MUC1-IgG2a-pcDNA3 Plasmids.....	I

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss des pO_2 auf wichtige Ertragskoeffizienten zur Zeit der exponentiellen Wachstumsphase im Batch.....	60
Tabelle 2: Ertragskoeffizienten zum Glukose- und Laktatstoffwechsel in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung bei konstanter Glukosezufütterung.....	106
Tabelle 3: Ertragskoeffizienten zum O_2 - und CO_2 -Stoffwechsel in Perfusionsskultur mit Glukoselimitierung.....	110

Verzeichnis der Mini-Reviews

Mini-Review 1– proteinfreie Kulturmedien.....	49
Mini-Review 2– Kultivierungstemperatur.....	54
Mini-Review 3– pO_2	56
Mini-Review 4– OUR.....	58
Mini-Review 5– kontinuierliche Perfusionsskultur.....	65
Mini-Review 6– Glukose limitierte Kultur.....	85

Abkürzungen

A-Z	Abkürzung	Bedeutung
A	αKG	alpha-Ketoglutarat
	2D	Zweidimensional
	AcCoA	Acetyl-Coenzym-A
	ADP	Adenosindiphosphat
	Ala	Alanin
	AP	Alkaline Phosphatase
	APC	Antigen präsentierende Zelle
	AS	Aminosäure
	Asn	Asparagin
	Asp	Aspartat
	ATCC	American Type Culture Collection
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BCIP	Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat
	BHK	Baby Hamster Kidney
	BSA	Bovines Serum Albumin
C	CD	Cluster of Differentiation
	cGlc	Glukosekonzentration
	CHO	Chinese Hamster Ovary
	Cit	Citrat
	CMV	humaner Cytomegalovirus
	CPR	Carbon-Dioxide Production Rate (volumetrische CO ₂ -Bildungsrate)
	CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
	c _v	vitale Zellen
D	DGL	Degree of Glucose Limitation (Grad der Glukoselimitierung)
	DMSO	Dimethylsulfoxid
E	EGFP	enhanced GFP
	ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
	EtOH	Ethylalkohol
F	F6P	Fruktose-6-Phosphat
	FBP	Fruktose-bis-Phosphat
	Fc	Fragmentum cristalinum
	FCS	Fetal Calf Serum
G	G418	Geneticin-Sulphat 418
	GA3P	Glycerolaldehyd-3-Phosphat
	GDH	Glutamatdehydrogenase
	GFP	Green Fluorescent Protein
	Glc6P	Glukose-6-Phosphat (G6P)
	Gln	Glutamin
	Glu	Glutamat
	GluTA	Glutamat-Transaminase
	Gly	Glycin
	GOD	Glukoseoxidase
H	HMFG	Human Milk Fat Globulin
	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
	IMDM	Iscoves Modified Dulbeccos Medium

A-Z	Abkürzung	Bedeutung
I	ICit	Isocitrat
	IgG	Immunglobulin G
K	Km	Monodkonstante
L	LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
	LOD	Laktatoxidase
M	Mal	Malat
	Maldi-TOF	Maldi-time of flight
	MCB	Master Cell Bank
	MHC	Major Histocompatibility Complex
	MUC1	humanes Mucin1
	MUC2	humanes Mucin2
N	NAD	Nicotin-Adenin-Dinukleotid
	NADH	Nicotin-Adenin-Dinukleotid-H
	NADP	Nicotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
	NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
	NMR	Nuklear Magnet Resonanz
O	OAA	Oxalacetat
	OD	optische Dichte
	OUR	Oxygen Uptake Rate (volumetrische Sauerstoffaufnahme)
P	PBS	Phosphat Puffer Saline
	PEP	Phosphoenol-Pyruvat
	PFK	Phosphofruktokinase
	pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
	PPP	Pentosephosphatzyklus
	PVDF	Polyvinyliden-difluorid
	Pyr	Pyruvat
R	RQ	Respiratorischer Quotient
	RZA	Raum-Zeit Ausbeute
S	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulphonat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	Ser	Serin
	SMP	Symmetric Multi Processor
T	TCA	Tricarbonsäurezyklus = Citratzyklus
	TCE	Trichloressigsäure
	THF	Tetra –Hydro-Folat
	TOR	Target Of Rapamycin
	tPA	tissue Plasminogen Activator
	TR	Tandem Repeat
V	VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	WCB	Working Cell Bank

1 Aufgabenstellung und Konzept der Arbeit

Brust- und Ovarialkarzinome überexprimieren in > 90 % aller Fälle das Protein MUC1 mit, im Vergleich zu nicht entarteten Zellen, veränderter Glykosylierung. Daher ist MUC1 ein interessantes Ziel für eine spezifische Immuntherapie gegen diese Karzinome. Im Rahmen eines EU-Projekts sollte eine solche Therapie basierend auf rekombinantem MUC1 entwickelt werden.

Zielsetzung der hier vorliegenden Dissertationsarbeit war die Entwicklung eines Bioprozesses zur Produktion des rekombinanten MUC1 mit Krebs-assoziiierter Glykosylierung.

Grundlage der Bioprozessentwicklung war eine rekombinante CHO-K1 Zelle, welche das Fusionsprotein MUC1-IgG2a sekretiert.

Folgende konkrete Zielvorgaben für die Bioprozessentwicklung lagen im Rahmen des EU-Projekts zu Beginn vor:

- Der Bioprozess muss so gestaltet sein, dass eine industrielle Anwendung im Großmaßstab unter „*good manufacturing practice*“ (GMP) ermöglicht werden kann.
- Die spezifische Produktivität und Raum-Zeit Ausbeute an MUC1-IgG2a war zu maximieren, um den Prozess möglichst wirtschaftlich zu gestalten.
- Das produzierte MUC1-IgG2a sollte Krebs-assoziierte Glykosylierung aufweisen.
- Parallel zur Prozessentwicklung sollten bereits 100 mg MUC1-IgG2a für Studien *in vitro* und in Maus-Modellen zur Verfügung gestellt werden.

Der Bioprozess zur Herstellung von MUC1-IgG2a diente ferner als Modellprozess für die Entwicklung innovativer technischer und wissenschaftlicher Ansätze in der Zellkulturtechnologie. Daraus ergaben sich als zusätzliche Zielsetzungen:

- Die Integration moderner Technologien für die Prozessführung und Prozessüberwachung in den Bioprozess.
- Die Entwicklung einer neuartigen industriell anwendbaren Prozessstrategie zur Steigerung der Produktivität von Säugerzellkulturen.

Abbildung A1 zeigt das erarbeitete Konzept zur Umsetzung der genannten Zielvorgaben.

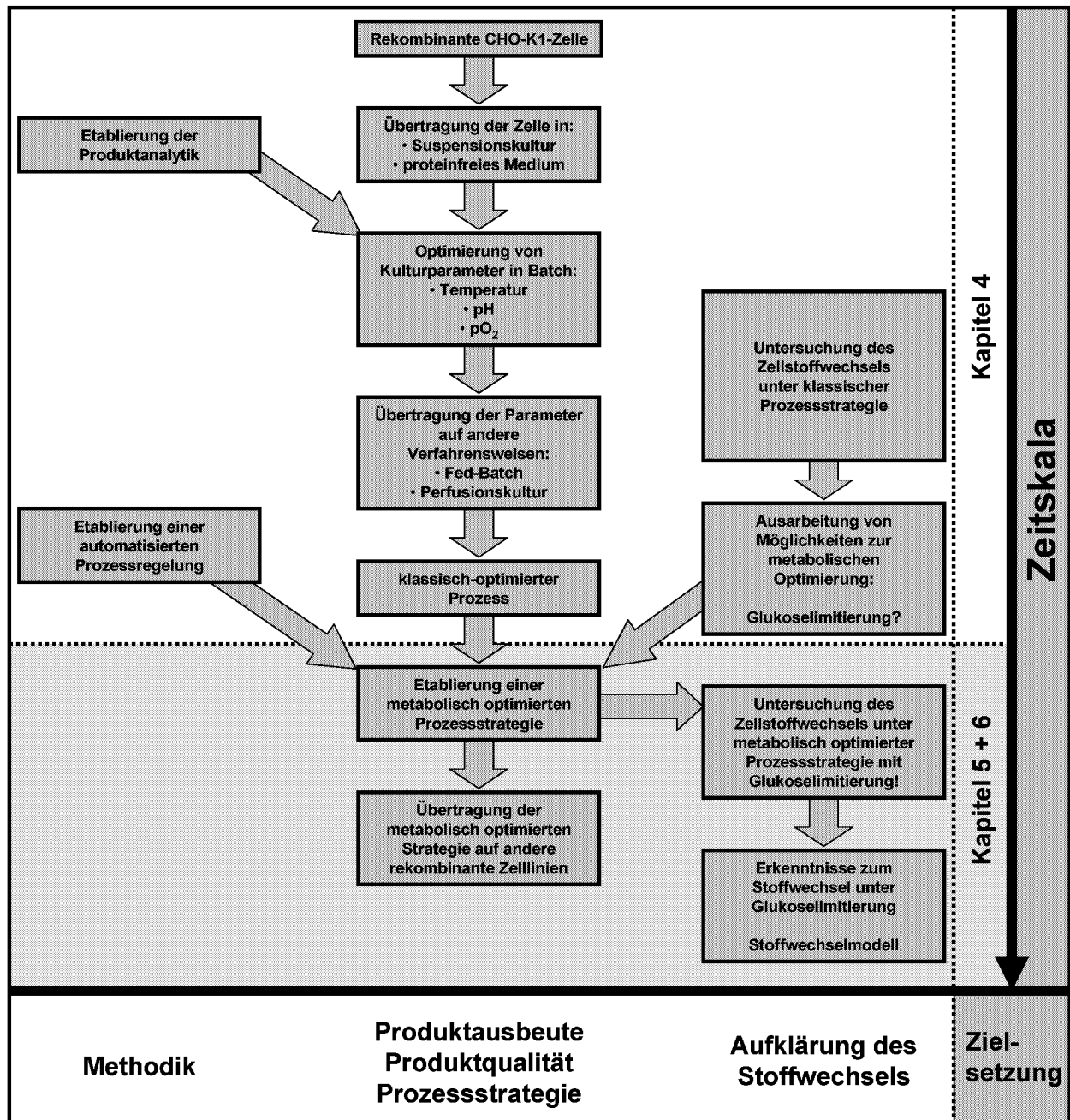


Abbildung A 1: Konzept der vorliegenden Arbeit.

Die Umsetzung der konkreten Zielvorgaben aus dem EU-Projekt wird in Kapitel 4 dieser Arbeit gezeigt.

Als Ansatz zur Steigerung der Produktivität wurde die Optimierung des Zellstoffwechsels unter Glukoselimitierung gewählt. Die Betrachtung der daraus resultierenden metabolisch optimierten Prozessstrategie und der neu gewonnenen Erkenntnisse zum Stoffwechsel von Säugerzellen unter Glukoselimitierung wird in den Kapiteln 5 + 6 behandelt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *MUC1 und Brustkrebs*

2.1.1 Das Protein MUC1

MUC1 (CD 227) gehört zu der Proteinfamilie der Mucine, auch Mucus Glykoproteine genannt. Diese sind in hohem Maße durch epitheliale Zellen exprimiert, sowohl transmembran, als auch als sekretierte Form. In gesunden Zellen ist MUC1 dabei auf der apikalen Seite der epithelialen Zellen exprimiert und ist somit wesentlich an der Bildung von Struktur und Funktionalität der Schleimhäute beteiligt. Charakteristisch für MUC1, wie auch anderen Mucinen, sind eine variable Anzahl von tandem wiederholten Mucin-Domänen (TR, tandem repeats) im extrazellulären, und somit auch sekretierten Bereich des Proteins. Im Menschen liegen zwischen 20 und 120 TR vor. Jeder TR besteht aus 20 Aminosäuren, mit 5 potentiellen O-Glykosylierungsstellen (**Abbildung TG3**) [1, 2, 3, 4]. Außer auf gesunden epithelialen Zellen wird MUC1 verstärkt durch epitheliale Krebsarten, wie in Brustgewebe, Cervix, Dickdarm und Pankreas exprimiert [1, 5, 6].

In Krebspatienten nimmt zudem die Menge an sekretiertem MUC1 im Serum deutlich zu. Auf epithelialen Krebszellen ist, im Gegensatz zu gesunden Zellen, die polare apikale Lokalisierung des MUC1 verloren gegangen, es ist auf der gesamten Zelloberfläche zu finden. Doch darin liegt, was MUC1 betrifft, nicht der einzige Unterschied zwischen gesunden Zellen und Krebszellen.

2.1.2 MUC1-Glykosylierung

Weiterhin unterscheidet sich die Glykosylierung von gesunden Zellen und Krebszellen maßgeblich. In normalen Zellen bestehen die O-Glykane in den TR aus langen, verzweigten und zumeist core-2 (zwei Verzweigungsstellen) basierten Oligosacchariden. In Krebszellen dagegen sind die O-Glykane unverzweigt, kürzer, core-1 basiert (eine Verzweigungsstelle) und stark sialyliert (**Abbildung TG1**) [1, 3, 7, 8, 9, 10, 11]. Die Unterschiede in der Glykosylierung korrelieren mit Unterschieden in der Expression von Galaktosyltransferasen [10]. Die in MUC1 vorhandenen N- und O-Glykane machen einen Großteil des Molekulargewichts aus.

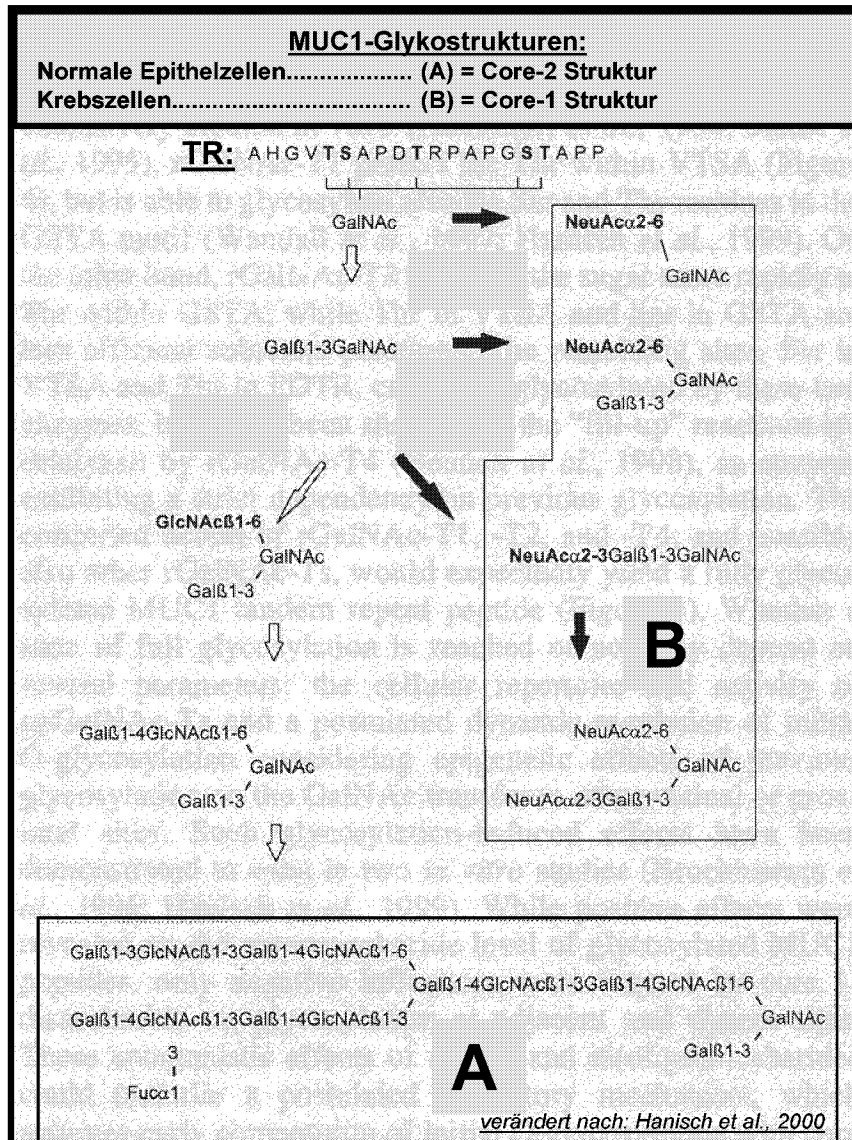


Abbildung TG 1: Glykosylierung von MUC1 in gesunden Zellen und Krebszellen.

2.1.3 MUC1 als potentielles Immuntherapeutikum

Insbesondere die Krebs-assoziierten Unterschiede in der MUC1 Glykosylierung machen MUC1 zu einem interessanten potentiellen Antigen für die Immuntherapie gegen Krebs [6, 12]. Ansatzpunkt für eine potentielle Immuntherapie sind neue Epitope, welche im Bereich der auf Krebszellen vermindert glykosylierten TR vorhanden sind. Diese Epitope werden auf gesunden Zellen durch die längeren und stärker verzweigten Glykane maskiert.

Zum einen können spezifische Antikörper gegen diese Krebs-assoziierten Epitope als Therapeutikum genutzt werden [13]. Zum anderen ist denkbar, dass die Epitope selbst als Antigene dem Immunsystem präsentiert werden, um eine spezifische Immunantwort hervorzurufen. Die Krebs-assoziierten Epitope könnten so als Impfstoff eingesetzt werden. , Eine „prime-

boost“ Kombinationsimpfstrategie könnte besonders erfolgsversprechend sein, wie verschiedene Immunisierungsstudien gegen HIV in den letzten Jahren gezeigt haben [14, 15]. Eine gegen Brustkrebs gerichtete prime-boost Strategie könnte auf einen DNA-Impfstoff basieren, der die Immunantwort initiiert (Prime). Die mittels viralem Vektor transfizierte DNA, welche für MUC1 codiert, sollte zu einer Präsentation der MUC1-Antigene durch den MHC I Komplex von antigenpräsentierenden Zellen (APC) führen und so eine Aktivierung von antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) hervorrufen (**Abbildung TG2**). Im zweiten Schritt könnte dann rekombinantes MUC1 verabreicht werden. Die darauf vorhandenen Epitope sollten über den MHC II Komplex von APC präsentiert werden. Das sollte dann zu einer Aktivierung von $CD4^+$ T-Lymphozyten führen, welche die CTL und auch B-Zellen aktivieren, welche gegen MUC1-Epitope gerichtete Antikörper sekretieren (Boost) (**Abbildung TG2**). Antikörper und CTL könnten effizient gegen die MUC1 exprimierenden Krebszellen vorgehen.

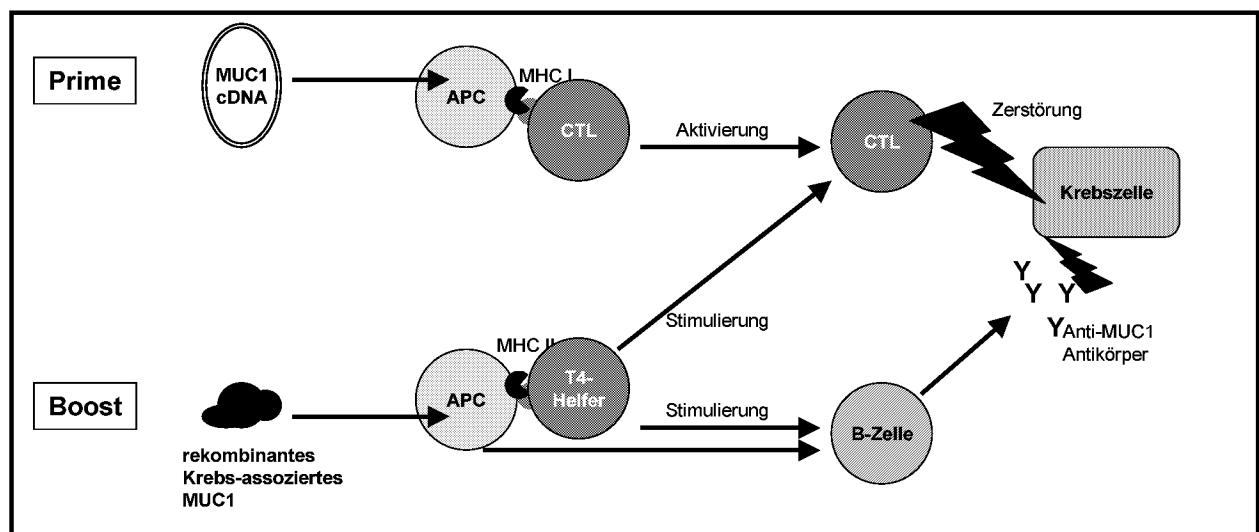


Abbildung TG 2: Theorie zum immunologischen Wirkmechanismus der „prime-boost“ Impfstrategie.

Diese Impfstrategie wurde in einem in das 5. Rahmenprogramm integriertes EU-Projekt mit dem Titel „*Development of a cancer vaccine combining DNA and specific glycoprotein/glycopeptide formulations for a tumour antigen*“ verfolgt. Die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit war im Rahmen dieses Projekts die Prozessentwicklung zur Produktion und Bereitstellung des für den „boost“ benötigten rekombinanten MUC1 Glykoproteins als Tumor-Antigen.

2.2 Produktion von rekombinantem MUC1 mit CHO-K1 Zellen

2.2.1 Das Fusionsprotein MUC1-IgG2a

Das rekombinante MUC1 sollte in der sekretierten Form, also ohne Transmembrandomäne und ohne intrazelluläre Domäne hergestellt werden. Dazu wurde ein Fusionsprotein konstruiert, welches neben einer N-terminalen extrazellulären Domäne als MUC1-Teil eine C-terminale Domäne bestehend aus der, durch Exon 1-3 kodierten Proteinsequenz von murinem IgG2a (Fc) enthält (**Abbildung TG3**). Der MUC1-Teil enthält 16 TR und weist somit 80 potentielle O-Glykosylierungsstellen auf. Der IgG2a-Fc Teil des Fusionsproteins soll den MUC1-Teil stabilisieren und kann zudem als tag zur Aufarbeitung des Fusionsproteins dienen. Zwischen den MUC1-Teil und den IgG2a-Teil wurde eine Enterokinaseschnittstelle inseriert, um eine enzymatische Abspaltung des IgG2a-Fc zu ermöglichen. Das Fusionsprotein hat ein apparentes Molekulargewicht von etwa 170kDa. Ungefähr 40% der Masse ist auf Glykane zurückzuführen. Dies ist jedoch variabel und von der Besetzungsdichte der Glykosylierungsstellen, sowie der Länge der Glykane abhängig.

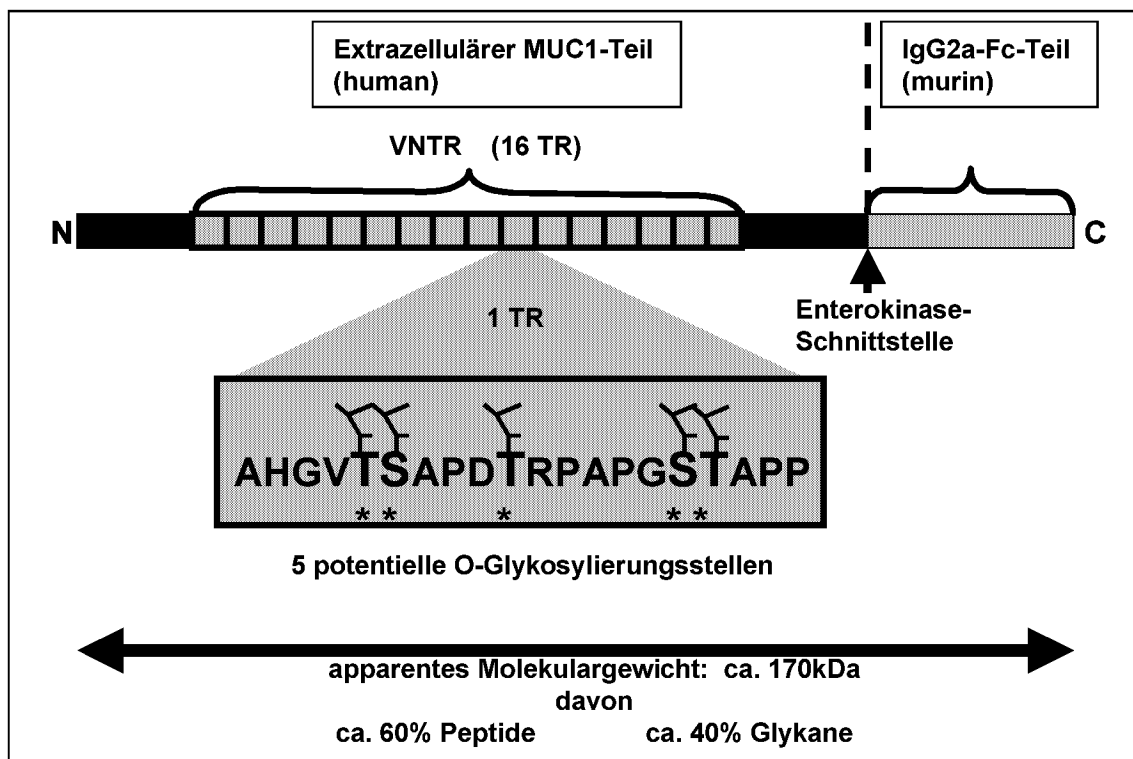


Abbildung TG 3: Struktur des MUC1-IgG2a Fusionsproteins.

Die cDNA für das Fusionsprotein wurde in den pcDNA3-Vektor von Invitrogen inseriert und steht unter Kontrolle eines CMV (humaner Cytomegalovirus) Promotors (**Anhang 1**).

Der Vektor ist ein Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen und wurde gewählt, da er hohe Transkriptionsraten aufweist und somit zu verstärkter Expression des rekombinanten Proteins beitragen könnte. Wirt für die Expression ist eine *Chinese Hamster Ovary* Zelllinie.

2.2.2 CHO-Zellen als Expressionssystem

CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) sind Zellen, die aus dem Eierstock des chinesischen Hamsters gewonnen wurden. 1948 führten Watson und Hu den chinesischen Hamster als Labortier ein. Eine ernsthafte Vermehrung und Nutzung der Tiere erfolgte jedoch erst drei Jahre später durch Yerganian. Puck etablierte die erste fibroblastische Zelllinie aus den Eierstockzellen des chinesischen Hamsters im Jahre 1957. Diese Zelllinie war aneuploid und wies ein starkes Wachstum auf. Die erste Sublinie der isolierten CHO-Zellen nannte man CHO-K1 (Klon1), eine adhärent wachsende Zelllinie. Eine weitere Sublinie dieser Zelle wurde 1971 von Thompson an ein Wachstum in Suspension adaptiert. Sie wurde CHO-S (Suspension) genannt [16].

CHO-Zellen sind fibroblastische Zellen. Diese verfügen über eine hohe Teilungsfähigkeit und sind für die Proliferation des Bindegewebes verantwortlich. Fibroblasten bilden zusammen mit den Fibrozyten die zellulären Bestandteile des Bindegewebes, und sekretieren die Kollagene. Aus diesem Grund besitzen sie einen hohen Anteil an rauem ER, an dem die Proteinbiosynthese stattfindet. Des Weiteren besitzen sie einen sehr ausgeprägten Golgi-Apparat, in dem die Glykosylierung der Proteine vollzogen wird. Dies macht CHO-Zellen zu einem exzellenten Kandidaten für die Expression rekombinanter Glykoproteine. Daher hat sich die Expression rekombinanter Proteine in CHO-Zellen zur Standardtechnologie entwickelt [17, 18, 19]. Neben CHO-Zellen sind murine Myelomazellen (SP2/0 und NS0) wichtige Produktionszelllinien. Zur Etablierung der CHO-Zelle in der industriellen Produktion von Biopharmazeutika hat weiterhin beigetragen, dass CHO-Zellen in der Lage sind, eine Glykosylierung ähnlich der von humanen Proteinen zu liefern, was bedeutsam für die Aktivität vieler Proteine ist [17]. Nicht zuletzt ist wichtig, dass CHO-Zellen in vielen von den Zulassungsbehörden bereits zugelassenen Prozessen verwendet werden, was die Zulassung eines neuen Prozesses erleichtern kann [18].

Die hier verwendete CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie sollte demnach die Anforderungen an eine Produktionszelllinie erfüllen.

2.3 Säugerzellkulturen

2.3.1 Industrielle Bedeutung von Säugerzellkulturen

Die Zellkulturtechnologie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung erfahren. Dieser Trend wird sich in den kommenden Jahren vermutlich noch verstärken, wenn man bedenkt, dass sich etwa 500 therapeutische oder diagnostische Antikörper oder rekombinante Proteine in der Entwicklung befinden, davon bereits mehr als 100 in klinischen Studien [20, 21]. Dies wird eine Expansion der Produktionskapazitäten für Säugerzellkulturen erforderlich machen. Doch auch andere Technologien zur Herstellung rekombinanter Proteine befinden sich in der Entwicklung. Dazu gehören transgene Tiere (Gewinnung der Proteine aus Milch oder Hühnereiern) und auch transgene Pflanzen [20]. Obwohl diese neuen Technologien effiziente und kostengünstige Alternativen zur Zellkultur darstellen könnten, kommen sie bis heute nicht maßgeblich zum Einsatz. Der Grund hierfür liegt vor allem darin, dass die biologisch aktive Form vieler glykosylierter Proteine bisher nur in Säugerzellkulturen hergestellt werden konnte, was an dem Potential der Zellen zur Glykosylierung und Proteinfaltung liegt. Zwar ist die Glykosylierung auch mit transgenen Tieren realisierbar, hier liegt jedoch noch keine den Anforderungen des Arzneimittelgesetzes genügende Technologie vor. Aus diesem Grund wird die Zellkulturtechnologie trotz hoher Investitionskosten, Betriebskosten und vergleichsweise geringer Produktausbeuten weiterhin genutzt. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich jedoch auch, dass die Zellkulturtechnologie weiter optimiert werden muss, um auch in Zukunft konkurrenzfähig zu bleiben, wenn es darum geht, kostengünstige Medikamente zu produzieren. Daher wird nach Möglichkeiten gesucht, die Produktivität der Zellkulturprozesse deutlich zu steigern. Neben technischen Verbesserungen liegt ein weiterer Ansatz hier vor allem in der Steigerung der Produktivität über die Optimierung des Stoffwechsels der verwendeten Zelllinien.

2.3.2 Zentralstoffwechsel in Säugerzelllinien

Säugerzelllinien und Krebszellen sind immortalisiert und weisen beide einen ähnlichen Zentralstoffwechsel auf [22]. Im Gegensatz zu Pflanzenzellen benötigen alle tierischen Zellen, so auch Säugerzellen, zumindest Glukose und die Aminosäure Glutamin zur Bereitstellung von Kohlenstoff, Stickstoff und Energie in Form von ATP und NADPH [22, 23]. Diese Energie wird für Wachstum, Erhaltungsstoffwechsel und die Synthese der Produktproteine benötigt. Somit liegt eine Möglichkeit zur Steigerung der Produktivität in der Generierung eines effi-

zienteren Energiehaushalts in den Zellen. Dies könnte prinzipiell durch genetische Manipulation der Zelle zur Veränderung einzelner Stoffwechselreaktionen, veränderte physiologische Umgebungsbedingungen oder einer Kombination aus beidem erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Produktivität könnte auch darin bestehen, das Zellwachstum zu vermindern, um die Energieäquivalente der Proteinsynthese zukommen zu lassen. Das Zellwachstum kann über den Zellzyklus oder indirekt über den Stoffwechsel der Zellen beeinflusst werden [24, 25, 26, 27].

Die Betrachtung des Zentralstoffwechsels in Säugerzelllinien kann hierbei Hinweise auf Engpässe in der Energiebereitstellung liefern, und somit Ansätze zur Verbesserung des Stoffwechsels aufzeigen. Ein vereinfachtes Modell des Zentralstoffwechsels in Säugerzelllinien ist in **Abbildung TG4** dargestellt (verändert nach [28]).

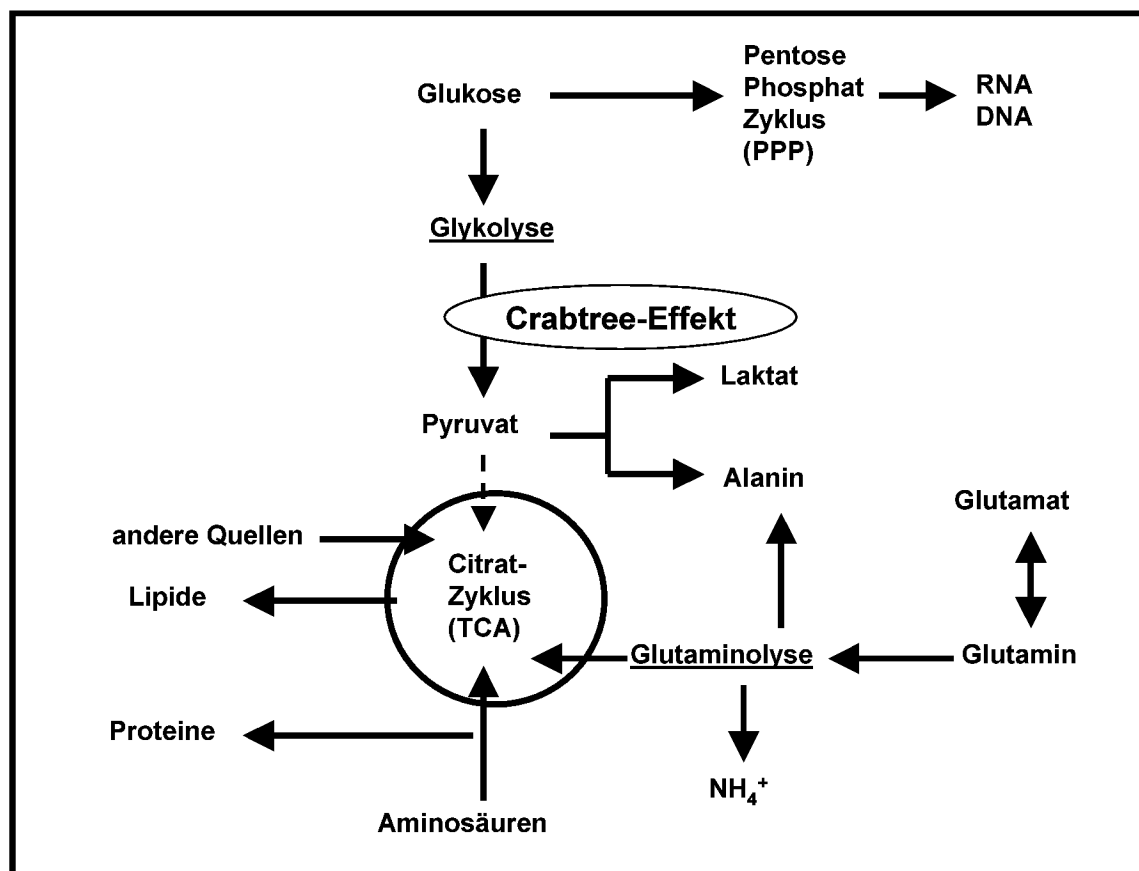


Abbildung TG 4: Vereinfachte Darstellung des Zentralstoffwechsels von Säugerzelllinien.

Glukose geht über die Glykolyse, Glutamin über die Glutaminolyse in den Citrat-Zyklus ein. Charakteristisch für den Glukosestoffwechsel von Säugerzelllinien ist, dass Glukose nicht vollständig zur CO_2 oxidiert wird, sondern vor allem in den Laktat-Pool einfließt. Daraus re-

sultiert eine deutlich geringere Ausbeute an ATP (**Abbildung TG6**). Der Grund für diesen energetisch ineffizienten Stoffwechsel liegt möglicherweise im Crabtree-Effekt [22, 29, 30, 31, 32]. Ein hypothetischer Mechanismus des Crabtree-Effekt ist in **Abbildung TG5** erklärt. Der Crabtree-Effekt führt weiterhin dazu, dass pro mol Glukose mehr als 1 mol Laktat entsteht. Daher liegt auch unter aeroben Bedingungen Laktatgärung vor. Diese Form der Glykolyse wird auch „aerobe Glykolyse“ genannt [33]. Die Laktatkonzentration in der Kultur steigt an. Dies kann Wachstum und Produktivität inhibieren [34, 35, 36, 37].

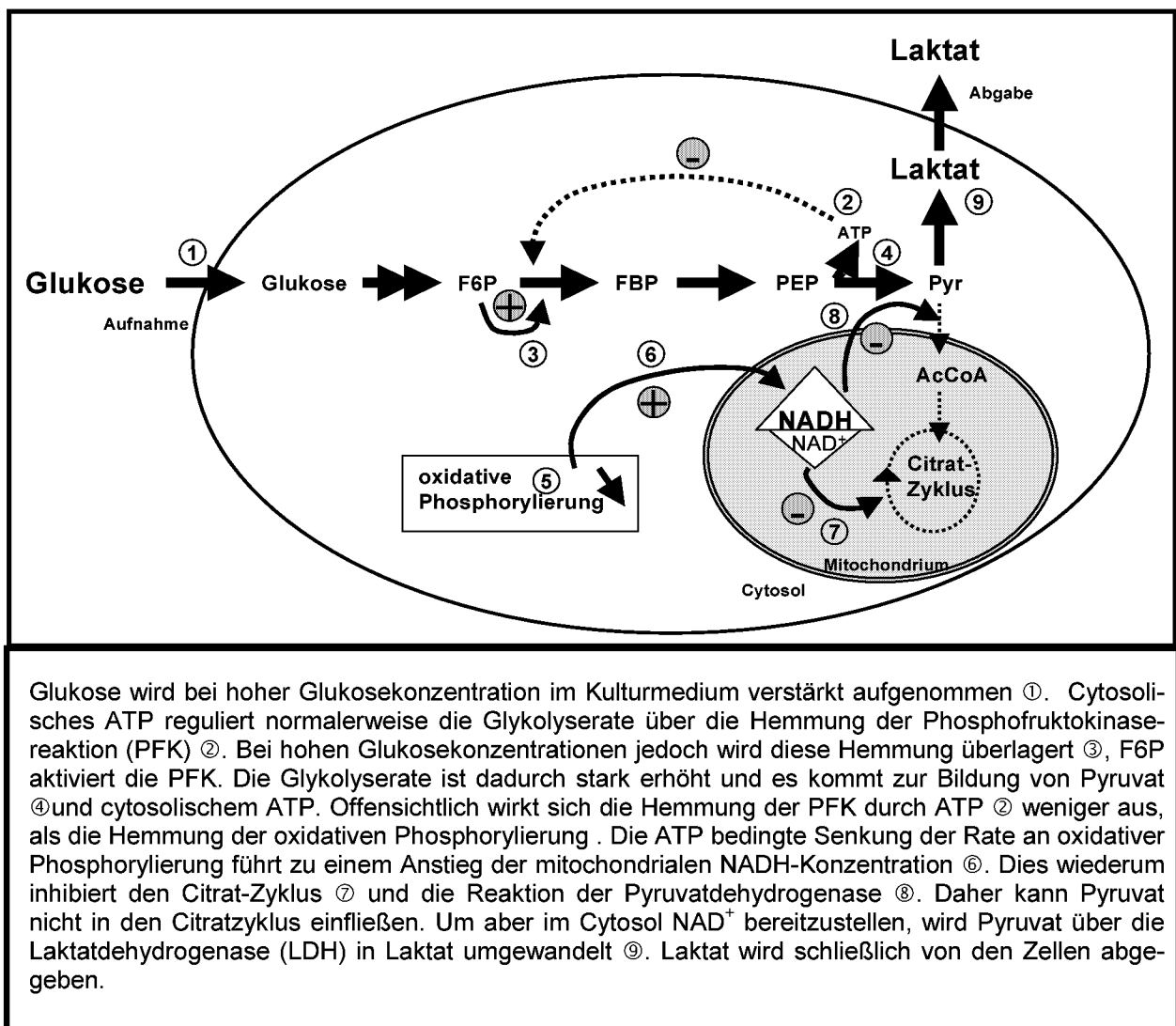


Abbildung TG 5: Hypothetischer Mechanismus des Crabtree-Effekts.

Ein Ziel zur metabolischen Optimierung von Säugerzellkulturen könnte demnach in der Unterdrückung des Crabtree-Effekt liegen, was zu gesteigerter Energieausbeute und möglicherweise auch gesteigerter Produktivität führen könnte.

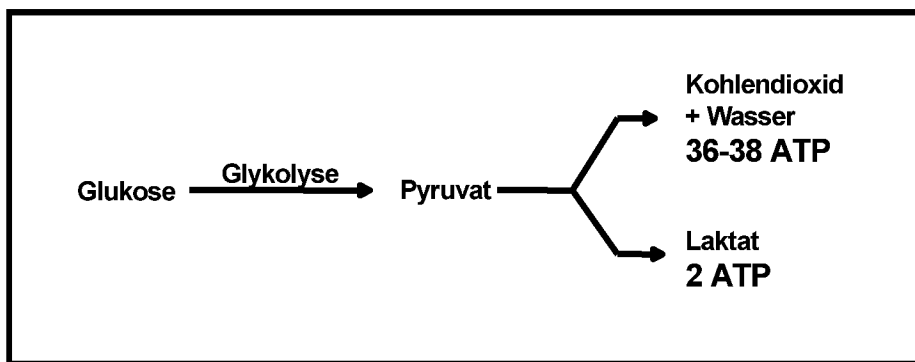


Abbildung TG 6:
Energiebilanzen der
Glykolyse.

Glukosestoffwechsel und Glutaminstoffwechsel sind insbesondere über den Pyruvat-Pool in den Zellen aneinander gekoppelt (**Abbildung TG7**). Ein großer intrazellulärer Pyruvat-Pool fördert die Glutaminolyse über die Glutamat-Transaminase (GluTA) unter Bildung von Alanin. Weniger Pyruvat steht für den Citrat-Zyklus zur Verfügung. Umgekehrt bei Glutaminolyse über die Glutamatdehydrogenase (GDH) unter verstärkter Bildung von Ammonium (**Abbildung TG7**). Da die Glutaminolyse über die GDH führt zur vollständigen Oxidation des Glutamins zu CO_2 , wobei die GDH-Reaktion zusätzlich 1 NADH (entspricht 3 ATP) liefert, die Glutaminolyse über Transaminierung jedoch nicht. Hinzu kommt, dass bei Transaminierung Pyruvat nicht zu CO_2 oxidiert wird und so weiter 15 ATP/Pyruvat verloren gehen. Potentiell könnte ein Glutaminstoffwechsel über die GDH also vorteilhaft für die Produktivität der Zelle sein, da 18 ATP/Glutamin mehr gebildet werden (**Abbildung TG8**).

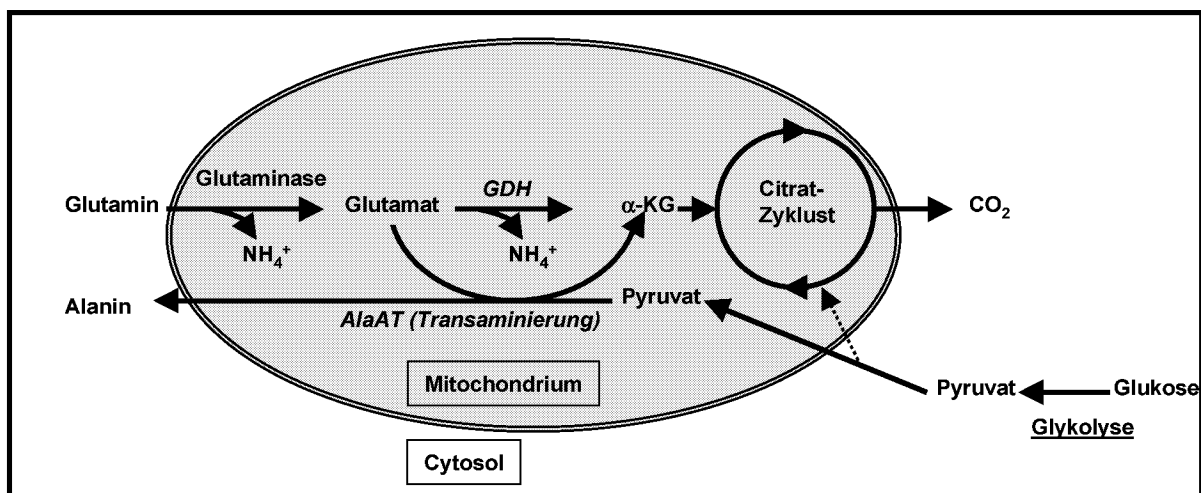


Abbildung TG 7: Vereinfachte Darstellung der Glutaminolyse in Säugerzelllinien

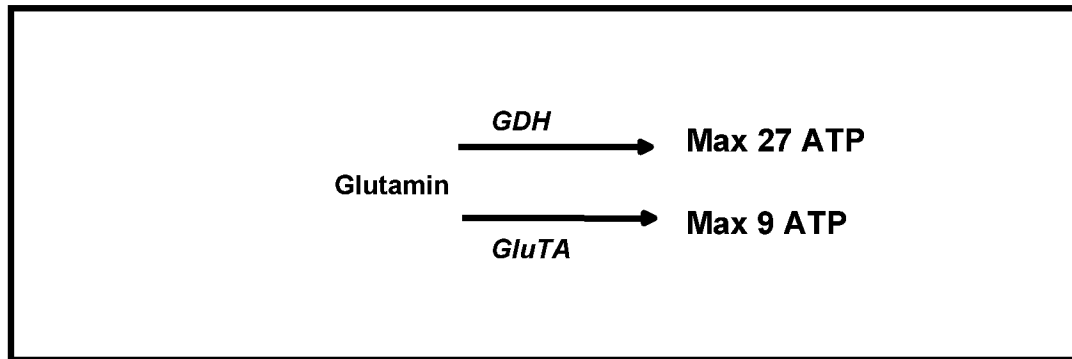


Abbildung TG 8: Energiebilanzen der Glutaminolysereaktionen.

Die hier aufgeführten Erkenntnisse über den Stoffwechsel von Säugerzelllinien lassen die Möglichkeit einer Steigerung der Produktivität durch eine intelligente Nährstoffversorgung durch Glutamin und Glukose im Rahmen des Bioprozesses als wahrscheinlich erscheinen.

2.3.3 Anforderungen an die Bioprozessentwicklung mit Säugerzellen

Ein zu entwickelnder Bioprozess sollte, wie gerade erläutert, einen metabolisch effizienteren Stoffwechsel ermöglichen. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Prozessentwicklung einen industriell anwendbaren Prozess zur Herstellung eines therapeutischen Proteins zum Ziel hat.

Ein industrieller Bioprozess sollte prinzipiell 2 Hauptkriterien erfüllen [38]:

- Hohe und konsistente Produktqualität
- Wirtschaftlichkeit des Herstellungsverfahrens

Hohe und konsistente Produktqualität und Sicherheit des Produktes:

Unabdingbar zur Sicherstellung hoher Produktqualität ist zunächst eine Analytik, welche es erlaubt das Produkt als Inprozesskontrolle bereits während des Prozesses zu charakterisieren [39, 40, 41]. Daher wurde im Rahmen dieser Prozessentwicklung eine entsprechende Analytik entwickelt (siehe 4.1.1 Produktanalytik). Eine Produktquantifizierung mittels ELISA wurde ebenfalls etabliert. Des weiteren ist eine detaillierte Prozessbeschreibung mittels mathematischer Größen nötig, um die Verfahrensweise, welche das Produkt hoher Qualität liefert, detailgenau reproduzieren zu können. Schließlich ist eine ausreichende Dokumentation des Prozesses notwendig [42], welche die Grundlage der pharmazeutischen Dokumentation und der *Expert-Reports* darstellt, die bei den Zulassungsbehörden eingereicht werden [39].

Wirtschaftlichkeit des Herstellungsverfahrens:

Die Wirtschaftlichkeit des Herstellungsverfahrens hängt von folgenden Schlüsselfaktoren ab [43, 44]:

- Zellspezifische Produktivität
- Kosten für die Produktaufarbeitung
- Rohstoffkosten
- Investitionskosten
- Personalkosten

Um die Wirtschaftlichkeit des Herstellungsverfahrens zu erhöhen wurde die hier gezeigte Prozessentwicklung auf die Etablierung einer Suspensionskultur in proteinfreiem Kulturmedium und die Nutzung der Perfusions- und Fed-Batch Verfahrensweise konzentriert. Diese Verfahrensweisen gelten als geeignet für die Steigerung der Wirtschaftlichkeit eines Prozesses, sind in der Industrie im Großmaßstab unter verhältnismäßig geringem Personalaufwand etabliert, wobei die Produktionsanlagen oft flexibel einsetzbar sind. Zudem erscheint die Zulassung dieser Verfahrensweisen im Rahmen eines Produktionsprozesses als vergleichsweise einfach [18, 44].

2.4 Bioverfahrenstechnische Grundlagen

2.4.1 Verfahrensweisen

Verschiedene Verfahrensweisen finden in der Säugerzellkultur Anwendung:

Satzkultur (Batch)

Von Beginn der Kultur an ist das Kulturvolumen maximal. Mit Ausnahme von O₂ sowie CO₂ und Lauge zur pH-Regelung werden der Kultur keinerlei Substrate zugeführt. Das Kulturvolumen ist meist durch die Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Zellen (Inokulum) zum Starten der Kultur begrenzt. Die Kulturdauer ist relativ kurz, da das Zellwachstum mit Eintritt einer Substratlimitierung rasch endet. Ein Nachteil des Batch ist auch die Akkumulierung toxischer oder wachstumsinhibierender Metabolite wie NH₄⁺ und Laktat, sowie erhöhte Proteaseaktivität durch absterbende Zellen. Ein Vorteil des Batch ist, dass alle Wachstumsphasen einer Kultur durchlaufen werden, was Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten und den Zellstoffwechsel der Zellen ermöglicht.

Zulaufsatzkultur (Fed-Batch)

Der Fed-Batch wird analog dem Batch gestartet, jedoch mit zunächst deutlich geringerem Kulturvolumen. Mit Erreichen einer bestimmten Zellzahl wird dann zusätzlich zur Betriebsweise im Batch der Zulauf eines Nährmedium, Medienkonzentrats oder einzelner Substrate gestartet. Durch die im Vergleich zum Batch gesteigerte und verlängerte Substratversorgung kommt es später zur Substratlimitierung und somit zu höheren Zellzahlen. Alle übrigen Nachteile des Batch bleiben jedoch erhalten. Ein weiterer Vorteil ist, dass mittels des Zufütterungsprofils Einfluss auf den Zellstoffwechsel genommen werden kann. Die Verwendung von Konzentraten ergibt weitere Vorteile. So kann die Dauer bis zum Erreichen des maximalen Kulturvolumens verlängert werden. Zudem kann schon zu einem frühen Zeitpunkt der Kultur die Zelldichte gesteigert werden, was zu erhöhten Produktkonzentrationen führt.

Periodische Zulaufsatzkultur (Repetitive Fed-Batch)

Nach dem Fed-Batch erfolgt keine vollständige Leerung des Kulturgefäßes, sondern das verbleibende Volumen wird als Startkultur für einen erneuten Fed-Batch genutzt.

Kontinuierliche Kultur ohne Zellrückhaltung (Chemostat)

Die Kultur startet als Batch. Mit Erreichen einer bestimmten Zelldichte wird ein kontinuierlicher Zulauf an frischem Nährmedium eingeschaltet. Gleichzeitig wird mit gleicher Flussrate Kulturlösung abgeführt. Dabei bleibt das Kulturvolumen konstant. Aus dem Volumenstrom und dem Kulturvolumen ergeben sich Durchflussrate und Verweilzeit in der Kultur. Das Zellwachstum wird durch limitierende Substratkonzentrationen begrenzt. Damit sind Wachstumsrate und Durchflussrate gekoppelt. Die Wachstumsrate gleicht sich der Durchflussrate an.

Kontinuierliche Kultur mit Zellrückhaltung (Perfusionskultur)

Die Perfusionskultur wird analog zum Chemostat betrieben. Durch die Zellrückhaltung, welche beispielsweise über rotierende Filter (Spinfilter) realisiert werden kann, wird die Wachstumsrate jedoch von der Durchflussrate entkoppelt. Dies führt zu deutlich höheren Zelldichten und damit verbunden zu geringeren Verweilzeiten und höheren Raum-Zeit Ausbeuten. Vorteile der Perfusionskultur sind weiterhin eine verminderte Proteaseaktivität in der Kultur und hohe Vitalitäten bedingt durch Abführung toter Zellen durch den Spinfilter.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Standardmethode zur Kultivierung von Säugerzellen im Labormaßstab sind Gewebekulturflaschen. Gewebekulturflaschen werden hauptsächlich zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen genutzt. Ausführungen mit rauer Oberfläche und ladungsarmen Materialien können aber auch für die Kultivierung von Suspensionszellen verwendet werden.

3.1.1 Zelllinie

Die hier vorliegende Zelllinie geht aus einer CHO-K1 Zelllinie von ATCC hervor.

Die CHO-K1 Zelllinie wurde aus konfluenter Kultur mittels Elektroporation mit dem Plasmid MUC1-IgG2a-pcDNA3 transfiziert, welches auch eine Resistenz gegen Geneticin vermittelt. So konnte nach der Transfektion unter G418-Sulphat Selektion die rekombinante CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie generiert werden, welche die MUC1-IgG2a cDNA genomisch integriert hat. Die Zellen sekretieren das Fusionsprotein MUC1-IgG2a und wiesen adhärentes Wachstum auf. Zur Kultivierung dieser Zellen wurden Gewebekulturflaschen mit einer Kultivierungsfläche von 25, 75 und 175 cm² verwendet.

Im Verlauf der Prozessentwicklung wurde die Zelllinie jedoch an Wachstum in Suspension adaptiert. Die Adaptierung erfolgte direkt durch Transfer der Zellen in ProCHO4-CDM in Gewebekulturflaschen für Suspensionskultur. Zwei Tage später wurde die Suspensionszelllinie dann in Spinnergefäße, und somit in gerührte Suspensionskultur überführt.

3.1.2 Medium

Die adhärent wachsende Ausgangszelle ist an ein Wachstum in *Iscoves Modified Dulbeccos Medium* (IMDM) + 10% FCS angepasst. Aufgrund der möglichen klinischen Anwendung des Produktes zu einem späteren Zeitpunkt, war jedoch die Verwendung eines chemisch definierten serumfreien und proteinfreien Mediums erforderlich. Mit Übertragung in Suspensionskultur wurde daher nur noch das Medium ProCHO4-CDM der Firma Biowhittaker Europe verwendet. ProCHO4-CDM wurden standardmäßig folgende Komponenten supplementiert:

- Glutamin 4,1 mmol l⁻¹

- Hypoxanthin und Thymidin je 0,1 mmol l⁻¹
- Genitacin (G) 418-Sulphat 250 mg l⁻¹

Für Kulturen mit einer geringeren Glukoseanfangskonzentration als 23,89 mmol l⁻¹ wurde ein modifiziertes ProCHO4-CDM ohne Glukose verwendet. Diesem Medium mussten zusätzlich noch diverse Aminosäuren und Glukose in gewünschter Konzentration zu supplementiert werden, um die Rezeptur von ProCHO4-CDM zu erhalten.

Um in nicht pH-geregelten Fermentation Schwankungen des pH-Werts zu vermindern, wurden den Medien für alle Versuche standardmäßig 20 mmol l⁻¹ Bicarbonat zur Pufferung zugegeben.

3.1.3 Stammhaltung und Cell-Banking

Um während einer Versuchsreihe immer wieder auf genetisch identische Zellen zurückgreifen zu können, empfiehlt es sich neben der *master cell bank* (MCB) eine *working cell bank* (WCB) anzulegen. Als Inokulum für jede neue Kultur sollten Zellen aus der WCB aufgetaut werden. Die MCB dient lediglich der Generierung neuer WCB's sowie der Herstellung modifizierter Zelllinien.

Die eigentliche Stammhaltung zur Expansion der Inokuli und zur Bereitstellung von Zellen für kurzfristig erforderliche Kulturen erfolgt als Suspensionskultur in Spinnergefäßen. Es sollte dabei darauf geachtet werden, dass die Stammhaltung nicht länger als 2-3 Monate erfolgt, da sonst Mutationen nicht ausgeschlossen werden können.

Wenn die Zellzahl 2×10^6 ml⁻¹ überschreitet, sollte die Kultur mit frischem Medium auf $1,5 \times 10^5$ ml⁻¹ verdünnt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die Zelle weder durch Stoffwechselprodukte, noch durch Substratlimitierung in ihrem Wachstum inhibiert wird.

Um Zellen über lange Zeit zu konservieren, werden sie in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Diese Kryokonservierung garantiert eine kontaminationsfreie und mutationsfreie Aufbewahrung der Zellen über viele Jahre. Soll die Lagerung nur für kurze Zeit erfolgen, reicht eine Temperatur von -80°C aus.

Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgt in einem Gemisch aus Medium und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid), welches die Zellen vor Schädigung durch Kristallisation schützt. Idealerweise befinden sich die einzufrierenden Zellen im exponentiellen Wachstum, um nach dem Auftauen der Zellen schnell wieder proliferierende Zellen zu erhalten. Die Menge der Zellen wird so gewählt, dass eine Konzentration von 10^7 vitalen Zellen ml^{-1} im Einfriermedium vorliegt.

Die Zellen werden für 6 Minuten bei $200 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird im Einfriermedium resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen überführt (je $1 \text{ ml} = 10^7$ vitale Zellen). Die Kryoröhrchen werden in ein Einfriermodul, welches mit Isopropanol gefüllt ist, überführt. Dieses Einfriermodul sorgt für eine gleichmäßige Abkühlung von 1°C min^{-1} . Über Nacht wird das Einfriermodul bei -80°C gelagert und die Zellen können dann zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wird zunächst die benötigte Menge an Kulturmedium auf 37°C temperiert und in einem sterilen geschlossenen Gefäß 9 ml kühles Medium vorgelegt. Die Probe wird im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann sofort in das vorgelegte kühle Medium überführt. Dabei wird das zelltoxische DMSO verdünnt. Die Zellen werden für 5 Minuten bei $200 \times g$ und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Bis zu diesem Zeitpunkt sollten die Zellen gekühlt sein, um die Aufnahme des toxischen DMSO durch die Zellen zu minimieren. Das Pellet wird dann in vorgewärmten Medium resuspendiert und zur Kultivierung in eine Gewebekulturflasche oder ein Spinnergefäß überführt.

3.1.4 Suspensionskulturen

Kultur in Spinnergefäßen

Bei dem Spinnergefäß handelt es sich um eine Glasflasche, in deren Mitte sich ein frei aufgehängter Glasklöppel mit Magnetkern befindet, so dass die Kultur durch einen Magnetrührer ständig durchmischt werden kann. Dadurch wird eine bessere Versorgung der Kultur mit Sauerstoff gewährleistet und die Verklumpung bei hohen Zelldichten vermindert.

Zum Befüllen, Animpfen, Probeziehen und Medienwechsel besitzt der Spinner zwei weitere

Öffnungen. Der Gasaustausch mit der Umgebung erfolgt passiv und ist durch Sterilfilter, die am Deckel des Spinners angebracht sind, gegeben. Durch sie kann ein diffusiver Gasaustausch stattfinden. Die Spinnergefäße stehen in begasten, temperierten und befeuchteten Inkubatorschränken.

Bei der Spinnerkultivierung mit Oberflächenbegasung (head-space) ist darauf zu achten, dass das Kulturvolumen 40% des Gesamtvolumens nicht überschreitet, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung und Durchmischung aller Zellen zu gewährleisten.

Kultur in der cellform-pro[®] Anlage

Die cellform-pro[®] - Anlage der Firma DASGIP erlaubt die gleichzeitige Kultivierung von bis zu acht Spinners unter kontrollierten Bedingungen. Die Anlage ermöglicht es pH- und pO₂-geregelter Ansätze im Batch, Fed-Batch oder kontinuierlich zu betreiben

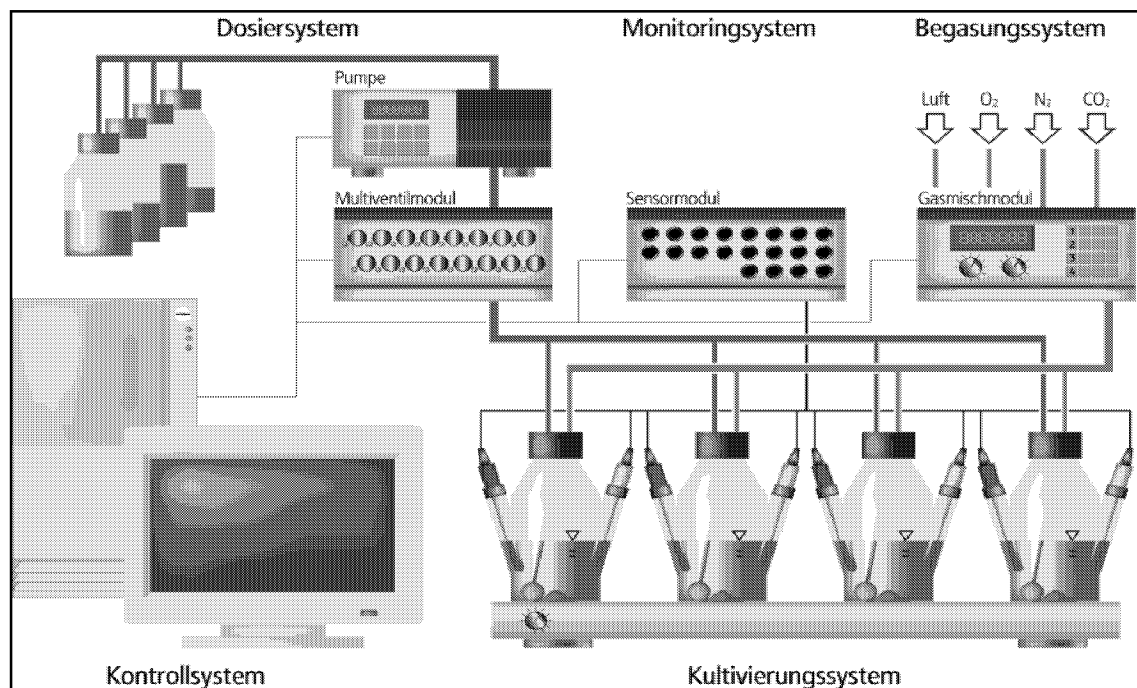


Abbildung M 1: Schematische Darstellung der cellform-pro[®] -Anlage. (Quelle DASGIP)

Die Spinner sind so gebaut, dass über zusätzliche Öffnungen pH- und pO₂-Elektroden in den Spinner eingebaut werden können, und somit eine Überwachung, Aufzeichnung und Regelung dieser Kultivierungsparameter möglich ist (**Abbildung M2**). Zusätzlich kann über das Dosiersystem eine Zudosierung von einem oder zwei Substraten erfolgen.

