

Forschungszentrum Jülich



Institut für Biotechnologie

***Verfahrenstechnik für die Kultivierung
hämatopoetischer Zellen***

Sebastian Schmidt

Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen

Sebastian Schmidt

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3830
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3830
D82 (Diss., Aachen, RWTH, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

KURZFASSUNG - ABSTRACT

Für die *ex vivo* Expansion hämatopoetischer Zellen, einer Schlüsseltechnologie in der Krebstherapie, wurde im Rahmen der Arbeit ein System von Kultivierungstechniken entwickelt. Der Festbettreaktor ermöglicht die Kultivierung hämatopoetischer Zellen in Kokultur zusammen mit stromalen Zellen und immobilisiert auf porösen Mikroträgern. Dieses System hat eine ausreichende Größe um klinisch relevante Zellzahlen zu generieren. Dazu passend wurde der Miniatur-Schlaufenreaktor entwickelt, der im 1 mL Maßstab mit geringer Zellzahl parallele Experimente erlaubt. Eine stromafreie Kultivierung in Suspension ermöglicht der neu entwickelte Suspensionsreaktor, der kontrollierte Kultivierungen in einem Volumen zwischen 40 und 550 mL ermöglicht. Durch eine integrierte Zellrückhaltung mittels Filtration kann die Kultur auch perfundiert mit Zelldichten von über $1 \cdot 10^7$ c/mL betrieben werden. Für parallele Versuche im kleineren Maßstab wurde auch für die Suspensionskultur ein miniaturisiertes System mit einem Kulturvolumen von 10 mL entwickelt. Für die Optimierung der Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Ein Einfluss der Werkstoffe, die für die Konstruktion der Kultursysteme verwendet wurden, konnte nachgewiesen werden. Die optimale Osmolalität konnte zu 0,31–0,32 Osmol/kg bestimmt werden. Neben den hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden T-Lymphozyten als Beispiel für einen ausdifferenzierten Zelltyp im neuen Suspensionsreaktor effektiv vorkultiviert, um dann in einem 20 L-Rührkessel eine klinisch relevante Zahl von $2,9 \cdot 10^{10}$ Zellen zu generieren. Der neue Suspensionsreaktor konnte darüber hinaus im klinischen Umfeld etabliert und in eine klinische Studie Phase I/II zur Krebstherapie bei Kindern und Jugendlichen eingebracht werden. Die transfundierten Zellen aus dem Suspensionsreaktor wurden von dem behandelten Patienten gut vertragen und lösten keinerlei Abstoßungsreaktionen aus.

In this work a system of culture techniques was developed for the *ex vivo* expansion of hematopoietic cells, which is of major importance in cancer therapy. For stroma dependent cocultivation, the fixed bed reactor and the 1 mL miniaturized loop reactor allow the cultivation for clinical and screening purposes, respectively. Here the cells are immobilized on macroporous carriers. For a suspension culture a reactor was developed that has a working volume between 40 and 550 mL. An integrated filtration allows a continuous cultivation up to densities of $1 \cdot 10^7$ c/mL. Finally, a small scale spinner vessel of 10 mL suspension offers the possibility of a screening in suspended culture. Additionally, some relevant parameters for the cultivation of hematopoietic progenitor cells were investigated. It was shown, that the materials the cultivation systems are made of have an influence on the cultivation, but in technical systems it is too small to be relevant. An optimal osmolality of the culture was found at 0,31–0,32 Osmol/kg. Besides the progenitor cells, T-lymphocytes were cultivated as an example of a more differentiated cell type. After the successful cultivation in the new suspension reactor system, a standard 20 L stirred vessel was used to obtain a clinically relevant final cell number of $2,9 \cdot 10^{10}$ cells. The new suspension systems was used also in a clinical study phase I/II for cancer therapy of children. Cells obtained from the reactor were transfused to a patient, who showed no negative side effects from the therapy.

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XV
Liste der Formelzeichen	XVII
Verzeichnis der Abkürzungen und Warenzeichen	XXI
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit	1
2 Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Die Expansion hämatopoetischer Zellen als verfahrenstechnisches Problem .	3
2.2 Das hämatopoetische System	4
2.3 Gewinnung hämatopoetischer Zellen	10
2.4 Anwendungsmöglichkeiten	12
2.5 Kultivierungstechniken	15
2.6 Verfahrenstechnische Grundlagen	25
3 Material und Methoden	35
3.1 Medien	35
3.2 Zytokine	36
3.3 Zellen und Zellaufreinigung	37
3.4 Kultivierungsmethoden	41
3.5 Analytische Methoden	42
3.6 Werkstoffe und die Untersuchung ihres Einflusses	47
3.7 Verfahrenstechnische Methoden	48
4 Grundlegende Voruntersuchungen	53
4.1 Werkstoffeinflüsse	53
4.2 Der Einfluss der Osmolalität	58
4.3 Fütterungsstrategie	60
4.4 Untersuchungen des Scherkräfteinflusses	65
4.5 Schlussfolgerungen aus den Voruntersuchungen	70
5 Konstruktion der Kultursysteme	73
5.1 Immobilisierte Systeme	73
5.2 Suspensionssysteme	80
6 Verfahrenstechnische Charakterisierung	87
6.1 Immobilisierte Systeme	87
6.2 Suspensionssysteme	96
6.3 Ein verfahrenstechnischer Vergleich verschiedener Kultursysteme	98

7 Etablierung der Kultursysteme	101
7.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor	101
7.2 Der miniaturisierte Spinner	107
8 Kultivierung primärer Zellen	111
8.1 Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen	111
8.2 Kultivierung ausdifferenzierter Zellen am Beispiel der T-Lymphozyten . . .	132
9 NK-92 - Ein Beispiel für eine klinische Anwendung	141
9.1 Die Optimierung der NK-92 Kultur	142
9.2 Konstruktive Veränderungen	147
9.3 Kultivierungen im klinischen Umfeld	148
9.4 Klinische Anwendung	149
10 Schlussfolgerungen	151
10.1 Weniger erfolgreiche Konzepte	151
10.2 Die Kultivierungsstrategie für hämatopoetische Zellen	154
11 Ausblick	155
11.1 Konstruktive Weiterentwicklungen und Scale-Up	155
11.2 Verfahrensoptimierung	157
11.3 Klinische Anwendungen	158
11.4 Schlussgedanken	158
12 Zusammenfassung	161
Literaturverzeichnis	163
A Die Modellierung des hämatopoetischen Systems	185
B Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Geräte	187
C Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	193
D Protokolle der verwendeten Methoden	195
E Source-Code des Programms für die automatische Bildanalyse	199
F Konstruktionszeichnungen der Kultursysteme	201
F.1 Immobilisierte Systeme	201
F.2 Suspensionssysteme	205
G Die Herleitung der Sauerstoffbilanz-Gleichung für den Festbettreaktor	211
H Studienprotokoll der klinischen Studie bei Kindern und Jugendlichen	213
I Studienprotokoll der klinischen Studie bei erwachsenen Patienten	227
J Standardarbeitsanweisung für den Betrieb des Suspensions-Bioreaktors	241

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Die Struktur der vorliegenden Arbeit	2
2.1	Die Kultivierung von hämatopoetischen Zellen in der Verfahrenstechnik . .	3
2.2	Das Zusammenwirken von hämatopoetischen Zellen und Stroma	4
2.3	Das hämatopoetische System	5
2.4	Die detektierbaren Zellen der myeloiden Reihe	7
2.5	Die beiden prinzipiellen Möglichkeiten einer Teilung der Stammzelle	9
2.6	Aufarbeitung hämatopoetischer Zellen in Subpopulationen	12
2.7	Transplantations-Strategien nach einer Hochdosis-Chemotherapie	14
2.8	Prinzipielle Vorgehensweise bei einer Gentherapie (nach [171])	15
2.9	Die Strategie einer adoptiven Immuntherapie (nach [87])	16
2.10	Schematischer Aufbau des AastromReplicell Systems (nach [154] und [197])	19
2.11	Die Verweilzeitsummenfunktionen als Ausgangssignal eines kontinuierlichen Reaktors nach einer Stufenmarkierung	30
2.12	Taylorwirbel in einem Searle-Viskosimeter (nach [196])	33
3.1	Die Antikörperbindung der CD34 ⁺ -Zellen an die MACS-MicroBeads	40
3.2	Das Vorgehen beim Zytotoxizitäts Assay	45
3.3	Die Bestimmung der Mischzeit durch den Farbumschlag eines Indikators . .	48
3.4	Der Aufbau des Versuchsstandes zur Mischzeituntersuchung im Miniatur- Schlaufenreaktor	49
3.5	Die digitale Videoanalyse	50
3.6	Die Umwandlung von Videodateien in Einzelbilder	50
3.7	Der Versuchsaufbau für die Scherkraftuntersuchungen mit dem Rotations- Viskosimeter	52
4.1	Der Einfluss verschiedener Materialien auf stromale Zellen	54
4.2	Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serum- haltiger Kultur	55
4.3	Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serum- freier Kultur	55
4.4	Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serum- freier Kultur ohne direkten Werkstoffkontakt	57
4.5	Der Einfluss von Glas auf hämatopoetische Zellen in serumfreier Kultur ohne direkten Werkstoffkontakt in Abhängigkeit des Verhältnisses der Werkstof- foberfläche zum Medienvolumen	57
4.6	Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von MNZ	59
4.7	Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von CD34 ⁺ -Zellen .	60
4.8	Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von CFC	61
4.9	Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von BFU-E und CFU-G/M	61
4.10	Die Veränderung der Medienosmolalität während der Kultivierung	62
4.11	Die Expansion mononukleärer Zellen bei verschiedenen Fütterungsstrategien	63
4.12	Die CFC-Expansion bei verschiedenen Fütterungsstrategien	64
4.13	Die Expansion der CD34 ⁺ -Zellen bei verschiedenen Fütterungsstrategien . .	64

4.14	Verlauf der Aminosäurekonzentrationen relativ zum Ausgangswert in ungefütterter Kultur	65
4.15	Maximale Aminosäure-Verbrauchsrate in ungefütterter Kultur	66
4.16	Die Messwerte einer beispielhaften Absterbekurve für die Zelllinie KG-1 bei einer Schubspannung von 3,29 Pa und die dazugehörige Anpassung	67
4.17	Die Wachstums- und Absterbekoeffizienten der Zelllinie KG-1 in Abhängigkeit von der Schubspannung	68
4.18	Die Wachstums- und Absterbekoeffizienten der Hybridoma-Zelllinien CRL-8018 und HDP-1 (sowie primärer CD34 ⁺ -Zellen als Vergleich) in Abhängigkeit der Scherkraft	69
5.1	Das Prinzip des Festbettreaktors	74
5.2	Fotografie des Festbettreaktors	75
5.3	Vergleich der Volumina verschiedener Reaktoren	76
5.4	Der Festbettreaktor als Simulation des menschlichen Organismus	76
5.5	Das Prinzip des Miniatur-Schlaufenreaktors	77
5.6	Der Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors mit Zwischenplatte	78
5.7	Fotografie des Aufbaus der Einsätze des Miniatur-Schlaufenreaktors	78
5.8	Fotografie eines Einsatzes des Miniatur-Schlaufenreaktors	79
5.9	Fotografie des Aufbaus des Miniatur-Schlaufenreaktors	79
5.10	Fotografie des Miniatur-Schlaufenreaktors	80
5.11	Das Prinzip der Zellrückhaltung	81
5.12	Verwendete konstruktive Lösungen der Filterdichtung	82
5.13	Der scherarme Magnetührstab	82
5.14	Der Aufbau des Suspensionsreaktors	83
5.15	Schematische Darstellung des Suspensionsreaktor-Systems	84
5.16	Fotografie des Suspensionsreaktors	84
5.17	Vergleich eines kommerziellen Spinners mit dem neuen miniaturisierten Spinner	85
5.18	Das Prinzip des miniaturisierten Spinners	85
5.19	Fotografie des miniaturisierten Spinners	86
6.1	Theoretischer und experimentell ermittelter Sauerstofftransfer im Begasungsgefäß des Festbettreaktors	88
6.2	Zahl der idealen Rührkessel im Modell der Rührkesselkaskade, die zur Modellierung des Verweilzeitverhaltens des Festbettreaktors notwendig sind, in Abhängigkeit vom eingestellten Umlaufverhältnis	89
6.3	Gradientenbildung von stromalen Zellen bei unterschiedlichen Inokulumsmethoden im Festbett (Erläuterung siehe Text)	91
6.4	Gradientenbildung hämatopoetischer Zellen bei unterschiedlichen Inokulumsmethoden im Festbett (Erläuterung siehe Text)	92
6.5	Die $k_l a$ -Werte im Miniatur-Schlaufenreaktor bei verschiedenen Rührerdrehzahlen sowie mit und ohne Einsätzen und Trägern	93
6.6	Beispielhafte Messkurve und Anpassung der Durchmischung des Miniatur-Schlaufenreaktors	95
6.7	Mischzeit-Kennzahl als Funktion der Rührer-Reynoldszahl für verschiedene Konfigurationen des Miniatur-Schlaufenreaktors	96
6.8	$k_l a$ -Wert als Funktion der Rührer-Reynoldszahl für verschiedene Füllstände im Suspensionsreaktor	97

6.9	Verweilzeitsummenfunktion eines idealen Rührkessels und die im Suspensionsreaktor gemessene Funktion	98
6.10	Schematische Darstellung der Strömung im Probenahmestutzen des Suspensionsreaktors	99
6.11	Vergleich der $k_l a$ -Werte von Kultursystemen verschiedener Volumina („P...“ steht für Gewebekulturplatten mit der entsprechenden Anzahl an Vertiefungen, „T...“ für Gewebekulturflaschen mit der entsprechenden Oberfläche in cm^2)	99
7.1	Die Zellrückhalterate der Zelllinie KG-1 bei der Kultivierung und bei maximalem Volumenstrom	101
7.2	Der Verlauf der Zellkonzentration bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1	102
7.3	Der Verlauf der Gesamtzellzahl bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1	103
7.4	Das Reaktorfüllvolumen und die Durchflussrate bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1	103
7.5	Die Zusammensetzung der Gasphase und die Rührerdrehzahl bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1	105
7.6	Ein Vergleich der maximal erreichbaren Zelldichten mit verschiedenen kontrollierten Kultursystemen	106
7.7	Ein Vergleich der maximal erreichbaren realen Zellexpansion in verschiedenen Kultursystemen	107
7.8	Zellexpansion bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 bei verschiedenen Rührerdrehzahlen	108
7.9	Wachstumsrate bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 bei verschiedenen Rührerdrehzahlen	109
7.10	Zellexpansion bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 in statischer und gerührter Kultur	110
8.1	Die Expansion der auf Kollagenträgern immobilisierten hämatopoetischen Zellen im Festbettreaktor	112
8.2	Ein Vergleich der Expansion der immobilisierten MNZ im alten und neuen Festbettreaktor	113
8.3	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines unbewachsenen und eines vollständig besiedelten porösen Kollagenträgers (Trägerdurchmesser: 0,6 mm)	114
8.4	Kokultivierung hämatopoetischer Zellen auf stromalen Zellen, links auf einem Kollagenträger, rechts <i>in vivo</i> im humanen Knochenmark [256]	115
8.5	Die Immobilisierungsrate der Zelllinie KG-1 relativ zu primären Zellen bei verschiedenen Verhältnissen von stromalen zu hämatopoetischen Zellen	116
8.6	Die Expansion der MNZ bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter und statischer Kultur	117
8.7	Die Expansion der CD34^+ -Zellen bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter und statischer Kultur	117
8.8	Die Expansion der koloniebildenden Zellen bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter und statischer Kultur	118
8.9	Die Expansion der Gesamtzellzahl bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen	119
8.10	Die Expansion der CD34^+ -Zellen bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen	119
8.11	Die Expansion der koloniebildenden Zellen bei der Kultivierung von CD34^+ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen	120

8.12	MNZ-Expansion bei verschiedenen Rührerdrehzahlen im Spinner	121
8.13	CFC-Expansion bei verschiedenen Rührerdrehzahlen im Spinner	122
8.14	Kultivierung von CD34 ⁺ -Zellen in statischer und gerührter Kultur	123
8.15	Kultivierung von CD34 ⁺ -Zellen mit und ohne Vorbehandlung des Spinners mit Serum	124
8.16	Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen (1. Experiment)	125
8.17	Anteil der humanen hämatopoetischen CD45 ⁺ -Zellen im Knochenmark und peripheren Blut von NOD/SCID-Mäusen, 6 Wochen nach Transplantation (1. Experiment)	126
8.18	Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen mit dem Zytokin-Standard 3	127
8.19	Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung mit verschiedenen Zytokinkombinationen	127
8.20	Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen (2. Experiment)	128
8.21	Anteil der humanen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark und peri- peren Blut von NOD/SCID-Mäusen, 6 Wochen nach Transplantation (2. Experiment)	129
8.22	Vergleich zwischen Daten dieser Arbeit und Literaturwerten der Zellexpans- sionen verschiedener Subpopulationen nach sieben Tagen Kultivierung . . .	132
8.23	Expansion der MNZ bei der Lymphozyten-Kultivierung	134
8.24	Verlauf des Kulturvolumens bei der Kultivierung von T-Lymphozyten im neuen Suspensionsreaktor und im 20 L-Rührkessel	135
8.25	Anteil der CD3 ⁺ -Zellen während der Kultivierung von T-Lymphozyten . . .	135
8.26	Expansion verschiedener Subpopulationen während der Kultivierung von T- Lymphozyten	136
8.27	Anteil der lysierten Zielzellen im Zytotoxizitäts Assay als Funktion des Ver- hältnisses von Ziel- zu Effektorzelle	137
8.28	Der Verlauf der Glukose-Konzentration bei einer diskontinuierlich gefütter- ten Spinnerkultur von T-Lymphozyten	138
8.29	Der Verlauf der Wachstumsrate bei einer diskontinuierlich gefütterten Spin- nerkultur von T-Lymphozyten	138
8.30	Der Verlauf der Glukose-Konzentration bei der kontinuierlich gefütterten Kultivierung von T-Lymphozyten in kontrollierten Reaktoren	139
8.31	Der Verlauf der Wachstumsrate bei der kontinuierlich gefütterten Kultivie- rung von T-Lymphozyten in kontrollierten Reaktoren	140
9.1	Kultivierung der Zelllinie NK-92 in einer Batch-Kultur mit unsupplemen- tiertem und supplementiertem Medium	142
9.2	Entwicklung der Glukose-, Glutamin-, Asparagin- und Serin-Konzentration während der Batch-Kultivierung der Zelllinie NK-92	143
9.3	Entwicklung der Laktat-Konzentration während der Batch-Kultivierung der Zelllinie NK-92 bei unterschiedlichen Mengen vorgelegten Laktats	144
9.4	Verlauf der IL-2 Konzentration und der Zellkonzentration nach der IL-2 Nachdosierung in der stationären Phase einer Batch-Kultur	145
9.5	Verlauf der Zellkonzentration bei der Kultivierung der Zelllinie NK-92 in perfundierter Kultur	146
9.6	Verlauf der IL-2 Konzentration bei der Kultivierung der Zelllinie NK-92 in perfundierter Kultur	146

9.7	Anteil der lysierten Zielzellen im Zytotoxizitäts Assay als Funktion des Verhältnisses von Ziel- zu Effektorzelle mit kultivierten NK-92 Zellen	147
9.8	Kultivierungen der Zelllinie NK-92 im klinischen Umfeld (Sprünge in den Kurvenverläufen entstehen durch die diskontinuierliche Vergrößerung des Kulturvolumens)	148
9.9	Verlauf der Gesamtzellzahl der Zelllinie NK-92 vor der Transplantation . . .	149
10.1	Vergleich der auf den Mikroträgern immobilisierten Zellzahl der Zelllinie M2-10B4 als Relativwert zum Inokulum	152
10.2	Vergleich der Zellexpansion der Modellzelllinie KG-1 im Spinner und im Schüttelkolben	153
11.1	Mögliche Erhöhung der erreichbaren Zellzahl bei Verwendung einer zusätzlichen Membranbegasung aus Silikonschläuchen	156
11.2	Abschätzung des neuen Filtrationssystems und Vergleich mit dem Spinfilter (Daten aus [16, 57])	157
A.1	Modellvorstellung des hämatopoetischen Systems (nach [298])	186
A.2	Modellvorstellung der Stammzellen (nach [298])	186
E.1	Dialogfenster des Programms, mit Feldern für die Start- und Endnummer der Videobilder und der Schaltfläche zum Starten der Programmroutine . .	199
F.1	Kultivierungsraum des Festbettreaktors (Werkstoff: Glas)	201
F.2	Unterer Flansch des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	201
F.3	Einsatz des Begasungsgefäßes des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMo-Ti 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	202
F.4	Volumenverringerte Elektrodenhalterung des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	203
F.5	Einsatz des Miniatur-Schlaufenreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	204
F.6	Zwischenplatte des Miniatur-Schlaufenreaktors (Werkstoff: Glas)	204
F.7	Zusammenstellungszeichnung des Deckels des kontrollierten Suspensionsreaktors	205
F.8	Deckelplatte des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMo-Ti 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	206
F.9	Reaktorablauf des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: X6 CrNi-MoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)	207
F.10	Zellrückhaltefilter des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: Hastel-loy)	207
F.11	Reaktorgefäß des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: Glas) . . .	208
F.12	Reaktorgefäß des miniaturisierten Spinners (Werkstoff: Glas)	209
F.13	Rührerwelle des miniaturisierten Spinners (Werkstoff: virginales PTFE) . .	209
J.1	Wärmekreislauf und Messtechnik	243
J.2	Schema der Begasung	244
J.3	Medien Zu- und Abläufe	244

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Reife Blutzellen, ihre Aufgabe, Anzahl im Blut und Lebensdauer (nach [2])	6
2.2	Koloniebildende Zellen und die zugehörigen ausdifferenzierten Blutzellen . .	7
2.3	Relevante Oberflächenmoleküle ausgewählter hämatopoetischer Zelltypen . .	7
2.4	Bewertung der Kulturstrategien	16
2.5	Eine Auswahl von Literaturstellen mit stromahaltigen Kulturen	19
2.6	Eine Auswahl von Literaturstellen mit stromafreien Kulturen	20
2.7	Einflüsse verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen (nach [136])	21
3.1	Die Zytokinkombinationen für die Kultivierung CD34 ⁺ -Zellen dieser Arbeit	37
3.2	Zeitgestaffelte Zugabe von Frischmedium zum schonenden Auftauen von CD34 ⁺ -Zellen	41
3.3	Verwendete Messgrenzen bei der Zellzahlbestimmung mit dem CASY1-Partikelzählgerät	42
4.1	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die stromale Zelllinie M2-10B4	53
4.2	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die hämatopoetischen Zellen mit direktem Werkstoffkontakt	54
4.3	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die hämatopoetischen Zellen ohne direkten Werkstoffkontakt in serumfreiem Medium	56
4.4	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Einflusses der Osmolarität	59
4.5	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung der Fütterungsstrategie .	62
4.6	Die untersuchten Schubspannungen und die zugehörigen Taylorzahlen	66
4.7	Die optimalen Bedingungen für die Kultivierung früher hämatopoetischer Zellen	70
6.1	Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung der Gradientenbildung beim Inokulieren des Festbettreaktors	90
7.1	Die Parameter der Kultivierung der Zelllinie KG-1 im Suspensionsreaktor .	102
7.2	Die Parameter der Kultivierung der Zelllinie KG-1 im Spinner	107
8.1	Die wichtigsten Parameter der Kultivierung im Festbettreaktor	111
8.2	Die Parameter des vergleichenden Immobilisierungs-Versuches im Miniatur-Schlaufenreaktor	114
8.3	Die Parameter der Kultivierung von CD34 ⁺ -Zellen im Suspensionsreaktor .	115
8.4	Die Parameter der Kultivierung CD34 ⁺ -Zellen im Suspensionsreaktor mit variiertem Medium	118
8.5	Die Parameter der Kultivierung von CD34 ⁺ -Zellen im Spinner	121
8.6	Die Parameter der Kultivierung von CD34 ⁺ -Zellen des parallelen Systemvergleichs	124
8.7	Die Parameter der Kultivierung von T-Lymphozyten	133

LISTE DER FORMELZEICHEN

Lateinische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
A	Membranfläche	[m ²]
a	volumenbezogene Oberfläche	[m ² /m ³]
c	Zelldichte	[c/m ³]
c_{Stamm}	Stammzelldichte	[c/m ³]
c_T	Zellkonzentration auf den Trägern	[c/m ³]
D	Diffusions-Koeffizienten der Flüssigkeit	[m ² /s]
d	Rührerdurchmesser	[m]
d_a	Schlauchaußendurchmesser	[m]
d_i	Schlauchinnendurchmesser	[m]
E	Anzahl der erythroiden Zellen	[-]
$F(t)$	Verweilzeitsummenfunktion	[-]
G	Anzahl der Granulozyten	[-]
H	Henry-Koeffizient	[Pa m ³ /kg]
K	Stoffdurchgangskoeffizient	[m/s]
k	Absterbekoeffizienten	[1/s]
k'	Koeffizient	[1/s]
k_1	Konstante	[-]
k_2	Konstante	[-]
k_l	flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient	[m/s]
k_m	Stoffübergangskoeffizient der Membran	[m/s]
L	Länge der Schlauchmembran	[m]
M	Mischungsgrad	[-]
\dot{m}	Gesamt-Massenstrom des Sauerstoffs	[kg/s]
N	Anzahl der Rührkessel	[-]
n	Gasmenge	[mol]
n	Rührerdrehzahl	[1/s]
OTR	volumenbezogenen Sauerstoffeintrag	[kg/m ³ s]
P	Permeabilität der Membran	[kg/m Pa s]
p	Selbsterneuerungs-Wahrscheinlichkeit	[-]
p_D	Wasserdampfdruck	[Pa]
p_g	Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase	[Pa]
p_l	Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[Pa]
p_i^*	gemessener Sauerstoffpartialdruck	[% Luftsättigung]
$p_{l,A}$	Partialdruck in der Flüssigkeit am Ausgang der Membran	[Pa]
$p_{l,E}$	Partialdruck in der Flüssigkeit am Eingang der Membran	[Pa]
$p_{O_2,g}$	Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase	[Pa]
p_U	Umgebungsdruck	[Pa]
q_{O_2}	zellspezifische Sauerstoffverbrauch	[kg/c s]
R_{O_2}	molspezifische Gaskonstante für Sauerstoff	[bar L/mol K]
r_i	Radius des inneren Zylinders	[m]
S	Anzahl der Stammzellen	[-]

Symbol	Bedeutung	Einheit
T	Temperatur	[K]
t	Zeit	[s]
t_{50}	Dauer eines halben Medienwechsels	[s]
t_v	Verzögerungszeit	[s]
U	Umlaufverhältnis	[-]
\dot{V}	Volumenstrom	[m ³ /s]
V_g	Gasvolumen	[m ³]
V_l	Flüssigkeitsvolumen	[m ³]
V_R	Reaktorvolumen	[m ³]
V_T	Trägerschüttvolumen	[m ³]
\dot{V}_{um}	Volumenstrom des Medien-Umlaufs	[m ³ /s]
\dot{V}_{zu}	Volumenstrom des Medien-Zulaufs	[m ³ /s]
v	mittleren Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit	[m/s]
x_g	Sauerstoffanteil in der Gasphase	[-]
x_i	Konzentration der Komponente i	[kg/m ³]
x_l	Stoffkonzentration in der Flüssigphase	[kg/m ³]
x_l^*	Stoffkonzentration in der Flüssigkeit an der Phasengrenze	[kg/m ³]
$x_T(t)$	Tracerkonzentration	[kg/m ³]

Griechische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
α_E	Wahrscheinlichkeit der Ausdifferenzierung zu Erythrozyten	[-]
α_G	Wahrscheinlichkeit der Ausdifferenzierung zu Granulozyten	[-]
α_S	Anteil der Stammzellen im Zellzyklus	[-]
$\dot{\gamma}$	Geschwindigkeitsgradienten	[1/s]
δ	Homogenisiergrad	[-]
δ	Membranwandstärke	[m]
δ	Spaltbreite	[m]
η	dynamischen Viskosität	[kg/m s]
θ_δ	Mischzeit	[s]
μ	Wachstumsrate	[1/s]
$\mu_{max}(S,E,G)$	maximale Wachstumsrate der Stammzellen	[1/s]
ν	kinematische Viskosität	[m ² /s]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
τ	mittlere Verweilzeit	[s]
τ	Schubspannung	[Pa]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[1/s]

Dimensionslose Kennzahlen

Symbol	Bedeutung	Definition
$n\theta_\delta$	Mischzeit-Kennzahl	-
Re_R	Rohr-Reynoldszahl	$Re_R = \frac{v d_i}{\nu}$
Re_r	Rührer-Reynoldszahl	$Re_r = \frac{n d^2}{\nu}$
Sc	Schmidtzahl	$Sc = \frac{\nu}{D}$
Sh	Sherwoodzahl	$Sh = \frac{k_i d_i}{D}$
Ta	Taylorzahl	$Ta = \frac{\omega \delta r_i}{\nu} \left(\frac{\delta}{r_i} \right)^{0,5}$

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND WARENZEICHEN

Abkürzungen

ATCC	<u>American Type Culture Collection</u>	G-CSF	<u>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</u>
BFU-E	<u>Burst-Forming Unit-Erythroid</u>	GM-CSF	<u>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</u>
BM	<u>Bonemarrow</u>	GMP	<u>Good Manufacturing Practice</u>
BSA	<u>Bovine Serum Albumin</u>	GVHD	<u>Graft-Versus-Host Disease</u>
CAFC	<u>Cobblestone Area Forming Cells</u>	GVL	<u>Graft-Versus-Leukemia</u>
CB	<u>Cord Blood</u>	hhiQ-Plasma	<u>humanes hitzeinaktiviertes Quarantäne-Plasma</u>
CD	<u>Cluster of Differentiation</u>	HS	<u>Horse Serum</u>
CFC	<u>Colony Forming Cell</u>	IL-1	<u>Interleukin-1</u>
CFU	<u>Colony-Forming Unit</u>	IL-2	<u>Interleukin-2</u>
CFU-Ba	<u>CFU-Basophile Granulozyten</u>	IL-3	<u>Interleukin-3</u>
CFU-E	<u>CFU-Erythroid</u>	IL-6	<u>Interleukin-6</u>
CFU-Eo	<u>CFU-Eosinophile Granulozyten</u>	IMDM	<u>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</u>
CFU-G	<u>CFU-Granulocyte</u>	LAK-Zellen	<u>lymphokinaktivierte Killer-Zellen</u>
CFU-GEMM	<u>CFU-Granulocyte, Erythroid, Megakaryocyte, Macrophage</u>	LTC-IC	<u>Long Term Culture-Initiating Cells</u>
CFU-GM	<u>CFU-Granulocyte, Macrophage</u>	MACS	<u>Magnetic Cell Sorting</u>
CFU-M	<u>CFU-Macrophage</u>	MNZ	<u>mononukleäre Zellen</u>
CFU-Meg	<u>CFU-Megakaryocyte</u>	MRC	<u>Mouse Repopulating Cells</u>
CIP	<u>Clean-In-Place</u>	NK-Zellen	<u>natürliche Killer-Zellen</u>
CMV	<u>Cytomegalovirus</u>	NOD/SCID	<u>Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient</u>
DMSO	<u>Dimethylsulfoxid</u>	NTA	<u>2-Naphthyl-Trifluoraceton</u>
DSMZ	<u>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH</u>	OTR	<u>Oxygen Transfer Rate</u>
DTPA	<u>diethylene-triamin-pentaacetic acid</u>	PB	<u>peripheral Blood</u>
EBV	<u>Epstein-Barr-Virus</u>	PBS	<u>Phosphate-Buffered Saline</u>
ECACC	<u>European Collection of Cell Cultures</u>	PE	<u>Phycoerythrin</u>
ELISA	<u>Enzyme Linked Immunosorbend Assay</u>	PEEK	<u>Polyetheretherketon</u>
EPO	<u>Erythropoietin</u>	PS	<u>Polystyrol</u>
FCS	<u>Fetal Calf Serum</u>	PTFE	<u>Polytetrafluorethylen</u>
FITC	<u>Fluorescein Isothiocyanat</u>	SCF	<u>Stem Cell Factor</u>
FL	<u>FLT-3 Ligand</u>	SIP	<u>Steam-In-Place</u>
		TIL	<u>tumorinfiltrierende Lymphozyten</u>
		TPO	<u>Thrombopoietin</u>

Warenzeichen

Bezeichnung	Inhaber
ACDSee	ACD Systems Ltd., Victoria, British Columbia, Kanada
CASY	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CellGro	Mediatech, Inc., Herndon, VA, USA
Cy-Chrome	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Hastelloy	Haynes International, Inc., Kokomo, IN, USA
MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Marprene	Watson-Marlow Ltd., Falmouth, UK
Milli-Q	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Pentium	Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA
Proleukin	Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA
Replicell	Aastrom Biosciences, Inc., Ann Arbor, MI, USA
Teflon	E. I. du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA
VIA-Probe	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Visual Basic	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Viton	DuPont Dow Elastomers L.L.C., Wilmington, DE, USA

Einleitung

In Deutschland sterben jedes Jahr über 200 000 Menschen an einer Krebserkrankung. Das sind etwa 25 % aller Todesfälle, womit der Krebs nach den Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellt [11]. Neue Therapieformen und gentechnische Verfahren eröffnen in jüngster Zeit große Chancen in der Krebstherapie. Die Vermehrung von blutbildenden, so genannten hämatopoetischen Zellen (vom griechischen *haima* = Blut und *poiesis* = Produktion) außerhalb des menschlichen Körpers spielt hierbei eine Schlüsselrolle. Die Kultivierung dieser Zellen in einem klinischen Maßstab stellt dabei nicht nur eine biologisch-medizinische, sondern auch eine technische Herausforderung dar. Während die technische Entwicklung für die Kultivierung von Mikroorganismen und tierischen Zellkulturen heute als nahezu ausgereift gelten kann, gilt dies für die humane Zellkultur nicht. Daher werden in diesem Bereich der medizinischen Anwendungen die meisten und bedeutendsten Fortschritte bei der Entwicklung von Kultursystemen erwartet (vergleiche auch [302]).

Die zentrale Bedeutung des Blutes für den menschlichen Organismus ist seit jeher bekannt. Schon um die Wende vom 5. zum 4. Jahrhundert vor Christus wurde von den Hippokratikern zum ersten Mal die Viersäftelehre (Humoralpathologie) aufgestellt, in der das Blut zu einem der vier Grundbausteine des Menschen gezählt wird. Diese Lehre hatte bis in das 17. Jahrhundert Gültigkeit. Erst 1628 beschrieb WILLIAM HARVEY in seiner Schrift „De motu cordis et sanguinis in animalibus“ zum ersten Mal den großen Blutkreislauf, und gegen Ende des 19. Jahrhunderts begann man auch die einzelnen Blutzellen und deren Herkunft zu erforschen [56, 202]. Trotzdem dauerte es bis in das Jahr 1990 ehe begonnen wurde, im Rahmen klinischer Anwendungen spezielle Kultursysteme für den Erhalt und die Vermehrung von hämatopoetischen Zellen zu entwickeln. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kultivierungstechniken für tierische Zelllinien bereits im industriellen Maßstab etabliert.

Eine mögliche Erklärung, dass dieses Thema erst seit relativ kurzer Zeit ernsthaft bearbeitet wird, ist auch das fehlende Zusammenwachsen der einzelnen wissenschaftlichen Disziplinen. Eine solche Interdisziplinarität war in der Wissenschaft bisher selten üblich. Bei der Kultivierung hämatopoetischer Zellen gilt dies nicht mehr. Auch für die Lösung der hier auftretenden ingenieurtechnischen Probleme ist es von entscheidender Bedeutung, die Grundlagen, die Anforderungen und die Ziele aller anderen Disziplinen zu verstehen und zu berücksichtigen. Folgerichtig entstand die vorliegende Arbeit in enger Zusammenarbeit mit der Biologie, Chemie und Medizin.

1.1 Zielsetzung und Aufbau der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung, Etablierung und Anwendung neuer Systeme für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen vor dem Hintergrund neuer krebstherapeutischer Methoden. Vor der Entwicklung einer neuen Reaktortechnik steht die Aufgabe, den Einfluss von Kultivierungs-Parametern zu untersuchen, die bisher nicht ausreichend beschrieben worden sind. Damit soll die Grundlage geschaffen werden, die Kultursysteme optimal zu konstruieren und zu betreiben.