Die *Headspace*-Begasung erfolgt aktiv über sterile Zuluftfilter am Deckel der Spinner und setzt sich aus einer Mischung von bis zu vier Gasen (N₂, O₂, CO₂, Luft) zusammen. Über die

Gasmischstation kann die Zusammensetzung der Zuluft und des Massendurchflusses für jeden Spinner individuell eingestellt werden.

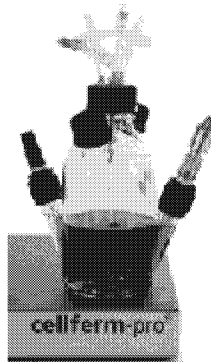


Abbildung M 2: Spinnergefäß für die Nutzung in der cellferm-pro[®]-Anlage. (Quelle: DASGIP)

Um die sterile Probenahme zu erleichtern, sind an den Spinnern Probenahmeventile angebracht, die es ermöglichen direkt im Inkubator Proben zu nehmen. Die Spinner müssen so nicht vom System abgekoppelt werden. Vom Probenahmeventil reicht ein dünner Schlauch in das Medium hinein und mit Hilfe von sterilen Einmal-Injektionsspritzen kann nach Spülen des Probenschlauchs Probe genommen werden.

Ein an das System angeschlossenes Kontrollsystem zeichnet für jeden Spinner die pH- und pO₂- Werte auf und gibt sie zusätzlich während des Prozesses als Graphik auf dem Bildschirm wieder. Weiterhin können auf der Benutzeroberfläche während des Versuches die Begasungs- und Dosieraten und der Verlauf der OUR (*oxygen uptake rate*) verfolgt werden. Die Dokumentation der Laufzeitdaten erfolgt in festen Zeitabständen und kann nach Beendigung des Versuchs vom Benutzer eingesehen und ausgewertet werden.

Kultur in Bioreaktoren

Kontinuierliche Perfusionenkulturen wurden in Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von einem Liter durchgeführt. Dieses System wurde gewählt, da therapeutische Proteine im industriellen Großmaßstab ebenfalls meist in gerührten Bioreaktoren hergestellt werden.

Aufbau der Prozessanlage:

Eine schematische Darstellung einer Prozessanlage mit Maximalkonfiguration, also unter gleichzeitiger Implementierung aller verwendeten Technologie, ist in **Abbildung M3** dargestellt. **Abbildung M4** zeigt ein Foto einer Prozessanlage, welche sich in Betrieb befindet.

Im folgenden sind die einzelnen Komponenten der Anlage aufgeführt:

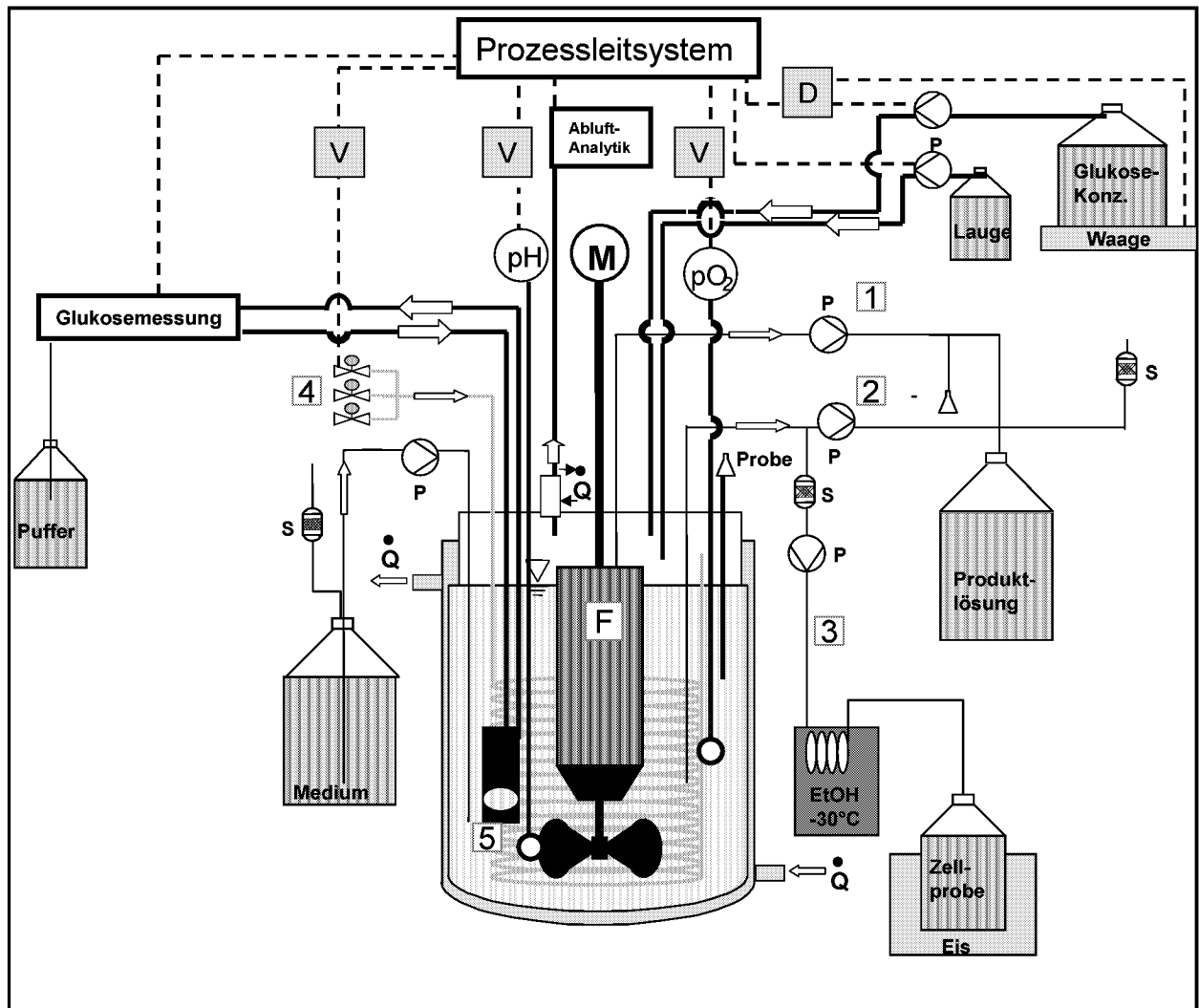


Abbildung M 3: Schematische Darstellung eines Rührkesselprozesses mit Maximalkonfiguration.

Die Temperierung des Bioreaktors auf 37°C erfolgt über den Doppelmantel mittels eines externen Wasserbades ($\dot{Q}$). Ein Propellerrührer, der über einen Elektromotor (M) auf 200 rpm angetrieben wird, dient zur Durchmischung des Reaktors. Die Medienzugabe erfolgt dicht am Propellerrührer, um eine optimale Verteilung und Durchmischung zu gewährleisten. Ein über dem Rührer eingebauter Metallgewebefilter (Spinfilter) mit einer Porengröße von 75 μm und einer effektiven Filterfläche von 100 cm^2 hält die meisten Zellen im Bioreaktor zurück.

Die Abfuhr des Kulturüberstandes erfolgt ohne Zellrückhaltung aus dem unteren Teil des Reaktors (2) und mit Zellrückhaltung aus dem Bereich innerhalb des Spinfilters (F) (1). Der Kulturüberstand wird in Ernteflaschen gesammelt und bei 4°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die schnelle Probennahme von Zellen für NMR-Untersuchungen erfolgt über eine zusätzliche Verzweigung (3). Medien- und Produktflaschen können während des Prozesses über Sterilkupplungen (S) befüllt bzw. entleert werden. Zu- und Abläufe werden über manuell gesteuerte Pumpen (P) betrieben.

Die Begasung der Kultur erfolgt über *Massflow*-Ventile (4). Das Gasgemisch (Luft, O_2 , N_2 und CO_2) gelangt über einen Sterilfilter in den Begasungsschlauch des Reaktors, der sich spiralförmig durch den gesamten Reaktor zieht und im *Headspace* endet. Die Gase diffundieren durch den Silikonschlauch ins Medium und werden durch die vom Propellerrührer erzeugte Strömung verteilt. Der Begasungsvolumenstrom wird im Verlauf eines Prozesses konstant zwischen 2 l h^{-1} und 5 l h^{-1} gehalten. Über den O_2 -Anteil in der Zuluft kann die Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) im Medium variiert werden. Die notwendige Gasmischung wird über die Prozessleitsystem mittels Variation der Öffnung der Ventile geregelt.

Die Abluft wird durch einen externen Wasserkreislauf (4°C) mittels Kondensation getrocknet und geht über einen Sterilfilter in die Abgasanalytik. Dort wird der Gehalt an O_2 durch paramagnetische Messung und der Gehalt an CO_2 mittels Infrarotmessung über eine Küvette bestimmt. Die Prozessleitsystem bilanziert Zugas und Abgas und berechnet online die volumetrische O_2 -Aufnahmerate (OUR) und die volumetrische CO_2 -Bildungsrate (CPR). Diese wird zusammen mit allen gemessenen Größen über einen Monitor angezeigt.

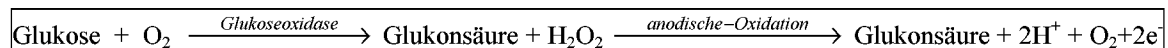
Zur Messung von pH und pO_2 sind in den Reaktor eine pH-Elektrode und eine pO_2 -Elektrode eingebaut. Das Signal der pH-Elektrode wird über einen Messverstärker (V) zum Prozessleitsystem weitergeleitet. Dieses steuert eine Pumpe an, über die Lauge ($0,3 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$) zudosiert werden kann, wenn der pH einen Grenzwert unterschreitet. Alternativ oder kaskadiert kann der pH auch über CO_2 im Zugas variiert werden.

CO_2 dient zudem dazu, vor allem in der Startphase der Kultur einen gewissen CO_2 -Partialdruck in der Kultur aufrecht zu erhalten. Deshalb wird mit dem Zugas konstant 5% CO_2 zudosiert.

Das Signal der pO_2 Elektrode wird über einen Messverstärker (V) zum Prozessleitsystem geleitet. Abhängig vom Sollwert für den pO_2 regelt das Prozessleitsystem dann die Öffnung der verschiedenen *Massflow*-Ventile.

Ist eine online closed-loop Regelung für Glukose implementiert, so wird alle 15 Minuten über eine Dialysesonde (5) in einem Kreislauf mit Akzeptorpuffer zellfreie Kulturlösung verdünnt zur Glukoseanalytik geführt. Der Puffer enthält Benzoat zur Vermeidung von Kontaminationen in der Analytik.

Die online-Analytik für Glukose basiert auf einer enzymatisch-amperometrischen Umsetzung der Glukose zu Glukonsäure und weiter einer anodischen Oxidation des H_2O_2 :



Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen, ist die Glukoseoxidase in einem kleinen Enzymmembranreaktor immobilisiert. So wird auch bei kleinen Glukosekonzentrationen eine für die amperometrische Reaktion ausreichend große Konzentration an H_2O_2 generiert. Das elektrische Messsignal dieser Reaktion wird zum Prozessleitsystem geleitet. Dieses regelt dann über einen Dosierregler (D) die Zudosierung des Glukosekonzentrats.

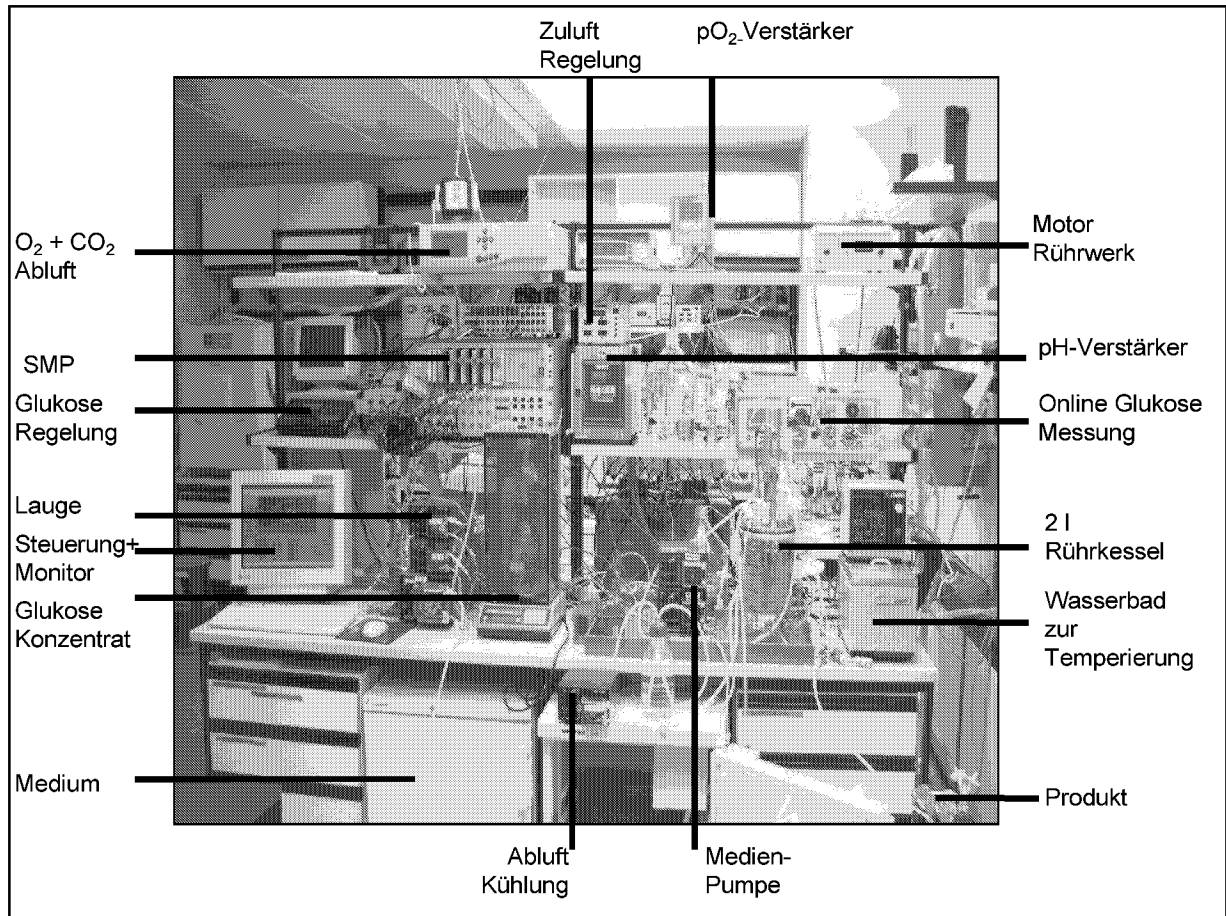


Abbildung M 4: Foto eines Rührkesselprozesses mit Maximalkonfiguration in Betrieb, ohne schnelle Zellprobenahme.

Durchführung der Kultur im Bioreaktor:

Zur Sterilisation wird der Bioreaktor für 3 h unter Standardbedingungen autoklaviert. Vor Beginn der eigentlichen Fermentation wird der Reaktor für mindestens 72 Stunden nur mit Medium betrieben, um die Sterilität zu überprüfen (Steriltest).

Zum Inokulieren des Bioreaktors werden 10-20 % des Arbeitsvolumens an Zellsuspension zugegeben. Die Zellzahl im Bioreaktor sollte mindestens 1×10^5 vitale Zellen ml^{-1} betragen, um eine lange *Lag*-Phase zu vermeiden. Zur Bestimmung der Zellzahl und der Konzentrationen anderer Metabolite, wird mindestens einmal täglich eine Probe aus dem unteren Bereich des Kulturvolumens (mittels Anlegen eines Unterdrucks in der Probenahmeflasche) gezogen. Die Probenahmeflaschen werden steril über einer Flamme gewechselt.

Bei der kontinuierlichen Betriebsweise erfolgt die Anfangsphase der Kultivierung im Batch, bis eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6 - 2,0 \times 10^6$ Zellen ml^{-1} erreicht ist. Dann wird zu einer kontinuierlichen Betriebsweise übergegangen.

3.2 Prozessleitsystem

Kern des Prozessleitsystems ist ein Rechner mit einem Pentium Prozessor.

Sämtliche Regelungen und Steuerungen, sowie Aufzeichnungen und Darstellungen von Messgrößen werden durch die Prozessleitsoftware „*LabVIEW*“ realisiert. *LabVIEW* ist eine graphische Entwicklungsumgebung für die Mess- und Automatisierungstechnik.

Die Software wurde auf die Anforderungen der durchgeführten Prozesse spezifisch angepasst.

Die Benutzeroberfläche der Software erlaubt die Variation von Sollwerten, Regelparametern und Graphikdarstellungen durch den Benutzer, zum Teil auch während des Prozesses.

Die so gewählten Einstellungen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Prozesse sind in **Anhang 2** aufgeführt.

Folgende Parameter wurden in das Prozessleitsystem implementiert:

Geregelte Parameter:

- pO_2
- pH
- Glukosekonzentration

Gesteuerte Parameter:

- Zusammensetzung Zugas
- Gasfluss

Erfasste Parameter:

- pO_2
- pH
- Zusammensetzung Zugas
- Abgaszusammensetzung (O_2 und CO_2)
- Glukosekonzentration

Berechnete Größen:

- OUR
- CPR

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Zellzahl und Vitalität

Um die Entwicklung einer Kultur gut verfolgen zu können, ist es wichtig regelmäßig Zellzahl und Vitalität zu bestimmen.

Die Zellzahl wird mittels Zählkammer und elektronischem Zählgerät bestimmt.

Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer (Hämocytometer)

Bei der Neubauer-Kammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, der durch ein eingraviertes Netzraster in Großquadrate eingeteilt ist. In Verbindung mit dem dazugehörigen Deckglas, ergibt sich durch den Abstand ein definiertes Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ pro Großquadrat.

Die vorverdünnte Probe wird 1:2 mit Erytrosin-B-Lösung verdünnt. Erytrosin-B ist ein anionischer Farbstoff mit einer Affinität zu Plasmaproteinen der Zellen. Die intakte Zellwand von vitalen Zellen verhindert ein Eindringen des Farbstoffs in die Zellen, so dass nur tote Zellen angefärbt werden.

Die Zellen aus 2 x 4 Großquadraten werden gezählt, und dann zur Mittelwertbildung herangezogen. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Verdünnung der Probe, wird der erhaltene Wert mit 10^4 multipliziert.

$$X = \frac{N \cdot F \cdot 10^4}{GQ}$$

X..... Zellkonzentration [ml⁻¹]
N..... Anzahl gezählter Zellen insgesamt
F..... Verdünnungsfaktor
GQ..... Anzahl ausgezählter Großquadrate

Aus dem Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl lässt sich die Vitalität der Probe ermitteln. Die Angabe der Vitalität erfolgt im allgemeinen in Prozent.

$$Vitalität = \frac{Lebendzellzahl}{Gesamtzellzahl} \cdot 100\%$$

Zellzahlbestimmung mit dem elektronischen Zählgerät (Casy Cell Counter, Schärfe System)

Die Bestimmung der Zellzahl mit dem elektronischen Zählgerät beruht auf dem Prinzip der Widerstandsänderung. Die mit isotonischer Lösung verdünnte Probe wird dabei über eine Messkapillare mit definiertem Durchmesser geleitet. An der Kapillare ist eine Spannung an-

gelegt und durch die Widerstandsänderung, die durch eine intakte Zelle ausgelöst wird, verändert sich der Strom. Die dabei vom Gerät registrierten Impulse ergeben die Zellzahl. Aufgrund der unterschiedlichen Widerstandserhöhungen kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen liegen im Messbereich zwischen 10 µm und 40 µm. Mit dem elektronischen Zählgerät kann nicht nur die Zellzahl bestimmt werden, sondern auch das Volumen der Zellen.

3.3.2 Medienanalytik

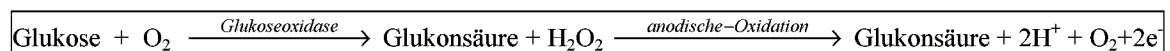
Zur Medienanalytik müssen zuvor aus allen Proben Zellen und Zelltrümmer abzentrifugiert werden.

Die Bestimmungen von Glukose, Glutamin, Glutamat und Laktat erfolgen enzymatisch-amperometrisch. Bei allen wird durch eine enzymatische Umsetzung des zu bestimmenden Stoffes H₂O₂ frei, welches dann an einer Platinelektrode zu H⁺, Sauerstoff und zwei Elektronen zerfällt. Die Elektronen erzeugen einen Stromfluss, der proportional zur Wasserstoffperoxid Konzentration und somit auch zur Substratkonzentration ist.

Glukose

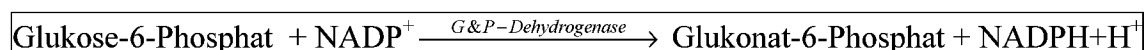
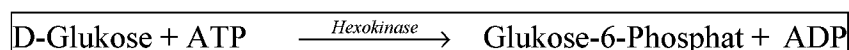
Die Glukosekonzentration im Medium wurde mittels dem EBIO compact von Eppendorf bestimmt:

Glukose trifft nach Durchtritt durch eine Membranschicht auf immobilisierte Glukoseoxidase (GOD) und wird zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt.



Die Bestimmung von Glukosekonzentrationen < 0,1 g l⁻¹ wurde mittels der UV-Methode zur Bestimmung von D-Glukose nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Boehringer Mannheim Kat. Nr 716251).

Der Test beruht auf enzymatischen Umsetzungen von D-Glukose zu Glukose-6-Phosphat und weiter zu Glukonat-6-Phosphat

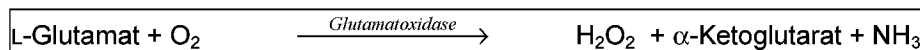


Die Menge an gebildetem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ist stöchiometrisch zur Menge an Glukose. Der Anstieg an NADPH wird schließlich über die Extinktion bei 340 nm ausgelesen.

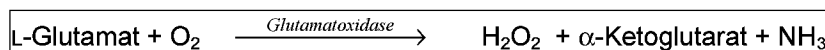
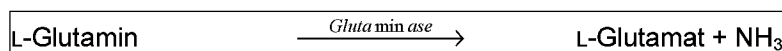
Glutamin und Glutamat

Glutamin und Glutamat wurden mittels einem biochemischen Analysator (Yellow Springs) gemessen. Der Analysator verwendet zwei Sensoren mit jeweils einer Enzymmembran. Der eine Sensor bestimmt den Glutamatgehalt, der andere den Glutamingehalt der Probe. Glutaminase und Glutamatoxidase liegen immobilisiert vor. Da die Glutaminmembran eine Enzymreaktionskette verwendet und die letzte Reaktion eine Glutamatmessung ist, wird vom Glutaminsensor auch freies Glutamat in der Probe gemessen. Nach Bestimmung der Glutamatkonzentration durch die Glutamatoxidase wird der Glutamatgehalt aus der Glutaminmessung vom Gesamtglutamatgehalt abgezogen.

Reaktion am Glutamatsensor:



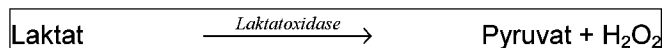
Reaktion am Glutaminsensor:



Laktat

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte ebenfalls mit einem biochemischen Analysator (Yellow Springs).

Laktat wird durch immobilisierte Laktatoxidase (LOD) zu Pyruvat und H_2O_2 umgesetzt.



Osmolarität

Die Bestimmung der Osmolarität einer Lösung ist eine vergleichende Messung. Der Gefrierpunkt reinen Wassers wird mit dem Gefrierpunkt der Lösung verglichen. Wasser gefriert bei einer Temperatur von 0°C, während eine Lösung mit einem Salzgehalt von 1 Osmol/l erst bei -1,858°C gefriert.

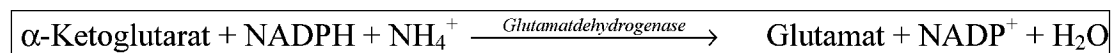
Die Probenlösung wird unter den Gefrierpunkte abgekühlt und dann mit Eiskristallen beimpft, was die Kristallisation der Probe einleitet. Anschließend steigt die Temperatur spontan bis auf die Kristallisationstemperatur an.

Anhand der Gefrierpunktverschiebung können die Osmolaritäten der Lösungen bestimmt werden.

Ammonium

Die Ammoniumkonzentration wurde mittels eines enzymatischen Tests bestimmt, der in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird.

Der Test basiert auf einer durch das Enzym Glutamatdehydrogenase (GDH) katalysierten Umsetzung von α -Ketoglutarat mit Ammonium zu Glutamat. Dabei wird NADPH verbraucht.



1 U Glutamatdehydrogenase reduziert in Anwesenheit von Ammonium 1 μM α -Ketoglutarat pro Minute bei einem pH-Wert von 7,3 und 25°C. Die durch die Oxidation des NADPH zu NADP^+ verursachte Abnahme der Absorption bei 340 nm ist proportional zur Ammoniumkonzentration in der Probe. Gemessen wird im *96-well-Reader* bei 340 nm.

Die gemessenen Extinktionen bei 340 nm der Standardverdünnungen werden gegen die jeweiligen Ammoniumkonzentrationen aufgetragen (**Abbildung M1**). Es ergibt sich die Standardgerade mit

$$y = m \cdot x + b$$

- y..... OD des Standards
- m..... Steigung des Standards
- x..... Standardkonzentration
- b..... Schnittpunkt des Standards mit der y-Achse (OD)

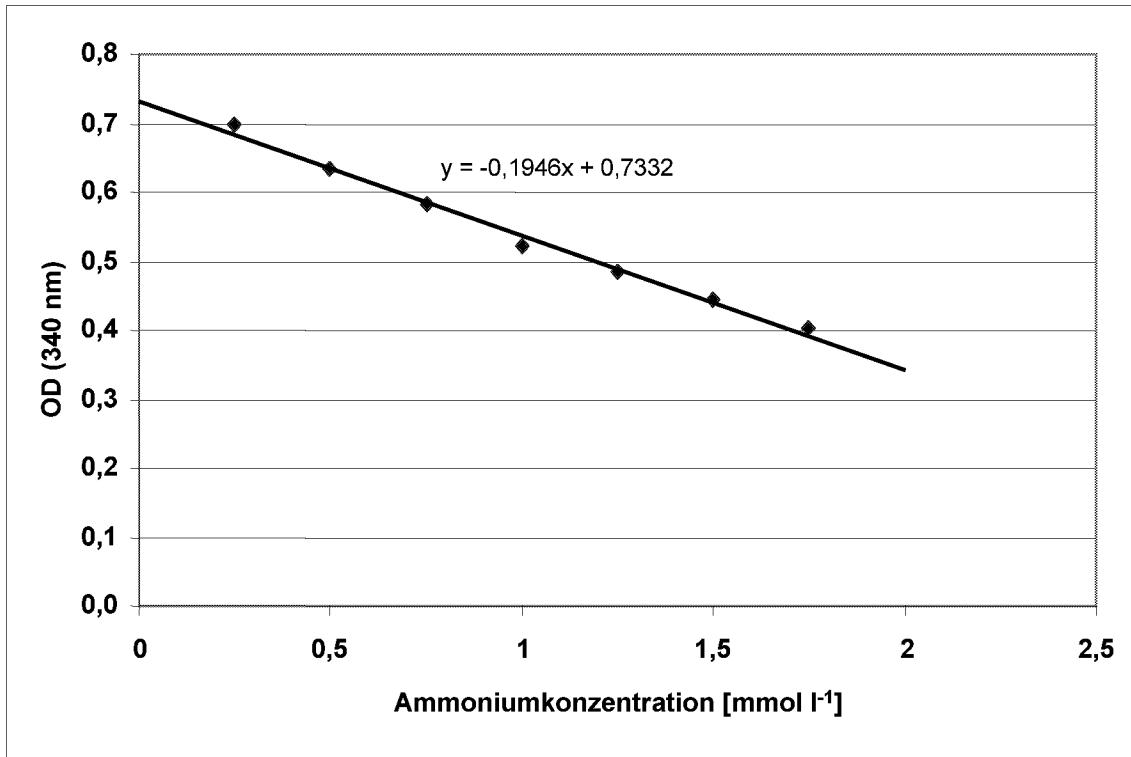


Abbildung M 5: Beispiel für die Ermittlung der Standardgeraden im Ammoniumtest.

Die Probenkonzentration wird nun über folgende Gleichung bestimmt:

$$c_{\text{Probe}} = - \left(\frac{OD_{\text{Probe}} - b}{m} * VF \right)$$

c_{Probe} Konzentration in der Probe [mmol l⁻¹]

OD_{Probe} Extinktion bei 340 nm nach Ablauf der Reaktion

b Schnittpunkt der Standardgeraden mit der y-Achse

m Steigung der Standardgeraden

VF Verdünnungsfaktor

Das detaillierte Versuchsprotokoll für den Ammoniumtest ist in **Anhang 3** beschrieben.

Aminosäuren

Die Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren ist aus dem zell- und proteinfreien Kulturüberstand mittels HPLC möglich.

Die Proteine aus den Kulturüberständen wurden dazu zunächst durch eine Trichloressigsäure (TCE) Fällung entfernt. Das Fällungsprotokoll ist in **Anhang 4** beschrieben.

Prinzip der Aminosäure-HPLC:

Die Proben werden mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert. Dabei reagiert die Aminosäure zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat.

Die Trennung der Aminosäuren erfolgt nun über eine Reversed-Phase-Chromatographie-Säule. Die unterschiedlichen Aminosäurederivate sind über die Anregung der Fluoreszenz bei 230 nm und Emission bei 455 nm detektierbar. Es zeigen sich *Peaks* nach den für die einzelnen Aminosäuren charakteristischen Verweilzeiten. Zur Bestimmung der Quantität der einzelnen Aminosäuren wird ein interner Standard benutzt.

Da OPA nur mit primären Aminosäuren reagiert, erfolgt die Konzentrationsbestimmung des Prolins mit 9-Fluorenylmethylchloroformat in Acetonitril (FMOC).

Parameter der Aminosäure-HPLC sind detailliert im **Anhang 5** aufgelistet.

3.3.3 Produktanalytik

SDS-Page

Zur Analyse des Gesamtproteins im Kulturüberstand, wurde eine Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Als Gele wurden Tris-Acetate gepufferte 3-8% NuPAGE® Gele verwendet. Die SDS-PAGE wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Als Molekulargewichtstandard wurde SeeBlue Plus2® von Invitrogen benutzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers mit Coomassie-Blue gefärbt.

Immunoblot

Zur Detektion von IgG-Fc im Kulturüberstand, wurde im Anschluss an die SDS-PAGE Western-blotting mit nicht gefärbten Gelen durchgeführt.

Dazu wurde das Protein elektrophoretisch auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen. Die Immundetektion des auf der Membran fixierten Proteins geschah dann durch den im ELISA verwendeten Ziege-anti-Maus-IgG-AP Antikörper. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mittels BCIP/NBT. Das detaillierte Versuchsprotokoll zur Durchführung des Immunoblots ist in **Anhang 6** wiedergegeben.

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der ELISA eignet sich zur Konzentrationsbestimmung von Antikörpern. Es ist möglich, Konzentrationen ab 0,2- 1,0 µg/ml mit diesem Test nachzuweisen.

Das von den Zellen sekretierte MUC1-IgG2a kann somit quantitativ erfasst werden.

Der IgG2a- Teil bindet spezifisch an den Beschichtungsantikörper (*Ziege-anti-Maus-IgG*) auf der Mikrotiterplatte und kann über einen Konjugatantikörper, der alkaline Phosphatase (AP) kovalent gebunden hat (*Ziege-anti-Maus-IgG-AP*), nachgewiesen werden. Der Konjugatantikörper bindet spezifisch an IgG und somit ist die gebundene Enzymmenge proportional zur gebundenen Menge an MUC1-IgG2a. Durch IgG2a-haltige Proteinfragmente kann eine zu hohe Konzentration ermittelt werden. Deshalb ist darauf zu achten, möglichst nur Kulturüberstände zum ELISA einzusetzen, die von Proben mit guter Vitalität stammen und möglichst nicht oft eingefroren und aufgetaut wurden.

Durch Zugabe von p-Nitrophenolphosphat entsteht durch die enzymatische Abspaltung des Phosphatrestes eine Gelbfärbung des Nitrophenols, die photometrisch bestimmt werden kann. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zur Konzentration des Konjugatantikörpers. Die Messwerte werden logarithmisch aufgetragen (**Abbildung M2**), wobei die Standardkurve zusammen mit den Probewerten in einem Diagramm dargestellt wird. Beide Kurven sollten im linearen Bereich die gleiche Steigung haben. Nach Ermittlung der Regressionsgerade im linearen Bereich des Standards, kann die Produktkonzentration der Proben berechnet werden, da die OD-Unterschiede zwischen Standard und Proben mit bekannter Vorverdünnung auf die unterschiedliche Produktkonzentration in den verglichenen Näpfen zurückzuführen ist.

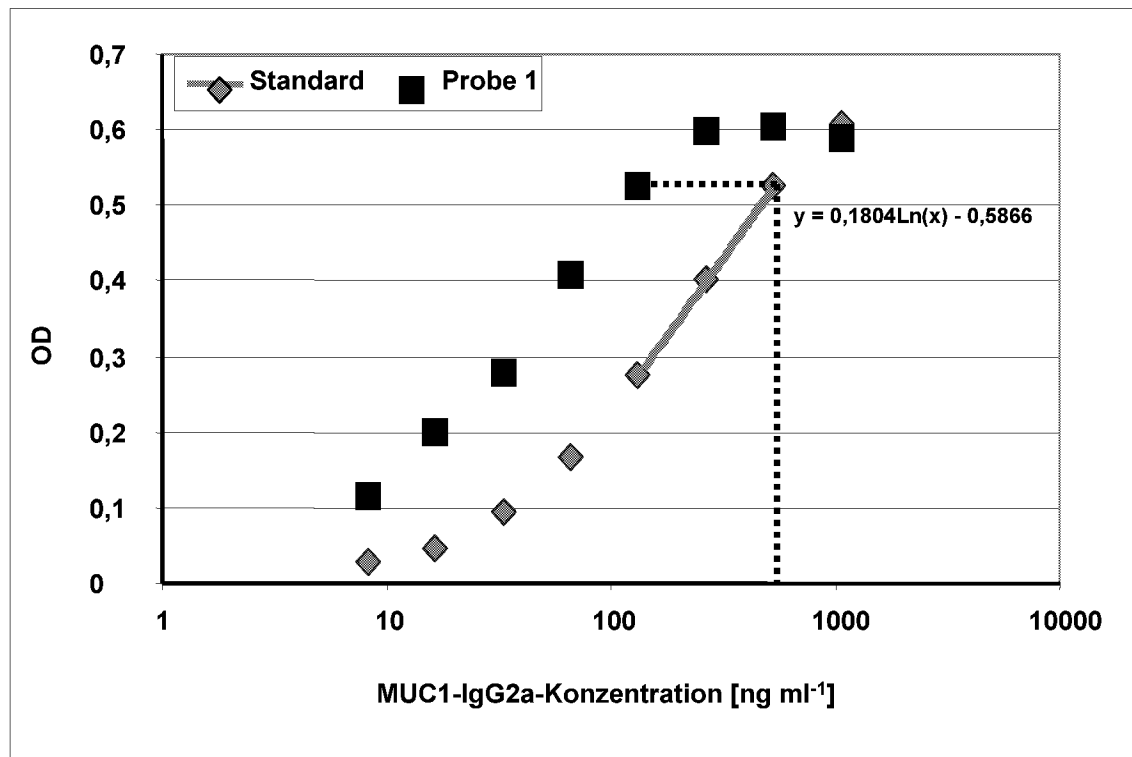


Abbildung M 6. Beispiel für die Auswertung des ELISA.

Die Bestimmung der Regressionsgerade erfolgt durch:

$$y = m \cdot \ln(x) - b$$

- y..... OD des Standards
- m..... Steigung des Standardgeraden
- x..... Standardkonzentration [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
- b..... Schnittpunkt des Standards mit der y-Achse (OD)

Die Probenkonzentration wird nun für Messpunkte im linearen Bereich bestimmt:

$$c_{\text{Probe}} = \exp\left(\frac{OD_{\text{Probe}} + b}{m}\right)$$

- c_{Probe} Produktkonzentration in der Probe [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
- b.....Schnittpunkt des Standards mit der Y-Achse
- m.....Steigung des Standards

Das Versuchsprotokoll für den ELISA findet sich in **Anhang 7** wieder.

Bestimmung der MUC2 Produktkonzentration mittels Fluoreszenzdetektion

Testprinzip:

Das von der CHO-Zelle produzierte MUC2-GFP-C-term besitzt durch die Anbindung des GFP- (*green fluorescent protein*) Teils eine Autofluoreszenz. Regt man das Protein mit Licht der Wellenlänge 485 nm an, kann nach 1s Verzögerungszeit die Emission des Lichts bei 535 nm gemessen werden.

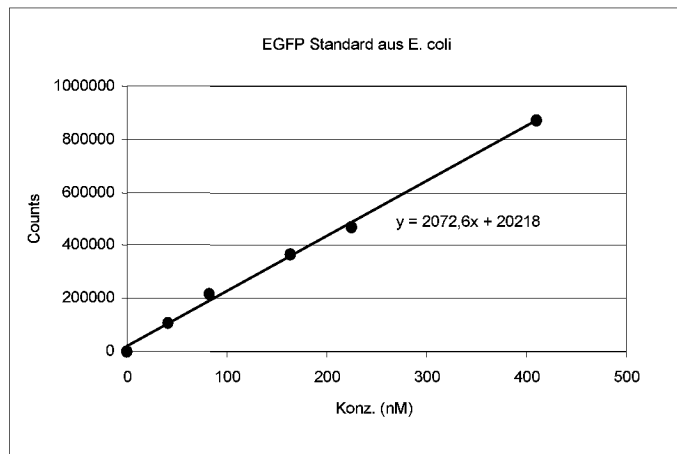


Abbildung M 7: Beispiel für die Ermittlung der Standardgerade beim Fluoreszenztest.

Um aus den gemessenen Fluoreszenzen der Proben auf Produktkonzentrationen schließen zu können, wird eine Standardgerade mit

EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) aus *E. Coli* aufgenommen (**Abbildung M7**).

In Voruntersuchungen hat sich gezeigt, dass die Konzentration des Proteins gut mit der Intensität der Fluoreszenz korreliert. Angeregt und gemessen wird im *96 well reader*.

Der ermittelte Blindwert des Mediums wird von allen gemessenen Werten abgezogen, bevor die ermittelten Fluoreszenzintensitäten des Standards gegen die Konzentrationen aufgetragen werden.

Es ergibt sich die Standardgerade mit

$$y = m \cdot x + b$$

y..... Fluoreszenzintensität des Standards
 m..... Steigung des Standards
 x..... Standardkonzentration
 b..... Schnittpunkt des Standards mit der y-Achse

Die Probenkonzentration wird nun über folgende Gleichung bestimmt:

$$c_{\text{Probe}} = \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Probe}} - b}{m} * VF$$

c_{Probe}.....Konzentration in der Probe
 Fluoreszenz_{Probe}.....Fluoreszenzintensität bei 535 nm nach 1 Sekunde
 b.....Schnittpunkt der Standardgeraden mit der y-Achse
 m.....Steigung der Standardgeraden
 VF.....Verdünnungsfaktor

Das Versuchsprotokoll für diese Analytik ist in **Anhang 8** wiedergegeben.

3.3.4 Sonstige Methoden

^{13}C -Markierungsexperiment

Im Rahmen des ^{13}C -Markierungsexperimentes wurden Zellen nach ~100 h mit Zufütterung von $5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ }^{13}\text{C}_3$ -markiertem Laktat mittels schneller Probenahme aus dem Bioreaktor entnommen.

Dazu wird Kulturüberstand mit einer Pumprate von 60 ml min^{-1} durch einen in -30°C kaltem 70% EtOH liegendem 2 Meter langen Teflonschlauch (Wanddicke 1 mm) in einen auf Eis gelagerten Glasbehälter gepumpt. Dies ermöglicht die Abkühlung von 150 ml Kulturüberstand von 37°C auf $1,5^\circ\text{C}$ innerhalb von 2,5 min. Somit ist ein für diese Applikation ausreichend schnelles Abstoppen des Zellmetabolismus ohne Schädigung der Zellen möglich.

Für Poolmessungen von Zentralmetaboliten müssten die Abkühlzeit und -temperatur jedoch deutlich reduziert werden, da die Vorgänge im Zentralmetabolismus wesentlich schneller ablaufen als der Aufbau von Biomasse, wie Nukleinsäuren und Protein, welche hier im Anschluss untersucht wurden.

Die weitere Probenaufarbeitung vor der NMR-Messung ist in **Anhang 9** beschrieben.

2D- ^{13}C -NMR

Die NMR wurde wie in [45] beschrieben durchgeführt.

3.4 Mathematische Methoden

Die prozesskinetische Betrachtung der beschriebenen Bioprozesse basiert auf der Berechnung metabolischer Raten nach den von Monod entwickelten Modellen:

3.4.1 Prozesskinetik in Batch Kultur

Wachstum

Zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ können Biomasse oder vitale Zelldichten herangezogen werden. Für Säugerzellkulturen ist die Bestimmung der vitalen Zellzahl leichter durchführbar und wird somit zur Ermittlung der Wachstumsrate genutzt.

Die Wachstumsrate gibt die relative Wachstumsgeschwindigkeit bezogen auf die Zellzahl an.

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

Gleichung 1

μ spezifische Wachstumsrate [h⁻¹]
 t Zeit [h]
 X absolute vitale Zellzahl [c_v]

für die Zunahme der vitalen Zellzahl gilt:

$$X_2 = X_1 \cdot e^{\mu \cdot (t_2 - t_1)}$$

Gleichung 2

Nach μ aufgelöst ergibt sich:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Gleichung 3

Die Verdopplungszeit zum Erreichen von $x_2 = 2x_1$ berechnet sich wie folgt:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Gleichung 4

t_d Verdopplungszeit [h]
 μ spezifische Wachstumsrate [h⁻¹]

Zur Ermittlung der mittleren Zellzahl $\bar{X}$ im Zeitintervall Δt bietet sich aufgrund des exponentiellen Wachstums der Zellen die Verwendung des logarithmischen Mittels an:

$$\bar{X} = \frac{X_2 - X_1}{\ln X_2 - \ln X_1}$$

Gleichung 5

$\bar{X}$ mittlere absolute Zellzahl [c_v]

Substratverbrauch und Produktivität im Batch

Spezifische Verbrauchsrate beschreiben den Verbrauch an Substrat bezogen auf eine definierte Zellzahl. Es gilt:

$$q_s = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{\bar{X}}$$

Gleichung 6

q_s	spezifische Substratverbrauchsrate	[mmol cv ⁻¹ h ⁻¹]
S	Substratmenge	[mmol]
$\bar{X}$	mittlere absolute vitale Zellzahl	[c _v]

Nach Integration der Gleichung 6 und Berücksichtigung der Gleichung 5 ergibt sich für die mittlere spezifische Substratverbrauchsrate in Δt :

$$q_s = \left(\frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} \right) \cdot \frac{1}{\bar{X}}$$

Gleichung 7

Die spezifische Produktivität im Batch berechnet sich analog zur spezifischen Substratverbrauchsrate

$$q_p = \left(\frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} \right) \cdot \frac{1}{\bar{X}}$$

Gleichung 8

q_p	spezifische Produktivität	[$\mu\text{g c}_v^{-1} \text{h}^{-1}$]
$P_{1,2}$	Produktmenge zum Zeitpunkt $t_{1,2}$	[μg]

Raum-Zeit Ausbeute im Batch

Um die gebildete Menge an Produkt pro Volumeneinheit und Zeit darzustellen, wird die Raum-Zeit Ausbeute (RZA) ermittelt. Dabei handelt es sich um eine volumetrische Produktivität. Wird die Produktkonzentration P analog Gleichung 5 zeitlich gemittelt gilt für die RZA :

$$RZA = \frac{(p_2 - p_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Gleichung 9

RZA	Raum-Zeit Ausbeute	[mg d ⁻¹ l ⁻¹]
t	Zeit	[d]
$p_{1,2}$	Produktkonzentration zur Zeit $t_{1,2}$	[mg l ⁻¹]

3.4.2 Prozesskinetik im Fed-Batch

Im Fed-Batch kommt es, im Unterschied zum Batch, zu einer Variation des Kulturvolumens über die Zeit, sowie zu einer Zufuhr an Substrat. Dies muss bei der Berechnung der Verbrauchsrate berücksichtigt werden.

Exemplarisch soll für die Berechnung der Substratverbrauchsrate im Fed-Batch gezeigt werden, wie diese Veränderungen einfließen:

$$q_S = \left[\frac{(S_1 \cdot V_{R_1} + F_{in} \cdot S_{in} \cdot (t_2 - t_1)) - (S_2 \cdot (V_{R_1} + F \cdot (t_2 - t_1)))}{(t_2 - t_1)} \right] \cdot \frac{1}{\bar{X}} \quad \text{Gleichung 10}$$

q_S	spezifische Substratverbrauchsrate	$[\text{mmol cv}^{-1} \text{ h}^{-1}]$
S_1	Substratkonzentration für t_1	$[\text{mmol l}^{-1}]$
S_2	Substratkonzentration für t_2	$[\text{mmol l}^{-1}]$
S_{in}	Substratkonzentration im Medienzulauf	$[\text{mmol l}^{-1}]$
F_{in}	Volumenstrom im Medienzulauf	$[\text{l h}^{-1}]$
V_{R1}	Reaktorvolumen bei t_1	$[\text{l}]$
V_{R2}	Reaktorvolumen bei t_2	$[\text{l}]$

3.4.3 Prozesskinetik in kontinuierlicher Perfusionskultur

Bei kontinuierlich betriebenen Reaktoren ist der Volumenstrom in den Reaktor (frisch zugefüttertes Medium) gleich dem Volumenstrom aus dem Reaktor (Produktlösung). Das Kulturvolumen ist idealerweise konstant. Bei der Berechnung metabolischer Raten muss daher immer die Durchflussrate D mitberücksichtigt werden.

Durchflussrate und Verweilzeit

Die Durchflussrate berechnet sich aus dem Quotient von Fluss und Reaktorvolumen

$$D = \frac{F}{V_R} \quad \text{Gleichung 11}$$

D	Durchflussrate	$[\text{h}^{-1}]$
F	Fluss	$[\text{l h}^{-1}]$
V_R	Kulturvolumen	$[\text{l}]$

Die durchschnittliche Aufenthaltszeit eines Volumenelements im Reaktor ist als die Verweilzeit τ definiert.

$$\tau = \frac{V_R}{F} \quad \text{Gleichung 12}$$

τ	Verweilzeit	$[\text{h}]$
--------------	-------------	--------------

Die Durchflussrate ist der Kehrwert der Verweilzeit.

In kontinuierlichen Perfusionskulturen ist eine Zellrückhaltung realisiert. Die Rückhalterate R errechnet sich über:

$$R = \left(1 - \frac{x_A}{x_F} \right)$$

Gleichung 13

R	Zellrückhalterate	
x_A	Zellzahl im Ablauf	$[c_v \text{ ml}^{-1}]$
x_F	Zellzahl in der Kultur	$[c_v \text{ ml}^{-1}]$

Für einen kontinuierlichen Perforationsreaktor, welcher sich im steady-state mit gleichbleibender Zelldichte befindet gilt:

$$\mu = D \cdot (1 - R)$$

Gleichung 14a

Da sich der Bioreaktor jedoch die meiste Zeit im Übergangszustand (mit veränderlicher Zelldichte) mit unvollständiger Zellrückhaltung bei konstantem Volumen befindet, wurde die spezifische Wachstumsrate mittels folgender Gleichung bestimmt:

$$\mu = \left[\frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} + (F \cdot (1 - R) \cdot \bar{x}) \right] \cdot \frac{1}{\bar{X}}$$

Gleichung 14b

$\bar{x}$	mittlere vitale Zelldichte	$[c_v \text{ l}^{-1}]$
-----------------	----------------------------	------------------------

Substratverbrauch und Produktivität

Für den Substratverbrauch in kontinuierlichen Systemen bei konstanten Kulturvolumina gilt:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (\bar{S} - S_i) - Q_s$$

Gleichung 15

S_i	Substratkonzentration im Zulauf	$[\text{mmol l}^{-1}]$
$\bar{S}$...	mittlere Substratkonzentration im Reaktor	$[\text{mmol l}^{-1}]$
Q_s ...	volumetrische Verbrauchsrate	$[\text{mmol h}^{-1}]$

Nach Auflösen der Gleichung nach Q_s ergibt sich in Δt :

$$Q_s = D \cdot (\bar{S} - S_i) + \left(\frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} \right)$$

Gleichung 16

Um nun die spezifische Substratverbrauchsrate zu berechnen, wird noch die Zellzahl in Form des logarithmischen Mittels mit einbezogen.

$$q_s = \frac{1}{\bar{X}} \cdot \left[D \cdot (\bar{S} - S_0) + \left(\frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} \right) \right]$$

Gleichung 17

q_s	spezifische Substratverbrauchsrate	$[\text{mmol } c_v^{-1} \text{ h}^{-1}]$
S_1	Substratkonzentration für t_1	$[\text{mmol l}^{-1}]$
S_2	Substratkonzentration für t_2	$[\text{mmol l}^{-1}]$

Die spezifische Produktivität errechnet sich analog zur Substratverbrauchsrate:

$$q_P = \frac{1}{\bar{X}} \cdot \left[D \cdot \bar{P} + \left(\frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} \right) \right]$$

Gleichung 18

q_P	spezifische Produktbildungsrate	[mg c_v^{-1} h ⁻¹]
P_1	Produktkonzentration für t_1	[mg l ⁻¹]
P_2	Produktkonzentration für t_2	[mg l ⁻¹]
$\bar{P}$	mittlere Produktkonzentration im Reaktor	[mg l ⁻¹]

Die momentane Raum-Zeit Ausbeute in kontinuierlicher Perfusionskultur berechnet sich aus:

$$RZA = \frac{\bar{P} \cdot D}{V_R} \cdot 24$$

Gleichung 19

RZA...	Raum-Zeit Ausbeute	[mg d ⁻¹ l ⁻¹]
--------	--------------------	---------------------------------------

Die Verbrauchsdaten für gasförmige Substrate wurden in kontinuierlicher Perfusionskultur aus der Massenbilanz zwischen Zu- und Abgas unter Berücksichtigung von Volumenänderungen bedingt durch die Fixierung oder Entstehung idealer Gase bestimmt. Hierbei wurde der Austrag der Gase mit der Flüssigkeit jedoch nicht berücksichtigt, da entsprechende Messungen des pCO₂ aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten. Dies dürfte dazu führen, dass für die qCPR (**Gleichung 21**) und den RQ (**Gleichung 24**) zu kleine Werte angenommen werden, was im Ergebnisteil zu berücksichtigen ist.

Die Sauerstoffaufnahme (OUR = Q_{O2}) berechnet sich wie folgt:

$$Q_{O_2} = \frac{1000}{V_{mol}} \cdot \left[F_{in} \cdot O_{2in} - \left(O_{2off} \cdot \frac{(100 - O_{2in} - CO_{2in} + O_{2off} + CO_{2off})}{100} \cdot F_{in} \right) \right]$$

Gleichung 20

OUR = Q _{O2}	Sauerstoffaufnahme	[mmol h ⁻¹]
V_{mol}	Molvolumen (hier 22,4)	[l mol ⁻¹]
F_{in}	Volumenstrom des Gasflusses in die Kultur	[l h ⁻¹]
$O_{2in/off}$	Anteil an O ₂ im Zu-/Abgas	[%]
$CO_{2in/off}$	Anteil an CO ₂ im Zu-/Abgas	[%]

Die zellspezifische OUR (qOUR) ist analog zu Gleichung 17:

$$qOUR = \frac{1}{\bar{X}} \cdot OUR$$

[mmol c_v^{-1} h⁻¹]

Gleichung 21

Die volumetrische CO₂-Produktionsrate (CPR = Q_{CO2}) berechnet sich analog Gleichung 20:

$$Q_{CO_2} = \frac{1000}{V_{mol}} \cdot \left[F_{in} \cdot CO_{2in} - \left(CO_{2off} \cdot \frac{(100 - O_{2in} - CO_{2in} + O_{2off} + CO_{2off})}{100} \cdot F_{in} \right) \right]$$

Gleichung 22

CPR = Q _{CO2}	volumetrische Kohlendioxidbildung	[mmol h ⁻¹]
------------------------------	-----------------------------------	-------------------------

Die zellspezifische CPR ist analog zu Gleichung 21:

$$qCPR = \frac{1}{\bar{X}} \cdot CPR$$

Gleichung 23

qCPR...zellspezifische CPR

[mmol c_v^{-1} h⁻¹]

Der respiratorische Quotient (RQ) gibt das Verhältnis von qCPR zu qOUR an. Daher gilt:

$$RQ = \frac{qCPR}{qOUR}$$

Gleichung 24

RQ.....respiratorischer Quotient

[mmol mmol⁻¹]

Für alle betrachteten Verfahrensweisen lassen sich auch Ertragskoeffizienten (Y für engl. Yield) berechnen. Diese geben das Verhältnis von spezifischen Verbrauchs- oder Bildungsra-
ten eines Substrates bzw. Metaboliten zu den spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten
eines anderen Substrates an. Die Ertragskoeffizienten berechnen sich daher aus den jeweiligen
Quotienten der spezifischen Raten:

$$Y_{A/B} = \frac{qA}{qB}$$

Gleichung 25

Y_{A/B}..... Ertragskoeffizient A/B

qA..... zellspezifische Verbrauchs- bzw. Bildungsrate für Substrat A

qB..... zellspezifische Verbrauchs- bzw. Bildungsrate für Substrat B

Aufgrund von Verbindungen im Zellstoffwechsel lassen sich Ertragskoeffizienten verknüpfen
und erlauben so, weitere Aussagen zum Stoffwechsel zu treffen. Dieses Prinzip wurde ver-
wendet, um den Anteil an verbrauchter Glukose zu bestimmen, der für die Bildung von ATP
genutzt wurde (Y_{Glc-Energy/Glc}). Dabei fließt Glukose unter Bildung von ATP entweder in Lak-
tat (Y_{Glc/Lac} ≤ 2) ein oder wird unter Sauerstoffverbrauch veratmet (Y_{O2/Glc} ≤ 6).

Daher berechnet sich Y_{Glc-Energy/Glc} sich wie folgt [46]:

$$Y_{Glc-Energy/Glc} = \frac{1}{2} Y_{Lac/Glc} + \frac{1}{6} Y_{OUR/Glc}$$

Gleichung 26

Y_{Glc-Energy/Glc}.....Anteil zur ATP-Bildung genutzter Glukose [mmol mmol⁻¹]

Die Veränderung spezifischer Substratverbrauchsrate kann Hinweise geben auf vorliegende
Substratlimitierungen. Daher kann der Grad der Limitierung, hier am Beispiel der Glukoseli-
mitierung gezeigt, wie folgt definiert werden [47]:

$$DGL = \frac{qGlc}{qGlc_{max}}$$

Gleichung 27

DGL..... Grad der Glukoselimitierung

qGlc..... spezifische Glukoseaufnahme

qGlc_{max}..... maximale beobachtete spezifische
Glukoseaufnahme

[0;1]

[mmol c_v^{-1} h⁻¹]

[mmol c_v^{-1} h⁻¹]

4 Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von MUC1-IgG2a nach herkömmlicher Verfahrensweise

4.1 Allgemeine Anforderungen an die Bioprozessentwicklung

Zielsetzung der Arbeit war es, ausgehend von der rekombinanten CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie als Expressionssystem einen industriell anwendbaren Bioprozess zur Herstellung von MUC1-IgG2a zu entwickeln, mit Schwerpunkt auf den *upstream* Prozess, also die Entwicklung bis zum Produktionsprozess größeren Maßstabs. Mit der Vorgabe der möglichen industriellen Anwendbarkeit des Bioprozesses waren die Hauptziele der Prozessentwicklung bereits festgelegt. Diese bestimmten die Vorgehensweise und die Wahl der Methoden und Apparate im Rahmen der Prozessentwicklung maßgeblich.

In besonderem Maße hat das Ziel, die Steigerung der zellspezifischen Produktivität und verbunden damit der Produktkonzentration in der Kultur zu steigern diese Prozessentwicklung bestimmt. Hier kann der *upstream* Prozess entscheidend zur Wirtschaftlichkeit beitragen. Nicht nur eine Optimierung der Kultivierungsparameter kann die Produktivität der Zellen steigern, sondern möglicherweise auch die Realisierung eines optimierten Zellstoffwechsels. Die Etablierung einer Produktquantifizierung sowie die Analyse der Produktqualität sind essentiell für eine Prozessentwicklung. Daher soll im folgenden Kapitel zunächst auf die Ergebnisse dieser Etablierung eingegangen werden.

4.1.1 Produktanalytik

Ohne die Möglichkeit die Produktkonzentration im Kulturüberstand bestimmen zu können, lässt sich eine Bioprozessentwicklung nicht durchführen. Daher wurde zunächst eine Analytik zur Quantifizierung von MUC1-IgG2a etabliert. Welche Methode dazu im Einzelfall geeignet ist, hängt von diversen Faktoren ab. So spielen Analysedauer, Kosten für Verbrauchsmittel und Apparatur, notwendige Sensitivität und Probendurchsatz eine Rolle.

Zur Quantifizierung der täglichen Proben von MUC1-IgG2a in Kulturüberständen erschienen sowohl eine HPLC unter Verwendung einer Protein-G Säule, als auch ein ELISA als geeignet, da die notwendigen Einrichtungen hierfür gegeben waren und diese Methoden die Analyse von über 50 Proben am Tag reproduzierbar ermöglichen ohne hohe Verbrauchskosten. Die theoretische Funktionsweise der Protein-G HPLC beruht auf der Bindung des IgG2a-Fc Teil von MUC1-IgG2a an Protein-G. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unabhängig vom Lösungsmittel (Kulturmedium, PBS), der Produktreinheit und der Produktkonzentration, dass MUC1-IgG2a nicht an Protein-G bindet (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine sterische Maskierung des IgG2a-Fc Teil durch den großen MUC1 Teil, welcher in hohem Maße glykosyliert ist, zurückzuführen sein. Aus diesem Grund erschien die Quantifizierung von MUC1-IgG2a mittels Protein-G HPLC als nicht realisierbar.

Es konnte hingegen ein ELISA entwickelt werden, der dies ermöglicht (siehe Kapitel 3.3.4).

Produktquantifizierung mittels ELISA

Da für die Berechnung der MUC1-IgG2a Konzentration ein interner Standard aus MUC1-IgG2a mit bekannter Konzentration nötig ist, musste für die Entwicklung des ELISA zunächst MUC1-IgG2a mit bekannter Konzentration bereitgestellt werden. Dies konnte durch eine nicht weiter optimierte kontinuierliche Kultur mit Zellrückhaltung in einem 2 Liter Rührkessel Bioreaktor unter Verwendung von ProCHO4-CDM als Kulturmedium realisiert werden. Der so gewonnene Kulturüberstand wurde im Mucin-Biologie Labor von Prof. Hansson an der Universität Göteborg aufgereinigt. Die Konzentration des aufgereinigten Standards wurde dort mittels Western Blotting sowie mittels Quantifizierung der aus dem MUC1-IgG2a durch Edman-Sequenzierung gewonnenen Aminosäuren durchgeführt. Mit dem so gewonnenen Standard konnte der in Kapitel 3.3.4 beschriebene ELISA entwickelt werden.

Dieser zeichnet sich aus durch:

- Gute Reproduzierbarkeit mit einem Fehler von nur etwa $1\mu\text{g ml}^{-1}$.
- Sämtliche notwendigen Antikörper sind kommerziell erhältlich, was die Generierung und Aufreinigung MUC1-IgG2a spezifischer Antikörper erübrigt. Somit können auch Fehler durch Verunreinigungen aus der Antikörperlösung ausgeschlossen werden.
- Die Quantifizierung von MUC1-IgG2a ist weitgehend unabhängig von der Glykosylierung, da die verwendeten Antikörper an den IgG2a-Fc Teil binden (dies ist im Gegensatz zur Bindung von ProteinG an den Fc-Teil noch möglich), nicht aber an den MUC1 Teil des Fusionsproteins. Dies ist von Bedeutung, da so mögliche Schwankungen in der Proteinglykosylierung keinen Einfluss auf die Quantifizierung des Produkts haben.

Erste Quantifizierungen von MUC1-IgG2a aus Kulturüberständen von Batch Kulturen zeigten, dass die Konzentration an MUC1-IgG2a gegen Ende des Batch scheinbar exponentiell ansteigt (**Abbildung 1; A**). So wurde vor Abbruch der Kultur ein Produkttiter von $297\mu\text{g ml}^{-1}$ bestimmt. Auffällig war jedoch, dass dieser Anstieg parallel zum Rückgang der Vitalität in der Kultur erfolgte (**Abbildung 1; C**). Dies ließ bereits vermuten, dass möglicherweise ein falsch positives Signal evtl. durch Fc-haltige Degradationsfragmente von MUC1-IgG2a vorliegen könnte (**Abbildung 1, A**; Werte in Klammern). An dieser Stelle wird die Bedeutung der Überwachung der Produktqualität offensichtlich. Um nun qualitativ aufzuzeigen, welche Proteine das Signal im ELISA erzeugen, wurde ein Immunoblot basierend auf den im ELISA genutzten Detektionsantikörper etabliert (siehe Kapitel 3.3.4).

Bestimmung der Produktqualität

Neben der Analyse des Gesamtproteins im Kulturüberstand ist also zunächst die qualitative Bestimmung der IgG-reaktiven Proteinfragmente von Bedeutung. Der hierzu entwickelte Immunoblot (siehe Kapitel 3.3.4) zeigt, dass parallel zur Abnahme der Vitalität in der Kultur der Anteil IgG-reaktiver Proteinfragmente steigt, während die dem MUC1-IgG2a entsprechende Proteinbande bei 170 kDa etwas schwächer wird (**Abbildung 1, B**). Die Fragmente zeigen sich zum einen in distinkten Banden < 40 kDa, was auf Proteaseaktivität im Kulturüberstand hindeuten könnte. Zum anderen entsteht ein „Schmier“ von nicht distinkten Proteinbanden. Dies könnte neben Proteaseaktivität auch auf gesteigerte Glykosidaseaktivität hindeuten. Protease- und Glykosidaseaktivität in tierischen Zellkulturen können generell ein Problem darstellen [38, 40, 44, 48].

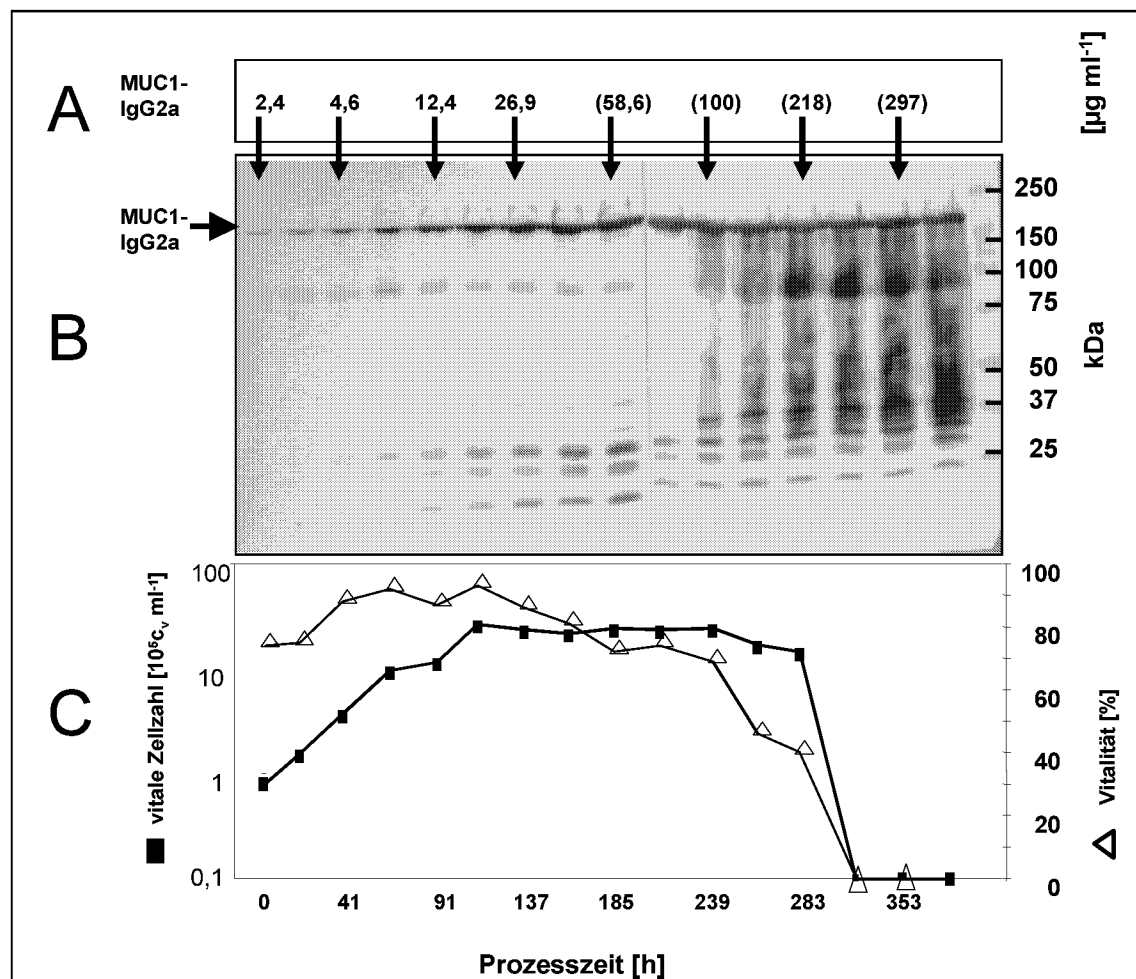


Abbildung 1: MUC1-IgG2a Konzentration (A), Produktqualität (B) und Vitalität (C) in Batch Kultur.

Auch für die hier beschriebene Prozessentwicklung hat dies Konsequenzen:

- Zum einen kann die Produktquantifizierung mittels ELISA nur solange verlässliche Werte liefern, wie die Vitalität hoch ist. Daher wird in allen im folgenden gezeigten Versuchen die Bestimmung der MUC1-IgG2a Konzentration mit dem Zeitpunkt abgebrochen, mit dem die Vitalität unter 90% sinkt. Zudem muss angenommen werden, dass allgemein bei Vitalitäten <100% ein geringer Anteil falsch positiver Signale im ELISA entsteht, was zu einer gewissen Ungenauigkeit in der Produktquantifizierung und geringfügiger Überschätzung der Konzentration an MUC1-IgG2a führen dürfte. Dies sollte bei allen im weiteren gezeigten Ergebnissen bedacht werden.
- Zum anderen zeigt dies einen deutlichen Nachteil von Batch und Fed-Batch Verfahren. Die Produkternte sollte erfolgen bevor die Vitalität deutlich absinkt, da ansonsten die Produktintegrität abnimmt und die Produktqualität somit nicht mehr garantiert werden kann. Zudem würde die Präsenz von Proteasen und Glykosidasen eine weitere Schwierigkeit in der Produktaufarbeitung darstellen [49]. Insbesondere Glykosidaseaktivität kann hier zu Problemen bezüglich der Produktqualität führen, da die Glykosylierung maßgeblich für die biologische Aktivität des MUC1 ist. Daher sollte Glykosidaseaktivität in jedem Fall vermieden werden. Ein potentieller Produktionsprozess muss daher hohe Vitalitäten garantieren.

Da die Glykosylierung des MUC1 so bedeutend ist, ist eine Inprozesskontrolle zur Bestimmung der vorzugsweise Krebs-assoziierten Glykosylierung unabdingbar. Diese muss erlauben innerhalb kurzer Zeit festzustellen, ob die gewünschte Glykosylierung vorliegt. Hierzu eignet sich wiederum ein Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern, welche MUC1 an den für die Krebs-assoziierte Glykosylierung maßgeblichen Glykoepitopen binden. Solche Antikörper werden bereits für die Diagnose und Prognose von Brustkrebs klinisch eingesetzt [50, 51].

Bereits zu Beginn der Prozessentwicklung wurde dieser Immunoblot durch die Partner in Schweden (Prof. Hansson) mit Kulturüberständen aus T-Flaschen durchgeführt.

Das MUC1-IgG2a wurde spezifisch durch die Antikörper HMFG-1, HMFG-2 und SM3 gebunden (**Abbildung 2**). So konnte gezeigt werden, dass Krebs-assoziierte Glykosylierung sehr wahrscheinlich vorliegt und das rekombinante MUC1 damit den Vorgaben an ein potentielles Therapeutikum entspricht.

HMFG-1 und HMFG-2 zeigen beide Reaktivität mit core-1 und core-2 Glykanen in den Tandem Repeats [11, 51, 52]. SM3 hat hohe Bindungsaffinität mit Krebs-assoziierten core-1, nicht jedoch mit core-2 Glykanen [10]. Daraus resultiert, dass das rekombinante MUC1-IgG2a überwiegend core-1 Glykane trägt, die zumindest partiell Krebs-assoziierte Struktur aufweisen. Diese wichtige Erkenntnis zeigte zu einem frühen Zeitpunkt, dass die Bioprozessentwicklung mit dieser Zelle sinnvoll ist.

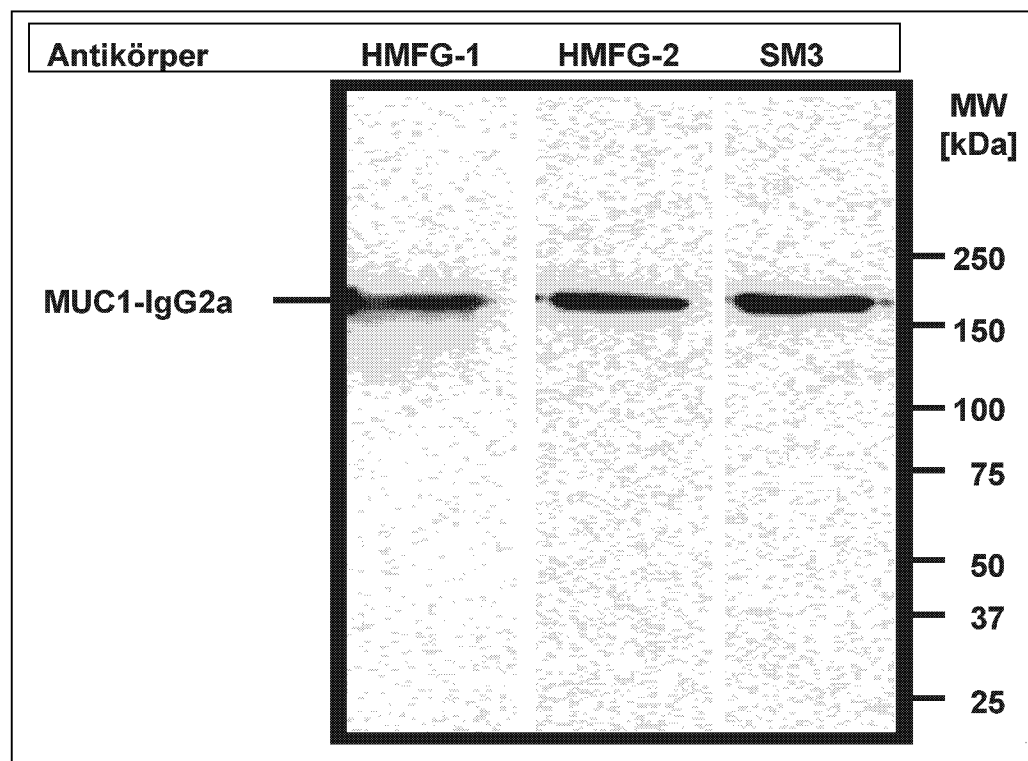


Abbildung 2:

Charakterisierung der MUC1 O-Glykosylierung mittels Immunoblotting.

Eine detailliertere Produktanalytik wird später begleitend zum Produktionsprozess nötig sein. Denkbar sind beispielsweise MALDI-TOF und LC-MS und eine Reihe anderer Methoden

[53, 54]. Diese sind wegen des zeitlichen und apparativen Aufwands jedoch nicht standardmäßig durchgeführt worden. Auf eine detailliertere Glykoanalyse des MUC1-IgG2a wird daher nur an essentiellen Zeitpunkten im Rahmen der Prozessentwicklung eingegangen.

Neben der qualitativen Analyse des Produktes mittels Immunoblot ist auch die Analyse von Gesamtprotein im Kulturüberstand bedeutsam. Die qualitative Einschätzung der Menge an Produkt im Vergleich zum Gesamtprotein im Kulturüberstand gibt wichtige Information betreffend der anschließenden Produktaufreinigung und kann zur Bestimmung des Zeitpunktes der Produkternte dienen [40]. Die Analyse des Gesamtproteins kann beispielsweise mittels Gelelektrophorese erfolgen (siehe Kapitel 3.3.4). Diese Methode wurde im Rahmen der Evaluierung der Kulturüberstände auf Gesamtprotein genutzt.

Die Bedeutung der Quantität und Qualität des Produktes im Kulturüberstand wird insgesamt deutlich. Diese werden unter anderem von der Wahl des Kulturmediums, aber auch der Verfahrensweise (beispielsweise Suspensionskultur) beeinflusst.

Daher stand im Rahmen der Optimierung der Kulturparameter die Medienwahl, Adaptierung an Suspensionskultur und Medienoptimierung zeitlich an erster Stelle.

4.2 Optimierung von Kulturparametern

Die Medienwahl, Adaptierung der Zellen an Suspensionskultur und Medienoptimierung sind also Schritte zu Beginn der Optimierung der Kultivierungsbedingungen. Begleitend dazu müssen jedoch weitere Kulturparameter wie z.B.

- Kultivierungstemperatur
- Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2)
- pH

optimiert werden.

Diese Parameter können enormen Einfluss auf Zellwachstum, Produktivität und den zellulären Stoffwechsel haben und deren Optimierung ist somit wichtig für einen wirtschaftlicheren Bioprozess [42, 44, 55]. Erste Arbeiten im Rahmen der Prozessentwicklung dienten daher dieser Optimierung. Ergebnisse dazu werden in den folgenden Kapitel gezeigt und diskutiert. Die Untersuchung dieser Parameter wurde nach Überführung der Zellen in Suspensionskultur in Spinner Kulturgefäßen durchgeführt, da diese einfach zu handhaben sind, kleine Kulturvolumina aufweisen und somit auch parallelisierte Kulturen zur Untersuchung einzelner Parameter ermöglichen. Parallelansätze von bis zu 4 Spinnern wurden zur Optimierung von pO_2 und pH genutzt, unter Verwendung der cellferm-pro® Anlage (siehe Kapitel 3.1.4).

Mini-Review 1– proteinfreie Kulturmedien

Die potentielle spätere industrielle Anwendung des MUC1-IgG2a Herstellprozesses grenzt die Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums bereits stark ein. Der Zusatz von Serum und BSA sollte vermieden werden, da die Komplexität von Serum aber auch BSA die spätere Aufreinigung des Produkts erheblich erschweren würde. Zudem bestünde die Gefahr, dass aufgrund der Kontaminationsgefahr mit Prionen oder Viren Prozesse, in denen Serum Verwendung findet, durch die Zulassungsbehörden nicht mehr genehmigt werden könnten [18, 56]. Die wachstumsfördernden Effekte von Serum können durch Zugabe von pflanzlichen Proteinhydrolysaten, Lipiden, Fettsäuren, Metallionen und Vitaminen zumindest partiell wiederhergestellt werden. Die Zugabe von oberflächenaktiven Polyolen, wie Pluronic-F68 kann zudem die Sensitivität der Zellen gegenüber Scherung vermindern [57, 58].

4.2.1 Kulturmedium und Suspensionskultur

Wegen der Notwendigkeit zum Verzicht auf Serum und Protein im Medium wurden mehrere kommerziell erhältliche Proteinfreie Medien (ProCHO3-CDM, ProCHO4-CDM, ProCHO5-CDM und SMIF-6) mit IMDM + 10% FCS, dem Ausgangsmedium für die CHO-MUC1-IgG2a Zelle verglichen. Dazu wurden in Gewebekulturflaschen in IMDM + 10% FCS adhären kultivierte Zellen direkt in Spinner Gefäße, also in gerührte Suspensionskultur, in die zu testenden Medien überführt. Eine Spinnerkultur mit IMDM + 10% FCS diente als Referenz.

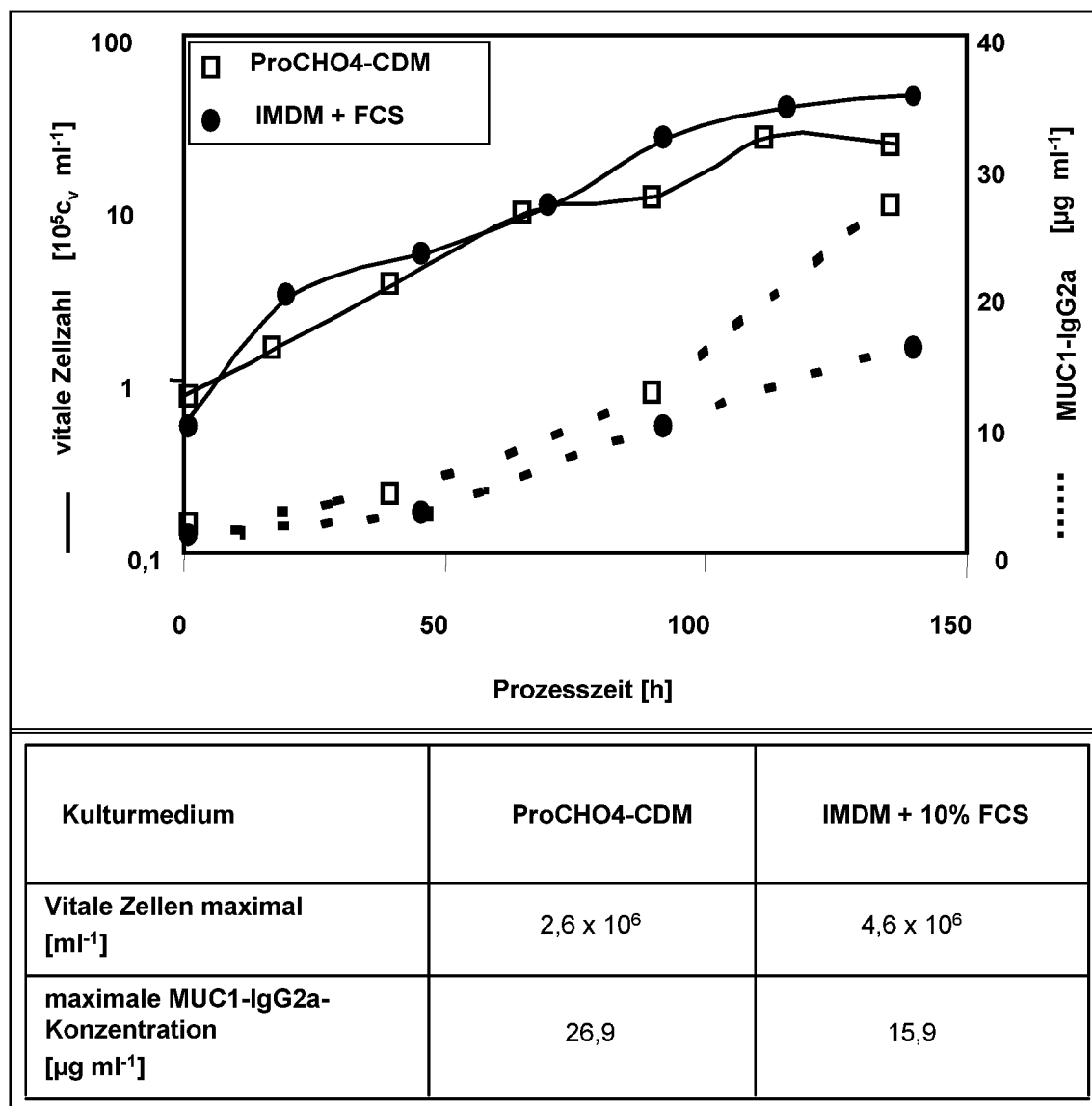
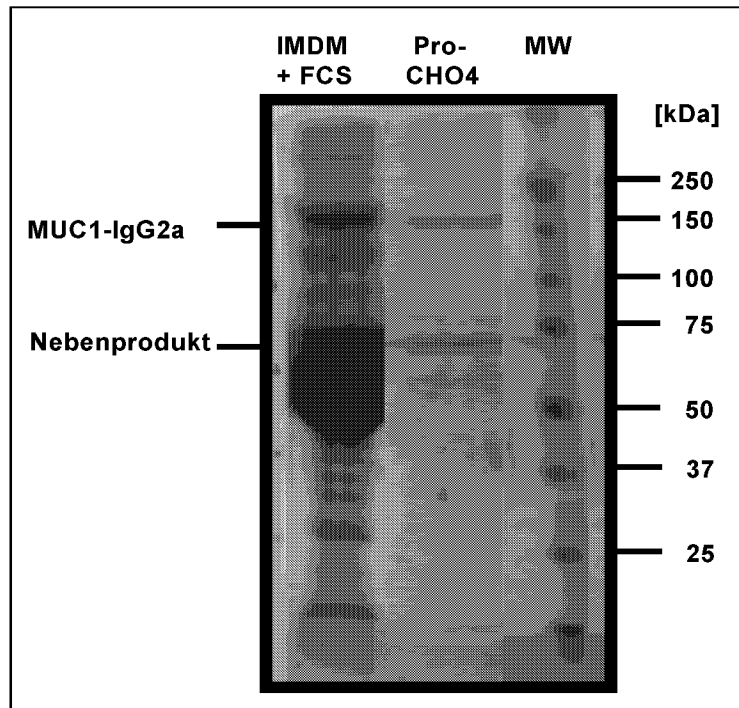


Abbildung 3: Zellwachstum und Produktivität nach schneller Adaptierung auf proteinfreie Suspensionskultur in ProCHO4-CDM.

Mit ProCHO4-CDM als Kulturmedium konnte die höchste Produktkonzentration erreicht werden. Ergebnisse dieser Kultur sind in **Abbildung 3** gezeigt.

Zwar war die maximale vitale Zellzahl in ProCHO4-CDM geringer als in IMDM + 10% FCS, jedoch konnte in ProCHO4-CDM mit $26,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ ein deutlich höherer maximaler MUC1-IgG2a Titer erreicht werden als mit $15,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ in IMDM + 10% FCS. Dies deutet darauf hin, dass entweder stark wachstumsfördernde aber die Produktivität mindernde Komponenten aus dem Serum in ProCHO4-CDM nicht vorhanden sind oder, dass Komponenten aus dem ProCHO4-CDM, welche im IMDM nicht oder in anderer Konzentration vorhanden sind stark die Produktivität fördern. In Frage kommen hier beispielsweise die Aminosäuren, welche fast durchweg in ProCHO4-CDM in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen, als in IMDM.

Besonders hervorzuheben ist jedoch die Tatsache, dass der hohe Produkttiter mit ProCHO4-CDM nach direktem Transfer in Proteinfreie Suspensionskultur erzielt werden konnte. Dies konnte auch für eine andere CHO-Zelllinie bestätigt werden [59]. Dabei zeigten die Zellen nur wenig Tendenz zu Klumpung. Dies ist umso erstaunlicher, da die Adaptierung an Proteinfreie Kultur und Suspension meist mit erheblichem Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist und so häufig mehrere Wochen in Anspruch nimmt [56]. Die Überführung der Kultur in Suspension ist vorteilhaft für die spätere *large-scale* Anwendung sehr wichtig sind. So lässt sich technisch eine gerührte Kultur mit einem Volumen von bis zu 20000 Liter realisieren und das dazu nötige *up-scaling* ist in der Industrie bereits etabliert. Dass die Zellsuspension sehr homogen ist vereinfacht die Prozesskontrolle und die Versorgung mit Sauerstoff auch bei hohen Zelldichten [18]. Dies zeigt, dass ProCHO4-CDM eine für diesen Zweck sehr gut ausgewogene Rezeptur aufweist. ProCHO4-CDM enthält als makromolekulare Komponente außer Pluronic-F68® (ca. 4,5 kDa) lediglich $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ rekombinantes Insulin, jedoch keine weiteren Proteine oder andere makromolekularen Substanzen.



Daher stellt MUC1-IgG2a hier das, was die Menge betrifft, Hauptprotein (170 kDa) im Kulturüberstand dar (**Abbildung 4**). Lediglich ein weiteres Nebenprodukt mit etwa 70 kDa apparenter Molekulargröße tritt auf. **Abbildung 4** betreffend muss beachtet werden, dass der auf IMDM + 10% FCS basierende Kulturüberstand eine deutlich höhere Zelldichte aufwies (**Abbildung 3**).

Abbildung 4: Vergleich der Kulturüberstände aus Serum enthaltender und proteinfreier Kultur (SDS-PAGE, Coomassie Färbung).

Dennoch ist offensichtlich, dass unter Verwendung von IMDM + 10% FCS deutlich mehr Gesamtprotein unterschiedlichen Molekulargewichts im Kulturüberstand vorhanden ist. Immunglobuline könnten Proteine sein, welche im Größenbereich von MUC1-IgG2a auftreten. Die Produktaufreinigung von Kulturüberständen auf Basis von ProCHO4-CDM dürfte somit wesentlich einfacher, schneller und Kosten sparender möglich sein, als dies aus Serum enthaltenden Medien der Fall wäre.

Nach Auswahl von ProCHO4-CDM als Kulturmedium wurde dann untersucht, ob eventuell Wachstumslimitierungen in Batch Kulturen durch Depletion von messbaren Substraten (Aminosäuren, Glukose, Nukleoside) auftreten. Bei Betrachtung der Aminosäuren konnte im Batch keine Depletion beobachtet werden, so dass eine Limitierung hier unwahrscheinlich erschien. Jedoch konnte für einige Aminosäuren eine starke Zu- bzw. Abnahme der Konzentration über die Prozesszeit beobachtet werden (**Abbildung 5**).

Dies lässt Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der CHO-MUC1-IgG2a Zelle zu. So wird Asparagin stark verbraucht. Offensichtlich wird es analog zu Glutamin als wichtige Kohlen-

stoff- und Stickstoffquelle für den Anabolismus genutzt. Asparagin wird zu Aspartat desaminiert und Aspartat kann dann mittels dem Aspartat-Shuttle unter Bildung von Oxalacetat den Citrat-Zyklus speisen und somit auch zur Energiegewinnung in Form von ATP beitragen [60].

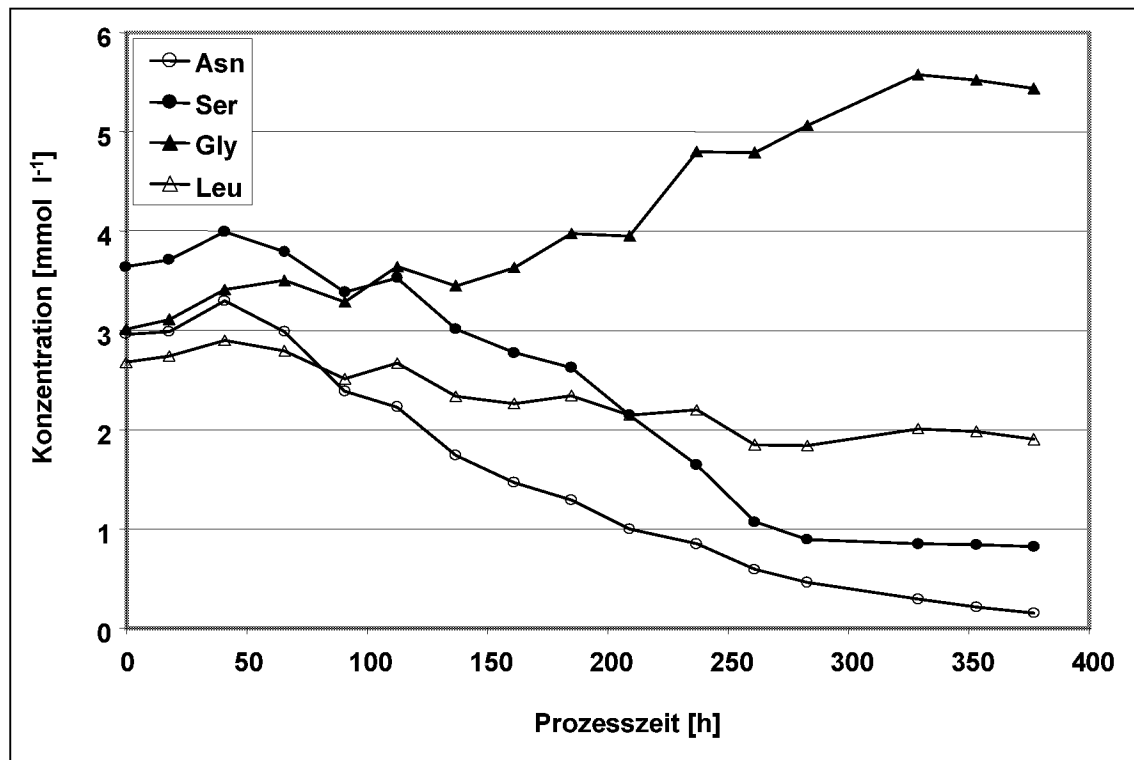


Abbildung 5: Verstoffwechselung ausgewählter Aminosäuren in Batch Kultur.

Somit ist die Supplementierung von Asparagin in Konzentrationen von mehreren mmol l^{-1} eine Möglichkeit das Zellwachstum zu fördern [61, 62]. Zusätzlich kann Asparagin dem wachstumshemmenden Effekt hoher CO_2 -Konzentrationen entgegenwirken [63], was insbesondere bei Hochzelldichtekulturen vorteilhaft sein kann.

Die Aminosäure Leucin wurde ebenfalls stark verbraucht. Leucin ist für Säuger eine essentielle Aminosäure, die einen wachstumsfördernden Effekt auf tierische Zellen hat [64]. Sie kann zu Acetyl-CoA abgebaut werden und liefert somit eine weitere Möglichkeit den Citratzyklus zu speisen, und damit die ATP-Bereitstellung zu unterstützen.

Weiterhin liegt ein ausgeprägter Serin-Glycin Metabolismus vor. Dabei wird Serin stark verbraucht und Glycin im annähernd selben Umfang gebildet (Abbildung 5). Die Umwandlung von Serin in Glycin ist eine wichtige Reaktion zur Bildung von 5,10-Methylen-THF, welches als C_1 -Gruppen Donor für wichtige Biosynthesefunktionen dient, so auch für die Thymidin Biosynthese [65].

Die einzige Substanz für die im Laufe der Batch Kultur eine Depletion festgestellt werden konnte, war Hypoxanthin (Daten nicht gezeigt), während das andere im Medium vorhandene

Nukleosid Thymidin kaum verbraucht wurde. Hypoxanthin ist als Nukleosid ein wichtiger Baustein für die Synthese von Purinen und damit von Nukleinsäuren über den *salvage pathway* [64, 66]. In der Absterbephase (Zelllyse) der Kultur wird das aufgenommene Hypoxanthin jedoch wieder freigesetzt, so dass schließlich nahezu die Ausgangskonzentration vorliegt.

Im Gegensatz zu Beobachtungen bei BHK-21 Zellen [67], hatte eine Erhöhung der Hypoxanthinkonzentration keinen Einfluss auf Zellwachstum oder Produktivität (Ergebnisse nicht gezeigt). Dabei ist erstaunlich, dass die Zellen die Hypoxanthin-Aufnahmerate mit erhöhter Konzentration steigerten und zeitgleich mit abnehmender Vitalität proportional zur Anfangskonzentration Hypoxanthin wieder frei gesetzt wurde. Eine Erklärung hierfür wurde nicht gefunden. Hierbei handelt es sich um eine Hypoxanthin Aufnahme durch Transporter unter Verbrauch von ATP [68, 69, 70].

Basierend auf ProCHO4-CDM als Kulturmedium sollte nun im Anschluss der Einfluss von Temperatur, pO_2 und pH auf Zellwachstum und Produktivität untersucht werden.

Mini-Review 2– Kultivierungstemperatur

Die Kultivierungstemperatur kann großen Einfluss auf Zellwachstum und Produktivität haben. Sie beeinflusst beispielsweise die Sauerstoffaufnahme (OUR) der Zellen [71]. Meist liegt die Kultivierungstemperatur für industrielle Prozesse mit CHO-Zellen bei 37°C–37,5°C. Für eine andere Zelllinie aus Hamster (BHK-21) wurde jedoch gezeigt, dass Wachstum und Produktivität bei 37°C nicht ihr Optimum haben [67]. Beschrieben wurde auch, dass in einigen Fällen eine Absenkung der Kultivierungstemperatur nach Erreichen der gewünschten Zelldichte die Prozessdauer verlängern und sogar zu einem Anstieg der zellspezifischen Produktivität führen kann [27, 72].

4.2.2 Kultivierungstemperatur

Zur Ermittlung der optimalen Kultivierungstemperatur wurden zunächst in parallel inokulierten Spinner-Gefäßen CHO-MUC1-IgG2a Zellen bei 35,5, 37 oder 38,5°C kultiviert, um zu ermitteln, ob eine Temperaturabweichung von $\pm 1,5^\circ\text{C}$ einen Effekt auf Wachstum und Produktivität dieser Zelllinie hat. Es zeigte sich, dass die maximal erreichte vitale Zellzahl bei 37°C und $35,5^\circ\text{C}$ mit etwa $2,65 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ vitalen Zellen deutlich höher lag, als bei $38,5^\circ\text{C}$ mit $1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ vitalen Zellen (**Abbildung 6**).

Bei 37°C war die maximale zellspezifische Produktivität jedoch deutlich höher, als bei den beiden anderen Temperaturen, was bei 37°C zu dem deutlich höchsten MUC1-IgG2a Titer führte (**Abbildung 6**). 37°C erscheint demzufolge als optimale Kultivierungstemperatur. Offensichtlich hat die Temperatur speziell bei $38,5^\circ\text{C}$ sehr unterschiedlichen Einfluss auf verschiedene Bereiche des Stoffwechsels. Dies zeigt, dass die zelluläre Regulation zwischen Wachstum und Produktbildung sensibel auf äußere Einflüsse reagiert.

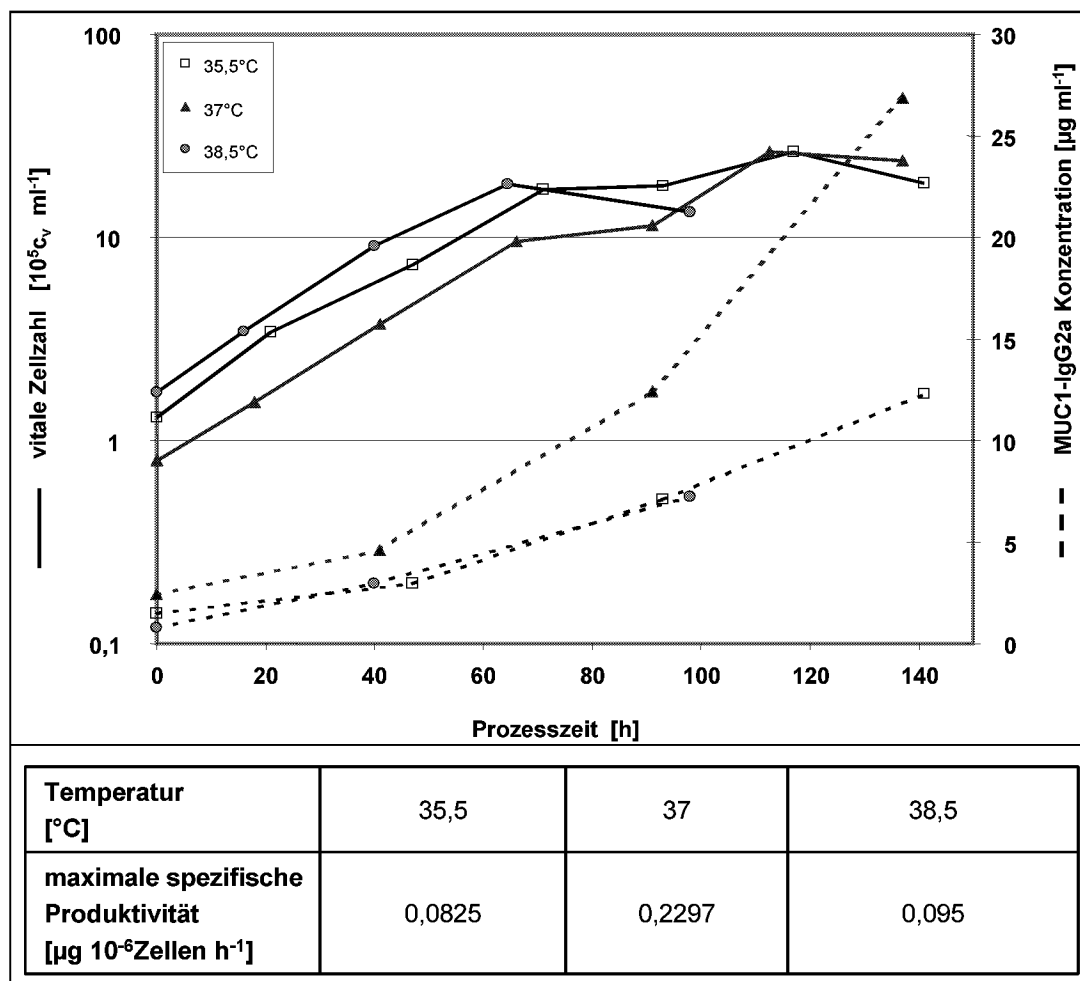


Abbildung 6: Einfluss der Kultivierungstemperatur auf Wachstum und Produktivität.

4.2.3 Gelöstsauerstoffkonzentration

Mini-Review 3– pO₂

Die Gelöstsauerstoffkonzentration (oder Sauerstoffpartialdruck - pO₂) ist ein sehr wichtiger Parameter für Wachstum, Produktivität, Metabolismus und Protein-Glykosylierung [73, 74, 75]. In Hochzelldichtekulturen ist der pO₂ häufig limitierend für das Wachstum [42]. Es wurde auch gezeigt, dass der pO₂ einen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen der Glykolyse und damit auch auf die zellspezifische Glukoseverbrauchsrate und die zellspezifische Laktatbildungsrate [76, 77, 78] hat. Weiter beeinflusst der pO₂ auch die Glutamatbildung und den Redox-Zustand der Zelle und so den gesamten Zentralstoffwechsel [74]. Damit liefert der pO₂ auch Potential für eine Steigerung der Produktivität.

Um nun den Einfluss des pO₂ auf das Wachstum der CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie und deren Produktivität zu untersuchen, wurden in einem 4-fach parallelen Ansatz in der cellferm-pro[®] Anlage Batch Kulturen in Spinner-Kulturgefäßen auf unterschiedliche pO₂-Werte (5%, 40%, 65% und 95% der maximalen Sättigung durch Luft unter Normalbedingungen) geregelt, unter ansonsten identischen Kulturbedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass der pO₂ Wachstum und Produktivität der Zellen beeinflusst (**Abbildung 7**).

Aus **Abbildung 7** geht zunächst hervor, dass bei 5% pO₂ mit $1,07 \times 10^6$ vitale Zellen ml⁻¹ deutlich weniger Biomasse entstand als bei den übrigen pO₂ ($4,7\text{--}4,9 \times 10^6$ ml⁻¹). Bei 5% liegt vermutlich bereits eine Wachstumslimitierung vor.

Es wurde weiterhin beobachtet, dass bei 40, 60 und 95% pO₂ die Glukose nach etwa 150h verbraucht war. Auffällig war, dass bei 40% pO₂ weniger Glukose in die Laktatbildung einging, was sich daran zeigte, dass bei 40% war die maximale Laktatkonzentration am geringsten war (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu variiert die maximale zellspezifische Produktivität sehr stark mit dem pO₂. (**Abbildung 7**) Bei 40% pO₂ wurde mit $0,241 \mu\text{g } 10^{-6} \text{c}_v \text{ h}^{-1}$ die mit Abstand höchste spezifische Produktivität erreicht, im Gegensatz zu $< 0,15 \mu\text{g } 10^{-6} \text{c}_v \text{ h}^{-1}$ bei 5%, 60% und 95%. Besonders der Unterschied zwischen 40% und 60% ist erstaunlich, wenn bedacht wird, dass beide Werte in der Literatur als angemessen betrachtet werden.

Die sehr unterschiedliche zellspezifische Produktivität bei ähnlichen maximalen vitalen Zellzahlen führt in Abhängigkeit vom pO_2 zu sehr verschiedenen maximalen Produktkonzentrationen im Batch. Bei 40% wurden $43 \mu\text{g ml}^{-1}$ erreicht gegenüber nur $18,5$ und $23 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei 60% und 95% pO_2 . Gleiches gilt für die, allerdings nur kurzzeitig zum Ende des Batch beobachteten maximalen Raum-Zeit Ausbeuten (Abbildung 7).

Zusätzlich konnte in pO_2 geregelter Spinnerkultur im Vergleich zu unregelter Kultur (Abbildung 3) generell eine Steigerung des Produkttiters erreicht werden.

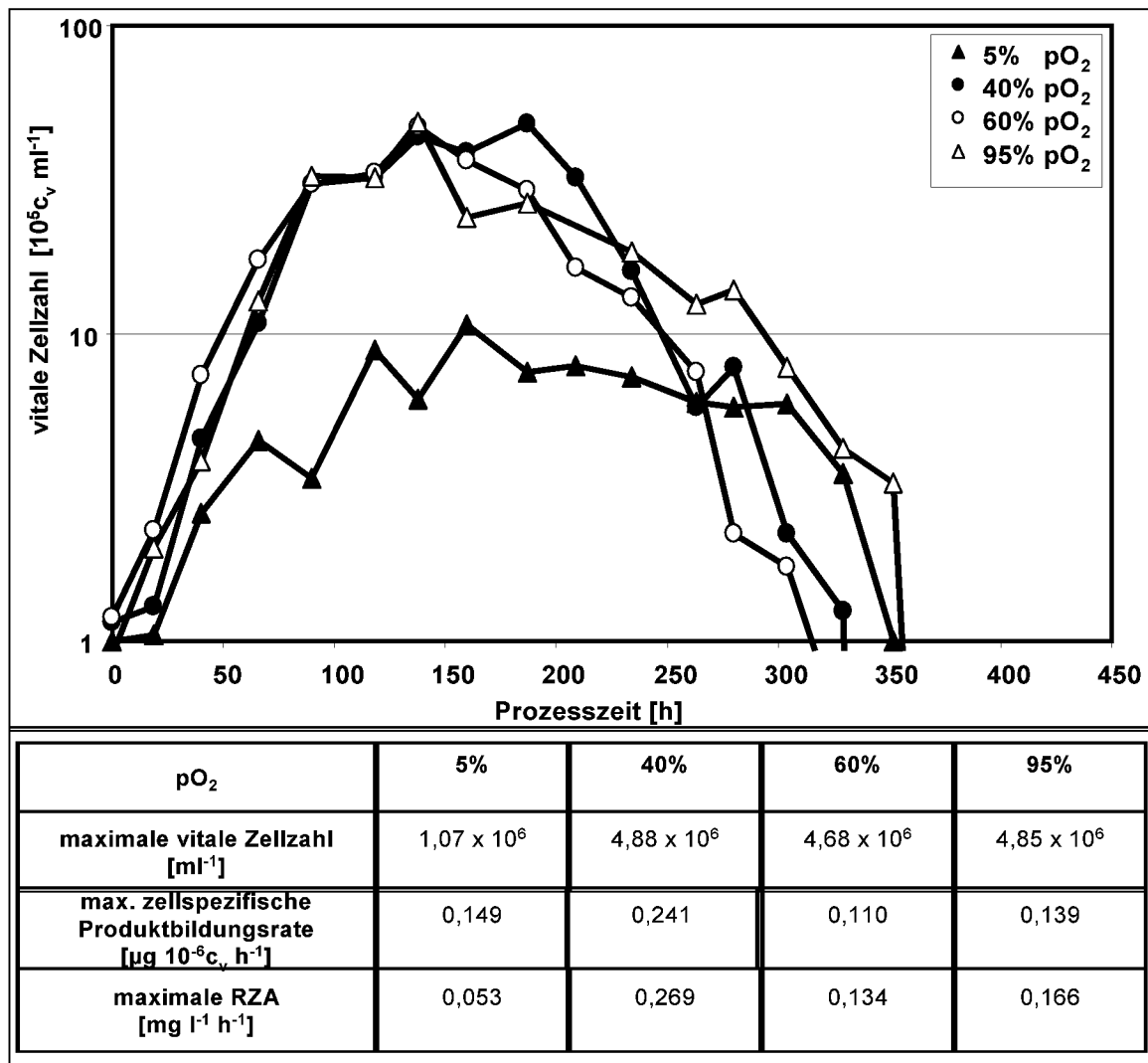


Abbildung 7: Einfluss des pO_2 auf Zellwachstum, Stoffwechsel und Produktivität.

Offensichtlich ist der pO_2 extrem kritisch für die Produktivität, was eventuell mit einem effizienteren Glukosestoffwechsel zusammenhängt. Möglicherweise liegt die Ursache direkt bei den Stoffwechselreaktionen, bei denen O_2 beteiligt ist, also der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette. Wenn der Einfluss des pO_2 über die Atmungskette wirkt, dann sollte der pO_2 auch Einfluss auf die Sauerstoffaufnahme (OUR) haben. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben [73]

Mini-Review 4-- OUR

Da die OUR in Zusammenhang mit Wachstum und Zellstoffwechsel steht, kann sie zur Abschätzung des Zellwachstums im Bioreaktor dienen und so helfen den Zeitpunkt besser abzuschätzen, an dem die exponentielle Wachstumsphase im Prozess endet [79]. In anderen Fällen ist beschrieben, dass die OUR benutzt werden kann, um den Glukoseverbrauch abzuschätzen. Dies wurde angewendet, um mittels der OUR die Glukosezufütterung in kontinuierlichen oder Fed-Batch Bioprozessen zu regeln [80, 81]. Die Zusammenhänge zwischen OUR und Stoffwechsel scheinen zwischen unterschiedlichen Zelllinien zu variieren. Das Verhältnis von OUR zu anderen Verbrauchsdaten kann Aufschluss über den Metabolismus der Zellen geben und kann so zum *online-Monitoring* des Zellstoffwechsels beitragen [82, 83]. Beispielsweise wurde beobachtet, dass die OUR ansteigt, wenn die Glukosekonzentration im Medium sinkt und umgekehrt. Dies wird mit einer Abnahme und im umgekehrten Fall mit einer Zunahme des Crabtree-Effekts begründet [84]. Über den Pasteur-Effekt, also die Inhibierung der Laktat-Gärung unter aeroben Bedingungen in Organismen mit fakultativer Gärung, kann die OUR indirekt beeinflusst werden [85, 86]. So stellt die OUR auch im Rahmen einer Prozessentwicklung einen wichtigen Parameter dar, um den Prozess auf die Bedürfnisse der Zelle hin zu optimieren.

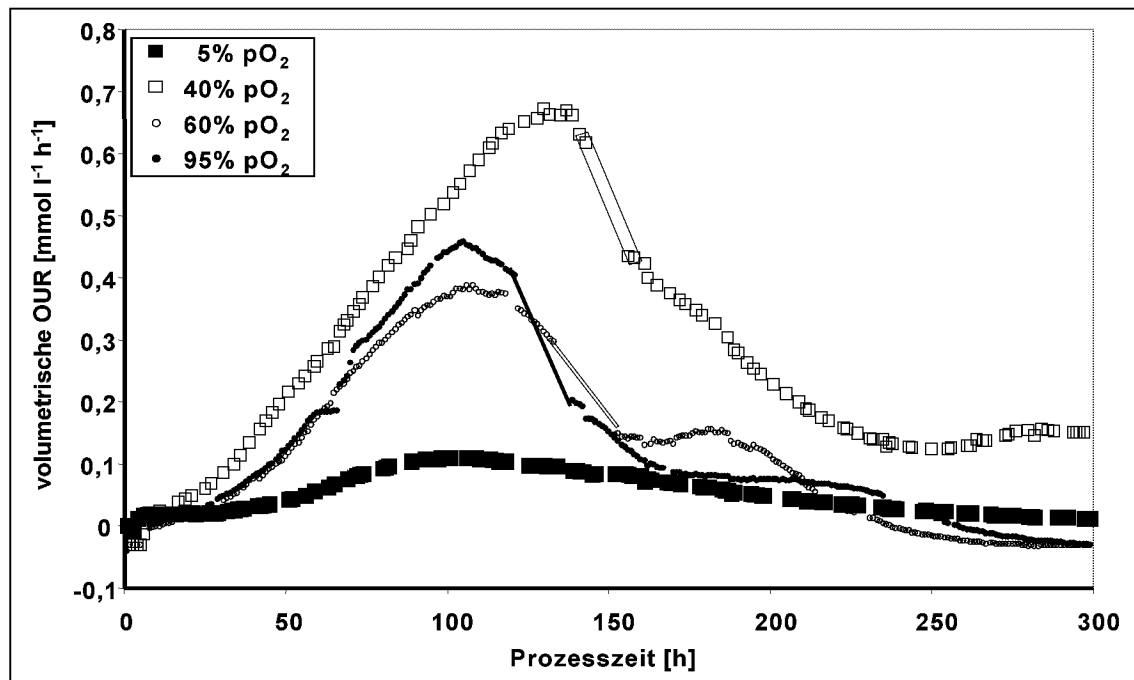
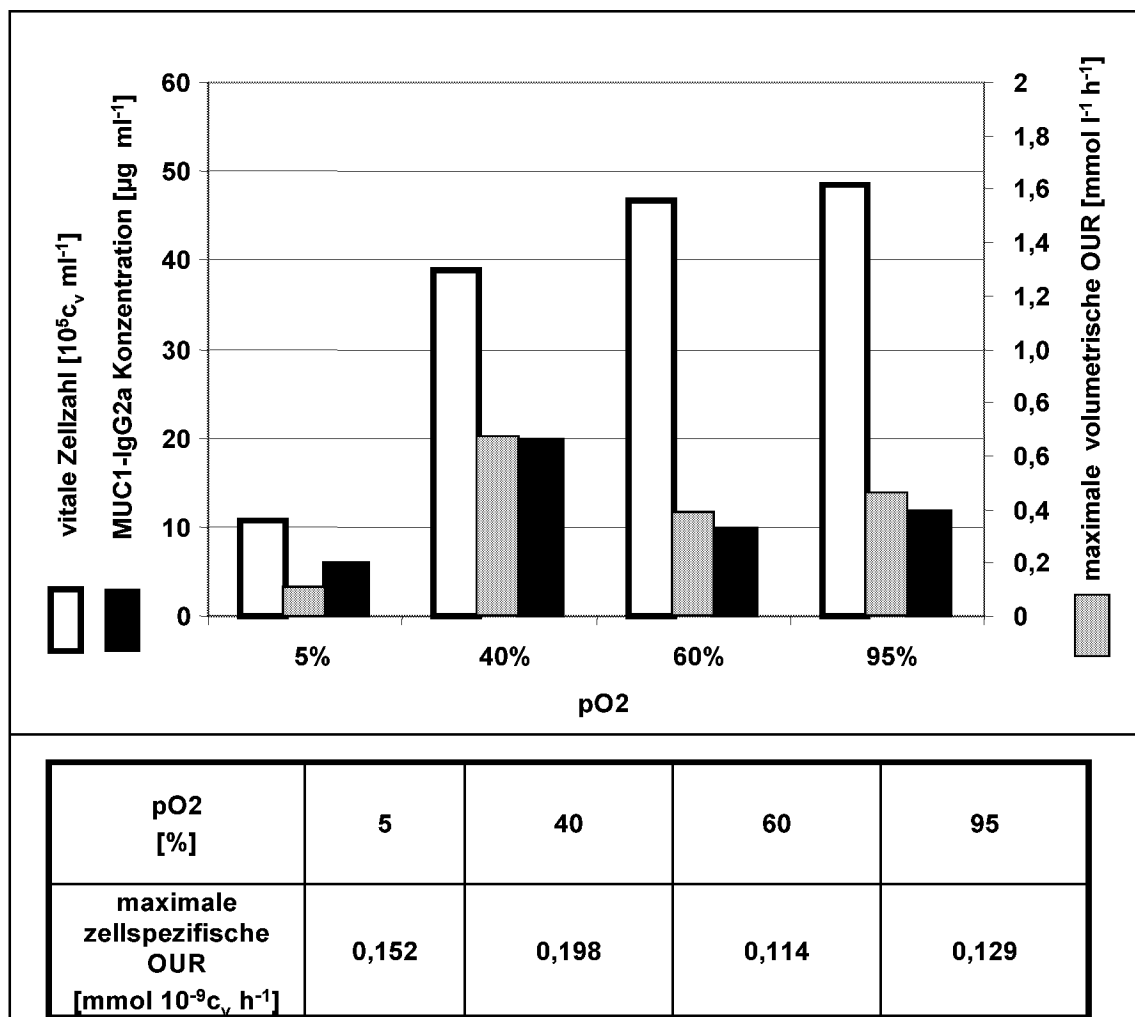
Die OUR ist ein sehr wichtiger Prozessparameter, welcher sich über mehrere Methoden bestimmen lässt [87]:

- Die dynamische Methode basiert auf der Betrachtung der Veränderung des pO_2 über die Zeit bei unterbrochener O_2 -Zuführung [80, 81]. Dies führt jedoch zu Schwankungen des pO_2 in der Kultur, was den Zellmetabolismus stören kann.
- Die Bilanzierung der OUR aus der Differenz der O_2 -Flüsse in Zu- und Abgas vermeidet diese Schwankungen [83], ist jedoch technisch aufwendiger und dürfte vor allem für kontinuierliche Hochzelldichtefermentationen geeignet sein, da hier der absolute O_2 -Verbrauch sehr hoch ist.

Bei geringem absoluten O_2 -Verbrauch hingegen erscheint es geeigneter, die OUR über die notwendige Differenz der O_2 -Konzentration zwischen Gas- und Flüssigphase abzuschätzen, welche erforderlich ist, um einen vorgegebenen pO_2 zu erreichen. Dies ist in der cellferm-pro[®] Anlage realisiert (Kapitel 3.1.4).

Da die cellferm-pro[®] Anlage die OUR online abschätzt, konnten pO_2 , zellspezifische Produktivität und OUR miteinander verglichen werden. **Abbildung 9** vergleicht diese Parameter zum Zeitpunkt maximaler OUR im jeweiligen Spinnergefäß.

Es wird deutlich, dass die maximale OUR im Fall der CHO-IgG2a Zelllinie nicht mit der zum Zeitpunkt der maximalen OUR erreichten Lebendzellzahl, sondern mit dem erreichten Produkttiter korreliert. Dabei traten die Maxima von Lebendzellzahl und OUR nicht zeitgleich auf (vergleiche **Abbildung 7** und **Abbildung 8**). Die Menge an aufgenommenem Sauerstoff korreliert somit in erster Annäherung mit der Menge an gebildetem Produkt. Bei 40% pO_2 wird neben der maximalen OUR auch der maximale Produkttiter erreicht. Hier trat mit $0,198 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ c}_v \text{ h}^{-1}$ auch die höchste zellspezifische OUR auf (**Abbildung 9**). Dies deutet auf die höhere Rate oxidativer Phosphorylierung bei diesem pO_2 hin. In allen durchgeführten Versuchen nahm die zellspezifische Glukoseverbrauchsrate mit sinkender Glukosekonzentration ab.

Abbildung 8: Verlauf der volumetrischen OUR über die Zeit bei verschiedenen pO_2 .Abbildung 9: Vergleich von Wachstum, Produktivität und OUR bei unterschiedlichen pO_2 zum Zeitpunkt maximaler OUR.

Ertragskoeffizient \ pO ₂	5%	40%	60%	95%
max. Y _{Produkt/Glukose} %	0,29	0,73	0,29	0,43
max. Y _{Produkt/Glutamin} %	2,9	3,7	2,2	1,6
min. Y _{Laktat/Glukose} [mmol mmol ⁻¹]	1,85	0,11	0,59	0,78
max. Y _{OUR/Glukose} [mmol mmol ⁻¹]	1,3	3,1	1,8	1,7
min. Y _{OUR/Glukose} [mmol mmol ⁻¹]	0,64	1,69	0,61	0,52
max. Y _{OUR/Gln} [mmol mmol ⁻¹]	7,3	8,9	6,23	6,27

Tabelle 1: Einfluss des pO₂ auf wichtige Ertragskoeffizienten zur Zeit der exponentiellen Wachstumsphase im Batch.

Doch unabhängig vom Zeitpunkt im Prozess lag der Ertragskoeffizient $Y_{OUR/Glc}$ bei 40% pO₂ am höchsten (**Tabelle 1**). Dies zeigt, dass auch unabhängig von der Restglukosekonzentration in der Kultur bei 40% der Anteil der Glukose, welcher über den Citrat-Zyklus indi-

rekt die oxidative Phosphorylierung speist, höher ist, als bei anderen pO₂. Dies stimmt überein mit der Erkenntnis, dass bei 40% am wenigsten Glukose in Laktat eingeht (**Tabelle 1**). Offensichtlich hat also der pO₂ direkten Einfluss auf die Ausprägung des Pasteur-Effekts, also die Inhibierung der Laktat-Gärung durch Sauerstoff. Der $Y_{OUR/Glc}$ ist proportional zur Ausprägung des Pasteur-Effekts. Umgekehrt überwiegt unter O₂-Limitierung (5% pO₂) die Laktat-Gärung ($Y_{Lac/Glc} = 1,85$).

Der Pasteur-Effekt scheint bei 40% pO₂ am stärksten ausgeprägt zu sein. Bei 40% sind der minimal und der maximal beobachtete $Y_{OUR/Glc}$ mit 1,69 mmol mmol⁻¹ bzw. 3,1 mmol mmol⁻¹ im Vergleich zu anderen pO₂ am höchsten (**Tabelle 1**). Dies erklärt zwar den Zusammenhang zwischen pO₂ und OUR, jedoch noch nicht die erhöhte Produktivität bei 40% pO₂. Dieser Zusammenhang könnte durch eine bessere Bereitstellung von ATP für die Proteinsynthese durch die oxidative Phosphorylierung erklärt werden.

Es ist aber auch denkbar, dass Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise HIF-1 [86, 88], welche in Verbindung mit Sauerstoffbereitstellung induziert werden, nicht nur die Transkription der Gene der Glykolyse regulieren, sondern eventuell auch die Ablesung des CMV-Promotor gesteuerten MUC1-IgG2a Gen-Abschnitts beeinflussen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Optimierung des pO₂ eine deutliche Steigerung der zellspezifischen Produktivität ermöglicht. Dieser Effekt ist gekoppelt mit einem vergleichsweise hohen Pasteur-Effekt.

4.2.4 pH

Der pH kann die Effizienz des Prozesses über zwei Wege beeinflussen. Zum einen kann der pH auf die Zelle selbst einwirken und so die Ausbeute an Biomasse oder die zellspezifische Produktivität mitbestimmen [42, 89, 90]. Zum anderen kann der pH Einfluss auf die Produktstabilität und Produktqualität, wie Glykosylierung haben [91, 92]. Daher war es notwendig, im Rahmen dieser Bioprozessentwicklung auch den pH zu optimieren, indem parallelisierte Spinnerkulturen in der cellferm-pro[®] Anlage auf unterschiedliche pH durch Zugabe von Lauge oder CO₂ geregelt wurden. Inokuli und sonstige Startbedingungen waren für alle Spinnerkulturen identisch, ebenso die Temperatur (37°C) und der pO₂ (40%).

Der pH-Wert wurde auf pH 6,8, pH 7,2 oder pH 7,5 geregelt.

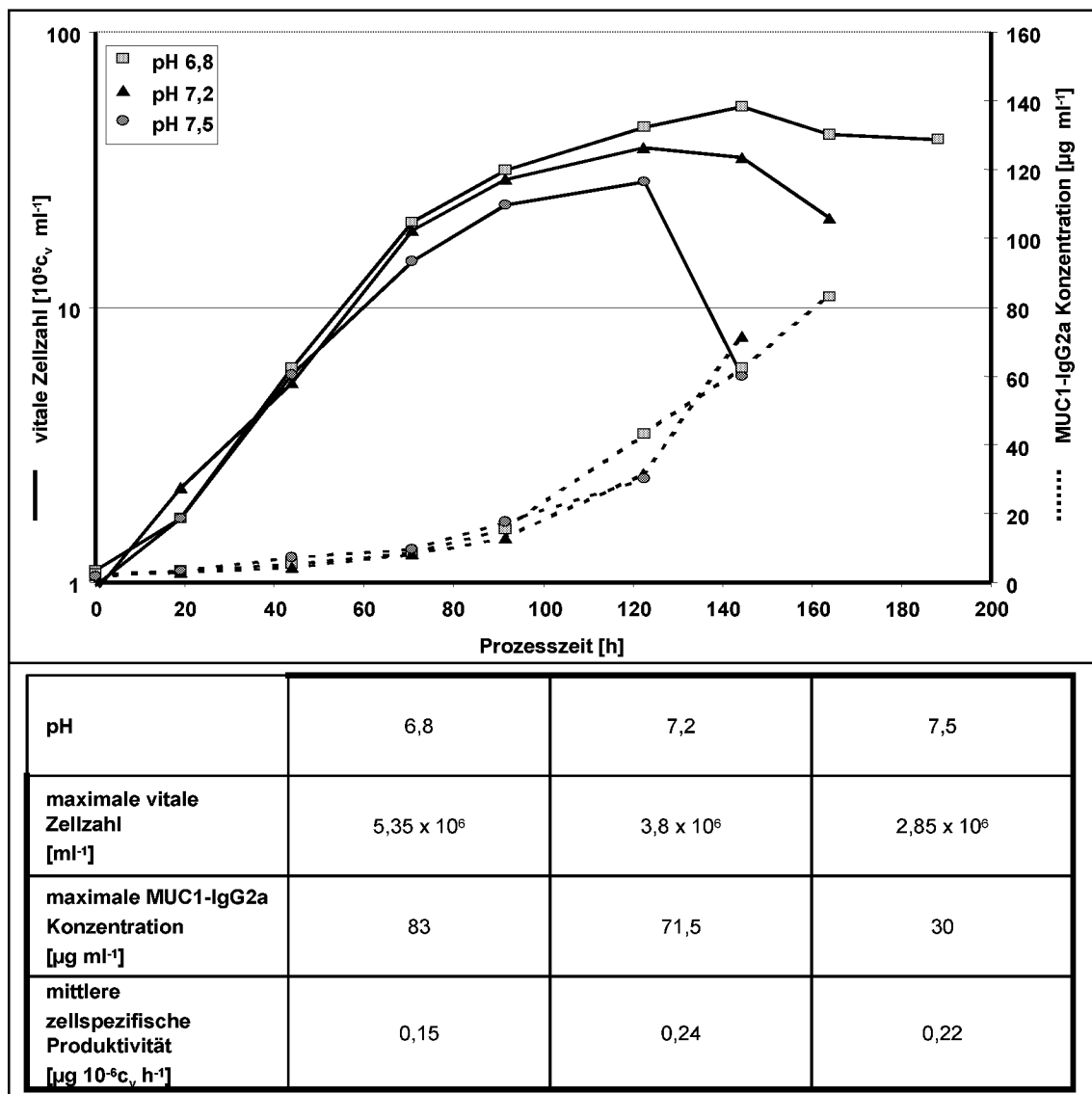


Abbildung 10: Einfluss des pH auf Zellwachstum und Produktivität.