Beim heutigen Wissensstand kann über die bevorzugte Kultivierungsstrategie von hämatopoetischen Zellen noch keine Entscheidung getroffen werden. Daher werden sowohl

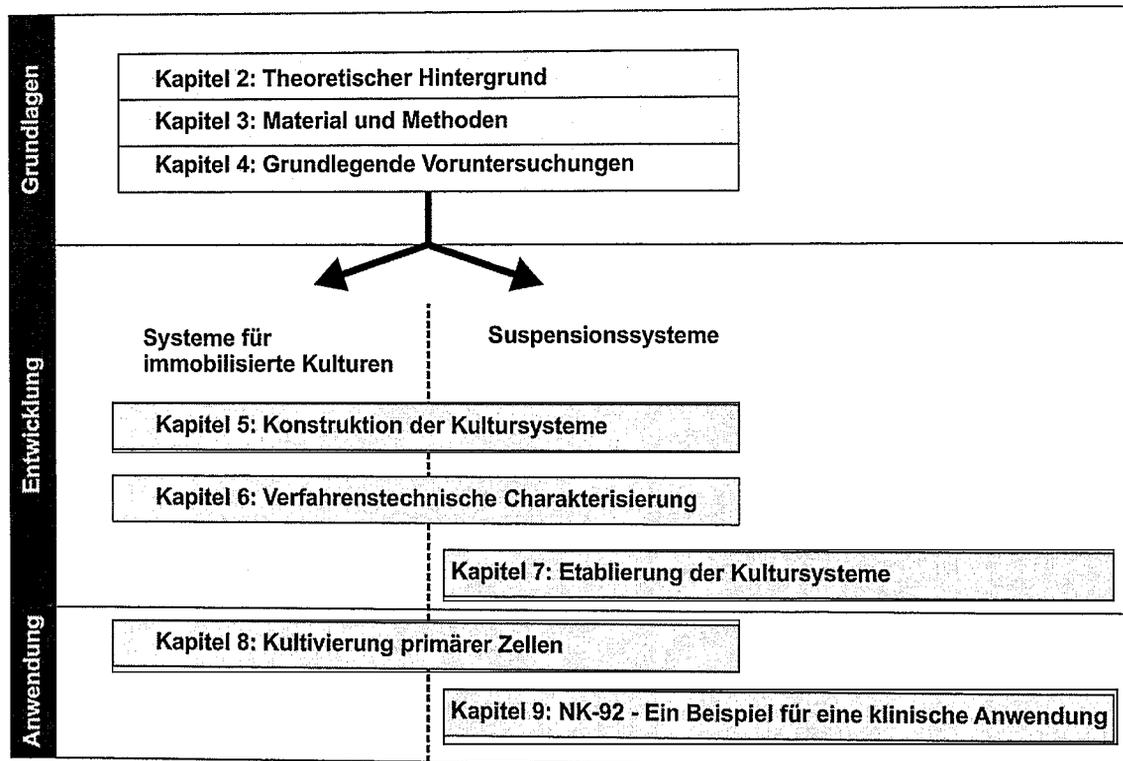


Abbildung 1.1: Die Struktur der vorliegenden Arbeit

Lösungen für eine immobilisierte Kultur, als auch für eine suspendierte Kultur vorgestellt. Darüber hinaus gilt es neben Reaktoren in klinischem Maßstab, auch passende parallelisierbare Kleinsysteme zu entwickeln. Nur mit ihrer Hilfe ist es möglich, durch weitere Forschungsarbeiten die Kultivierungstechnik zu verbessern.

Im Bereich der immobilisierten Kultur basiert diese Arbeit auf Vorarbeiten am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH, an dem aus einer bestehenden Wirbelschicht-Reaktortechnik ein Festbettreaktor für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen entwickelt wurde [172, 243].

Der Aufbau der Arbeit ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Ausgehend von der Darstellung der Grundlagen wird ab Kapitel 5 auf Seite 73 die Entwicklung der immobilisierten und suspendierten Systeme parallel vorgestellt. Eine Etablierung der immobilisierten Systeme ist dank der vorhandenen Vorarbeiten nicht notwendig. Die Ergebnisse der Anwendung der neuen Systeme sind in Kapitel 8 auf Seite 111 dargestellt. Diese Anwendungen sollen keine endgültigen Verfahrensoptimierungen darstellen, sondern die prinzipielle Funktionsfähigkeit demonstrieren. Das abschließende Kapitel 9 auf Seite 141 zeigt dann den Einsatz des Suspensionsreaktors in einer klinischen Anwendung und damit ein konkretes Beispiel einer Prozessoptimierung.

Theoretischer Hintergrund

2.1 Die Expansion hämatopoetischer Zellen als verfahrenstechnisches Problem

In der Verfahrenstechnik beschäftigt man sich mit Entwurf, Planung und Betrieb von Verfahren und Anlagen der Stoffumwandlung. Ein Teilbereich, der immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist die Bioverfahrenstechnik. Hier bedient man sich biologischer Hilfsmittel für die Stoffumwandlung, die entweder durch ganze Mikroorganismen oder Zellen, oder mithilfe von isolierten Enzymen stattfinden kann. Die lebenden Organismen sind in der Lage, sehr viele einzelne Umwandlungsschritte durchzuführen und zu koordinieren. Besonders Säugetierzellen können sehr komplexe, hochmolekulare Stoffe, wie zum Beispiel Antikörper oder glykosylierte Proteine, aus niedermolekularen Nährstoffen generieren. Eine Besonderheit ergibt sich aus der Möglichkeit der Zellen, sich selbst zu replizieren. Die Expansion, das heißt Vermehrung von Zellen, ist eine spezielle Form der Stoffumwandlung von niedermolekularen Stoffen in die Biomasse der Zellen (Abbildung 2.1). Dies gilt auch für die Expansion hämatopoetischer Zellen.

Durch die Fortschritte in der Medizin und Biologie wird die *ex vivo* Expansion (*ex vivo* = außerhalb des Körpers) von immer größerem praktischen Interesse und dadurch zum konkreten technischen Problem. Die Verfahrenstechnik der Kultivierung hämatopoetischer Zellen hat die Aufgabe, eine solche Vermehrung von Zellen im klinischen Maßstab zu realisieren. Die Aufgabenstellung ist besonders komplex, weil hier die Stoffumwandlung von Nährstoffen in Biomasse von vielen entweder stark variierenden oder unbekanntem Faktoren abhängt. Die Variationen erklären sich aus der Tatsache, dass es sich um Primärzellen handelt, also Zellen von individuellen Menschen. Diese sogenannte Spendervariabilität ist nicht nur ein biologisches Problem, sondern auch eine wichtige Randbedingung für die technische Umsetzung. Die unbekanntem Einflussfaktoren beruhen auf dem heute noch mangelhaften Verständnis der Zellen. Viele wichtige Faktoren, wie beispielsweise verschiedene Zytokine

Problemstellung

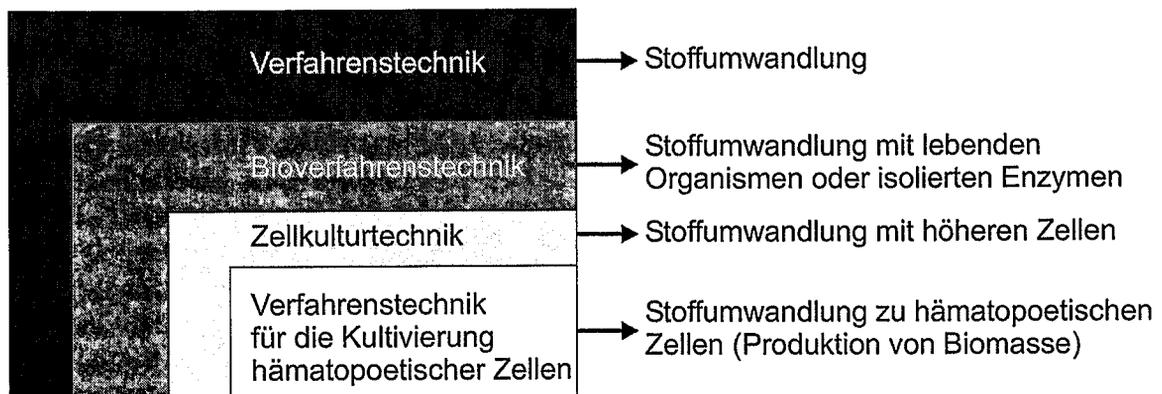


Abbildung 2.1: Die Kultivierung von hämatopoetischen Zellen in der Verfahrenstechnik

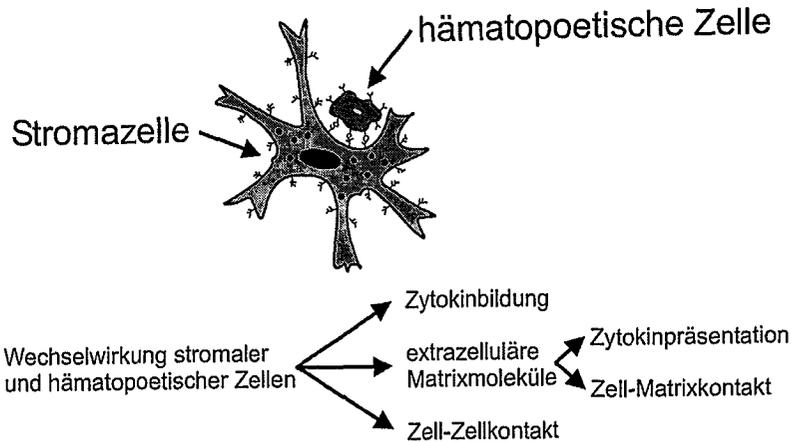


Abbildung 2.2: Das Zusammenwirken von hämatopoetischen Zellen und Stroma

oder der Sauerstoffpartialdruck, sind aber bereits bekannt, und schon jetzt wird deutlich, wie vielschichtig die Vorgänge des Systems der menschlichen Blutbildung sind. Verfahrenstechnische Methoden bieten neben der eigentlichen technischen Umsetzung auch neue Möglichkeiten, die Einflüsse verschiedener Kultivierungsparameter zu untersuchen.

Die konkrete verfahrenstechnische Aufgabe ist ein gleichzeitiger Scale-up und Scale-down. Auf der einen Seite ist es wegen der geringen Zahl an Zellen, die für die Kultivierung zur Verfügung stehen, nicht möglich, auf Standardtechniken, insbesondere der tierischen Zellkultur, zurückzugreifen. Um eine kontrollierte Kultur zu ermöglichen, muss daher auch eine kontrollierte Reaktortechnik in vergleichsweise kleinstem Maßstab entwickelt werden. Auf der anderen Seite stammen die meisten Ergebnisse der Hämatologie aus Laborversuchen im Milliliter-Maßstab. Diese Ergebnisse gilt es auf klinisch relevante Größe zu übertragen. Essenzielle Grundlage jedes anwendungsorientierten Ansatzes ist jedoch das Wissen und Verständnis über die Vorgänge im hämatopoetischen System. Die Kenntnis der biologischen Zusammenhänge ist ein wichtiger Schlüssel für die technische Lösung, weshalb zunächst der biologische Hintergrund der Problemstellung erläutert wird, bevor die technischen Aspekte vorgestellt werden.

2.2 Das hämatopoetische System

2.2.1 Ort der Hämatopoese

Die Hämatopoese, also die Blutbildung, findet im erwachsenen Menschen hauptsächlich im roten Knochenmark statt. Dieses befindet sich in den großen Röhrenknochen, dem Beckenkamm und dem Schädelknochen [283]. Die hämatopoetischen Zellen liegen hier in einem Bindegewebe, das als Stroma (griechisch für Bett) bezeichnet wird. Stroma besteht aus verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Makrophagen und anderen) und extrazellulärer Matrix (einer Mischung aus Faserproteinen, wie Kollagen, Laminin und Fibronectin, und Glykosaminoglykanen) [272, 299, 275]. Die Interaktionen zwischen hämatopoetischen Zellen, stromalen Zellen und Extrazellulär-Matrix sind extrem vielfältig und in Abbildung 2.2 angedeutet (vgl. auch [158] oder [51]). Innerhalb des Knochenmarks findet die komplette Reifung neuer Blutzellen statt, die dann in die Blutbahn übergehen. Eine Ausnahme bilden hier die T-Lymphozyten, die in einem unreiferen Stadium das Knochenmark verlassen und im Thymus heranreifen.

Bei der embryonalen Entwicklung findet die Blutbildung zunächst nicht im Knochen-

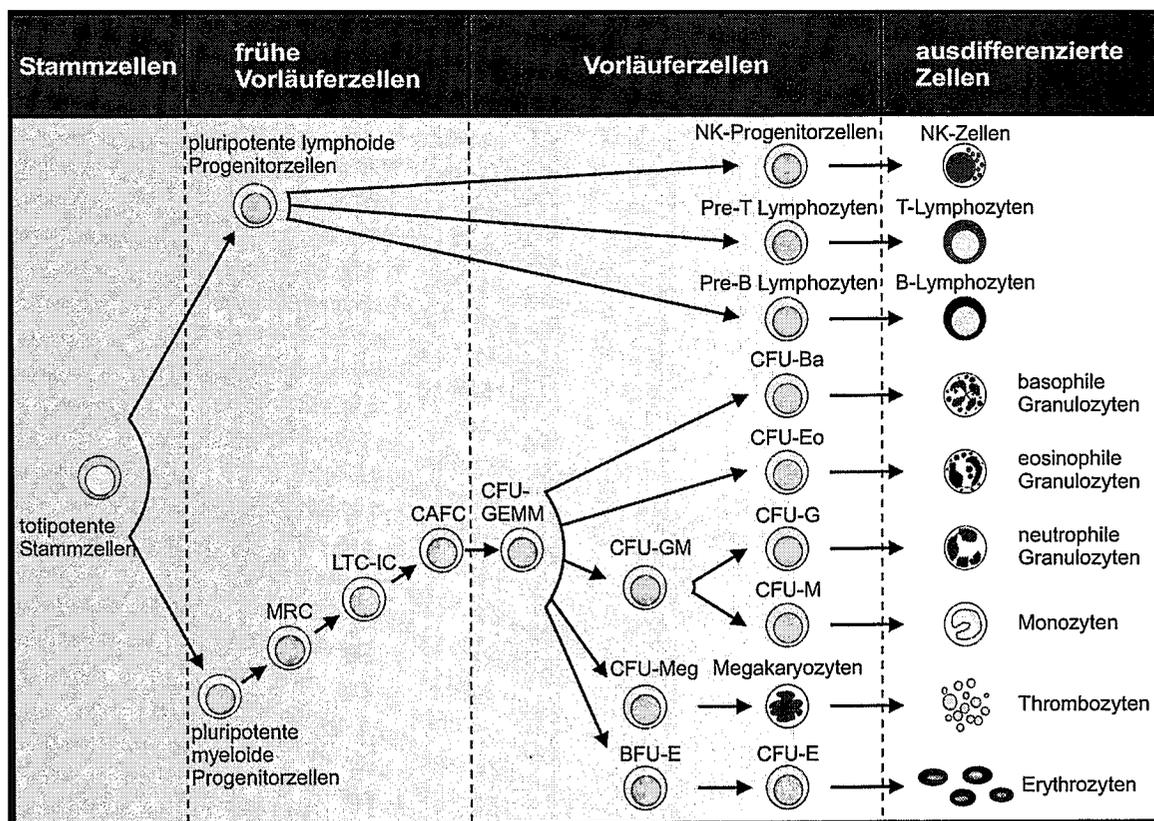


Abbildung 2.3: Das hämatopoetische System

mark, sondern in Leber und Milz statt. Erst während der Embryogenese und nach der Geburt wandern die hämatopoetischen Zellen in das Knochenmark [255].

2.2.2 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Das hämatopoetische System ist trotz intensivster Bemühungen bislang noch nicht vollständig bekannt. Dies liegt einerseits an der hohen Komplexität der Interaktionen der hämatopoetischen Zellen mit sich selbst und mit anderen Zellen des menschlichen Organismus, zum anderen an den immer noch mangelhaften Möglichkeiten, einige Zelltypen des Systems sicher zu identifizieren.

Die heutige Vorstellung ist in vereinfachter Form in Abbildung 2.3 dargestellt. Aus einer relativ kleinen Zahl von Stammzellen gehen alle blutbildenden Zellen und reifen Blutzellen hervor. Die Stammzellen werden daher als totipotent bezeichnet. Prinzipiell unterscheidet man zwei große Richtungen der hämatopoetischen Zellentwicklung, die lymphoide („lymphozytenähnliche“) und die myeloide („knochenmarkähnliche“) Reihe. Durch Proliferation und Ausdifferenzierung der Stammzelle entstehen die sehr frühen Vorläuferzellen, auch frühe Progenitoren genannt, die nicht mehr in alle Zelltypen differenzieren können. Man nennt sie daher pluripotent. Je weiter die Proliferation und Reifung fortschreiten, umso mehr werden die Möglichkeiten, in die verschiedenen Richtungen auszdifferenzieren, eingeschränkt. Ab einer gewissen Stufe sind die Zellen vollständig auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt, zu dem sie endgültig heranreifen. Die Ausdifferenzierung ist ein fließender Prozess. Die Differenzierungs-Stufen, dargestellt in Abbildung 2.3, sind daher weniger als distinkte Stufen der biologischen Vorgänge zu verstehen, sondern vielmehr als Einteilungen, die durch die Möglichkeiten der Analyse der Zellen bedingt sind.

Tabelle 2.1: Reife Blutzellen, ihre Aufgabe, Anzahl im Blut und Lebensdauer (nach [2])

Zelltyp	Hauptfunktion	Konzentration im Blut [c/mL]	Lebensdauer
NK-Zellen	Abtötung von Virus-infizierten Zellen und eigenen Tumorzellen (antigenunabhängige Immunantwort)	$1 \cdot 10^5$	7–500 Tage
T-Lymphozyten	Zellvermittelte Immunität (antigenspezifische Immunantwort)	$1 \cdot 10^6$	7–500 Tage
B-Lymphozyten	Produktion von Antikörpern (antigenspezifische Immunantwort)	$2 \cdot 10^6$	unbekannt
Basophile Granulozyten	Immunabwehr parasitärer Infektionen	$4 \cdot 10^4$	wenige Stunden
Eosinophile Granulozyten	Zerstörung größerer Parasiten und Modulation allergischer Reaktionen	$2 \cdot 10^5$	3–8 Stunden
Neutrophile Granulozyten	Phagozytose und Zerstörung einwandernder Bakterien	$5 \cdot 10^6$	6–9 Stunden
Monozyten	Werden in Geweben zu Makrophagen, die beschädigte Zellen und Bakterien phagozytieren	$4 \cdot 10^5$	3–6 Tage
Thrombozyten	Blutgerinnung	$3 \cdot 10^8$	1 Woche
Erythrozyten	Transport von O ₂	$5 \cdot 10^9$	4 Monate

Die Blutzellen haben im Organismus vielfältige Aufgaben, sind aber in die Kategorien Transport (Erythrozyten), Wundschutz (Thrombozyten) und Abwehr (zum Beispiel Lymphozyten, natürliche Killer (NK)-Zellen, Granulozyten, Makrophagen) einzuteilen (Tabelle 2.1).

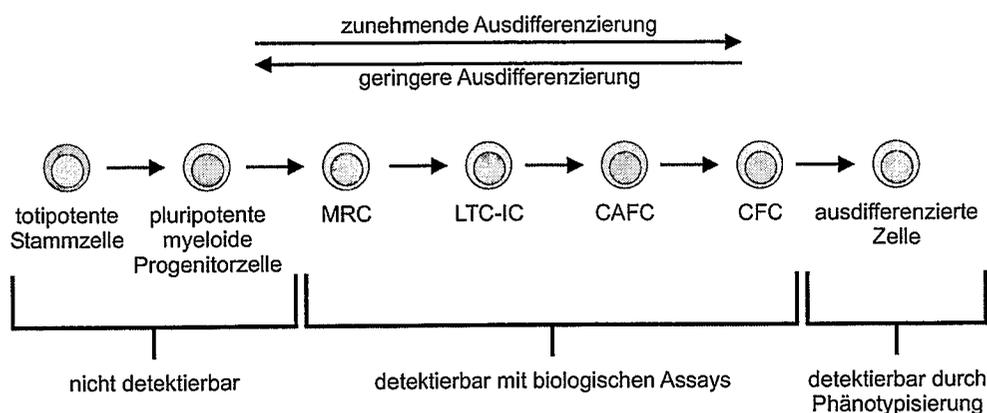
Die reifen Blutzellen lassen sich relativ gut anhand ihres Phänotypus charakterisieren. Vorläuferzellen können phänotypisch nur unzureichend beschrieben werden, weshalb zur eindeutigen Identifizierung biologische Assays notwendig sind. In der myeloiden Reihe unterscheidet man zwischen verschiedenen koloniebildenden Vorläuferzellen, Colony-Forming Cell (CFC) oder Colony-Forming Unit (CFU) genannt, die in Tabelle 2.2 auf der nächsten Seite dargestellt sind. Eine Sonderbezeichnung erhält hier eine Erythrozytenvorläuferzelle, die so genannte Burst-Forming Unit-Erythroid (BFU-E). Noch frühere Zellen sind die Cobblestone Area Forming Cells (CAFC), die Long Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC) und die Mouse Repopulating Cells (MRC). Abbildung 2.4 auf der nächsten Seite zeigt die einzelnen detektierbaren Einteilungen der Ausdifferenzierung. Eine genauere Beschreibung der einzelnen Assays findet sich in Abschnitt 3.5.3 auf Seite 43.

2.2.3 Phänotypisierung der Zellen

Während sich ausgereifte Zellen vielfach schon an ihrem optischen Erscheinungsbild identifizieren lassen, ist dies bei Vorläuferzellen nicht möglich. Eine Analyse der Oberflächmoleküle der Zellen bietet die Möglichkeit, auch Vorläuferzellen zu phänotypisieren. Die meisten Bezeichnungen dieser Moleküle sind international in der Cluster of Differentiation (CD)-Nomenklatur normiert. Es können auf diese Weise jedoch keine Aussagen über die biologische Funktionalität von Zellen gemacht werden, weshalb sich die biologischen

Tabelle 2.2: Koloniebildende Zellen und die zugehörigen ausdifferenzierten Blutzellen

Koloniebildende Vorläuferzelle	Ausdifferenzierte Blutzelle
BFU-E	Erythrozyten
CFU-E	Erythrozyten
CFU-GEMM	Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten
CFU-GM	Granulozyten und Monozyten
CFU-G	Granulozyten
CFU-M	Monozyten
CFU-Meg	Megakaryozyten
CFU-Eo	Eosinophile Granulozyten
CFU-Ba	Basophile Granulozyten

**Abbildung 2.4:** Die detektierbaren Zellen der myeloiden Reihe

Assays nicht ersetzen lassen. An den Oberflächenmolekülen können nur mehr oder weniger große Subpopulationen identifiziert werden. Je weiter eine Zelle ausdifferenziert, um so größer ist die Zahl der bekannten Oberflächenmoleküle. Auf Monozyten sind zum Beispiel weit über 50 Oberflächenmoleküle bekannt (siehe auch [8]).

Das wichtigste Oberflächenmolekül im Rahmen dieser Arbeit ist CD34 [130]. Es befindet sich auf etwa 1 % der hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark [126] und wird als der allgemeine Marker der frühen Vorläuferzellen angesehen. Eine Aufreinigung einer Zellpopulation auf frühe Vorläuferzellen wird deshalb auch anhand des CD34-Oberflächenmoleküls durchgeführt. Eine Liste aller relevanten Oberflächenmoleküle dieser Arbeit ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Relevante Oberflächenmoleküle ausgewählter hämatopoetischer Zelltypen

Zelltyp	Oberflächenmoleküle
Hämatopoetische Vorläuferzellen	CD34, CD45
T-Lymphozyten	CD3, CD4, CD8
B-Lymphozyten	CD19
NK-Zellen	CD16, CD56

2.2.4 Die Definition der Stammzelle

Die hämatopoetische Stammzelle ist bis heute nicht detektierbar. Sie ist vielmehr eine allgemein anerkannte Definition. Da bekannt ist, dass die detektierbaren Vorläuferzellen und die daraus hervorgehenden reifen Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben (siehe Tabelle 2.1 auf Seite 6), die Zahl der reifen Blutzellen aber ein Menschenleben lang durch das hämatopoetische System konstant gehalten wird, muss es eine Quelle für neue Zellen geben. Die Zellen, die diese Quelle darstellen, müssen demnach fähig sein, sich ohne Ausdifferenzierung zu teilen. Zusätzlich müssen sie in der Lage sein, in sämtliche Blutzelltypen auszdifferenzieren. Zellen mit diesen Fähigkeiten, also sich selbst erneuernde totipotente Zellen, sind als Stammzellen definiert [179].

In welcher Weise die Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung der Stammzelle stattfindet, kann nur spekuliert werden (Abbildung 2.5 auf der nächsten Seite). Die eine Möglichkeit ist, dass bei der Teilung der Stammzelle eine Tochterzelle als Stammzelle verbleibt, während die andere Tochterzelle beginnt, auszdifferenzieren. Durch eine solche asymmetrische Teilung bliebe die Population von Stammzellen im Körper zahlenmäßig in jedem Falle konstant. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sich die Stammzelle teilt und beide Tochterzellen zunächst Stammzellen bleiben. Einzelne Stammzellen müssten dann auf einen Stimulus hin beginnen, auszdifferenzieren. Bei dieser symmetrischen Teilung wäre eine Steuerung des Vorganges notwendig, um immer eine ausreichende Zahl von Stammzellen beizubehalten. Welche dieser Möglichkeiten dem Verhalten der Stammzelle entspricht, ist noch nicht nachgewiesen. Es ist bekannt, dass schon 10 000 Stammzellen in der Lage sind in Organismen ein zerstörtes hämatopoetisches System wiederherzustellen [35]. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, dass eine symmetrische Teilung möglich ist. Die Frage hat auch praktische Relevanz. Will man eine *ex vivo* Vermehrung der Stammzellen erreichen, ist es erforderlich, dass den Zellen die symmetrische Teilung offen steht, anderenfalls ist bestenfalls eine Erhaltung der Zahl von Stammzellen realisierbar. Fraglich bleibt auch, ob die Stammzelle nach der obigen Definition überhaupt einen einzelnen Zelltypus darstellt oder vielmehr eine heterogene Gruppe von Zellen. So ist beispielsweise bis heute umstritten, ob die Stammzellen den Oberflächenmarker CD34 tragen oder nicht [14, 69, 188, 187, 238]. Die widersprüchlichen Resultate deuten sehr darauf hin, dass es sowohl CD34-positive, wie negative Stammzellen gibt. Demnach wäre die Stammzellpopulation in jedem Falle heterogen.

2.2.5 Das Potenzial des Systems

Das Vermehrungspotenzial einer sich ausdifferenzierenden Zelle ist enorm. So können aus einzelnen CFC in zwei Wochen über 10 000 ($>2^{13}$) terminal ausdifferenzierte Zellen entstehen [55]. Diese große Vermehrungsfähigkeit ist zwingend notwendig, wenn man die begrenzte Lebensdauer der ausdifferenzierter Zellen berücksichtigt (Tabelle 2.1 auf Seite 6). In einem gesunden Erwachsenen müssen täglich etwa 400 Milliarden ausdifferenzierte Blutzellen ersetzt werden [126]. Im Falle einer Störung des Gleichgewichts, wie zum Beispiel bei einem starken Blutverlust, kann diese Zahl noch beträchtlich steigen. Im Falle der Erythropoese, der Bildung roter Blutkörperchen, kann sich bei Bedarf die Zellproduktion bis zu einem Faktor 30 erhöhen [58].

Es ist ansatzweise möglich, die Leistungen des hämatopoetischen Systems zu charakterisieren. Das Gesamtvolumen des roten Knochenmarks beträgt etwa 1,4 Liter [283], bei einer Dichte der hämatopoetischen Zellen von ca. $3 - 9 \cdot 10^8 \text{ e/mL}$ [58]. Ein Erwachsener verfügt über fast fünf Liter Blut, womit jedem Milliliter Knochenmark etwa 3,5 mL Blut gegenüberstehen. Aus dem täglichen Bedarf von hämatopoetischen Zellen errechnet sich so eine

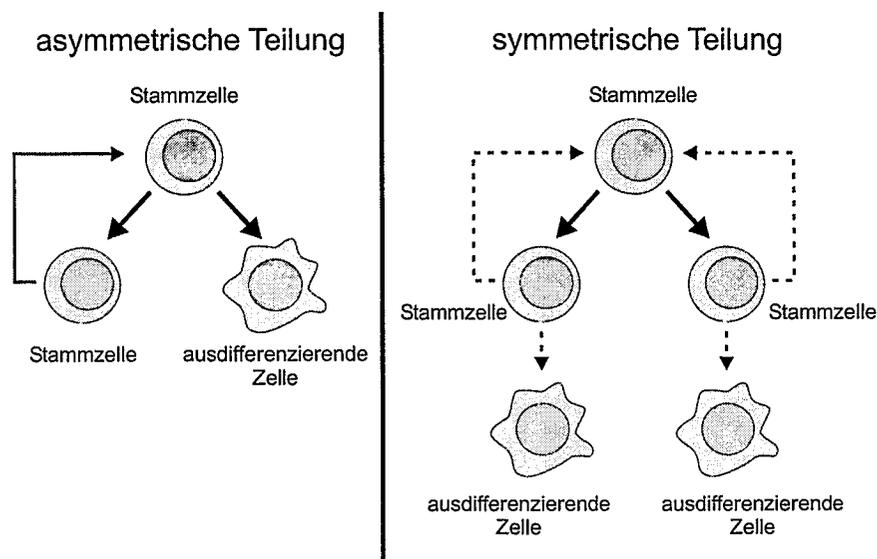


Abbildung 2.5: Die beiden prinzipiellen Möglichkeiten einer Teilung der Stammzelle

Verdoppelungszeit der Gesamtzellzahl im Knochenmark von etwa zwei Tagen. Damit ist das hämatopoetische das am schnellsten proliferierende System des menschlichen Körpers [126].

Man geht weiterhin davon aus, dass nur weniger als 10^6 der hämatopoetischen Knochenmarkszellen zu den Stammzellen gezählt werden können [58] und über 90 % der Stammzellen ruhen, sich also in der G_0 -Phase befinden [126]. Setzt man auch hier eine Verdopplungszeit von zwei Tagen für eine Stammzelle an, ergibt sich, dass sich aus einer einzelnen Stammzelle etwa 10^7 reife Blutzellen entwickeln können. Somit besteht der durchschnittliche Ausdifferenzierungs-Prozess aus zirka 23 Teilungen.

Der Vorgang der Ausdifferenzierung der CFC wurde oben mit nur 13 Teilungen beschrieben. Die Entwicklung von der Stammzelle zur CFC umfasst also ungefähr 10 Teilungen. Die Ausdifferenzierungs-Vorgänge der CFC sind relativ gut untersucht, die von der Stammzelle zur CFC sind dagegen fast unbekannt. Der unbekannte Teil der Differenzierung macht also über 40 % aus, was das Ausmaß der Unwissenheit über das hämatopoetische System verdeutlicht.

2.2.6 Die Regulation des Systems

Neben den in Abbildung 2.2 auf Seite 4 genannten Interaktionen zwischen den hämatopoetischen Zellen und der Extrazellulär-Matrix beziehungsweise den Stromalen Zellen spielen Wachstumsfaktoren, die so genannten Zytokine, eine Schlüsselrolle in der Regulation des hämatopoetischen Systems. Zytokin ist ein relativ weiter Oberbegriff für eine Gruppe von Peptiden. *In vivo* (= im lebenden Organismus) sind sie relativ kurzlebig und können sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkung haben. Sie werden von Stromalen und hämatopoetischen Zellen, aber auch von Zellen ganz anderer Gewebe des Körpers gebildet und sind bereits im piko- oder nanomolaren Bereich wirksam [84]. Die Trennlinie zwischen stimulierenden und inhibierenden Faktoren ist dabei nicht scharf zu ziehen. Viele Zytokine haben sowohl stimulierende als auch inhibierende Eigenschaften. Teilweise hängt dies nicht nur davon ab, welcher Zelltyp angesprochen wird, sondern auch von der Konzentration. Dasselbe Zytokin, das zum Beispiel in geringer Konzentration stimuliert, kann in höheren Konzentrationen inhibierend wirken. Hinzu kommt, dass viele Wachstumsfaktoren ein

synergistisches Zusammenwirken zeigen. Jeder Faktor für sich stimuliert danach wenig, zusammen ergeben sich aber starke Wirkungen auf die Zellen [291]. Beispiele sind die synergistischen Eigenschaften von FLT-3 Ligand (FL) und Stem Cell Factor (SCF) [61] oder die von Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-3 (IL-3) [153]. In Abschnitt 3.2 auf Seite 36 wird noch einmal auf die Zytokine, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, eingegangen.

Soviel heute über einzelne Wirkungen von Einflussfaktoren, wie Zytokinen, Stroma und extrazellulärer Matrix bekannt ist, so wenig kann über das Zusammenspiel dieser Faktoren im System der Hämatopoese gesagt werden. Bis heute gibt es keine umfassenden Untersuchungen, die die (Wechsel-)Wirkungen der verschiedenen Einflüsse als Ganzes betrachten und so ein geschlossenes Bild der Regulation ermöglichen. Daher ist es auch noch nicht gelungen, ein funktionsfähiges mathematisches Modell der Hämatopoese aufzustellen. Die Bemühungen um eine Modellbildung werden in Kapitel A auf Seite 185 genauer betrachtet.

2.3 Gewinnung hämatopoetischer Zellen

2.3.1 Primärmaterial

Ein Grund für das große therapeutische Potenzial der hämatopoetischen Zellen ist die relativ leichte Möglichkeit, primäres, das heißt von einem Spender stammendes, Zellmaterial zu gewinnen. Dadurch ist zum einen die klinische Anwendung erleichtert, insbesondere kann aber auch sichergestellt werden, dass genügend Material für die Forschung und Entwicklung zur Verfügung steht. Prinzipiell gibt es drei Quellen, aus denen Primärmaterial gewonnen werden kann, direkt aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blutkreislauf und aus der Nabelschnur eines neugeborenen Kindes.

2.3.1.1 Knochenmark

Das Knochenmark als Ort der Hämatopoese ist eine offensichtliche Quelle für blutbildende Zellen. Bei der Gewinnung primären Knochenmarks werden zudem nicht nur die hämatopoetischen Zellen, sondern auch das Stroma des Spenders gewonnen. Hierzu wird durch mehrfache Aspiration mit einer Nadel das Knochenmark aus dem Beckenkamm des Spenders entnommen, was unter Vollnarkose stattfindet [163]. Diese Prozedur ist auch der Hauptnachteil der Knochenmarkspende, es gibt nur wenige freiwillige gesunde Spender. Der Vorteil liegt in der großen Zahl an Zellen, die man erhält und darin, dass man neben den hämatopoetischen Zellen auch das Stroma des Spenders gewinnt.

2.3.1.2 Peripheres Blut

Im Blutkreislauf des Menschen befinden sich üblicherweise nur reife Blutzellen. Die Vorläuferzellen und besonders die Stammzellen halten sich im Knochenmark auf. Eine normale Blutspende ist daher nur eine Möglichkeit zur Gewinnung von reifen Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten. Möchte man Stamm- und Vorläuferzellen gewinnen, so müssen diese Zellen vor der Blutentnahme stimuliert werden, vom Knochenmark in den Blutkreislauf zu wandern. Diesen Vorgang nennt man Mobilisierung. Dabei werden dem Spender geringe Dosen von Chemotherapeutika, Wachstumsfaktoren, wie Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) oder Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) oder Mischungen aus beiden verabreicht. Diese Gabe führt dazu, dass Stamm- und Vorläuferzellen für eine gewisse Zeit in den Blutkreislauf übergehen. Die Zellen siedeln sich danach wieder im Knochenmark an. Dieses Phänomen wurde zuerst bei Patienten nach Chemotherapien beobachtet [226] – der genaue Mechanismus konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden [265].

Während dieser mobilisierten Phase können die frühen Zellen mithilfe einer Leukapherese entnommen werden. Bei der Leukapherese wird dem Spender ein Bypass an eine Vene gelegt. Das Blut wird in dem Bypass aufgetrennt in eine Fraktion aus Leukozyten und eine Fraktion aus Erythrozyten und Plasma. Letztere wird zum Spender zurückgeführt. In der Leukozytenfraktion, dem Leukaphereseprodukt, sind dann die frühen Zellen enthalten. Um ausreichende Mengen von Progenitorzellen zu erhalten ($1 - 8 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen pro kg Körpergewicht des Patienten), muss eine Leukapherese durchschnittlich an drei aufeinander folgenden Tagen wiederholt werden [265].

Der operative Eingriff ist wesentlich geringer als bei der Knochenmarksspende, weshalb die Leukapherese bei Patienten meistens die Methode der Wahl ist. Freiwillige Spender gibt es aber auch hier nur wenige.

2.3.1.3 Nabelschnurblut

Die dritte mögliche Quelle von Stamm- und Vorläuferzellen ist das Blut der Nabelschnurvene und der Plazenta bei neugeborenen Kindern. Wie im Abschnitt 2.2.1 auf Seite 4 erwähnt, hat sich die Blutbildung zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig in das Knochenmark verlagert. Daher ist das periphere Blut von Neugeborenen reich an Stamm- und Vorläuferzellen. Eine Tatsache, die zuerst 1974 beschrieben wurde [110]. Nach dem normalen Abklemmen der Nabelschnur bei der Geburt kann durch Punktion der Nabelschnurvene und der Plazenta zwischen 60 und 150 mL kindliches Blut steril entnommen werden [252].

Die Zahl der freiwilligen gesunden Spender ist beim Nabelschnurblut sehr hoch. Da die Nabelschnur nach einer Geburt normalerweise verworfen wird und die Blutentnahme erst zu diesem Zeitpunkt erfolgt, ist keinerlei Eingriff bei Mutter oder Kind notwendig. Die sehr gute Verfügbarkeit dieser Spenden hat dazu geführt, dass große Nabelschnurblutbanken mit weit über 10 000 Spenden aufgebaut werden konnten. Die wesentlichen Nachteile des Nabelschnurblutes sind die geringe Menge an gewonnenen Zellen pro Probe und die Tatsache, dass dieses Blut für den Empfänger immer Fremdmaterial darstellt. Eine Eigenspende, wie sie beim Knochenmark und peripheren Blut möglich ist, ist bei Nabelschnurblut nur sehr schwer zu realisieren.

2.3.2 Aufarbeitung

Nach der Entnahme der Spenderzellen werden diese vor einer weiteren Verwendung meist in einzelne Subpopulationen aufgetrennt (Abbildung 2.6 auf der nächsten Seite). Beim Knochenmark können zuerst die stromalen Zellen abgetrennt werden. Dabei macht man sich die Adhärenz dieser Zellen zunutze. Während die stromalen Zellen nach kurzer Zeit fest an einer Oberfläche haften, können die nicht adhärennten hämatopoetischen Zellen mit Kulturmedium ab gespült werden. Unter den hämatopoetischen Zellen sind nur die Monozyten adhärennt. Durch ein äquivalentes Adhärenzverfahren werden diese auch häufig aus den stromafreien Spenden aus peripherem Blut und der Nabelschnur entfernt. Aus den übrigen hämatopoetischen Zellen können dann die Erythrozyten und Thrombozyten durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation entfernt werden (siehe Abschnitt 3.3.2 auf Seite 39). Übrig bleiben nun nur noch die Zellen mit einem Kern, weshalb diese Fraktion mononukleäre Zellen (MNZ) genannt wird. Eine weitere Aufreinigung in Subpopulationen kann mithilfe der Oberflächenmoleküle erfolgen. Üblich ist die Aufreinigung nach CD34 (siehe Abschnitt 3.3.2.1 auf Seite 39). Diese Fraktion enthält die frühen Vorläuferzellen.