Wie aus **Abbildung 10** ersichtlich ist, nahm die maximal erreichte vitale Zellzahl mit zunehmendem pH ab. Bei pH 6,8 wurden mit $5,35 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ vitalen Zellen eine fast doppelt so hohe maximale Zelldichte als bei pH 7,5 ($2,85 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) erreicht.

Interessanterweise konnte bei pH 6,8 bereits eine Abnahme der Laktatkonzentration beobachtet werden, als die Glukose noch nicht vollständig limitierend war (Daten nicht gezeigt). Dadurch war die maximal erreichte Laktatkonzentration bei pH 6,8 am niedrigsten. Gleichzeitig führte ein verminderter Glukoseverbrauch dazu, dass die Glukose erst zu einem späteren Zeitpunkt depletiert war. Geringere Laktatkonzentration und verlängerte Versorgung mit Glukose könnten die Gründe dafür sein, warum im Batch die erreichte maximale Zellzahl bei pH 6,8 am höchsten ist.

Bei pH 6,8 wurde ebenfalls die höchste Produktkonzentration mit $83 \mu\text{g ml}^{-1}$ MUC1-IgG2a erzielt, gegenüber $71,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei pH 7,2 bzw. $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei pH 7,5. Die zellspezifische Produktivität war jedoch bei pH 7,2 mit $0,24 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ c}_v \text{ h}^{-1}$ maximal (**Abbildung 10**).

Erneut korrelierten OUR und zellspezifische Produktivität. Dabei war die zeitlich gemittelte OUR minimal bei pH 6,8 und maximal bei pH 7,2.

Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich schließen, dass bezüglich des pH eine 2-Phasen Prozessführung optimal sein könnte. Mit pH 6,8 in Phase 1 zur Generierung maximaler Biomasse und mit pH 7,2 in Phase 2 zur Maximierung der Raum-Zeit Ausbeute bei hoher zellspezifischer Produktivität und gleichzeitig hoher Lebendzelldichte. Dieses Prinzip könnte auch auf einen kontinuierlichen Prozess übertragen werden, mit pH 6,8 in der Anwachsphase.

4.2.5 Ergebnisse der Optimierung der Kulturparameter

Der Stand der Bioprozessentwicklung nach Optimierung der Kulturparameter stellt sich zusammenfassend wie folgt dar (Abbildung 11):

Mit ProCHO4-CDM wurde ein geeignetes Kulturmedium gefunden, mit dem ein direkter Transfer der Zellen von adhärenter Kultur in Serum zu Proteinfreier Suspensionskultur möglich ist. Die Parameter Temperatur, pO_2 und pH wurden in erster Annäherung optimiert und es konnte so eine Steigerung der maximalen Produktkonzentration in Batch Kultur erreicht werden. Insbesondere konnte durch eine auf 40% pO_2 geregelte Kultur die zellspezifische Produktivität verbessert werden. Eine verminderte Laktatbildungsrate und eine gesteigerte OUR deuten darauf hin, dass dies verbunden ist mit einem stark ausgeprägten Pasteur-Effekt, welcher die Laktat-Gärung inhibiert und so zur gesteigerten Bereitstellung von ATP führen könnte. Die zusätzliche Regelung des pH auf einen konstanten Wert von pH 7,2 ermöglichte es, diese Produktivität über eine längere Kulturdauer zu halten, und somit den Produkttiter weiter zu steigern. Mit einem pH von 6,8 hingegen wird eine höhere Zelldichte erreicht, was trotz verringelter spezifischer Produktivität die mit $83 \mu g ml^{-1}$ insgesamt höchste MUC1-IgG2a Konzentration erbrachte. Diese Ergebnisse lassen, bezüglich pH, einen 2-phasigen kontinuierlichen Prozess mit 40% pO_2 bei $37^\circ C$ als geeignet erscheinen.

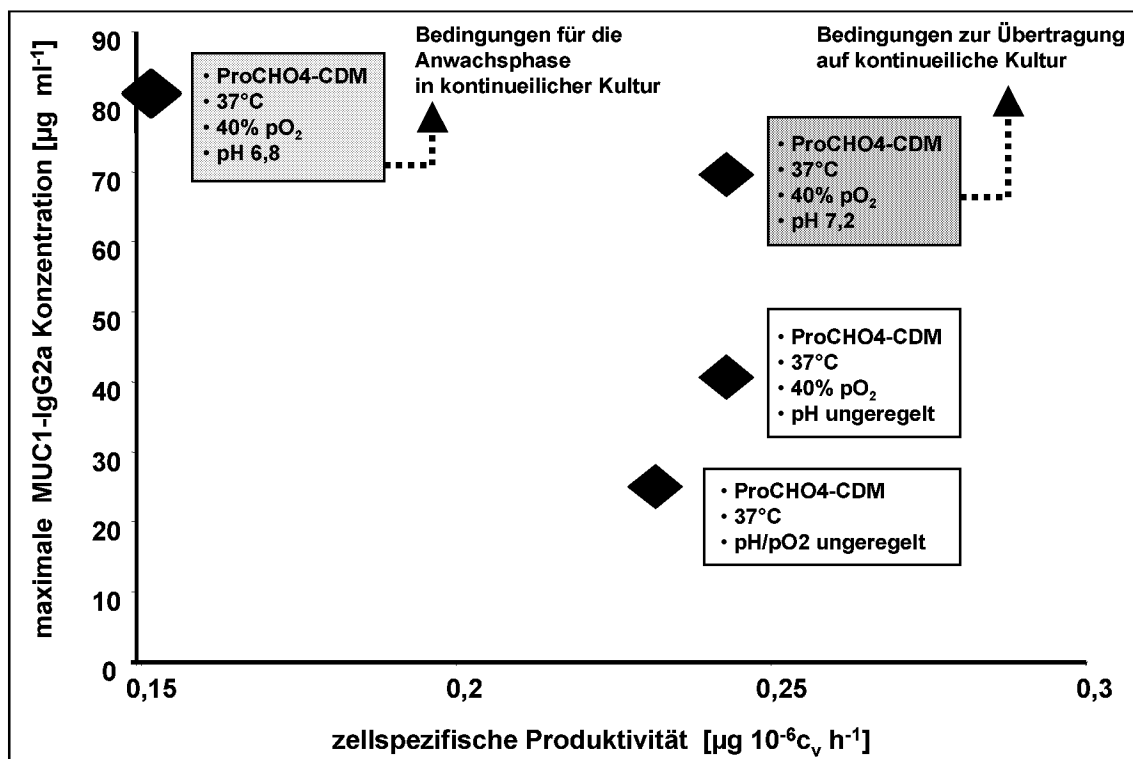


Abbildung 11: Steigerung der Produktbildung durch Regelung und Optimierung von Kulturparametern.

4.3 Übertragung der optimierten Bedingungen auf kontinuierliche Perfusionskultur

Nachdem die wesentlichen Kulturparameter für die Kultivierung der CHO-MUC1-IgG2a Zelle in Batch Kulturen optimiert wurden, bestand der nächste Schritt darin, die Verfahrensweise für den Produktionsprozess zu optimieren. Verschiedene Verfahrensweisen waren denkbar. Gegenüber Batch- oder Fed-Batch Kultur sind für die kontinuierliche Perfusionskultur eine Reihe von Vorteilen beschrieben, welche für die Herstellung von MUC1 bedeutsam sein könnten.

Mini-Review 5– kontinuierliche Perfusionskultur

Die kontinuierliche Perfusionskultur gleicht in einigen Charakteristika chemostatischen Kulturen ohne Zellrückhaltung. Durch Realisierung der Zellrückhaltung ändern sich jedoch die Zusammenhänge zwischen der Verdünnungs- oder Perfusionsrate (D) und den sich damit verbunden einstellenden Substrat- und Zellkonzentrationen im Bioreaktor. Es ist möglich, unter im Großmaßstab realisierbaren Bedingungen deutlich höhere Zelldichten und auch deutlich geringere Substratkonzentrationen zu erreichen. So kann die Durchflussrate dazu benutzt werden, die Prozessbedingungen zu kontrollieren, wobei D und die zellspezifische Wachstumsrate μ nicht gekoppelt sind [93]. Die vitale Zelldichte beeinflusst jedoch μ , so dass μ bei hohen Zelldichten oft abnimmt [94]. Durch die hohen Zelldichten können ebenfalls hohe Raum-Zeit Ausbeuten erreicht werden. Die Produktkonzentrationen liegen wegen der hohen Durchflussraten jedoch häufig unter denen von Batch Kulturen [95, 96]. Einige wichtige Voraussetzungen bei Nutzung dieser Verfahrensweisen ist die genetische Stabilität der produzierenden Zelllinie [97], was ein Ausschlusskriterium für einen potentiellen Herstellungsprozess sein kann. Die Perfusionskultur bietet neben der hohen Produktausbeute jedoch noch weitere Vorteile gegenüber anderen Verfahrensweisen [18, 55]. So kann Dank der kurzen Verweilzeiten im Bioreaktor die proteolytische und glykolytische Aktivität gegenüber Batch Kulturen häufig deutlich reduziert werden [95, 98]. Dadurch wird die perfusive Verfahrensweise insbesondere für die Produktion von Protease und Glykosidase sensitiven Proteinen interessant, ebenso wie für Proteine, welche zur Aggregation neigen. Beispiele für Anwendungen von Perfusionskulturen sind Prozesse zur Herstellung von Faktor VIII [99], tPA [100, 101] und großen Fusionsproteinen [102]. Die Technologien zur Zellrückhaltung, wie Spinfilter, akustische Rückhaltung und Scher- Affinitätsfiltration werden sukzessive verbessert [18, 95, 98, 103, 104, 105]. Perfusionskultur findet daher zunehmend Anwendung in der Industrie [18, 106]. Eine weitere Steigerung der Produktausbeuten in Perfusionsprozessen konnte dadurch erreicht werden, dass bei Verwendung von nicht zwingend an das Wachstum gekoppelt produzierenden Zelllinien die Wachstumsrate μ in der Produktionsphase gesenkt wurde, was eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität zur Folge hatte [100, 106].

Die Tatsache, dass es sich bei dem hier vorliegenden Fusionsprotein MUC1-IgG2a um ein sehr großes Protein mit Neigung zur Aggregation handelt, und zudem, dass die korrekte Glykosylierung des Proteins von funktionaler Bedeutung ist, legt eine perfusive Verfahrensweise zur Herstellung nahe.

Um die Eignung dieser Verfahrensweise zu untersuchen, wurde eine kontinuierliche Fermentation in einem 2 Liter Rührkesselreaktor mit einem Arbeitsvolumen von maximal einem Liter durchgeführt. Die Zellrückhaltung wurde durch einen internen Spinfilter mit einer durchschnittlichen Maschenweite von $75\mu\text{m}$ realisiert. Die Kultur wurde bei 37°C , 40% pO_2 (manuell geregelt) und pH 6,9-7,0 (manuell geregelt) durchgeführt, unter Nutzung von ProCHO4-CDM als Kulturmedium. Die Durchflussrate D wurde dabei so eingestellt, dass die Konzentrationen an Glutamin und Glukose über die gesamte Prozesszeit konstant auf nicht limitierendem Niveau gehalten werden konnten (**Abbildung 12**). Diese Verfahrensweise entspricht damit der herkömmlichen Strategie zur Substratbereitstellung in kontinuierlichen Perfusionsprozessen [93, 101, 107].

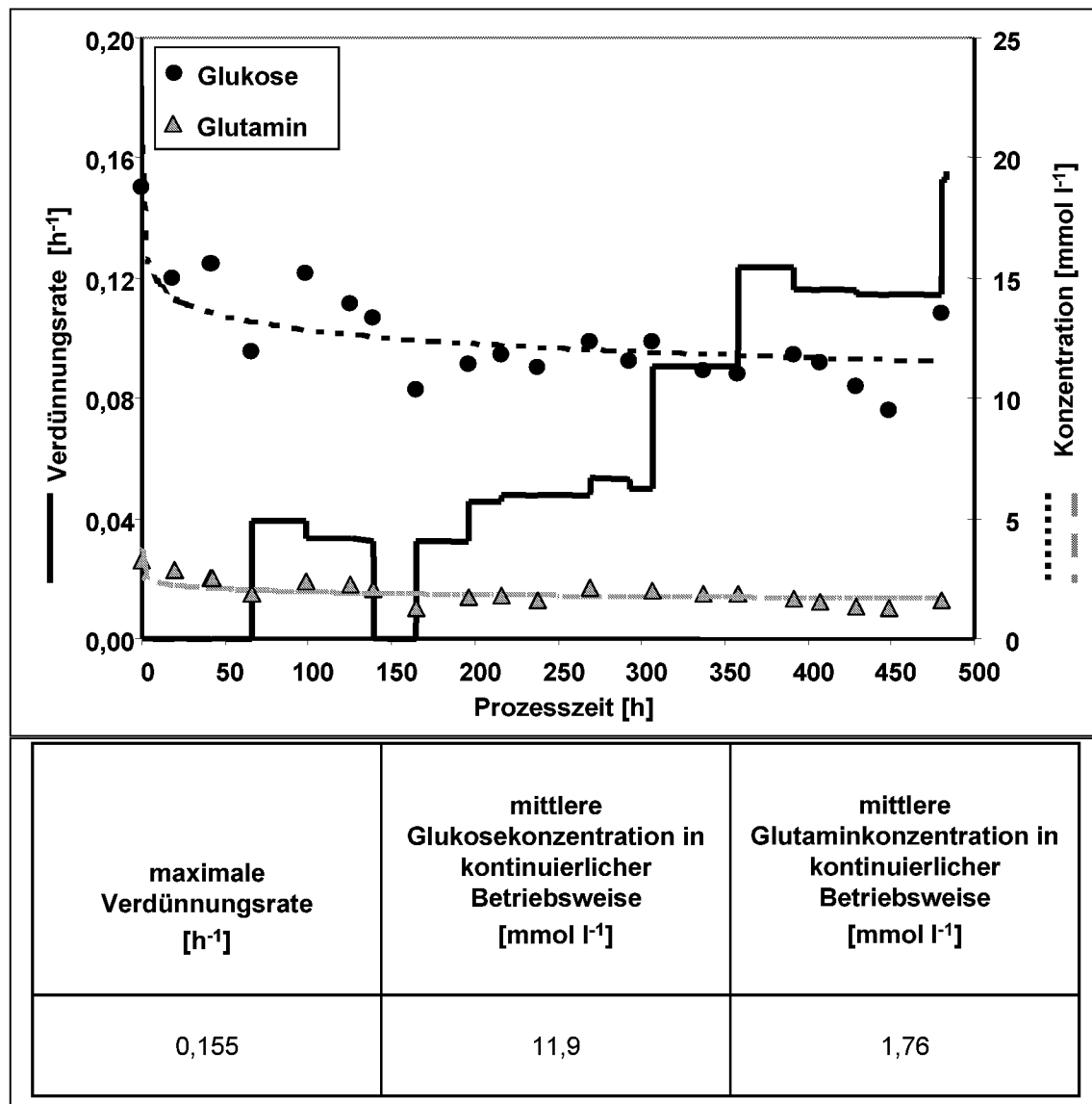


Abbildung 12: Verfahrensweise der nicht glukoselimitierten Perfusionskultur.

Abbildung 12 zeigt, dass die Glukosekonzentration bei durchschnittlich $11,9 \text{ mmol l}^{-1}$ und die Glutaminkonzentration bei im Mittel $1,76 \text{ mmol l}^{-1}$ gehalten wurde. Dazu war im Verlauf des Prozesses aufgrund der steigenden Lebendzell-dichte (**Abbildung 13**) und dem damit verbunden, steigendem Substratverbrauch eine Erhöhung der Durchflussrate auf bis zu $0,155 \text{ h}^{-1}$ nötig. Dies entspricht einer Verweilzeit von minimal 6,5 h bzw. einer Austauschrate von bis zu 3,72 Reaktorvolumen pro Tag, was mit 1 Liter Arbeitsvolumen der Produktion von 3,72 Litern Produktlösung pro Tag entspricht. Im folgenden sind Ergebnisse zu dieser Kultur gezeigt. Zusammenhänge zwischen Durchflussrate, Wachstumsrate und Zellrückhaltung sollen in Kapitel 5.4 eingehender betrachtet werden.

Zellwachstum und Produktivität

Durch die eingebaute Zellrückhaltung konnte die maximale vitale Zellzahl mit $3,01 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ gegenüber der Batch Kultur ($5,35 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) um den Faktor 5,6 gesteigert werden (**Abbildung 13**).

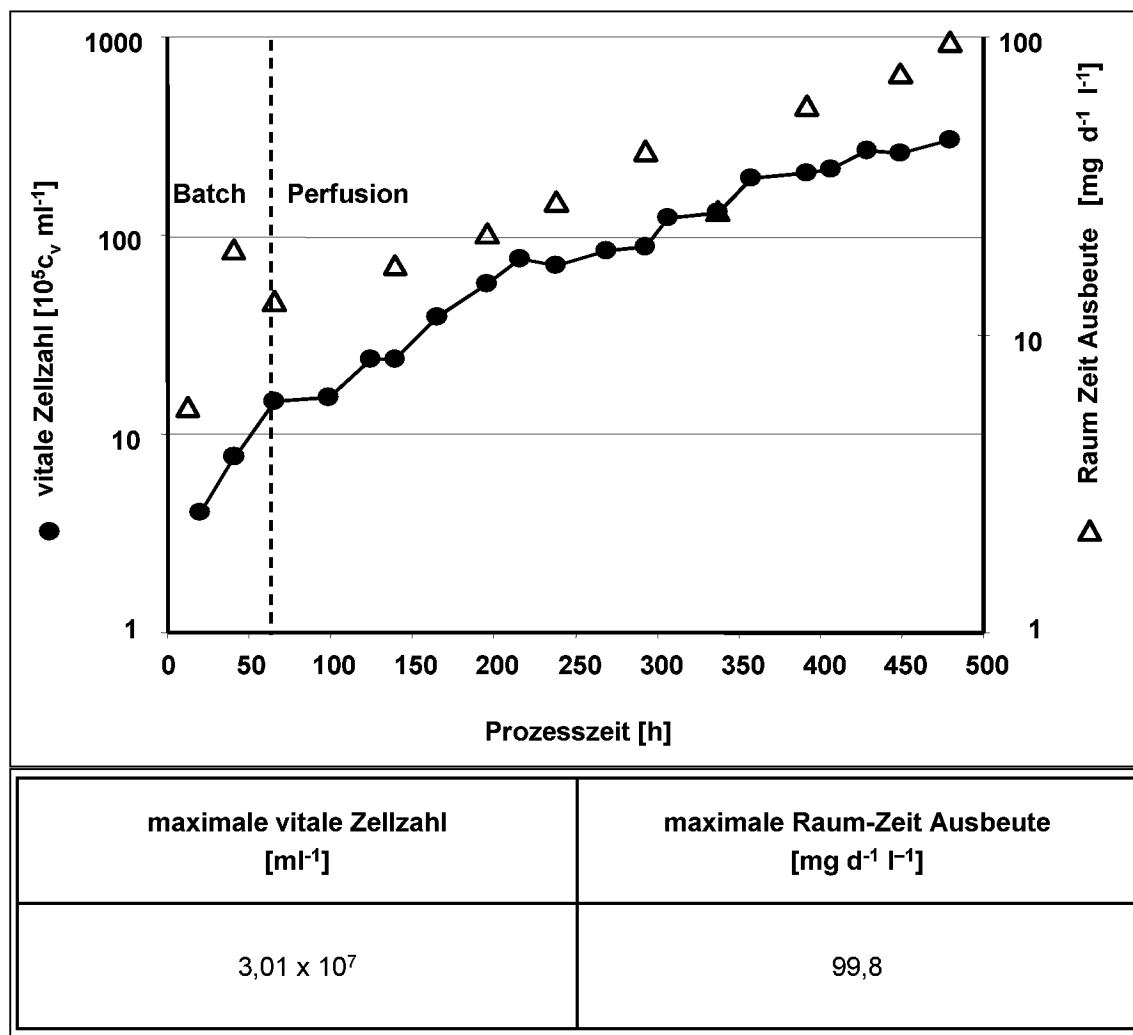


Abbildung 13: Vitale Zellzahl und Raum-Zeit Ausbeute in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

Mit der Steigerung der vitalen Zellzahl wurde auch eine deutliche Erhöhung der Raum-Zeit Ausbeute (RZA) erreicht $99,8 \text{ mg d}^{-1} \text{ l}^{-1}$ erreicht (**Abbildung 13**). Somit könnten mit dieser Verfahrensweise pro Tag in einem industriell realisierbaren Perfusionsreaktor mit 200 Liter Kulturvolumen rund 20 g MUC1-IgG2a produziert werden. Würde eine Erfolgsrate von 100% (keine Ausfälle) und eine Reaktorauslastung von 8 Monaten pro Jahr angenommen, könnten mit diesem Prozess rein theoretisch in einem Jahr knapp 5 kg MUC1-IgG2a hergestellt werden. Diese Machbarkeitsstudie für einen potentiellen Produktionsprozess erschien zu diesem Zeitpunkt der Prozessentwicklung als nicht irrelevant, da zu verschiedenen Zeitpunkten der Bioprozessentwicklung „go or no go“ Entscheidungen für weiterführende Entwicklungsschritte anstehen. Ein kostenintensives *upscaling* würde mit den zu erwartenden Ausbeuten in industriellem Maßstab an dieser Stelle jedoch als gerechtfertigt erscheinen.

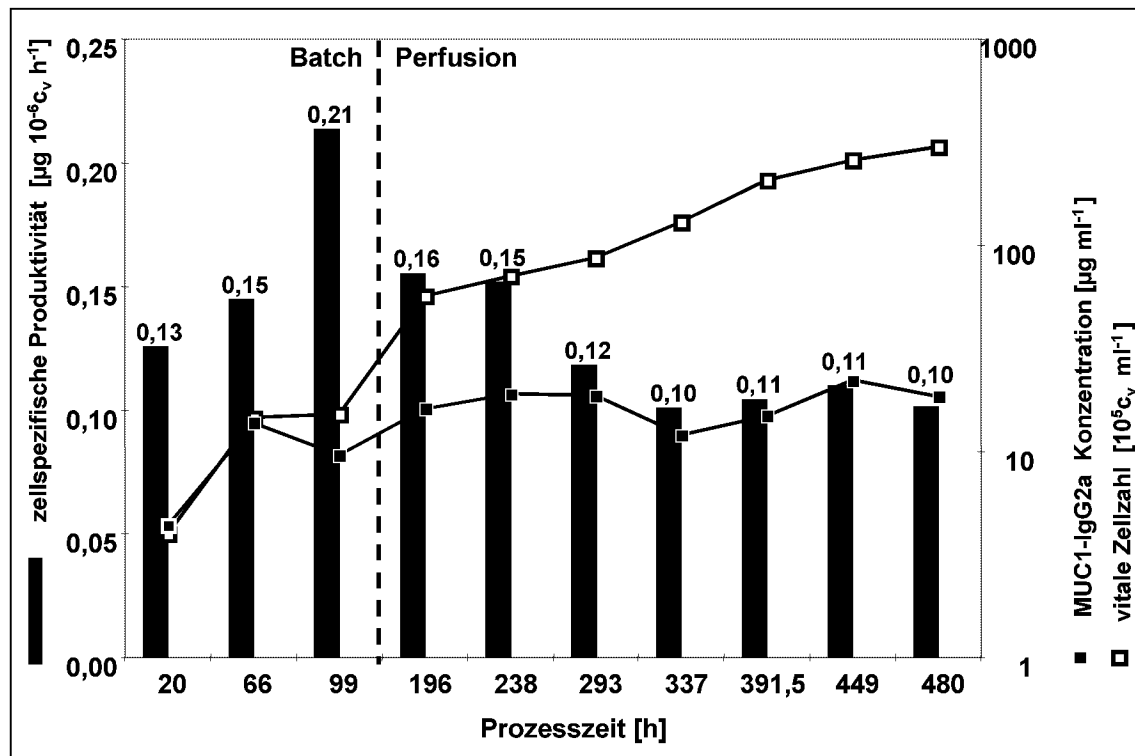


Abbildung 14: Vitale Zellzahl und Produktbildung in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

Betrachtet man die Produktbildung im Verlauf des Prozesses genauer, so ist festzustellen, dass die zellspezifische Produktivität während der kontinuierlichen Phase mit ansteigender vitaler Zellzahl abnimmt (**Abbildung 14**). Die Produktivität liegt in der späteren Produktionsphase bei etwa $0,11 \mu\text{g } 10^6 \text{ c}_v \text{ h}^{-1}$, also um etwa 50 % niedriger als in Batch Kultur (vergleiche **Abbildung 12**). Dies führte trotz der sehr hohen Lebendzelldichte dazu, dass die MUC1-IgG2a Konzentration in der perfusiven Phase nur zwischen 12 und $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ lag (**Abbildung 14**).

Daraus resultiert, dass sowohl was die Produktkonzentration, als auch was die Raum-Zeit Ausbeute betrifft, noch Potential zur Steigerung gegeben ist. Da die erreichte maximale vitale Zellzahl als optimiert betrachtet werden kann, liegt dieses Potential zur weiteren Optimierung des Prozesses hauptsächlich in einer Steigerung der zellspezifischen Produktivität während der Hochzelldichte-Phase.

Was die Produktquantität betrifft bestand zu diesem Zeitpunkt der Prozessentwicklung noch Verbesserungspotential, so dass Untersuchungen zur möglichen Ursache der verminderten zellspezifischen Produktivität erforderlich waren. Bevor hier darauf näher eingegangen werden soll, ist jedoch eine detaillierte Betrachtung der Produktqualität sinnvoll.

4.3.1 Produktqualität in kontinuierlicher Perfusionskultur

In Kapitel 4.1.1 konnte für Batch Kulturen gezeigt werden, dass die Produktqualität im Verlauf des Batch mit abnehmender Vitalität schlechter wird (**Abbildung 1**, zur besseren Vergleichbarkeit unten nochmals gezeigt). Vergleicht man dahingegen den Verlauf der Produktqualität in Batch Kulturen mit der während der kontinuierlichen Perfusionskultur (**Abbildung 15, B**), so fällt auf, dass auch nach längerer Prozessdauer kaum Degradationsprodukte auftreten. Das vollständige MUC1-IgG2a Fusionsprotein stellt die Hauptmenge an Protein in der Produktlösung dar. Dies dürfte zum einen auf eine deutlich geringere Proteaseaktivität zurückzuführen sein, vor allem bedingt durch die durchgehend hohe Vitalität von $> 90\%$ verbunden mit weniger lysierenden Zellen (**Abbildung 15, C**).

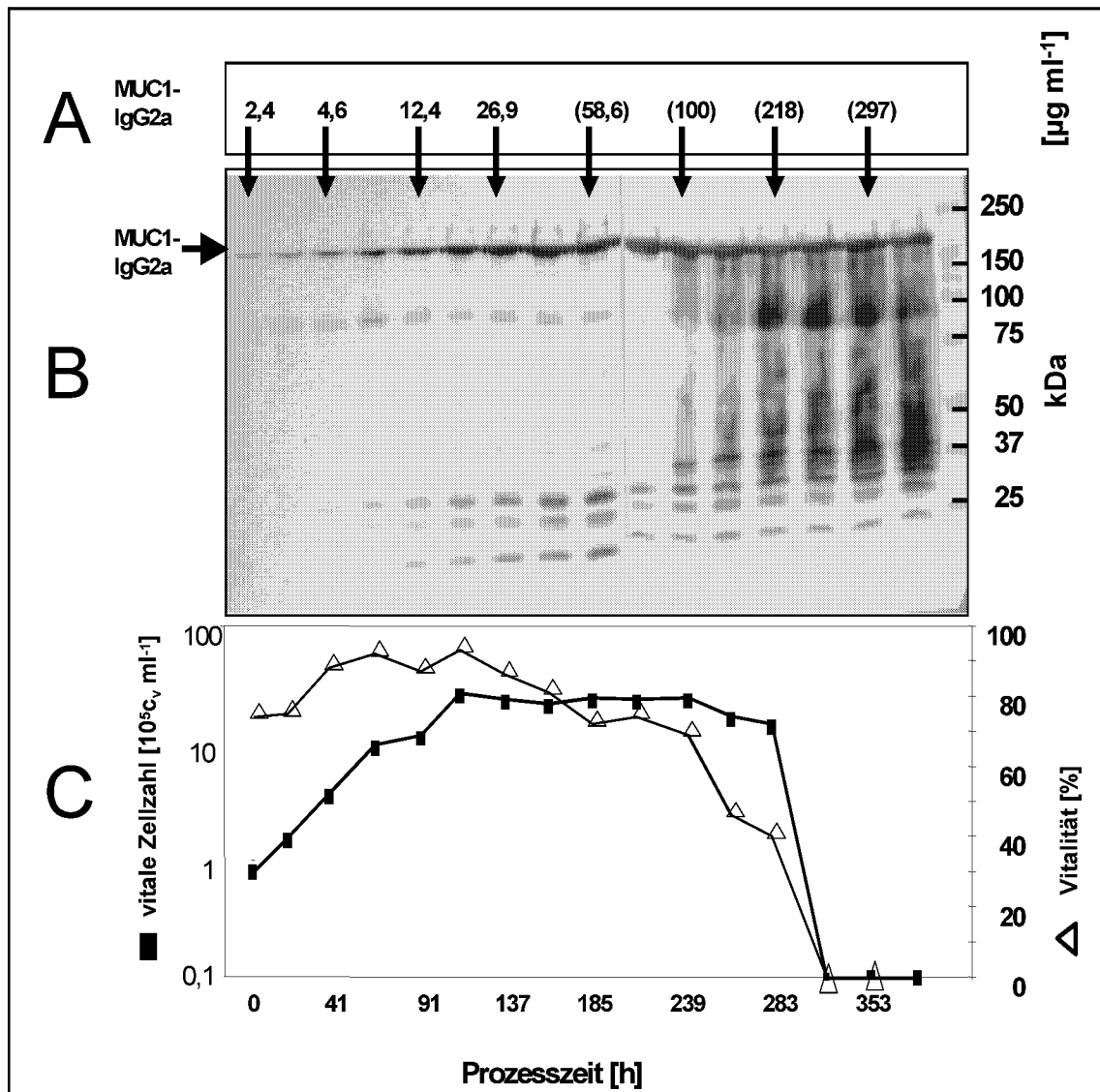


Abbildung 1: MUC1-IgG2a Konzentration (A), Produktqualität (B) und Vitalität (C) in Batch Kultur.

Zum anderen ist bedingt durch die geringe Verweilzeit die Kontaktdauer des MUC1-IgG2a mit den Proteasen bei der für enzymatische Aktivität günstigen Kultivierungstemperatur von 37°C mit 6 - 24 h deutlich geringer als in Batch Kultur mit 300 h, was den negativen Einfluss eventuell höherer Proteasekonzentrationen aufgrund höherer Zelldichten wieder kompensiert. Das Produkt aus Verweilzeit und Proteasekonzentration dürfte in etwa konstant sein. Daher dürfte vor allem die höhere Vitalität in der Perfusionskultur zur höheren Produktreinheit beitragen. Was das Ausmaß proteolytischer Produktdegradierung betrifft, ist die kontinuierliche Perfusionskultur daher eindeutig der Batch Kultur vorzuziehen. Der relativ hohe Reinheitsgrad des Produktes im Kulturüberstand dürfte die weitere Aufreinigung des MUC1-IgG2a deutlich vereinfachen und somit dazu beitragen Kosten einzusparen.

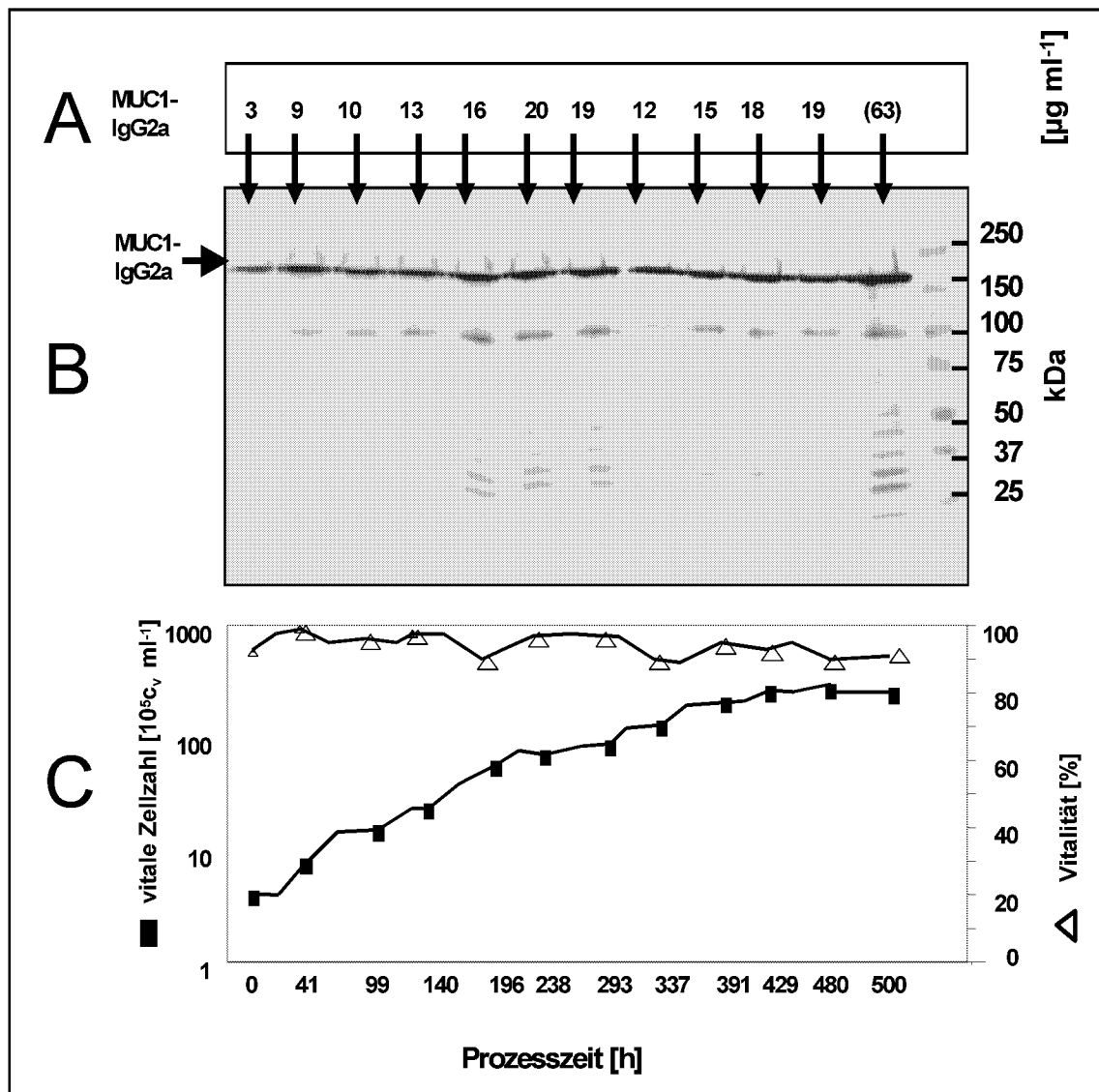


Abbildung 15: Vitalität und Produktqualität in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

Von ebenso großer, oder in Anbetracht der Bedeutung der Glykosylierung für die Funktionalität des MUC1 noch größerer Bedeutung, ist jedoch auch die glykolytische Produktdegradierung. Deshalb war es auch im Rahmen der Prozessentwicklung von immenser Wichtigkeit, die Glykosylierung des MUC1-IgG2a Proteins zu diesem Zeitpunkt detailliert zu untersuchen, zumal bekannt ist, dass eine Vielzahl von Prozessparametern die Proteinglykosylierung beeinflussen kann [19, 91, 108, 109]. Die Ergebnisse intensiver Untersuchungen zur Glykostruktur der O-Glykane im Bereich der TR des MUC1-IgG2a aus kontinuierlicher Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung sind in **Abbildung 16** dargestellt. Die Untersuchungen wurden im Mucin Biologie Labor von Professor Hansson, Universität Göteborg durchgeführt.

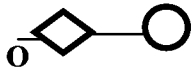
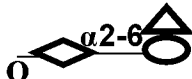
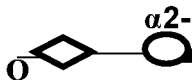
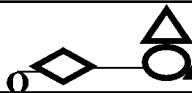
Besetzungsdichte potentieller O-Glykosylierungspositionen (TR-Bereich von MUC1-IgG2a)		3-5 von 5 4,4 im Mittel	
Art der vorhandenen O-Glykane		Core-1 Antennenstruktur	% der Peakfläche für alle Zucker
neutral			0,9
Art der vorhandenen Zucker		Core-1 Antennenstruktur	% der Peakfläche für alle sialylierten Zucker
sialyliert			0,4
sialyliert			82,2
Di-sialyliert			17,2
 N-Acetylgalactosamin  N-Acetylneuraminsäure (Sialylsäure)  Galactose			

Abbildung 16: Glykosylierung von MUC1-IgG2a aus Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

Nur sehr wenige Zucker sind neutral (GalNAc-Gal; T-Epitop). Der überwiegende Anteil der Zucker trägt hingegen Ladungen. Betrachtet man ausschließlich sialylierte Zucker, so tragen kaum Zucker die Sialylsäure in ausschließlich $\alpha 2-6$ Position.

Die meisten der mono-sialylierten Zucker sind $\alpha 2-3$ sialyliert (sialyl-T). Ein nicht unerheblicher Anteil der Zucker ist di-sialyliert (di-sialyl-T). Damit liegen auf dem MUC1-IgG2a ins-

gesamt nur core-1 basierte Glykane vor. Da core-2 Glykane nicht vorhanden sind und T-Epitope, entspricht die Glykosylierung der Krebs-assoziierten MUC1-Glykosylierung und nicht der Glykosylierung von MUC1 auf nicht entarteten Zellen (überwiegend core-2) [6, 12, 50, 51, 52, 110]. Diese Glykosylierung stimmt mit den durch Immunoblots mit den Antikörpern HMFG-1, HMFG-2 und SM3 (Kapitel 4.1.1) gefundenen Ergebnissen überein, welche ebenfalls auf überwiegend core-1 Glykosylierung mit Krebs-assoziierten Glykoepitopen hindeuteten. Dies zeigt, dass die auf Immunoblots basierende Inprozesskontrolle eine schnelle Abschätzung der relevanten Glykostruktur ermöglicht. Die detaillierte Analyse der Glykane zeigte zudem, dass 3-5 der 5 potentiellen O-Glykosylierungsstellen besetzt sind (im Mittel 4,4 Stellen). Da diese Glykosylierung der Glykosylierung von MUC1 auf Brustkrebszellen ähnlich erscheint, wurde der IgG2a-Fc Teil des in dieser Fermentation MUC1-IgG2a im Labor von Professor Hansson enzymatisch (mittels Enterokinase) abgespalten und das so gewonnene MUC1 in Mausstudien zur Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinanten MUC1 *in vivo* benutzt. Ergebnisse aus diesen Studien stehen zur Zeit noch aus. Insgesamt rechtfertigte die Glykosylierung ebenso wie die gewonnene Produktmenge eine Weiterführung der Prozessentwicklung, deren Schwerpunkt nun auf die Steigerung der zellspezifischen Produktivität in kontinuierlicher Hochzelldeckkultur gelegt wurde.

4.3.2 Beobachtungen zum Zellstoffwechsel in Perfusionskultur

Bisher konnte für die vorliegende CHO-MUC1-IgG2a Zelle ein Zusammenhang zwischen der zellspezifischen Produktivität und dem Verhältnis von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse und damit der Effizienz der ATP-Bereitstellung beobachtet werden (Kapitel 4.2.3). Daher ist es naheliegend, auch für den kontinuierlichen Perfusionsprozess diese Bereiche des Stoffwechsels zu betrachten. Eine Betrachtung der OUR erscheint sinnvoll. Für die unter Kapitel 4.3 gezeigten Versuche lag jedoch keine Möglichkeit der OUR-Abschätzung vor. Deshalb soll die Betrachtung des Stoffwechsels an dieser Stelle auf die Glykolyse bzw. den Glukose-/Laktatstoffwechsel beschränkt werden. Wie bereits gezeigt, konnte die Glukosekonzentration während der gesamten Kulturdauer auf etwa 12 mmol l^{-1} gehalten werden, es lag also kontinuierlich ein Überschuss an Glukose vor.

Zu keiner Zeit kam es zu einer Glukoselimitierung. Trotz der hohen Durchflussraten stellte sich eine Laktatkonzentration von $> 10 \text{ mmol l}^{-1}$ ein (**Abbildung 17**).

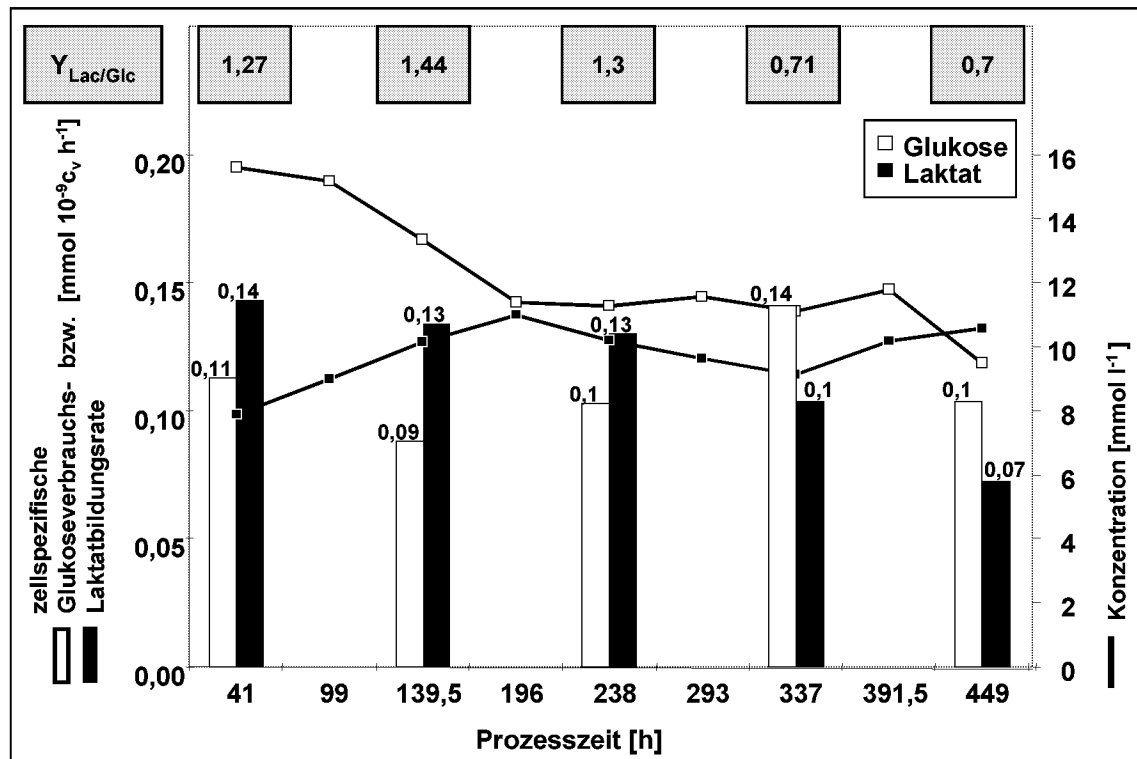


Abbildung 17: Glukose- und Laktatstoffwechsel in Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

Betrachtet man den Ertragskoeffizienten $Y_{Lac/Glc}$ so wird deutlich, dass über die gesamte Prozessdauer mehr als 0,7 mol Laktat pro mol Glukose gebildet wurde (**Abbildung 17**). Es liegt offensichtlich ein Glukose-Überschussmetabolismus vor. Dieser ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Glykolyserate, wobei jedoch die Hauptmenge an Glukose über Pyruvat in Laktat einfließt und nicht in den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung zu gelangen scheint. Offensichtlich liegt hier ein ausgeprägter Crabtree-Effekt vor. Darauf lässt die Tatsache schließen, dass die Bildung von Laktat umso höher ist, je höher auch die Glukosekonzentration in der Kultur ist.

Der Crabtree-Effekt ist verbunden mit einer Reduzierung des aeroben Stoffwechsels, also der oxydativen Phosphorylierung, und könnte damit Ursache der verringerten ATP-Bereitstellung sein. Daher könnte der Crabtree-Effekt mit verantwortlich sein für die relativ geringe zellspezifische Produktivität.

Der $Y_{Lac/Glc}$ war zum Ende der Prozessdauer am niedrigsten. Hier wurden auch die niedrigsten Glukosekonzentrationen und die niedrigsten zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate beobachtet (**Abbildung 17**). Möglicherweise ist gegen Ende der Crabtree-Effekt etwas weniger ausgeprägt.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ein erheblicher Anteil der Glukose nicht in die oxidative Phosphorylierung eingeht und damit nicht effizient zur ATP-Bildung beitragen kann, sondern in Laktat einfließt, was deutlich weniger ATP-Bildung bedeutet.

Möglicherweise könnte die zellspezifische Produktivität weiter verbessert werden, wenn es gelingt, die Energiebereitstellung durch den Glukosestoffwechsel zu optimieren, indem der Crabtree-Effekt vermieden wird. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, könnte die Senkung der Glukosekonzentration in der Kultur sein. Mit dem Ziel, einen bezüglich des Glukosestoffwechsels potentiell optimierten kontinuierlichen Perfusionsprozess zu etablieren, wurde daher zunächst der Einfluss von Glukose und Laktat auf Zellwachstum und Produktbildung in Batch Kulturen untersucht, bevor eine optimierte Prozessstrategie ausgearbeitet werden sollte.

4.3.3 Ergebnisse der Übertragung auf kontinuierliche Perfusionskultur

Die Ergebnisse der Übertragung der im Batch optimierten Kulturparameter auf kontinuierliche Perfusionskultur ohne Substratlimitierung können wie folgt zusammengefasst werden (Abbildung 18):

In einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor mit Zellrückhaltung durch Spinfilter und bei konstanten, nicht limitierenden Glukose- und Glutaminkonzentrationen konnte eine Hochzelldichte von über 3×10^7 vitalen Zellen pro ml bei einer Vitalität von über 90% erreicht werden. Die maximale Raum-Zeit Ausbeute konnte gegenüber einer Batch Kultur um nahezu den Faktor 2 auf etwa $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gesteigert werden. Dank der hohen Vitalität und der kurzen Verweilzeit war dabei die Produktqualität und die Produktreinheit sehr hoch. Detaillierte Glykoanalytik zeigte, dass das rekombinante MUC1-IgG2a aus dieser Kultur mit core-1 T-Epitopen überwiegend Krebs-assoziierte Glykosylierung aufweist, was die Nutzung des aufgereinigten Produkts in *in vivo* Studien in Mäusen ermöglichte. Die zellspezifische Produktivität lag jedoch gegenüber einer Batch Kultur um 50% niedriger, was möglicherweise mit einem ineffizienten Glukose Überschussmetabolismus (Crabtree-Effekt) zusammenhängen könnte. Eine Prozessstrategie in kontinuierlicher Perfusionskultur, welche den Crabtree-Effekt vermeidet und die oxidative Phosphorylierung fördert, könnte eventuell zu einer Steigerung der zellspezifischen Produktivität bei Hochzellichten, und somit zu einer weiteren Steigerung der Raum-Zeit Ausbeute führen.

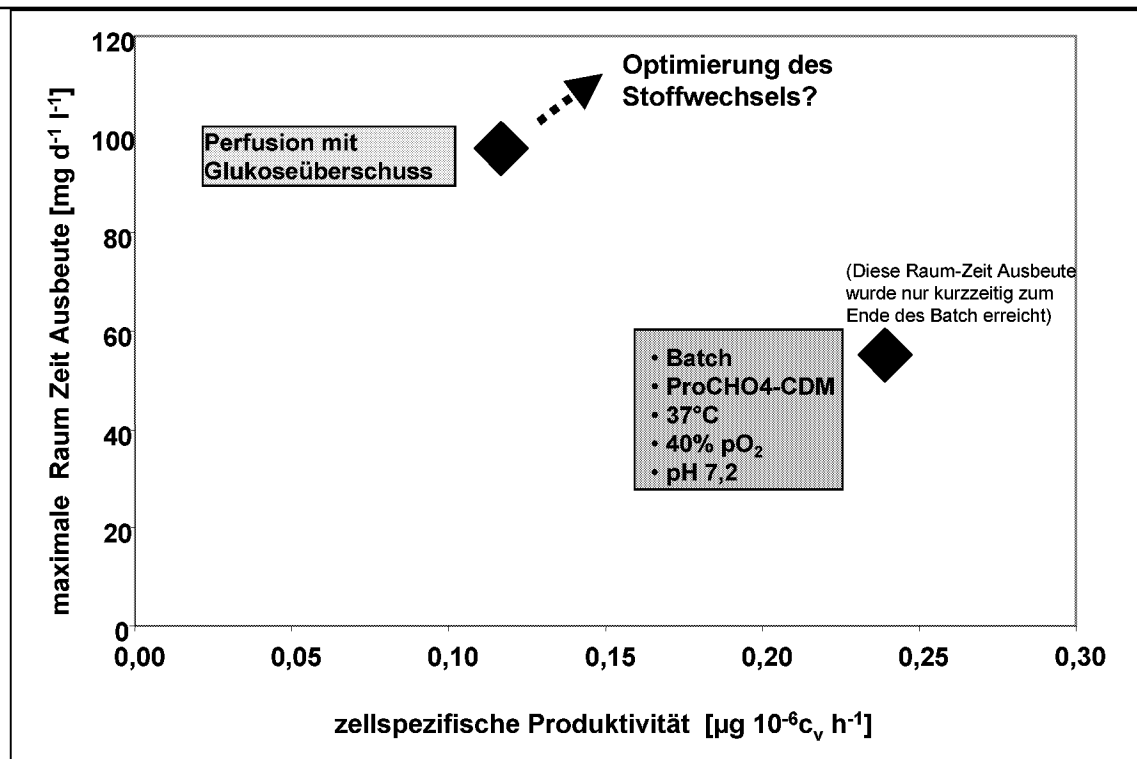


Abbildung 18: Vergleich von Raum-Zeit Ausbeute und spezifischer Produktivität in Batch und Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung.

4.4 Untersuchungen zum Glukose-Laktat Stoffwechsel

Um den Glukose- und Laktatstoffwechsel und dessen Einfluss auf Zellwachstum und Produktbildung eingehender zu untersuchen, wurden unter Nutzung der cellferm-pro[®] Anlage in parallelen Spinner Kulturen die Glukoseanfangskonzentration und in einem weiteren Versuchsansatz die Laktatanfangskonzentration variiert. Glukose dient der Zelle neben Glutamin als wichtiger Energielieferant. Je mehr Glukose in Laktat eingeht, desto geringer ist der Anteil des zellulären ATP, welches aus Glukose generiert wird. Glukose ist jedoch auch Hauptquelle von Vorläufermolekülen für die Biosynthese, insbesondere von Nukleinsäuren [111]. Ein bedeutender Einfluss der Glukosekonzentration auf Wachstum und Produktbildung, ist von daher zu erwarten. Laktat ist bei Säugerzellen eines der Hauptabbauprodukte aus dem Zentralstoffwechsel. Die Menge an gebildetem Laktat im Verhältnis zu anderen Substraten lässt Rückschlüsse auf den Zentralmetabolismus zu. In höheren Konzentrationen kann Laktat inhibierend auf Zellwachstum und Produktbildung wirken. Schon aus diesem Grund ist die Bildung von Laktat zu vermeiden [34, 36, 82, 97, 107, 112]. Darüber hinaus geht, wie bereits zuvor diskutiert, eine verminderte Laktatbildung mit einem energetisch effizienteren Stoffwechsel einher, so dass Maßnahmen zur Senkung der Laktatbildung indirekt auch zur Steigerung der Produktivität führen könnten.

4.4.1 Einfluss der Glukosekonzentration

Zunächst wurde die Glukoseanfangskonzentration variiert. Dazu wurden in zwei Batch Fermentationen die Glukoseanfangskonzentrationen auf 12,5 oder 20 mmol l⁻¹ eingestellt und beide Kultivierungen parallel bei 37°C, 40% pO₂ und pH 7,2 durchgeführt. Die durch die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen abweichende Osmolalität wurde über Zugabe von Natriumchlorid in beiden Kulturen wieder ausgeglichen.

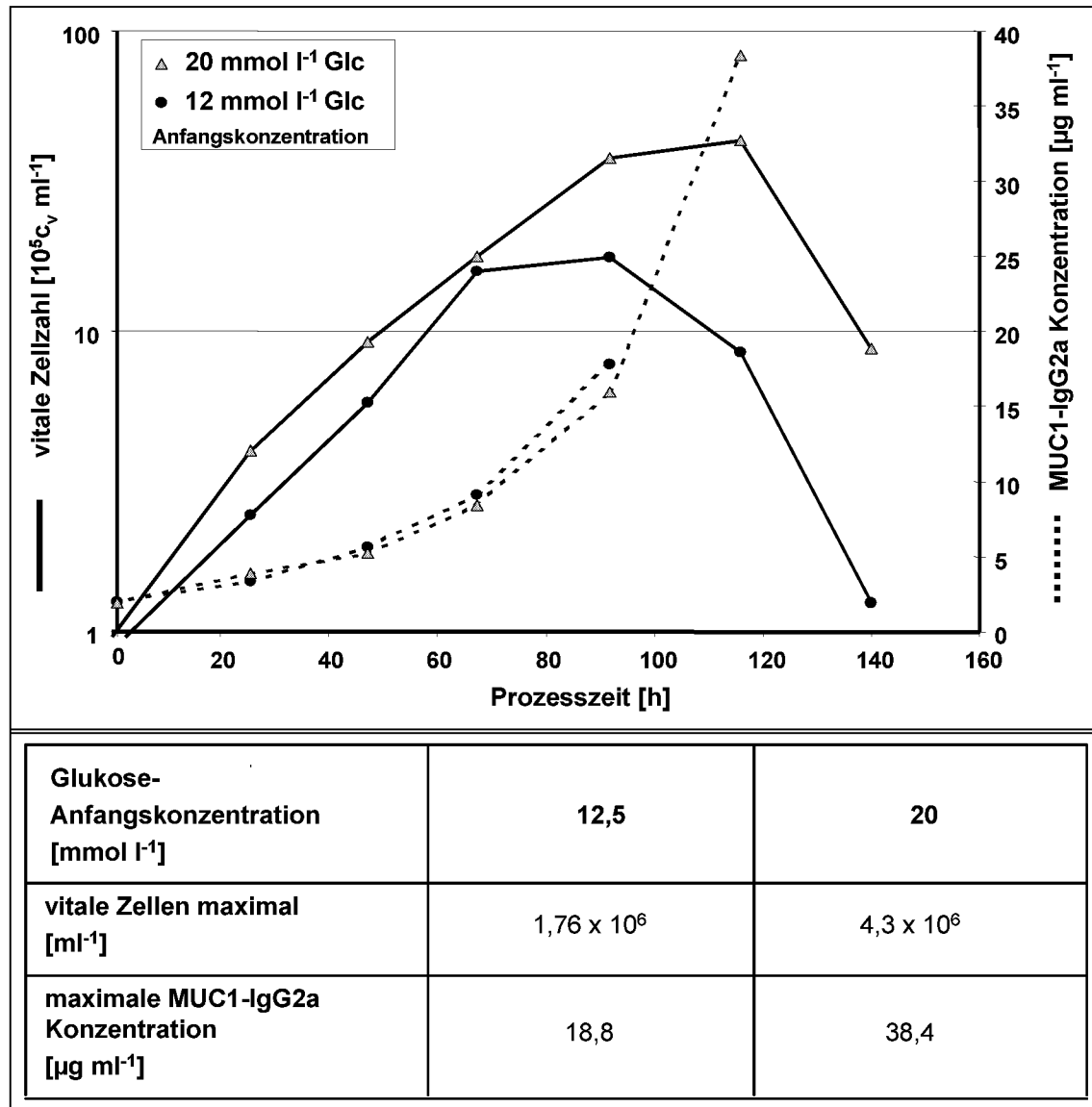


Abbildung 19: Einfluss der Glukoseanfangskonzentration auf Wachstum und Produktkonzentration

Verbunden mit der höheren Zelldichte wurde auch eine höhere maximale MUC1-IgG2a Konzentration erzielt (**Abbildung 19**). Dabei konnten bei 12,5 mmol l⁻¹ Glukoseanfangskonzentration pro 1 x 10⁶ ml⁻¹ vitale Zellen etwa 10,7 µg ml⁻¹ MUC1-IgG2a gewonnen werden, bei 20 mmol l⁻¹ Glukose jedoch nur etwa 8,9 µg ml⁻¹. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die mittlere zellspezifische Produktivität bei der geringeren Glukoseanfangskonzentration höher lag (**Abbildung 20**). Glukose fördert offenbar Wachstum auf Kosten der Produktivität. In der Tat wurden bei beiden Kulturen die höchsten spezifischen Produktivitäten jeweils dann erreicht, als nahezu Glukoselimitierung vorlag (**Abbildung 20**). Interessant ist hier natürlich erneut die Betrachtung des Laktatstoffwechsels zu diesem Zeitpunkt.

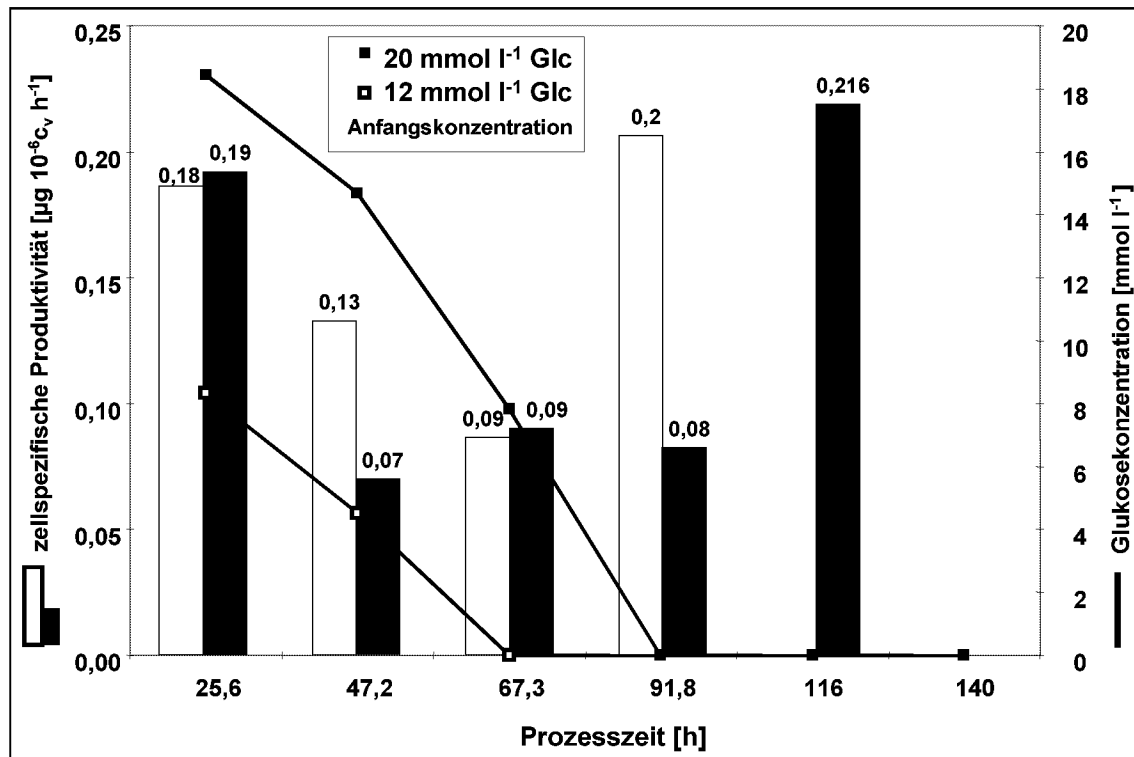


Abbildung 20: Einfluss der Glukoseanfängskonzentration auf die spezifische Produktivität

Betrachtet man den Verlauf der Wachstumskurven bei verschiedenen Glukoseanfängskonzentrationen, so fällt auf, dass die höhere Glukosekonzentration zu einer höheren maximal erreichten vitalen Zellzahl führt (**Abbildung 19**). In dem gezeigten Versuch und auch anderen Versuchen konnte wiederholt beobachtet werden, dass für jedes Gramm pro Liter Glukose (je 5,56 mmol l⁻¹) maximal etwa 1×10^6 ml⁻¹ vitale Zellen erreicht werden können. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Zellwachstum und Zellteilung nur stattfindet, solange Glukose vorhanden ist. Vergleicht man **Abbildung 19** und **Abbildung 20**, so wird deutlich, dass zusammen mit Glukosedepletion die exponentielle Wachstumsphase endet und nur kurze Zeit später die maximale vitale Zellzahl erreicht wird. Nach Monod dürfte die Wachstumsrate der Zellen dann rasch gegen Null gehen, wenn die Glukosekonzentration den $K_{m, \text{Glc}}$ unterschreitet. Dieser wird mit einem Wert zwischen 0,06 mmol l⁻¹ und 0,4 mmol l⁻¹ angegeben [113, 114]. Zum Erreichen hoher Zelldichten ist demzufolge eine Versorgung mit Glukose nötig, da mit Eintreten totaler Glukoselimitierung die zellspezifische Wachstumsrate auf Null absinkt und die Zellen absterben.