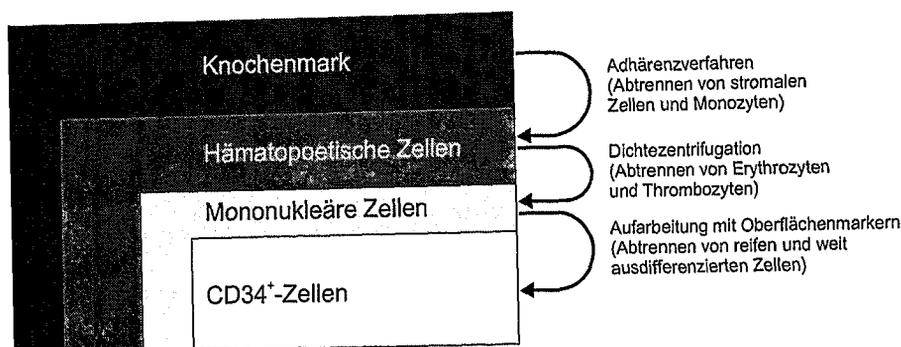


Abbildung 2.6: Aufarbeitung hämatopoetischer Zellen in Subpopulationen

2.3.3 Zelllinien

Die meisten Zellen eines Organismus haben eine begrenzte Lebenszeit. Sie können sich also nicht unendlich oft teilen. Einer *ex vivo* Kultivierung dieser Zellen ist daher eine natürliche Grenze gesetzt. Manchmal passiert es jedoch, dass sich während der Kultivierung Zellen genetisch so verändern, dass sie sich unendlich oft teilen können. Eine solche Zelle nennt man eine kontinuierliche Zelllinie. Die meisten heute gebräuchlichen Zelllinien entstammen aber nicht einem solchen Zufallsprodukt, sondern wurden gezielter gewonnen. Hierfür gibt es zwei Methoden: Bei den Tumorzelllinien werden die Zellen aus dem Tumor eines Patienten kultiviert. Eine Tumorzelle ist eine entartete Zelle eines bestimmten Gewebes des Körpers. Viele dieser entarteten Zellen zeigen die Eigenschaften einer Zelllinie. Durch eine Kultivierung kann aus einer solchen Tumorzelle eine Zelllinie gewonnen werden. Viele dieser Tumorzellen zeigen aber auch ein sehr unterschiedliches Verhalten zu den Zellen des ursprünglichen Gewebes. Eine große Zahl von Tumorzelllinien aus adhärenenten Geweben verliert beispielsweise diese Adhärenz und wächst vorzugsweise in Suspension. Wenn man sie mit den Ursprungszellen vergleichen möchte, ist daher besonders wichtig, die Funktionalität der Zelllinie zu prüfen.

Die zweite Methode für die Gewinnung einer Zelllinie ist die Transformation. Bei dieser wird in eine normale sterbliche Zelle gezielt mit Viren, Chemikalien oder Elektroporation die genetische Information für die Unsterblichkeit eingebracht. Durch dieses Vorgehen können die Eigenschaften der Zelllinie gezielt beeinflusst werden. Jedoch ist es auch hier möglich, dass sich die Zelllinie in wesentlichen Punkten von der Ursprungszelle unterscheidet [2].

Neben den Unterschieden zu der Ursprungszelle muss berücksichtigt werden, dass Zelllinien durch ihre oftmals sehr lange Kulturdauer genetischen Veränderungen unterliegen. Es ist deshalb üblich, Zellen möglichst schnell nach ihrer Etablierung in einer Master-Zellbank zu kryokonservieren, also tiefgekühlt zu lagern. Diese besteht üblicherweise aus 100 Tiefgefrier-Röhrchen. Aus einem Röhrchen der Master-Zellbank wird nach dem Auftauen wieder eine Zellbank, die Working-Zellbank, gewonnen, die erneut 100 Tiefgefrier-Röhrchen umfasst. Eine Zelllinie wird dann nicht mehr beliebig lange kultiviert, sondern die alten Zellen werden in regelmäßigen Abständen verworfen. Frische Zellen aus der Working-Zellbank werden dann erneut in Kultur genommen.

2.4 Anwendungsmöglichkeiten

Die medizinischen Einsatzmöglichkeiten hämatopoetischer Zellen sind sehr zahlreich. Es werden darum in diesem und dem folgenden Abschnitt (Abschnitt 2.5 auf Seite 15) nur

die speziellen Anwendungen berücksichtigt, die den Hintergrund der vorliegenden Arbeit darstellen. Das heißt Anwendungen in der Krebstherapie, in denen die *ex vivo* Kultivierung von frühen Vorläuferzellen oder von T-Lymphozyten eine Rolle spielt.

2.4.1 Transplantation

Die Chemotherapie ist ein Standardverfahren in der Krebstherapie. Dabei werden dem krebserkrankten Patienten zytotoxische Substanzen verabreicht. Diese wirken auf alle sich schnell teilende Zellen tödlich und somit neben Krebszellen, auch beispielsweise auf hämatopoetische Zellen. Die Höhe der verabreichten Dosis ist begrenzt, da das hämatopoetische System des Patienten nicht zerstört werden darf. Hierdurch geschieht es aber häufig, dass auch Krebszellen die Therapie überleben und der Patient erneut erkrankt. Bei der Hochdosis-Chemotherapie gibt man dem Patienten bewusst eine Dosis, die so stark ist, dass sie auch das hämatopoetische System dauerhaft schädigt oder sogar zerstört. Damit erhöht sich aber die Chance, alle Krebszellen zu töten. Direkt nach der Chemotherapie werden dem Patienten hämatopoetische Zellen zurückgegeben, die dann ein neues blutbildendes System aufbauen können (Abbildung 2.7 auf der nächsten Seite). Die Zellen können dabei entweder dem Patienten vor der Therapie selbst entnommen werden (autologe Spende) oder von einem immunologisch verträglichen Fremdspender stammen (allogene Spende). Welches Material verwendet wird, ist eine Einzelfallentscheidung. Eine Fremdspende birgt die Gefahr starker Abstoßungsreaktionen durch die immunkompetenten Zellen (Graft-Versus-Host Disease (GVHD)). In abgeschwächter Form können die Abstoßungsreaktionen aber auch dazu führen, dass eventuell doch noch verbliebene Krebszellen von der Spende wirksamer bekämpft werden (Graft-Versus-Leukemia (GVL) Effekt).

Bei der Transplantation hämatopoetischer Zellen nach einer Hochdosis-Chemotherapie werden zwei Ziele verfolgt. Zum einen die schnelle Wiederherstellung des Immun- und Blutgerinnungssystems des Patienten (short-term engraftment), der nach der Hochdosis-Chemotherapie schutzlos jeglicher Art von Keimen gegenübersteht und wegen der fehlenden Gerinnungseigenschaften des Blutes innerlich zu verbluten droht. Hier ist besonders der Aufbau der neutrophilen Zellen und Thrombozyten, also das Überwinden der Neutropenie und Thrombozytopenie, wichtig. Zum anderen muss sich das blutbildende System dauerhaft stabil aufbauen (long-term engraftment). Die Transplantation von Stammzellen ist daher unbedingt erforderlich.

Die *ex vivo* Kultivierung kann bei dieser Therapieform an mehreren Stellen von Nutzen sein (Abbildung 2.7 auf der nächsten Seite). Die spezielle Anwendung hängt davon ab, welches Spendermaterial verwendet wird. Eine autologe Spende kann Krebszellen enthalten, besonders im Fall von Leukämien (Blutkrebs), womit man dem soeben geheilten Patienten seine eigenen Krebszellen zurückgeben würde. Hier hilft das so genannte Tumor-Purging. Durch eine gezielte Aufreinigung und/oder eine kurze *ex vivo* Kultivierung der Spenderzellen können die Krebszellen entfernt werden [164, 137].

Bei Nabelschnurblut ist die Zellzahl nicht ausreichend, um einen erwachsenen Patienten zu transplantieren [24, 29, 292]. Durch eine Vermehrung der Zellen außerhalb des Körpers vor der Transplantation kann dieser Engpass überwunden werden. Auch bei Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut ist es durchaus wünschenswert, wenn durch eine *ex vivo* Vermehrung die Größe der benötigten Spende verringert werden kann. Auf diese Weise kann die Schwere des operativen Eingriffes bzw. die Zahl der Leukapheresen reduziert werden.

Darüber hinaus bieten *ex vivo* vermehrte Zellen die Chance, die Zusammensetzung des Transplantates gezielt zu beeinflussen. Eine Mischung aus Stammzellen für die dauerhafte Wiederherstellung der Hämatopoese und von weiter ausdifferenzierten Zellen für die schnelle Überwindung der Neutropenie und Thrombozytopenie ist das angestrebte Ideal.

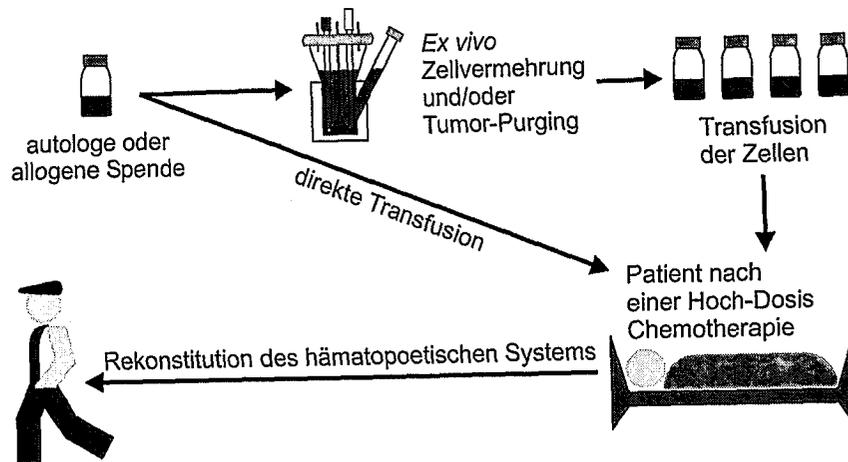


Abbildung 2.7: Transplantations-Strategien nach einer Hochdosis-Chemotherapie

2.4.2 Gentherapie

Die Gentherapien sind ganz neue Ansätze für die Bekämpfung von Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen. Die hämatopoetischen Zellen, speziell die Stammzellen, sind das bevorzugte Ziel für gentechnische Veränderungen. Die Gründe dafür liegen in der Rolle der Zellen im Immunsystem des Körpers, an der Tatsache, dass die Stammzellen über das ganze Leben eines Menschen im Körper unverändert existieren und an der leichten Zugänglichkeit des Zellmaterials. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, eine Zelle gentechnisch zu verändern (Abbildung 2.8 auf der nächsten Seite). Bei der *in vivo* Methode werden die Gentransfervehikel, meistens Viren, dem Patienten direkt verabreicht. Dabei muss sichergestellt werden, dass ausschließlich die gewünschten Zielzellen genetisch manipuliert werden. Die *ex vivo* Methode verändert die Zielzellen in einer Kultur, wodurch mit Sicherheit nur die gewünschten Zellen betroffen sind und der Erfolg einer solchen Transfektion geprüft werden kann. Manche besonders effektiven Gentransfervehikel, wie die Retroviren, können das neue genetische Material auch nur dann in eine Zelle einschleusen, wenn diese sich in der Teilung befindet. Viele Zellen, wie beispielsweise die hämatopoetischen Stammzellen, befinden sich aber im Körper die meiste Zeit in der G_0 -Phase [282]. In einer *ex vivo* Kultur können sie durch gezielte Stimulationen zur Teilung angeregt werden. Erst dadurch ist eine effiziente Transfektion möglich.

In bestimmten Therapie-Strategien ist beispielsweise geplant, Resistenzgene in die hämatopoetischen Zellen zu transfizieren [131, 277]. Die Zellen würden dadurch unempfindlich gegen bestimmte Chemotherapeutika, wodurch die Hochdosis-Chemotherapie keine Schädigung des hämatopoetischen Systems verursachen würde.

2.4.3 Adoptive Immuntherapie

Der dritte große Anwendungsbereich für die *ex vivo* Kultivierung hämatopoetischer Zellen ist die adoptive Immuntherapie, bei der auch gentherapeutische Methoden eine Rolle spielen können. Hierbei versucht man, die körpereigenen Abwehrkräfte des Krebspatienten zu stärken. Das Immunsystem, das den Tumor offensichtlich nicht mehr wirkungsvoll bekämpfen kann, soll wieder von selbst die Erkrankung heilen können. Die Zielzellen sind in diesem Ansatz nicht die Stammzellen, sondern die immunologisch wirksamen ausdifferenzierten Zellen, speziell die T-Lymphozyten. T-Lymphozyten sind Zellen des Immunsystems, die sehr spezifisch gegen Merkmale, so genannte Antigene, einer bestimmten Störung im Organismus vorgehen. Antigene sind zum Beispiel spezielle Oberflächenmoleküle eines Tumors.

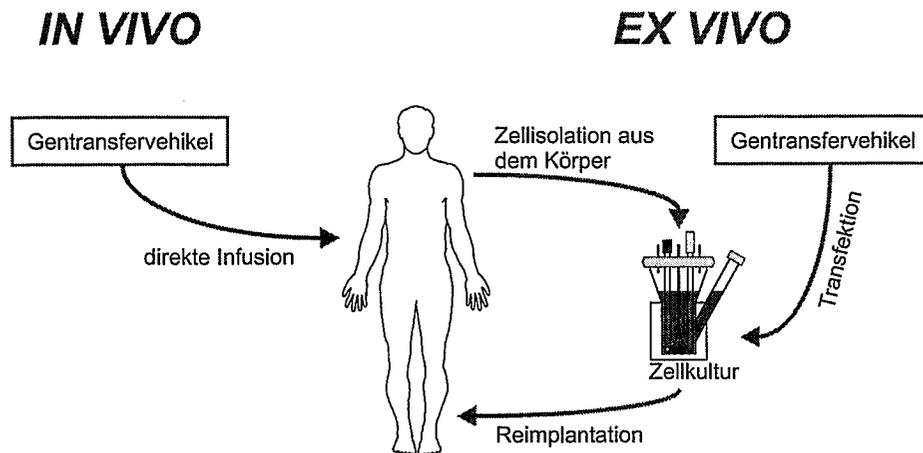


Abbildung 2.8: Prinzipielle Vorgehensweise bei einer Gentherapie (nach [171])

Um in der Lage zu sein, diese zu erkennen, müssen die Zellen durch gezielte Stimulation aus ihrem zunächst nicht-aktivierten in einen aktivierten Zustand versetzt werden. Eine mögliche Behandlungsstrategie versucht, aus der direkten Umgebung des Tumors eines Patienten T-Lymphozyten zu gewinnen, die den Tumor bereits spezifisch angreifen. Diese tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) werden *ex vivo* vermehrt und dem Patienten reinjiziert. Eine andere Strategie sieht vor, durch die Kultivierung von MNZ mit großen Mengen Interleukin-2 (IL-2), einem so genannten Lymphokin, lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) zu generieren. Solche Zellen greifen im Patienten ebenfalls das Tumorgewebe an. Ein dritter wichtiger Ansatz mit spezifischen Lymphozyten versucht nicht den Krebs selbst zu bekämpfen, sondern die gefährlichen Nebenwirkungen der Chemotherapie. In der immundefizienten Phase nach einer Chemotherapie können Virusinfektionen, die bei einem gesunden Menschen ohne Symptome sind, lebensgefährlich sein. Insbesondere zwei Herpesarten, der Zytomegalie-Virus (englisch Cytomegalovirus (CMV)) und der Epstein-Barr-Virus (EBV), sind wegen ihres hohen Durchseuchungsgrades gefährlich. 50–70 % der Menschen sind mit CMV infiziert, 90 % mit EBV [88, 227]. Eine Gabe CMV- oder EBV-spezifischer T-Lymphozyten nach der Chemotherapie kann die Gefährdung durch die Viren abwenden. Um die Zellen zu gewinnen, werden primäre T-Lymphozyten des Patienten zunächst *ex vivo* antigenspezifisch aktiviert. Nach einer Expansion können diese zytotoxischen T-Lymphozyten dem Patienten zurückgegeben werden (Abbildung 2.9 auf der nächsten Seite).

2.5 Kultivierungstechniken

Die technischen Lösungen für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen müssen in jedem Fall an die speziellen Ziele und die verwendeten Zelltypen angepasst werden. Aufgrund der Vielzahl der sich dadurch ergebenden Kultivierungsstrategien sollen an dieser Stelle nur die vorhandenen Alternativen für die frühen Progenitorzellen und die ausdifferenzierten T-Lymphozyten dargestellt werden.

Die Stamm- und Vorläuferzellen wachsen *in vivo* in einem gewebeartigen Verbund mit stromalen Zellen und Extrazellulär-Matrix. Bei den Kultivierungstechniken für frühe Zellen sind daher zwei große Strategien auszumachen, die stromahaltigen und die stromafreien Kulturen. In stromahaltigen Kulturen versucht man, durch eine Kokultivierung der hämatopoetischen Zellen mit primären stromalen Zellen oder stromalen Zelllinien die reale Situation im Knochenmark nachzuahmen. Man nutzt dadurch die regulativen Fähigkeiten

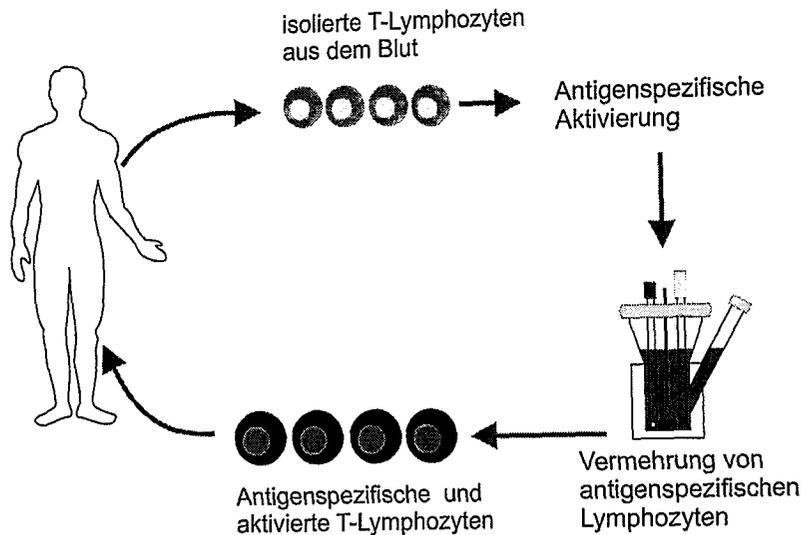


Abbildung 2.9: Die Strategie einer adoptiven Immuntherapie (nach [87])

Tabelle 2.4: Bewertung der Kulturstrategien

Anforderung an das Kultursystem	stromahaltige Kultur	Suspensionskultur
knochenmarkähnliche Gewebekultur	+	-
definierte Kulturbedingungen	-	+
klinische Verwendbarkeit	o	+
Prozesskontrolle und Analytik	-	+
leichte Zellernte	-	+
Betriebskosten	+	-

des Stroma auf die hämatopoetischen Zellen aus, deren genaue Mechanismen unbekannt sind (vergleiche Abschnitt 2.2.1 auf Seite 4). Im technisch wesentlich einfacheren stromafreien Kultursystem entfällt die Regulation durch das Stroma. Daher wird versucht, die Kultur durch zusätzliche lösliche Zytokine zu regulieren. Die Zusammensetzung der Zytokinmischung spielt dabei die Schlüsselrolle für den Verlauf der Kultivierung.

Bis heute konnte sich keine der beiden Richtungen durchsetzen. Die Vor- und Nachteile der beiden Strategien sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Während die stromahaltige Kultur wesentlich größere Anforderungen an die Handhabung bei der Analytik und der Zellernte sowie an die technische Ausführung stellt, kann die Suspensionskultur die biologischen Anforderungen der frühen Zellen nur unzureichend erfüllen. Die biologischen Ergebnisse sprechen heute in jedem Fall für eine Verwendung von Stroma. Auch die Kosten legen nahe, stromahaltig zu kultivieren. Die notwendige Zugabe von größeren Mengen Zytokinen in die Suspensionskultur ist ein großes wirtschaftliches Problem. Die Kosten für einen Liter Medium können von etwa 40 DM leicht auf weit über 10 000 DM steigen.

Eine klinische Anwendung des stromahaltigen Konzepts ist aber nur bedingt möglich. Solange keine stromalen Zellen des Spenders der hämatopoetischen Zellen zur Verfügung stehen, wie beim Leukaphereseprodukt und beim Nabelschnurblut, muss man auf das Stroma eines Fremdspenders oder eine stromale Zelllinie ausweichen. Beides ist im Rahmen einer Transplantation sehr kritisch zu beurteilen.

Die Kultivierung von ausdifferenzierten Zellen wird in der Regel im stromafreien Suspensionssystem durchgeführt, so auch für T-Lymphozyten. Ausnahmen ergeben sich nur dann, wenn die Zellen selbst adhären sind, wie beispielsweise Monozyten, oder die aus-

differenzierten Zellen aus Stamm- und Progenitorzellen generiert werden sollen. Hier kann ein immobilisiertes oder sogar stromahaltiges System durchaus wieder sinnvoll sein.

2.5.1 Historische Entwicklung

2.5.1.1 Kultivierungstechniken der Progenitorzellen

In den Anfängen der Kultivierung früher hämatopoetischer Zellen standen noch keine rekombinant hergestellten humanen Zytokine zur Verfügung [164]. Folgerichtig beschreibt DEXTER in den 70er Jahren die ersten erfolgreichen Kultivierungen hämatopoetischer Zellen in einem stromahaltigen System [52]. Hierbei wurden murine (= von Nagern stammende) stromale und hämatopoetische Zellen in zweidimensionaler Kokultur in Gewebekulturflaschen für 6–8 Wochen kultiviert. 1980 übertrugen GARTNER und KAPLAN diesen Ansatz auf humane Zellen [63]. Die so kultivierten Zellen waren in der Lage, die Granulopoese und Erythropoese, also die myeloide Reihe, aufrecht zu erhalten. Durch eine Variation dieses Ansatzes gelang es WHITLOCK et al. 1984, auch die lymphoide Reihe *ex vivo* zu etablieren [296].

Alle diese Kulturen fanden statisch, also ungerührt, in herkömmlichen Gewebekultur-schalen oder -platten statt (vergleiche Abschnitt 3.4 auf Seite 41). Es zeigte sich jedoch, dass diese Techniken einerseits keine Kultivierungen im klinischen Maßstab ermöglichen, es andererseits damit auch nicht gelang, optimale biologische Bedingungen zu schaffen. Seit etwa 10 Jahren werden daher komplexere Systeme für hämatopoetische Zellen entwickelt. Dabei wurde zunächst versucht, Standardtechniken aus der tierischen Zellkultur zu übertragen. So testeten SARDONINI und WU 1993 Hohlfasermodule, Airliftreaktoren und einfache gerührte Kultursysteme [236]. Letzteres sind Spinnerflaschen, die sowohl als Suspensionssystem als auch für mikroträgergestützte Kulturen eingesetzt wurden. Mit Ausnahme des Suspensionsspinners konnte keines der Systeme einen Vorteil gegenüber den statischen Kulturen aufweisen. Andere klassische Ansätze, wie die Mikroverkapselung [144], waren ebenfalls erfolglos. Dagegen zeigte sich die aus der Transfusionsmedizin entstammende Beutellkultur als gut anwendbar [143]. Diese Kunststoff-Beutel, zumeist aus Teflon, sind ein simples Kultursystem auch für größere Maßstäbe. Die Wände des Beutels sind für eine Sauerstoffversorgung der Zellen gaspermeabel, ansonsten ist das System aber komplett geschlossen. Als Konsequenz solcher Untersuchungen haben sich von den klassischen Kulturtechniken nur die Spinnerflaschen als gerührte [41, 42, 44, 104, 144, 309] und die Beutel als statische Suspensionskultur [15, 64, 143, 219, 248, 300] durchsetzen können.

Neben diesen herkömmlichen Systemen wurden aber ebenfalls eine Reihe von spezialisierten Lösungen entwickelt. Der Ansatz war dabei, die *in vivo* Verhältnisse im Knochenmark in einem *ex vivo* System zu mimikrieren. Diese Systeme arbeiten daher mit immobilisierten stromahaltigen Kokulturen. Die Immobilisierung findet auf Nylongewebe [189, 190], Mikroträgern [155, 172, 243, 285, 286, 287] oder auf zweidimensionalen Oberflächen [114, 118, 200, 233] statt. Die Flachbetttechnik, bei der die Zellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche immobilisiert sind und kontinuierlich von Medium überströmt werden, wurde noch weiter entwickelt. Durch eine geriffelte Oberflächenstruktur gelang es, trotz der Strömung des Mediums, hämatopoetische Zellen ohne Stroma aufgrund ihrer Sedimentation auf der Oberfläche zurückzuhalten [233].

2.5.1.2 Kultivierungstechniken der T-Lymphozyten

Im Vergleich zu den frühen Progenitorzellen ist die Kultivierung der T-Lymphozyten vom technischen Standpunkt aus eher einfach. Da die Zellen *in vivo* in Suspension wachsen, wurde hier zumeist auf klassische Techniken zurückgegriffen. Die ersten klinischen Studien von

ROSENBERG und Mitarbeitern [231, 230], in denen große Mengen von T-Lymphozyten *ex vivo* generiert wurden, benutzten die von MUUL adaptierte Roller-Flaschen Technik [180]. Erfolgreich entwickelten sich auch Systeme wie Gewebekulturflaschen [294] und Beutel [181, 193, 306]. Die wesentliche Herausforderung stellt hier der Scale-up dar. Für therapeutische Ansätze werden unter Umständen mehr als $2 \cdot 10^{11}$ Zellen benötigt [147]. Um diese enorme Zellzahl zu erreichen, wurden in den ersten Ansätzen besonders viele der oben genannten Kultursysteme parallel betrieben (zum Beispiel [231]). Diese Strategie ist zwar prinzipiell erfolgreich, birgt aber ein hohes Kontaminationsrisiko und ist sehr arbeits- und kostenintensiv. Die maximale Zelldichte in einem solchen System beträgt etwa $2 \cdot 10^6$ c/mL, womit 100 Liter Kulturvolumen notwendig sind. Dies entspricht mehr als 1000 der größten handelsüblichen Gewebekulturflaschen. KNATZEK verwendete daher einen Hohlfaserreaktor, in dem eine sehr hohe Zelldichte realisiert und so die erforderliche Zellzahl in kleineren Volumina erreicht werden konnte [109]. Der Nachteil dieses Ansatzes ist die fehlende Möglichkeit der Kontrolle der Zellen im Prozess, die schwierige Zellernte und die wenig physiologische Kultivierung der Zellen in einem gewebeähnlichen Verband.

2.5.2 Stand der Technik

Das heute am weitesten entwickelte Kultursystem für frühe hämatopoetische Zellen ist zweifellos der Flachbettreaktor. Dieser ist unter dem Namen AastromReplicell bereits kommerzialisiert (Aastrom Bioscience, Inc., Ann Arbor, MI, USA). Das System ist die konsequente Weiterentwicklung der Arbeiten von KOLLER [118] und PALSSON [200] und ihren Mitarbeitern. Abbildung 2.10 auf der nächsten Seite zeigt das Prinzip dieses rotations-symmetrischen Kultursystems. Die Zellen liegen auf einer Kunststoffoberfläche, werden dort durch ihre Adhärenz oder Sedimentation zurückgehalten und kontinuierlich mit frischem Medium überströmt. Die Begasung erfolgt dabei diffusiv über eine permeable Membran, die die obere Fläche des eigentlichen Kulturraumes darstellt. An der Seite des Kunststoffeinsatzes ist ein zusätzlicher Stutzen für die Zellernte angebracht. Dieses kontinuierlich perfundierte System wird bereits in mehreren klinischen Studien für Transplantationen nach einer Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt (zum Beispiel [6, 34, 32]). Trotz dieses hohen Entwicklungsstandes sind die Ergebnisse bisher nicht ausreichend. Zwar wurden keinerlei Unverträglichkeiten bei den Patienten beobachtet, es zeigen sich aber deutliche Hinweise, dass während der Kultivierung die Stammzellen nicht erhalten werden können [33].

Weitere klinische Studien für Transplantationen nach einer Hochdosis-Chemotherapie arbeiten mit statischen Kultursystemen. BARNET verwendete 1987 in der ersten klinischen Anwendung von *ex vivo* kultivierten hämatopoetischen Zellen Gewebekulturflaschen [9]. Weitere Studien übernahmen diese Technik [25] oder benutzten Kultur-Beutel [92, 300]. Diese Systeme haben sich aufgrund ihrer leichten und sicheren Handhabung durchgesetzt.

Anders als bei den Progenitorzellen gibt es für die Kultivierung von T-Lymphozyten keine spezialisierte Technik. Obwohl die Zahl der klinischen Studien sehr groß ist (beispielsweise [129, 146, 215, 228, 229]), wird mit Ausnahme des Hohlfaserreaktors seit über 10 Jahren nur in statischen Systemen, wie Gewebekulturflaschen oder Kultur-Beuteln, gearbeitet [4]. Mit kontrollierten gerührten Systemen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, gibt es bisher nur erste Ansätze [31].

2.5.3 Kultivierungsparameter

Die möglichen Variationen der Randbedingungen eines Versuches sind sehr vielfältig und beeinflussen die Ergebnisse stark. Will man Kultivierungsdaten sinnvoll vergleichen, so

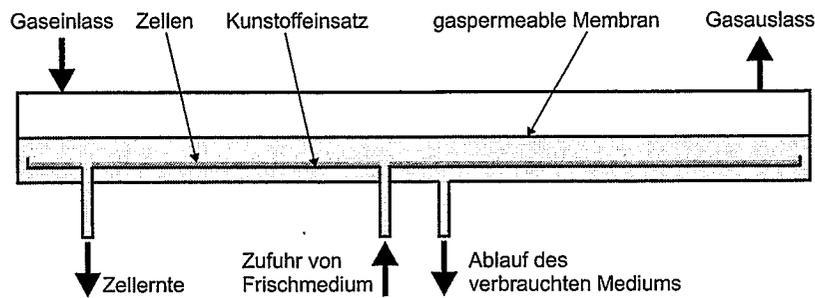


Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau des AastromReplicell Systems (nach [154] und [197])

Tabelle 2.5: Eine Auswahl von Literaturstellen mit stromahaltigen Kulturen

Zelltyp	statische Kultur	gerührte Kultur	kontrollierte Bioreaktoren
BM ^a -MNZ	[23, 115, 119, 123, 124, 125, 127, 143, 216, 236, 245, 246]	[104, 144, 309]	[6, 116, 118, 122, 155, 194, 199, 200, 236]
BM-CD34 ⁺	[91, 120, 123, 125, 217]	[236]	[122, 128]
PB ^b -MNZ			[172, 233, 274]
PB-CD34 ⁺	[21, 217]		
CB ^c -MNZ	[115, 117]		[114, 274]
CB-CD34 ⁺	[100, 159, 276]		[172]

^a bone marrow = Knochenmark, ^b peripheral blood = peripheres Blut, ^c cord blood = Nabelschnurblut

sollten die folgenden Punkte zwischen den einzelnen Ansätzen möglichst wenig variieren:

- Das Kulturprinzip (statische, gerührte oder perfundierte Kultur)
- Die verwendete Zellpopulation (Knochenmark, peripheres Blut oder Nabelschnurblut; MNZ oder CD34⁺)
- Das Stroma (stromahaltig oder stromafrei)
- Das Medium (serumhaltig oder serumfrei)
- Die eingesetzte Zytokinkombination

Die beiden letzten Punkte variieren besonders stark. Die Frage nach dem Medium und den Zytokinen wird praktisch von jeder Arbeitsgruppe individuell entschieden, und dies geschieht meist nicht auf der Basis strukturierter Untersuchungen. Ein einheitlicher Überblick ist in diesen Punkten daher nicht möglich.

Um die Frage nach der optimalen Kultivierungsstrategie zu beantworten, sind Vergleiche mit den Daten von anderen Arbeitsgruppen aber sehr wichtig. In Bezug auf die ersten drei Punkte lassen sich die Daten aus der Literatur zusammenfassen. Eine Auswahl von Literaturstellen für stromahaltige und stromafreie Kulturen zeigen die Tabelle 2.5 und die Tabelle 2.6 auf der nächsten Seite. Hier sind die einzelnen Quellen nach Kulturprinzip und Zellpopulation aufgeschlüsselt. Die MNZ aus dem Knochenmark enthalten dabei noch stromale Zellen, da hier üblicherweise die Abtrennung des Stroma durch Adhärenzverfahren nicht durchgeführt wird. Bei allen anderen Zellpopulationen handelt es sich um reine hämatopoetische Zellen, die in stromahaltigen Kulturen gezielt mit anderen primären stromalen Zellen oder mit Zelllinien kultiviert werden.

Über die biologischen und biochemischen Startbedingungen hinaus sind einige Parameter für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen wenigstens in Ansätzen untersucht worden. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Tabelle 2.6: Eine Auswahl von Literaturstellen mit stromafreien Kulturen

Zelltyp	statische Kultur	gerührte Kultur	kontrollierte Bioreaktoren
BM-CD34 ⁺	[7, 15, 64, 119, 123, 125, 127, 209, 210, 216, 219, 223]		[65, 122, 128]
PB-MNZ	[41, 75, 135, 167, 235]	[41, 42, 44]	[43, 233, 234, 274]
PB-CD34 ⁺	[21, 26, 78, 83, 135, 136, 156, 177, 167, 173, 248, 253, 300]	[42]	[234]
CB-MNZ	[115, 117, 235]	[44, 42]	[43, 48, 116, 121, 274]
CB-CD34 ⁺	[13, 45, 47, 49, 73, 112, 160, 176, 220, 307]	[113]	

2.5.3.1 Anforderungen an die Materialien

Eine der grundlegendsten Entscheidungen für die Konstruktion von neuen Kultursystemen ist die Wahl der Materialien. Der Werkstoff, aus dem das Kulturgefäß gefertigt wird, muss mehreren Ansprüchen genügen. Einige rein physikalische Anforderungen sind eine Grundvoraussetzung. Der Werkstoff muss mechanisch stabil und gut abzudichten sein, um Leckagen und die damit einhergehenden Kontaminationen zu verhindern. Er muss sterilisierbar sein und bei Systemen, die wiederverwendet werden sollen, vorzugsweise dampfsterilisierbar, also autoklavierbar. Die Durchsichtigkeit des Materials ist die Voraussetzung für eine optische Kontrolle einer Kultur im geschlossenen System.

Neben diesen grundlegenden Anforderungen ist die Biokompatibilität des Materials sehr wichtig. Das Material sollte idealerweise inert sein. Weder sollen sich Stoffe aus den Materialien lösen, noch sollten Inhaltsstoffe der Kulturmedien an den Oberflächen adsorbiert werden. Bei immobilisierten Kulturen spielt auch die direkte Adhäsion der Zellen und der Extrazellulär-Matrix eine wichtige Rolle. Dabei können diese schädigenden Einflüsse zu verringerter Proliferation oder gar zum Absterben der Zellen führen. Bei hämatopoetischen Zellen muss zusätzlich ein Einfluss auf das Ausdifferenzierungs-Verhalten ausgeschlossen werden.

Aus diesem Grund untersuchte LAIUPPA verschiedene in der Zellkultur übliche Materialien auf ihren Einfluss auf hämatopoetische Zellen [134, 135, 136]. Dies waren hauptsächlich Polymere, aber auch Metalle und Glas. Polystyrol stellt das Standardmaterial für Einweg-Zellkulturgefäße dar und diente als Referenz. Die untersuchten Polymere werden als Material für Kultur-Beutel verwendet, während Metalle und Glas die üblichen Werkstoffe für den Bau kontrollierter Bioreaktoren sind. Die Ergebnisse, aufgeschlüsselt nach unterschiedlichen Materialien und verschiedenen Kulturbedingungen, sind in Tabelle 2.7 auf der nächsten Seite zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass frühe Zellen wesentlich empfindlicher auf die Werkstoffe reagieren als weiter ausdifferenzierte. Die Expansion von MNZ wurde beispielsweise von Polymethylpenten nicht beeinflusst, jedoch nahm der Anteil der CFU-GM im Vergleich zu Polystyrol deutlich ab. Nur bei Acetal, Polyethylen Terephthalat und Polytetrafluorethylen wurden Anzeichen für das Lösen von toxischen Substanzen aus dem Material gefunden. Die wesentliche Ursache der Schädigung konnte ansonsten auf die Bindung von Medienbestandteilen, wahrscheinlich Proteinen, an die Oberflächen zurückgeführt werden, die dann als Substrat fehlten. Dies erklärt auch, warum bei der Zugabe des sehr proteinreichen Serums in das Kulturmedium ein schützender Effekt beobachtet werden konnte. In Abschnitt 4.1 auf Seite 53 werden die Materialien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, auf ihre Biokompatibilität hin überprüft.

Tabelle 2.7: Einflüsse verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen (nach [136])

	Einfluss auf die Gesamtzellzahl	Einfluss auf die Zahl der CFU-GM
Acetal	--	--
Edelstahl	--	-
Glas	--	--
hochdichtes Polyethylen (HDPE)	-	--
Teflon Perfluoralkoxy (PFA)	O	O
Polyacetonitril-Methylacrylat (Barex)	-	-
Polycarbonat (PC)	--	--
Polyethylen (PE)	--	--
Polyethylen Terephthalat (PET)	-	-
Polymethylpenten (PMP)	O	-
Polypropylen (PP)	-	--
Polystyrol (PS)	O	O
Polysulfon	--	--
Polytetrafluorethylen (PTFE)	--	--
Titan	O	O
Zelluloseacetat	O	-

O = kein Einfluss, - = leicht negativer Einfluss, -- = stark negativer Einfluss

2.5.3.2 Die Osmolalität

Die Osmolalität als Maß der gelösten Teilchen pro Masse des Lösungsmittels ist ein wichtiger Parameter der Zellkultivierung. Da humane Zellen, wie alle Säugerzellen, keine stabile Zellwand besitzen, reagieren sie empfindlich auf Schwankungen des osmotischen Drucks. Das Lösungsmittel in Kulturmedien ist Wasser. Es diffundiert je nach Druckgradient in die Zelle hinein oder aus ihr hinaus. Dadurch kommt es zu Veränderungen der Zellgröße und des Stoffwechsels, im Extremfall auch zu letalen Schädigungen [27].

Bei der einzigen beschriebenen Untersuchung des Osmolalitätseinflusses auf hämatopoetische Zellen betrachtete MCADAMS den Bereich von 300–550 mOsmol/kg [162]. Die untere Grenze stellt dabei die natürliche Osmolalität im Blut dar [290], womit die Untersuchungen im rein hypertonen Bereich stattfanden. Die Ergebnisse zeigen einen linearen Abfall des Zellwachstums bei steigender Osmolalität. Eine Ausnahme waren hier nur die BFU-E, die erst bei Werten über 325 mOsmol/kg in ihrem Wachstum gehindert waren. Da angenommen werden kann, dass sehr niedrige Osmolalitäten, also Werte im hypotonischen Bereich, den Zellen ebenfalls schaden, muss es ein Optimum geben. In dieser Arbeit wird versucht, über die Ergebnisse von MCADAMS hinaus, durch die Untersuchung des hypo- und hypertonen Bereiches, dieses Optimum zu bestimmen (Abschnitt 4.2 auf Seite 58).

2.5.3.3 Der Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck des Kulturmediums ist der Anteil des gelösten Sauerstoffs relativ zur Sättigung mit Luft. Im Idealzustand stellt sich in einer Kultur ein Fließgleichgewicht zwischen dem Sauerstoffeintrag durch die Begasung und den sauerstoffverbrauchenden Zellen ein. *In vivo* ist ein solches Fließgleichgewicht realisiert. Messungen ergaben im Knochenmark einen Sauerstoffpartialdruck von $51,8 \pm 14,5$ mmHg [96], was einem Partialdruck im Kulturmedium von etwa $33 \pm 9,2$ % entspricht. Für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen haben eine Reihe von Untersuchungen ergeben, dass bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken um 25 % speziell die frühen Vorläuferzellen besser kultiviert wer-

den können. Bei höheren Partialdrücken sind dagegen weiter ausdifferenzierte Zellen im Vorteil [22, 23, 39, 115, 116]. Der Hintergrund dieser Beobachtungen ist noch ungeklärt. Neben den trivialen Einflüssen bei extremen Zuständen, also der Sauerstofflimitierung bei sehr niedrigen und die toxische Sauerstoffwirkung bei sehr hohen Partialdrücken, reagieren hämatopoetische Zellen offensichtlich auch in gut verträglichen Bereichen auf Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes. Eine mögliche Erklärung wäre die verringerte Bildung der Sauerstoffradikale O_2^- und H_2O_2 durch reife myeloide Zellen bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen [170]. Ebenfalls wurde beobachtet, dass zum Beispiel BFU-E bei geringem Sauerstoffangebot eine höhere Sensitivität zum Wachstumsfaktor Erythropoietin (EPO) zeigen [225]. Hier liegen demnach Vermutungen nahe, dass sich der Sauerstoff auf den Stoffwechsel oder die Signaltransduktion auswirkt.

Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse, wie wichtig eine Messung und Regelung des Sauerstoffs in einer Kultur sind. In unkontrollierten Systemen verändert sich der Sauerstoffgehalt des Mediums mit dem Wachstum der Zellen zwangsläufig. Dadurch kann es nicht nur leicht zu unerkannten Sauerstofflimitierungen kommen, sondern man lässt auch die Möglichkeit aus, mit dem Sauerstoffgehalt gezielt das Wachstums- und Ausdifferenzierungsverhalten zu steuern.

2.5.3.4 Der pH-Wert

Der dritte wichtige Medien-Parameter ist der pH-Wert. Auch hier sieht man ähnliche Effekte wie bei der Osmolalität und dem Sauerstoffpartialdruck. MCADAMS fand für die Kultivierung von CFU-GM einen optimalen Bereich von pH 7,2–7,4. Das Maximum lag dabei bei pH 7,35 [165, 167]. Für die erythroide Ausdifferenzierung konnte dagegen ein optimaler Wert von pH 7,6 ermittelt werden [166]. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen von murinen Zellen [311] und mit den physiologischen Werten des Menschen überein. Im normalen arteriellen Blut liegt der pH-Wert bei 7,4 im venösen bei 7,37 [90]. Im Knochenmark selbst kann der Wert vermutlich an manchen Stellen durchaus variieren. Das Knochenmark ist ein sehr heterogenes Gewebe, in dem sich örtliche Schwankungen ergeben. Dies könnte das erythroide Optimum erklären, das bei einem scheinbar unphysiologischen Wert liegt.

Weicht man von den Idealbedingungen ab, so wird die Proliferation sehr schnell inhibiert und bei stärkeren Abweichungen völlig unterbunden. Bei einem pH-Wert von 6,7 beispielsweise sind die CFU-GM bereits vollständig in ihrer Entwicklung gehindert, BFU-E bereits bei Werten unter pH 7,0. Da die Stoffwechselprodukte der proliferierenden Zellen, insbesondere CO_2 und Laktat, trotz einer Pufferung das Medium stark versäuern, ist die pH-Wert Messung und Regelung von großer Bedeutung. Hier zeigen sich wieder die Vorteile einer kontrollierten Kultur. In normalen statischen Kulturen, kann der pH-Wert nur optisch über Indikatoren wie Phenolrot überprüft und die Regelung nur unzureichend über den CO_2 -Gehalt der die Kultur umgebenden Gasphase reguliert werden.

2.5.3.5 Die Inokulumsdichte und die Fütterungsstrategie

Die Fragen nach der Inokulumsdichte und nach der Notwendigkeit einer Fütterung während der Kultivierung sind miteinander verknüpft. Mehrere Untersuchungen geben zunächst ein eindeutiges Bild: Bei kleinem Inokulum werden grundsätzlich höhere Zellexpansionen erreicht als bei hohen Startzellichten [41, 75, 79, 124]. Klein bedeutet in diesem Fall weniger als $5 \cdot 10^4$ MNZ oder $CD34^+$ -Zellen pro mL Kulturvolumen, groß Zellichten im Bereich von über $5 \cdot 10^5$ MNZ oder $CD34^+$ -Zellen pro mL. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es in den Kulturen bei höheren Zellichten zu Limitierungen oder Inhibierungen kommt.

Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, dass in stromahaltigen Kulturen der Effekt noch stärker ausgeprägt ist. Stromazellen haben einen aktiveren Stoffwechsel als die hämatopoetischen Zellen. Was genau die Zellen limitiert oder inhibiert, ist interessanterweise bisher nicht untersucht worden. Es könnte sich dabei um einen Mangel an Medienbestandteilen, Wachstumsfaktoren oder Sauerstoff handeln oder um Inhibierungen durch Stoffwechselprodukte wie Laktat, Ammonium, Sauerstoffradikale oder hemmende Zytokine. ZANDSTRA zeigte, dass in gerührten Spinnerkulturen höhere Zelldichten erreicht werden, als in äquivalenten Kulturen in Gewebekulturflaschen [308]. Dies spricht unter den dort gegebenen Umständen für eine Sauerstofflimitierung, da sich die gerührte Kultur insbesondere durch einen besseren Stoffübergang, und das heißt eine bessere Sauerstoffversorgung, auszeichnet. Bei anderen Untersuchungen lassen sich hierzu jedoch keine Aussagen machen. Durch das Verdünnen der Zellen mit frischem Medium konnte die Limitierung jedoch aufgehoben werden, und die Zellen proliferierten weiter [194, 199]. Trotz der Zugabe von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren könnte hier aber auch durch die Verdünnung der Zellen lediglich eine Sauerstofflimitierung aufgehoben worden sein.

Die logische Konsequenz aus diesen Beobachtungen ist die Entwicklung einer Fütterungsstrategie. Den positiven Effekt einer erhöhten Fütterungsrate zeigte zuerst SCHWARTZ im stromahaltigen System [246]. Dies war gleichzeitig ein wichtiger Anstoß, den Flachbettreaktor zu entwickeln (vergleiche Abschnitt 2.5.1.1 auf Seite 17 und [114, 118, 200]). Später konnte auch der positive Effekt häufigen Fütterns auf stromafreie Kulturen nachgewiesen werden [79, 234]. Genau wie bei der Frage der Inokulumdichte ist ein größerer Effekt in der stromahaltigen Kultur zu bemerken [124].

Die Fütterungsfrequenzen reichen dabei in statischen Kulturen vom Austausch des halben Medienvolumens einmal pro Woche bis zum täglichen Austausch des kompletten Mediums [124, 246]. Die perfundierten Kulturen werden im Regelfall nicht kontinuierlich mit Frischmedium versorgt. Vielmehr wird aus einem Reservoir das Medium durch die Kulturkammer gepumpt und dann wieder in das Reservoir zurückgeleitet. Das Medium des Reservoirs wird diskontinuierlich gegen Frischmedium ausgetauscht. Die berichteten Austauschraten liegen in Abständen zwischen einem vollständigen Medienaustausch jeden Tag [285] und einem halben Medienaustausch dreimal pro Woche [232, 233]. Eine Ausnahme bildet der Ansatz von PALSSON, der frisches Medium durch die Kulturkammer leitete und es danach direkt verwarf [200]. Die Verweilzeiten in der Kulturkammer liegen bei beiden Strategien zwischen zehn Minuten und vier Tagen [198]. Die zweite Ausnahme ist der mikroträgergestützte Festbettreaktor, in dessen Medienkreislauf kontinuierlich Frischmedium zugeführt und verbrauchtes Medium abgezogen wird [172, 243]. Hier liegt die Verweilzeit bei 4,2 Tagen.

Eine Optimierung der Inokulumdichte und des Fütterungsprotokolls kann nur auf der Basis einer kompletten Bilanzierung des Prozesses erfolgen. Da diese bislang nicht durchgeführt wurde, basiert die übliche Fütterung nur auf den oben genannten empirischen Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit soll zwar keine solche vollständige Bilanzierung durchgeführt werden, jedoch wird in Abschnitt 4.3 auf Seite 60 versucht, einen Beitrag zu der Suche nach dem limitierenden Substrat zu leisten.

2.5.4 Anforderungen an neue Kultursysteme

Die Entwicklung neuer Kultursysteme für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen ist in zwei Bereichen notwendig. Zum einen gilt es, klinisch einsetzbare Techniken zu entwickeln, zum anderen müssen aber zusätzlich Möglichkeiten für vergleichende Untersuchungen geschaffen werden. Letzteres ist insbesondere vor dem Hintergrund der Kultivierungskosten und der Spendervariabilität zu sehen. Größere vergleichende Untersuchungen im klinischen

Maßstab sind heute finanziell keinesfalls möglich. Aber auch biologisch betrachtet sind sehr kleine Systeme sinnvoll, da die Möglichkeit geschaffen wird, mit der Probe eines einzelnen Spenders unterschiedliche Kulturbedingungen zu testen. Die Ergebnis verfälschende Spendervariabilität kann so minimiert werden. Mit einer solchen Technik könnte sowohl das Wissen über die Kultivierungsparameter erweitert, als auch direkt eine klinische Anwendung entwickelt werden. Insgesamt ist das Ziel also nicht die Entwicklung einer sehr klar begrenzten spezifischen Lösung, sondern die Entwicklung eines Systems von Kultivierungstechniken, die flexibel, individuell und an die speziellen Anforderungen angepasst eingesetzt werden sollen.

Eine Abschätzung der benötigten Größe und Leistungsfähigkeit der klinischen Systeme kann auf der Grundlage des derzeitigen Wissens aus klinischen Versuchen durchgeführt werden. Für Transplantationen nach einer Hochdosis-Chemotherapie werden als optimale Zellmengen mit entweder $2 \cdot 10^5$ CFU-GM oder $2 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen, jeweils pro kg Körpergewicht des Patienten, angegeben [12]. Welche dieser Zellpopulationen der ideale Maßstab ist, ist umstritten [265]. Die größte Herausforderung für die *ex vivo* Expansion stellt die Generierung dieser Zellmengen aus Nabelschnurblut dar. Aus einer Spende können hier durchschnittlich nur $5,8 \cdot 10^5$ CFU-GM beziehungsweise $5 \cdot 10^6$ CD34⁺-Zellen gewonnen werden [252]. Ausgehend von einem durchschnittlichen Gewicht eines Patienten von 70 kg, sollte ein klinisches System demnach ein Expansionspotenzial von einem Faktor 25 für CFU-GM beziehungsweise einem Faktor 28 für CD34⁺-Zellen haben.

Diese Anforderungen stellen für einen kontrollierten Bioreaktor ein Scale-down Problem dar. Für Suspensionssysteme gilt dabei, ausgehend von einer auf CD34⁺-Zellen aufgereinigten Nabelschnurblutprobe, dass man in der Lage sein muss, die Kultivierung mit nur 50 mL Kulturvolumen zu starten. Diese Berechnung beruht auf der mittleren Inokulumsdichte von $1 \cdot 10^5$ c/mL (vergleiche Abschnitt 2.5.3.5 auf Seite 22). Die Abschätzung des maximalen Volumens muss neben der erforderlichen Zellzahl von CD34⁺-Zellen auch die Ausdifferenzierung während der Kultur berücksichtigen. Nimmt man nach zehn Tagen Kultur einen konservativen Wert von 5 % CD34⁺-Zellen an, so müssen bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ c/mL 280 mL Kulturvolumen zur Verfügung stehen. Diese Abschätzung stellt den denkbar ungünstigsten Fall dar, da CFU-GM keiner so starken Ausdifferenzierung unterliegen, wie die CD34⁺-Zellen. Für immobilisierte Zellen ist eine solche Abschätzung wesentlich schwieriger. Die Anwesenheit der Stromalen Zellen vergrößert das benötigte Volumen am Anfang der Kultur deutlich. Desweiteren kann in einem solchen System das Volumen nicht wie in der Suspensionskultur beliebig gesteigert werden. Über die Besiedlung einer zusätzlich zur Verfügung gestellten Oberfläche durch bereits immobilisierte Zellen ist bisher nicht berichtet worden. Ein solches Konzept ist wahrscheinlich auch nur schwer zu realisieren. Man muss daher ein Mittelmaß zwischen Inokulumsdichte und zu erreichender Zellzahl finden. In einem mikroträgergestützten System, wie es der in dieser Arbeit vorgestellte Festbettreaktor ist, können Dichten über $1 \cdot 10^8$ Zellen pro mL Trägerschüttvolumen erreicht werden [18]. Der Anteil der Stromalen Zellen würde dabei nur etwa 1 % betragen, kann also vernachlässigt werden. Eine äquivalente Rechnung wie für die Suspensionskulturen muss berücksichtigen, dass die Ausdifferenzierung im stromahaltigen System verlangsamt ist. Hier sind 15 % CD34⁺-Zellen eine konservative Schätzung. Daraus ergibt sich ein benötigtes Trägerschüttvolumen von etwa 10 mL. Die Inokulumsdichte würde dann $5 \cdot 10^5$ c/mL_{Schüttung} betragen.

Die Kultivierung von T-Lymphozyten stellt zunächst keine neuen Aufgaben an die Kultivierungstechnik. Die benötigten Zellzahlen reichen bis zu $2 \cdot 10^{11}$ Zellen unspezifisch vermehrter [147] oder $1 \cdot 10^9$ spezifisch vermehrter Zellen [206]. Für die Generierung dieser Zellzahl stehen eine Vielzahl von Suspensionsreaktoren aus dem Bereich der tierischen Zellkultur zur Verfügung (siehe beispielsweise [72]). Jedoch kann die Zellzahl zu Beginn der Kultivierung extrem gering sein, unter Umständen handelt es sich dabei nur um weniger als

100 spezifische Zelle. Eine klare Abschätzung, wie sie oben für die Kultivierung bei Transplantationen gezeigt wurde, ist daher nicht möglich. Eine Verkleinerung von kontrollierten Bioreaktoren ist jedoch auch hier angeraten, damit eine Kultivierung mit steuerbaren Parametern schon bei möglichst kleinen Zellzahlen durchgeführt werden kann.

Bei klinischen Anwendungen ist über die konkrete Aufgabenstellung hinaus, nämlich die Vermehrung einer bestimmten Zellpopulation auf eine therapeutisch anwendbare Menge, die Anwendbarkeit im klinischen Umfeld zu berücksichtigen. Dadurch erweitert sich das Anforderungsprofil um Aspekte der Betriebssicherheit und leichten Bedienbarkeit. Im Einzelnen sollte das Kultursystem zusätzlich die folgenden Punkte erfüllen:

- Einhaltung der Regeln der Good Manufacturing Practice (GMP)
- Ausschließliche Verwendung definierter Materialien
- Sichere Steriltechnik
- Möglichst geschlossenes System
- Einfachheit in der Bedienung
- Hoher Grad an Automatisierung
- Kosteneffizienz

Eine genaue gesetzliche Regelung der Anforderungen an eine *ex vivo* Kultivierung hämatopoetischer Zellen existiert noch nicht. Wichtige Anhaltspunkte geben die Ausarbeitungen der Food and Drug Administration des Gesundheitsministeriums der USA (zum Beispiel [182, 183, 184]). Dort werden zur Zeit entsprechende Regularien entwickelt (den aktuellen Stand der Entwicklung und die verfügbaren Veröffentlichungen findet man im World Wide Web unter <http://www.fda.gov/cber/tissue>). In Deutschland unterliegt die Präparation von Zellen, die Patienten verabreicht werden, dem Arzneimittelgesetz und dem Transfusionsgesetz. Sofern die Präparation nicht individuell für einen Patienten durchgeführt wird, ist diese auch zulassungspflichtig [95]. Die Grundlagen für die Herstellungserlaubnis und die Zulassung bilden neben den Gesetzestexten unter anderem die Richtlinien der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Institutes [278, 279].

2.6 Verfahrenstechnische Grundlagen

Die ingenieurtechnischen Arbeiten bei der Entwicklung neuer Kultursysteme können in die Bereiche Konstruktion, Charakterisierung und Optimierung eingeteilt werden. Die Konstruktion muss insbesondere die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen biologischen Randbedingungen berücksichtigen. Eine genaue Charakterisierung bildet die wichtige Grundlage für eine umfassende Bilanzierung und die dadurch mögliche gezielte Optimierung der Prozesse. Die Charakterisierung der Systeme ist zunächst von den biologischen Hintergründen unabhängig.

Eine wesentliche Aufgabe einer Strömung in einem Bioreaktor, die zum Beispiel durch einen Rührer erzeugt werden kann, ist die Makro- und Mikromischung des Kulturmediums, um Gradienten abzubauen. Die Strömung in einem gerührten System ist dabei praktisch immer im nicht-laminaren Bereich. Das Makromischen ist für den Transport von Flüssigkeitsballen verantwortlich und ist stark maßstabsabhängig. In einem diskontinuierlichen Prozess, wie ihn zum Beispiel die gerührten Kulturen hämatopoetischer Zellen darstellen, kann die Mischungsintensität mit der integralen Größe der Mischzeit beschrieben werden. In einem kontinuierlichen Prozess, wie ihn ein Perfusionsreaktor darstellt, beschreibt die Verweilzeitverteilung das Makromischen. Das Mikromischen ist die Homogenisierung der Flüssigkeitsballen mit der Umgebung auf molekularer Ebene. Dieses ist von den Stoffwerten und der spezifischen Rührerleistung abhängig [312]. Im Mischprozess ist aber die Makro-

vermischung geschwindigkeitsbestimmend [148]. Daher wird in dieser Arbeit ausschließlich diese Makrovermischung charakterisiert.

Die zweite wichtige Aufgabe einer Strömung in einem Bioreaktor ist die Verbesserung des Stoffübergangs. Damit kann sowohl die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff verbessert, als auch entstandenes CO₂ effektiver aus dem Medium entfernt werden.

Die Grundlagen der Misch- und Verweilzeitverteilung sowie des Stoffübergangs werden im Folgenden beschrieben. Abschließend wird auf die laminaren Scherkräfte in einem Rotationsviskosimeter eingegangen. Diese sind die Grundlage für die Untersuchungen des Scherkraft-Einflusses in Abschnitt 4.4 auf Seite 65, die für die Etablierung einer Modellzelllinie entscheidend sind.

2.6.1 Mischzeitverhalten

Sind Flüssigkeiten vollständig ineinander lösbar, so kann eine Durchmischung bis auf molekularer Ebene erfolgen. Für die Beschreibung eines solchen Vorganges wird die Mischzeit θ_δ definiert. Sie gibt den Zeitbedarf für eine bestimmte Annäherung an die Homogenität an. Der Homogenisierungsgrad δ ist dabei die relative Abweichung von der Homogenität. Mischt man eine Komponente i in eine Flüssigkeit, so steigt die Konzentration x_i der Komponente i von $x_{i,0}$ zu Beginn des Mischprozesses auf $x_{i,\infty}$ bei vollständiger Homogenisierung. Für die relative Abweichung gilt dann:

$$\delta = \frac{x_{i,\infty} - x_i}{x_{i,\infty} - x_{i,0}} \quad (2.1)$$

mit: δ = Homogenisierungsgrad [-]
 x_i = Konzentration der Komponente i [kg/m³]

Weiterhin ist der Mischungsgrad definiert als:

$$M = 1 - \delta \quad (2.2)$$

mit: M = Mischungsgrad [-]

Die zu Vergleichszwecken üblicherweise verwendete Mischzeit $\theta_{0,01}$ gibt also die Zeit an, die bis zu einem Mischungsgrad von 99 % notwendig ist. In der Regel nimmt die Abweichung von der vollständigen Homogenität exponentiell ab. Nach HIBY kann der zeitabhängige Verlauf durch die Gleichung

$$M = 1 - \exp(k_1 - k_2(\theta_\delta - t_v)) \quad (2.3)$$

mit: $k_{1,2}$ = Konstanten [-]
 θ_δ = Mischzeit [s]
 t_v = Verzögerungszeit [s]

beschrieben werden [86]. Dabei müssen die Konstanten experimentell ermittelt werden. Die Verzögerungszeit, die besonders bei laminaren Strömungen auftritt, kann in der Regel vernachlässigt werden.

In gerührten diskontinuierlichen Systemen mit festen geometrischen Verhältnissen und mit einem Stoffsystem ohne Dichte- und Viskositätsunterschiede hängt die Mischzeit nur von den Stoffwerten der Dichte ρ und der kinematischen Viskosität ν , der Rührerdrehzahl n und dem Rührerdurchmesser d , als charakteristische Länge, ab:

$$\theta_\delta = f(\rho, \nu, n, d) \quad (2.4)$$

mit: ρ = Dichte $[\text{kg}/\text{m}^3]$
 ν = kinematische Viskosität $[\text{m}^2/\text{s}]$
 n = Rührerdrehzahl $[\text{1}/\text{s}]$
 d = Rührerdurchmesser $[\text{m}]$

In dimensionsloser Schreibweise ergibt sich daraus:

$$n \theta_\delta = f(Re_r) \quad (2.5)$$

mit der Rührer-Reynoldszahl:

$$Re_r = \frac{n d^2}{\nu} \quad (2.6)$$

Der Ausdruck $n\theta_\delta$ wird auch als Mischzeit-Kennzahl bezeichnet und gibt die Anzahl der notwendigen Rührerumdrehungen an, die erforderlich sind, um den durch δ charakterisierten Homogenisierungsgrad zu erreichen. Mit der Gleichung (2.6) kann nun die Mischzeit-Charakteristik eines Systems beschrieben werden. Üblicherweise nimmt die Mischzeit-Kennzahl mit zunehmender Reynoldszahl zunächst ab und ist im turbulenten Strömungsbereich konstant [240].

Für die experimentelle Bestimmung des Mischzeitverhaltens sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden. Sie unterscheiden sich vor allem in der Größe des vermessenen Volumenelementes und dem experimentellen Aufwand. Die gebräuchlichsten Methoden sollen hier kurz vorgestellt werden (ausführlichere Übersichten finden sich bei [60, 86, 98, 312]):

- **Änderung der Leitfähigkeit:**
Durch die Zugabe einer geringen Menge eines Elektrolyts (zum Beispiel einer Salzlösung) in das zu untersuchende System kann die Veränderung der Leitfähigkeit gemessen werden. Dies geschieht mit Sonden, die zusätzlich eine Messung in einem sehr kleinen Volumen erlauben. Auch die örtlichen Unterschiede in einem System können so untersucht werden. Diese Methode ist nur schwer in stark salzhaltigen Lösungen, wie Kulturmedium, durchzuführen.
- **Farbumschlag mit einem chemischen Indikator:**
Legt man in dem System einen chemischen Indikator vor, so können zwei Reaktanden in geringer Konzentration eine schnelle Neutralisationsreaktion miteinander eingehen. Durch den Indikator ändert sich bei einem kritischen pH-Wert das Spektrum der Farbextinktion, die beispielsweise mit Photoelementen detektiert werden kann. Ein Beispiel ist der Farbumschlag von Phenolrot in einem pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,5 durch die Zugabe einer Säure oder Lauge. Diese Methode ist sehr einfach zu realisieren und durch abwechselnde Zugabe von Säure und Lauge beliebig oft wiederholbar. Nachteilig ist, dass sie im neutralen pH-Bereich, also am Umschlagpunkt, nur sehr ungenaue Ergebnisse liefert. Die Methode ist auch nicht in stark puffernden Medien, wie Kulturmedium, einsetzbar.
- **Chemische entfärbende Reaktion:**
Diese Methode funktioniert ähnlich wie die Methode des Farbumschlages. Die Flüssigkeit im System wird mit Jod J_2 gefärbt. Durch die Zugabe einer stöchiometrisch gleichen Menge Natriumthiosulfats $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ findet eine schnelle, transportkontrollierte Entfärbungsreaktion statt. Der Übergang vom gefärbten zum farblosen Zustand kann erneut durch Photoelemente gemessen werden.

- Änderung der Temperatur:
Durch die Zugabe von heißer Flüssigkeit in die im System vorliegende kalte Flüssigkeit kann über Thermolemente die Durchmischung gemessen werden. Eine andere Möglichkeit bietet die Messung bei der Einleitung einer schnellen, transportkontrollierten Reaktion zwischen zwei chemischen Reaktanden, zum Beispiel bei einer Neutralisation. Diese Methode ist recht einfach und liefert über die Thermolemente auch Informationen über die lokale Vermischung. Sie geht aber in jedem Fall von einem adiabaten System aus, weshalb sie besonders bei diskontinuierlichen Systemen nachteilig ist.

2.6.2 Verweilzeitverhalten

Das Verweilzeitverhalten stellt die Beschreibung des Makromischens in einem kontinuierlichen Prozess dar. Eine genaue Beschreibung des Geschwindigkeitsfeldes in einem durchströmten System ist meistens nicht möglich. Man untersucht daher die Verteilung der Aufenthaltszeit eines Flüssigkeitselements im System. Dafür wird am Eingang des kontinuierlichen Prozesses eine Markierung mit einer Tracersubstanz aufgebracht und die zeitliche Veränderung der Substanz am Ausgang gemessen. Die Markierung kann dabei entweder ein DIRAC-Impuls sein oder eine Stufenmarkierung. Das Ausgangssignal kann mathematisch beschrieben werden (vergleiche [145, 148]). Dazu wird die Verweilzeitsummenfunktion herangezogen. Sie gibt an, welcher Anteil der Tracersubstanz eine Verweilzeit im Prozessraum kleiner t hat. Für die Tracerkonzentration $x_T(t)$ am Ausgang zum Zeitpunkt t gilt demnach:

$$F(t) = \frac{x_T(t)}{x_T(t = \infty)} \quad (2.7)$$

mit: t = Zeit [s]
 $F(t)$ = Verweilzeitsummenfunktion [-]
 $x_T(t)$ = Tracerkonzentration [kg/m³]

Prinzipiell unterscheidet man zwei Idealzustände. Beim idealen Strömungsrohr findet im Reaktor keinerlei Vermischung der Tracersubstanz statt, beim idealen Rührkessel findet zu jeder Zeit eine vollständige Vermischung statt. Zwischen diesen Extrema liegen nicht ideale Zustände vor. Abbildung 2.11 auf Seite 30 zeigt die Verweilzeitsummenfunktion als Antwort auf eine Stufenmarkierung für die beiden idealen Zustände und einen beispielhaften nicht-idealen Zustand dazwischen. Bei der Beaufschlagung mit einer Stufenfunktion gilt für die Verweilzeitsummenfunktion im Falle des idealen Rührkessels:

$$F(t) = 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.8)$$

mit: τ = mittlere Verweilzeit [s]

und im Falle des idealen Strömungsrohrs:

$$F(t) = 0 \quad \forall t < \tau \quad (2.9)$$

$$F(t) = 1 \quad \forall t \geq \tau \quad (2.10)$$

Für die mittlere Verweilzeit:

$$\tau = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad (2.11)$$

mit: $V_R =$ Reaktorvolumen $[\text{m}^3]$
 $\dot{V} =$ Volumenstrom durch das System $[\text{m}^3/\text{s}]$

Darüber hinaus macht es Sinn, eine Zeit t_{50} zu definieren, in der das Volumen genau zur Hälfte ausgetauscht ist. Damit lassen sich die Ergebnisse der diskontinuierlich gefütterten Versuche in der Hämatologie, die üblicherweise mit halben Medienwechseln durchgeführt werden, einfach mit kontinuierlichen Prozessen vergleichen. Bei Annahme eines idealen Rührkessels gilt dabei insbesondere nicht $t_{50} = 0,5\tau$, was oft fälschlich angenommen wird. Vielmehr ergibt sich aus Gleichung (2.8) auf der vorherigen Seite:

$$t_{50} = -\tau \ln\left(\frac{1}{2}\right) \approx 0,693\tau \quad (2.12)$$

mit: $t_{50} =$ Dauer eines halben Medienwechsels [s]

was immerhin eine Abweichung von über 38 % zu der falschen Annahme bedeutet.

Für die nicht idealen Zustände bei kontinuierlichen Prozessen kann das Modell der Rührkesselkaskade herangezogen werden. Hier berechnet man die Verweilzeitsummenfunktion des Systems so, als seien mehrere ideale Rührkessel als Kaskade hintereinander geschaltet. Die Zahl der Rührkessel muss dabei aus Experimenten ermittelt werden. Für eine ideale Rührkesselkaskade gilt:

$$F(t) = 1 - \exp\left(-\frac{Nt}{\tau}\right) \sum_{i=1}^N \frac{\left(\frac{Nt}{\tau}\right)^{i-1}}{(i-1)!} \quad (2.13)$$

mit: $N =$ Anzahl der Rührkessel [-]
 $\tau =$ mittlere Verweilzeit der Kaskade [s]

Für die Grenzwerte $N = 1$ und $N \rightarrow \infty$ geht diese Gleichung in die Formen des idealen Rührkessels (Gleichung (2.8) auf der vorherigen Seite) und idealen Strömungsrohrs (Gleichung (2.9) auf der vorherigen Seite und Gleichung (2.10) auf der vorherigen Seite) über.

Die experimentelle Ermittlung des Verweilzeitverhaltens bedient sich ähnlicher Methoden wie die Mischzeituntersuchungen. Als Tracersubstanzen dienen zumeist Farbstoffe oder Elektrolytlösungen, deren Konzentrationsverlauf am Auslauf des Systems photometrisch oder durch eine Leitfähigkeitsmessung bestimmt wird. Liegt ein idealer Rührkessel vor, ist auch eine Messung im Reaktorraum selbst denkbar, da dort die Konzentration wegen der idealen Vermischung identisch mit der am Auslauf ist.

2.6.3 Sauerstoffeintrag

Die Sauerstoffversorgung ist eine der zentralen Problemstellungen für Zellkulturprozesse. Alle Kulturen sind aerobe Prozesse, und ein Mangel an Sauerstoff führt schnell zu einem Absterben der Zellen. Da Säugerzellen, so auch hämatopoetische Zellen, keine Zellwand besitzen, sind besonders schonende diffusive Begasungskonzepte notwendig. Eine Blasenbegasung ist für Zellkulturen im Labormaßstab nur sehr schwer zu realisieren. Übliche Techniken sind daher die diffusive Begasung direkt über die Flüssigkeitsoberfläche oder durch eine Membran.

Neben dem Eintrag von Sauerstoff dient die Begasung auch in begrenztem Maße der Beeinflussung des pH-Wertes. Das Kohlendioxid, das von den Zellen produziert wird, versäuert besonders bei hohen Zelldichten das Medium stark. Durch die Diffusion aus der

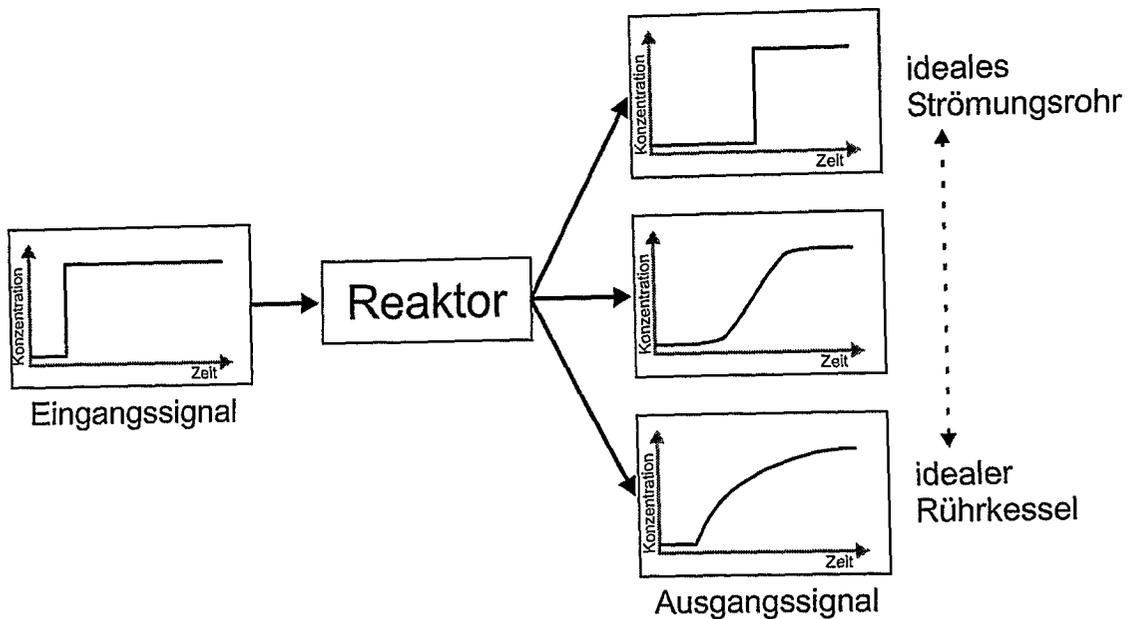


Abbildung 2.11: Die Verweilzeitsummenfunktionen als Ausgangssignal eines kontinuierlichen Reaktors nach einer Stufenmarkierung

Flüssigkeit in die Gasphase kann zumindest ein Teil des CO_2 ausgetragen und so der Versäuerung entgegen gewirkt werden. Umgekehrt bietet es sich an, der Gasphase bei kleinen Zelldichten einen geringen Anteil (zirka 5%) CO_2 beizumischen, um zu verhindern, dass das Medium zu basisch wird.

Für eine reine Oberflächenbegasung in einem Bioreaktor ergibt sich für den volumenbezogenen Sauerstoffeintrag OTR (englisch, Oxygen Transfer Rate) aus der klassischen Film- und Penetrationstheorie und dem Henry'schen Gesetz:

$$OTR = \frac{\dot{m}}{V_R} = k_l a (x_i^* - x_l) = \frac{k_l a}{H} (p_g - p_l) \quad (2.14)$$

mit: OTR	= volumenbezogenen Sauerstoffeintrag	$[\text{kg}/\text{m}^3 \text{ s}]$
V_R	= Reaktorvolumen	$[\text{m}^3]$
\dot{m}	= Gesamt-Massenstrom des Sauerstoffs	$[\text{kg}/\text{s}]$
k_l	= flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient	$[\text{m}/\text{s}]$
a	= volumenbezogene Oberfläche	$[\text{m}^2/\text{m}^3]$
x_i^*	= Stoffkonzentration in der Flüssigkeit an der Phasengrenze	$[\text{kg}/\text{m}^3]$
x_l	= Stoffkonzentration in der Flüssigphase	$[\text{kg}/\text{m}^3]$
H	= Henry-Koeffizient	$[\text{Pa m}^3/\text{kg}]$
p_g	= Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase	$[\text{Pa}]$
p_l	= Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	$[\text{Pa}]$

Der gassetige Stoffübergangswiderstand kann üblicherweise vernachlässigt werden.

Eine Messung des $k_l a$ -Wertes in Bioprozessen kann mit verschiedenen Methoden erfolgen (eine ausführliche Beschreibung findet sich in [251]):

- Die stationäre Methode:
Im laufenden Prozess, also mit einem biologischen Verbraucher in der Flüssigkeit, misst man an einem stabilen Betriebspunkt die Sauerstoffkonzentrationen in der Zu-

und Abluft sowie in der Flüssigkeit. Durch eine Bilanzierung erhält man den $k_{l}a$ -Wert. Die Voraussetzung des stabilen Betriebspunktes ist in biologischen Prozessen aber nur kurzzeitig realisierbar. Weiterhin stellt die Messung der Abreicherung des Sauerstoffes in der Gasphase eine große messtechnische Herausforderung dar. Ganz besonders gilt dies bei Zellkulturen, deren Sauerstoffverbrauch vergleichsweise gering ist.

- Die instationäre Methode:

Hier wird die Sauerstoffversorgung einer laufenden Kultur kurzzeitig ab- und dann wieder angestellt. Mit einer Sauerstoffelektrode werden der Abfall und spätere Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium gemessen. Aus dem Abfall errechnet sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen, womit dann zusammen mit dem gemessenen Anstieg der $k_{l}a$ -Wert errechnet werden kann.

Eine Variation dieser Methode arbeitet ohne biologischen Verbraucher. Der Sauerstoff der Flüssigphase wird mit Stickstoff ausgeblasen. Danach wird nur der Anstieg der Sauerstoffkonzentration durch die Begasung gemessen, woraus sich direkt der $k_{l}a$ -Wert errechnen lässt.