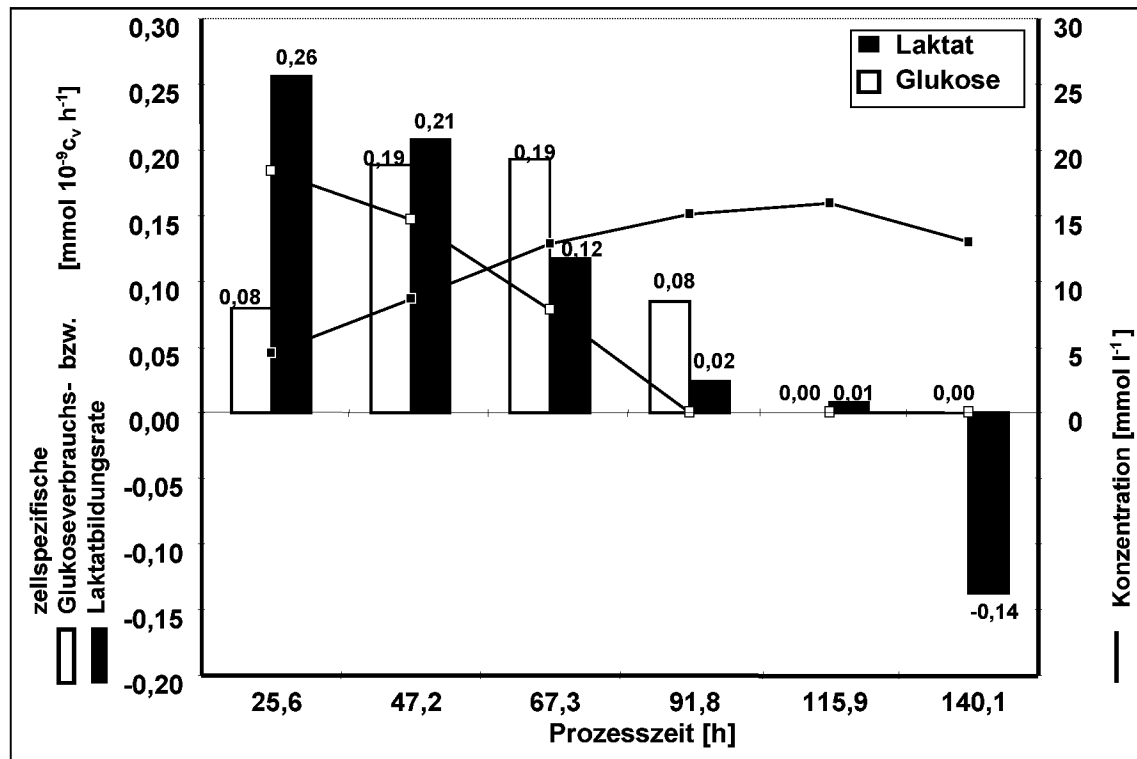


Abbildung 21: Glukose- und Laktatstoffwechsel bei 20 mmol l⁻¹ Glukoseanfangskonzentration

Abbildung 21 zeigt für 20 mmol l⁻¹ Glukoseanfangskonzentration, dass zellspezifische Glukoseverbrauchsrate q_{Glc} und Laktatbildungsrate q_{Lac} zurückgehen, wenn die Glukosekonzentration gegen Null geht. Die Glukoseverbrauchsrate ist zeitgleich mit der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten (maximale Wachstumsrate μ). Nach Eintritt der Glukoselimitierung geht q_{Lac} zunächst auf Null zurück. Schließlich liegt sogar Laktatverbrauch vor, was sich in einer abnehmenden Laktatkonzentration äußert. Gleiches wurde bei 12,5 mmol l⁻¹ Glukoseanfangskonzentration beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein „metabolic-shift“ von Laktatproduktion zu Laktatverbrauch bei Säugerzellkulturen ist indes nicht neu, sondern für verschiedene Zelllinien und auch CHO-Zellen als typisch beschrieben oder zumindest beobachtet worden [34, 115, 116, 117, 118]. In der Endphase des Batch während des Laktatverbrauchs und während maximaler Glukoselimitierung (beschrieben durch den Grad der Glukoselimitierung (DGL)) ist die spezifische Produktivität maximal (**Abbildung 22**). Da die Kultur jedoch substratlimitiert ist und dann sehr schnell abstirbt, ist die Dauer dieser hochproduktiven Phase nur sehr kurz. Kontrolliertes Zufüttern von Glukose und anderen Substraten könnte diese Phase dagegen aufrecht erhalten. Ein Fed-Batch mit einer Anwachsphase unter Glukoseüberschuss und einer Produktionsphase mit einer Glukosekonzentration unter $K_{m,Glc}$ könnte dies realisieren.

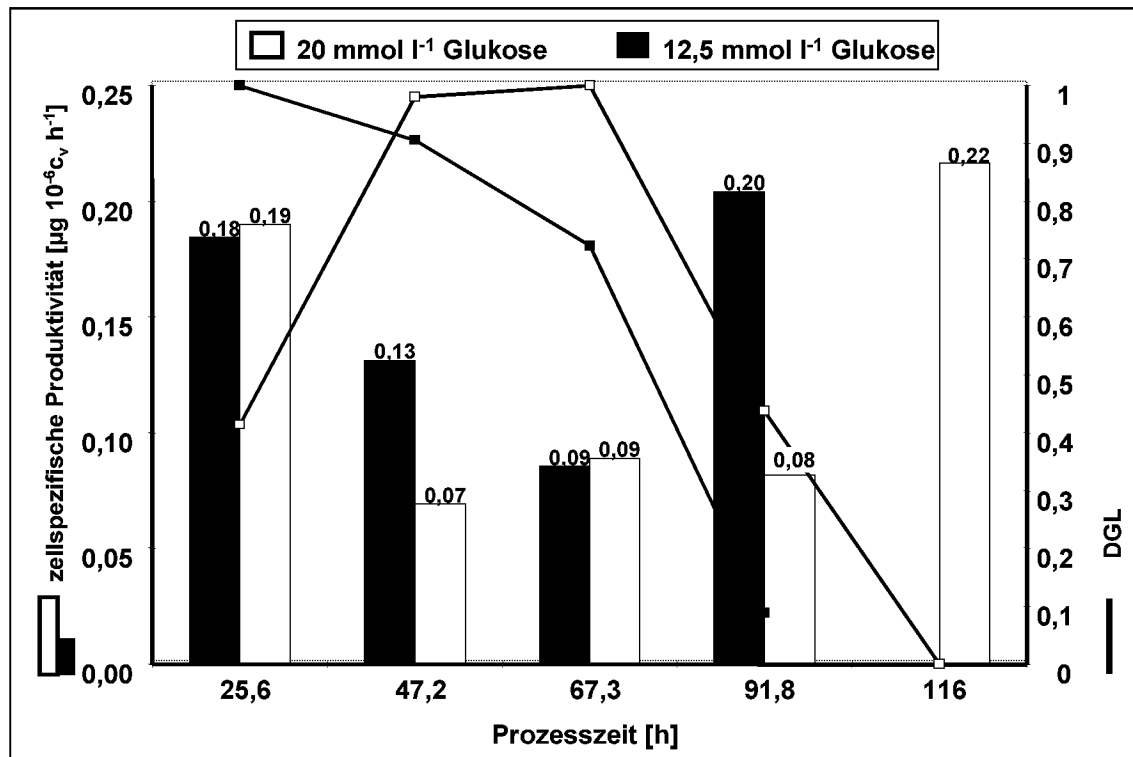


Abbildung 22: Spezifische Produktivität und DGL bei unterschiedlichen Glukoseanfängskonzentrationen

Dies dürfte zu dem Stoffwechsel mit Laktatverbrauch und niedriger Wachstumsrate führen. Ob letztlich der veränderte Glukosemetabolismus ursächlich die Produktivität beeinflusst (evtl. durch Vermeidung des Crabtree-Effekts, verbunden mit effizienterer Energieausbeute), oder aber die Glukoselimitierung die Wachstumsrate senkt und diese die Produktivität z.B. über einen veränderten Zellzyklus bestimmt, ist dabei nicht klar. Um eine erhöhte Produktivität zu erzielen, erscheint daher eine Prozessführung als geeignet, die beides realisiert, nämlich eine Glukosekonzentration unter $K_{m,Glc}$ ermöglicht und somit die Wachstumsrate μ senkt. Dabei sollten jedoch Limitierungen durch andere Substrate vermieden werden. Auch in einem kontinuierlich betriebenen Perfusionsreaktor könnte die Glukosekonzentration unter den $K_{m,Glc}$ gebracht werden, was Dank der hohen Zelldichten und der Entkopplung von Durchflussrate und Wachstumsrate auch bei im Vergleich zu chemostatischer Kultur relativ hohen Durchflussraten realisierbar sein könnte. So könnte eine nahezu glukoselimitierte Perfusionskultur mit niedriger Wachstumsrate der Zellen möglicherweise zu einer erhöhten Produktivität führen, wenn man die in Kapitel 4 beschriebene Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss zum Vergleich heranzieht. Damit stellt die Glukose limitierte Perfusionskultur potentiell eine Prozessstrategie dar, welche eine erhöhte Raum-Zeit Ausbeute liefern könnte. Diese Möglichkeit soll in Kapitel 5 eingehender diskutiert werden.

4.4.2 Einfluss der Laktatkonzentration

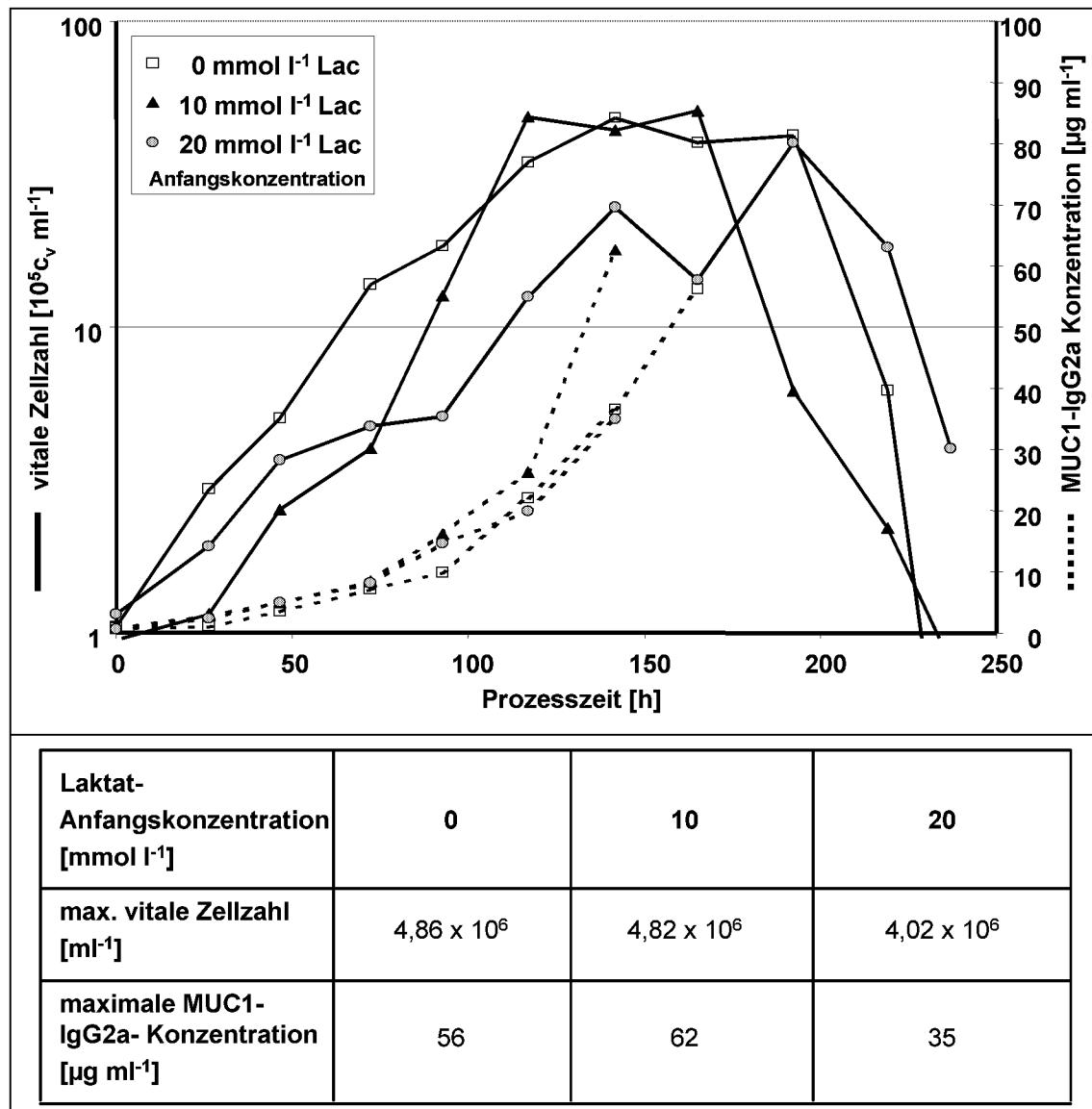


Abbildung 23: Einfluss der Laktatanfangskonzentration auf Wachstum und Produktkonzentration

Die Produktivität nimmt in der Batch Kultur dann zu, wenn die Laktatkonzentration abnimmt. Basierend auf den bisher gezeigten Untersuchungen, kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass allein oder partiell die Abnahme der Laktatkonzentration positiv auf die Produktivität wirkt. Dies scheint plausibel, da in der Vergangenheit häufig gezeigt wurde, dass Laktat in höheren Konzentrationen negativ auf Wachstum und Produktivität wirken kann [34, 36, 119]. Um zu untersuchen, ob die Laktatkonzentration die Produktivität beeinflusst, wurde analog zum Versuchsansatz zur Untersuchung des Einflusses der Glukoseanfangskonzentration nun die Laktatanfangskonzentration variiert. Die Laktatkonzentrationen wurden auf 0 mmol l⁻¹, 10 mmol l⁻¹ und 20 mmol l⁻¹ eingestellt. Zwischen 0 mmol l⁻¹ und 10 mmol l⁻¹ Laktat zu Beginn

der Kultur wurden keine maßgeblichen Unterschiede in der maximal erreichten Zellzahl und Produktkonzentration beobachtet (**Abbildung 23**).

Bei 20 mmol l⁻¹ Laktat zu Beginn der Kultur, konnten jedoch im Vergleich zu den anderen Laktatanfangskonzentrationen nur etwa 80% der maximalen vitalen Zellzahl und etwa 60% der maximalen MUC1-IgG2a Konzentration erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in der maximalen Produktkonzentration sind auf die höhere vitale Zellzahl zurückzuführen. Die mittlere zellspezifische Produktivität lag bei 10 mmol l⁻¹ Laktatanfangskonzentration zu Beginn der Kultur höher als bei 0 mmol l⁻¹ oder 20 mmol l⁻¹. Im Verlauf der Kultur glichen die Produktivitäten sich jedoch aneinander an (Daten nicht gezeigt). Die höhere Produktivität bei 10 mmol l⁻¹ Laktat zu Beginn der Kultur könnte darauf hinweisen, dass die inokulierten Zellen, welche standardmäßig selbst aus einer Kultur mit hohen vitalen Zellzahlen und einer Laktatkonzentration von meist über 10 mmol l⁻¹ Laktat entnommen werden, keiner ausgeprägten enzymatischen Anpassungsphase unterliegen. Möglicherweise ist so der in die Proteinexpression eingebundene Enzymapparat effizienter, während ohne Laktat im Medium dieser Enzymapparat nicht optimal arbeiten kann.

Somit konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der hohen spezifischen Produktivität und niedriger Laktatkonzentration gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass nicht die Laktatkonzentration an sich, sondern der mit dem verlangsamten Wachstum unter Glukoselimitierung einhergehende Stoffwechsel die Steigerung der Produktivität verursacht.

4.4.3 Ergebnisse zum Glukose- und Laktatstoffwechsel

Glukosekonzentrationen deutlich höher als $K_{m,Glc}$ (0,06-0,4 mmol l⁻¹) sind erforderlich, um hohe Wachstumsraten und hohe vitale Zellzahlen in Batch Kulturen zu erreichen. Mit abnehmender Glukosekonzentration sinken die zellspezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten. Die zellspezifische Produktivität steigt verbunden damit an und erreicht bei Glukosedepletion (Glukosekonzentration < $K_{m,Glc}$) einen maximalen Wert. Gleichzeitig sinkt die Wachstumsrate μ deutlich ab. Die gleichzeitig abnehmende Laktatkonzentration allein ist nicht Grund für die gesteigerte Produktivität. Die Zellen sind bei Glukoselimitierung in der Lage Laktat zu verbrauchen. Ursächliche Zusammenhänge zwischen Glukoselimitierung, verminderter Wachstumsrate und gesteigerter Produktivität zum Ende der Batch Kultur konnten noch nicht geklärt werden. Fed-Batch oder kontinuierliche Perfusionskultur mit einer Glukosekonzentration < $K_{m,Glc}$ und damit verminderter Wachstumsrate könnten jedoch eine gesteigerte Produktivität und Raum-Zeit Ausbeute liefern.

5 Entwicklung eines metabolisch optimierten Bioprozesses zur Herstellung von MUC1-IgG2a

Aufgrund der bisher diskutierten Ergebnisse erscheint die glukoselimitierte Perfusionskultur als eine Möglichkeit, um die Raum-Zeit Ausbeute zu steigern. Die Prozessstrategie zum Erreichen des gewünschten Stoffwechsels in kontinuierlicher Perfusionskultur ist dabei entscheidend. Die variablen Prozessparameter sind:

- Die angestrebte Glukosekonzentration in der Kultur
- Die Glukosekonzentration im zugefütterten Medium
- Der Startzeitpunkt der Glukoselimitierung
- Das Fütterungsprofil für den Medienzulauf

Hilfreich bei der Festlegung dieser Größen war neben den bereits diskutierten Ergebnissen eine detaillierte Literaturrecherche zum Thema „Glukose limitierte Kultur“, um möglichst viele Erfahrungswerte in die zu entwickelnde Prozessstrategie einfließen lassen zu können.

Mini-Review 6– Glukose limitierte Kultur

Eine Vielzahl von Autoren berichtet über glukoselimitierte Zellkulturen. Ziel vieler Prozesse war es dabei, die Bildung des das Wachstum inhibierenden Laktats zu vermeiden oder zumindest zu senken. In chemostatischen Kulturen wurde durch Senkung der stationären Glukosekonzentration im Medium eine Absenkung der Glukosekonzentration auf Werte zwischen 0,5 und 1 mmol l⁻¹ erreicht, was zu einer deutlich niedrigeren Laktatbildungsrate führte [118, 120, 121, 122]. In einigen Fällen konnte die Glukosekonzentration auf 0,14 – 0,3 mmol l⁻¹ gesenkt werden, wobei in CHO und BHK Zellen ein „metabolic shift“ zu einem effizienteren Stoffwechsel mit niedrigerer Laktatbildung und verbesserten Biomasseertragskoeffizienten erreicht werden konnte [46, 114, 123]. Dieser kann auch bei anschließender moderater Erhöhung der Glukosekonzentration aufrecht erhalten werden und ermöglicht das Erreichen höherer vitaler Zellzahlen und somit höherer Produktausbeuten.

Die zellspezifische Produktivität konnte jedoch nur in einem Fall in einem limitierten Chemostat gesteigert werden. Hier trat erhöhte Antikörperproduktivität von Hybridomazellen bei Glukosekonzentrationen < 1 mmol l⁻¹ auf [124].

Eine Möglichkeit zu einem geänderten Stoffwechsel zu kommen, stellt der Glukose limitierte Fed-Batch dar [81]. So wurde in einem Beispiel nach Eintreten des „metabolic shift“ mit verminderter Laktatbildung der Prozess dann in chemostatischer Betriebsweise mit niedriger Glukosekonzentration fortgeführt [125]. Bei dieser Vorgehensweise wird im Fed-Batch mit zunehmender Limitierung die Wachstumsrate ebenfalls gesenkt, jedoch kann der metabolische Zustand nach dem „metabolic shift“ im Chemostat dann auch bei höherer Wachstumsrate aufrecht erhalten werden, aber ohne erhöhte Produktivität [126].

In anderen Fed-Batch Kulturen, mit Hybridoma und BHK-Zellen, konnte neben verminderter Laktatbildung, durch Glukoselimitierung eine erhöhte maximale Zellzahl erzielt werden [115, 127, 128].

In einigen Fed-Batch Kulturen konnte bei extremer Glukoselimitierung ($c_{Glc} < 0,1 \text{ mmol l}^{-1}$) zusätzlich eine gesteigerte spezifische Produktivität beobachtet werden [80, 129], teilweise verbunden mit Laktatverbrauch [128]. Dieses diauxische Wachstum wird mit einer Stoffwechseländerung von Glykolyse zu Glukoneogenese hypothesisiert [116].

In limitierten kontinuierlichen Perfusionskulturen wurde zwar von verminderter Laktatproduktion berichtet, jedoch nicht von gesteigerter spezifischer Produktivität [47, 130, 131, 132]. In Perfusionskulturen mit L929 Fibroblasten wurde eine gesteigerte Glykolyse und Laktatbildung ab $0,28 \text{ mmol l}^{-1}$ Glukose beobachtet, unter diesem Wert hingegen trat keine Laktatproduktion sondern Laktatverbrauch auf [133].

Der Stoffwechsel der glukoselimitierten Zellen wurde ebenfalls eingehender untersucht. In Fibroblasten wurde unter Glukoselimitierung ein erhöhtes NAD/NADH-Verhältnis bei unveränderter „Adenylate Energy Charge“ beobachtet [134]. Pyruvat scheint verstärkt in den Citratzyklus einzufließen [46, 114]. Dies könnte die beobachtete gesteigerte OUR bei Glukoselimitierung erklären [82, 84]. Auch der Fluss von Glukose in den Pentosephosphatzyklus scheint bei CHO-Zellen unter Glukoselimitierung gesteigert zu sein [116]. Weiterhin wurde beobachtet, dass Glutamin unter Glukoselimitierung stärker oxidiert wird und somit eine höhere ATP-Ausbeute bringt, was durch Nutzung der Glutaminoxidase an Stelle der Transaminase zur Speisung des Citratzyklus erklärt wird [128, 135, 136]. Unter Glukoselimitierung ist die Wachstumsrate vermindert und der Zellzyklus verändert [137, 138, 139], auch gesteigerte Apoptose wurde beobachtet [140, 141].

Untersuchungen des Proteoms von Zellen, welche den „metabolic shift“ durchlaufen haben ergaben veränderte Expressionsniveaus von Enzymen der Glykolyse und anderen Proteinen [142, 143, 144]. Glukoselimitierung scheint indes auch Einfluss auf die Proteinglykosylierung zu haben. In glukoselimitierten Chemostatkulturen wurde mehrfach eine Veränderung der Glykosylierung beobachtet, verbunden mit dem Auftreten kürzerer Glykane [113, 145, 146] oder geringerer Besetzungsdichte der Glykosylierungsstellen, was durch eine Abnahme der UDP-Zucker-Pools in den Zellen unter Glukoselimitierung erklärt wird [147]. In einem anderen Fall wiederum konnte gezeigt werden, dass in BHK Zellen sich die Glykosylierung unter Glukoselimitierung nicht signifikant änderte [148]. Auch von geringerer Besetzungsdichte der Glykosylierungsstellen im Protein wird berichtet [120].

Schließlich wurde ebenfalls gezeigt, dass andere Substrate, wie Galaktose, Fruktose oder Uridin, die Glukose ersetzen können [100, 149].

Ergebnis der Literaturrecherche war vor allem, dass in kontinuierlichen Kulturen (Perfusion und Chemostat) mit Regelung der Glukosekonzentration auf niedrige Werte von bis zu $0,14 \text{ mmol l}^{-1}$ zwar ein effizienterer Metabolismus und somit weniger Laktatbildung trotz teilweise höherer vitaler Zellzahlen erreichbar ist, eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität jedoch nicht. Nur in stark limitierten Fed-Batch Kulturen wurde eine gesteigerte spezifische Produktivität beschrieben, zum Teil in Verbindung mit Laktatverbrauch, welcher nur bei extrem niedrigen Glukosekonzentrationen aufzutreten scheint.

Geringe Glukosekonzentrationen können nach dem aktuellen Stand der Technik nicht oder nur sehr schwer durch geregelte Glukosezufütterung eingestellt werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass Glukosekonzentrationen von unter $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ nur sehr ungenau und mit großer Störanfälligkeit durch online-Glukose Messsysteme erfasst werden können. Das hat Bedeutung für die zu etablierende Prozessstrategie.

Die Ergebnisse aus den weiter oben diskutierten Versuchen im Rahmen der durchgeführten Prozessentwicklung, sowie die Literatur lassen darauf schließen, dass zur Steigerung der spezifischen Produktivität Glukosekonzentrationen von unter $0,28 \text{ mmol l}^{-1}$ oder, um auch eine deutlich verminderte Wachstumsrate zu erzielen, von unter $K_{m, \text{Glc}}$, also etwa $0,06 \text{ mmol l}^{-1}$, in der Perfusionskultur realisiert werden müssten. Möglicherweise ist eine komplexe Regelstrategie wegen unzureichend sensibler Online-Meßsysteme hierzu nicht in der Lage und wäre für einen industriell angewandten Prozess eventuell auch zu sehr störanfällig.

Alternativ zu einer geregelten Glukosefütterung könnte wie in einem Chemostaten mit konstanter Glukosekonzentration im Medium die Durchflussrate konstant gehalten oder im Verlauf der Kultur weniger stark erhöht werden, als in Kapitel 4 gezeigt. In einem Chemostat würde sich so bei gegebener Durchflussrate eine Glukosekonzentration einstellen, die eine Wachstumsrate μ gleich der Durchflussrate D noch ermöglicht. Dies würde jedoch dazu führen, dass nur bei extrem niedrigen und schwer realisierbaren, sowie kaum profitablen Durchflussraten die Glukosekonzentration in den Bereich von $K_{m, \text{Glc}}$ gesenkt werden kann.

Im Perfusionsreaktor hingegen sind die Durchflussrate und die Wachstumsrate entkoppelt, da es durch die Zellrückhaltung nicht zur Auswaschung der Zellen bei $\mu_{\max} < D$ kommen kann. Daraus sollte resultieren, dass mit steigender Zellzahl die Glukosekonzentration weiter absinken kann, als dies im Chemostat ohne Zellrückhaltung der Fall wäre. Aus dieser Überlegung heraus schien eine konstante Durchflussrate im Bereich von $D < \mu_{\max}$ mit im Vergleich zu Kapitel 4 unveränderter Glukosekonzentration im Medium als geeignet, oder verkürzt formuliert:

- Glukoselimitierte Perfusionskultur mit konstanter Glukosezufütterung

Weiterhin könnten zwei andere Verfahrensweisen geeignet sein, um eine glukoselimitierte Kultur mit gesteigerter Produktivität zu erreichen:

- Perfusionskultur mit Glukoselimitierung durch online closed-loop Glukose Regelung unter Nutzung modernster online Glukose Messtechnologie
- Fed-Batch mit Glukoselimitierung durch reduzierte Glukose Zufütterung

Aufgrund der erfolgreichen Ergebnisse zur Raum-Zeit Ausbeute an MUC1-IgG2a in Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss, wurden zunächst die Ansätze zur Perfusionskultur getestet.

5.1 Glukoselimitierung in unterschiedlichen Verfahrensweisen

5.1.1 Glukose limitierte Perfusionskultur mit konstanter Glukosezufütterung

In einer weiteren Perfusionskultur wurde der Medienfluss im Verlauf der Kultur trotz steigender vitaler Zellzahl konstant gehalten. Die Durchflussrate war somit bis auf kleinere Schwankungen bedingt durch Änderungen des Kulturvolumens ebenfalls konstant. Die Kultur wurde ansonsten analog zur in Kapitel 4 gezeigten Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss durchgeführt, jedoch jetzt der pH auf 7,2 geregelt. Der Zeitpunkt, zu dem die Kultur vom Batch Modus in den Perfusionsmodus umgestellt wurde, war bei der Glukose limitierten Kultur etwas später gewählt, um die Glukosekonzentration zu Beginn etwas weiter absinken zu lassen. Ein Vergleich von Fütterungsstrategie und Glukosekonzentration zwischen Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss (vergleiche **Abbildung 12**) und mit Glukoselimitierung ist in **Abbildung 24** gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die Glukosekonzentration bei konstanter Durchflussrate sukzessive absinkt und schließlich ab

$t = 280 \text{ h}$ die Nachweisgrenze von etwa $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ unterschreitet und auf diesem niedrigen Niveau (gleich Null gesetzt) verbleibt. Sensitivere Messmethoden bestimmten eine Glukosekonzentration zwischen 0 und $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ in der stationären Phase (Daten nicht gezeigt). Demnach lagen die Glukosekonzentrationen im Bereich von $K_{m,\text{Glc}}$.

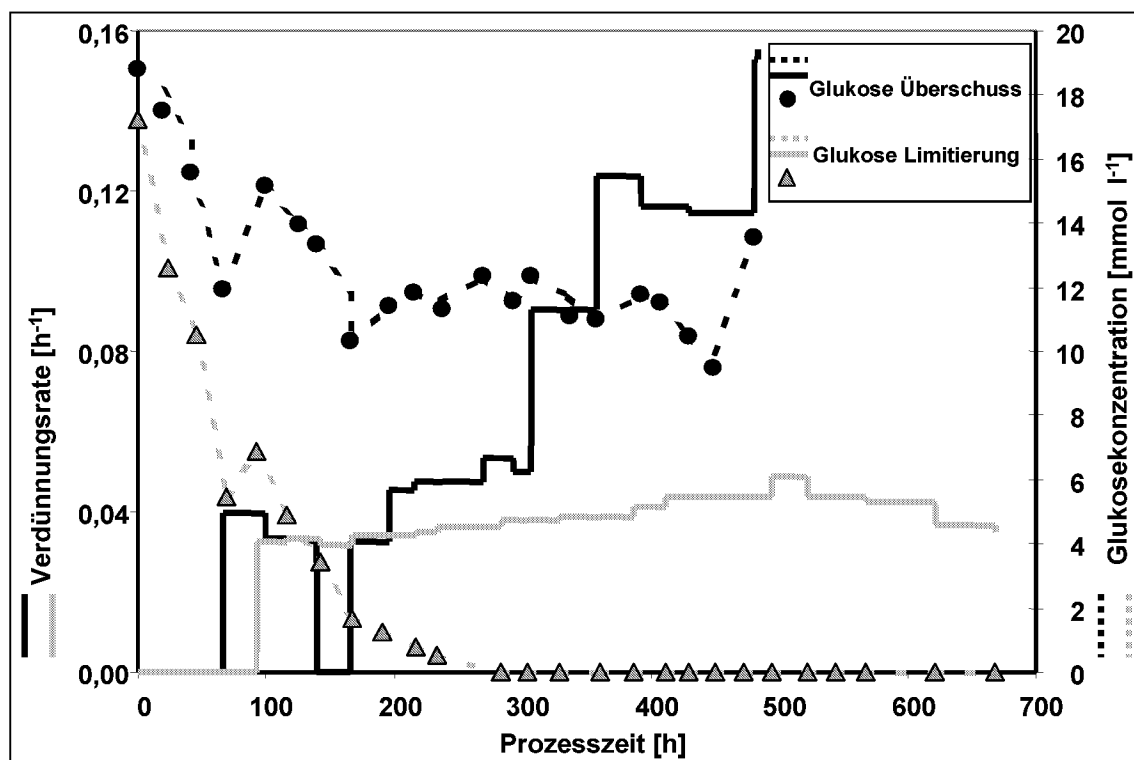


Abbildung 24: Vergleich von Durchflussrate und Glukosekonzentration zwischen Perfusionskulturen mit

und ohne Glukoselimitierung.

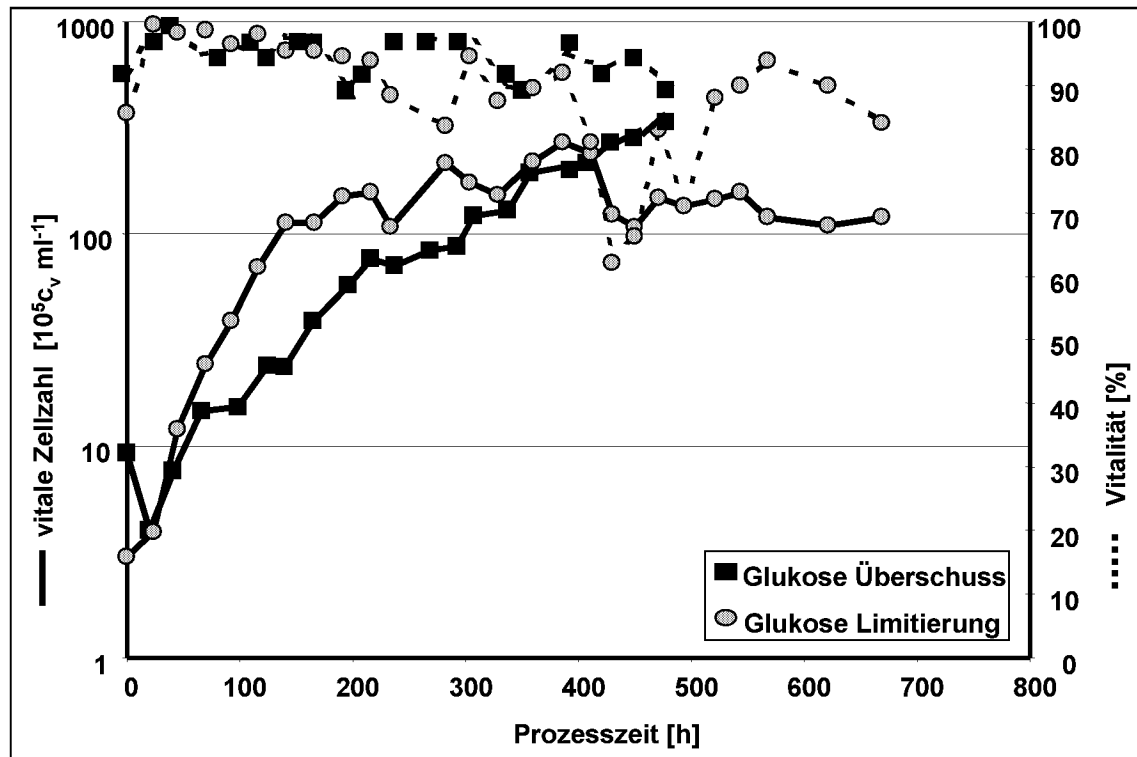


Abbildung 25: Vergleich von vitaler Zellzahl und Vitalität zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

Die maximal erreichte Zellzahl lag ebenso im Bereich von $3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Nach Eintreten der Glukoselimitierung sank die Zellzahl dann jedoch etwas ab und lag danach zwischen $1,5$ und $2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$. Begleitend dazu kam es vorübergehend zu einem Absinken der Vitalität, die dann jedoch wieder anstieg und bei 90% lag (Abbildung 25). Bei um den Faktor 3-4 geringerer Durchflussrate konnte somit annähernd die gleiche vitale Zellzahl erreicht werden, wie bei Glukoseüberschusskultur.

Dies war möglich durch eine Senkung der zellspezifischen Glukoseverbrauchsrate mit abnehmender Glukosekonzentration im Bioreaktor (Abbildung 26). Während diese bei Glukoseüberschuss um $0,11 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ h}^{-1}$ schwankte, sank die spezifische Verbrauchsrate für Glukose in Glukose limitierter Kultur auf bis zu $0,05 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ h}^{-1}$ ab, stieg zusammen mit abnehmender vitaler Zellzahl schließlich jedoch wieder auf etwas unter $0,1 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ h}^{-1}$ an. Insbesondere vor Eintritt der Glukoselimitierung war der zellspezifische Glukoseverbrauch deutlich niedriger als mit hoher Glukosekonzentration.

Erstaunlicher als der veränderte Glukosestoffwechsel ist die beobachtete Veränderung im Laktatstoffwechsel (Abbildung 27). Mit Unterschreiten einer Glukosekonzentration von etwa 5 mmol l^{-1} sank die zellspezifische Laktatbildungsrate deutlich ab.

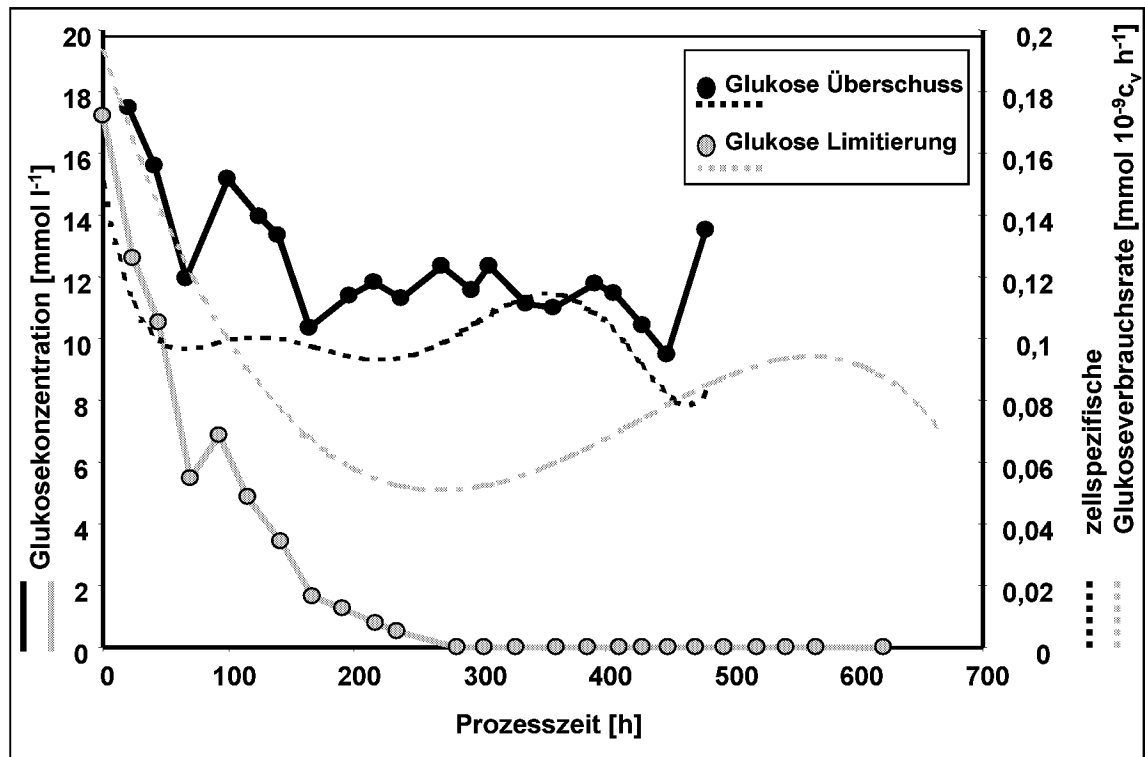


Abbildung 26: Vergleich von Glukosekonzentration und zellspezifischer Glukoseaufnahme zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

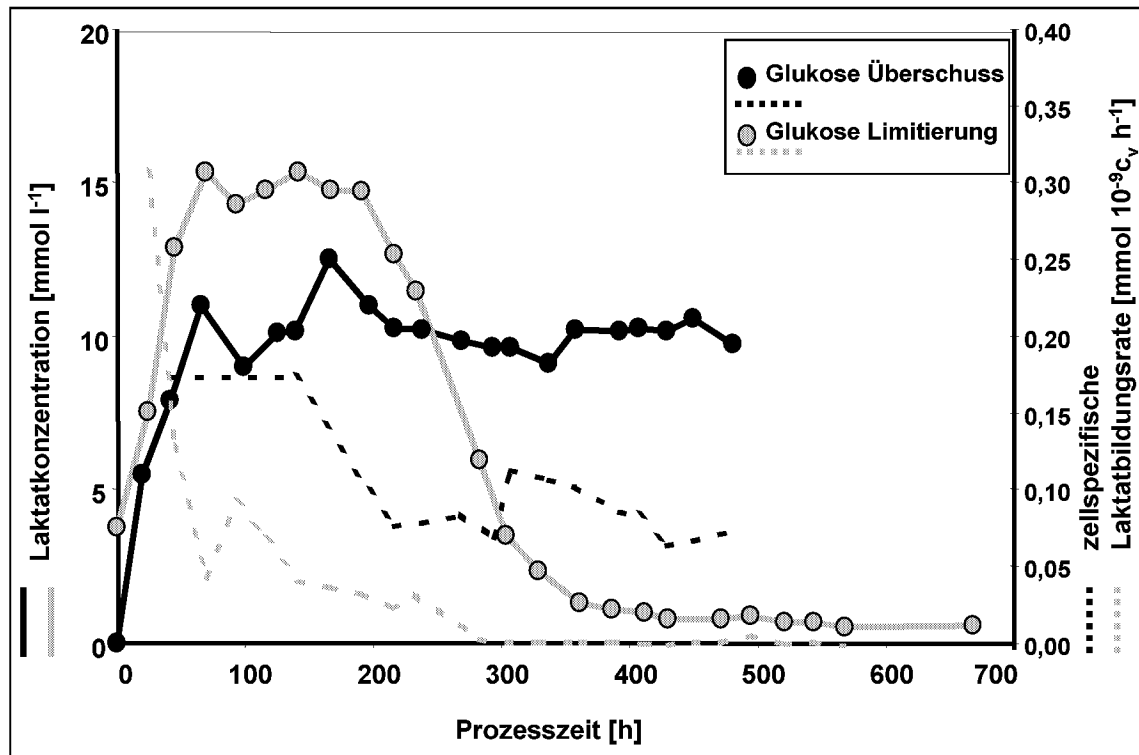


Abbildung 27: Vergleich von Laktatkonzentration und zellspezifischer Laktatbildungsrate zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

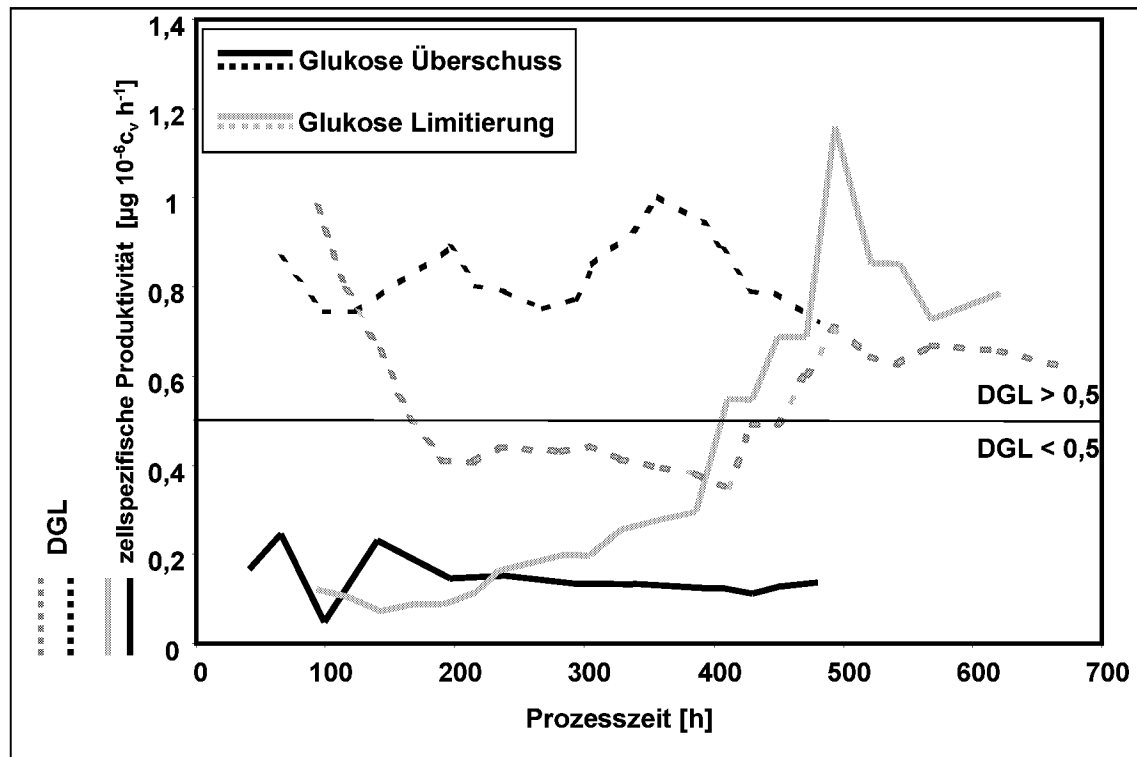


Abbildung 28: Vergleich von DGL und zellspezifischer Produktivität zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

Dies führte dazu, dass die Laktatkonzentration zunächst nicht weiter anstieg und schließlich dadurch abnahm, dass weniger Laktat gebildet als aus dem Bioreaktor ausgewaschen wurde. Dabei nahm die Laktatbildungsrate soweit ab, bis letztlich die verbleibende Laktatkonzentration unter 1 mmol l^{-1} sank, was der unteren Nachweisgrenze für die verwendete Laktatanalytik entspricht. Möglicherweise sank die Laktatkonzentration demnach nahe 0, ebenso die Laktatbildungsrate. Auch bei Glukoseüberschusskultur nahm die Laktatbildungsrate zwar ab, jedoch nur so weit, dass es nicht zur Auswaschung von Laktat kam. **Mit Glukoselimitierung war ab $t = 400 \text{ h}$ eine Hochzelldichtekultur ohne Laktatbildung realisiert!** Zieht man nun zur Quantifizierung der Glukoselimitierung den DGL heran (siehe Kapitel 3.4.3), dann fällt auf, dass dieser vorübergehend einen Wert von 0,5 unterschritt, was auf starke Glukoselimitierung hindeutet (Abbildung 28). Im Vergleich dazu wurde bei Glukoseüberschuss ein DGL von 0,7 nicht unterschritten.

Die Zielsetzung der glukoselimitierten Perfusionskultur war die Steigerung der zellspezifischen Produktivität. Aus Abbildung 28 wird deutlich, dass mit Eintritt der Glukoselimitierung die spezifische Produktivität anzusteigen begann und schließlich einen Maximalwert von $1,16 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ h}^{-1}$ MUC1-IgG2a erreichte, jedoch nicht zeitgleich mit minimalem DGL. Offensichtlich ist die Glukoselimitierung nicht alleine Grund für die gesteigerte Produktivität.

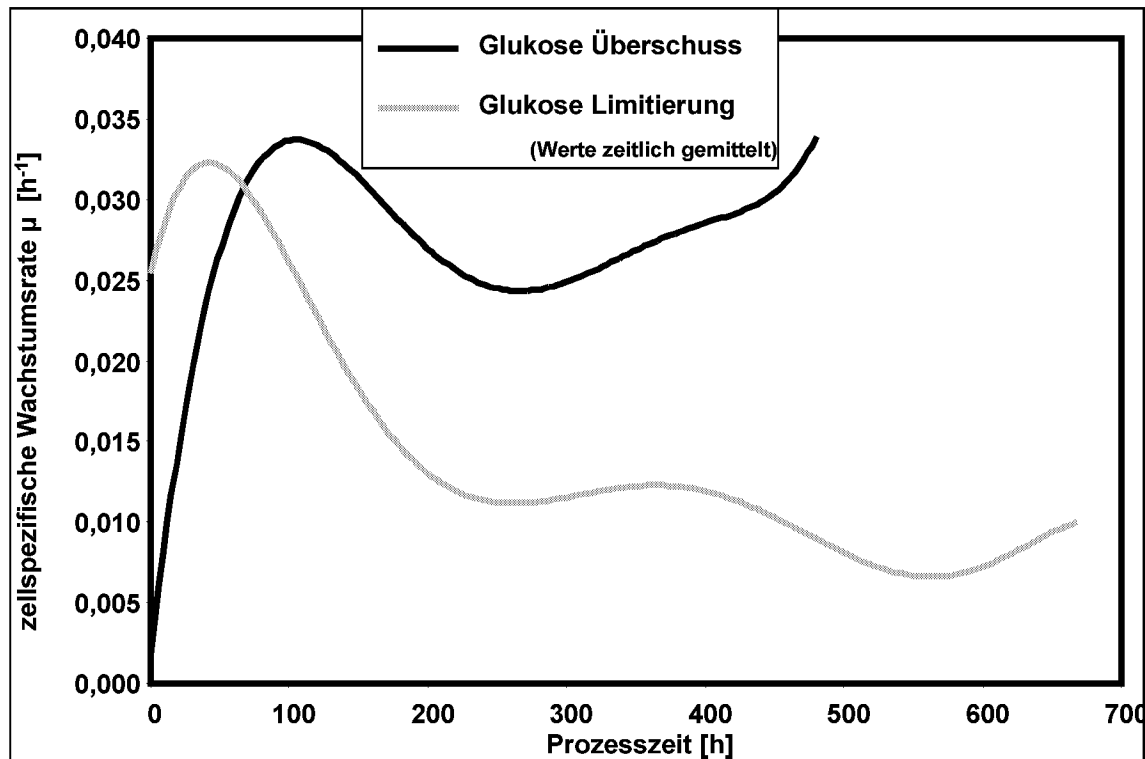


Abbildung 29: Vergleich der zellspezifischen Wachstumsrate μ zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

Die maximale zellspezifische Produktivität in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung gegenüber der Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss ($0,21 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ h}^{-1}$) um den Faktor 5,5 gesteigert werden. Betrachtet man nur die Phase mit $> 1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ vitalen Zellen, **so liegt eine bis zu 10,5 -fache Steigerung der spezifischen Produktivität vor!**

In Batch Kulturen war die Steigerung der Produktivität zum Ende des Batch nicht nur mit Glukoselimitierung, sondern auch mit verminderter Wachstumsrate verbunden. Möglicherweise ist neben der Glukoselimitierung die Wachstumsrate mit entscheidend für die Entwicklung einer gesteigerten Produktivität. Der Vergleich der spezifischen Wachstumsraten zwischen den beiden perfusiven Verfahrensweisen ist deshalb ebenso interessant. Mit zunehmender Glukoselimitierung (vergleiche DGL, **Abbildung 28**) sank die Wachstumsrate stark ab. Der Minimalwert ($\mu = 0,007 \text{ h}^{-1}$) wurde jedoch zu einem Zeitpunkt erreicht, als der DGL bereits wieder anstieg (**Abbildung 28 + 29**). In der Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss hingegen lag die spezifische Wachstumsrate der CHO-MUC1-IgG2a Zellen bei etwa $0,03 \text{ h}^{-1}$. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass die durch Glukoselimitierung verursachte geringe Wachstumsrate entscheidend für die hohe Produktivität sein könnte.

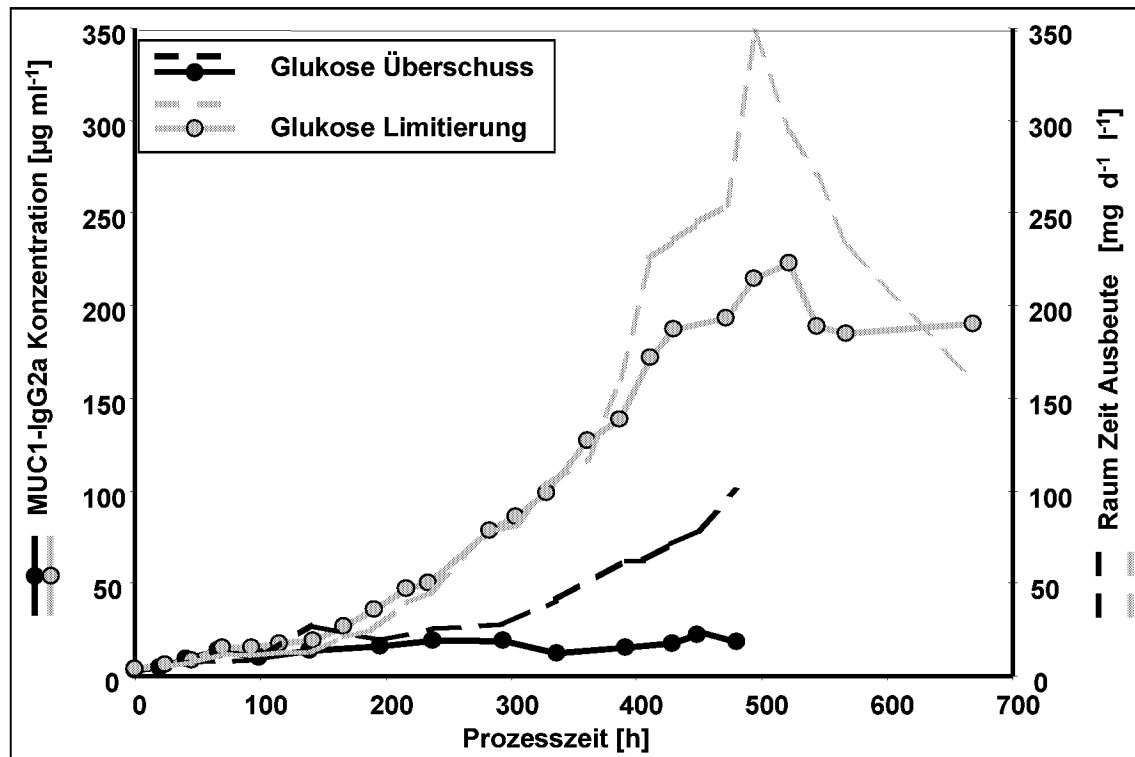


Abbildung 30: Vergleich von Produktkonzentration und Raum-Zeit Ausbeute zwischen Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

Die um den Faktor 5,5 – 10,5 erhöhte spezifische Produktivität führte zusammen mit der etwas niedrigeren vitalen Zellzahl im Vergleich zur Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss zu einer 3,5-fach gesteigerten Raum-Zeit Ausbeute an MUC1-IgG2a (**Abbildung 30**).

Die maximal erreichte RZA betrug $350 \text{ mg d}^{-1} \text{ l}^{-1}$ Reaktorvolumen. Selbst nach Absinken der RZA zum Ende der Kultur wurden noch $200 \text{ mg d}^{-1} \text{ l}^{-1}$ erzielt. Somit hätten mit diesem Prozess im industriellen Maßstab (200 Liter Reaktor) bis zu 70 g MUC1-IgG2a pro Tag hergestellt werden können. Bei einer Reaktorauslastung von 8 Monaten pro Jahr könnten in einem solchen Bioreaktor somit bis zu 17 kg MUC1-IgG2a produziert werden.

Da die Durchflussrate in dieser Verfahrensweise mit etwa $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$ sehr niedrig war, resultierte daraus ebenfalls eine deutlich erhöhte Produktkonzentration im Reaktor und der Produktlösung. Die maximal erreichte MUC1-IgG2a Konzentration betrug 223 µg ml^{-1} (**Abbildung 30**). Die niedrigere Durchflussrate könnte auch den Einsatz deutlich größerer Bioreaktoren mit bis zu 2000 Liter Reaktorvolumen technisch realisierbar werden lassen, was die Gesamtjahresausbeute pro Reaktor auf theoretisch 170 kg steigern könnte. In einer großen Fermentationsanlage mit 6 solcher Bioreaktoren konnten daher etwa eine Tonne MUC1-IgG2a pro Jahr produziert werden.

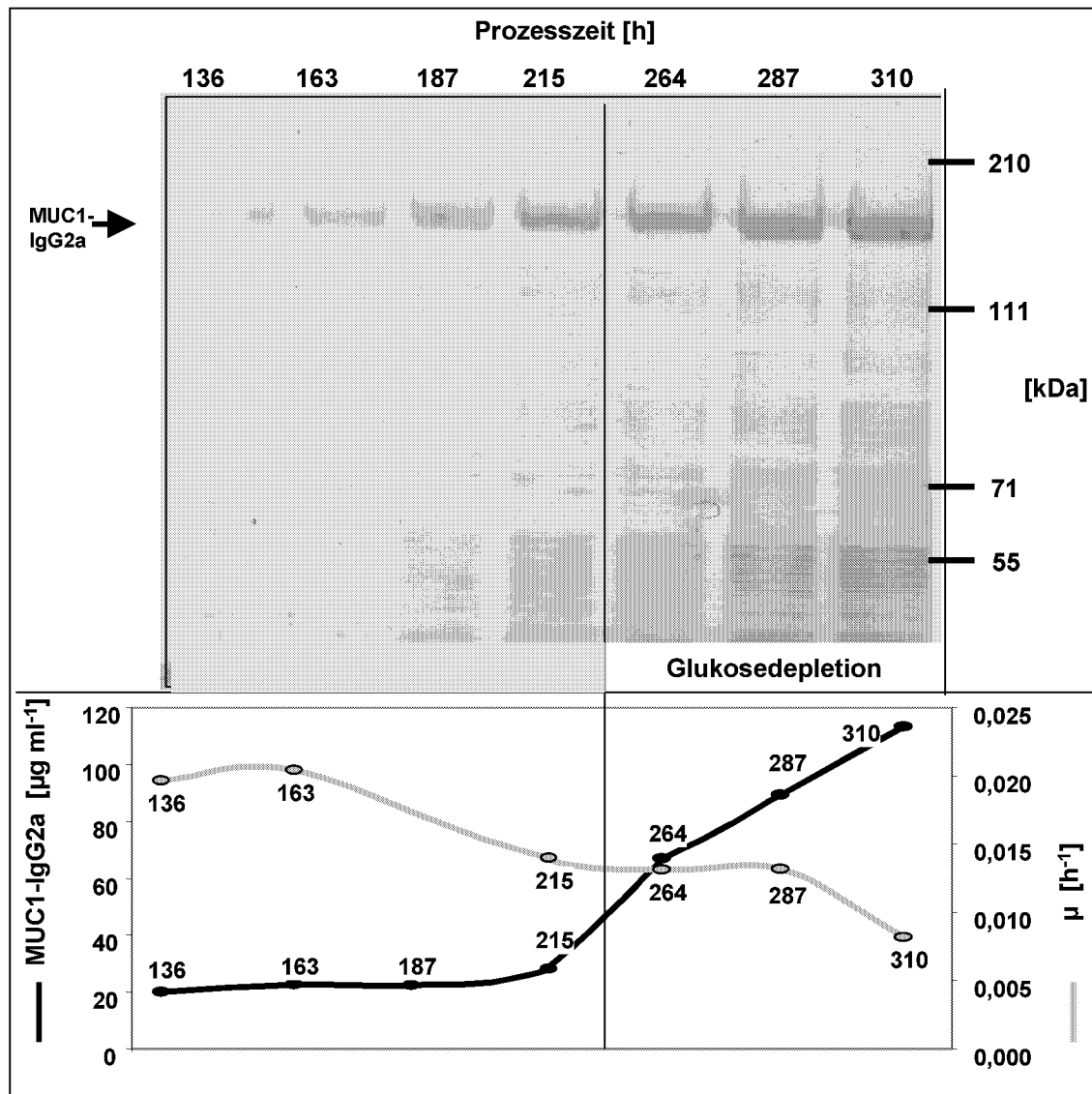


Abbildung 31: Produktkonzentration und spezifische Wachstumsrate μ in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung. Verifizierung durch SDS-PAGE

Der Anstieg der mittels ELISA bestimmten Produktkonzentration zeitgleich mit zunehmender Glukoselimitierung wurde für jeden durchgeführten Versuch durch eine SDS-PAGE bestätigt, wie hier für eine weitere glukoselimitierte Perfusionskultur gezeigt ist (**Abbildung 31**).

Es ist klar ersichtlich, dass die dem MUC1-IgG2a entsprechende Proteinbande bei 170 kDa entsprechend der im ELISA bestimmten Konzentration zunimmt. Dies bestätigt, dass der hohe Wert für die bestimmte MUC1-IgG2a Konzentration nicht auf ein falsch-positives Signal des ELISA zurückzuführen ist. **MUC1-IgG2a ist eindeutig das mit Abstand mengenmäßig dominierende Protein im Kulturüberstand!**

Abbildung 31 zeigt auch, dass der Anstieg der Produktkonzentration mit der Abnahme der spezifischen Wachstumsrate einhergeht.

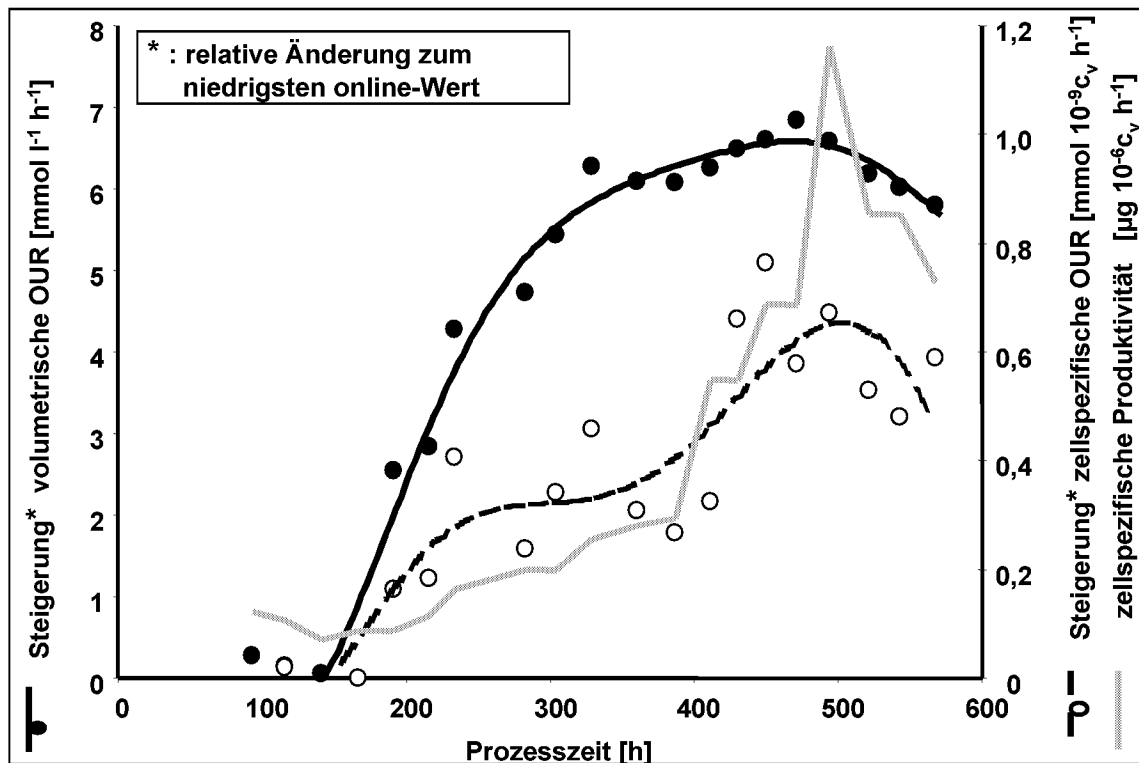


Abbildung 32: OUR und spezifische Produktivität in Perfusionkultur mit Glukoselimitierung.