- Die Sulfit-Methode:

In der Abwesenheit von Zellen wird in Anwesenheit eines Kupfer- oder Kobaltkatalysators Natriumsulfit oxidiert. Die Konzentration des Sauerstoffs in der Flüssigphase ist dadurch immer gleich Null. Aus der zeitlichen Normalitätsänderung der Sulfit-Lösung oder der Messung der sich abreichernden Gasphase kann der Sauerstoffeintrag bestimmt werden.

Bei einer Membranbegasung muss statt des flüssigkeitsseitigen Stoffübergangskoeffizienten, der Stoffdurchgangskoeffizient verwendet werden. Dabei gilt:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{k_m} + \frac{1}{k_l}} \quad (2.15)$$

mit: K = Stoffdurchgangskoeffizient [m/s]
 k_m = Stoffübergangskoeffizient der Membran [m/s]

Der Stoffübergangskoeffizient der Membran lässt sich mit der Permeabilität des Membranwerkstoffes und der Wandstärke der Membran berechnen:

$$k_m = \frac{P H}{\delta} \quad (2.16)$$

mit: P = Permeabilität der Membran [kg/m Pa s]
 δ = Membranwandstärke [m]

Auch hier kann der gaseitige Transportwiderstand vernachlässigt werden.

Im Falle einer Begasung mit einer durchströmten Schlauchmembran muss für die Wandstärke allerdings ein korrigierter Wert eingesetzt werden. Falls die Flüssigphase durch den Schlauch geleitet wird, während sich die Gasphase außerhalb des Schlauches befindet, gilt:

$$\delta = \frac{1}{2} d_i \ln \left(\frac{d_a}{d_i} \right) \quad (2.17)$$

mit: d_i = Schlauchinnendurchmesser [m]
 d_a = Schlauchaußendurchmesser [m]

Darüber hinaus muss als treibendes Gefälle hier der logarithmische Mittelwert zwischen dem Gefälle am Eingang und am Ausgang der Schlauchmembran eingesetzt werden. Insgesamt gilt daher für den Gesamt-Massenstrom über die Membran:

$$\dot{m} = \frac{K A}{H} \frac{p_{l,A} - p_{l,E}}{\ln\left(\frac{p_g - p_{l,E}}{p_g - p_{l,A}}\right)} = \frac{\dot{V}}{H} (p_{l,A} - p_{l,E}) \quad (2.18)$$

mit: A = Membranfläche [m²]
 $p_{l,A}$ = Partialdruck in der Flüssigkeit am Ausgang der Membran [Pa]
 $p_{l,E}$ = Partialdruck in der Flüssigkeit am Eingang der Membran [Pa]
 \dot{V} = Volumenstrom durch die Membran [m³/s]

Der flüssigkeitsseitige Stoffeintrag bei einer solchen Schlauchmembran-Begasung lässt sich auch dimensionslos darstellen. Die Kennzahlen dieses Problems sind die Rohr-Reynoldszahl:

$$Re_R = \frac{v d_i}{\nu} \quad (2.19)$$

mit: v = mittleren Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit [m/s]

die Schmidtzahl:

$$Sc = \frac{\nu}{D} \quad (2.20)$$

mit: D = Diffusions-Koeffizienten der Flüssigkeit [m²/s]

und die Sherwoodzahl:

$$Sh = \frac{k_l d_i}{D} \quad (2.21)$$

Aus der Analogie von Stoff- und Wärmeaustausch kann man für das vorliegende Problem eine empirische Gleichung angeben [185]:

$$Sh = \sqrt[3]{3,66^3 + 1,61^3 Re_R Sc} \frac{d_i}{L} \quad (2.22)$$

mit: L Länge der Schlauchmembran [m]

2.6.4 Laminare Scherkräfte im Rotationsviskosimeter

Die Scherkräfte in realen Bioreaktoren sind ähnlich wie die Strömungs-Charakteristik nicht genau zu bestimmen. Für einen Vergleich des Verhaltens von verschiedenen Zelltypen unter Scherbelastung setzt man die Zellen definierten laminaren Scherkräften aus. Die ideale laminare Strömung bildet sich zwischen einer ruhenden und einer sich bewegenden planparallelen Platte aus. Hier gilt bei Newton'schen Fluiden:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (2.23)$$

mit: τ = Schubspannung [Pa]
 η = dynamischen Viskosität [kg/m s]
 $\dot{\gamma}$ = Geschwindigkeitsgradienten [1/s]

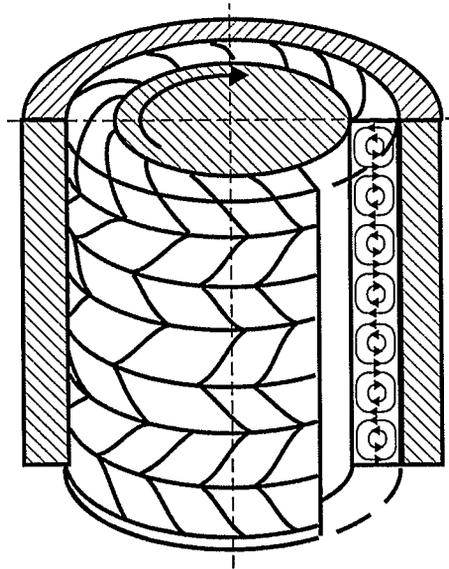


Abbildung 2.12: Taylorwirbel in einem Searle-Viskosimeter (nach [196])

In der Praxis ist ein solches System nur schwer realisierbar. Daher verwendet man Rotationsviskosimeter. In diesen wird in einem Spalt zwischen zwei konzentrischen Zylindern durch die Bewegung einer der Zylinder eine laminare Strömung erzeugt. Wird dabei der äußere Zylinder bewegt, spricht man von einem Couette-System, bei Bewegung des inneren Zylinders von einem Searle-System. Wählt man den Spalt zwischen den Zylindern klein genug, so kann von einer konstanten Schubspannung über die ganze Spaltbreite ausgegangen werden.

Im Searle-System können jedoch Störungen der Strömung durch Zentrifugalkräfte entstehen. Lange bevor die Strömung turbulent wird, können sich dadurch im System gegenläufige Ringwirbel, so genannte Taylorwirbel, bilden (Abbildung 2.12). Für die Charakterisierung des Strömungszustandes wird daher bei Rotationsviskosimetern nicht die Reynolds-Zahl, sondern die Taylorzahl Ta herangezogen.

Die Taylorzahl ist definiert als:

$$Ta = \frac{\omega \delta r_i}{\nu} \left(\frac{\delta}{r_i} \right)^{0,5} \quad (2.24)$$

mit: ω = Winkelgeschwindigkeit [1/s]
 δ = Spaltbreite [m]
 r_i = Radius des inneren Zylinders [m]

Bis zu einer Taylorzahl von 41,3 ist die Strömung laminar. Im Bereich zwischen 41,3 und 400 bilden sich Taylorwirbel aus, und bei Werten über 400 ist die Strömung vollständig turbulent.

Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden der vorliegenden Arbeit erläutert. Es wird dabei im Wesentlichen auf die prinzipiellen Vorgehensweisen eingegangen. Ein Herstellernachweis der Geräte und Chemikalien findet sich im Anhang in Kapitel B auf Seite 187, die genaue Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen in Kapitel C auf Seite 193 und die detaillierten Protokolle der Methoden in Kapitel D auf Seite 195. Alle Arbeiten mit Zellen, Medien und Seren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeiten, die ein Öffnen der sterilen Behältnisse erforderten, fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt.

3.1 Medien

Sämtliche in dieser Arbeit benutzten Medien sowie die Seren und das Plasma sind kommerziell in flüssiger Form erhältlich. Sie werden steril verpackt geliefert und längerfristig bei -20 °C gelagert. Kurzfristige Lagerungen, wie sie in den Vorlageflaschen während perfundierter Kulturen notwendig sind, finden bei 4 °C statt. Die genauen Medienzusammensetzungen der sehr unterschiedlichen Kulturen dieser Arbeit werden zusammen mit den Ergebnissen der jeweiligen Experimente beschrieben.

3.1.1 Kulturmedien

Für serumhaltige Kulturen früher hämatopoetischer Zellen wurde als Basalmedium Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) eingesetzt. Dieses Medium ist stark mit Aminosäuren, Vitaminen und Glukose angereichert. Die Zusammensetzung ist vollständig bekannt und in Kapitel C auf Seite 193 aufgelistet. IMDM wurde, soweit es nicht anders angegeben ist, ohne den Zusatz von Antibiotika verwendet.

Für die serumhaltige Kultivierung der T-Lymphozyten, der Zielzellen des Zytotoxizitäts Assays und teilweise für die stromalen Zelllinien kam als Basalmedium RPMI 1640 zum Einsatz. Auch dieses Medium ist vollständig dokumentiert und im Anhang beschrieben. Die Zusammensetzung unterscheidet sich nur wenig vom IMDM, wobei die Inhaltsstoffe in geringeren Konzentrationen vorliegen.

Das serumfrei verwendete X-Vivo 10 ist ein spezielles Medium für die humane Zellkultur. Seine genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt, doch wird dieses Medium auf der Basis von IMDM hergestellt. Es enthält zusätzliche Bestandteile, wie humanes Insulin, Transferrin und Albumin, weshalb es nicht zu den definierten Medien gezählt werden kann. X-Vivo 10 ist in zwei Varianten erhältlich, entweder mit dem pH-Indikator Phenolrot und dem Antibiotikum Gentamicin oder ohne diese beiden Stoffe. Letzteres wurde bei den antibiotikafreien Kultivierungen hämatopoetischer Zellen verwendet. In diesen Fällen wurde das Phenolrot als steril filtrierte Lösung entsprechend der Konzentration im IMDM ergänzt. Für die Kultivierung der Zelllinie NK-92 wurde das Medium mit dem Zusatz von Gentamicin, Phenolrot und humanem Plasma verwendet.

Als zweites undefiniertes und serumfreies Medium kam CellGro SCGM (Stem Cell Growth Medium) zum Einsatz. Dieses Medium ist speziell für frühe hämatopoetische Zellen entwickelt worden und wird im Normalfall antibiotikafrei verwendet.

3.1.2 Seren und Plasma

Serum ist der flüssige Anteil des Blutes, der nach der Blutgerinnung verbleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde fötales Kälberserum (englisch Fetal Calf Serum (FCS)) und Pferdeserum (englisch horse serum (HS)) benutzt. Jede neue Serumcharge wurde vor ihrem Gebrauch auf ihre Wirkung bei hämatopoetischen Zellen getestet. Die Chargen, die im Vergleich zu vorhandenen Chargen eine geringere Proliferation der Zellen bewirkten, wurden verworfen. Die übliche Konzentration des Serums betrug für das FCS 10 %, nur bei der Kultivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden abweichend davon 12,5 % FCS und 12,5 % HS eingesetzt.

Für die Kultivierung der Zelllinie NK-92 wurde humanes hitzeinaktiviertes Quarantäne-Plasma (hhiQ-Plasma) verwendet. Im Gegensatz zum Serum ist das Plasma der flüssige Anteil des Blutes nach der Zellabtrennung, der, beispielsweise mit Trinatriumzitat, ungerinnbar gemacht wurde. Es enthält insbesondere noch Fibrinogen [90]. Das Plasma wird sechs Monate bei -20 °C in Quarantäne gelagert. Der Spender des Plasmas, der nach allgemeinen Kriterien, wie etwa dem Blutbild, gesund sein muss, wird vor der Spende und nach dem Ablauf der sechsmonatigen Quarantänezeit zusätzlich auf Infektionen mit HIV, Hepatitis B und C sowie Syphilis (TPHA-Test) getestet. Erst bei negativen Befunden für alle Tests wird das Plasma freigegeben. Für die Hitzeinaktivierung wird das Plasma für 30 Minuten auf 56 °C erhitzt. Dabei fallen die Proteine aus, insbesondere die Immunglobuline, die bei einem Einsatz mit immunkompetenten Zellen unter Umständen ungewollte Reaktionen hervorrufen können. Das hitzeinaktivierte Plasma wird abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Vor dem Einsatz des aufgearbeiteten Plasmas wurde ein zusätzlicher Steriltest angelegt.

Eine identische Hitzeinaktivierung ist für die Kultivierungen der T-Lymphozyten auch mit FCS durchgeführt worden.

3.2 Zytokine

Alle in der vorliegenden Arbeit benutzten Zytokine sind mit rekombinanten Organismen produzierte und kommerziell erhältliche humane Wachstumsfaktoren. Für die Kultivierung von CD34⁺-Zellen kamen drei Zytokinkombinationen zum Einsatz. Diese sind in Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite aufgelistet. Der erste Zytokinstandard wurde aus Erfahrungen aus der Literatur zusammengestellt. Aufgrund der schnellen Entwicklungen im Bereich der Kultivierung hämatopoetischer Zellen wurde während der Arbeit der zweite Standard eingeführt. Der dritte Standard entstammt einer strukturierten Untersuchung über den Einfluss der Zytokine, bei der die optimierte Kombination mithilfe eines genetischen Algorithmus bestimmt worden war [261]. Der genetische Algorithmus ist ein mathematisch strukturierter Ansatz für eine parallele Optimierung von Medienzusammensetzungen in einem Mehrparameterfeld [295]. Die Zielgröße der Optimierung war dabei die maximale Expansion der CD34⁺-Zellen pro eingesetzter Menge Zytokine.

Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, werden in den Beschreibungen der Kultivierungen von CD34⁺-Zellen der folgenden Kapitel nur noch die Nummern der eingesetzten Standards genannt, wie sie in Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite definiert sind.

Die wesentlichen Eigenschaften der verwendeten Zytokine sind im Folgenden vorgestellt (nach [3, 28, 46, 74, 93]):

- Interleukin-2

IL-2 ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 16 kDa, das *in vivo* hauptsächlich von T-Lymphozyten produziert wird. Es zeigt eine stark stimulierende Wirkung auf die Proliferation von T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen.

Tabelle 3.1: Die Zytokinkombinationen für die Kultivierung CD34⁺-Zellen dieser Arbeit

Standard 1	Standard 2	Standard 3
5 ng/mL IL-3	10 ng/mL IL-3	10 ng/mL IL-3
1 ng/mL GM-CSF	100 ng/mL IL-6	50 ng/mL IL-6
5 ng/mL SCF	50 ng/mL GM-CSF	50 ng/mL SCF
	50 ng/mL SCF	10 ng/mL FL
	100 ng/mL FL	

- **Interleukin-3**
IL-3 ist ein stark glykosyliertes Protein mit einer Masse von 28 kDa und wird im Menschen ebenfalls von T-Lymphozyten produziert. Es wirkt positiv auf die Proliferation von sehr frühen hämatopoetischen Zellen und zeigt synergistische Eigenschaften mit anderen Zytokinen.
- **Interleukin-6**
Interleukin-6 (IL-6) hat eine Molekülmasse von 25 kDa. Im Organismus wird es von T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Hepatozyten hergestellt. Ähnlich wie das IL-3 zeigt IL-6 Synergien mit anderen Wachstumsfaktoren und wirkt auf frühe hämatopoetische Zellen.
- **Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor**
Der GM-CSF ist ein Zytokin, das von Makrophagen, Endothelzellen und T-Lymphozyten produziert wird. Es ist 22 kDa schwer. GM-CSF ist ein auf weiter ausdifferenzierte Zellen wirkendes Zytokin. Es hat starke Wirkung auf die Proliferation und Aussdifferenzierung von Granulozyten und Makrophagen, auf reife neutrophile und eosinophile Zellen sowie Monozyten.
- **Stem Cell Factor**
Der 28 kDa schwere SCF ist ein sehr potentes glykosyliertes Zytokin, das sehr frühe Vorläuferzellen der myeloiden und lymphoiden Reihe unterstützt, aber auch reife Granulozyten, Mastzellen und Megakaryozyten. Er wird von den stromalen Zellen im Knochenmark gebildet.
- **FLT-3 Ligand**
FL ist ein stark synergistischer Wachstumsfaktor mit einer Masse von 30 kDa. Er unterstützt sehr frühe Vorläuferzellen sowie reife Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten. Er wird von stromalen Zellen, besonders den Fibroblasten produziert.
- **Thrombopoietin**
Thrombopoietin (TPO) ist ein 60–70 kDa schweres Zytokin, das von den stromalen Zellen des Knochenmarks produziert wird. Es fördert die Megakaryozyten und Thrombozytenbildung, aber auch den Erhalt der sehr frühen hämatopoetischen Zellen.

3.3 Zellen und Zellaufreinigung

3.3.1 Zelllinien

3.3.1.1 KG-1

Die KG-1 ist eine humane kontinuierliche Zelllinie, die 1978 von KOEFFLER und GOLDE etabliert wurde [111]. Sie wurde aus Knochenmarkspirat eines 59-jährigen, weißen Mannes

gewonnen, der an einer erythroiden Leukämie litt, die sich zu einer akuten myeloiden Leukämie entwickelt hatte. Die KG-1 entstammt einer frühen myeloiden Vorläuferzelle und trägt insbesondere die Oberflächenmoleküle CD34 und CD45. Eine genaue Auflistung aller Oberflächenmoleküle findet sich bei PASTERNAK und PASTERNAK [203].

Diese Zelllinie wächst in Suspension und neigt nicht zu Adhärenz oder Aggregatbildung. Sie benötigt serumhaltiges Medium, jedoch keine Zytokine. Dies zeichnet die Zelllinie besonders aus. Sie ist die einzige verfügbare CD34⁺-Zelllinie, die zytokinfrei wächst. Damit ist sie die ideale Modellzelllinie für Entwicklungszwecke. Bei sehr langer Kultivierung von über 10 Monaten oder einer Stimulierung mit Zytokinen können die Zellen in Granulozyten und Makrophagen ausdifferenzieren. Bei diesem Vorgang werden die Zellen wieder adhärenz und verlieren das CD34-Oberflächenmolekül [239].

Die KG-1 ist sowohl über die American Type Culture Collection (ATCC) (Zelllinie Nummer: CCL-246), die European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Zelllinie Nummer: 86111306), als auch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ) (Zelllinie Nummer: ACC 14) erhältlich.

3.3.1.2 NK-92

Bei der NK-92 handelt es sich wie bei der KG-1 um eine kontinuierliche Zelllinie. Sie wurde 1992 etabliert und 1994 von GONG und seinen Mitarbeitern zuerst beschrieben [68]. Die Zelllinie ist aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen, weißen Mannes mit granulärem Lymphom, einer aggressiven Form des Non-HODKIN-Lymphoms, gewonnen worden. Sie ist unter anderem CD56⁺ und CD3⁻, weshalb sie eindeutig den Natürlichen Killer(NK)-Zellen zugeordnet werden kann. Ungewöhnlich ist jedoch, dass ihr das CD16-Oberflächenmolekül fehlt.

Primäre NK-Zellen haben *in vivo* die Aufgabe, maligne Zellen zu binden und zu lysieren. Diese zytotoxischen Fähigkeiten zur Abtötung von Tumorzellen sind bei der NK-92 immer noch stark ausgeprägt. Sie ist dabei gegen sehr viele verschiedene Tumorarten wirksam, darunter Melanome, Leukämien, Lymphome und Myelome [107, 260, 304, 305]. In dieser Beziehung ist sie die effektivste NK-Zelllinie, die derzeit zur Verfügung steht. Die Fähigkeit geht auch zunächst dann nicht verloren, wenn sie durch eine radioaktive Bestrahlung von 10 Gy wachstumsarretiert wird [108, 106]. Daher ist sie von großem Interesse für klinische Anwendungen. So ist geplant, die Zelle zum Tumor-Purging bei Transplantationen [108] und Immuntherapien [260] einzusetzen. Schon heute ist sie Teil eines klinischen Versuches zur direkten Behandlung von Krebspatienten (siehe Kapitel 9 auf Seite 141).

Die Zellen wachsen in Suspension nicht adhärenz, neigen aber zur Aggregatbildung. Sie sind serumabhängig und benötigen geringe Mengen IL-2. Das ursprünglich beschriebene Medium bestand aus Alpha Medium mit 12,5 % FCS, 12,5 % HS, 10⁻⁶ Mol Hydrokortison und 50 U/mL IL-2 [68]. Die NK-92 ist bei der ATCC (Zelllinie Nummer: CRL-2407) erhältlich.

3.3.1.3 Stromale Zelllinien

Für die Ko-Kultivierung mit hämatopoetischen Zellen ist es entscheidend, dass die stromalen Zellen durch radioaktive Bestrahlung wachstumsarretiert werden können. Sie dürfen dabei nicht ihre Fähigkeiten zur Produktion von Extrazellulär-Matrix und Zytokinen, zur Adhärenz und zur Regulation der hämatopoetischen Zellen verlieren. Bis heute ist keine humane Zelllinie verfügbar, die in ausreichendem Maß über diese Eigenschaften verfügt. Daher werden üblicherweise murine Zellen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit kamen drei verschiedene murine stromale Zelllinien zum Einsatz.

Die erste ist die M2-10B4, die 1988 aus den Stromalen Knochenmarkzellen einer Maus gewonnen werden konnte [142]. Diese Fibroblasten-Zelllinie wächst adhärent und produziert Laminin und Kollagen Typ IV. Zusätzlich wurde eine gentechnisch modifizierte Variante dieser Zelllinie benutzt. Diese sogenannte M2-10B4mod ist so verändert, dass sie humanes G-CSF und IL-3 produziert [91].

Die dritte Zelllinie ist die Sl/Sl. Sie ist ebenfalls eine Fibroblasten-Zelllinie und konnte aus den Embryonen einer Sl/Sl-Maus gewonnen werden [258]. Dieser Maus fehlt die Fähigkeit, SCF zu produzieren. Die Zelllinie Sl/Sl ist ebenfalls gentechnisch verändert, so dass sie humanes SCF und IL-3 produziert [91].

Alle drei Zelllinien wurden in IMDM mit 10 % FCS kultiviert und vor ihrer Verwendung in Ko-Kulturen mit hämatopoetischen Zellen radioaktiv mit 80 Gy bestrahlt.

3.3.1.4 Zelllinien für den Zytotoxizitäts Assay

Als Zielzelle für den Zytotoxizitäts Assay (siehe Abschnitt 3.5.3.5 auf Seite 45) dienen zwei unterschiedliche Zelllinien.

Die Zelllinie K-562 ist eine primäre Erythroblasten-Zelllinie, die 1970 aus dem Knochenmark einer 53-jährigen, weißen Patientin mit chronischer myeloider Leukämie gewonnen wurde [151, 152]. Sie ist über die ATCC (Zelllinie Nummer: CCL-243), die ECACC (Zelllinie Nummer: 89121407) und die DSMZ (Zelllinie Nummer: ACC 10) erhältlich.

Die Raji-Zelllinie konnte 1963 etabliert werden und stammt aus dem Oberkiefer eines elfjährigen, farbigen Jungen mit BURKITT-Lymphom. Sie ist EBV-positiv. Diese Zelllinie ist über die ATCC (Zelllinie Nummer: CCL-86), die ECACC (Zelllinie Nummer: 85011429) und die DSMZ (Zelllinie Nummer: ACC 319) verfügbar.

3.3.2 Primäre Zellen

3.3.2.1 CD34⁺-Zellen

CD34⁺-Zellen wurden aus Nabelschnurvenenblut gewonnen. Das Nabelschnurblut wird nach einer normalen Geburt eines gesunden Kindes mit der Zustimmung der Mutter aus der durchtrennten Nabelschnur steril entnommen. Das Blut wird mit Heparin, Adenosin, und Theophyllin versetzt, die eine Gerinnung des Blutes und Adhäsion der Thrombozyten verhindern, und danach im Verhältnis 1:3 mit einer Phosphate-Buffered Saline (PBS)-Lösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ verdünnt.

Zur Gewinnung der MNZ durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation wird Ficoll Separations Solution, ein Trennmedium mit einer Dichte von 1,077 g/mL, mit dem verdünnten Blut in einem Zentrifugenröhrchen überschichtet und abzentrifugiert (300 × g). Granulozyten und Erythrozyten befinden sich danach wegen ihrer größeren Dichte am Boden des Röhrchens und die MNZ als Bande oberhalb des Trennmediums. Über den MNZ befinden sich das Plasma und die Thrombozyten. Diese Bande der MNZ, der so genannte Buffy Coat, wird vorsichtig abgenommen und zweimal in PBS gewaschen. In einem weiteren Zentrifugenröhrchen kann dann ein Bovine Serum Albumin (BSA)-Kissen vorgelegt werden, das aus PBS mit 10 % BSA besteht, und auf das die gewaschenen Zellen überschichtet werden. Beim anschließenden Abzentrifugieren (300 × g) sedimentieren die MNZ, während verbliebene Thrombozyten eine Bande oberhalb des BSA-Kissens bilden, die dann entfernt werden kann. Nach einer zweimaligen Wiederholung dieser Prozedur liegt die reine Fraktion der MNZ vor.

Für die weitere Aufreinigung auf die Fraktion der CD34⁺-Zellen wurde das Magnetic Cell Sorting (MACS)-CD34 Progenitor Cell Isolation Kit nach den Anweisungen des Herstellers verwendet [175]. Dabei nimmt man die MNZ in MACS-Puffer (PBS + 0,5 % BSA + 2 mM

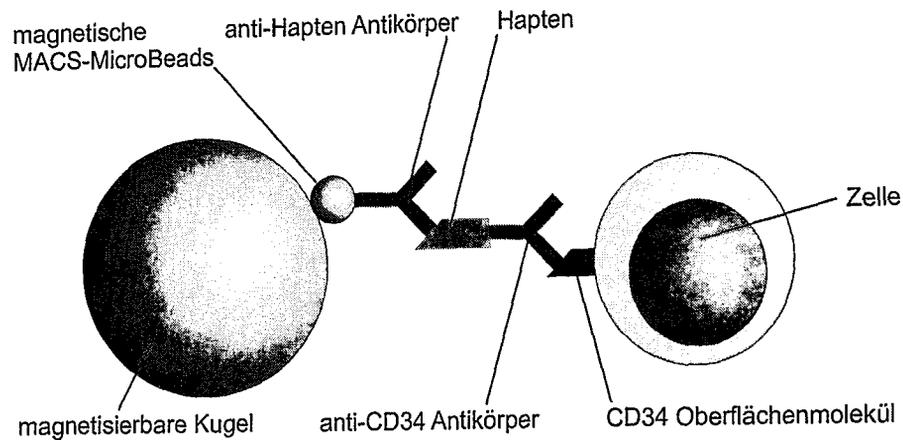


Abbildung 3.1: Die Antikörperbindung der CD34⁺-Zellen an die MACS-MicroBeads

EDTA) auf und wäscht sie einmal. Danach wird die Suspension mit FcR-Blocker und monoklonalen Hapten-konjugierten anti-CD34-Antikörpern 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend noch einmal in MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen werden dann mit supra-paramagnetischen MACS-MicroBeads, die an einen anti-Hapten-Antikörper gebunden sind, für weitere 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und erneut in MACS-Puffer gewaschen. Nun sind über die beiden Antigen-Antikörper-Bindungen MACS-MicroBeads an die CD34⁺-Zellen gebunden (vergleiche Abbildung 3.1). Eine mit ferromagnetischen Kugeln vorgefüllte Separationssäule wird in ein Magnetfeld platziert, mit der markierten Zellsuspension gefüllt und dreimal mit MACS-Puffer gewaschen. Zellen, die den anti-CD34 Antikörper gebunden haben, verbleiben in der Säule. Zellen ohne Antikörper spült man bei den Waschschrritten heraus. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt. Die Partikel verlieren dadurch ihre Magnetisierung und die CD34⁺-Zellen können aus der Säule herausgespült werden. Der Aufreinigungsschritt über die Säule wird noch einmal wiederholt. Auf diese Weise werden Reinheiten von durchschnittlich weit über 90 % CD34⁺-Zellen erreicht.

Für eine dauerhafte Lagerung werden die Zellen in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DM-SO) aufgenommen und bei -80 °C in einem Kryoeinfriergerät mit 2-Propanol eingefroren. Nach 48 Stunden wird die kryokonservierte Probe in flüssigen Stickstoff umgelagert. Auf diese Weise lassen sich Proben über Jahrzehnte ohne Beeinträchtigungen der Zellen lagern [257].

3.3.2.2 T-Lymphozyten

Primäre T-Lymphozyten wurden aus dem peripheren Venenblut, das heißt aus normalen Blutspenden, gesunder freiwilliger Spender gewonnen. Der Anteil an Lymphozyten in einer solchen Spende ist sehr hoch, weshalb üblicherweise keine spezifische Aufarbeitung notwendig ist. Aus der Blutspende wird, wie in Abschnitt 3.3.2.1 auf der vorherigen Seite beschrieben, die MNZ-Fraktion isoliert. Anschließend trennt man verbliebene adhärenente Zellen, das sind Monozyten und verbliebene Granulozyten, durch Plastikadhärenz abgetrennt. Dazu inkubiert man die MNZ für eine Stunde in Kulturmedium in einer Gewebekulturflasche im Brutschrank. Die nicht adhärenente Zellen können dann mit dem Überstand abgezogen werden. Die Kryokonservierung von Lymphozyten erfolgt analog zu den CD34⁺-Zellen.

Tabelle 3.2: Zeitgestaffelte Zugabe von Frischmedium zum schonenden Auftauen von CD34⁺-Zellen

Zeitpunkt nach dem Auftauen [min]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zuzugebende Medienmenge [mL/mL Kryokonservat]	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

3.4 Kultivierungsmethoden

Dieser Abschnitt beschreibt die allgemeinen Vorarbeiten für die Kultivierungen. Die Details der einzelnen Kulturen werden im Zusammenhang der experimentellen Ergebnisse erläutert.

3.4.1 Auftauen von kryokonservierten Proben

Alle Zellkulturen wurden mit kryokonservierten Proben gestartet. Dazu wird eine Probe in einem Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Sobald das letzte Eis geschmolzen ist, werden die Zellen in 10 mL gekühltes IMDM mit 10 % FCS überführt und abzentrifugiert. Der Waschschrift entfernt insbesondere das zellschädigende DMSO. Abschließend kann man die Zellen in dem gewünschten Kulturmedium aufnehmen.

Ein besonders schonendes Verfahren wurde bei den primären Spenderzellen angewandt. Hierbei werden nach dem Auftauen den Zellen langsam ansteigende Mengen an IMDM mit 10 % FCS zugegeben (siehe Tabelle 3.2). Durch dieses Vorgehen passt sich die Osmolarität langsam an die des Kulturmediums an. Man verhindert so, dass die Zellen einem osmotischen Schock ausgesetzt sind.

3.4.2 Vorkultivierung und Stammhaltung

Die Vorkultivierung und Stammhaltung wurden in handelsüblichen Gewebekulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und in einer Gasatmosphäre aus Luft mit 5 % CO₂ durchgeführt. Die Stammhaltung der Suspensions-Zelllinien erfolgte bei Zelldichten zwischen 1·10⁵ und 2·10⁶ c/mL in IMDM mit 10 % FCS im Falle der KG-1 und mit RPMI 1640 mit 10 % FCS bei der Raji und K-562. Für die Anzucht stromaler Zelllinien wurde der Inhalt einer kryokonservierten Probe in eine Gewebekulturflasche inokuliert. Sobald die Kultur konfluent war, mussten die Zellen mit Trypsin enzymatisch abgelöst und in eine 1:2 Verdünnung aufgeteilt neu inokuliert werden. Dem Medium der genetisch modifizierten Zelllinien M2-10B4mod und Sl/Sl setzt man bei jeder zweiten Passage die Antibiotika Geneticin und Hygromycin B zu. Diese töten selektiv die Zellen, die in ihrem Genotyp von den ursprünglichen genetisch veränderten Zellen abweichen. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung abgelöst und in einem Zentrifugenröhrchen in 20 mL Kulturmedium aufgenommen. Bei den Stromale Zelllinien kam IMDM mit 10 % FCS als Kulturmedium zum Einsatz.

3.4.3 Vor- und Nachbereitung der Kulturgefäße

Gewebekulturflaschen und -platten sowie Teflon-Beutel sind kommerziell erhältliche steril verpackte Einmalartikel. Sie sind nicht autoklavierbar und sind nach Gebrauch zu verworfen.

Tabelle 3.3: Verwendete Messgrenzen bei der Zellzahlbestimmung mit dem CASY1-Partikelzählgerät

Zelltyp	Untere Messgrenze [μm]	Obere Messgrenze [μm]
hämatopoetische Vorläuferzellen	6,00	30,00
T-Lymphozyten	7,80	30,00
Zelllinie M2-10B4	12,00	30,00
Zelllinie SI/SI	10,20	30,00
Zelllinie NK-92	11,10	30,00
Zelllinie KG-1	9,15	30,00

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Systeme sind dagegen autoklavierbar und man kann sie wiederverwenden. Vor Gebrauch wurden sie deshalb autoklaviert, anschließend mit dem jeweiligen Kulturmedium gefüllt und für mindestens 24 Stunden einem Sterilttest unterzogen. Für den Fall, dass das spätere Kulturmedium antibiotikahaltig war, kam für den Sterilttest ein antibiotikafreies Medium zum Einsatz. Nach dem Sterilttest wurde das Medium in jedem Falle entfernt und die Kultur mit frischem Medium gestartet.

Die eventuell benutzten Messelektroden mussten vor dem Start der Kultur nach den Angaben des Herstellers kalibriert werden. Bei den pH-Einstab-Messketten geschah dies vor dem Sterilisieren, bei den amperometrischen Sauerstoff-Elektroden, die nach dem Clark-Prinzip funktionieren, während des Steriltests.

Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Kulturgefäße mit den eventuell verbliebenen Medium und Zellen autoklaviert, alle Bauteile gründlich gereinigt und Verschleißteile, wie Elektroden-Membranen, bei Bedarf gewechselt.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Zellzahl und Vitalität

Die Zahl der Zellen aus Suspensionskulturen wurde direkt nach der Probenahme in einer Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) oder mit dem CASY1-Partikelzählgerät bestimmt. Das Partikelzählgerät bestimmt die Lebendzellzahl anhand der Größenverteilung. Vitale Zellen sind häufig größer als tote Zellen. Für eine zuverlässige Zählung ist eine individuelle Einstellung der Messgrenzen für jeden Zelltyp entscheidend. In Tabelle 3.3 sind die Grenzen für die Messung der vitalen Zellzahl der Zelltypen in dieser Arbeit angegeben.

Die Vitalität wurde mit einer Trypanblau-Färbung, bei der das Zytosol toter Zellen gefärbt wird, im Hämozytometer ermittelt. Die Aussagekraft einer Vitalitätsbestimmung ist aber gering. Es werden nur tote, aber noch ganze Zellen erfasst. Zellen, die zerstört sind, oder apoptotische Zellen können so nicht bestimmt werden. Daher wurde die Vitalitätsbestimmung nur als Qualitätskontrolle durchgeführt und stellt keinen Kultivierungsparameter dar.

Bei immobilisierten Kulturen mussten zunächst die Zellen von der Oberfläche abgelöst werden. Dies geschah entweder mit Trypsin, das enzymatisch Zellen von Oberflächen ablöst, oder bei Kollagenträgern mit Kollagenase, das den Träger auflöst. Nach dem Ablösen wurden die Zellen wie die Suspensionszellen gezählt. Als zweite Möglichkeit bei immobilisierten Zellen wurde eine Kernfärbung eingesetzt. Dabei inkubiert man die Zellen für 24 Stunden mit einer Kristallviolett-Lösung. Die in dieser Lösung vorhandene Zitronensäure lysiert die Zellen und das Kristallviolett färbt die Zellkerne. Die Anzahl der Kerne, die sich nach der Zellyse in Suspension befinden, kann dann in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

3.5.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die Phänotypisierung der Zellen aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenmarker (vergleiche Tabelle 2.3 auf Seite 7) erfolgt mithilfe eines Durchflusszytometers. Bei dieser Methode werden monoklonale Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle eingesetzt, an die z.B. die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Cy-Chrome gekoppelt sind. Im Durchflusszytometer wird die markierte Zellsuspension in einer Kapillare durch eine Messzelle geführt, in der die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren. Durch das Licht des Lasers (488 nm) werden die Markierungssubstanzen je nach Typ zur Emission von Licht verschiedener Wellenlängen angeregt. Die Intensität des emittierten Lichts wird durch Fotodetektoren gemessen und ist proportional zur Ausprägung des zu untersuchenden Kennzeichens. Durch unspezifische Bindungen der Antikörper könnte die Messung beeinträchtigt werden, weshalb parallel zu den Proben immer eine Negativkontrolle untersucht wird. Dazu setzt man Antikörper ein, die den gleichen Isotyp wie spezifischen Antikörper aufweisen, aber keine Strukturen der humanen Zellen erkennen können (zum Beispiel Maus IgG1-FITC und Maus IgG1-PE). Neben spezifischen Oberflächenmolekülen werden im Durchflusszytometer standardmäßig die relative Zellgröße und -granularität über ein für diese Parameter typisches Streulichtmuster analysiert.

Für die Färbungen wurden 10^5 bis 10^6 der Suspensionszellen oder abgelösten immobilisierten Zellen (siehe Abschnitt 3.5.1 auf der vorherigen Seite) in $100 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen. Danach wurde diese Suspension mit jeweils $5 \mu\text{l}$ eines FITC- und eines PE-markierten Antikörpers für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen direkt vermessen.

3.5.3 Biologische Assays

3.5.3.1 Methylzellulose-Assay

Mit dem Methylzellulose-Assay können die CFC nachgewiesen werden. Das semisolid Medium Methylzellulose-Medium enthält die Zytokine EPO, SCF, GM-CSF und IL-3, die die Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen bewirken. Die Nachkommen einer einzelnen Vorläuferzelle bilden in einem Zeitraum von zwei Wochen einen zusammenhängenden Zellhaufen, eine so genannte Kolonie, da ein Wandern der Zellen durch die hohe Viskosität verhindert wird. Die Zellen werden in so hoher Verdünnung in das Medium gegeben, dass sich die Kolonien nicht überschneiden. Die Kolonien sind so optisch unter einem Invertmikroskop auszählbar. Die verschiedenen Vorläuferzellen (vergleiche Tabelle 2.2 auf Seite 7) lassen sich anhand der Form und Farbe der Kolonie und der Morphologie der Einzelzellen typisieren.

Zur Durchführung des Assays setzt man je nach Kulturdauer unterschiedliche Zellmengen ein, da im Verlauf einer Kultur die Zellen teilweise ausdifferenzieren. Vom Inokulum wurden 100 Zellen, von den Proben an den Tagen vier und sieben 250 Zellen und ab Tag zehn 500 Zellen in $100 \mu\text{L}$ IMDM in einen Milliliter Methylzellulose-Medium gegeben. Diese Zellsuspension wurde gut vermischt und in einer 35 mm-Gewebekulturschale im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) für zwei Wochen kultiviert. Grundsätzlich gehörte eine Doppel-Bestimmung zum Standardvorgehen, bei der Inokulums-Probe sogar eine Dreifach-Bestimmung.

3.5.3.2 Cobblestone Area Forming Cells-Assay

Der CAFC-Assay ist prinzipiell eine genormte Kultivierungsbedingung, unter der sehr frühe Zellen überleben, weiter ausdifferenzierte jedoch absterben. Dafür werden die Zellen in

Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen in serumhaltiger Ko-Kultur mit stromalen Zellen 6 Wochen lang kultiviert.

Als stromale Zellen kam eine Mischung zu gleichen Teilen von jeweils $6 \cdot 10^3$ Zellen/Vertiefung der Zelllinien M2-10B4mod und Sl/Sl zum Einsatz. Beide wurden vor der Verwendung mit 80 Gy bestrahlt. Nach der Adhäsion der stromalen Zellen wurden die hämatopoetischen Zellen in sechs verschiedenen Dichten und jeweils zehn parallelen Ansätzen in 100 μ L Medium pro Vertiefung inokuliert. Die Dichte reichte dabei von 1 bis 243 Zellen pro Vertiefung bei der Analyse des Inokulums. Für Untersuchungen von Proben aus einer Kultur wurde jeweils die zehnfache Dichte eingesetzt. Nach sechs Wochen Kultur im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂), während dessen einmal pro Woche die Hälfte des Mediums erneuert wurde, konnte der Assay unter dem Invertmikroskop ausgezählt werden. Als Medium diente IMDM mit 12,5 % FCS, 12,5 % HS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung.

CAFC bilden unter den beschriebenen Bedingungen räumlich zusammenhängende Cluster, die an Kopfsteinpflaster erinnern. Wenn eine Vertiefung mindestens einen Cluster mit 6 charakteristischen Cobblestone-Zellen aufweist, wird sie als positiv gewertet. Andernfalls ist die Vertiefung als negativ zu werten. Aufgrund der verschiedenen Zelldichten kann hieraus eine quantitative Aussage über die Zahl der CAFC gemacht werden.

3.5.3.3 Long-Term Culture Initiating Cells-Assay

Der LTC-IC-Assay ist eine Erweiterung des CAFC-Assays um einen Methylzellulose-Assay. Hierbei wird nach Abschluss des CAFC-Assays die Platte abzentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen mit Methylzellulose-Medium überschichtet. So werden sie zwei Wochen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) weiterkultiviert. Aus den Zellen, die nach dem CAFC-Assay dazu in der Lage waren, haben sich dann Kolonien gebildet. Der LTC-IC-Assay wird äquivalent dem CAFC-Assay ausgezählt.

LTC-IC sind noch frühere Vorläuferzellen, als die CAFC (vergleiche Abbildung 2.4 auf Seite 7). Die Abstufung ist aber sehr gering. Alle Assays dieser Arbeit zeigten immer die gleiche Zahl von LTC-IC und CAFC.

3.5.3.4 Immundefiziente Mäuse

Noch frühere Zellen als die LTC-IC können nur durch Tierversuche detektiert werden. Dazu werden Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient (NOD/SCID)-Mäuse verwendet. Diese Mäuse haben eine schwere Immunschwäche-Krankheit, wodurch ihnen weder eine Antikörper vermittelte Immunantwort, noch eine durch T-Lymphozyten möglich ist. Aus diesem Grund löst eine Transplantation humaner Zellen bei ihnen keine GVHD aus. Allerdings müssen sie wegen dieser Immunschwäche unter sterilen Bedingungen gehalten werden.

Für den Repopulierungs-Versuch werden die Mäuse mit 0,25–0,3 Gy bestrahlt, was die Zerstörung des restlichen hämatopoetischen Systems bewirkt. Innerhalb von 3–5 Stunden werden die humanen hämatopoetischen Zellen in die Schwanzvene injiziert. Nach sechs Wochen werden die Mäuse getötet und die Zellen aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark mit dem Durchflusszytometer über den allgemeinen Leukozyten-Marker CD45 auf den Anteil humaner Zellen getestet.

Die NOD/SCID-Versuche dieser Arbeit wurden kommerziell bei der EPO-GmbH in Berlin-Buch durchgeführt. Für jede untersuchte Probe sind dabei fünf Mäuse transplantiert worden.

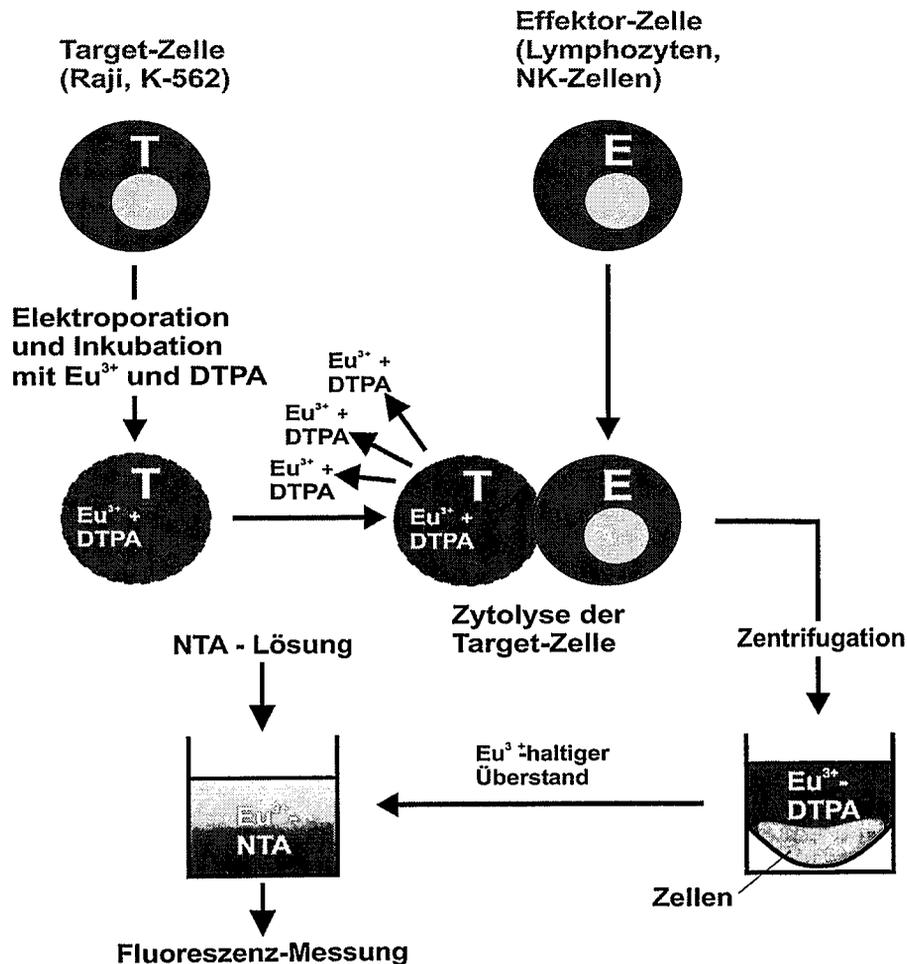


Abbildung 3.2: Das Vorgehen beim Zytotoxizitäts Assay

3.5.3.5 Zytotoxizitäts Assay

Die Funktionalität von zytotoxischen Zellen, wie spezifische T-Lymphozyten und NK-Zellen, lässt sich mit dem Zytotoxizitäts Assay nachweisen (Abbildung 3.2). Dazu werden die Zellmembranen einer Ziel (Target)-Zelle mittels Elektroporation durchlässig gemacht und die Zellen mit einem Komplex aus dem Lanthanid Europium und diethylene-triamin-pentaacetic acid (DTPA) inkubiert. Dieser Komplex wird in die Zellen aufgenommen. In dieser Arbeit wurden die Zelllinien K-562 und Raji als Target-Zellen verwendet. Werden die mit dem Europium-Komplex markierten Zellen anschließend zusammen mit den Effektor-Zellen, das heißt den zytotoxischen Zellen, inkubiert, so werden die Target-Zellen im Falle einer zytotoxischen Wirkung von der Effektor-Zelle lysiert. Dabei wird der Eu^{3+} -DTPA Komplex wieder in das umgebende Medium abgegeben. Die Ausschüttung der Europiummenge kann nach einer Umwandlung des DTPA-Komplexes mit einer 2-Naphthyl-Trifluoracetone (NTA)-Lösung zu einem Europium-NTA-Komplex zeitverzögert fluorometrisch bestimmt werden und ist in Abhängigkeit des eingesetzten Verhältnisses von Ziel- zu Effektorzelle ein Maß für die Zytotoxizität.

3.5.4 Medienanalytik

Alle analytischen Verfahren arbeiten mit zellfreien Flüssigkeiten. Vor der Messung müssen daher eventuell vorhandene Zellen durch Zentrifugation aus der Probe entfernt werden.

3.5.4.1 Osmolalität

Die Osmolalität wurde mithilfe eines Osmometers bestimmt, das die Gefrierpunkts-Erniedrigung in salzhaltigen Lösungen bestimmt. Dabei werden 50 μ l Medium bis auf -7 °C unterkühlt und mit einem Impfkristall zur Kristallisation gebracht. Die sich dabei einstellende Gefrierpunkttemperatur ist im Vergleich zum reinen Lösungsmittel, hier Wasser, ein Maß für die Osmolalität.

3.5.4.2 Glukose

Die Glukose-Konzentration wurde mit einem automatischen Analysator, der nach einem enzymatisch-amperometrischen Prinzip arbeitet, gemessen. Die Methode beruht auf der oxidativen Umsetzung von Glukose zu Glukonsäure mithilfe membran-immobilisierter Glukose-Oxidasen. Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert an einer Platinelektrode zu Sauerstoff, wobei der dabei gemessene Strom proportional zur Glukose-Konzentration ist.

3.5.4.3 Glutamin und Glutamat

Die Glutamin- und Glutamat-Konzentrationen wurden mit einem Analysator bestimmt, der nach dem gleichen Prinzip wie der für Glukose arbeitet. Hier wird Glutamat mit einer immobilisierten Glutamatoxidase zu α -Keto-Glutamat, Ammoniak und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid oxidiert und der Elektrodenstrom ist proportional der Glutamat-Konzentration. Das Glutamin muss mit einer Glutaminase zunächst zu Glutamat umgesetzt werden, bevor es äquivalent behandelt wird.

3.5.4.4 Laktat

Auch der Laktat-Analysator arbeitet enzymatisch-amperometrisch. Laktat wird mit einer Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Letzteres wird, wie oben beschrieben, oxidiert und gemessen.

3.5.4.5 Aminosäuren

Um das gesamte Aminosäurespektrum zu bestimmen, wurde eine Aminosäure-HPLC verwendet. Dazu wurden zunächst die Proteine einer Probe mit Trichloressigsäure gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der proteinfreie Überstand mit 1 N Natronlauge neutralisiert und die Aminosäuren mit einem ortho-Phthaldialdehyd-Reagenz zu fluoreszierenden Derivaten umgesetzt. Die so vorbehandelte Probe wurde in einer Reversed-Phase-Chromatographie-Säule in der HPLC aufgetrennt und analysiert.

3.5.4.6 ELISA

Um die IL-2-Konzentration im Medium der NK-92-Kulturen zu bestimmen, wurde ein Enzyme Linked Immunosorbend Assay (ELISA) verwendet. Ein anti-IL-2-Antikörper ist dabei auf dem Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert. An diesen Antikörpern bindet das IL-2 aus dem Medium. Ein zweiter anti-IL-2-Antikörper, der biotinyliert ist, wird an das IL-2 gebunden und daran wiederum eine Streptavidin-gekoppelte Peroxidase. Letztere katalysiert die Spaltung eines chromogenen Substrats. Das Reaktionsprodukt wird photometrisch quantifiziert und ist im Vergleich zu einem Standard ein Maß für die vorhandene Menge IL-2.

3.6 Werkstoffe und die Untersuchung ihres Einflusses

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Werkstoffe auf hämatopoetische und stromale Zellen wurden alle relevanten Materialien, die in den neuen Kultursystemen Verwendung fanden, untersucht. Dies waren:

- Borosilikat-Glas:
Glas ist das bevorzugte Material für den Bau von kontrollierten Bioreaktoren, die nicht Steam-In-Place (SIP)- oder Clean-In-Place (CIP)-fähig sein müssen. Dies trifft besonders auf Reaktoren mit weniger als 10 Liter Kulturvolumen zu.
- Hochlegierter Edelstahl:
Feste Einbauten werden bevorzugt in rostfreiem Edelstahl ausgeführt. Der Standardwerkstoff ist X6 Cr Ni Mo Ti 17 12 2 (Werkstoff-Nummer: 1.4571), der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.
- Polytetrafluorethylen (PTFE):
PTFE (Teflon) gilt als biologisch inert und wird speziell für Ummantelungen von kritischen Materialien verwendet. Beispielsweise sind die ferromagnetischen Kerne von Magnetrührstäben nicht rostfrei und werden daher in PTFE eingegossen.
- Polydimethylsiloxan (Silikon):
Das Silikon ist das Standardmaterial für Dichtungen und Schlauchleitungen.

Neben diesen in den Konstruktionen benutzten Werkstoffen wurden zwei weitere Standardwerkstoffe untersucht:

- Polyetheretherketon (PEEK):
PEEK ist ähnlich wie PTFE ein inerter Werkstoff. Er wird häufig in der Chromatografie verwendet und ist autoklavierbar.
- Viton:
Viton ist ein Fluor-Kautschuk und wird sehr oft als Dichtungsmaterial eingesetzt.

Für eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander und mit den Ergebnissen aus der Literatur sowie als Nachweis der Funktionsfähigkeit des experimentellen Ansatzes wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle eingeführt:

- Polystyrol (PS):
PS diente als Positivkontrolle. Es ist das anerkannte Standardmaterial für Einwegprodukte zur Zellkultivierung, wie zum Beispiel Gewebekulturflaschen.
- Blei:
Blei, genauer Pb 99,94 Cu (Werkstoffnummer: 2.3035), diente als Negativkontrolle. Da Blei ein bekanntes Zellgift ist, müssen bei einem korrekten experimentellen Vorgehen sehr starke negative Einflüsse auf die Zellen beobachtet werden können.

Von allen Materialien wurden Proben mit einem Durchmesser von 60 mm und einer Dicke von 1–3 mm verwendet. Diese wurden nach denselben Methoden gereinigt und sterilisiert, wie sie für die Kultursysteme üblich sind. Nach dem Sterilisieren im Autoklaven und anschließender Trocknung im Wärmeschrank konnten die Proben mit einer sterilen Pinzette in Gewebekulturschalen von ebenfalls 60 mm Durchmesser gelegt werden, so dass der gesamte Boden bedeckt war. PS, das nicht autoklavierbar ist, musste daher gründlich gereinigt und über Nacht in 70 % Ethanol unter der Sicherheitswerkbank mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden. Am nächsten Morgen war das Ethanol rückstandsfrei verdunstet, und die sterile Probe kam wie beschrieben zum Einsatz.

Nach dem Einsetzen der Materialproben wurden die Gewebekulturschalen mit Medium befüllt. Bei den Untersuchungen des Einflusses eines direkten Materialkontaktes auf die Zel-

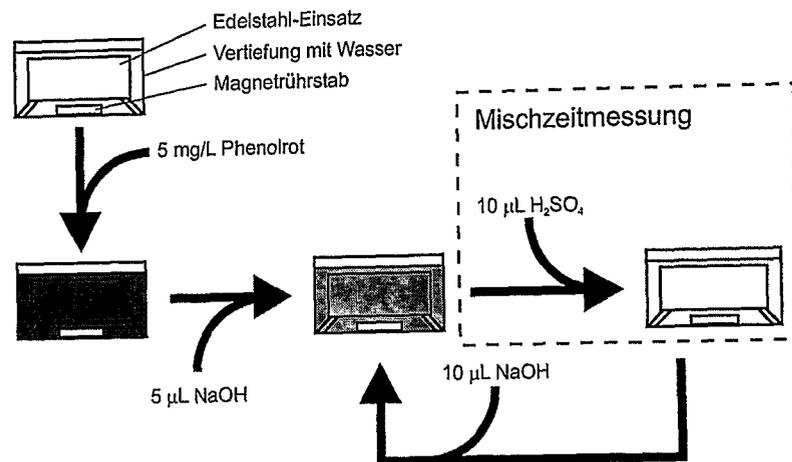


Abbildung 3.3: Die Bestimmung der Mischzeit durch den Farbumschlag eines Indikators

len wurden die Zellen anschließend inokuliert und sieben Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Im Falle der Einflussuntersuchungen ohne direkten Kontakt wurden die mediengefüllten Gewebekulturschalen zuerst zehn Tage im Brutschrank inkubiert, danach das Medium abgezogen und in neue Gewebekulturschalen ohne Materialproben gegeben. In diesen konnten dann die Zellen inokuliert und für sieben Tage im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert werden.

Zum Abernten der Zellen wurde im Falle der stromalen Zellen zunächst das Medium abgezogen und verworfen. Die Zellen konnten dann enzymatisch mit Trypsin abgelöst und abgezogen werden. Anschließend wurde die Materialprobe noch dreimal mit 3 mL PBS gewaschen, um eventuell verbliebene Zellen zu gewinnen.

Bei den hämatopoetischen Zellen wurde das Medium gleichfalls abgezogen, aber nicht verworfen, da es die Zellen enthielt. Die Proben wurden ebenso dreimal mit PBS gewaschen.

In beiden Fällen wurde die zellhaltige Lösung mit der Waschlösung vereinigt und so abzentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstands konnten die Zellen im Restvolumen resuspendiert, das verbliebene Suspensionsvolumen bestimmt und die Zellzahl gemessen werden. Die hämatopoetischen Zellen wurden zudem im Durchflusszytometer analysiert und in Methylzellulose-Assays eingesetzt.

3.7 Verfahrenstechnische Methoden

3.7.1 Bestimmung der Mischzeit

Für die Untersuchung der Mischzeit-Charakteristik im Miniatur-Schlaufenreaktor (siehe Abschnitt 5.1.2 auf Seite 76) wurde die Methode des Farbumschlags mit einem chemischen Indikator (vergleiche Abschnitt 2.6.1 auf Seite 26) verwendet und weiterentwickelt. Wie in Abbildung 3.3 skizziert, wird bei dieser Methode als Indikator 5 mg/L Phenolrot in Wasser eingesetzt. Nach dem Befüllen des Miniatur-Schlaufenreaktors kommen 5 µL 1 N Natronlauge hinzu, um eine basische Lösung zu erhalten. Mit 10 µL 1 N Schwefelsäure kann daraufhin die Lösung vom basischen in den sauren Bereich titriert werden. Dadurch entsteht ein deutlicher Farbumschlag von dunkelviolett zu hellgelb. Dieser Farbumschlag wird mit einer Videokamera aufgezeichnet, und die Daten werden mit einer Videobildanalyse ausgewertet. Abschließend wird mit 10 µL 1 N Natronlauge der basische Ausgangszustand der Lösung wiederhergestellt. Auf diese Weise ist die Messung beliebig oft wiederholbar.

Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite zeigt den Aufbau des Versuchsaufbaus. Der Miniatur-

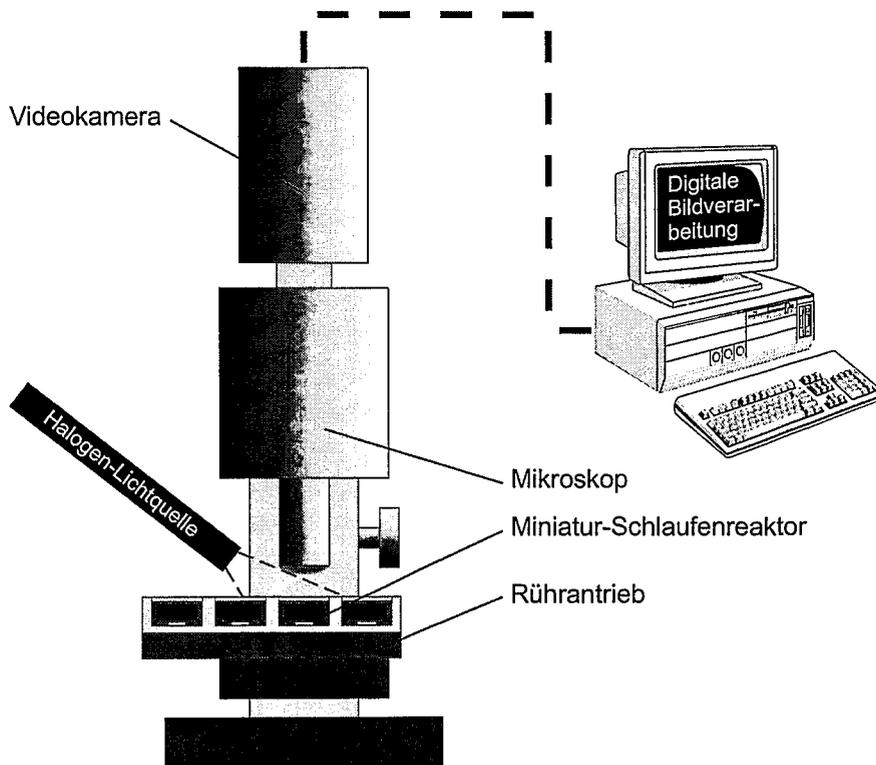


Abbildung 3.4: Der Aufbau des Versuchsstandes zur Mischzeituntersuchung im Miniatur-Schlaufenreaktor

Schlaufenreaktor wurde unter einem Mikroskop platziert, auf das eine Videokamera aufgesetzt war, die die Daten direkt in einen Computer übertrug. Der Reaktor wurde so mit einer Halogen-Lichtquelle beleuchtet, dass das gesamte Flüssigkeitsvolumen durchleuchtet war. Der Bildausschnitt des Mikroskops zeigte dabei nur ein Viertel des Reaktorraumes, da dieser aber rotations-symmetrisch ist, konnten die Ergebnisse auf das gesamte System übertragen werden.

Es wurde grundsätzlich der Umschlag vom basischen in den sauren Bereich gemessen. Die Zugabe der Schwefelsäure erfolgte erst, nachdem sich die Strömung vollständig ausgebildet hatte und immer nur durch vorsichtige Zugabe eines Tropfens mittig an der Oberfläche des Reaktors.

Die Bildrate der Videoaufzeichnung betrug in dieser Arbeit 1 Bild/s, ist aber prinzipiell bis maximal 20 Bilder/s frei wählbar. Bei der digitalen Weiterverarbeitung wurde der mittlere Grünwert der einzelnen Bilder analysiert. Die Veränderung im Grünanteil zeigt sich, im Gegensatz zu den Blau- und Rotanteilen, unter den gegebenen Bedingungen und der Darstellung der Bilddaten im RGB-Format als stärkstes Signal. Um die Grünwerte zu erhalten, muss die Video-Datei in Einzelbilder umgewandelt werden, die dann einzeln analysiert werden können. Das Vorgehen verdeutlicht Abbildung 3.5 auf der nächsten Seite. Nach der Aufnahme der Video-Datei im Audio Video Interleaved (AVI)-Format erfolgt eine Umwandlung jedes Einzelbildes in eine Datei im Tagged Image File (TIF)-Format. Diese Dateien können von dem Programm ScionImage Release Beta 3b (Scion Corporation) sukzessive eingelesen und auf ihren mittleren Grünwert analysiert werden. Das Programm stellt eine

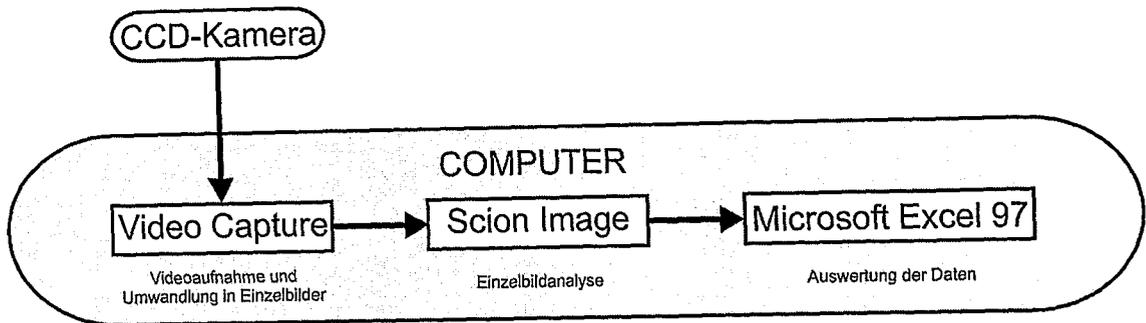


Abbildung 3.5: Die digitale Videoanalyse

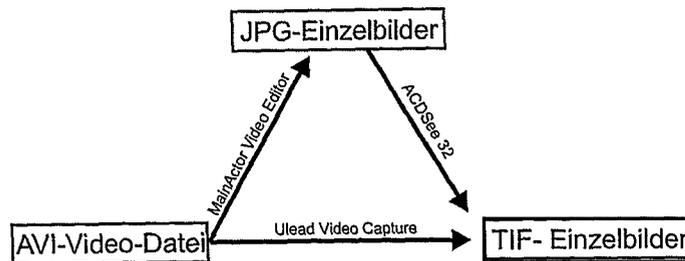


Abbildung 3.6: Die Umwandlung von Videodateien in Einzelbilder

Adaption des Macintosh-Programmes NIH Image der National Institutes of Health (USA) für Windows-Computer dar. Die gesammelten Werte werden dann in Microsoft Excel 97 SR-2 (Microsoft Corporation) importiert und ausgewertet.

Bei der Umwandlung von AVI-Dateien in TIF-Einzelbilddateien können zwei alternative Wege beschritten werden (Abbildung 3.6). Die Bilder können mit dem Programm Video Capture Version 5.02 (Ulead Systems, Inc.) direkt als TIF-Datei gespeichert werden. Dieses muss aber einzeln, Bild für Bild geschehen. Die andere Möglichkeit ist, die Bilder mit dem Programm MainActor Video Editor Version 2.03 (Main Concept, GbR Moenig/Zabel, [293]) zu speichern. Dies geschieht für alle Bilder in einem einzelnen Arbeitsschritt. Die Bilddateien liegen dann jedoch im Joint Photographic Experts Group (JPG)-Format vor. Bevor sie von ScionImage eingelesen werden können, müssen sie daher noch in das TIF-Format umgewandelt werden. Dies kann beispielsweise recht einfach mit dem Programm ACDSee 32 Version 2.41 (ACD Systems) geschehen. Für den Weg der direkten Umwandlung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein VisualBasic-Programm geschrieben, das die Umwandlung automatisiert. Dieses Programm umfasst ebenfalls die folgenden Arbeitsschritte des Einlesens und der Analyse des Grünwertes im Programm ScionImage. Der Source-Code ist in Kapitel E auf Seite 199 abgedruckt.

Die hier vorgestellte neue Möglichkeit der automatischen Videobildanalyse ist sehr rechenintensiv, da sie ausschließlich eine Automatisierung von Anwendungsprogrammen darstellt. Um unverhältnismäßig hohe Rechenzeiten zu vermeiden, ist ein Computer mit schnellem Prozessor sehr empfehlenswert. Die Analyse einer Video-Datei mit 1 000 Bildern benötigt auf einem Rechner mit einem Prozessor vom Typ Intel Pentium 120 MHz rund 36 Stunden. Ein Computer mit einem Prozessor vom Typ Intel Pentium II 350 MHz und identischer Peripherie (Bus-System, Festplatten-Zugriffszeit, etc.) benötigt dafür nur etwa eine Stunde.

3.7.2 Verweilzeitmessungen

Die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens bei den beiden perfundierten Bioreaktoren, dem Festbettreaktor und dem Suspensionsreaktor, konnte mit den in Abschnitt 2.6.2 auf Seite 28 genannten Methoden durchgeführt werden. Der Suspensionsreaktor wurde dafür mit Wasser gefüllt und mit einer Stufenfunktion einer 1 mM KCl-Lösung beaufschlagt. Die Veränderung der Leitfähigkeit konnte mithilfe einer Leitfähigkeits-Messsonde im Reaktorraum gemessen und die Werte von einem Computer aufgezeichnet werden.

Beim Festbettreaktor wurde statt des Elektrolyts eine Phenolrot-Lösung mit 5 mg/L als Stufenfunktion zugeführt. Die Veränderung der Rotfärbung konnte direkt am Reaktor-Ausgang mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 270 nm gemessen werden. Diese Daten wurden ebenfalls unmittelbar von einem Computer aufgezeichnet.

3.7.3 Bestimmung des Sauerstoffeintrags

Für die Charakterisierung des Begasungsgefäßes des Festbettreaktors wurde der Sauerstoff aus dem Wasser in einem Vorlagegefäß mit Stickstoff ausgetrieben. So konnte es durch die Begasungseinheit gepumpt werden, wobei jeweils vor und nach der Begasung mit einer Sauerstoffelektrode der Sauerstoffpartialdruck bestimmt wurde. Die Gasphase bestand hier aus reiner Luft.

Im Miniatur-Schlaufenreaktor wurde mit der Sulfit-Methode gearbeitet. Eine einzelne Vertiefung wird dazu mit einer Metallplatte und einer dünnen Gummimatte abgedichtet. In die Metallplatte ist eine Sauerstoffelektrode integriert. Auf diese Weise wird ein definierter Raum mit Luft oberhalb der Flüssigkeit einer Vertiefung geschaffen. Unter der Annahme, dass die Flüssigphase mit der Natriumsulfitlösung keinerlei gelösten Sauerstoff enthält, kann mit der Messung der Abreicherung des Sauerstoffs in der Gasphase der Sauerstoffeintrag bestimmt werden. Diese Arbeiten fanden in enger Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen statt.

Die Sauerstoffeintragungsmessung im Suspensionsreaktor erfolgte nach der instationären Methode mit Wasser (siehe auch Abschnitt 2.6.3 auf Seite 29). Der Sauerstoff konnte mit Stickstoff aus dem Wasser entfernt und der Anstieg des Sauerstoffgehaltes durch die anschließende diffusive Oberflächenbegasung mit Luft gemessen werden.

3.7.4 Scherkraftuntersuchungen

Die Scherkraftuntersuchungen fanden in einem Rotations-Viskosimeter statt. Es besteht aus einem Messbecher und einem Messkörper, die zusammen ein Doppel-Ringspalt-System ergeben (siehe Abbildung 3.7 auf der nächsten Seite). Der Messkörper ist mit der Mess- und Antriebswelle verbunden, an der über ein Torsionselement die aufgebrachte Schubspannung bestimmt wird. Der Messbecher kann an ein Wasserbad angeschlossen werden, wodurch sich der Doppelspalt einheitlich temperieren lässt. Da es bei längerer Versuchsdauer zu relevanten Verdunstungs-Verlusten kommen kann, wurde der Raum oberhalb des Doppelspaltes ebenfalls temperiert. Eine Wicklung von Silikonschläuchen, die ebenfalls an das Wasserbad angeschlossen war, konnte an dieser Stelle wirksam Verdunstungen des Mediums verhindern.

Zusätzlich wurde das Medium mit einem vortemperierten und befeuchteten Luftstrom mit 5 % CO₂ begast, um eine Veränderung des pH-Wertes bei längerer Untersuchungsdauer zu verhindern. Bei sehr niedrigen Drehzahlen musste hier auch zusätzlicher Sauerstoff supplementiert werden, um eine entsprechende Limitierung auszuschließen.

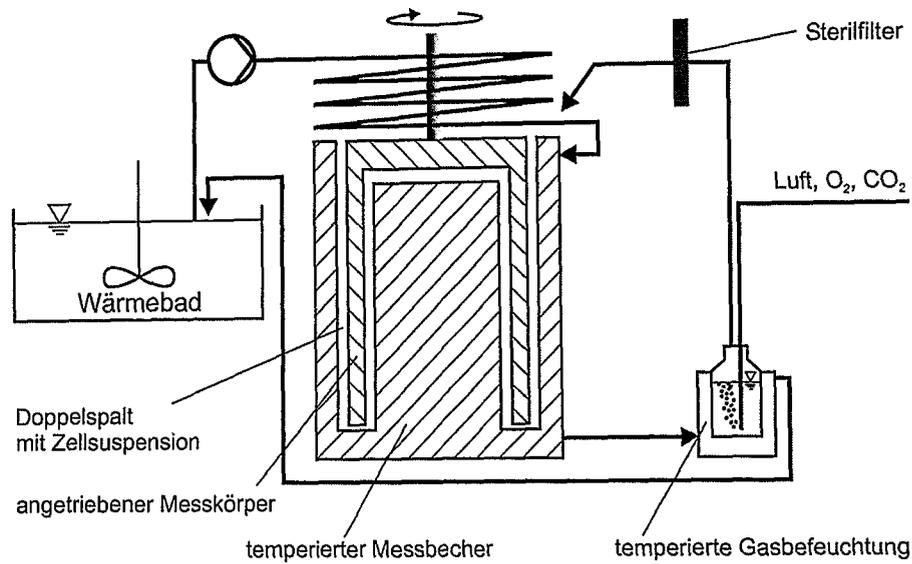


Abbildung 3.7: Der Versuchsaufbau für die Scherkraftuntersuchungen mit dem Rotations-Viskosimeter

Für die Untersuchungen des Scherkraft-Einflusses kamen 12 mL der zu untersuchenden Zellsuspension in den Doppel-Ringspalt. Die Zellen wurden dann unter konstanter Schubspannung im Ringspalt kultiviert. Die Probenahmen zur Zellzahlbestimmung erfolgten zeitlich gestaffelt mit einer Kanüle.

Da dieser Versuchsaufbau nicht sicher sterilisierbar ist, wurde in den Versuchen unter keimarmen Bedingungen und mit Antibiotika gearbeitet.

Grundlegende Voruntersuchungen

4.1 Werkstoffeinflüsse

4.1.1 Einflüsse auf stromale Zellen

Der Materialeinfluss auf stromale Zellen wurde mit der bestrahlten Zelllinie M2-10B4 untersucht. Die genauen Kulturbedingungen sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite. Hier ist die Gesamtzellzahl der stromalen Zellen pro Ansatz relativ auf den Wert der Positiv-Kontrolle Polystyrol bezogen. Da die Zellen wachstumsarretiert waren, ist eine Auftragung der Expansion nicht sinnvoll. Bis auf eine leicht schädigende Wirkung des Bleis, sind im Rahmen der Messgenauigkeit keine wesentlichen Einflüsse zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht prinzipiell den Erwartungen. Die stromalen Zellen schaffen durch die Ausbildung der Extrazellulär-Matrix eine schützende Schicht zwischen sich und der Umgebung. Selbst bei der Kultivierung der Zellen auf der Materialprobe ist daher ein direkter Kontakt zwischen Zelle und Werkstoff unwahrscheinlich. Ein schädigender Einfluss kann deshalb nur durch die Bindung von Nährstoffen an den Werkstoff oder das Herauslösen toxischer Substanzen, wie zum Beispiel Weichmacher, verursacht werden. Weiterhin kann angenommen werden, dass das Serum einen zusätzlichen schützenden Effekt hat. Bis auf das Blei, das in Form von Pb^{2+} auch in Lösung geht, sind alle untersuchten Materialien für die Kultivierung von stromalen Zellen uneingeschränkt verwendbar.