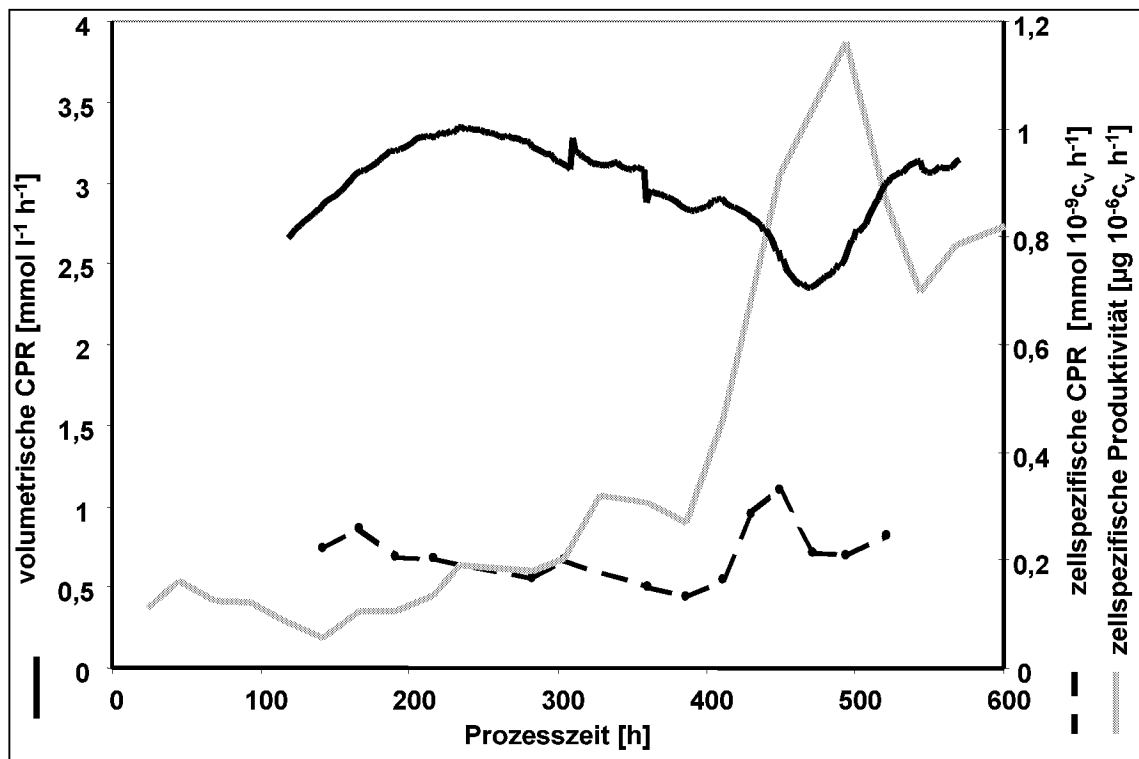


Abbildung 33: CPR und spezifische Produktivität in Glukose limitierter Perfusionkultur.

Zuvor konnte gezeigt werden, dass in Batch Kulturen die spezifische Produktivität mit der OUR korrelierte. Die OUR konnte somit in Batch Kultur zur Online-Abschätzung der Produktivität benutzt werden (siehe Kapitel 4.2.3). Es stellte sich somit die Frage, ob diese Korrelation auch eine Abschätzung der Produktivität in kontinuierlicher Perfusionkultur ermöglichen könnte. Deshalb wurde eine Online-Messung von O_2 und CO_2 im Abgas realisiert, welche eine OUR-Abschätzung mittels O_2 -Bilanzierung und zusätzlich eine Abschätzung der CO_2 -Produktionsrate (CPR) aus Zu- und Abgas ermöglichte.

Wie in Mini-Review 5 beschrieben, dürfte diese Methode für kontinuierliche Hochzelldichtekulturen eine genaue OUR-Abschätzung bieten, weist aber bei geringer absoluter OUR, also speziell zum Beginn des Prozesses, größere Ungenauigkeit auf weshalb die OUR erst ab etwa $t = 200$ h gezeigt wird.

Ergebnisse zur Online-OUR Bestimmung sind in **Abbildung 32** gezeigt.

Die OUR stieg mit zunehmender zellspezifischer Produktivität an und erreichte zusammen mit dieser einen Maximalwert. Berechnet man die zellspezifische OUR so wird deutlich, dass die gesteigerte spezifische Produktivität sehr gut mit der Steigerung der spezifischen OUR gegenüber dem Anfangswert zu Beginn der Kultur korreliert (**Abbildung 32**). Die Änderung der OUR kann somit insbesondere bei konstanten vitalen Zellzahlen in kontinuierlicher Perfusionkultur mit Glukoselimitierung zur Produktivitätsabschätzung dienen.

Die relative Entwicklung der CPR konnte ebenfalls mittels der Bilanzierung von Zu- und Abgas abgeschätzt werden, da der pH durch Zugabe von NaOH konstant gehalten werden konnte und in dem kontinuierlichen Prozess Ausgasung und Abpufferung von CO_2 durch das Bicarbonat enthaltende Medium als konstant angenommen werden konnte [150]. Es muss jedoch, wie bereits in Kapitel 3.4.3 erwähnt, berücksichtigt werden, dass die abgeschätzte CPR unter der realen CPR liegen dürfte, da CO_2 , welches über das Kulturmedium ausgetragen wird nicht in der Bilanzierung auftaucht. Wegen der relativ ungenauen Bilanzierung von Zu- und Abgas bei kleinen absoluten Differenzen konnte die CPR in der Anfangsphase des Prozesses so auch nicht ermittelt werden.

Wie aus **Abbildung 33** hervorgeht, betrug die geschätzte CPR $2,5 - 3,5 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die zellspezifische CPR stieg parallel zu der Produktivität an, allerdings in geringem Ausmaß.

Der gleichzeitige Rückgang der volumetrischen CPR beruht auf den Rückgang der Gesamtzellzahl zu diesem Zeitpunkt.

5.1.2 Perfusionskultur mit Glukoselimitierung durch closed-loop Glukose Regelung

Mit dem Ziel, die Prozessdauer bis zum Erreichen der Glukoselimitierung zu verringern, wurde eine Perfusionskultur durchgeführt, bei der die Glukosekonzentration über eine online closed-loop Regelung kontrolliert wurde. Damit sollte vermieden werden, dass ein Überschuss an Glukose zudosiert wird. Der Sollwert für die Glukosekonzentration nach Einschalten der Perfusion war zunächst auf 5 mmol l^{-1} eingestellt (Anwachsphase). Dann wurde der Sollwert auf 1 mmol l^{-1} gestellt. Die online-Glukose Messung konnte mit einer Frequenz von 15 min durch den online-Glukose Analyser der Firma Trace-Biotech (Process Trace) realisiert werden. Die Glukosezudosierung erfolgte über ein Konzentrat mit einer Glukosekonzentration von 70 mmol l^{-1} .

Mit einem Sollwert von 1 mmol l^{-1} konnte eine Glukosekonzentration $< 0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ eingestellt werden (**Abbildung 34**). Dies wurde durch parallele offline-Kontrollmessungen mittels dem Ebio-compact Analyser bestätigt (die Konzentration lag unter der Nachweisgrenze des Analysers). Die Abweichung der Glukosekonzentration von dem Sollwert ist bedingt durch die Messfrequenz von 15 min, die eine genauere Regelung nicht ermöglicht. Die Messfrequenz kann in Anbetracht der Kulturdauer von mehreren 100 h nicht erhöht werden, da dies die technisch mögliche Anzahl von Messungen überschreiten würde. Dies zeigt, dass die online-closed loop Regelung der Glukose auf Konzentrationen im Bereich $< k_{m,\text{Glc}}$ technisch derzeit kaum realisierbar ist.

Mit dieser Strategie konnte trotzdem die Dauer bis zum Erreichen der niedrigen Glukosekonzentration und bis zum Erreichen einer Laktatkonzentration $< 1 \text{ mmol l}^{-1}$ gegenüber der Verfahrensweise mit konstanter Zufütterung verringert werden. Die spezifische Wachstumsrate nahm mit geregelter Glukosezufütterung mit der Zeit jedoch deutlich zu und nicht ab, wie dies zuvor bei konstanter Zufütterung beobachtet wurde. Dies führte insbesondere in der Phase mit geringer Glukosekonzentration zu einem schnellen Anstieg der vitalen Zellzahl bis zu dem Zeitpunkt des Versuchsabbruchs (**Abbildung 34**), der wegen einer Kontamination erfolgte. Die Kontamination könnte möglicherweise über die verwendete Glukose-Dialysesonde verursacht worden sein. Dennoch konnte auch hier eine maximale vitale Zellzahl von $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ erreicht werden. Der maximale Produkttiter lag jedoch nur bei $33 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ MUC1-IgG2a (**Abbildung 34**). Im Gegensatz zur Perfusionskultur mit konstanter Glukose Zufütterung, nahm die zellspezifische Produktivität im Verlauf der Glukose geregelten Kultur ab (**Abbildung 35**).

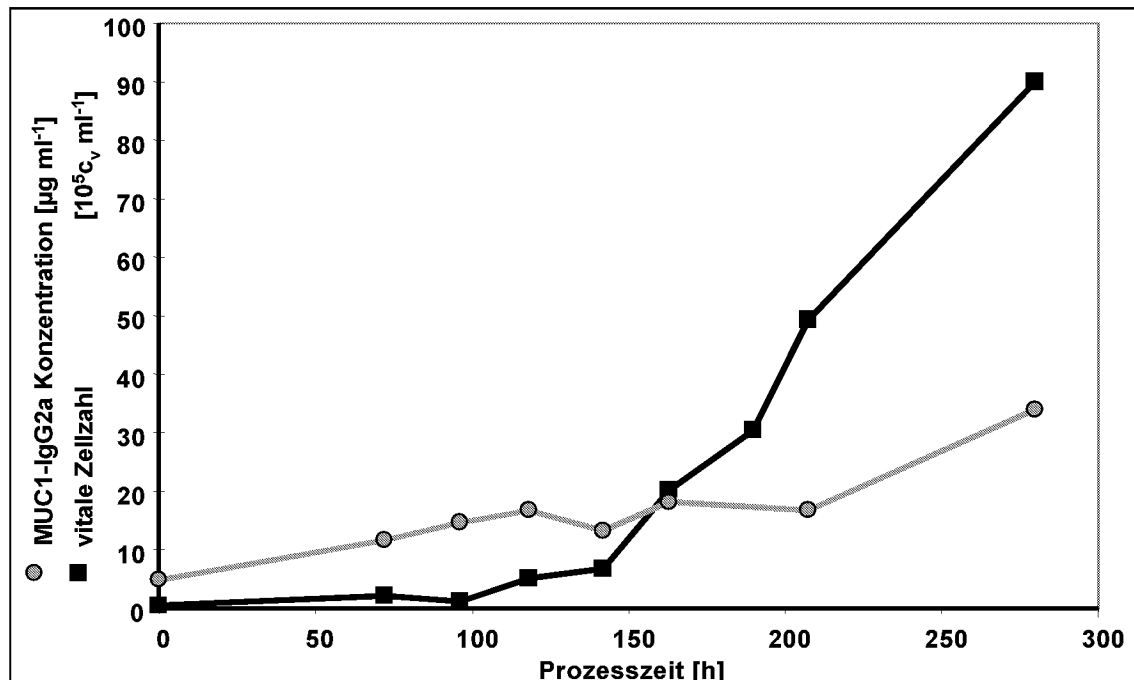


Abbildung 34: Zellzahl und MUC1-IgG2a Konzentration in Perfusionskultur mit Glukose Regelung.

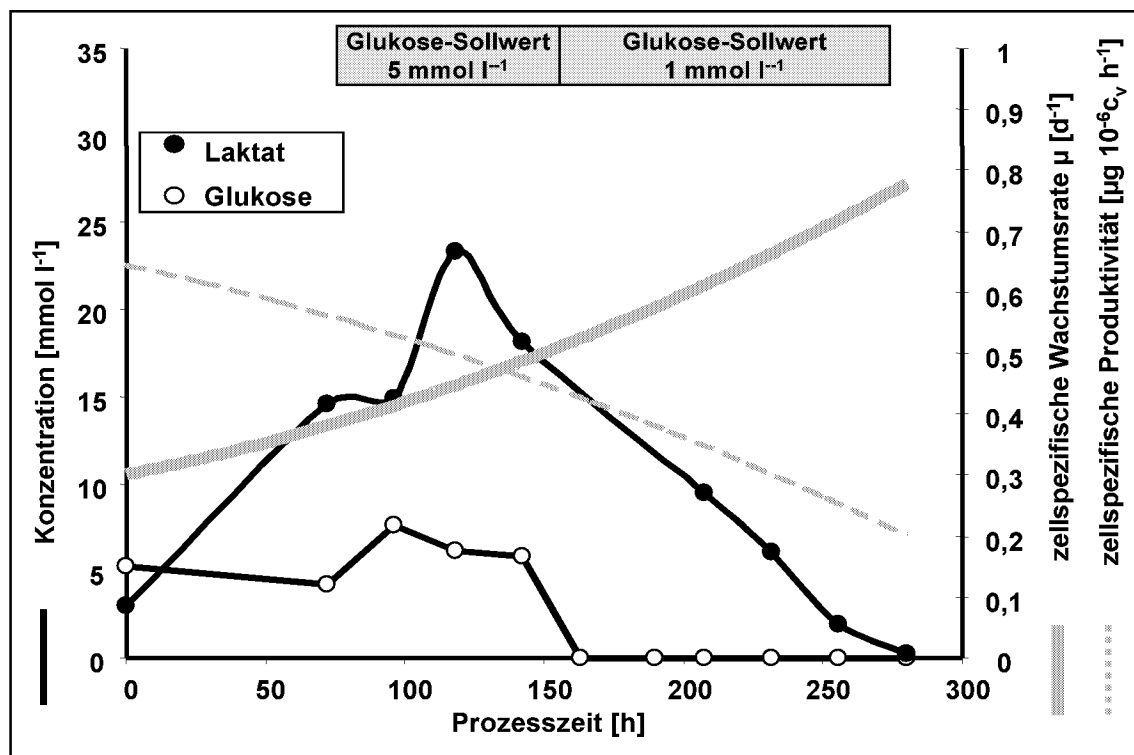


Abbildung 35: Glukose-, Laktatkonzentration, Wachstumsrate (aus Gründen graphischer Darstellung in d^{-1} angegeben) und Produktivität in Perfusionskultur mit closed-loop Glukose Regelung.

Dadurch lag die Raum-Zeit Ausbeute deutlich niedriger als bei konstanter Glukose Zufütterung (Daten nicht gezeigt). Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass im Unterschied zur konstanten Zufütterung von Glukose, die closed-loop geregelte Zudosierung dem momentanen Glukoseverbrauch der Zellen angepasst ist. Dadurch wird eine gesteigerte Glukoselimitierung vermieden.

5.1.3 Repetitive Fed-Batch Kultur mit Glukoselimitierung

Die Fed-Batch Kultivierung von Säugerzellen ist in der Industrie wegen der Möglichkeit der Maßstabsübertragung auf bis zu 12000 Liter Kulturvolumen die am häufigsten angewendete Verfahrensweise. Die Ergebnisse der Perfusionskultur mit der CHO-MUC1-IgG2a Zelle, sowie die Literatur zu erhöhter Produktivität in Glukose limitierten Fed-Batch Kulturen ließ vermuten, dass auch die Glukose limitierte Fed-Batch Kultur mit CHO-MUC1-IgG2a Zellen eine Möglichkeit zur Verwirklichung hoher Raum-Zeit Ausbeuten sein könnte. Deshalb wurden in einem parallelen Ansatz zwei Spinner Kulturgefäße unter Nutzung der cellferm-pro[®] Anlage bei 37°C, pH 7,2 und 40% pO₂ Kulturen gleichzeitig als Batch gestartet. Die Anfangskonzentration an Glukose wurde mit 12,5 mmol l⁻¹ gegenüber herkömmlichen Batch Kulturen verringert, um eine schnellere Glukosedepletion zu erreichen.

Nach etwa 50 h, nachdem die Restglukosekonzentration einen Wert von 5 mmol l⁻¹ unterschritten hatte, bzw. der DGL < 0,3 war (**Abbildung 37**) wurde eine der beiden Kulturen in den Fed-Batch Modus gewechselt, indem ein kontinuierlicher Zufluss (2,8 ml h⁻¹) an Pro-CHO4-CDM mit 23,9 mmol l⁻¹ Glukose eingeschaltet wurde.

Die Menge an zudosierter Glukose pro Zeit entsprach dabei dem berechneten volumetrischen Glukoseverbrauch in diesem Zeitabschnitt. Da die Zellen sich zu dem Zeitpunkt des Fed-Batch Starts noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (**Abbildung 36**), nahm der volumetrische Glukoseverbrauch trotz zurückgehender spezifischer Glukoseverbrauchsrate zu diesem Zeitpunkt noch zu. Zudem würde die Zudosierung von Glukose die Wachstumsphase verlängern. Deshalb konnte davon ausgegangen werden, dass so der Eintritt der Glukosedepletion zwar nicht maßgeblich gegenüber dem Batch verzögert würde, die Zellen wegen der kontinuierlichen Glukosezudosierung jedoch nicht sofort völlig Glukoselimitiert sind. Dies sollte eine sukzessive Umstellung des Zellstoffwechsels begünstigen und ein Absterben der Zellen wie im Batch vermeiden.

Tatsächlich trat die Glukosedepletion in beiden Ansätzen zeitgleich nach 91,8 h ein. Der DGL im Fed-Batch lag bei etwa 0,1, während im Batch mit Eintritt der Glukosedepletion totale Glukoselimitierung vorlag (DGL = 0) (**Abbildung 37**). Im Fed-Batch stieg die vitale Zellzahl bei guter Vitalität weiter an, während im Batch bedingt durch die totale Limitierung Vitalität und vitale Zellzahl bereits sanken. In beiden Ansätzen konnte der typische Laktatverbrauch festgestellt werden. Dadurch, dass im Fed-Batch die vitale Zellzahl aber nicht wie im Batch gegen Null ging, konnte, bis zum Abbruch des Fed-Batch aufgrund von Softwareproblemen, die Laktatkonzentration weiter bis auf nahezu Null absinken (**Abbildung 36**).

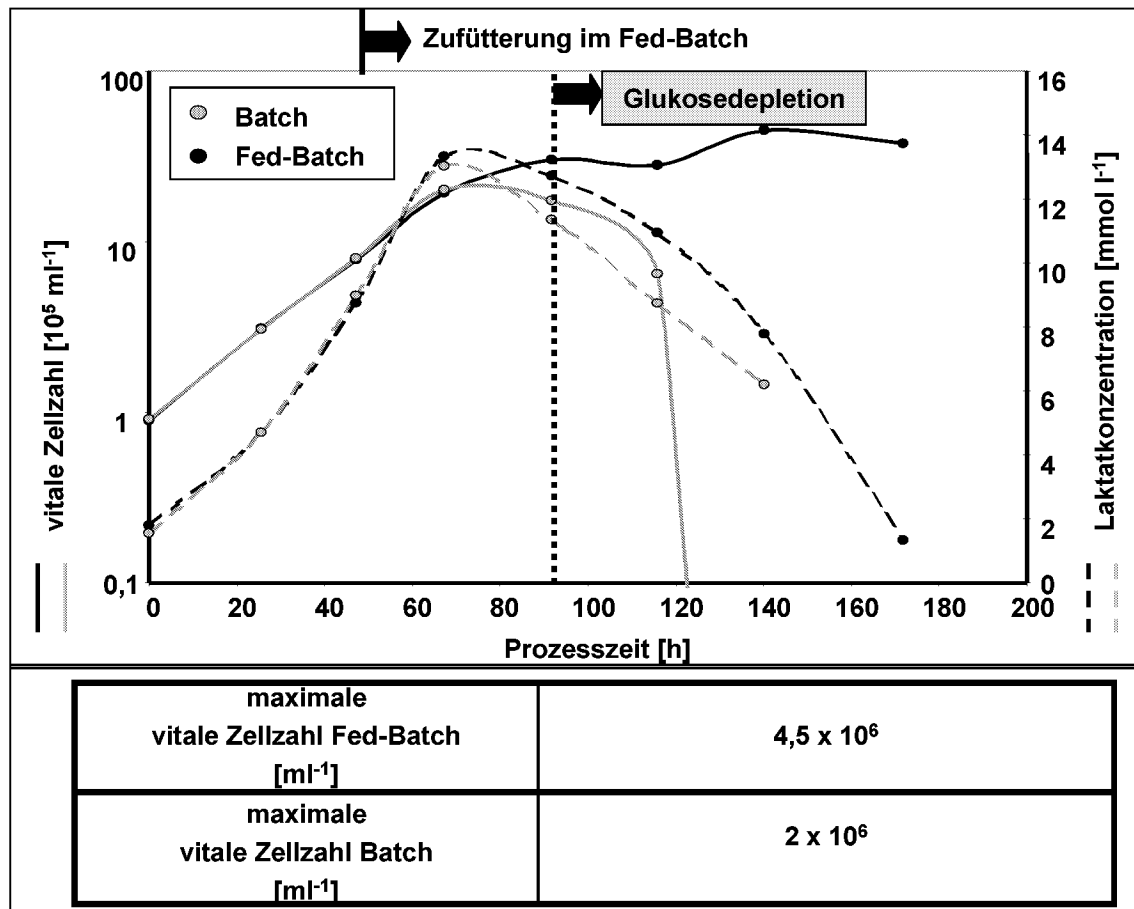


Abbildung 36: Vergleich von Wachstum und Laktatkonzentration zwischen Batch und Fed-Batch.

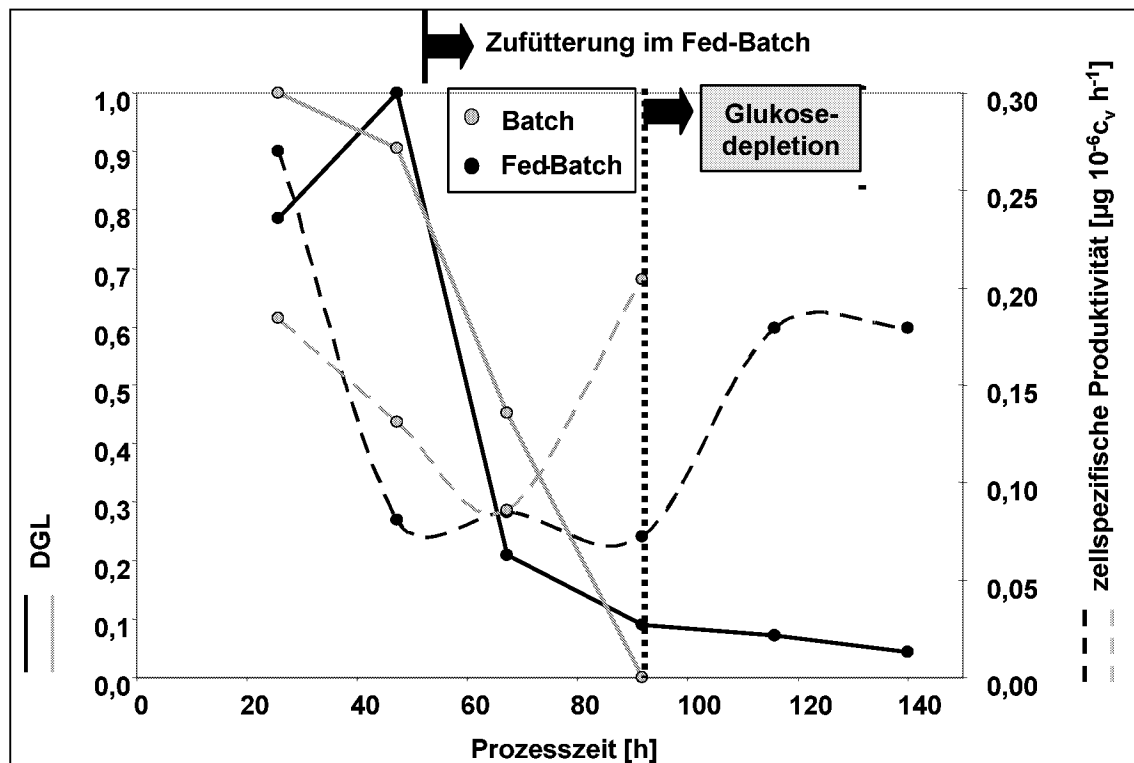


Abbildung 37: Vergleich von DGL und spezifischer Produktivität zwischen Batch und Fed-Batch.

Im weiteren Verlauf wurden nach jeweils 24 h Kulturdauer 70 ml Kulturvolumen aus dem Fed-Batch abgenommen, was exakt dem in diesem Zeitintervall zudosierte Volumen entsprach (repetitiver Fed-Batch). Dadurch konnte die Kulturdauer weiter verlängert werden.

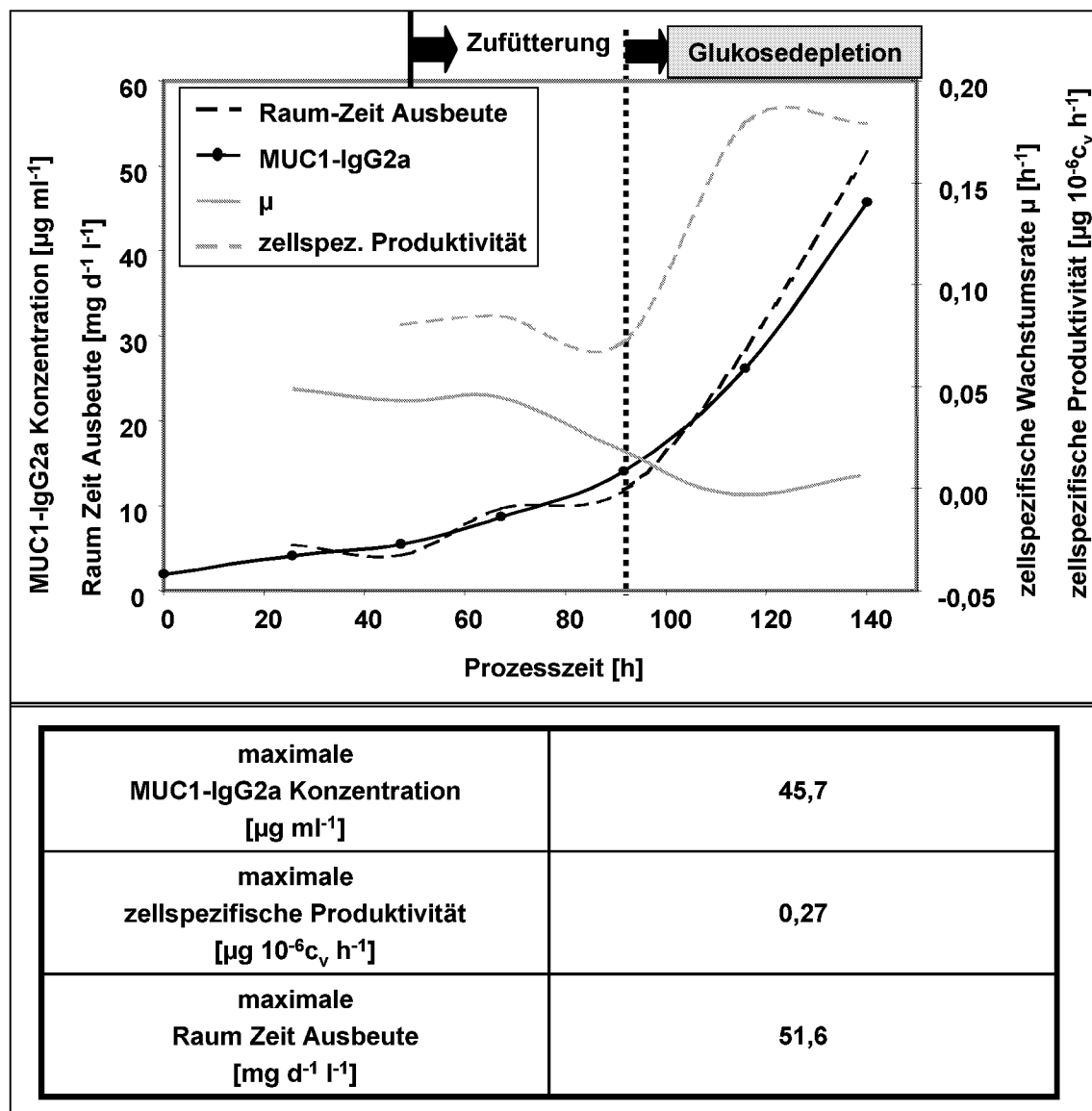


Abbildung 38: Produktbildung und Wachstumsrate in Glukose limitierter Fed-Batch Kultur.

Die starke, aber nicht totale Glukoselimitierung hatte zur Folge, dass die Wachstumsrate auf nahezu Null zurückging (Abbildung 38). In Verbindung mit der Glukoselimitierung und der geringen Wachstumsrate konnte die spezifische Produktivität nachhaltig gesteigert werden (Abbildung 37). Dennoch konnte in beiden Ansätzen zu keinem Zeitpunkt eine dem Wert in der Perfusionskultur vergleichbare spezifische Produktivität erreicht werden. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Mit der gesteigerten Produktivität konnte ein Anstieg der Produktkonzentration auf über $45 \mu\text{g ml}^{-1}$ erzielt werden (**Abbildung 38**). Aus mehreren Gründen wurde keine noch höhere MUC1-IgG2a Konzentration erreicht. Zum einen konnte in der Endphase des repetitiven Fed-Batch Modus wegen der sehr geringen Wachstumsrate keine deutliche Steigerung der vitalen Zellzahl mehr erreicht werden. Zum anderen lag die spezifische Produktivität in den beiden Ansätzen insgesamt auch im Vergleich mit anderen Batch Kulturen ungewöhnlich niedrig. Gründe hierfür konnten nicht gefunden werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei besserer Produktivität von Beginn der Kultur an, bzw. mit größerem Kulturgefäß aber ohne repetitiven Modus eine insgesamt deutlich höhere Produktkonzentration hätte erreicht werden können.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass die Strategie der Steigerung der Produktivität durch Glukoselimitierung im Fed-Batch für die CHO-MUC1-IgG2a Zelle erfolgreich ist, und so zu einer größeren Raum-Zeit Ausbeute führen kann.

5.1.4 Einfluss der Glukoselimitierung auf die Glykosylierung von MUC1-IgG2a

Unabhängig davon, welche Verfahrensweise mit Erfolg zu einer gesteigerten Produktausbeute im Sinne von Quantität führt, ist die Produktqualität und die Funktionalität, welche hauptsächlich durch die Glykosylierung bedingt ist, von essentieller Bedeutung. Nur wenn mit der entwickelten hochproduktiven Verfahrensweise auch MUC1-IgG2a mit Krebs-assoziiierter Glykosylierung produziert werden kann, wird die Strategie Anwendung finden können. Dabei war, wie in Mini-Review 7 bereits für andere Proteine aufgezeigt wurde, ein Einfluss der Glukoselimitierung auf die MUC1 Glykosylierung nicht auszuschließen. Um dies zu untersuchen, wurde MUC1-IgG2a aus glukoselimitierter Perfusionskultur mit konstanter Glukosezufütterung im Labor von Prof. Hansson in Göteborg detailliert auf die Glykosylierungsstruktur untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind vergleichend mit der Glykosylierung aus Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung in **Abbildung 39** dargestellt.

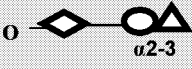
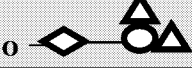
Glykosylierung / Prozessführung		Glukose Überschuss	Glukose Limitierung
Besetzungsdichte potentieller O-Glykosylierungspositionen (TR-Bereich von MUC1-IgG2a)		4,4 im Mittel (3-5 von 5)	4,3-4,4 im Mittel (3-5 von 5)
Art der vorhandenen O-Glykane	Core-1 Antennenstruktur	% der Peakfläche für alle Zucker	
neutral		0,9	2,2
Art der vorhandenen Zucker	Core-1 Antennenstruktur	% der Peakfläche für alle sialylierten Zucker	
sialyliert		0,4	0,4
sialyliert		82,2	85,1
Di-sialyliert		17,2	14,4
 N-Acetylgalactosamin  N-Acetylneuraminsäure (Sialylsäure)  Galactose			

Abbildung 39: Vergleich der Glykosylierung von MUC1-IgG2a aus Perfusionskulturen mit und ohne Glukoselimitierung.

Die O-Glykosylierung von MUC1 wurde durch die Glukoselimitierung im Vergleich zum ohne Glukoselimitierung produzierten MUC1 nicht signifikant verändert. Sowohl die Änderungen in der Besetzungsdichte der Glykosylierungspositionen auf dem Protein, als auch die Anteile der verschiedenen Zucker in den unterschiedlichen Glykanen sind unter beiden Verfahrensweisen nahezu identisch.

Damit konnte gezeigt werden, dass mit der Glukose limitierten Verfahrensweise eine erheblich gesteigerte Ausbeute an Krebs-assoziiertem MUC1-IgG2a erzielt werden konnte!

5.1.5 Ergebnisse aus den Verfahrensweisen mit Glukoselimitierung

Basierend auf Beobachtungen von erhöhter Produktivität bei Glukoselimitierung in Batch Kulturen wurde eine neue Prozessstrategie entwickelt. Diese führt in kontinuierlicher Perfusionskultur mit sehr starker Glukoselimitierung ($DGL < 0,4$) und damit verbunden sehr niedriger Wachstumsrate ($\mu = 0,005 \text{ h}^{-1}$) zu einer um den Faktor 10,5 erhöhten spezifischen Produktivität ($1,16 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ c}_v \text{ h}^{-1}$) und 3,5-fach gesteigerten Raum-Zeit Ausbeute ($350 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) an MUC1-IgG2a im Vergleich zu einer Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss. Eine maximale MUC1-IgG2a Konzentration von $223 \mu\text{g ml}^{-1}$ wurde erreicht (Abbildung 40). Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Glukosekonzentration in der Kultur auf einen Wert im Bereich des $K_{m/\text{Glc}}$ gesenkt wird und weiterhin dadurch, dass die Laktatkonzentration in der Kultur bei sehr hohen Zelldichten gegen Null sinkt. Eine signifikante Umstellung des Zellstoffwechsels ist feststellbar. Da sich diese Verfahrensweise weiterhin durch geringe Störanfälligkeit, geringen Regel- und Kostenaufwand, geringen Medienverbrauch, sowie hohe Produktkonzentrationen auszeichnet, ist diese besonders attraktiv für eine industrielle Anwendung.

Die Strategie der Produktivitätssteigerung unter Glukoselimitierung konnte erfolgreich auf Fed-Batch übertragen werden, was eine Anwendung der Strategie im größten Maßstab ermöglichen könnte.

Durch Senkung der Glukosekonzentration mittels online closed-loop Glukose Regelung in Perfusionskultur konnte hingegen keine Steigerung von Produktivität und Raum-Zeit Ausbeute erzielt werden.

Die Glukoselimitierung und erhöhte spezifische Produktivität hatte keinen Einfluss auf die O-Glykosylierung von MUC1-IgG2a. Somit konnte die Ausbeute an Krebs-assoziiertem MUC1 erheblich gesteigert werden.

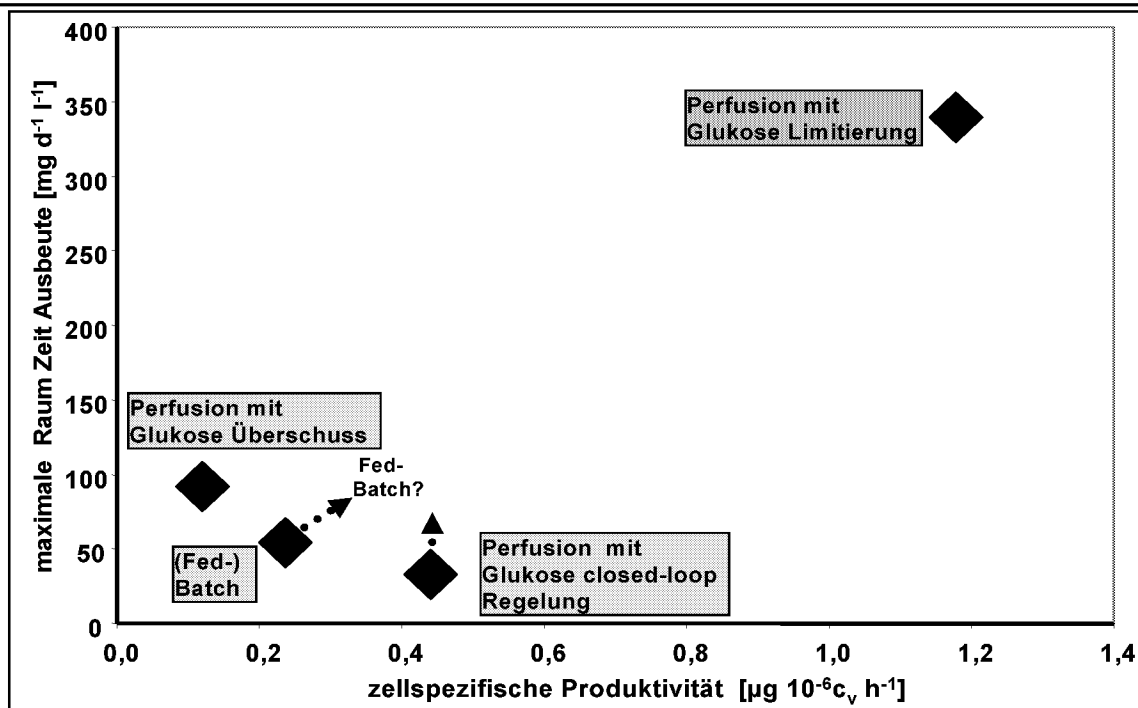


Abbildung 40: Raum-Zeit Ausbeuten und Produktivitäten bei unterschiedlichen Verfahrensweisen.

5.2 Prozesskinetische Charakterisierung und Diskussion von Wachstum und Stoffwechsel unter Glukoselimitierung

Basierend auf den online und offline gewonnenen Messdaten zu Zellwachstum, Substratverbrauch, Metabolit- und Produktbildung aus der kontinuierlichen Perfusionskultur mit Glukoselimitierung durch konstant niedrige Glukosezufütterung soll im folgenden der aufgetretene Stoffwechsel charakterisiert und diskutiert werden.

5.2.1 Glukose-, Aminosäurestoffwechsel und Produktbildung

Die Verfahrensweise mit konstant geringer Durchflussrate zum Erzielen der Glukose limitierten Perfusionskultur konnte Produktivität und Raum-Zeit Ausbeute erheblich steigern.

Dabei Betrag zu Beginn der Kultur das Verhältnis zwischen der Masse an verbrauchter Glukose zu der Masse an gebildetem Produkt nur 0,55%, zum Zeitpunkt maximaler Produktivität jedoch 5,76% (**Tabelle 2**, $Y_{\text{Produkt/Glc}}$).

Zeitpunkt im Bioprozess	Start der Perfusion	maximale Laktat-Konzentration	Eintritt der Glukose-depletion	Laktat-Konzentration < 1 mmol l ⁻¹	maximale zellspezifische Produktivität
Ausbeute-Koeffizient					
$Y_{\text{Laktat/Glukose}}$ [mmol mmol ⁻¹]	0,7	0,77	0,11	0,02	0,04
$Y_{\text{Glutamin/Glukose}}$ [mmol mmol ⁻¹]	0,17	0,16	0,15	0,15	0,15
$Y_{\text{Produkt/Glukose}}$ [mmol mmol ⁻¹]%	0,55	0,62	2,31	5	5,76
$Y_{\text{Glykane/Glukose}}$ [mmol mmol ⁻¹]%	0,22	0,37	0,93	2	2,3
$Y_{\text{Glukose/}\mu}$ [mmol 10 ⁻⁹ cv]	4,82	2,12	2,05	n.d. $\mu \sim 0$	n.d. $\mu \sim 0$
zellspezifische Produktivität [$\mu\text{g } 10^{-6} \text{c}_v \text{ h}^{-1}$]	0,12	0,056	0,18	0,46	1,16

Tabelle 2: Ertragskoeffizienten zum Glukose- und Laktatstoffwechsel in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung bei konstanter Glukosezufütterung.

Dieses Verhältnis dürfte für die Produktion von rekombinanten Proteinen mit Zellkulturen außerordentlich hoch sein. Betrachtet man lediglich die Zuckerstrukturen des MUC1-IgG2a, so berechnet sich $Y_{\text{Glykane/Glc}}$ auf 2,3 % (**Tabelle 2**).

Auch dies ist im Vergleich zu anderen Zellen sehr viel. Zudem zeigt diese Berechnung, dass prozentual betrachtet trotz Glukoselimitierung nur wenig Glukose in Glykane eingeht. Umgekehrt wird deutlich, dass die Glukoselimitierung nicht limitierend für die Glykosylierung des MUC1-IgG2a sein sollte, da auch unter Glukoselimitierung der Anteil an Glukose, welcher für andere Stoffwechselwege genutzt wird bei weitem überwiegt.

Die bestimmten Ertragskoeffizienten machen deutlich, dass bei Glukoselimitierung verhältnismäßig mehr Glukose in das Produkt fließt. Betrachtet man nun $Y_{\text{Glc}/\mu}$, so erhält man auch eine Aussage darüber, wie das Verhältnis von Glukoseverbrauch zur Bildung von Biomasse ist, vorausgesetzt die mittlere Masse pro Zelle ändert sich im Verlauf der Kultur nicht signifikant. Mit zunehmender Glukoselimitierung sinkt $Y_{\text{Glc}/\mu}$ von anfangs $4,82 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ Zellen}$ auf unter $2,05 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ Zellen}$ ab (**Tabelle 2**). Mit zunehmender Glukoselimitierung geht demnach verhältnismäßig weniger Glukose in Biomasse ein. Gleichzeitig dürfte bei geringerer Glykolyserate unter Glukoselimitierung der Anteil an Glukose, welcher in den PPP eingeht größer werden [151, 152]. Somit sollten die im PPP gebildeten Pentosen verstärkt zur Synthese von RNA für die Proteinsynthese zur Verfügung stehen, anstatt für die zur Zellteilung benötigte DNA-Synthese genutzt zu werden.

Wie genau ändert sich der Glukose- und Laktatstoffwechsel mit abnehmender Glukosekonzentration und inwiefern ist diese Änderung kritisch für die Produktivität?

Es wurde eine Abnahme der Glukoseverbrauchsrate mit sinkender Glukosekonzentration beobachtet, was bedeutet, dass die hohe Glykolyserate verringert wurde, die Glykolyse keinen Crabtree-Effekt mehr aufwies. Die geringe extrazelluläre Glukosekonzentration bedingt eine Minderung des Glukosetransports in die Zelle [153]. Dadurch wird die den Crabtree-Effekt verursachende Kaskade vermieden. Die Abnahme der Glukoseaufnahmerate ermöglichte das Erreichen sehr hoher vitaler Zellzahlen, trotz vergleichsweise geringer Glukosezufütterung. Die Fütterungsstrategie ermöglicht so in optimaler Weise eine stetige Steigerung der Glukoselimitierung. Dies ist möglich, da keinerlei Schwankungen der Glukoseaufnahme durch plötzlichen Änderungen der Glukosekonzentration auftreten, wie es beispielsweise in Fed-Batch Kulturen mit gepulster Zufütterung der Fall ist. Zudem konnte dadurch die Laktatbildungsrate ebenfalls sukzessive gesenkt werden. Dies ermöglicht den Zellen den Metabolismus problem-

los in einen Stoffwechsel ohne Laktatbildung umzustellen. Der Ertragskoeffizient $Y_{\text{Lac/Glc}}$ erreichte einen Minimalwert von $0,02 \text{ mol mol}^{-1}$ im Vergleich zu $Y_{\text{Lac/Glc}} > 1 \text{ mol mol}^{-1}$ bei Glukoseüberschuss (**Tabelle 2** und **Abbildung 17**).

Eine CHO-Hochzelldichtekultur praktisch ohne Laktatbildung ist realisiert!

Um dies zu erreichen, muss der DGL einen Wert von 0,5 möglichst weit unterschreiten, da so der Stoffwechsel entsprechend umgestellt wird und die Wachstumsrate sinkt. Soll die dafür benötigte Menge zuzufütternder Glukose berechnet werden, so ist zu beachten, dass in glukoselimitierter Perfusionskultur, nur 60-70% der maximalen Zelldichte einer Perfusionskultur ohne Glukoselimitierung zu erwarten sind (**Abbildung 25**). Soll ein DGL von 0,5 unterschritten werden, so darf demnach höchstens 30-35% der Menge an Glukose zugeführt werden, die maximal in Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss zugeführt würde.

Für die Durchflussrate der glukoselimitierten Perfusionskultur muss gelten:

$$D_{\text{Glukoselimitierung}} \leq 0,3 \dots 0,35 \cdot D_{\text{max Glukoseüberschuss}}$$

Mit dieser Durchflussrate wird die gewünschte Glukoselimitierung und damit die Steigerung der Produktivität der CHO-MUC1-IgG2a Zelle erreicht. Praktisch ist dies etwa gleich einer Durchflussrate im Bereich von μ , also einer für chemostatische Kultur typische Durchflussrate.

Dies zeigt, dass die Verfahrensweise eine extreme Umstellung des Stoffwechsels ermöglicht, die im Chemostat oder in Perfusionskultur mit geregelter Zufütterung bisher nicht beschrieben ist. Im Chemostat wäre bei gleicher Glukosekonzentration im Medium vermutlich eine Durchflussrate im Bereich des in dieser Kultur minimal beobachteten μ ($0,005 \text{ h}^{-1}$) notwendig, um die Glukosekonzentration und damit indirekt die Laktatbildung bei hoher Zelldichte vergleichbar weit abzusenken. Die geringe Durchflussrate würde bedeuten, dass nur sehr kleine Mengen Kulturüberstand, also Produktlösung abgeführt würden. In der Literatur findet man für CHO-Zellkultur keine Beispiele von Chemostaten mit solch niedriger Durchflussrate. Das Ausmaß an Glukoselimitierung (DGL) und die Wachstumsrate konnten im Chemostat nicht ausreichend stark gesteigert, respektive gesenkt werden. Dies könnte der Grund sein, warum in chemostatischer Kultur nie eine Steigerung der spezifischen Produktivität unter Glukoselimitierung beschrieben wurde. In stark limitierten Fed-Batch Kulturen wurde hingegen eine Steigerung der spezifischen Produktivität vermutlich deshalb schon einmal beobachtet (siehe **Mini-Review 7**), weil dort DGL und Wachstumsrate ähnliche oder niedrigere Werte anneh-

men konnten, wie in der hier gezeigten Perfusionskultur. Dies konnte mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fed-Batch Kultur bestätigt werden (siehe Kapitel 5.1.3).

Da die Glukoseaufnahme über den Citratzyklus an die Glutaminaufnahme gekoppelt ist und umgekehrt [124], ist auch eine Betrachtung der Glutaminaufnahmerate sinnvoll. Die Glutaminkonzentration sank im Verlauf der Kultur auf etwa $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ab (Daten nicht gezeigt). Da der K_m für das Enzym Glutaminase, das den ersten Schritt der Glutaminolyse katalysiert deutlich über $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ liegt [128], ist davon auszugehen, dass neben Glukoselimitierung auch Glutaminlimitierung vorlag. Die Glutaminaufnahmerate verringerte sich im Verlauf der Kultur dann auch in gleicher Weise, wie die Glukoseaufnahmerate, was sich in dem konstant bei etwa $0,15 \text{ mol mol}^{-1}$ verbleibendem $Y_{\text{Gln/Glc}}$ widerspiegelt (**Tabelle 2**).

Es wurde schon in der Vergangenheit berichtet, dass kombinierte Glutamin- und Glukoselimitierung in Fed-Batch Kultur keinen negativen Einfluss, sondern vielmehr positiven Einfluss auf die Produktivität haben [124, 128]. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei Glukoselimitierung der Pyruvat-Pool in der Zelle kleiner wird. Somit stünde kein Pyruvat mehr für die Umwandlung von dem aus Glutamin hervorgehenden Glutamat in α -Ketoglutarat (α KG) über die Glutamat-Transaminase (GluTA) zur Verfügung. Die Umwandlung von Glutamat in α KG könnte dann bevorzugt über die Glutamatdehydrogenase (GDH) ablaufen. Die vollständige Oxidierung von Glutamin über die GDH kann 27 ATP/Glutamin liefern [61, 128], die Oxidierung nach Umwandlung von Glutamat in α KG unter Bildung von Alanin oder Aspartat über die GluTA jedoch nur maximal 9 ATP/Glutamin (**Abbildung TG7**). So könnte trotz Glutaminlimitierung noch effizient ATP über Glutamin gebildet werden. Wird die GDH an Stelle der AlaTA zur Generierung von α KG genutzt, so sollte dies zur Bildung von 2 mol NH_4^+ statt nur 1 mol NH_4^+ pro mol Glutamin führen. Daher soll die NH_4^+ -Bildung im Verlauf der Kultur untersucht werden (siehe auch Kapitel 5.3). Interessant weiterhin zu untersuchen, in wie weit durch Variation der Glutaminlimitierung bei bestehender Glukoselimitierung die Produktivität verändert würde.

Weitere Rückschlüsse auf die Vorgänge im Zentralstoffwechsel und damit auch auf die Verstoffwechselung von Glukose und Glutamin können anhand der Betrachtung des O_2 - und CO_2 -Stoffwechsels gezogen werden.

5.2.2 O₂- und CO₂-Stoffwechsel

Dass die OUR und die CPR online-abgeschätzt wurden (**Abbildung 32 + 33**), macht eine detaillierte Betrachtung dieser Parameter möglich. Dazu sind die Ertragskoeffizienten von O₂ und CO₂ zu Glukose zu markanten Zeitpunkten im Verlauf der Glukose limitierten Perfusionskultur berechnet worden (**Tabelle 3**).

Zeitpunkt im Bioprozess Ausbeute-Koeffizient	Start der Perfusion	maximale Laktat-Konzentration	Eintritt der Glukose-depletion	Laktat-Konzentration < 1 mmol l ⁻¹	maximale zellspezifische Produktivität
$\delta Y_{OUR/Glukose}^*$ [mmol mmol ⁻¹]	n.d.	~ 3,27 (> 3,27)	5,2	6,21	5,67
$Y_{CPR/Glukose}^*$ [mmol mmol ⁻¹]	n.d.	4,22 (> 4,22)	3,63 (> 3,63)	2,99 (> 2,99)	1,75 (> 1,75)
~ RQ	n.d.	1,3	0,7 (> 0,7)	0,48 (> 0,48)	0,31 (> 0,31)
$Y_{Glc-Energy/Glc}$ [mmol mmol ⁻¹] %	n.d.	93	92	105	96,5
δY_{OUR}^* Glukose+AS _{TCA} [mmol mmol ⁻¹]	n.d.	n.d.	4,42	5,01	4,71
*: relative Änderung gegenüber dem Zeitpunkt mit niedrigster OUR (= Null gesetzt) Werte in Klammern geben die vermutlich realen Werte an.					

Tabelle 3: Ertragskoeffizienten zum O₂- und CO₂-Stoffwechsel in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung.

$Y_{OUR/Glc}$ steigt mit zunehmender Glukoselimitierung an und erreicht schließlich Werte von mehr als 6 mmol mmol⁻¹. Dies ist in Übereinstimmung mit dem $Y_{OUR/Glc}$, welcher in einem Glukose limitierten Fed-Batch bestimmt wurde, und als deutlicher Hinweis darauf interpretiert wurde, dass die Glukose bei Glukoselimitierung praktisch vollständig oxidiert wird [81]. Diese Betrachtungsweise ist zunächst naheliegend und könnte auch den Anstieg der OUR bei Glukoselimitierung im hier gezeigten Versuch plausibel erklären. Weiterhin konnte mit Hilfe von $Y_{OUR/Glc}$ und $Y_{Lac/Glc}$ der molare Anteil der Glukose bestimmt werden, der in die Gewinnung von ATP einfließt (siehe Kapitel 2.3.2). Dies gilt jedoch nur, wenn der O₂-Verbrauch durch andere Stoffwechselreaktionen als den Glukosestoffwechsel vernachlässigbar ist. Diese Annahme vorausgesetzt, liegt der so bestimmte $Y_{Glc-Energy/Glc}$ über die gesamte Kulturdauer zwischen 0,9 und 1 mmol mmol⁻¹ (**Tabelle 3**).

Der überwiegende Anteil der Glukose würde demnach auch unter Glukoselimitierung zur ATP-Gewinnung genutzt und nur $< 10\%$ zur Generierung von Biomasse, z.B. über den Pentosephosphat-Zyklus (PPP). Dies korreliert mit den durch andere Autoren gefundenen Werten für den Fluss von Glukose in den PPP in Hybridomazellen [155]. Wenn 92–100% der Glukose veratmet und etwa 2% der Glukose zur Glykosylierung des Produkts genutzt werden (**Tabelle 2**), dann könnte die Kohlenstoffbilanz für Glukose als nahezu geschlossen betrachtet werden. Diese Aussagen sind jedoch kritisch zu betrachten, da nicht zwingend davon ausgegangen werden kann, dass kaum O_2 durch die Oxidation anderer Substrate als Glukose verbraucht wird. Insbesondere Aminosäuren fließen neben Glukose in die oxidative Phosphorylierung ein und beeinflussen daher die OUR. Bilanziert man den Ertrag $Y_{OUR/Glukose+AS-TCA}$, also die molare Menge an verbrauchtem O_2 im Verhältnis zur verbrauchten Menge an Glukose und aller Aminosäuren, die ebenfalls in den Citratzyklus einfließen, so liegen die Werte zwischen 4 und 5 $mmol\ mmol^{-1}$ von maximal möglichen 6 $mmol\ mmol^{-1}$ (**Tabelle 3**). Auch diese Betrachtung suggeriert eine fast vollständige Oxidierung von verbrauchter Glukose und Aminosäuren, was wiederum nicht zwingend der tatsächlichen Verstoffwechselung dieser Substrate entsprechen muss.

Neben der OUR konnte auch die abgeschätzte CPR dazu beitragen, weitere Informationen über den Stoffwechsel zu gewinnen. In der hier vorliegenden Kultur nahm $Y_{CPR/Glc}$ mit zunehmender Glukoselimitierung und abnehmender Wachstumsrate kontinuierlich ab (**Tabelle 3**). Daraus resultiert, dass der Respiratorische Quotient (RQ) der Kultur ebenfalls im Verlauf der Kultur gesunken ist. Die Abnahme des RQ von etwa 1,3 zu Beginn bis $>0,31$ zum Ende der Kultur fällt dabei extrem stark aus. Die vollständige Veratmung von Glukose ergäbe einen $RQ = 1$. Ein $RQ > 1$ tritt nur bei Gärung, Lipid- oder Proteinanabolismus auf, während ein $RQ < 1$ auf die unvollständige Oxidierung von Aminosäuren sowie Protein- und Lipidkatabolismus hinweist [22, 151, 156]. Der theoretisch niedrigst anzunehmende RQ liegt bei etwa 0,6, wobei dieser Wert vor allem in Zusammenhang mit ketogener Glukoneogenese nachgewiesen wurde [173]. Das der hier bestimmte $RQ < 0,6$ ist, kann durch die zu gering angenommene $qCPR$ erklärt werden. Daraus folgt, dass unter Glukoselimitierung die $qOUR$ nicht durch die vollständige Veratmung von Glukose dominiert werden kann, da so im Verlauf der Kultur ein $RQ \sim 1$ bestimmt worden wäre. Somit ist wahrscheinlich auch die Aussage unzutreffend, dass $> 90\%$ der Glukose für den Energiestoffwechsel genutzt werden. Vielmehr deutet vieles darauf hin, dass die geringe verbrauchte Menge an Glukose unter Glukoselimitierung verstärkt in Produkt einfließt, was die gesteigerte Produktivität erklärt.

Offensichtlich wird die oxidative Phosphorylierung unter Glukoselimitierung maßgeblich auch über andere Stoffwechselreaktionen, wie Transaminierungen oder den Katabolismus von Proteinen oder Lipiden gespeist. Der Abbau von Lipiden und die Oxidierung von Fettsäuren dürfte bei vorhandener Glukoselimitierung begünstigt werden durch einen kleinen intrazellulären AcCoA-Pool [152]. Die Zugabe von Fettsäuren und Lipiden zum Kulturmedium erscheint daher sinnvoll und könnte zu einer weiteren Produktivitätssteigerung führen. In diesem Zusammenhang erscheint eine Prozessbegleitende Lipidanalytik als sinnvoll. Der sehr niedrige $RQ < 0,7$ deutet zudem stark auf Glukoneogenese hin! Mit zunehmender Glukoselimitierung stellt sich demnach der gesamte zentrale Stoffwechsel um. Diese Umstellung ist nicht nur verbunden mit einer stark gesteigerten zellspezifischen Produktivität und geringerer Laktatbildungsrate sondern auch mit einer deutlichen Abnahme der spezifischen Wachstumsrate (**Abbildung 41**). Der Zusammenhang von RQ und den genannten Parametern zu verschiedenen markanten Prozesszeitpunkten kann wichtige Aussagen über den Gesamtstoffwechsel liefern. So fällt auf, dass im Bereich $RQ > 0,7$, also im Bereich des Stoffwechsels mit Anabolismus und Atmung die Wachstumsrate relativ konstant $> \mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ist. Es gibt Hinweise darauf, dass im Medium enthaltene Fettsäuren bei höheren Wachstumsraten zur Synthese von weiteren Lipiden genutzt werden, jedoch kaum zu CO_2 oxidiert werden [157, 158].

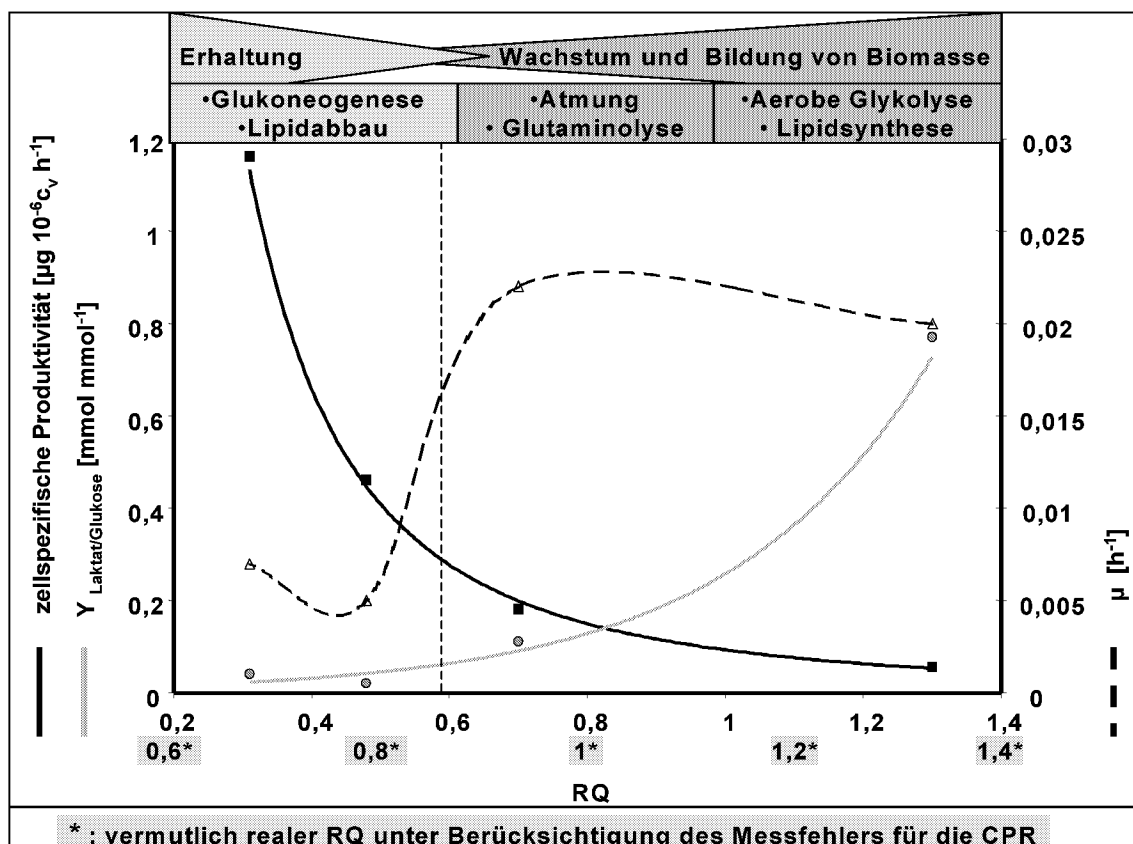


Abbildung 41: Zusammenhänge zwischen respiratorischem Quotienten, Wachstum und Produktivität.

Dies ist in Übereinstimmung mit der Aussage, dass hier der Stoffwechsel zur Bildung von Biomasse und Zellwachstum klar überwiegt. In diesem Bereich ist die spezifische Produktivität gering und es liegt ein ausgeprägter Crabtree-Effekt vor. Im Bereich $RQ < 0,7$ hingegen sinkt die spezifische Wachstumsrate stark ab (**Abbildung 41**). Dort dürfte dem RQ nach zu urteilen vor allem Katabolismus (Abbau von Lipiden und eventuell auch Proteinen), sowie Glukoneogenese vorliegen, Reaktionen, die nicht zur Bildung von Biomasse und Zellwachstum führen. Lipide und Fette können dabei durch die Biomasse selbst oder durch Zuführung über das Medium bereit gestellt werden. Somit kann dieser Stoffwechsel vermehrt Energie und Substrat für den Erhaltungsstoffwechsel liefern, dessen Anteil in diesem Bereich des RQ besonders hoch sein dürfte. Hier ist die spezifische Produktivität deutlich erhöht.

Auf den potentiellen Erhaltungsstoffwechsel der Zellen und dessen Bedeutung für Substratverbrauch und Produktbildung soll daher im weiteren noch genauer eingegangen werden.