4.1.2 Einflüsse auf hämatopoetische Zellen

4.1.2.1 Einflüsse bei direktem Werkstoffkontakt

Bei der Kultivierung von hämatopoetischen Zellen (Tabelle 4.2 auf der nächsten Seite) zeigen die untersuchten Werkstoffe eine wesentlich größere Wirkung auf die Zellen. Dies ist aber entscheidend von dem eingesetzten Medium abhängig. Während in serumhaltiger Kultur nur Glas, Silikon, Viton und Blei eine spürbare Schädigung der Zellen ergeben (Abbildung 4.2 auf Seite 55), ist in serumfreier Kultur bei allen Materialien ein deutlicher Einfluss zu erkennen (Abbildung 4.3 auf Seite 55). Dabei ist die verringerte Expansion

Tabelle 4.1: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die stromale Zelllinie M2-10B4

Zellen:	stromale Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy)
Medium:	5 mL/Ansatz RPMI + 10 % FCS
Kultursystem:	Gewebekulturschalen (Ø 60 mm) mit Materialproben im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)
Kulturdauer:	7 Tage
Inokulumdichte:	$3 \cdot 10^4$ c/mL
Fütterung:	keine
Zahl der Versuche:	n=4

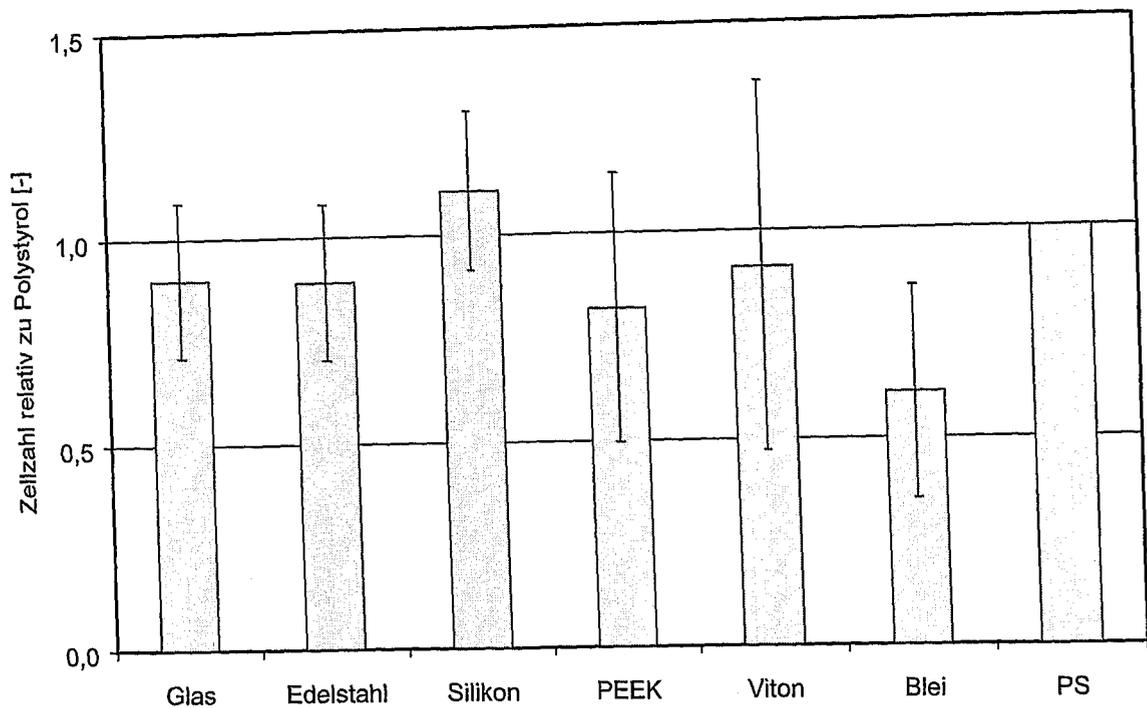


Abbildung 4.1: Der Einfluss verschiedener Materialien auf stromale Zellen

Tabelle 4.2: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die hämatopoetischen Zellen mit direktem Werkstoffkontakt

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	5 mL/Ansatz IMDM + 12,5 % FCS + 12,5 % HS + Zytokin-Standard 1 bzw. X-Vivo 10 + Zytokin-Standard 1
Kultursystem:	Gewebekulturschalen (Ø 60 mm) mit Materialproben im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)
Kulturdauer:	7 Tage
Inokulumdichte:	5 · 10 ³ c/mL
Fütterung:	keine
Zahl der Versuche:	n=4

bei frühen Zellen, den CFC, stärker ausgeprägt. Das Wachstum der CFC und damit die biologische Aktivität der Zellen wird besonders durch die Werkstoffe beeinflusst.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, warum die Messung der Gesamtzellzahl nicht ausreicht, um hämatopoetische Zellen zu charakterisieren. Die frühen Zellen sind nämlich keineswegs immer die sensiblere Teilpopulation im Vergleich zu weiter ausdifferenzierten Zellen. So kann man beispielsweise nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen häufig beobachten, dass speziell die weiter ausdifferenzierten Zellen diese Behandlung nicht überleben. Die Wiederfindungsrate bei frühen Zellen ist dagegen sehr hoch.

4.1.2.2 Einflüsse ohne direkten Werkstoffkontakt

Die grundsätzliche Frage bei der Schädigung der Zellen durch Werkstoffe ist, ob sie durch den direkten Zell-Werkstoff-Kontakt oder durch eine Interaktion von Medium und Werkstoff, wie durch Adsorption von Medienbestandteilen oder durch das Herauslösen von toxischen Substanzen aus der Materialprobe, verursacht wird. Um diese Frage für die hämatopoetischen Zellen zu beantworten, wurden die Untersuchungen unter serumfreien Bedin-

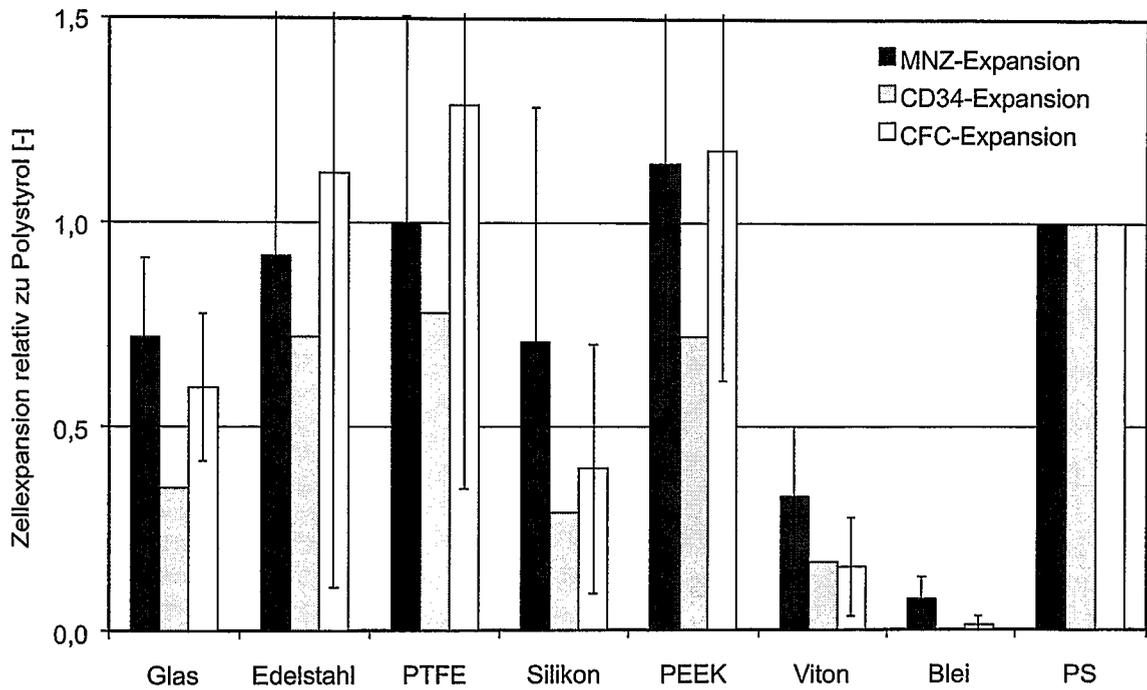


Abbildung 4.2: Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serumhaltiger Kultur

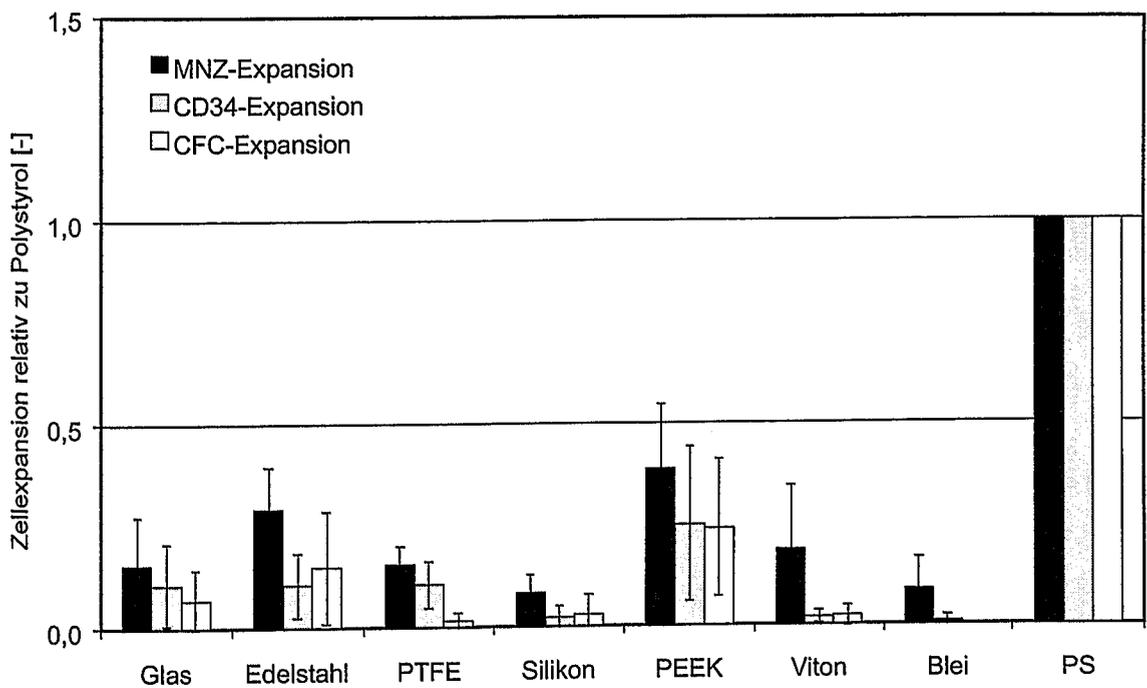


Abbildung 4.3: Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serumfreier Kultur

Tabelle 4.3: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Materialeinflusses auf die hämatopoetischen Zellen ohne direkten Werkstoffkontakt in serumfreiem Medium

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	1 mL/Ansatz X-Vivo 10 + Zytokin-Standard 1
Kultursystem:	Gewebekulturplatte mit zwölf Vertiefungen ohne Materialproben im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)
Kulturdauer:	10 Tage Inkubation der Materialien, 7 Tage Kultivierung der Zellen
Inokulumsdichte:	1 · 10 ⁴ c/mL
Fütterung:	keine
Zahl der Versuche:	n=4

gungen wiederholt, wobei die Zellen nicht in direkten Kontakt mit den Werkstoffen kamen (Tabelle 4.3). Das Medium inkubierte vielmehr vor der Kultivierung für zehn Tage mit den Werkstoffen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass Wechselwirkungen zwischen Werkstoff und Medium zum Zeitpunkt des Inokulums abgeschlossen waren.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen in Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite zeigt eine deutlich geringere Schädigung der Zellen im Vergleich zu der Kultur mit direktem Materialkontakt. Besonders PEEK, aber auch PTFE sind im Rahmen der Messgenauigkeit als inert zu betrachten. Die übrigen Materialien haben weiterhin einen sehr starken Einfluss. Die Schädigung der Zellen ohne Materialkontakt unter diesen serumfreien Bedingungen ist dabei größer, als die mit Kontakt in serumhaltiger Kultur. Dies bedeutet, dass das Serum einen erheblichen schützenden Effekt auf die Zellen ausübt. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei der Schädigung der Zellen ohne direkten Werkstoff-Kontakt um eine Folge von Proteinbindungen an die Material-Oberfläche handelt. Diese Proteine fehlen in der anschließenden Kultur. Unter serumhaltigen Bedingungen liegen wesentlich höhere Proteinmengen in den Medien vor, weshalb die Bindung eines Teils davon nur eine geringe Auswirkung hat.

Nach diesen Untersuchungen erscheint es empfehlenswert, keine der Standardmaterialien zu verwenden. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass im technischen System die Material-Effekte in dieser starken Form nicht beobachtet werden können. Es kann zum Beispiel kein Unterschied zwischen einer Kultur in einer Gewebekulturflasche aus Polystyrol und einem Spinner aus Glas festgestellt werden (vergleiche Abschnitt 7.2 auf Seite 107). Diese Beobachtungen könnten sich aus den unterschiedlichen Verhältnissen zwischen der Werkstoffoberfläche und dem Kulturvolumen erklären. Nach einer zehntägigen Inkubation des Mediums sollten sämtliche Bindungsprozesse abgeschlossen sein und sich eine Sättigung der Oberfläche eingestellt haben. Damit wäre die Stärke des Effekts nur noch vom Verhältnis der Oberfläche zum Volumen abhängig.

Um die These der Proteinbindung zu prüfen und das Fehlen schädlicher Einflüsse im technischen System zu erklären, wurde das Verhältnis der Werkstoffoberfläche zum Mediovolumen variiert (Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite). Ein Verhältnis von 11,31 cm²/cm³ entspricht den bisherigen Untersuchungen, das Verhältnis 1 cm²/cm³ dem miniaturisierten Spinner. Deutlich ist die Abnahme des schädigenden Werkstoff-Einflusses bei sinkendem Verhältnis von Oberflächen zu Volumen zu beobachten.

4.1.3 Diskussion

Die Ergebnisse belegen eine negative Wirkung der standardmäßig verwendeten Werkstoffe auf die Kultivierung hämatopoetischer Zellen, dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf stromale Zellen. Dieses deckt sich qualitativ mit den in der Literatur beschriebenen Unter-

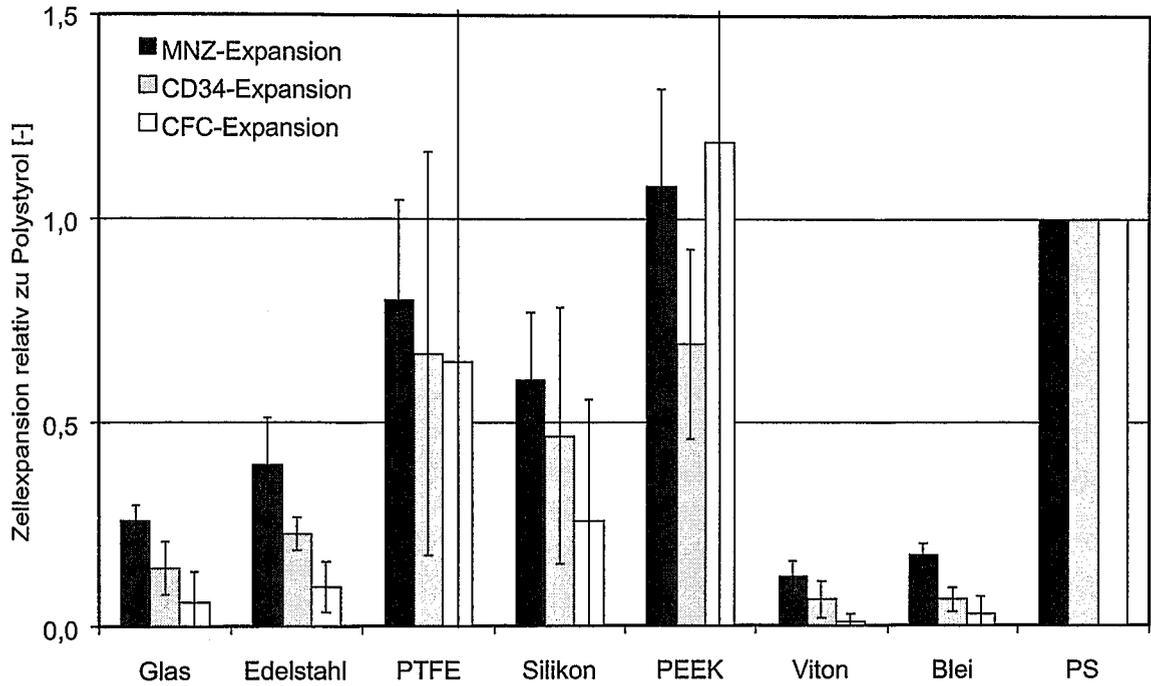


Abbildung 4.4: Der Einfluss verschiedener Materialien auf hämatopoetische Zellen in serumfreier Kultur ohne direkten Werkstoffkontakt

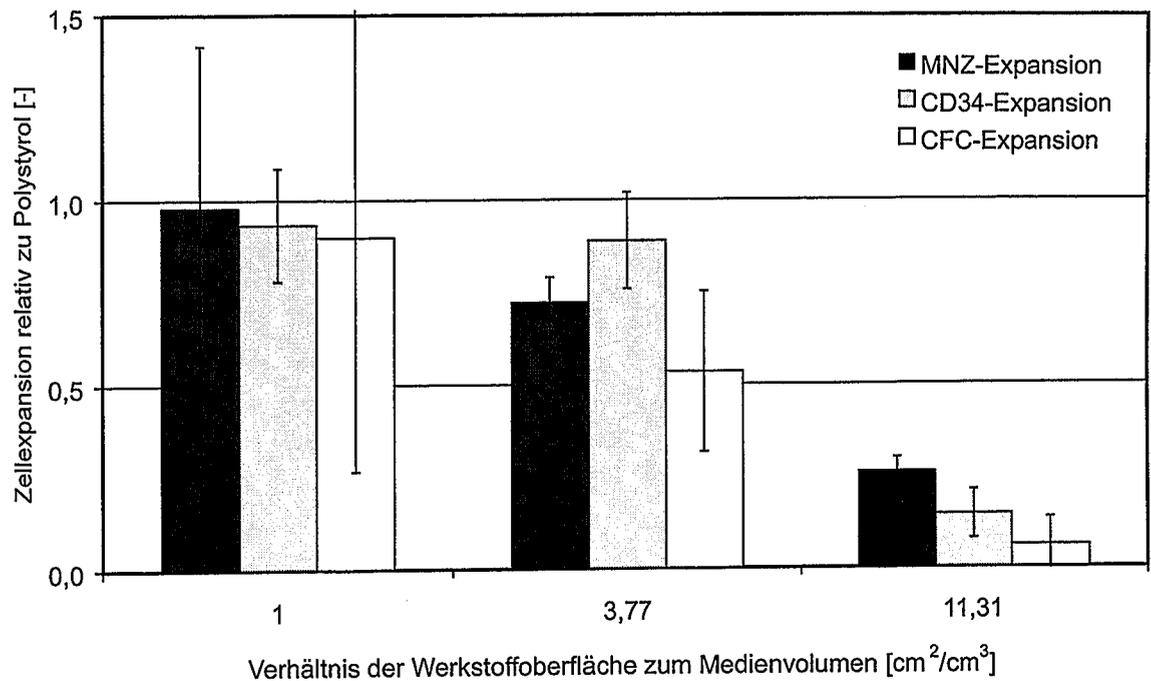


Abbildung 4.5: Der Einfluss von Glas auf hämatopoetische Zellen in serumfreier Kultur ohne direkten Werkstoffkontakt in Abhängigkeit des Verhältnisses der Werkstoffoberfläche zum Medienvolumen

suchungen von LAIUPPA [135, 134, 136]. Ein quantitativ genauer Vergleich lässt sich nicht durchführen, da speziell das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen nicht angegeben wird. Die prinzipiellen Aussagen sind aber deckungsgleich: Zum einen sind frühe Zellen bezüglich des Werkstoffeinflusses, im Gegensatz zur Kryokonservierung, empfindlicher als weiter ausdifferenzierte Zellen, zum anderen kann der schädigende Effekt auf Adsorptionseffekte beziehungsweise auf das Herauslösen toxischer Substanzen zurückgeführt werden.

Obwohl die Hauptursache der Schädigung in der Interaktion zwischen Material und Medium und nicht zwischen Material und Zellen liegt, kann bei direktem Materialkontakt der Zellen noch eine Verstärkung der Schädigung beobachtet werden. Dies hat insbesondere Folgen für immobilisierte Kulturen. Auch im stromafreien Ansatz gibt es Versuche, die Zellen zu immobilisieren. Dabei ist der Hintergrund die Vermutung, dass zum Erhalt der sehr frühen Zellen oder der Stammzellen, die Adhäsion der Zellen selbst eine wichtige Voraussetzung darstellt. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse muss man bei der Verwirklichung solcher Konzepte die Auswahl der Materialien besonders beachten. Glas, als prinzipiell naheliegendste Wahl, wäre demnach ungeeignet.

Die Tatsache, dass die Materialeinflüsse bei den in dieser Arbeit entwickelten Systemen nicht beobachtbar sind, liegt bei den immobilisierten Systemen zumindest zum Teil an der schützenden Wirkung des Stromas. Insgesamt werden die hämatopoetischen Zellen aber dank des günstigen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen nicht wesentlich geschädigt. Eine Bestätigung findet sich bei COLLINS, der in handelsüblichen Spinnern aus Glas herausfand, dass ein vorheriges Silikonisieren des Gefäßes keinen Vorteil bringt [42]. Diese Untersuchungen fanden unter serumfreien Bedingungen statt, bei denen die Schädigung durch Glas prinzipiell größer ist als die des Silikons (vergleiche Abbildung 4.4 auf der vorherigen Seite). Auch hier ist die günstige Geometrie die wahrscheinliche Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes.

Wichtige Konsequenz der vorliegenden Untersuchung, wie der Erfahrungen aus der Literatur, ist in jedem Fall, dass beim momentanen Stand der Technik das Material nur eine untergeordnete Rolle spielt und zunächst keinen wesentlichen Einfluss darstellt. Bei jeder Veränderung in der Geometrie der Systeme muss aber der Materialeinfluss beachtet und neu bewertet werden. Auch bei der Verwendung ganz neuer Materialien legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, deren Einfluss als Werkstoffprobe und im Kultursystem auf die Zellen sorgfältig zu überprüfen.

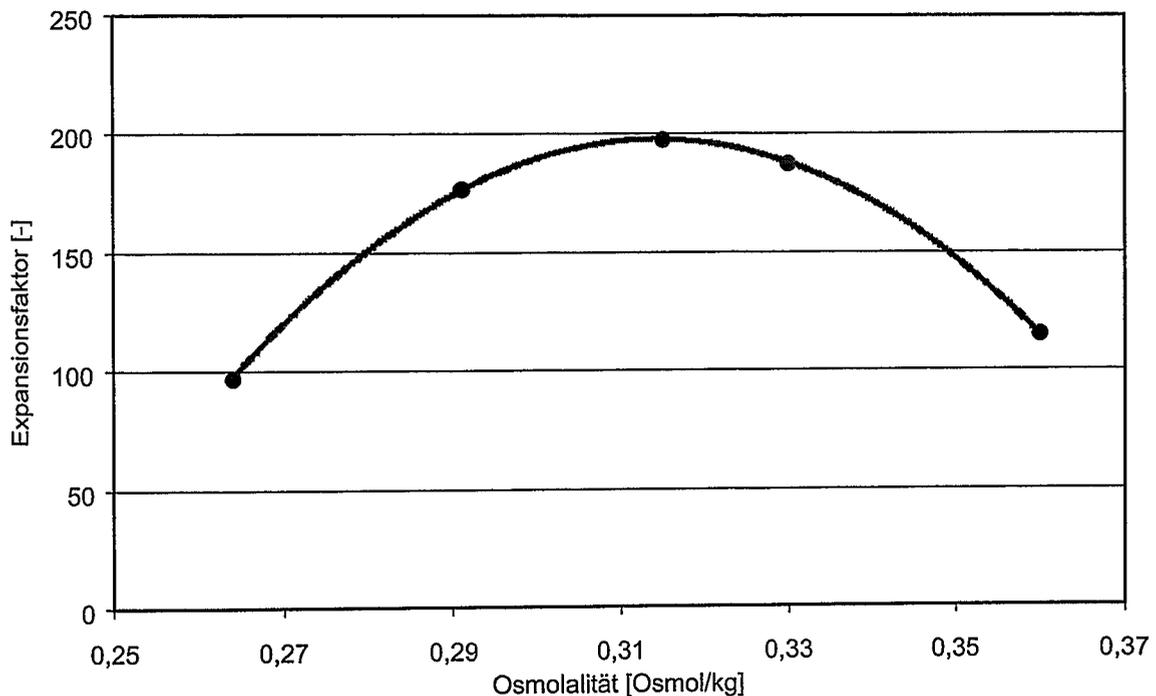
4.2 Der Einfluss der Osmolalität

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den Einfluss der Osmolalität zeigen besonders starke Schwankungen im gesamten Wachstumsverhalten aufgrund der Spendervariabilität. Die Daten der unabhängigen Versuche mit Zellmaterial von zwei verschiedenen Spendern können daher nicht gemeinsam dargestellt werden. Es zeigte sich aber, dass sich die Spendervariabilität nur auf die Proliferations-Fähigkeit der Zellen auswirkt. Die Lage aller gefundenen Optima war nicht von der Spendervariabilität betroffen. Dies ermöglicht es, die Kulturbedingungen zu optimieren, obwohl wegen des Primärmaterials bezüglich der Expansionsfaktoren nie eine sicher reproduzierbare Kultivierung möglich sein wird.

Durch die Erweiterung der Untersuchungen des von MCADAMS [162] betrachteten hypertonen auf den hypotonischen Bereich konnten die optimalen Osmolalitäten ermittelt werden. Die Kulturbedingungen zeigt Tabelle 4.4 auf der nächsten Seite. Es lassen sich dabei zunächst Optima in den aus Erfahrungen in der tierischen Zellkultur erwarteten Bereichen erkennen. Für die Expansion der Gesamtzellzahl, also der MNZ, kann ein idealer Bereich von 0,3–0,32 Osmol/kg angegeben werden (Abbildung 4.6 auf der nächsten Seite). Die Expansion der CD34⁺-Zellen, dargestellt in Abbildung 4.7 auf Seite 60, liefert ein ähn-

Tabelle 4.4: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung des Einflusses der Osmolalität

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	3 mL/Ansatz X-Vivo 10 + Zytokin-Standard 2
Kultursystem:	25 cm ² Gewebekulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)
Kulturdauer:	10 Tage
Inokulumdichte:	1,1 · 10 ⁴ c/mL
Fütterung:	keine
Zahl der Versuche:	n=2

**Abbildung 4.6:** Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von MNZ

liches Maximum. Hier zeigt sich aber, dass es bei höheren Osmolalitäten zu einer relativ schnellen Inhibierung der CD34⁺-Zellen kommt. Der hypertonische Bereich ist daher in jedem Fall zu vermeiden, möchte man eine Kultivierung von CD34⁺-Zellen optimieren. Dazu muss sowohl die ursprüngliche Osmolalität des Mediums, als auch die Gefahr der Verdunstung aus dem laufenden Prozess beachtet werden. Verdunstungsprozesse führen zu steigenden Osmolalitäten.

Ein sehr differenziertes Bild liefern die Ergebnisse für die koloniebildenden Zellen. Die gesamte CFC-Expansion hat ein sehr flaches Maximum, das in einem ähnlichen Bereich wie die Maxima der MNZ- und CD34⁺-Expansion liegt (Abbildung 4.8 auf Seite 61). Schlüsselte man dieses Ergebnis aber weiter nach den Subpopulationen auf, ergibt sich ein deutlich anderes Bild. Wie in Abbildung 4.9 auf Seite 61 dargestellt, gibt es klar unterschiedliche Maxima für BFU-E und für CFU-G und CFU-M. Die erythroide Reihe wird besonders bei sehr hohen Osmolalitäten, in einem Bereich um 0,34 Osmol/kg, unterstützt. Die maximale Expansion ist bei den BFU-E auch schon nach sieben Tagen zu beobachten. Alle anderen Subpopulationen haben das Expansionsmaximum am zehnten Tag und zeigen bei niedrigen Werten um 0,29 Osmol/kg eine maximale Proliferation. Das zunächst angenommene flache Maximum für die CFC-Expansion stellt also nur einen Mittelwert aus sehr unterschiedlichen einzelnen Maxima der Subpopulationen dar. Dieses Ergebnis erinnert an die

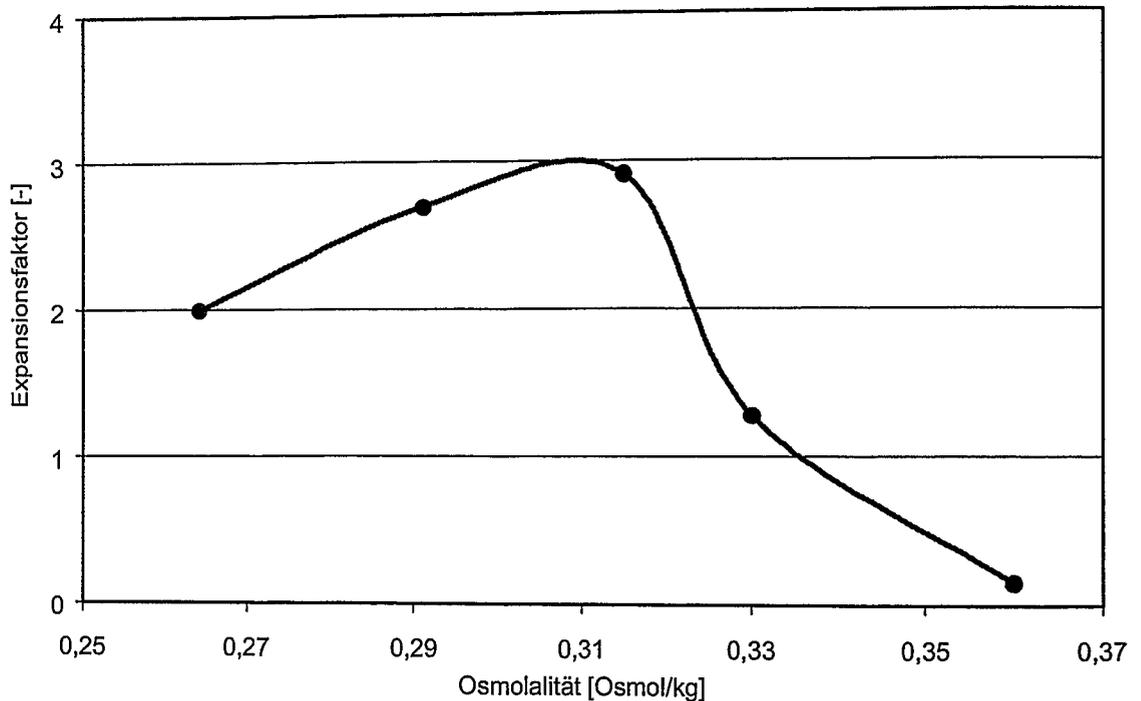


Abbildung 4.7: Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von CD34⁺-Zellen

Untersuchungen von McADAMS zum Einfluss des pH-Werts [165, 167]. Auch hier hat speziell die erythroide Reihe unterschiedliche Optimalbedingungen (vergleiche Abschnitt 2.5.3.4 auf Seite 22). Abhängig von der Zielsetzung der Kultivierung kann demnach auch die eingestellte Medien-Osmolalität einen wichtigen Einfluss haben. Der Kompromiss, bei dem alle Subpopulationen der Ausdifferenzierungs-Reihen gleichwertig unterstützt werden, liegt in dem Bereich von 0,31–0,32 Osmol/kg.

Es konnte auch gezeigt werden, dass sich die Osmolalität bei allen eingestellten Werten während der Kultivierung nicht wesentlich ändert (Abbildung 4.10 auf Seite 62). Tendenziell scheint die Osmolalität während der Kultivierung leicht zu steigen. Dies spricht für Verdunstungseffekte, die entweder auf nicht absolut ideale Bedingungen im Brutschrank oder auf die Handhabung der Kulturgefäße während der Probenahmen zurückzuführen sind. Begünstigt wird dies sicherlich auch durch die geringe Stoffwechselaktivität der hämatopoetischen Zellen. Dabei bilden die Zellen aus einer großen Anzahl niedermolekularer Stoffe eine kleinere Anzahl höhermolekulare Stoffe. Dadurch wird die Osmolalität gesenkt. Als praktische Konsequenz kann bei Kulturen gezielt die optimale Osmolalität eingestellt werden, die dann über den gesamten Kulturzeitraum vorliegt.

4.3 Fütterungsstrategie

Bei dem Vergleich verschiedener Fütterungsstrategien sollte versucht werden, Hinweise auf limitierende Substrate zu finden. Es sollte darüber hinaus die grundlegende Frage nach der Bedeutung von niedermolekularen Nährstoffen im Vergleich zu den hochmolekularen Wachstumsfaktoren, den Zytokinen, beantwortet werden. Dazu wurden vier Kulturen parallel mit $3 \cdot 10^4$ c/mL inokuliert. Diese Inokulumdichte stellt einen Wert im oberen Bereich der bevorzugten Inokulumdichten dar (vergleiche Abschnitt 2.5.3.5 auf Seite 22). Nach sieben-tägiger Kultur wurde ein Ansatz ungefüttert weiterkultiviert und drei Ansätze unterschiedlich gefüttert: einer mit zytokinfreiem Medium, einer nur mit Zytokinen und einer

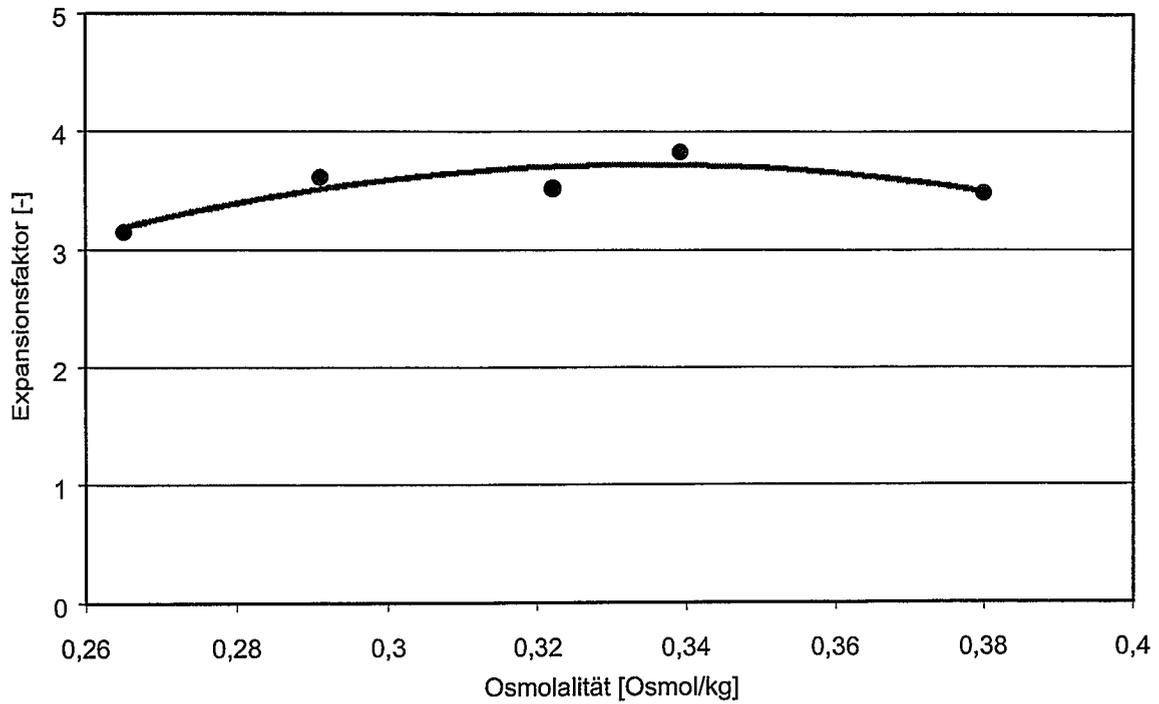


Abbildung 4.8: Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von CFC

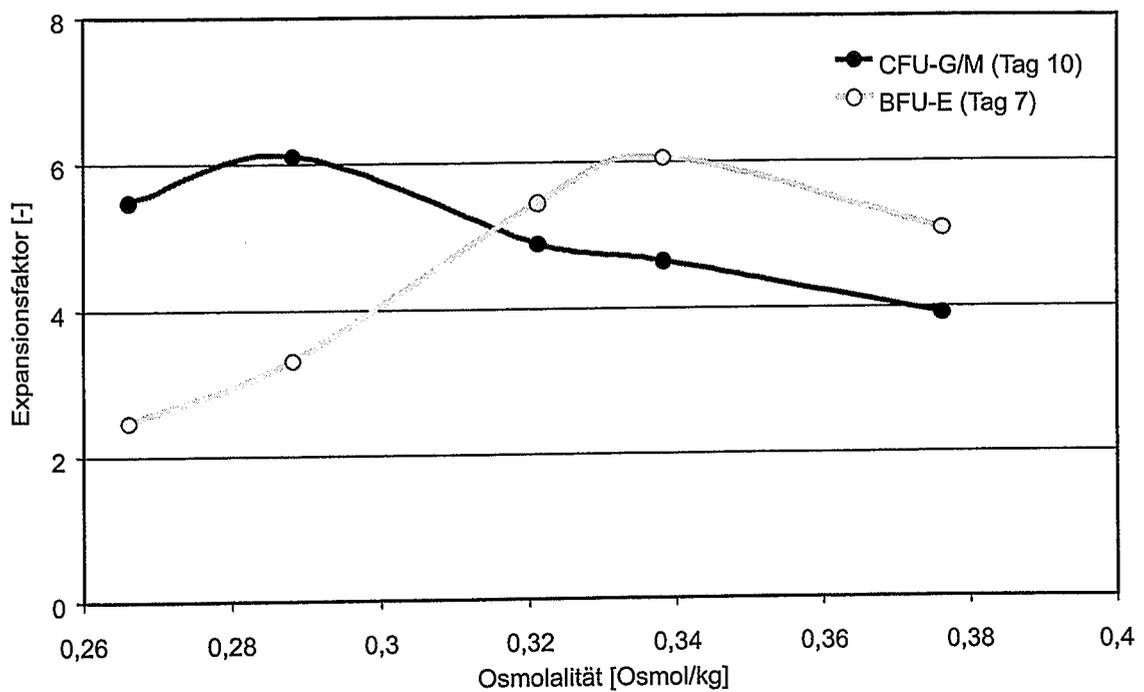


Abbildung 4.9: Der Einfluss der Medien-Osmolalität auf die Expansion von BFU-E und CFU-G/M

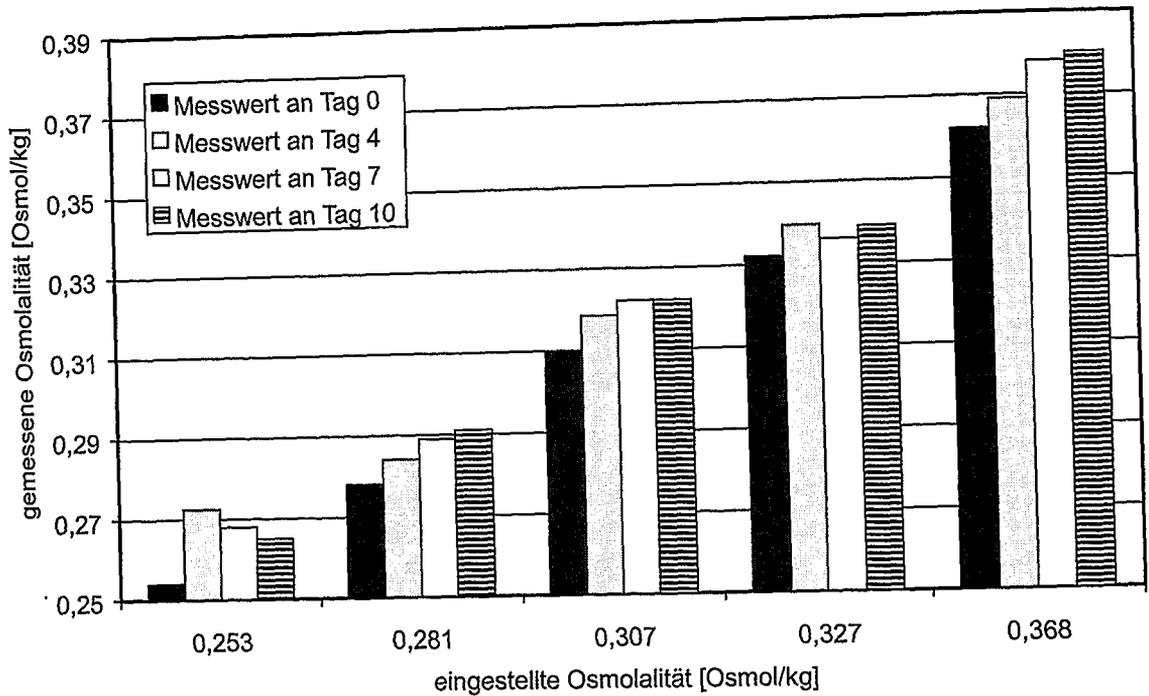


Abbildung 4.10: Die Veränderung der Medienosmolalität während der Kultivierung

Tabelle 4.5: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung der Fütterungsstrategie

Zellen:	primäre CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	5 mL/Ansatz CellGro SCGM + Zytokin-Standard 2
Kultursystem:	25 cm ² Gewebekulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂)
Kulturdauer:	14 Tage
Inokulumdichte:	3 · 10 ⁴ c/mL
Fütterung:	variierend (siehe Text)
Zahl der Wiederholungen:	n=2

mit zytokinhaltigem Medium. Die gefütterten Mengen entsprachen dabei den beim Beginn der Kultur verwendeten Mengen. Die sonstigen Versuchsbedingungen finden sich in Tabelle 4.5.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen ein sehr differenziertes Bild, mit unterschiedlichen Resultaten für die verschiedenen hämatopoetischen Subpopulationen. In Abbildung 4.11 auf der nächsten Seite ist zunächst die Expansion der MNZ dargestellt. Der positive Effekt des Fütterns mit Medium ist deutlich zu beobachten. Es ist auch zu sehen, dass die Zugabe der Zytokine noch einen zusätzlichen positiven Effekt hat. Der Kurvenverlauf lässt vermuten, dass sich die Zellen am Tag sieben noch nicht in einer Limitierung oder Inhibierung befinden. Einerseits ergibt die Medienanalyse zu diesem Zeitpunkt keinen Hinweis auf eine Limitierung, andererseits bleibt die Wachstumsrate der MNZ bei der Zufütterung von Medium weiter auf einem Wert von durchschnittlich 0.022 1/h. Das entspricht einer Verdoppelungszeit von fast zwei Tagen und somit der normalen *in vivo* Wachstumsrate (vergleiche Abschnitt 2.2.5 auf Seite 8) sowie den Erfahrungswerten für die *ex vivo* Kultivierung.