5.2.3 Wachstum und Erhaltungsstoffwechsel

Es konnte für verschiedene Verfahrensweisen gezeigt werden, dass die spezifische Produktivität mit abnehmender Wachstumsrate zunimmt (**Abbildung 42**). Umgekehrt konnte nur in den Ansätzen eine Steigerung der Produktivität erreicht werden, in denen die Wachstumsrate zurückging. Dabei nimmt die Steigerung der Produktivität hauptsächlich bei Wachstumsraten von etwa $\mu < 0,15 \text{ h}^{-1}$ zu (**Abbildung 29**). Denkbar ist eine Steigerung der Produktivität durch gesteigerte Proteinsekretion als Stressantwort auf die Glukoselimitierung [159]. Da die Wachstumsrate durch den Zellzyklus bedingt ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem sehr langsamen Wachstum das Verhältnis von S/G₁-Phase sehr klein ist, die G_{1/0}-Phase also besonders lange dauert. Hierin könnte ein Grund für die erhöhte Produktivität liegen [160]. Insbesondere für Hybridoma- und Myeloma-Zellen konnte gezeigt werden, dass die spezifische Antikörperproduktivität in der G₁- oder G₂-Phase höher als in der S-Phase ist [161, 162, 163]. Es gibt aber auch Beispiele für Zellen, die in der S-Phase des Zellzyklus verstärkt produzieren, also eine an das Wachstum gekoppelte Produktion aufweisen. Eine an das Wachstum gekoppelte Produktivität wird bei CHO-Zellen häufig beobachtet. Jedoch auch für CHO-Zellen gibt es Beispiele für G₁-Phase gekoppelte Produktivität [24, 27, 72].

Offensichtlich ist besonders bei rekombinanten Zelllinien die Kopplung der Produktbildung an das Zellwachstum von Zelle zu Zelle unterschiedlich.

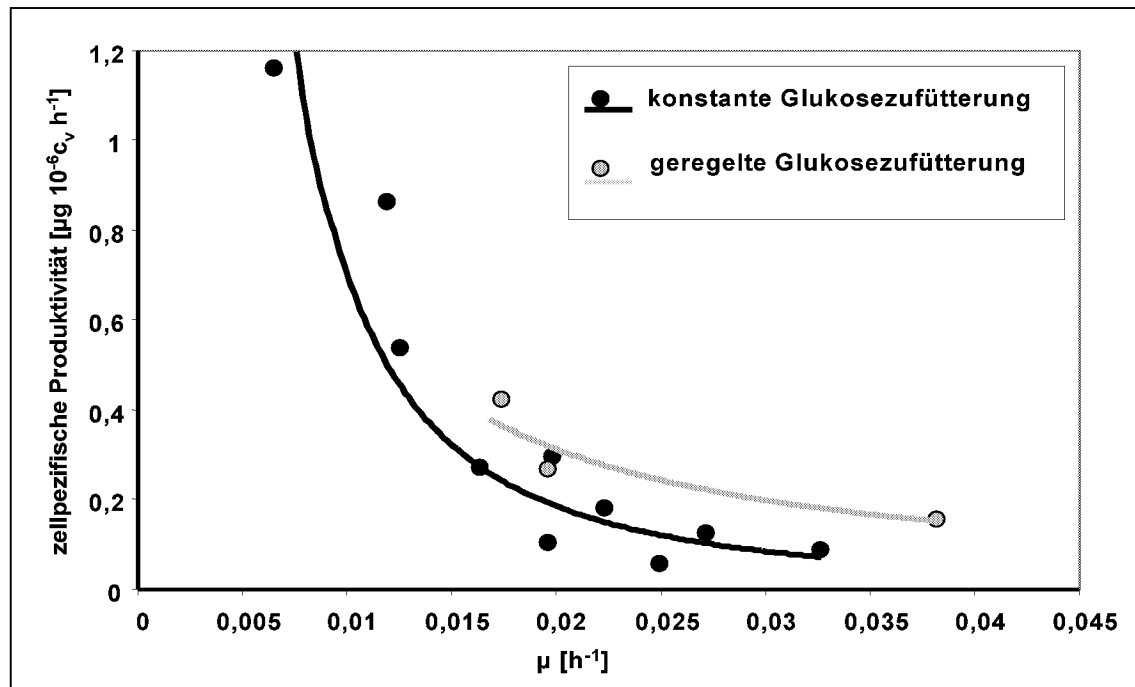


Abbildung 42: Zusammenhang zwischen spezifischer Produktivität und Wachstumsrate.

So muss für jede Zelle zunächst geprüft werden, ob die Produktbildung an das Wachstum gekoppelt ist oder nicht, bevor eine Prozessstrategie wie die hier entwickelte als sinnvoll erachtet werden kann.

Das Produktbildungsverhalten von Zellen könnte in Verbindung stehen mit der zur Zeit der Transfektion vorherrschenden Zellzyklusphase, da die rekombinante cDNA in die in dieser Phase möglicherweise verstärkt transkribierten Regionen des Genoms integriert werden könnte [164]. Zu diesen Regionen könnten Gene für Enzyme des Erhaltungsstoffwechsels oder allgemein von Proteinen gehören, welche in Verbindung mit dem durch die Glukoselimitierung verursachten Stoffwechsel verstärkt exprimiert werden. Über eine verstärkt G_1 -Phasen gekoppelte Produktbildung nach der Transfektion konfluenter, nicht wachsender Kulturen wurde berichtet [165]. Konfluente Transfektion könnte somit Anwendung finden, wenn G_1 -gekoppelte Produktivität erwünscht ist, so auch in dem hier entwickelten Verfahren. Die verwendete CHO-MUC1-IgG2a Zelle wurde in konfluenter Kultur transfiziert, genauer durch Elektroporation nach Abtrypsinieren aus konfluenter Kultur. Da Zellen in konfluenter Kultur kaum mehr Wachstum aufweisen, dürfte das Verhältnis von $S/G_{1/0}$ -Phase sehr klein gewesen sein [166], was die Wahrscheinlichkeit der Gewinnung eines G_1 -Phase gekoppelt produzierenden Klon erhöht hätte. In jedem Fall sollte zur weiteren Aufklärung des Zellzyklus unter Glukoselimitierung und erhöhter Produktivität eine Zellzyklusuntersuchung an den CHO-Zellen durchgeführt werden.

Über eine gesteigerte spezifische Produktivität von CHO-Zellen (möglicherweise in G₁-Phase) in kontinuierlicher Kultur mittels Glukoselimitierung wurde bisher nicht berichtet. In der Literatur werden jedoch weitere Möglichkeiten aufgezeigt die Produktivität zu steigern, in Verbindung mit verringerten Wachstum. So konnte über einen induzierbaren Zellzyklusarrest eine hohe Produktivität bei hohen Zelldichten mit Zellen in G₁-Phase erreicht werden [24]. Eine 1,7-fache Steigerung der spezifischen Produktivität wurde auch durch Senkung der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 30°C oder 32°C erzielt [27, 72]. Dies war ebenfalls verbunden mit einer Senkung der spezifischen Glukoseaufnahmerate, sowie einer Verschiebung des Zellzyklus von S-Phase in überwiegend G₁-Phase. Im Unterschied zu den hier gezeigten Daten nahm jedoch die spezifische OUR ab. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass bei signifikant niedrigeren Temperaturen alle Reaktionen, so auch die oxidative Phosphorylierung, verlangsamt ablaufen.

Möglicherweise verhindert dies eine noch deutlichere Steigerung der Produktivität bei niedrigen Temperaturen, trotz des auftretenden langsamen Wachstums und möglicherweise auch auftretenden Erhaltungsstoffwechsels. Im Gegensatz zur Steigerung der Produktivität unter niedrigen Temperaturen oder unter Zellzyklusarrest könnte die extreme Steigerung der Produktivität unter Glukoselimitierung jedoch begünstigt werden durch die Minderung des Crabtree-Effekts, was zu einer verstärkten Aktivität der oxidativen Phosphorylierung und damit ATP-Bildung im Rahmen des Erhaltungsstoffwechsels beitragen würde.

Bei niedriger Kultivierungstemperatur konnte zudem eine Änderung des Protein Expressionsmusters festgestellt werden [27, 167]. Dieser Ansatz, sowie eine Analyse der mRNA-Muster wird bereits für CHO-Zellen verfolgt, welche in Fed-Batch den „metabolic-shift“ von Laktatbildung zu Laktatverbrauch durchlaufen haben [143, 144]. Da alle hier ermittelten Ergebnisse auf eine deutliche Umstellung des Stoffwechsels hin deuten, und zudem noch nicht hinreichend geklärt werden konnte, wie der exakte Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel und der gesteigerten Produktivität ist, sollte eine Analyse des Proteoms der CHO-MUC1-IgG2a Zellen unter Glukoselimitierung durchgeführt werden. So könnten Hinweise darüber gefunden werden, welche Proteine in Zusammenhang mit erhöhter Produktivität verstärkt exprimiert werden. Vorstellbar wäre eine verstärkte Expression von Enzymen des Citratzyklus, von Proteinen des posttranslatorischen Modifikationsapparates oder von Kinasen oder anderen Proteinen mit regulatorischer Funktion [143]. So gibt es Proteine, welche das Zell-

wachstum in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung kontrollieren, wie zum Beispiel mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). TOR ist ein Sensor für intrazelluläres ATP und beeinflusst zudem die Acetylierung von Histonen, was wiederum die Expression der ribosomalen Proteine und damit die Proteinexpression beeinflusst. TOR steuert auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression cytosolischer Proteine kontrollieren [168, 169, 170]. Somit könnte TOR eine Verbindung zwischen Glukoselimitierung und Produktivitätssteigerung darstellen.

Bei einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu=0$ und damit einer Arretierung der Zellen in $G_{1/0}$ -Phase liegt theoretisch ausschließlich Erhaltungsstoffwechsel in der Zelle vor.

Es ist davon auszugehen, dass die Glukoselimitierung die Ursache für die beobachtete geringe Wachstumsrate der Zellen ist. Die in Verbindung mit der Glukoselimitierung beobachtete Glukoseaufnahmerate liegt in der Nähe der theoretisch für den Erhaltungsstoffwechsel notwendigen Glukoseaufnahmerate (m_{Glc}) der CHO-MUC1-IgG2a Zelle.

Aus **Abbildung 43** geht hervor, dass m_{Glc} im Bereich von etwa $0,03 - 0,06 \text{ mmol } 10^{-9} \text{ c}_v \text{ h}^{-1}$ liegt. Dass in verschiedenen Perfusionskulturen kein identischer Wert für m_{Glc} ermittelt werden konnte ist durch äußere Einflüsse wie pH und Glukosekonzentration, die Einfluss auf den Erhaltungsstoffwechsel und damit auch auf m_{Glc} haben erklärbar [159, 171]. Dies deutet erneut darauf hin, dass bei extremer Glukoselimitierung und gleichzeitig maximaler spezifischer Produktivität der Stoffwechsel weitgehend dem Erhaltungsstoffwechsel der Zelle entspricht. Im Erhaltungsstoffwechsel wird ATP vor allem für die Erhaltung des Ionengradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum, sowie in „futile-cycles“ verbraucht.

Es gibt Hinweise dafür, dass bis zu 60% des ATP-Verbrauchs in Säugerzellen auf diese Komponenten zurückzuführen sind [61, 172]. Zu den „futile cycles“ gehören unter anderem Umwandlungen zwischen Fruktose-6-Phosphat und Fruktose-Bis-Phosphat, zwischen Glutamat und α KG, sowie zwischen Glutamat und Glutamin [29, 30, 61], also Umwandlungen an zentralen Punkten des Glukose- und Glutaminstoffwechsels. Die „futile-cycles“ haben möglicherweise eine Funktion in der Verstärkung metabolischer Signale, wie z.B. ADP oder P_i [30]. Diese Signale könnten Einfluss auf die Expressionsrate von Proteinen haben.

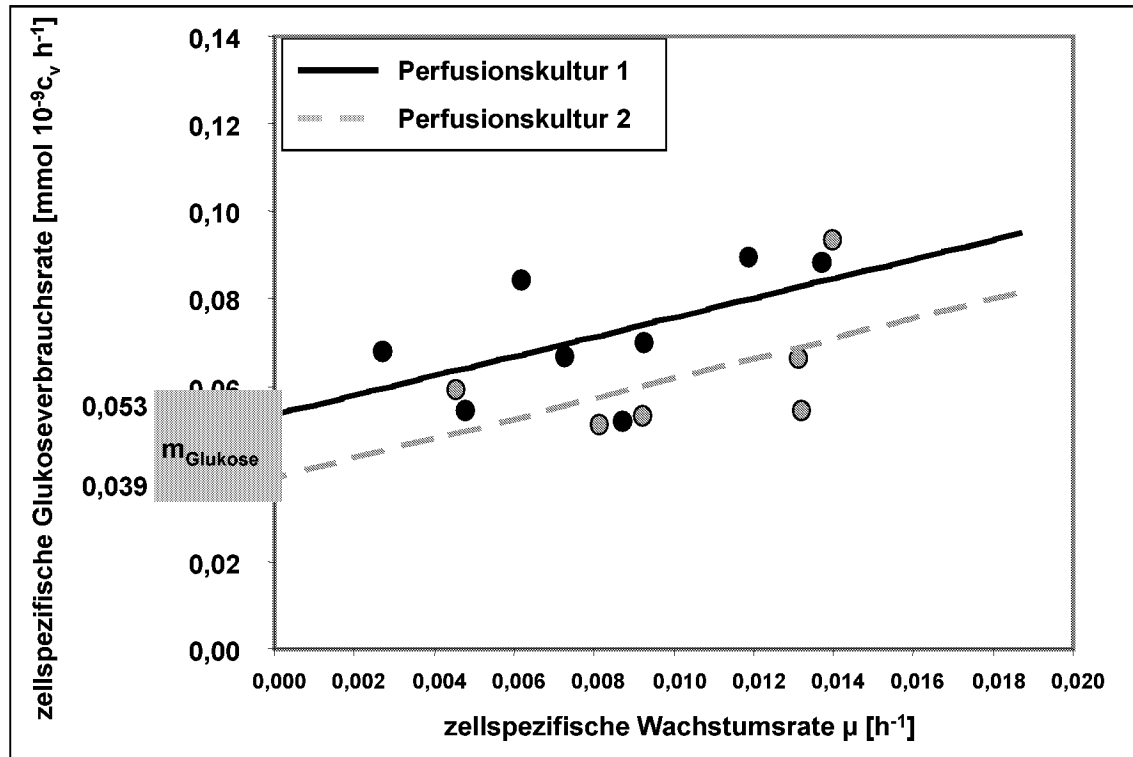


Abbildung 43: Die spezifische Glukoseverbrauchsrate aufgetragen gegen die spezifische Wachstumsrate.

Weiterhin ist denkbar, dass der Erhaltungsstoffwechsel unter extremer Glukoselimitierung, anders als ein beispielsweise durch Temperaturniedrigung verursachter Erhaltungsstoffwechsel, weniger Anteil an „futile-cycles“ aufweist. Dies könnte wiederum dazu führen, dass verhältnismäßig mehr ATP zur Proteinexpression zur Verfügung steht.

Nicht geklärt ist bisher, inwiefern Produktivität, Wachstum und Glukoselimitierung (DGL) gekoppelt sind und, wie diese Parameter sich gegenseitig beeinflussen. Eine Möglichkeit die Zusammenhänge zwischen DGL, Wachstumsrate und Produktivität zu untersuchen, stellt ein Puls-Experiment dar, in dem die Zellen, welche sich in Erhaltungsstoffwechsel bei hoher Produktivität befinden, plötzlich durch Verdoppelung der Glukosekonzentration im Zulauf von 23,9 auf 47,8 mmol l⁻¹, große Mengen an Glukose angeboten wird. Die Ergebnisse eines solchen Experiments in Perfusionskultur sind in **Abbildung 44** dargestellt.

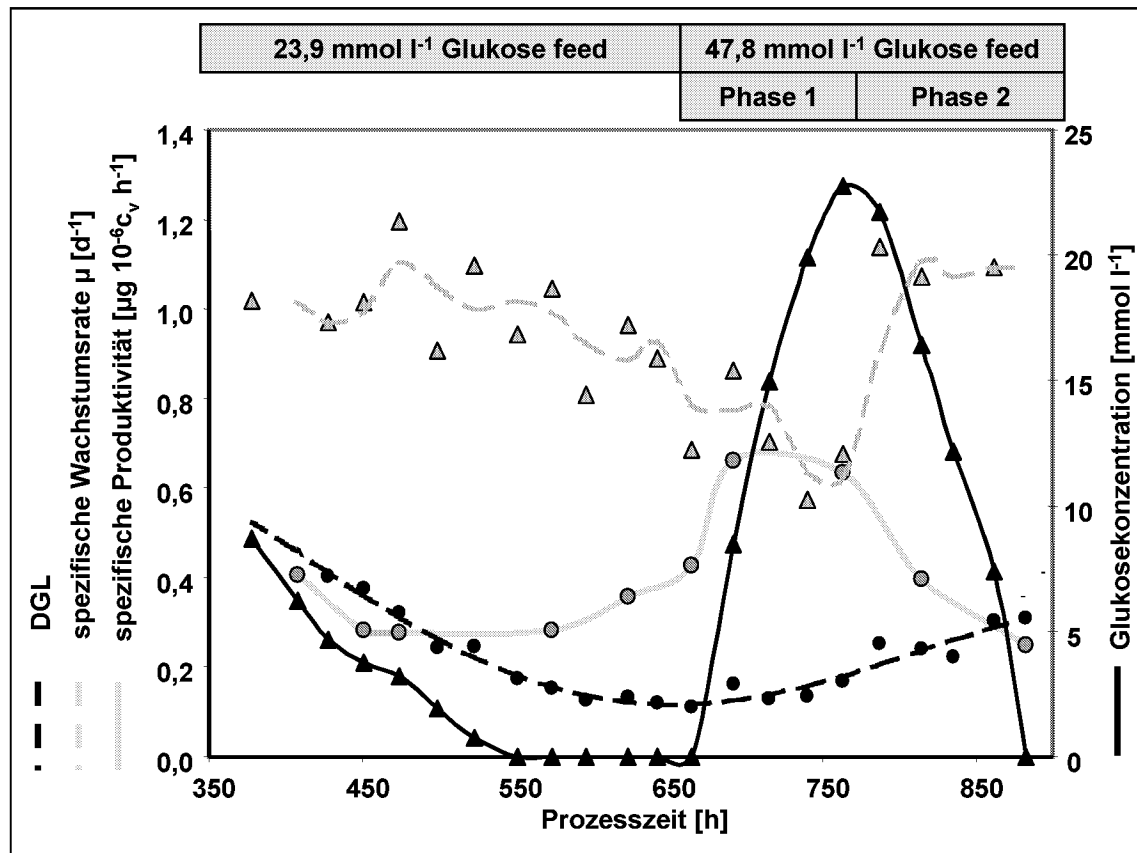


Abbildung 44: Reversibilität des unter Glukoselimitierung veränderten Stoffwechsels.

Es wird deutlich, dass trotz steigender Restglukosekonzentration zunächst die spezifische Wachstumsrate und die spezifische Produktivität kaum verändert werden, während die Glukoseaufnahmerate und damit DGL bereits zunehmen (Phase 1).

Bei weiterem leichten Anstieg der Glukoseaufnahmerate reagieren die Zellen mit einer Steigerung der Wachstumsrate, was zu einer Absenkung der Glukosekonzentration führt (Phase 2). In dieser Phase nimmt die spezifische Produktivität plötzlich drastisch ab. Die Glukosekonzentration sinkt dann wieder auf Null. In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob nach Senkung der Glukosekonzentration die Produktivität wieder ansteigt.

Dies sollte in Zukunft noch durchgeführt werden. Trotzdem geben diese Daten Aufschluss über Zusammenhänge zwischen Produktivität, Erhaltungsstoffwechsel, Wachstum und Glukoselimitierung:

- Die spezifische Produktivität ist deutlicher gekoppelt an die Wachstumsrate, als an die Glukoseverbrauchsrate.
- Eine Steigerung der Wachstumsrate und damit die Bildung von Biomasse ist auch bei relativ geringer Glukoseverbrauchsrate möglich. Daraus folgt, dass auch bei geringer Glukoseverbrauchsrate genügend ATP für Wachstum bereit steht. Möglicherweise

steht dieses ATP ohne Wachstum der Proteinexpressionsrate zur Verfügung, welche aber bei Wachstum sofort wieder gesenkt wird.

- Stoffwechsel unter Glukoselimitierung ist daher nicht automatisch gleich Erhaltungsstoffwechsel.

Daraus folgt erneut, dass nur diejenige Verfahrensweise zu einer Steigerung der spezifischen Produktivität führt, welche in Verbindung mit der Glukoselimitierung auch niedrige Wachstumsraten ermöglicht. Dazu eignen sich insbesondere Perfusionskultur oder Fed-Batch.

Eine Reihe von Erkenntnissen konnte aus der prozesskinetischen Betrachtung der Parameter Glukose, Aminosäuren, O_2 und CO_2 gewonnen werden. Genaueren Aufschluss über die ablaufenden Stoffwechselwege bei niedriger Wachstumsrate und Glukoselimitierung bedurften entweder der prozesskinetischen Untersuchung weiterer Metabolite, auch unter modifizierten Fütterungsstrategien, oder der Aufklärung mittels weiterer Methoden, wie beispielsweise die Isotopenmarkierung von Substraten. Daher wurden weitere solcher Untersuchungen angestellt.

5.3 Weiterführende Untersuchungen zum Zentralstoffwechsel unter Glukoselimitierung

Zuvor war in Batch Kulturen beobachtet worden, dass bei Glukoselimitierung Laktatverbrauch auftritt. In Perfusionkultur war Laktatverbrauch bisher nicht nachgewiesen worden. Die Abnahme der Laktatkonzentration in Perfusionkultur war auf Auswaschung zurückzuführen ($q_{\text{Lac}} > 0$). Da jedoch ansonsten der Stoffwechsel in Batch Kultur und Perfusionkultur mit Glukoselimitierung ähnlich ist, war anzunehmen, dass Laktatverbrauch auch in Perfusionkultur möglich sein sollte.

Um nun Laktatverbrauch nachzuweisen und zusätzlich die Zusammenhänge zwischen Laktatstoffwechsel und Glutaminstoffwechsel besser zu verstehen, wurde in Perfusionkultur mit konstanter Glukosezufütterung unter Glukoselimitierung zusätzlich Laktat zugefüttert (**Abbildung 45**).

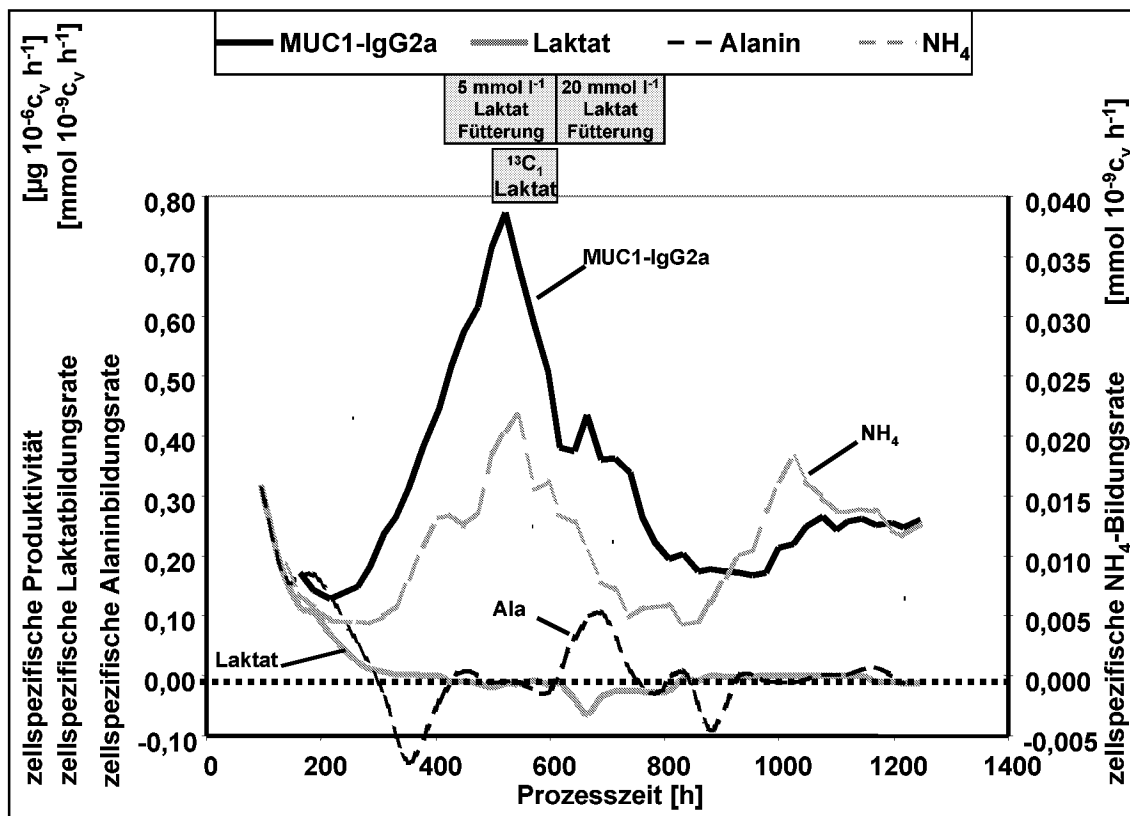


Abbildung 45: Stoffwechsel von Laktat, NH_4^+ , Alanin und Glukose in Perfusionkultur mit Glukoselimitierung.

Die aus diesem Versuch gefundenen Zusammenhänge bestätigen sehr gut, dass unter Glukoselimitierung α KG über die GDH aus Glutamat gebildet wird, unter Bildung von NH_4^+ . Bei Glukoseüberschuss, wie auch bei Laktatzufütterung, wird der Pyruvat-Pool der Zelle aufgefüllt. Pyruvat steht dann zur Verfügung, um über die Aminotransferasereaktion α KG zu bilden. Dabei entsteht nicht NH_4^+ , sondern Alanin.

Somit kann auch bei Zufütterung von Laktat Glutamin nicht vollständig oxidiert werden, die maximal mögliche Ausbeute an ATP ist theoretisch geringer (siehe Kapitel 5.2.1). Interessanterweise korreliert der Verlauf für die spezifische Produktivität sehr gut mit dem Verlauf für die NH_4^+ -Bildungsrate (**Abbildung 45**). Dies kann wiederum als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass die Versorgung der Zelle mit ATP durch Glutaminabbau unter Glukoselimitierung essentiell für die Produktivität ist. Die ATP-Bereitstellung wird durch Nutzung der GDH an Stelle der Aminostransferase wegen Mangel an Pyruvat bedingt durch Glukoselimitierung begünstigt.

Während 5 mmol^{-1} Laktat zugefüttert wurden, lag kein Restlaktat in der Kultur vor (Daten nicht gezeigt). Somit konnte Laktatverbrauch nachgewiesen werden. Bei erhöhtem Laktatverbrauch, während der Zufütterung von 20 mmol l^{-1} Laktat, nahm die NH_4^+ -Bildungsrate wieder ab, nachdem sie zuvor unter Glukoselimitierung angestiegen war. Nach Beendigung der Laktatzufütterung nahm die NH_4^+ -Bildungsrate dann wiederum zu.

Alanin wurde nur unter Glukoselimitierung ohne Zufütterung von Laktat verbraucht. Nimmt der Laktatverbrauch hingegen zu, dann wird Alanin erneut gebildet (**Abbildung 45**).

Durch Prozesskinetische Betrachtung konnten so weitere wichtige Hinweise auf den Stoffwechsel gefunden werden.

Im gleichen Versuch wurde weiterhin ^{13}C -Laktat, in Position C_3 markiert, über einen Zeitraum von 100 h zugefüttert (**Abbildung 45**) und danach wurden Zellen aus dem Kulturgefäß entnommen. Wie in **Anhang 9** beschrieben, wurden die Zellen dann hydrolysiert und das Hydrolysat mittels einer ^{13}C -2D-NMR auf ^{13}C hin untersucht. Somit sollte festgestellt werden, in welche Stoffwechselwege der Kohlenstoff aus dem zugefütterten Laktat einfließt. ^{13}C -Markierung konnte in Alanin, Aspartat und Glutamat gefunden werden (**Abbildung 47**). Ein statistisch nicht signifikantes Signal wurde auch in der Ribose der Nukleotide gefunden. Jedoch waren nur 2-3% der Ribose aus Nukleotiden in Position C_1 markiert, bei 1% natürlicher Markierung und dem vorhandenen Signal-Rausch Verhältnis der NMR-Messung ist dies jedoch kein eindeutiger Nachweis auf ^{13}C in den Nukleotiden.

Damit konnte bestätigt werden, dass wie zuvor diskutiert, große Teile des Laktats, via Pyruvat in Alanin einfließen. Über andere ebenfalls für Säugerzellen beschriebene Transaminierungsreaktionen kann ^{13}C so auch in Aspartat und Glutamat gelangen. Denkbar ist auch ein Fluss vom Pyruvat zum Oxalacetat und dann über das Aspartat-Shuttle System in Aspartat (**Abbildung 47**).

Das Signal in den Ribosen der Nukleotide könnte durch vorliegende Glukoneogenese erklärt werden. Möglicherweise kann es unter starker Glukoselimitierung in Säugerzelllinien zu Glukoneogenese kommen. Dies wurde bereits früher postuliert [116]. Die ^{13}C -Markierung in der Ribose der Nukleotide wäre jedoch erstmals ein Beweis für Glukoneogenese in CHO-Zellen. Deshalb sollte, um die Markierungsanteile im Stoffwechsel zu erhöhen,

^{13}C -vollmarkiertes Laktat in einem Wiederholungsversuch zugefüttert werden. Dies könnte zum Beweis der Glukoneogenese führen. Durch Glukoneogenese könnte auch unter Glukoselimitierung Glukose für den PPP und die Glykane der Glykoproteine bereitgestellt werden, falls dies erforderlich ist [152]. Die Zufütterung von Laktat sollte jedoch begrenzt werden, um die ATP-Bereitstellung über die GDH nicht zu senken.

Im Kapitel 5.1 konnte eine neue und hochproduktive Prozessstrategie, basierend auf Glukoselimitierung in Perfusionskultur vorgestellt werden. Weiter konnten, wie in den Kapiteln 5.2 und 5.3 gezeigt, anhand prozesskinetischer Daten und einem

^{13}C -Markierungsexperiment deutliche Hinweise auf den unter Glukoselimitierung ablaufenden Stoffwechsel gefunden und diskutiert werden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen kann nun ein theoretisches Modell des Zentralstoffwechsels von CHO-MUC1-IgG2a Zellen unter Glukoselimitierung aufgestellt werden.

Abschließend ist dieses Modell im folgenden nun vergleichend mit dem Modell des Stoffwechsels von CHO-MUC1-IgG2a Zellen unter Glukoseüberschuss aufgezeigt.

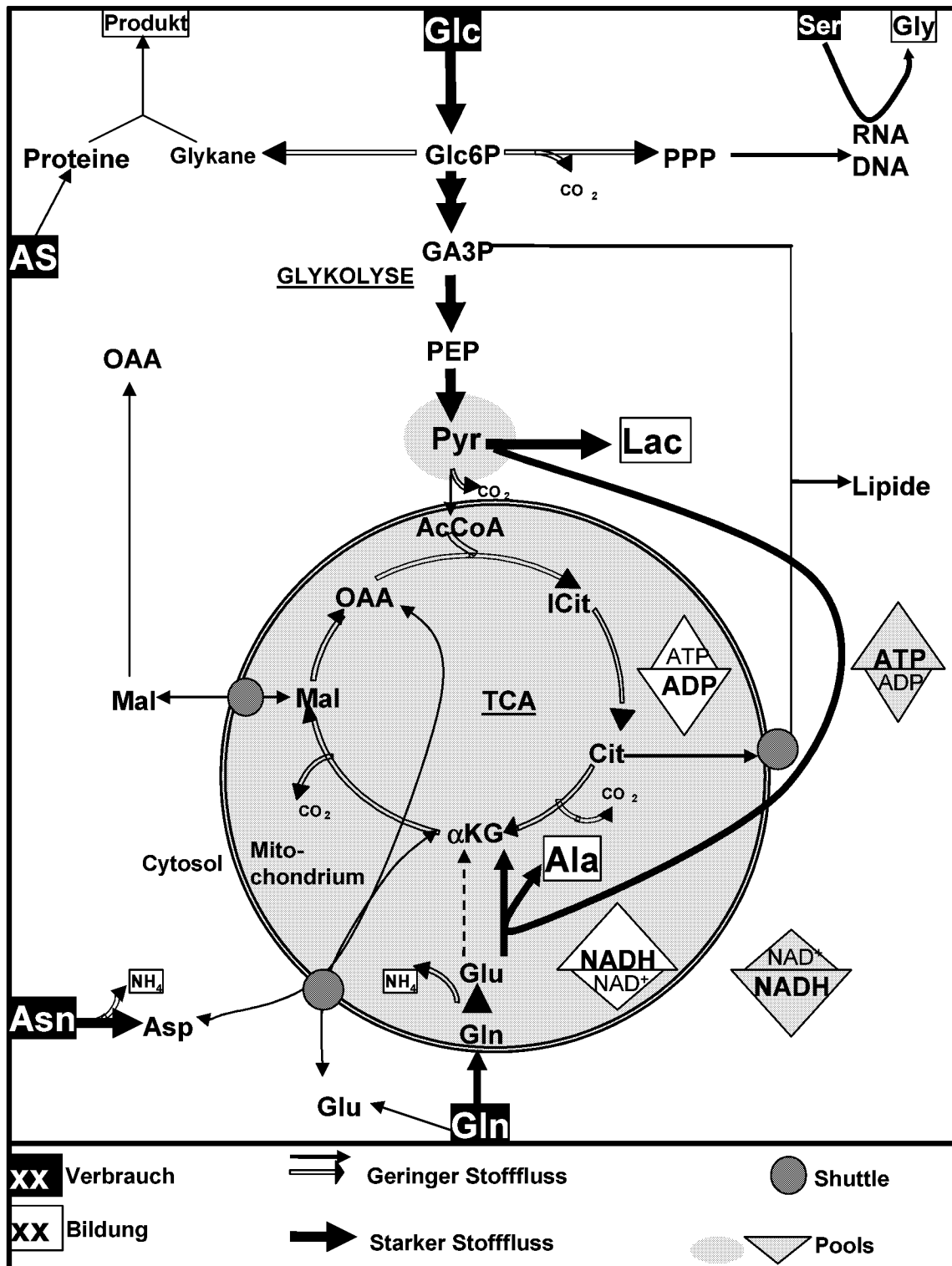


Abbildung 46: Vereinfachtes Modell des Zentralstoffwechsels unter Glukoseüberschuss und bei $RQ > 1$.

Der Stoffwechsel bei Glukoseüberschuss zeichnet sich durch hohe Raten an Glykolyse aus. Verbunden damit tritt der Crabtree-Effekt auf, welcher durch hohe Laktatbildungsrate bei niedriger TCA-Aktivität charakterisiert ist. Bei großem Pyruvat-Pool wird Pyruvat dabei hauptsächlich zu Alanin transaminiert. Neben großen cytosolischen ATP- und NADH-Pools sind weiter hohe Wachstumsraten, bzw. die Bildung von Biomasse und Lipidsynthese bei geringer Produktivität charakteristisch für diesen Stoffwechsel, welcher häufig in Zelllinien wie CHO und BHK, sowie Hybridoma beobachtet wird.

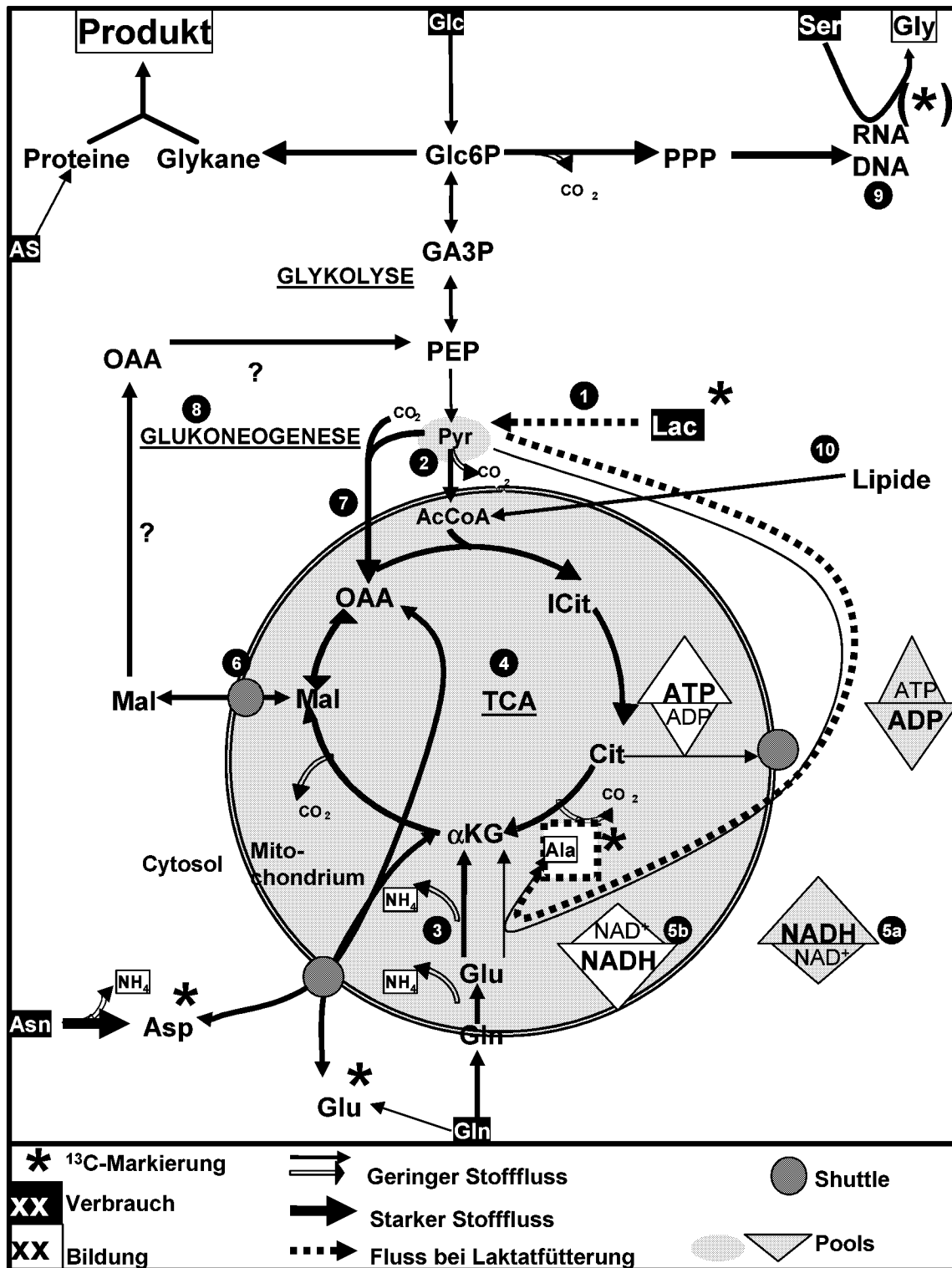


Abbildung 47: Vereinfachtes Modell des Zentralstoffwechsels unter Glukoselimitierung und bei $\text{RQ} \ll 1$.

Unter Glukoselimitierung liegt eine geringe Glykolyserate vor. Da daher kein Bedarf an cytosolischem NAD^+ besteht wird ① kein Laktat gebildet, höchstens verbraucht. Der Pyruvat-Pool ② ist klein. Deshalb wird Glutamat über die GDH ③ in αKG überführt. Ohne Crabtree-Effekt ist die TCA Aktivität ④ hoch. Unter diesem Stoffwechsel sind ⑤(a,b) der cytosolische NADH- und der mitochondriale NAD^+ -Pool groß, ebenso die Bereitstellung von ATP. Dadurch ist das Malat-Shuttle ⑥ aktiv und ebenso die Pyruvatcarboxylase ⑦, wodurch Pyruvat verstärkt in den TCA einfließen kann. Weiterhin ist dadurch Glukoneogenese ⑧ möglich. Auch andere Substrate als Glukose können so den PPP speisen, und somit Kohlenstoff für die Nukleotidsynthese ⑨ liefern. Weiterhin können Lipide und Fettsäuren ⑩ abgebaut werden. Bei geringer Wachstumsrate ist die Produktivität hoch.

Insgesamt ergibt sich somit folgende Hypothese zur Kopplung von Stoffwechsel und Produktivität:

Die Glukoselimitierung führt zu gesteigerter ATP-Bildung über Glutaminabbau. Weiterhin kommt es zur ATP-Bildung durch Lipid- und Fettsäureabbau. Gleichzeitig senkt die Glukoselimitierung die Wachstumsrate, so dass das gebildete ATP nicht zur Bildung von Biomasse, sondern zur Produktbildung genutzt werden kann. Zusammen mit einer in G₁-Phase möglicherweise erhöhten Transkriptionsrate ist die Proteinexpression und damit die Produktivität stark erhöht. Liegt verminderte ATP-Bildung vor oder steigt die Wachstumsrate stark an, dann sinkt die Produktivität ab.

Unter Verwendung einer kontinuierlichen Perfusionskultur konnte dieser günstige und hochproduktive Stoffwechselzustand eingestellt und gehalten werden. Im folgenden soll deshalb auf die Bedeutung dieser Verfahrensweise in diesem Zusammenhang eingegangen werden.

5.4 Bedeutung der Verfahrensweise für die Produktivität der Kultur unter Glukoselimitierung

Wie bereits in Kapitel 3.4.3 gezeigt wurde, erlaubt die Zellrückhaltung in kontinuierlicher Perfusionskultur eine Entkopplung der spezifischen Wachstumsrate μ von der Durchflussrate D . Daher kann μ auch mit hoher Durchflussrate bei guter Zellrückhalterate R weit abgesenkt werden. Dabei werden vergleichsweise hohe Zelldichten erreicht, da die durchschnittliche Verweilzeit der Zellen im Reaktor deutlich größer ist als im Chemostat. Dies führt dazu, dass die Substratkonzentrationen im Reaktor weiter absinken können, als bei gleicher Durchflussrate im Chemostat. Daher kann in der kontinuierlichen Perfusionskultur der günstige Betriebszustand erreicht und stabil gehalten werden, welcher den hochproduktiven Stoffwechselzustand in Verbindung mit niedriger Wachstumsrate und Glukoselimitierung ermöglicht. In Perfusionskultur dürfte eine langsame Steigerung der Durchflussrate im Gegensatz zum Chemostat nicht zu einem Verlassen des günstigen Stoffwechselzustandes führen, vorausgesetzt die Durchflussrate oder die Glukosekonzentration im Zulaufmedium werden nicht derart stark erhöht, dass ein metabolischer re-switch zurück zu einem ungünstigeren Stoffwechselzustand erfolgt. Dies liegt daran, dass bei Erhöhung der Durchflussrate die Substratkonzentrationen transient ansteigen, was zu vorübergehend leicht gesteigerter Wachstumsrate und damit erhöhter Zelldichte führt. Durch die erhöhte Zelldichte sinkt die Substratkonzentration im Reak-

tor dann wieder ab. Die auftretende Glukoselimitierung bewirkt eine Verminderung der Wachstumsrate der Zellen und der ursprüngliche stabile Betriebszustand wird wieder erreicht, jedoch durch die erhöhte Zelldichte mit gesteigerter Raum-Zeit Ausbeute. Diese Zusammenhänge sind in **Abbildung 48** dargestellt. **Abbildung 48** zeigt ebenfalls, dass im Chemostat der günstige Stoffwechselzustand theoretisch instabil ist, da eine auftretende Glukoselimitierung zu verminderter Wachstumsrate führt und sich so ein neuer steady-state mit verminderter Zelldichte einstellt, bei der die Glukoselimitierung nicht mehr gegeben wäre.

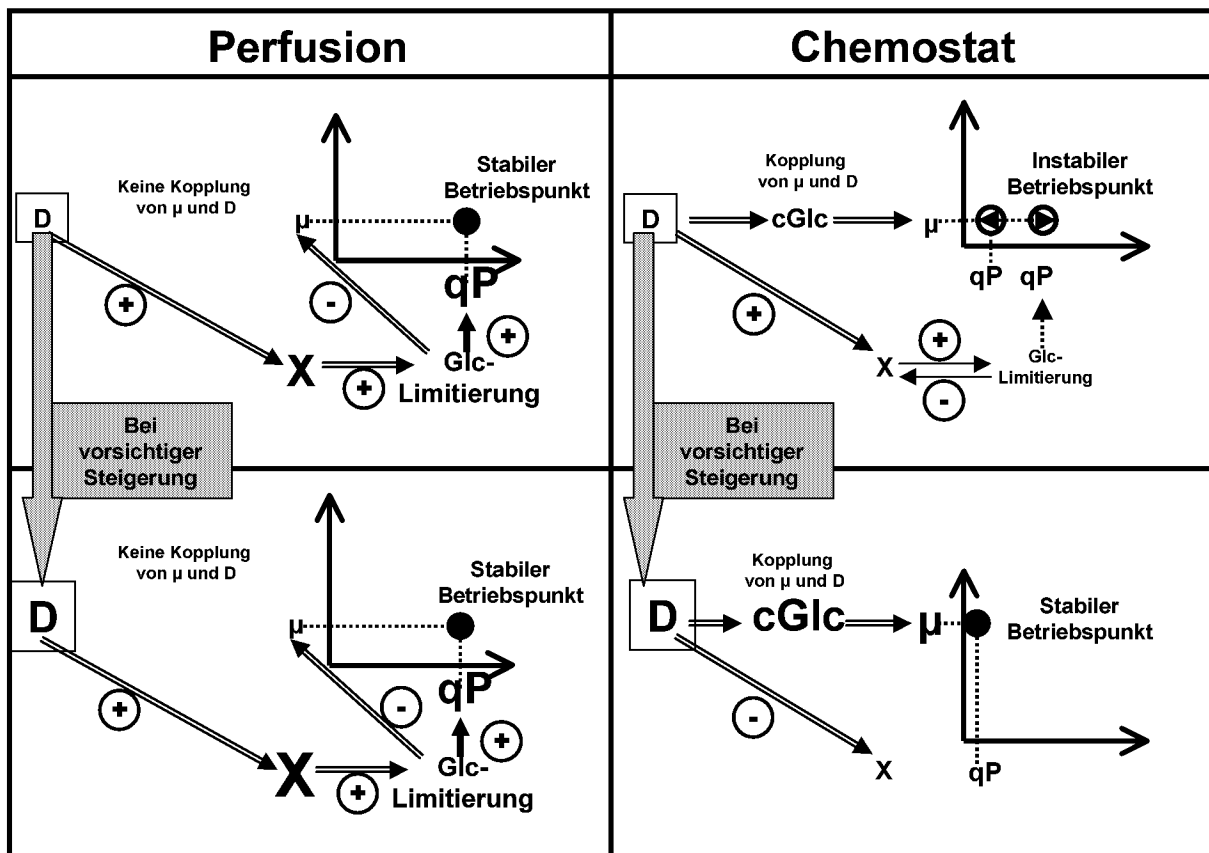


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Einflusses der prozesskinetischen Eigenschaften von Perfusionskultur und Chemostat auf den hochproduktiven Stoffwechsel unter Glukoselimitierung.

Die kontinuierliche Perfusionskultur ermöglicht so die Stabilisierung eines metabolisch günstigen Stoffwechselzustandes.

- Ein Verlassen des stabilen Betriebszustandes kann jedoch "nach oben" geschehen, wenn eine zu starke Erhöhung der Glukosekonzentration einen metabolischen re-switch verursacht.
- Ein Verlassen des stabilen Zustandes "nach unten" ist denkbar, wenn durch zu starke Senkung der Glukosekonzentration der Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr ermöglicht ist, was wahrscheinlich zu Apoptose führen würde.

Es muss gelten:
$$X \cdot qGlc_{\text{maintenance}} \leq D \cdot cGlc_{\text{Zufluss}}$$

Für den hier vorliegenden Prozess dürfte theoretisch die maximal mögliche Raum-Zeit Ausbeute (RZA) noch nicht erreicht worden sein. Da, wie zuvor erläutert, der hochproduktive Stoffwechselzustand auch bei erhöhter Durchflussrate D noch etabliert bleiben kann, besteht über eine Erhöhung von D die Möglichkeit der Steigerung der RZA. Zum anderen ist die RZA abhängig von der Zellrückhalterate R (Gleichung 14a). Daher kann auch durch Etablierung einer verbesserten Zellrückhalterate, beispielsweise mittels akustischer Zellrückhaltung, eine weitere Steigerung der RZA erreicht werden. Somit könnte über die Parameter D und R die Gesamtproduktivität des MUC1-IgG2a Prozesses noch weiter erhöht werden. Die hier beschriebenen theoretischen Zusammenhänge sind in **Abbildung 49** graphisch dargestellt.

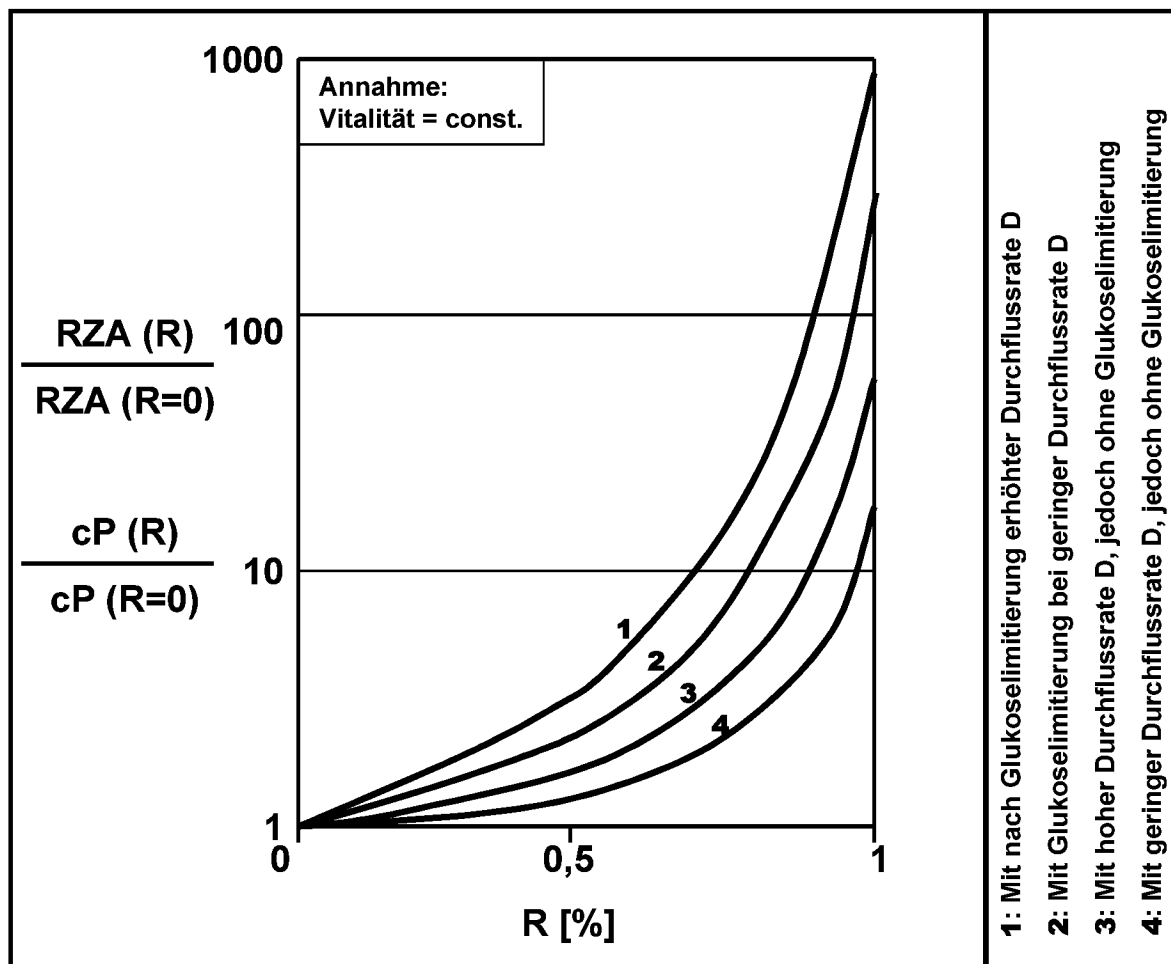


Abbildung 49: Zusammenhang zwischen Zellrückhalterate, Durchflussrate und RZA in Perfusionskultur.

Fazit:

Die kontinuierliche Perfusionskultur beinhaltet ein großes Potential für hochproduktive Prozesse mit Säugerzellkulturen zur Proteinproduktion unter Glukoselimitierung.

6 Übertragung der metabolisch optimierten Verfahrensweise auf eine andere CHO-Zelllinie

Die neu entwickelte Prozessstrategie, welche durch Glukoselimitierung zu einer Steigerung der spezifischen Produktivität führt, konnte erfolgreich im Rahmen der hier vorliegenden Prozessentwicklung zur Herstellung von MUC1-IgG2a angewendet werden. Prinzipiell sollte die Strategie auch auf andere CHO-Zelllinien und möglicherweise auch auf weitere Zelltypen, wie BHK und Hybridoma anwendbar sein. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Verfahrensweise der Glukose limitierten Perfusionskultur mit konstanter Glukosezufütterung unverändert auf eine weitere CHO-Zelle, welche das Fusionsprotein MUC2-GFP-Cterm sekretiert übertragen. Dabei wurden alle Prozessparameter identisch zur in Kapitel 5.1.1 gezeigten Kultur eingestellt.

Tatsächlich konnten im Verlauf der Kultur im Vergleich zur Kultur mit der CHO-MUC1-IgG2a Zelle (vergleiche **Abbildungen 26 + 27 + 29**) identische Veränderungen in Wachstum, sowie Glukose- und Laktatstoffwechsel beobachtet werden (**Abbildung 50**).

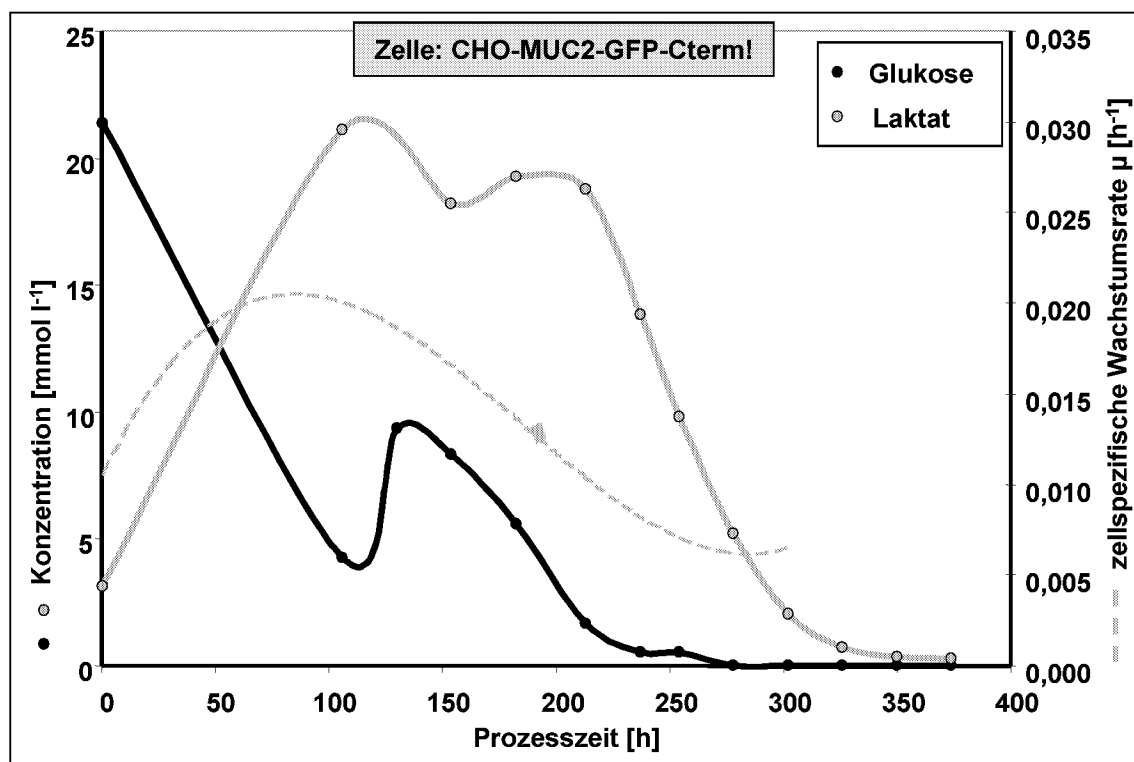


Abbildung 50: Wachstum sowie Glukose- und Laktatstoffwechsel der CHO-MUC2-GFP-Cterm Zelle in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung.

Die Glukosekonzentration ging mit zunehmender vitaler Zellzahl stetig zurück, bis Glukosedepletion vorlag. Nach Eintritt der Glukosedepletion ging die Laktatkonzentration in der Kultur unter $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ zurück und gleichzeitig verminderte sich die spezifische Wachstumsrate (**Abbildung 50**).

Dieser Rückgang ging einher mit einer Abnahme des DGL, also mit zunehmender Glukoselimitierung (**Abbildung 51**). Dadurch konnte erneut eine erhebliche Steigerung der zellspezifischen Produktivität erzielt werden (**Abbildung 51**). Dies führte zu einer um das mehrfache gesteigerten Produktkonzentration an MUC2-GFP-Cterm und, da die Zellzahl kaum rückläufig war, zu einer stark erhöhten Raum-Zeit Ausbeute (Daten nicht gezeigt).

Somit konnte die neu entwickelte Strategie erfolgreich auf eine weitere Zelllinie, welche ein anderes Protein sekretiert übertragen werden. Auch diese Zelle zeigte keine zwingend an das Wachstum gekoppelte Produktivität.

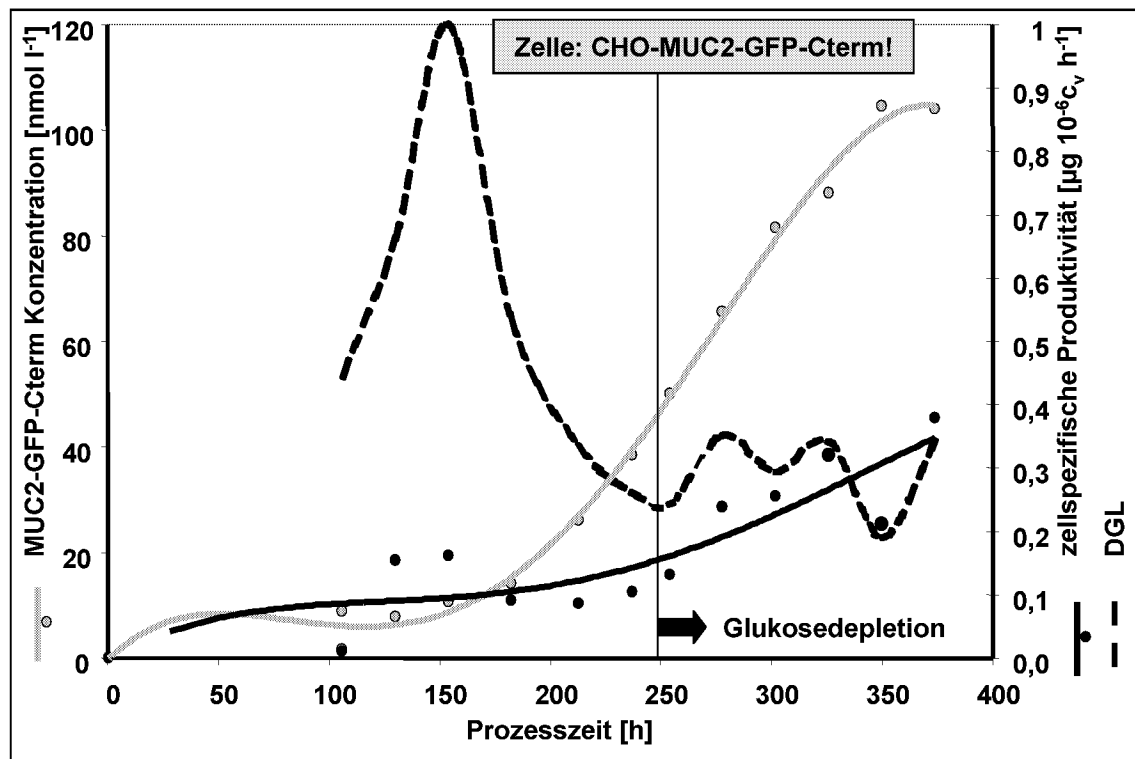


Abbildung 51: Einfluss der Glukoselimitierung auf die spezifische Produktivität der CHO-MUC2-GFP-Cterm Zelle.

Die Strategie führte bei einer weiteren CHO-Zelle allerdings nicht zum Erfolg. Im Fall dieser Zelle konnte die Produktivität unter Glukoselimitierung nicht gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür liegt möglicherweise in einer an das Wachstum gekoppelten Produktbildung. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass diese Zelle subkonfluent transfiziert wurde. Da auch bei dieser CHO-Zelle die Wachstumsrate unter Glukoselimitierung sehr niedrig war, wird so die geringere Produktivität erklärbar.

Die Strategie sollte daher noch einmal gezielt an zwei weiteren Zellen getestet werden, von denen eine an das Wachstum gekoppelt produziert, die andere jedoch nicht an das Wachstum gekoppelt produziert. Denkbar ist auch ein Versuch mit co-transfizierten Zellen, jeweils konfluent transfiziert mit Konstrukt 1 und subkonfluent mit Konstrukt 2 und umgekehrt. Wenn die Konstrukte die cDNA für unterschiedliche Proteine tragen, müsste das Protein aus jeweils konfluenter Transfektion vom Wachstum entkoppelt produziert werden, wenn die Transfektion Einfluss darauf hat.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Strategie breitere Anwendung finden könnte. Die Eignung der Strategie für eine gegebene Produktionszelle muss jedoch im Einzelfall getestet werden. Bei der Generierung der Produktionszellen sind Zellen, welche vom Wachstum entkoppelt produzieren dabei zu bevorzugen. Solche Zellen könnten möglicherweise mittels konfluenter Transfektion erhalten werden.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Dargestellt ist eine Prozessentwicklung zur Herstellung des Fusionsproteins MUC1-IgG2a, woraus rekombinantes MUC1 als potentielles Vaccin gegen Brustkrebs gewonnen werden soll.

In **Teil 1** der Prozessentwicklung wurden wichtige Prozessparameter optimiert und die optimierten Bedingungen auf kontinuierliche Perfusionkultur übertragen. In **Teil 2** der Prozessentwicklung konnte eine neue, hochproduktive Prozessstrategie basierend auf glukoselimitierter Perfusionkultur entwickelt werden. Schließlich gelang es in **Teil 3** der Arbeit mittels prozesskinetischer Untersuchungen und einem ^{13}C -Markierungsexperiment den Stoffwechsel unter Glukoselimitierung teilweise aufzuklären und damit ein neues Modell des unter Glukoselimitierung veränderten Stoffwechsels aufzustellen. Im Rahmen der Prozessentwicklung konnten die Produktkonzentration und die zellspezifische Produktivität erheblich gesteigert werden (**Abbildung 52**).

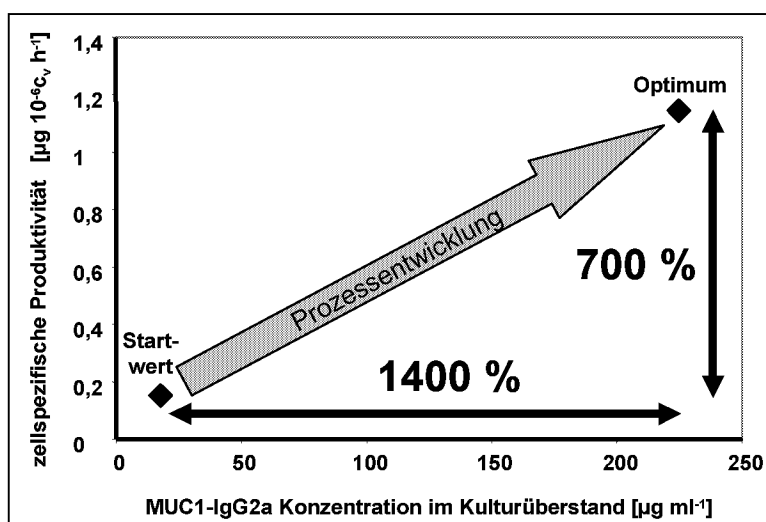


Abbildung 52: Leistungsdaten der durchgeführten Bioprozessentwicklung.

Die wichtigsten Ergebnisse sind im folgenden zusammengefasst:

Teil 1 -- Herkömmliche Prozessentwicklung:

- Ein direkter Transfer der Zellen von adhärenter Kultur in Serum zu proteinfreier Suspensionskultur mit ProCHO4-CDM als Kulturmedium wurde realisiert.
- Die Kultivierungsparameter Temperatur, pO_2 und pH konnten optimiert werden.
- Die zellspezifische Produktivität ist bei 40% pO_2 maximal. Ursache dafür ist ein stark ausgeprägter Pasteur-Effekt, welcher zu erhöhter OUR führt, die Laktat-Gärung inhibiert und so zur gesteigerten Bereitstellung von ATP beiträgt.
- Die spezifische Produktivität ist maximal bei pH 7,2. Das Zellwachstum wird vor allem bei pH 6,8 gefördert.
- Übertragung der optimierten Kulturparameter auf kontinuierliche Perfusionkultur ohne Glukoselimitierung. Dabei konnte eine Hochzelldichte von über 3×10^7 vitalen Zellen ml^{-1} bei einer Vitalität von über 90% erreicht werden. Die maximale Raum-Zeit Ausbeute wurde auf $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gesteigert.
- Dank der hohen Vitalität und kurzen Verweilzeit war dabei die Produktqualität und die Produktreinheit sehr hoch.
- Detailliertere Glykoanalytik zeigte, dass das rekombinante MUC1-IgG2a aus dieser Kultur Krebs-assoziierte Glykosylierung aufwies (core-1 T-Epitope). Daher konnte MUC1-IgG2a aus dieser Charge für *in vivo* Studien in Mäusen genutzt werden.
- Die zellspezifische Produktivität in Perfusionkultur ohne Glukoselimitierung lag jedoch gegenüber einer Batch Kultur um 50% niedriger, was möglicherweise mit dem Auftreten eines ineffizienten Glukose Überschussmetabolismus (Crabtree-Effekt) zusammenhängt.

- Eine Prozessstrategie in kontinuierlicher Perfusionskultur, welche den Crabtree-Effekt vermeidet und die oxidative Phosphorylierung fördert, erschien daher als geeignet, um eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität bei Hochzelldichten, und somit eine weitere Steigerung der Raum-Zeit Ausbeute zu erzielen.
- Versuche zum Glukose-Laktat Metabolismus zeigten, dass die zellspezifische Produktivität zum Ende der Batch Kultur mit auftretender Glukoselimitierung steigt und gleichzeitig die Wachstumsrate μ deutlich absinkt.

Teil 2 – Entwicklung einer metabolisch optimierten Prozessstrategie:

Basierend auf Beobachtungen von erhöhter Produktivität bei Glukoselimitierung in Batch Kulturen wurde eine neue Prozessstrategie entwickelt, die wie folgt beschrieben ist:

- In kontinuierlicher Perfusionskultur mit sehr starker Glukoselimitierung und damit verbunden sehr niedriger Wachstumsrate kommt es zu einer bis zu Faktor 10,5 erhöhten spezifischen Produktivität und 3,5-fach gesteigerten Raum-Zeit Ausbeute ($350 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) an MUC1-IgG2a, im Vergleich zu einer Perfusionskultur mit Glukoseüberschuss. Eine MUC1-IgG2a Konzentration von $223 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ wurde erreicht. Mit dieser Produktausbeute war das Optimum der Prozessentwicklung erreicht.
- Das metabolisch optimierte Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Glukosekonzentration in der Kultur auf einen Wert im Bereich des $K_{m/\text{Glc}}$ gesenkt wird und weiterhin dadurch, dass die Laktatkonzentration in der Kultur bei sehr hohen Zelldichten gegen Null sinkt. Eine signifikante Umstellung des Zellstoffwechsels ist feststellbar.
- Die Glukoselimitierung und die erhöhte spezifische Produktivität hatten keinen Einfluss auf die O-Glykosylierung von MUC1-IgG2a. Somit konnte die Ausbeute an Krebs-assoziiertem MUC1 erheblich gesteigert werden.
- Da sich diese Verfahrensweise weiterhin durch geringe Störanfälligkeit, geringen Regel- und Kostenaufwand, geringe Medienvolumina sowie die Generierung hoher Produktkonzentrationen auszeichnet, ist diese attraktiv für eine industrielle Anwendung.
- Die Strategie der Produktivitätssteigerung unter Glukoselimitierung konnte erfolgreich auf Fed-Batch übertragen werden, was eine Anwendung der Strategie im Großmaßstab ermöglicht. Durch Senkung der Glukosekonzentration mittels online closed-loop Glukose Regelung in Perfusionskultur gelang es hingegen nicht, die spezifische Produktivität zu steigern.

Teil 3 – Der Stoffwechsel unter Glukoselimitierung:

- Je stärker die Glukoselimitierung ist, desto deutlicher wird der Stoffwechsel umgestellt.
- Unter maximaler Produktivität gehen 2% der Glukose in die Glykane des MUC1-IgG2a ein.
- Die Glykolyserate ist niedrig und der Crabtree-Effekt tritt nicht mehr auf.
- Damit verbunden ist die Rate an oxidativer Phosphorylierung stark erhöht, die CO_2 -Bildungsrate jedoch gesenkt. Der Respiratorische Quotient $\ll 1$ deutet auf einen durch Transaminierungen und Lipidabbau geprägten Erhaltungsstoffwechsel hin.
- Die Glukoselimitierung führt außerdem zu einer gesteigerter ATP-Bildung über Glutaminabbau via der Glutamatdehydrogenase.
- Gleichzeitig senkt die Glukoselimitierung die Wachstumsrate, so dass das gebildete ATP nicht zur Bildung von Biomasse, sondern zur Produktbildung genutzt werden kann. Möglicherweise befinden sich die Zellen unter Glukoselimitierung und geringer Wachstumsrate in G_1 -Phase.
- Des weiteren konnte Laktatverbrauch nachgewiesen werden. Dies und der Hinweis darauf, dass ^{13}C aus Laktat möglicherweise in die Ribose von Nukleotiden eingeht, deuten auf Glukoneogenese hin. Wenn es gelingt, verstärkt ^{13}C aus Laktat in die Zelle einzuschleusen, könnte eventuell erstmals Glukoneogenese in CHO-Zellen nachgewiesen werden.
- Aus den Erkenntnissen zum Stoffwechsel unter Glukoselimitierung konnte schließlich ein umfassendes theoretisches Stoffwechselmodell aufgestellt werden.
- Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen für die vorliegende CHO-MUC1-IgG2a Zelle potentielle Möglichkeiten zur weiteren Steigerung der Produktivität auf.

Ferner gelang es, die metabolisch optimierte Prozessstrategie auf eine zweite CHO-Zelllinie zu übertragen, und so auch mit dieser Zelllinie eine Steigerung von spezifischer Produktivität und Raum-Zeit Ausbeute zu erreichen.

8 Ausblick

Folgende experimentellen Ansätze erscheinen als potentiell geeignet, um die Ausbeute an MUC1-IgG2a weiter zu steigern, und sollten daher durchgeführt werden:

- **Optimierung des pO_2 unter Glukoselimitierung.**
Da sich der pO_2 unter Glukoselimitierung als besonders kritisch herausgestellt hat, könnte hierin noch Verbesserungspotential zu liegen.
- **Durchführung der metabolisch optimierten Verfahrensweise unter 2 pH-Phasen.**
In der Anwachsphase pH 6,8 und mit Start der Perfusion oder mit Eintritt der Glukosedepletion pH 7,2.
- **Erhöhung der Durchflussrate in Perfusionskultur mit Glukoselimitierung.**
Es gibt Hinweise darauf, dass eine vorsichtige Erhöhung der Durchflussrate unter Glukoselimitierung zu erhöhten Zellzahlen führen kann, ohne dass der Stoffwechsel und die hohe Produktivität gestört werden.
- **Verminderung des Crabtree-Effekts durch Austausch der beteiligten Enzyme**
durch mikrobielle Enzyme aus Mikroorganismen, welche kaum Crabtree-Effekt aufweisen.
- **Die Supplementierung von Lipiden und Fettsäuren.**
Der RQ deutet auf Lipid- und Fettsäureabbau hin. Über das Medium zugeführte Lipide und Fettsäuren könnten daher eine verbesserte Energie- und Substratversorgung bringen.
- **Die Supplementierung von Glukagon.**
Sollte Glukoneogenese stattfinden, dann könnte diese und damit eventuell auch der optimierte Stoffwechsel über Glukagon angekurbelt werden. Glukagon ist Aktivator wichtiger enzymkatalysierter Glukoneogenesereaktionen.
- **Supplementierung von Fruktose und Galaktose unter Glukoselimitierung.**
So könnte der Kohlehydratfluss in die Zelle erhöht werden, ohne den Crabtree-Effekt zu verursachen.
- **Reproduktion und Optimierung des Glukose limitierten Fed-Batch.**
Da der Fed-Batch die Verfahrensweise darstellt, welche am besten in Großmaßstab übertragbar ist, sollte ein Fed-Batch im 2 Liter Rührkessel mit optimierter Glukose Zufütterung und längerer Prozessdauer durchgeführt werden. Dabei sollte auch die Produktqualität und Glykosylierung detaillierter untersucht werden.

Folgende experimentellen Ansätze erscheinen weiterhin als potentiell geeignet, um vor allem Erkenntnisse über den Stoffwechsel unter Glukoselimitierung zu liefern:

- **Variation der Glutaminkonzentration in Glukose limitierter Kultur.**
Glukose- und Glutaminstoffwechsel sind eng aneinander gekoppelt und es gibt Hinweise auf positive Auswirkungen von Glutaminlimitierung auf die Produktivität. Möglicherweise ist die Bereitstellung von Glutamin unter Glukoselimitierung aber auch kritisch für die Maximierung der Produktivität.
- **Markierungsexperiment mit vollmarkiertem ^{13}C -Laktat.**
Mit diesem Ansatz ist möglicherweise Glukoneogenese nachweisbar.
- **Markierungsexperiment mit ^{13}C -markierten Fettsäuren.**
Mit diesem Ansatz ist möglicherweise der Abbau von Fettsäuren unter Glukoselimitierung nachweisbar.
- **Zellzyklusanalyse unter Glukoselimitierung.**
Somit kann untersucht werden, wie die Glukoselimitierung den Zellzyklus verändert. Die Analyse kann beispielsweise über den Nachweis des DNA-Gehalts der Zellen erfolgen.
- **Vergleich des Einflusses der Glukoselimitierung auf (sub)konfluent transfizierte Zellen.**
Der Zustand der Zellkultur bei Transfektion könnte Einfluss auf die Kopplung der Produktbildung an das Wachstum haben. Insbesondere ein Versuch mit co-transfizierten Zellen (siehe Kapitel 6) könnte diese Hypothese beweisen.
- **Anwendung des Stoffflussmodells für BHK-Zellen auf die Bilanzierung von Stoffflüssen in der CHO-MUC1-IgG2a Zelle.**
Der Stoffwechsel von BHK und CHO ist ähnlich. Möglicherweise kann mit dem BHK-Modell von W. Paul eine detailliertere Stoffflussanalytik in CHO durchgeführt werden.
- **Die Quantifizierung von Metabolit-Pools mittels MS.**
Dies könnte in Verbindung mit der Untersuchung von Stoffflüssen zu einer weitergehenden Aufklärung des Stoffwechsels unter Glukoselimitierung beitragen.

Anhang

Anhang 1

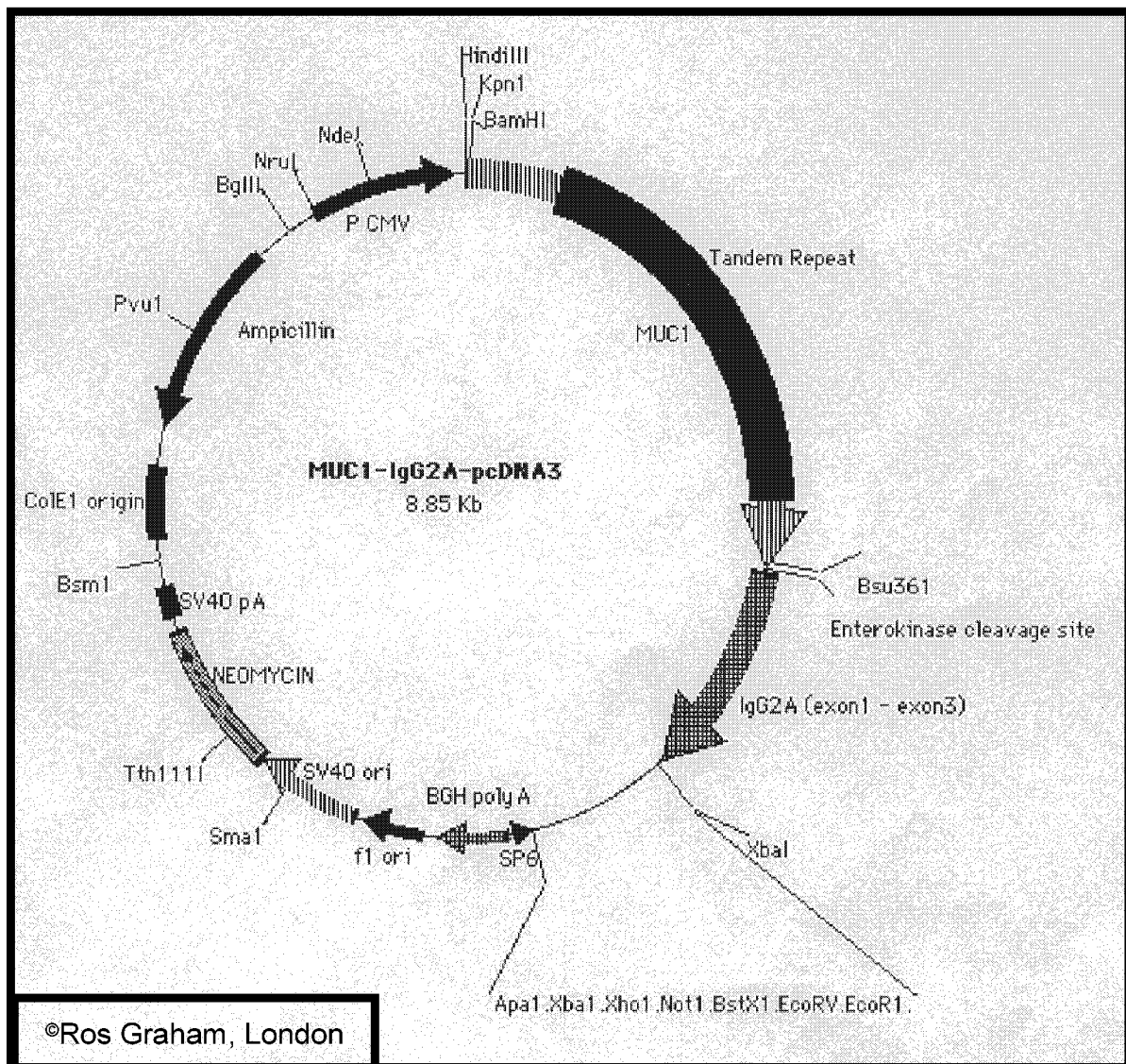


Abbildung 53: Genkarte des MUC1-IgG2a-pcDNA3 Plasmids.

Anhang 2

Prozesseinstellungen und Aufbauhinweise für einen mit LabVIEW geregelten Bioprozess:

Abtastfrequenzen Mainloop:

Setpoint 10s; PID Glc 2s; PID O₂ 2s; Airmix 2s; Treshold pH 5s; Offgas 120s; Trace 10s, SMP's analog IN 5s
SMP analog out 10s; SMP Relais 2s; Simple Dosi 5s; Graphiken 60s; logging-files 30s; calculate 60s

PID für O₂:

Kc=0,5

Ti=6,5 min

Td=0,5 min

pO₂ Sollwert = 40%

Gas flow gesamt = 2 l h⁻¹ (5% CO₂ bis cv in Konti > 1,5 x 10⁶ ml⁻¹; dann 0%)

PID für Glukose:

Konzentrat 70 mmol l⁻¹, kleiner und mittlerer Pumpschlauch und Lüftungsflasche
(Achtung Pumpschlauch für Nachfüllflasche)

Batch Phase:

Trace Messintervall = 10min in Einschwingphase, dann 30min

manuelle Steuerung mit Stellwert=10g h⁻¹ bis Sollwert für die Glukosekonzentration (cGlc) erreicht ist

dann kc=0,5

Ti=0,5 min

Tn=0 min, dabei Sollwert 0,5mmol l⁻¹ kleiner als gewünschte Glukosekonzentration

Kontinuierliche Phase:

Trace Messintervall = 10min in Einschwingphase, dann 30 min

Durchfluß einstellen

Wenn Sollwert cGlc = Istwert (+- 0,5mM):

Kc=5

Ti=11 min

Tn=2 min

Treshold für pH:

NaOH 0,3M; kleiner Schlauch, langsame Pumpeneinstellung (2rpm, 20)

Sollwert pH=7,2 Pumpe Aus

Lower limit = 7,0 Pumpe An

Upper limit = 7,2 Pumpe Aus

Trace Glukose-Messung:

Std. 1 = 0,1g/l oder ca. 0,6mM

Std. 2 = 0,5 g/l oder ca. 2,5mM

Manuelle Sondenkalibration (extern durch Eppendorf Analyser) bei Probenahme von Zellen

Offgas:

Vorab Erstellen einer Kalibriergeraden bei unterschiedlichen Gasmischungen (siehe Servomex Protokoll)!

Anhang 3

Nachweis von Ammonium:

Benötigte Lösungen:

Puffer A:	PBS- Puffer	pH 7,3	
	8,00 g l ⁻¹	NaCl	
	1,15 g l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄	
	0,20 g l ⁻¹	KCl	
	0,20 g l ⁻¹	KH ₂ PO ₄	
Reagenz 1:	α -Ketoglutarat/NADPH- Lösung		
	3,4 mmol l ⁻¹	α -Ketoglutarat	in PBS lösen
	0,23 mmol l ⁻¹	NADPH	
Reagenz 2:	GDH-Lösung (30 U ml ⁻¹)		
	GDH in PBS lösen		
	Ammoniumstandard (2,5 mmol l ⁻¹)		
	33,0 mg Ammoniumsulfat		in 100 ml PBS lösen

Durchführung des Tests:

- Standard mit Puffer A vorverdünnen, so dass unterschiedliche Konzentrationen vorliegen
- Proben mit Puffer A vorverdünnen, so dass die Ammoniumkonzentration idealerweise zwischen 0,5 und 2,5 mmol l⁻¹ liegt
- In alle *wells* einer 96-*well*-Flachboden-Mikrotiterplatte werden je 200 μ l Reagenz 1 vorgelegt und die Extinktion gemessen
- Je 25 μ l PBS (Nullprobe), Ammoniumstandard (0,5 – 2,5 mmol l⁻¹) oder Probe dazu pipettieren und Extinktion messen
- In jedes *well* 50 μ l GDH-Lösung (1,5 U/well) geben und damit die Reaktion starten
- Mikrotiterplatte unter Schütteln bei RT für 5 Minuten inkubieren
- Extinktion nach 5, 10, 15 Minuten Reaktionszeit messen

Anhang 4**Vorgehensweise für die TCE-Fällung:**

- 500 µl Probe werden mit 100 µl 36%iger Trichloressigsäure versetzt und nach gutem Durchmischen für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert.
- Vom Mittelstand werden 250µl abgenommen und mit 12,5 µl 1 mol l⁻¹ NaOH versetzt.
- Die Proben können, je nach Bedarf, mit H₂O bidest verdünnt werden
- 250 – 500 µl verdünnter Probe werden in *vials* abgefüllt, mit einer Bördelkappe verschlossen und bis zur Messung bei –20 °C gelagert.

Anhang 5**Parameter der Aminosäure-HPLC:**

Injektionsvolumen	1 µl
Temperatur	40° C
Detektion	Fluoreszenz
Messwellenlängen	455 nm, 230 nm
Säule	Hypersil RP-18, Länge: 125 mm Innendurchmesser: 4 mm
Durchfluss	0,5 ml min ⁻¹
Laufmittel	0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 7,2
Elutionsmittel	Methanol
Elutionsprofil	Stufengradient

Anhang 6

MUC1-IgG2a spezifischer Immunoblot:

Protokoll ausgehend von einer SDS-PAGE (Kapitel 3) und Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran (Invitrogen LC2002) nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen:

Lösungen:

- Blockierungs- + Waschpuffer:

100 mmol l ⁻¹	Tris/HCl
100 mmol l ⁻¹	NaCl pH 7,4
2,5 mmol l ⁻¹	MgCl ₂
0,5 %	Tween 20
- Blockierungs- + Waschpuffer + Ziege-anti-Maus IgG-AP (Sigma A-5153)
- Sigma APase Puffer = Puffertablette aus Sigma N-2770 + 20 ml⁻¹ RO Wasser
- 10 ml RO Wasser + Entwickler-Tablette Sigma B-5655
- Stopp-Lösung:

PBS + 20 mmol l ⁻¹ EDTA	pH 7,2
------------------------------------	--------

↓

lösen des EDTA durch Zugabe von Lauge

Entwicklung der Membran:

Lösung und Dauer der Inkubation:

- 1 h bei 37°C in Blockierungs- + Waschpuffer
- 1 h bei 37°C in Blockierungs- + Waschpuffer + Ziege-anti-Maus IgG-AP
- 2 x für 2 min. in Blockierungs- + Waschpuffer waschen
- 3 min. in APase Buffer
- APase Buffer + Entwickler-Tablette → bis Banden gut sichtbar sind
- Kurz in H₂O waschen
- 1 min. in Stopp Lösung

Die Membran kann getrocknet aufbewahrt werden.

Anhang 7

MUC1-IgG2a ELISA:

Lösungen:

- Lösung 1 : PBS 10x 80,0 g l⁻¹ NaCl
 11,5 g l⁻¹ Na₂HPO₄
 2,0 g l⁻¹ KCl
 2,0 g l⁻¹ KH₂PO₄
- PBS 1x 10 x PBS Konzentrat mit H₂O bidest verdünnen
- Lösung 2: Blockierungspuffer
 1 % BSA in 1x PBS lösen
- Lösung 3: Waschpuffer
 0,05 % Tween 20 in 1x PBS lösen
- Lösung 4: Beschichtungsantikörper [Sigma M-8642]
 1 mg Ziege-anti-Maus-IgG in 1 ml 135 mmol l⁻¹ NaCl lösen.
 Aliquotieren a 1 ml und bei -20 °C lagern.
 Vor Gebrauch auf 3 µg ml⁻¹ mit H₂O bidest verdünnen.
- Lösung 5: Verdünnungspuffer
 0,1 % BSA in 1x PBS lösen
- Lösung 6: Standard
 570 µg ml⁻¹ MUC1-IgG2a Standard mit Lösung 5 auf 1 µg ml⁻¹ verdünnen
- Lösung 7: Konjugatantikörper [Sigma A-5153]
 Ziege-anti-Maus-IgG-alkaline Phosphatase-Konjugat (AP)
 1:1000 mit Lösung 5 verdünnen
- Lösung 8: Substratpuffer (pNPP-Puffer) [Sigma N-2770]
 1 Tris Puffer Tablette in 20 ml H₂O bidest lösen ,
 darin 1 pNPP-Tablette lösen

Durchführung des ELISA

- Beschichtung der Mikrotiterflachbodenplatte
Je 100 µl Beschichtungsantikörper in jedes *well* der Mikrotiterplatte.
- Platte mit *plate sealer* verschließen und üN bei RT inkubieren
- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA

- Platte leeren, 3 x mit je 200 µl Waschpuffer pro *well* waschen (*ELISA-Washer*).
- je 200 µl Blockierungspuffer in jedes *well* einfüllen, abdecken und bei 37°C
- 2 h inkubieren. Nach Ablauf der Zeit Platte erneut waschen (*ELISA-Washer*) und anschließend trockenklappen.
- Beschichtete Platte im ELISA-Reader bei 405 nm auslesen, um zu überprüfen, ob sich gleichmäßig tiefe Extinktionswerte zeigen.
- Standards und Proben mit Verdünnungspuffer vorverdünnen
- Je 100 µl Verdünnungspuffer in alle *wells* der Reihen B bis H vorlegen.
- In Spaltenköpfe A1 und A2 werden je 200 µl des vorverdünnten Standards gegeben und in A12 200 µl Verdünnungspuffer als Negativkontrolle. In alle übrigen Spaltenköpfe werden je 200 µl der vorverdünnten Proben pipettiert.
- Je 100 µl werden von Reihe A in Reihe B gegeben und dort durch reverses Pipettieren mit dem vorgelegten Verdünnungspuffer gemischt. Dann 100 µl aus Reihe B in Reihe C pipettieren und erneut gut durchmischen. Nach diesem Schema verfährt man mit der gesamten Platte. Aus Reihe H werden je 100 µl entnommen und verworfen.
- Die Platte wird abgedeckt bei 37°C 1 h inkubiert.
- Nach Ablauf der Zeit Platte waschen (*ELISA-Washer*) und trockenklappen. In jedes
- *well* 100 µl frisch hergestellte Konjugatlösung geben. Platte verschließen und bei 37°C 1 h inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit Platte waschen (*ELISA-Washer*) und anschließend mit H₂O bidest nachwaschen und trockenklappen.
- In jedes *well* werden je 100 µl frisch hergestellte Substrat-Puffer-Lösung pipettiert.
- Extinktion der *wells* im *ELISA-Reader* bei 405 nm auslesen. Nach 15 und 30 Minuten erneut auslesen bis eine Extinktion in der Standardspalte von 0,7 – 0,8 erreicht ist.

Anhang 8

Fluoreszenz basierte Quantifizierung von MUC2-GFP-Cterm:

Materialien:

- EGFP-Standard aus E.coli (410 nmol l^{-1})
- Medium, in dem kultiviert wurde
- Zellfreie Proben des Kulturüberstandes

Durchführung des Tests:

- Der Standard und die Proben werden mit Medium vorverdünnt
- In je zwei *wells* (Doppelbestimmung) werden je $200 \text{ }\mu\text{l}$ der vorverdünnten Proben, des Standards oder des Mediums (Blindwert) gegeben
- Die Platte wird mit Licht der Wellenlänge von 485 nm angeregt.
Nach einer Sekunde wird die Platte bei 535 nm ausgelesen.

Anhang 9

¹³C-NMR Probenvorbereitung aus Kulturüberstand:

- Zentrifugation bei 200 x g für 8 Minuten, 4°C in 1 x mit PBS
- In 1x PBS resuspendieren und Zentrifugation wiederholen (= waschen)
- 2. Zentrifugation, Überstand verwerfen
- Mit 0,5% NaCl-Lösung waschen
- 3. Zentrifugation, Überstand verwerfen
- Zähflüssiges Pellet in Glas-Petrischale geben und mit Parafilm abdecken
- Lagerung bei -80°C
- Mit Gesamtzellzahl und Durchmesser der Zellen (CASY) das Gesamtvolumen berechnen
- Lyophilisation für 24 h (Enddruck 0,024 bar, Endtemperatur -107°C).

Saure Zellhydrolyse:

- Lösen von 200 mg Biotrockenmasse in 33ml 13,6% HCl
- 5 min Ultraschallbad zum Homogenisieren
- 30 min Begasen mit N₂
- Hydrolysieren für 12 h bei 110 °C
- Einfrieren des Hydrolysats auf -80°C
- Erneute Lyophilisation
- 362 mg Lyophilisat + 1,5 ml D₂O
- Filtrieren mit 0,2 µm
- Einfrieren bis zur NMR Messung auf -20°C

Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller
Abgasanalytik Xentra	Servomex, Hamm
Aminosäure HPLC, Amino Quant 1090 AX	Hewlett Packard, Waldborn
Autoklav	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Begasungsbrutschrank	Hereus Instruments, Hanau
Cellferm-pro [®]	DASGIP AG, Jülich
Dosierregler YFC 02Z	Satorius, Göttingen
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nalgene, Wiesbaden
ELISA-Washer Titertek	ICN Flow Biochemicals, Meckenheim
Fluorometer, Wallac Victor ²	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbad
Gelelektrophoresekoammer	Invitrogen, Karlsruhe
Gewebekulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Glukoseanalysator, Ebio compact	Eppendorf, Hamburg
Glutamin/Glutamat Analysator, YSI 2700 select	Yellow Springs Instruments, Bergisch Gladbach
Inversmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Laktat Analysator, YSI 1500L	Yellow Springs Instruments, Bergisch Gladbach
LabVIEW Prozessleitsoftware	National Instruments, München
Luftfilter	Gelman Sciences, Dreieich
Massendurchflussventile (O ₂ , CO ₂ , Luft, N ₂)	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Mediensterilfilter	Sartorius, Göttingen
Mikrotiterplatten (Rundboden)	Nunc, Wiesbaden
Neibauer-Zählkammer, Hämozytometer	Trace biotech, AG, Braunschweig
Online Glucose Analyser Process Trace	Brand, Wertheim
Osmometer, Osmomat O 30	Gonotec GmbH, Berlin
Partikelzählgerät, CASY1	Schärfe Sytem, Reutlingen
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Jena
pH-Einstabmesskette	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
Peristaltikpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Pumpenschläuche, Marprene	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage, RO-80/Milli-Q	Millipore, Eschborn
Rührkessel	Applikon Biotek, Knüllwald
Silikonschläuche	BIW, Wuppertal
Zellkulturgefäße	Greiner, Frickenhausen

Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	SIGMA, Dreisenhofen
L-Alanin	Serva, Heidelberg
Antikörper	SIGMA, Dreisenhofen
L-Asparagin-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Gibco BRL, Eggenstein
CasyClean	Schärfe Sytem, Reutlingen
Casyton	Schärfe Sytem, Reutlingen
Coomassie Blue G250	Serva, Heidelberg
D-Glukose	SIGMA, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco BRL, Eggenstein Wildbad
Erytrosin B	Serva, Heidelberg
Ethanol	Werner Hofman, Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Fmoc	Hewlett Packard, Waldbronn
G418-Sulphat	Gibco BRL, Eggenstein
Glukose	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hypoxanthin	Serva, Heidelberg
IMDM	Gibco BRL, Eggenstein
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	SIGMA, Dreisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbenzoat	SIGMA, Dreisenhofen
Natriumchlorid	Biochrom, Berlin
Natriumhydrogencarbonat	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NADPH	Merck, Darmstadt
Na-L-Laktat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP	Sigma, Deisenhofen
NuPAGE Zubehör	Invitrogen, Karlsruhe
OPA	Hewlett Packard, Waldbronn
L-Phenylalanin	Serva, Heidelberg
pNPP	Sigma, Steinheim
ProCHO4-CDM	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Serin	Merck, Darmstadt
Thymidin	Fluka, Buchs, Schweiz
Trishydroxymethylaminoethan	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypan	SIGMA, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Literatur

- [1] Gendler, S.J., *MUC1, the renaissance molecule*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2001. 6(3): p. 339-353.
- [2] MCGuckin, M., J. Golder, and I. McKenzie, *MUC1 (CD227)*. 2000.
- [3] Hanisch, F.G. and S. Muller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*. Glycobiology, 2000. 10(5): p. 439-449.
- [4] Hudson, M.J., et al., *Human MUC1 mucin: a potent glandular morphogen*. J Pathol, 2001. 194(3): p. 373-383.
- [5] Bon, G.G., et al., *Quantification of MUC1 in breast cancer patients. A method comparison study*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999. 83(1): p. 67-75.
- [6] Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and cancer*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1455(2-3): p. 301-313.
- [7] Altschuler, Y., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state*. Mol Biol Cell, 2000. 11(3): p. 819-831.
- [8] Hanisch, F.G., et al., *MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation*. Eur J Biochem, 1996. 236(1): p. 318-327.
- [9] Muller, S., et al., *High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells*. J Biol Chem, 1999. 274(26): p. 18165-18172.
- [10] Dalziel, M., et al., *The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1*. J Biol Chem, 2001. 276(14): p. 11007-11015.
- [11] Spencer, D.I., et al., *Effect of glycosylation of a synthetic MUC1 mucin-core-related peptide on recognition by anti-mucin antibodies*. Cancer Lett, 1996. 100(1-2): p. 11-15.
- [12] Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and the immunobiology of cancer*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2002. 7(2): p. 209-221.
- [13] Mukherjee, P., et al., *Mucin 1-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer*. J Immunother, 2003. 26(1): p. 47-62.
- [14] Amara, R.R., et al., *Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine*. Science, 2001. 292(5514): p. 69-74.
- [15] Fleury, B., et al., *Memory cytotoxic T lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-negative volunteers immunized with a recombinant canarypox expressing gp 160 of HIV-1 and boosted with a recombinant gp160*. J Infect Dis, 1996. 174(4): p. 734-738.
- [16] Gottesman, M., *Chinese Hamster Ovary Cells*. Methods in Enzymology, 1987. 151 p. 3-8.
- [17] Weikert, S., et al., *Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins*. Nature Biotechnology, 1999. 17(11): p. 1116-1121.
- [18] Chu, L. and D.K. Robinson, *Industrial choices for protein production by large-scale cell culture*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. 12(2): p. 180-187.
- [19] Andersen, D.C. and L. Krummen, *Recombinant protein expression for therapeutic applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(2): p. 117-123.
- [20] Dove, A., *Uncorking the biomanufacturing bottleneck*. Nature Biotechnology, 2002. 20(8): p. 777-779.
- [21] Dechema, F.B.d. and A. Zellkulturtechnologie, *Handlungsbedarf in industrieller Zellkultur*, in *Transkript*. 2001.
- [22] Hauser, H. and R. Wagner, *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*. 1 ed. 1997, Berlin: de Gruyter.
- [23] Doverskog, M., et al., *Physiology of cultured animal cells*. J Biotechnol, 1997. 59(1-2): p. 103-115.

- [24] Fussenegger, M., et al., *Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells*. Nat Biotechnol, 1998. 16(5): p. 468-472.
- [25] Sanfeliu, A., J.D. Chung, and G. Stephanopoulos, *Effect of insulin stimulation on the proliferation and death of Chinese hamster ovary cells*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 70(4): p. 421-427.
- [26] Ramirez, O.T. and R. Mutharasan, *Cell Cycle-Dependent and Growth Phase-Dependent Variations in Size Distribution, Antibody Productivity, and Oxygen-Demand in Hybridoma Cultures*. Biotechnology and Bioengineering, 1990. 36(8): p. 839-848.
- [27] Kaufmann, H., et al., *Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. 63(5): p. 573-582.
- [28] Godia, F. and J.J. Cairo, *Metabolic engineering of animal cells*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2002. 24(5): p. 289-298.
- [29] Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S.M. Ardawi, *The Role of High-Rates of Glycolysis and Glutamine Utilization in Rapidly Dividing Cells*. Bioscience Reports, 1985. 5(5): p. 393-400.
- [30] Newsholme, E.A., R.A.J. Challiss, and B. Crabtree, *Substrate Cycles - Their Role in Improving Sensitivity in Metabolic Control*. Trends in Biochemical Sciences, 1984. 9(6): p. 277-280.
- [31] Crabtree, B. and E.A. Newsholme, *Substrate Cycles - Reply*. Trends in Biochemical Sciences, 1985. 10(10): p. 387
- [32] Crabtree, B. and E.A. Newsholme, *A Quantitative Approach to Metabolic Control*. Current Topics in Cellular Regulation, 1985. 25(p. 21-76.
- [33] Schneider, F., *Die aerobe Glykolyse der Tumorzelle*. Naturwissenschaften, 1981. 68(p. 20-27.
- [34] Cruz, H.J., et al., *Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells*. Enzyme Microb Technol, 2000. 27(1-2): p. 43-52.
- [35] Hassell, T., S. Gleave, and M. Butler, *Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia*. Appl Biochem Biotechnol, 1991. 30(1): p. 29-41.
- [36] Lao, M.S. and D. Toth, *Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese hamster ovary cell culture*. Biotechnol Prog, 1997. 13(5): p. 688-691.
- [37] Ozturk, S.S., M.R. Riley, and B.O. Palsson, *Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody-Production*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. 39(4): p. 418-431.
- [38] Werner, R.G., et al., *Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals*. Arzneimittelforschung, 1998. 48(8): p. 870-880.
- [39] Werner, R.G. and H. Langlouis-Gau, *Meeting the regulatory requirements for pharmaceutical production of recombinant DNA derived products*. Arzneimittelforschung, 1989. 39(1): p. 108-111.
- [40] Sliwowski, M.B. and E.T. Cox, *Assay requirements for cell culture process development*. Bioprocess Technol, 1990. 10(p. 179-206.
- [41] Baker, K.N., et al., *Rapid monitoring of recombinant protein products: a comparison of current technologies*. Trends in Biotechnology, 2002. 20(4): p. 149-156.
- [42] Harms, P., Y. Kostov, and G. Rao, *Bioprocess monitoring*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(2): p. 124-127.
- [43] Werner, R.G., *Innovative and economic potential of mammalian cell culture*. Arzneimittelforschung, 1998. 48(4): p. 423-426.
- [44] Werner, R.G. and W. Noe, *Mammalian cell cultures. Part II: Genetic engineering, protein glycosylation, fermentation and process control*. Arzneimittelforschung, 1993. 43(11): p. 1242-1249.
- [45] Petersen, S., et al., *In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of Corynebacterium glutamicum*. J Biol Chem, 2000. 275(46): p. 35932-35941.
- [46] Hu, W.S., W.C. Zhou, and L.F. Europa, *Controlling mammalian cell metabolism in bioreactors*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998. 8(1): p. 8-13.

-
- [47] Konstantinov, K.B., *Advantages and disadvantages of glucose limitation in perfused mammalian cell cultures*. Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century, ed. B. EC. 1995: Kluwer Academic Publishers. 567-573.
 - [48] Gramer, M.J. and C.F. Goochee, *Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant*. Biotechnol Prog, 1993. 9(4): p. 366-373.
 - [49] Werner, R.G. and W. Berthold, *Purification of proteins produced by biotechnological process*. Arzneimittelforschung, 1988. 38(3): p. 422-428.
 - [50] Moller, H., et al., *NMR-based determination of the binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer-selective monoclonal antibody SM3*. European Journal of Biochemistry, 2002. 269(5): p. 1444-1455.
 - [51] Norum, L.F., et al., *Carcinoma-associated MUC1 detected by immunoradiometric assays*. Tumour Biol, 1998. 19 Suppl 1(p. 134-46.
 - [52] Burchell, J. and J. Taylorpapadimitriou, *Effect of Modification of Carbohydrate Side-Chains on the Reactivity of Antibodies with Core-Protein Epitopes of the Muc1 Gene-Product*. Epithelial Cell Biology, 1993. 2(4): p. 155-162.
 - [53] Sadick, M., *Understanding the puzzle of 'well-characterized biotechnology products'*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(3): p. 275-278.
 - [54] Gawlitzek, M., U. Valley, and R. Wagner, *Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells*. Biotechnol Bioeng, 1998. 57(5): p. 518-528.
 - [55] Hu, W.S. and J.G. Aunins, *Large-scale mammalian cell culture*. Curr Opin Biotechnol, 1997. 8(2): p. 148-153.
 - [56] Hesse, F. and R. Wagner, *Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures*. Trends in Biotechnology, 2000. 18(4): p. 173-180.
 - [57] Wu, J.Y., *Mechanisms of Animal-Cell Damage Associated with Gas-Bubbles and Cell Protection by Medium Additives*. Journal of Biotechnology, 1995. 43(2): p. 81-94.
 - [58] Lee, G.M., et al., *Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design*. J Biotechnol, 1999. 69(2-3): p. 85-93.
 - [59] Tsao, M. and e. al., eds. *Maintenance of high viability during direct transition of CHO-K1 cell growth from 10% to 0% serum: No adaptation required*. Animal cell technology. Products from cells . cells as product., ed. A. Bernard. 1999, Kluwer Academic Publishers. 103-106.
 - [60] Kurano, N., et al., *Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. 2. Effects of medium components and waste products*. J Biotechnol, 1990. 15(1-2): p. 113-128.
 - [61] Glacken, M.W., *Catabolic Control of Mammalian-Cell Culture*. Bio-Technology, 1988. 6(9): p. 1041ff.
 - [62] Christie, A. and M. Butler, *The adaptation of BHK cells to a non-ammoniogenic glutamate-based culture medium*. Biotechnol Bioeng, 1999. 64(3): p. 298-309.
 - [63] deZengotita, V.M., et al., *Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. 78(7): p. 741-752.
 - [64] Kim, E.J., N.S. Kim, and G.M. Lee, *Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase- deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. 35(4): p. 178-182.
 - [65] Narkewicz, M.R., et al., *Evidence for intracellular partitioning of serine and glycine metabolism in Chinese hamster ovary cells*. Biochem J, 1996. 313(Pt 3): p. 991-996.
 - [66] Ravid, K., P. Diamant, and Y. Avi-Dor, *Regulation of the salvage pathway of purine nucleotide synthesis by the oxidation state of NAD⁺ in rat heart cells*. Arch Biochem Biophys, 1984. 229(2): p. 632-639.
 - [67] Paul, W., *"Stoffflussanalytik in rekombinanten BHK-21 Zellen"*, IBT2. 2003, Forschungszentrum Juelich GmbH.

- [68] Marz, R., R.M. Wohlhueter, and P.G. Plagemann, *Purine and pyrimidine transport and phosphoribosylation and their interaction in overall uptake by cultured mammalian cells. A re- evaluation.* J Biol Chem, 1979. 254(7): p. 2329-2338.
- [69] Redzic, Z.B., et al., *The characteristics of nucleobase transport and metabolism by the perfused sheep choroid plexus.* Brain Res, 2001. 888(1): p. 66-74.
- [70] Plagemann, P.G., R.M. Wohlhueter, and C. Woffendin, *Nucleoside and nucleobase transport in animal cells.* Biochim Biophys Acta, 1988. 947(3): p. 405-443.
- [71] Jorjani, P. and S.S. Ozturk, *Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines.* Biotechnol Bioeng, 1999. 64(3): p. 349-356.
- [72] Ducommun, P., et al., *Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process.* Biotechnol Bioeng, 2002. 77(7): p. 838-842.
- [73] Miller, W.M., C.R. Wilke, and H.W. Blanch, *Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture.* J Cell Physiol, 1987. 132(3): p. 524-530.
- [74] Zupke, C., A.J. Sinskey, and G. Stephanopoulos, *Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas.* Appl Microbiol Biotechnol, 1995. 44(1-2): p. 27-36.
- [75] Kunkel, J.P., et al., *Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors.* Biotechnol Prog, 2000. 16(3): p. 462-470.
- [76] Miller, W.M., C.R. Wilke, and H.W. Blanch, *Transient Responses of Hybridoma Metabolism to Changes in the Oxygen-Supply Rate in Continuous Culture.* Bioprocess Engineering, 1988. 3(3): p. 103-111.
- [77] Vriezen, N. and J.P. van Dijken, *Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture.* Biotechnol Bioeng, 1998. 59(1): p. 28-39.
- [78] Kurano, N., et al., *Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments.* J Biotechnol, 1990. 15(1-2): p. 101-111.
- [79] Schoenherr, I., T. Stapp, and T. Ryll, *A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up.* Biotechnol Prog, 2000. 16(5): p. 815-821.
- [80] Zhou, W., et al., *Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding.* Cytotechnology, 1997. 24(2): p. 99-108.
- [81] Zhou, W.C., J. Rehm, and W.S. Hu, *High Viable Cell Concentration Fed-Batch Cultures of Hybridoma Cells through Online Nutrient Feeding.* Biotechnology and Bioengineering, 1995. 46(6): p. 579-587.
- [82] Zeng, A.P., W.S. Hu, and W.D. Deckwer, *Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures.* Biotechnol Prog, 1998. 14(3): p. 434-441.
- [83] Ducommun, P., et al., *A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures.* Journal of Biotechnology, 2000. 78(2): p. 139-147.
- [84] Barnabé, N. and M. Butler, *The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma.* Cytotechnology, 2000. 34 (1/2):47-57.
- [85] Ainscow, E.K. and M.D. Brand, *Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes.* European Journal of Biochemistry, 1999. 263(3): p. 671-685.
- [86] Seagroves, T.N., et al., *Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells.* Molecular and Cellular Biology, 2001. 21(10): p. 3436-3444.
- [87] Ruffieux, P.A., U. von Stockar, and I.W. Marison, *Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO(2)) oxygen uptake rates in animal cell cultures.* Journal of Biotechnology, 1998. 63(2): p. 85-95.
- [88] Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.* Nature, 1998. 394(6692): p. 485-490.
- [89] Donnelly, M. and I.E. Scheffler, *Energy-Metabolism in Respiration-Deficient and Wild-Type Chinese-Hamster Fibroblasts in Culture.* Journal of Cellular Physiology, 1976. 89(1): p. 39-51.
- [90] Miller, W.M., H.W. Blanch, and C.R. Wilke, *Kinetic-Analysis of Hybridoma Growth in Continuous Suspension-Culture.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1986. 192, p. 90ff.

-
- [91] Jenkins, N., R.B. Parekh, and D.C. James, *Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry*. Nat Biotechnol, 1996. 14(8): p. 975-981.
- [92] Zanghi, J.A., et al., *Bicarbonate concentration and osmolality are key determinants in the inhibition of CHO cell polysialylation under elevated pCO(2) or pH*. Biotechnol Bioeng, 1999. 65(2): p. 182-191.
- [93] Konstantinov, K.B., et al., *Control of long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat*. Biotechnol Prog, 1996. 12(1): p. 100-109.
- [94] Zeng, A.P., W.D. Deckwer, and W.S. Hu, *Determinants and rate laws of growth and death of hybridoma cells in continuous culture*. Biotechnol Bioeng, 1998. 57(6): p. 642-654.
- [95] Ryll, T., et al., *Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality*. Biotechnol Bioeng, 2000. 69(4): p. 440-449.
- [96] Hiller, G.W., D.S. Clark, and H.W. Blanch, *Cell Retention-Chemostat Studies of Hybridoma Cells - Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Suspension- Culture on Serum-Free Medium*. Biotechnology and Bioengineering, 1993. 42(2): p. 185-195.
- [97] Werner, R.G., et al., *Safety and economic aspects of continuous mammalian cell culture*. J Biotechnol, 1992. 22(1-2): p. 51-68.
- [98] Yang, M. and M. Butler, *Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level*. Cytotechnology, 2000. 34(1-2): p. 83-99.
- [99] Garber, K., *rFactor VIII deficit questioned*. Nature Biotechnology, 2000. 18(11): p. 1133-1133.
- [100] Altamirano, C., J.J. Cairo, and F. Godia, *Decoupling cell growth and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control*. Biotechnol Bioeng, 2001. 76(4): p. 351-360.
- [101] Dowd, J.E., K.E. Kwok, and J.M. Piret, *Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures*. Biotechnol Bioeng, 2001. 75(2): p. 252-256.
- [102] Cruz, H.J., et al., *Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells*. Journal of Biotechnology, 2002. 96(2): p. 169-183.
- [103] Vogel, J.H., et al., *Controlled shear affinity filtration (CSAF): A new technology for integration of cell separation and protein isolation from mammalian cell cultures*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. 78(7): p. 805-813.
- [104] Woodside, S.M., B.D. Bowen, and J.M. Piret, *Mammalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors*. Cytotechnology, 1998. 28(1-3): p. 163-175.
- [105] Bierau, H., et al., *A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with Hybridomas modified for inhibited apoptotic response*. Journal of Biotechnology, 1998. 62(3): p. 195-207.
- [106] Geserick, C., et al., *Enhanced productivity during controlled proliferation of BHK cells in continuously perfused bioreactors*. Biotechnol Bioeng, 2000. 69(3): p. 266-274.
- [107] Mercille, S., et al., *Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates*. Biotechnol Bioeng, 2000. 67(4): p. 435-450.
- [108] Andersen, D.C. and C.F. Goochee, *The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins*. Curr Opin Biotechnol, 1994. 5(5): p. 546-549.
- [109] Goochee, C.F. and T. Monica, *Environmental effects on protein glycosylation*. Biotechnology (N Y), 1990. 8(5): p. 421-427.
- [110] Spencer, D.I., et al., *Structure/activity studies of the anti-MUC1 monoclonal antibody C595 and synthetic MUC1 mucin-core-related peptides and glycopeptides*. Biospectroscopy, 1999. 5(2): p. 79-91.
- [111] Reitzer, L.J., B.M. Wice, and D. Kennell, *Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is the Major Energy-Source for Cultured Hela-Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1979. 254(8): p. 2669-2676.
- [112] Werner, R.G. and W. Noe, *Mammalian cell cultures. Part I: Characterization, morphology and metabolism*. Arzneimittelforschung, 1993. 43(10): p. 1134-1139.

- [113] Hayter, P.M., et al., *The Effect of the Dilution Rate on Cho Cell Physiology and Recombinant Interferon-Gamma Production in Glucose-Limited Chemostat Culture*. Biotechnology and Bioengineering, 1993. 42(9): p. 1077-1085.
- [114] Cruz, H.J., J.L. Moreira, and M.J. Carrondo, *Metabolic shifts by nutrient manipulation in continuous cultures of BHK cells*. Biotechnol Bioeng, 1999. 66(2): p. 104-113.
- [115] Deer, F. and M. Cunningham, *Development of a fed-batch strategy that utilizes multiple carbon sources to maximize recombinant protein expression in CHO cells*. Animal cell technology: Products from cells, cells as products, ed. B.A.e. al. 1999: Kluwer academic publishers. 151-153.
- [116] Lübben, H. and G. Kretzmer, *Diauxic cell behavior enables detoxification of CHO cell culture medium during fed batch cultivation*. New developments and new applications in animal cell technology, ed. M. et.al. 1998: Kluwer academic publishers. 267-271.
- [117] deZengotita, V.M., et al., *Phosphate feeding improves high-cell-concentration NS0 myeloma culture performance for monoclonal antibody production*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 69(5): p. 566-576.
- [118] Linz, M., et al., *Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures*. Biotechnol Prog, 1997. 13(4): p. 453-463.
- [119] Chen, K., et al., *Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production*. Biotechnol Bioeng, 2001. 72(1): p. 55-61.
- [120] Xie, L.Z., et al., *Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed- batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions*. Biotechnology and Bioengineering, 1997. 56(5): p. 577-582.
- [121] Levering, P.R., J.A.M. Vanheijst, and C.M.G. Sunnen, *Physiology of Myeloma Cells Grown in Glucose-Limited Chemostat Cultures*. Cytotechnology, 1992. 9(1-3): p. 125-130.
- [122] Christopher, C.W., et al., *Catabolic control of the enhanced alanine-preferring system for amino acid transport in glucose-starved hamster cells requires protein synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(4): p. 1878-1881.
- [123] Hu, W. and e. al., *Process for the continuous culture of cells*. 1998: US.
- [124] Kurokawa, H., et al., *Kinetic-Study of Hybridoma Metabolism and Antibody-Production in Continuous-Culture Using Serum-Free Medium*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993. 76(2): p. 128-133.
- [125] Europa, A.F., et al., *Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells*. Biotechnol Bioeng, 2000. 67(1): p. 25-34.
- [126] Follstad, B.D., et al., *Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity*. Biotechnol Bioeng, 1999. 63(6): p. 675-683.
- [127] Cruz, H.J., J.L. Moreira, and M.J. Carrondo, *Metabolically optimised BHK cell fed-batch cultures*. J Biotechnol, 2000. 80(2): p. 109-118.
- [128] Ljunggren, J. and L. Haggstrom, *Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed-Batch Cultures*. Biotechnology and Bioengineering, 1994. 44(7): p. 808-818.
- [129] Ljunggren, J. and L. Haggstrom, *Specific growth rate as a parameter for tracing growth-limiting substances in animal cell cultures*. J Biotechnol, 1995. 42(2): p. 163-175.
- [130] Michiyuki, T. and A. Takami, *Cultivation of mammalian cells*. 1989, Teijin LTD: JP.
- [131] Takkeuchi, *Method and apparatus for controlling cultivation conditions for animal cells*. 1994: JP.
- [132] Takkeuchi, K., *Method and apparatus for controlling cultivation conditions for animal cells*. 1994, Hitachi LTD: EU.
- [133] Graff, S., et al., *Significance of Glycolysis*. Journal of the National Cancer Institute, 1965. 34(4): p. 511ff.
- [134] Schwartz, J.P. and G.S. Johnson, *Metabolic Effects of Glucose Deprivation and of Various Sugars in Normal and Transformed Fibroblast Cell Lines*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1976. 173(1): p. 237-245.
- [135] Zielke, H.R., et al., *Reciprocal Regulation of Glucose and Glutamine Utilization by Cultured Human Diploid Fibroblasts*. Journal of Cellular Physiology, 1978. 95(1): p. 41-48.

-
- [136] Martinelle, K., et al., *Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from ¹H/¹⁵N NMR*. Biotechnol Bioeng, 1998. 60(4): p. 508-517.
 - [137] Frame, K.K. and W.S. Hu, *Kinetic-Study of Hybridoma Cell-Growth in Continuous Culture .2. Behavior of Producers and Comparison to Nonproducers*. Biotechnology and Bioengineering, 1991. 38(9): p. 1020-1028.
 - [138] Frame, K.K. and W.S. Hu, *Kinetic-Study of Hybridoma Cell-Growth in Continuous Culture .1. A Model for Non-producing Cells*. Biotechnology and Bioengineering, 1991. 37(1): p. 55-64.
 - [139] Andersen, D.C., et al., *Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 70(1): p. 25-31.
 - [140] Chung, J.D., A.J. Sinskey, and G. Stephanopoulos, *Growth factor and bcl-2 mediated survival during abortive proliferation of hybridoma cell line*. Biotechnol Bioeng, 1998. 57(2): p. 164-171.
 - [141] Zanghi, J.A., M. Fussenegger, and J.E. Bailey, *Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture*. Biotechnol Bioeng, 1999. 64(1): p. 108-119.
 - [142] Seow, T.K., et al., *Proteomic Investigation of Metabolic Shift in Mammalian Cell Culture*. Biotechnol Prog, 2001. 17(6): p. 1137-1144.
 - [143] Pascoe, D. *Proteomic analysis of metabolic changes in Fed-Batch cultures*. in *Metabolic Engineering*. 2002. Italy.
 - [144] Hu, W. *Genomic Exploration in Cell Culture Engineering*. in *Metabolic Engineering*. 2002. Italy.
 - [145] Podskalny, J.M., et al., *Glucose starvation alters insulin but not IGF-I binding to Chinese hamster ovary (CHO) cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. 140(3): p. 821-826.
 - [146] Hayter, P.M., et al., *Glucose-Limited Chemostat Culture of Chinese-Hamster Ovary Cells Producing Recombinant Human Interferon-Gamma*. Biotechnology and Bioengineering, 1992. 39(3): p. 327-335.
 - [147] Nyberg, G.B., et al., *Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells*. Biotechnol Bioeng, 1999. 62(3): p. 336-347.
 - [148] Cruz, H.J., et al., *Metabolic shifts do not influence the glycosylation patterns of a recombinant fusion protein expressed in BHK cells*. Biotechnol Bioeng, 2000. 69(2): p. 129-139.
 - [149] Wice, B.M., L.J. Reitzer, and D. Kennell, *The continuous growth of vertebrate cells in the absence of sugar*. J Biol Chem, 1981. 256(15): p. 7812-7819.
 - [150] Frahm, B., et al., *Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement*. Journal of Biotechnology, 2002. 99(2): p. 133-148.
 - [151] Karlson, P., *Biochemie*. 14 ed. 1994, Stuttgart: Thieme Verlag.
 - [152] Michal, G., *Biochemical Pathways*. 1 ed. 1999, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
 - [153] Frame, K.K. and W.S. Hu, *Oxygen-Uptake of Mammalian-Cells in Microcarrier Culture - Response to Changes in Glucose-Concentration*. Biotechnology Letters, 1985. 7(3): p. 147-152.
 - [154] Link, T., et al., *Verfahren zur Kultivierung von Zellen zur Produktion von Substanzen*. 2002, Forschungszentrum Jülich GmbH: Deutsche Patentanmeldung Nr. 10255508.p. 7-41.
 - [155] Petch, D. and M. Butler, *Profile of Energy-Metabolism in a Murine Hybridoma - Glucose and Glutamine Utilization*. Journal of Cellular Physiology, 1994. 161(1): p. 71-76.
 - [156] Dellweg, H., *Biotechnologie*. 1987, Weinheim: VCH.
 - [157] Kobayashi, M., et al., *Enhancement Effects of Bsa and Linoleic-Acid on Hybridoma Cell- Growth and Antibody-Production*. Cytotechnology, 1994. 15(1-3): p. 51-56.
 - [158] Butler, M., N. Huzel, and N. Barnabe, *Unsaturated fatty acids enhance cell yields and perturb the energy metabolism of an antibody-secreting hybridoma*. Biochem J, 1997. 322(Pt 2): p. 615-623.

- [159] Miller, W.M., H.W. Blanch, and C.R. Wilke, *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH (Reprinted from Biotechnology and Bioengineering, vol 32, pg 947-965, 1988)*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 67(6): p. 853-871.
- [160] Miller, W.M., C.R. Wilke, and H.W. Blanch, *Transient Responses of Hybridoma Cells to Lactate and Ammonia Pulse and Step Changes in Continuous Culture*. Bioprocess Engineering, 1988. 3(3): p. 113-122.
- [161] Hayter, P.M., N.F. Kirkby, and R.E. Spier, *Relationship between Hybridoma Growth and Monoclonal-Antibody Production*. Enzyme and Microbial Technology, 1992. 14(6): p. 454-461.
- [162] Richieri, R.A., L.S. Williams, and P.C. Chau, *Cell-Cycle Dependency of Monoclonal-Antibody Production in Asynchronous Serum-Free Hybridoma Cultures*. Cytotechnology, 1991. 5(3): p. 243-254.
- [163] Mercille, S. and B. Massie, *Apoptosis-resistant E1B-19K-expressing NS/0 myeloma cells exhibit increased viability and chimeric antibody productivity under perfusion culture conditions*. Biotechnol Bioeng, 1999. 63(5): p. 529-543.
- [164] Dean, D.A., *Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific*. Experimental Cell Research, 1997. 230(2): p. 293-302.
- [165] Eisenkraetzer, D., *Produktion rekombinanter Glycosyltransferasen mit CHO-Zellen*, in IBT2. 1999, FZJ: Juelich.
- [166] Noll, T., et al., *Improved product formation in high density Chinese hamster ovary cell cultures transfected at confluency*. Biotechnology Letters, 2002. 24(11): p. 861-866.
- [167] Stanford-Lee, S. *Effect of culture conditions on growth, productivity and proteome of CHO cells expressing recombinant proteins*. in *Metaboliv Engineering*. 2002. Italy.
- [168] Rohde, J.R. and M.E. Cardenas, *The tor pathway regulates gene expression by linking nutrient sensing to histone acetylation*. Molecular and Cellular Biology, 2003. 23(2): p. 629-635.
- [169] Dennis, P.B., et al., *Mammalian TOR: A homeostatic ATP sensor*. Science, 2001. 294(5544): p. 1102-1105.
- [170] Beck, T. and M.N. Hall, *The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors*. Nature, 1999. 402(6762): p. 689-692.
- [171] Cherlet, M. and A. Marc, *Intracellular pH monitoring as a tool for the study of hybridoma cell behavior in batch and continuous bioreactor cultures*. Biotechnol Prog, 1998. 14(4): p. 626-638.
- [172] Miller, W.M., C.R. Wilke, and H.W. Blanch, *The Transient Responses of Hybridoma Cells to Nutrient Additions in Continuous Culture .2. Glutamine Pulse and Step Changes*. Biotechnology and Bioengineering, 1989. 33(4): p. 487-499.
- [173] Schutz, Y. et al., *Respiratory quotients lower than 0.70 in ketogenic diets*. American Journal of Clinical Nutrition, 1980. 33 (6): p. 1317-1319.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4112
Februar 2004
ISSN 0944-2952