Betrachtet man die biologische Funktionalität der Zellen, indem man die Expansion der CFC aufträgt (Abbildung 4.12 auf Seite 64), wird zwar die Notwendigkeit der Medienzufütterung erneut sichtbar, der starke Effekt der Zytokine ist hier aber besonders auffal-

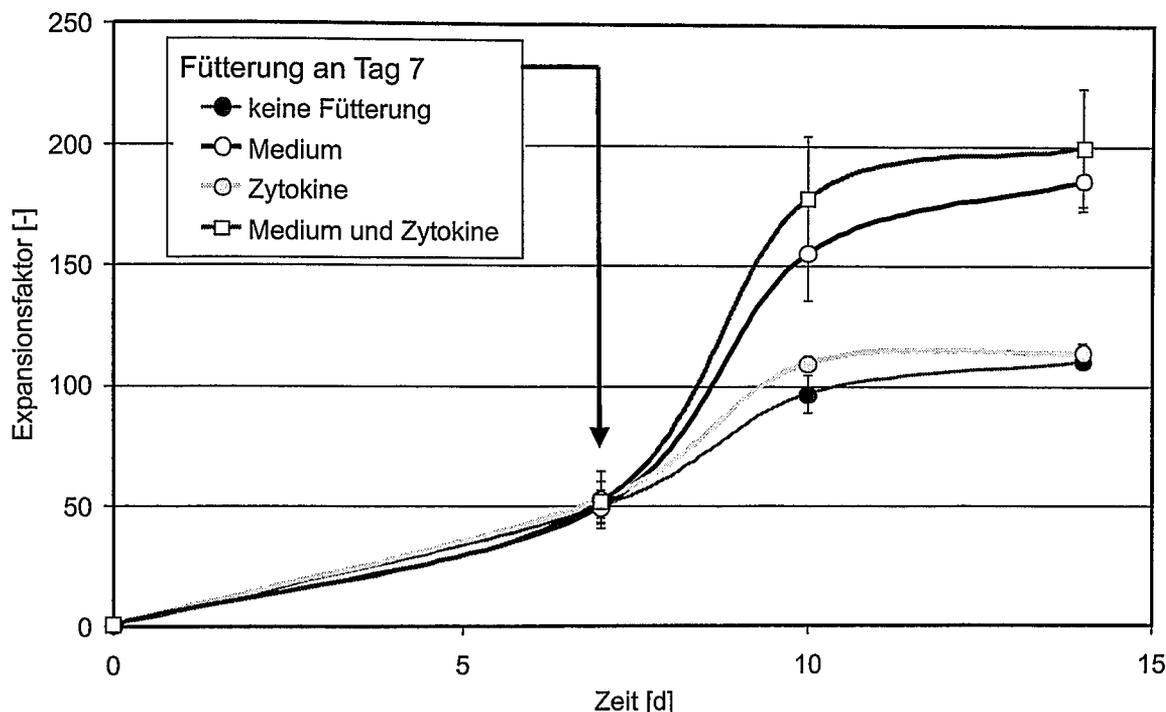


Abbildung 4.11: Die Expansion mononukleärer Zellen bei verschiedenen Fütterungsstrategien

lend. Der Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die biologische Funktionalität ist wesentlich stärker, als auf die Gesamtzellzahl und die allgemeine Wachstumsrate.

Anders als bei den übrigen Subpopulationen ist das Ergebnis für die CD34⁺-Zellen in Abbildung 4.13 auf der nächsten Seite. Hier kann bis zum zehnten Tag eine sehr geringe Auswirkung der Zufütterung beobachtet werden. Obwohl die Zellen in der ungefütterten Kultur offensichtlich limitiert oder inhibiert sind, hat dies erst nach Tag zehn starke Auswirkungen auf die Ausdifferenzierung der CD34⁺-Zellen. Nach diesem Zeitpunkt nimmt die Größe der Population der CD34⁺-Zellen in den nicht mit Medium gefütterten Kulturen sehr stark ab. In den gefütterten Ansätzen ist dagegen beinahe noch ein Erhalt dieser Zellen zu beobachten. Prinzipiell sieht man auch hier die Tendenz des zusätzlich positiven Effekts der Zytokine, wenn auch in abgeschwächter Form.

Einen Hinweis auf die Art der Limitierung ergibt die Medienanalyse der Kulturen. Zu den wesentlichsten niedermolekularen Bestandteilen gehören dabei Glukose und die Aminosäuren. Glukose war in den vorliegenden Kulturen keinesfalls limitierend und lag zu jeder Zeit in ausreichenden Mengen von über 1 g/L vor. Die Konzentration des in der Glykolyse gebildeten Laktats lag unter 20 mmol/L, so dass eine Inhibierung ausgeschlossen werden kann [82, 263]. Ein differenzierteres Bild ergibt sich bei den Aminosäuren. Abbildung 4.14 auf Seite 65 zeigt den Verlauf der Wiederfindungsraten der Aminosäuren in der ungefütterten Kultur. Während die meisten Verläufe keinen Hinweis auf Limitierungen und Inhibierungen geben, fallen vier Aminosäuren auf. Auf der einen Seite sammelt sich Alanin überdurchschnittlich stark an, auf der anderen Seite werden Asparagin, Glutamin und Serin praktisch vollständig verbraucht. Die Konzentrationen sinken dabei auf minimal 5 % des Ausgangswertes. Man kann annehmen, dass eine oder mehrere der drei verbrauchten Aminosäuren in Kombination, die wesentliche niedermolekulare Limitierung der Kultur ausmachen. Eine Inhibierung ist nicht wahrscheinlich. Die Akkumulation des Alanin auf fast das Doppelte des Ausgangswertes, was einer Konzentration von weniger als 0,6 mmol/L entspricht, kann als gering angesehen werden.

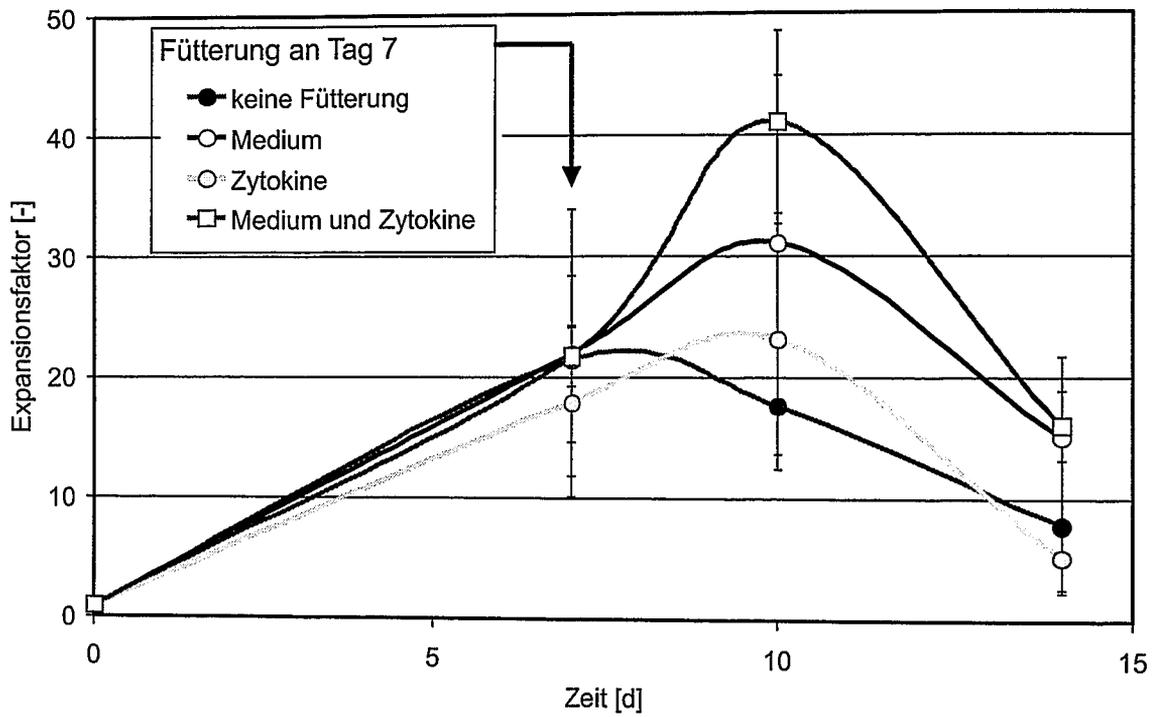


Abbildung 4.12: Die CFC-Expansion bei verschiedenen Fütterungsstrategien

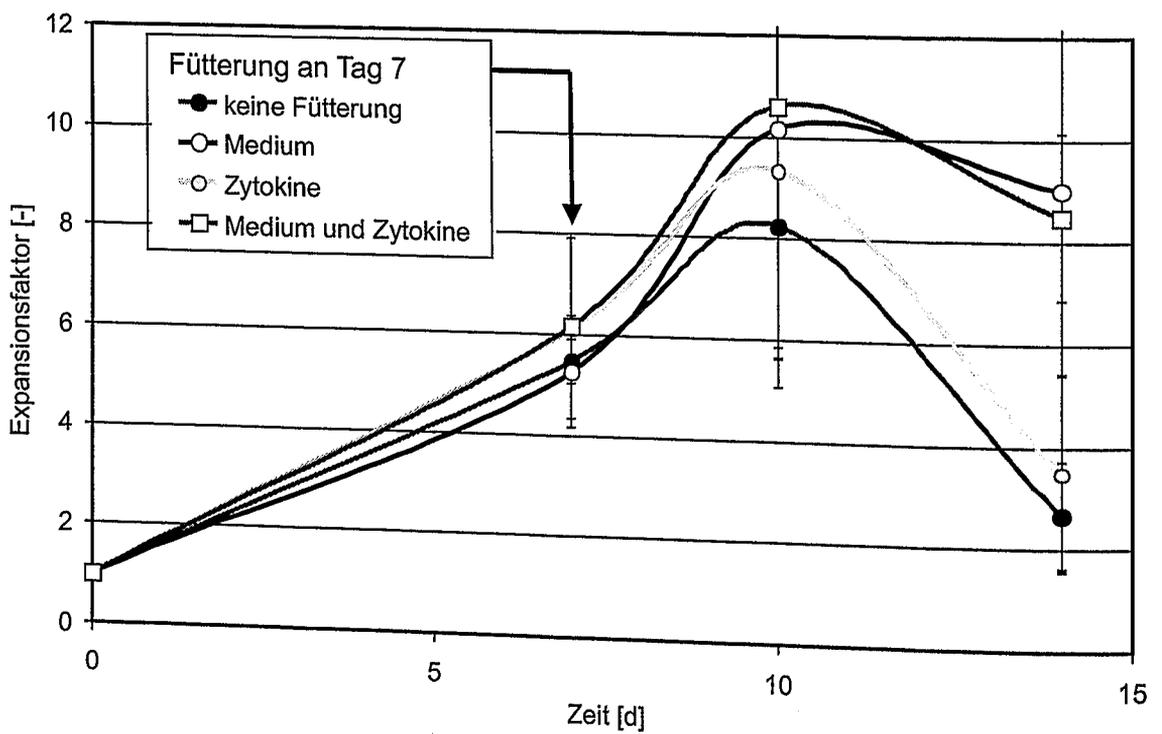


Abbildung 4.13: Die Expansion der CD34⁺-Zellen bei verschiedenen Fütterungsstrategien

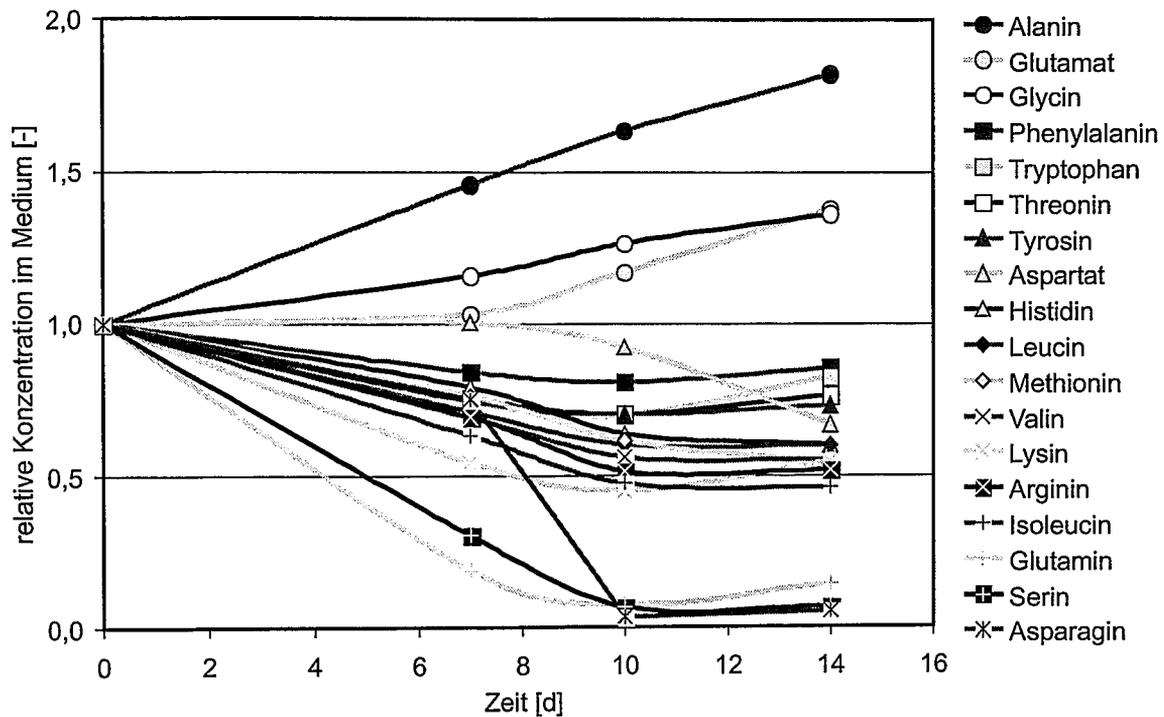


Abbildung 4.14: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen relativ zum Ausgangswert in ungefütterter Kultur

Betrachtet man die maximalen zellspezifischen Verbrauchsrate der einzelnen Aminosäuren (Abbildung 4.15 auf der nächsten Seite), fällt besonders der niedrige Asparagin-Verbrauch auf. Obwohl es sich um eine der niedrigsten Verbrauchsrate handelt, limitiert dieser Stoff. Asparagin liegt in den Medien in unverhältnismäßig geringen Mengen vor. Dies zeigt, dass es nicht ratsam ist, ungeprüft Medien-Zusammenstellungen von anderen Zelltypen auf hämatopoetische Zellen zu übertragen und weiterhin, dass eine solche Überprüfung bei den käuflich erhältlichen Spezialmedien für hämatopoetische Zellen, wie dem verwendeten CellGro SCGM, offensichtlich nicht stattgefunden hat. Diese Tatsache ist noch unverständlicher, wenn man berücksichtigt, dass die Aminosäure-Verbrauchsrate der hämatopoetischen Zellen deutlich unterhalb der von Standard-Zelllinien der Säugerzellkultur liegen. Beispielsweise werden für die Glutamin-Verbrauchsrate mehr als 19fach höhere Werte bei Hybridoma-Zellen und 21fach höhere Werte bei CHO-Zellen angegeben [5, 57]. Die Versorgung der hämatopoetischen Zellen mit niedermolekularen Substraten scheint danach im Vergleich zu der Versorgung von üblichen tierischen Zelllinien keine große Herausforderung darzustellen. Aus diesen Ergebnissen folgt auch, dass es sinnvoll ist, die entsprechenden Aminosäuren dem Medium zu supplementieren. Dieses Vorgehen wird beispielhaft in Kapitel 9 auf Seite 141 für die Zelllinie NK-92 demonstriert.

4.4 Untersuchungen des Scherkräfteinflusses

Die Untersuchungen des Einflusses von laminaren Scherkräften auf hämatopoetische Zellen verfolgen zwei Ziele. Zum einen soll die Zelllinie KG-1 als Modell für primäre CD34⁺-Zellen bestätigt werden, zum anderen bieten die Ergebnisse die Möglichkeit, Vergleiche mit anderen Zelllinien aus dem Bereich der Säugerzellkultur zu ziehen.

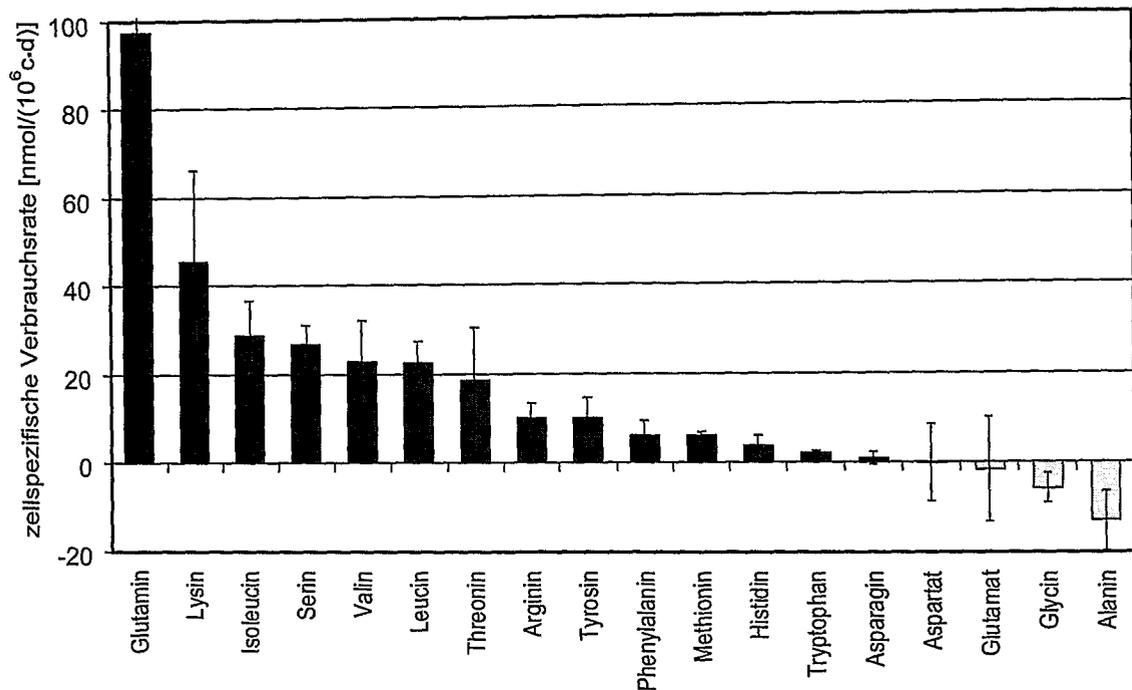


Abbildung 4.15: Maximale Aminosäure-Verbrauchsrate in ungefütterter Kultur

Tabelle 4.6: Die untersuchten Schubspannungen und die zugehörigen Taylorzahlen

Schubspannung τ [Pa]	Taylorzahl (Außenspalt) Ta_o [-]	Taylorzahl (Innenspalt) Ta_i [-]
0,64	24,40	18,63
1,45	55,36	42,28
2,47	94,56	71,99
3,29	125,75	96,04

4.4.1 KG-1

Die Messungen wurden bei vier verschiedenen Schubspannungen durchgeführt (Tabelle 4.6). Bis auf die niedrigste Scherrate liegen alle Messpunkte bereits im Übergangsbereich. Eine Bildung von Taylorwirbeln ist daher wahrscheinlich. Alle Werte liegen jedoch weit unter der Grenze zur turbulenten Strömung, weshalb man näherungsweise trotzdem von einer laminaren Strömung ausgehen kann.

Für jede Schubspannung wurden vier Messreihen aufgenommen. Die betrachtete Scherzeit lag dabei zwischen einer Minute und einem Tag. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4.16 auf der nächsten Seite. An jede Messreihe wurde dann eine exponentielle Funktion angepasst. Die Funktion, die ebenfalls in der Abbildung dargestellt ist, hat die Form:

$$\frac{c(t)}{c(t=0)} = \exp(kt) \quad (4.1)$$

mit: c = Zelldichte [c/m³]
 t = Zeit [s]
 k = Absterbekoeffizienten [1/s]

Der Absterbekoeffizienten ist auch der Anpassungs-Parameter. Die Definition des Absterbekoeffizienten als positive Größe führt automatisch zu negativen Werten von k . Dies

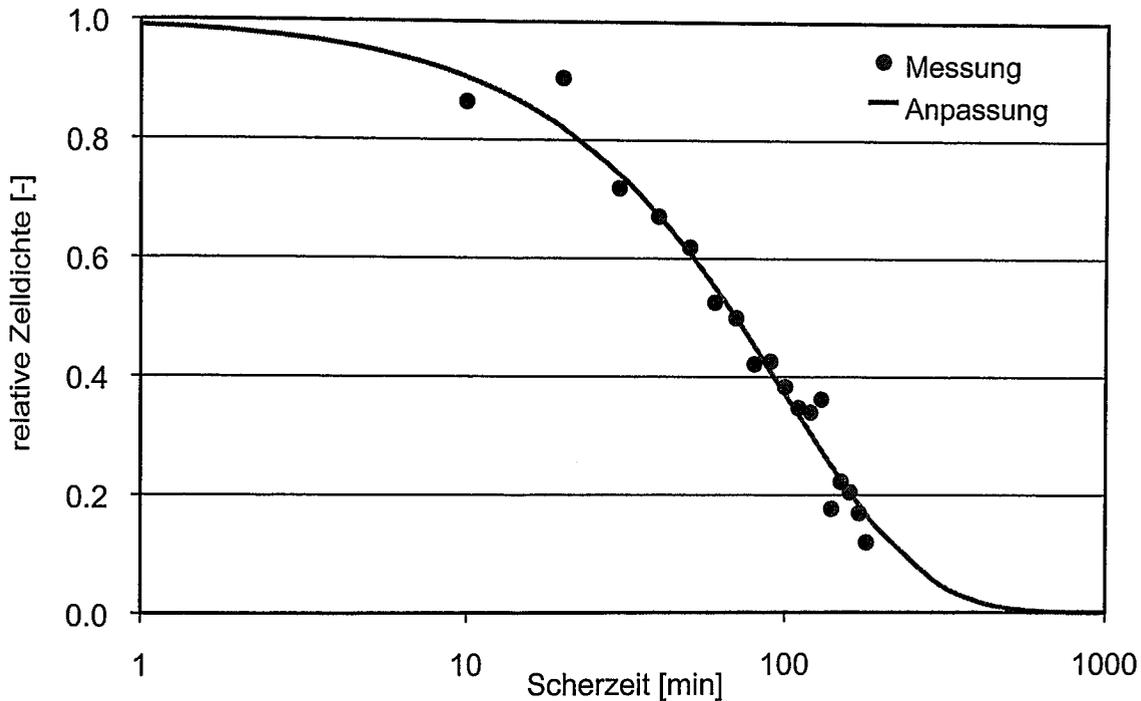


Abbildung 4.16: Die Messwerte einer beispielhaften Absterbekurve für die Zelllinie KG-1 bei einer Schubspannung von 3,29 Pa und die dazugehörige Anpassung

ist sinnvoll. Im Extremfall, der Abwesenheit jeglicher Scherkraft, geht diese Form in den normalen Ansatz für ein exponentielles Wachstum der Zellen über. Dann ist der Absterbekoeffizient k identisch mit dem Wachstumsfaktor μ und ermöglicht ein gemeinsames Auftragen des Wachstumskoeffizienten und des Absterbekoeffizienten.

Abbildung 4.17 auf der nächsten Seite zeigt diese Koeffizienten als Mittelwert von jeweils vier unabhängigen Messungen. Der Wert für die Schubspannung von 0 Pa entspricht dem mittleren Wachstumskoeffizienten in statischer Kultur, also unter Abwesenheit jeglicher Agitation des Mediums. Es zeigt sich eine näherungsweise lineare Abhängigkeit zwischen der Schubspannung und dem Absterbekoeffizienten. Mit der ebenfalls in der Abbildung dargestellten Anpassung lässt sich eine Aussage über die kritische Schubspannung machen, bei der kein Wachstum mehr beobachtet werden kann. Dieser Wert liegt danach bei 0,122 Pa.

Eine weitere Messung wurde bei einer sehr geringen Schubspannung von 0,034 Pa durchgeführt. Bei diesem Wert müssen die Zellen sich vermehren, aber nicht mit der maximalen Wachstumsrate. Mit der Messung kann sowohl die Anpassung aus Abbildung 4.17 auf der nächsten Seite, als auch der gesamte Versuchsaufbau überprüft werden. Gibt es neben den Scherkräften andere schädigende Bedingungen, so dürften die Zellen sich unter einer so geringen Schubspannung nicht vermehren. In vier unabhängigen Versuchen, in denen die Zellen bis zu 48 Stunden kultiviert wurden, konnte eine Wachstumsrate von $0,0115 \pm 0,0075 \text{ 1/h}$ ermittelt werden. Die lineare Korrelation der experimentellen Ergebnisse (vergleiche Abbildung 4.17 auf der nächsten Seite) sagt einen Wert von $0,0102 \text{ 1/h}$ voraus. Die Messmethode und die gefundene Korrelation ist damit bestätigt.

4.4.2 Primäre hämatopoetische Zellen

Eine äquivalente Untersuchung mit primärem Zellmaterial ist aufgrund der notwendigen sehr hohen Zellmengen nicht möglich. Es ist aber bekannt, dass die Zelllinie KG-1 prin-

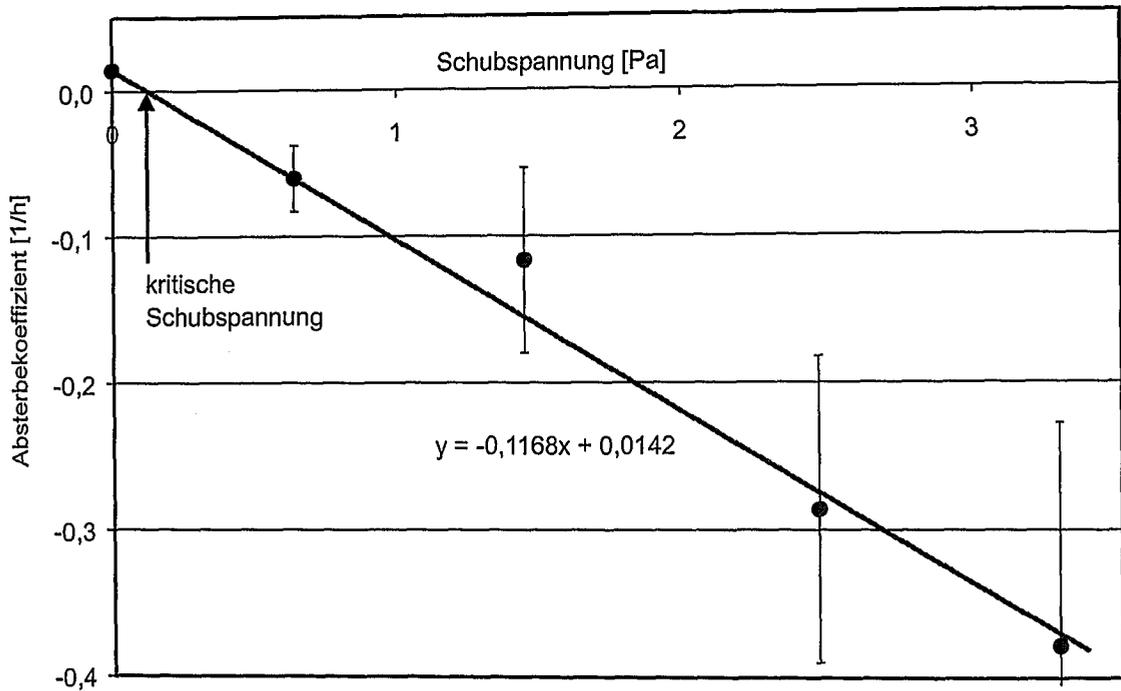


Abbildung 4.17: Die Wachstums- und Absterbekoeffizienten der Zelllinie KG-1 in Abhängigkeit von der Schubspannung

zipiell die gleiche durchschnittliche Wachstumsrate wie primäre CD34⁺-Zellen hat. Unter der Annahme, dass auch bei den primären Zellen zwischen dem Absterbekoeffizienten und der Schubspannung ein linearer Zusammenhang besteht, ist damit nur noch ein Messpunkt erforderlich. Daher wurden bei einer Schubspannung von 3,29 Pa zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Die CD34⁺-Zellen wurden vor der Messung sieben beziehungsweise zehn Tage in X-Vivo 10 mit dem Zytokin-Standard 2 kultiviert. Nach dieser Kultivierung waren genügend Zellen für eine Messung vorhanden. Der danach ermittelte Absterbekoeffizient betrug $0,391 \pm 0,152$ Pa, der Vergleichswert der KG-1 beträgt $0,378 \pm 0,151$ Pa.

4.4.3 Diskussion

Die Wachstums- und Absterbekoeffizienten der primären Zellen und der KG-1 sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Damit ist die Äquivalenz der Scherempfindlichkeit nachgewiesen, und die KG-1 kann als Modell-Zelllinie für primäre hämatopoetische Zellen eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund, dass nur die absolut notwendige Menge an primären Zellen für die Untersuchungen verwendet wurde, sind keine weitergehenden Aussagen möglich. Besonders die Annahme der linearen Abhängigkeit zwischen dem Absterbekoeffizienten und der Schubspannung kann nicht überprüft werden. Ausgehend von den beiden bekannten Messpunkten ist es allerdings unwahrscheinlich, dass die Abhängigkeit wesentlich von der linearen Form der KG-1 abweicht. Prinzipiell sind geringe Abweichung vom linearen Zusammenhang aufgrund der biologischer Vorgänge bei der Scherbelastung zu erwarten, die verwendete Messmethode ist jedoch zu ungenau, um diese aufzuzeigen.

Die ermittelten Daten lassen einen Vergleich mit Literaturwerten zu. Die beschriebenen Untersuchungen mit primären hämatopoetischen Zellen können dazu aber nicht herangezogen werden. Sie verwendeten Zellen aus peripherem Blut vor dem Hintergrund möglicher Beeinträchtigungen der Zellen im fließenden Vollblut *in vivo* (zum Beispiel [169]). Dabei

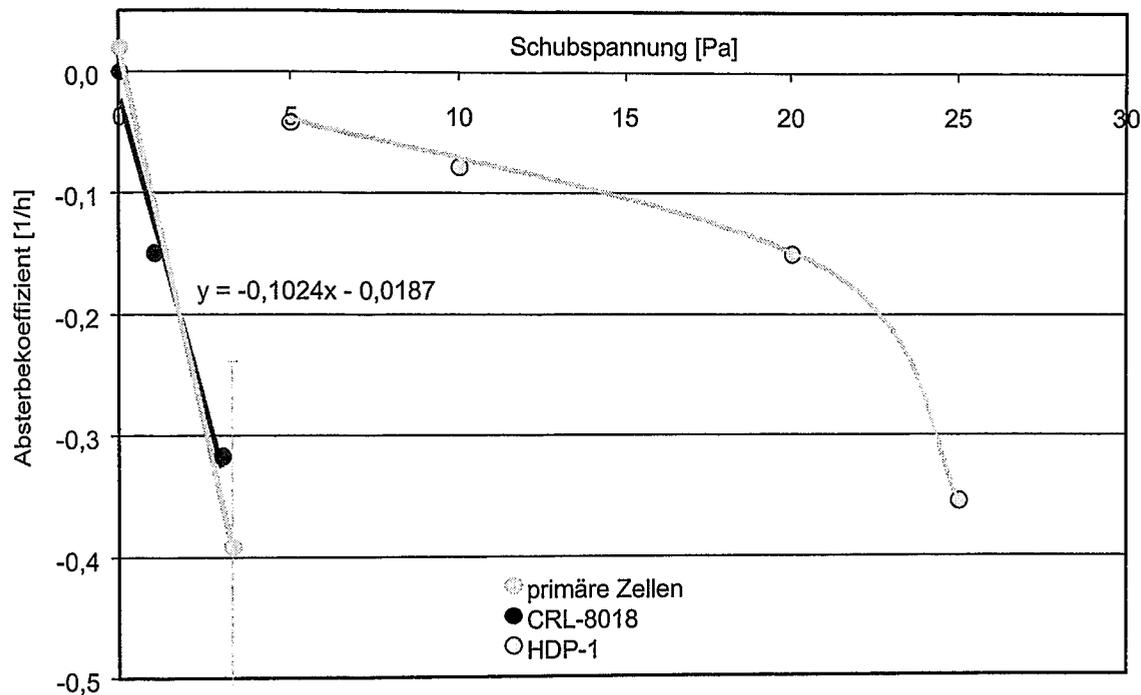


Abbildung 4.18: Die Wachstums- und Absterbekoeffizienten der Hybridoma-Zelllinien CRL-8018 und HDP-1 (sowie primärer CD34⁺-Zellen als Vergleich) in Abhängigkeit der Scherkraft

kommt es bei Scherbelastung zu einer Aggregatbildung der Zellen, besonders in Zusammenhang mit Thrombozyten, die eine schützende Wirkung auf die Zellen hat. Die Scherempfindlichkeit ist unter diesen Voraussetzungen wesentlich geringer als in einer Einzelzellsuspension. Eine solche Aggregatbildung ist aber bei aufgereinigten CD34⁺-Zellen nicht zu beobachten. Daher sind die Ergebnisse nicht vergleichbar.

Vergleiche mit verschiedenen Hybridoma-Zelllinien sind dagegen gut möglich. Es zeigt sich, dass die von PETERSEN und Mitarbeitern gut charakterisierte Zelllinie CRL-8018 [284] ein identisches Verhalten bei Scherbelastung wie die KG-1 und die CD34⁺-Zellen hat ([207], Abbildung 4.18). Zur Verdeutlichung, dass dies keineswegs selbstverständlich ist, sind in der Abbildung zusätzlich die Ergebnisse einer Untersuchung der Hybridoma-Zelllinie HDP-1 [247] gezeigt [1]. Diese Zelllinie ist wesentlich scherunempfindlicher und zeigt zudem keine lineare Abhängigkeit des Absterbekoeffizienten von der Schubspannung.

Durch das ähnliche Verhalten der Zelllinie CRL-8018 lassen sich die Erfahrungen mit diesen Zellen in verschiedenen Kultursystemen wahrscheinlich auf hämatopoetische Zellen übertragen. Eine praktische Überprüfung dieser Annahme könnte darüber hinaus sehr unkompliziert mit der Zelllinie KG-1 als Modell erfolgen. Die CRL-8018 ist sowohl im Spinner-System als auch in einem kontrollierten Suspensionsreaktor umfassend untersucht worden [174, 207, 208]. Die Ergebnisse der Spinner-Kulturen lassen einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu. Hierauf wird in Abschnitt 7.2 auf Seite 107 eingegangen. Der untersuchte Suspensionsreaktor (Setric Genie 2C, Setric Genie Industriel, Toulouse, Frankreich) hatte ein Arbeitsvolumen zwischen 750 mL und 2 L und wäre damit nur für eventuelle Kultivierungen im größeren Maßstab ein interessantes System.

Die vorliegende Untersuchung kann sicherlich nicht alle Einflussfaktoren der Schersensibilität von Zellen umfassend berücksichtigen. Bekannte Faktoren, wie beispielsweise die Wachstumsphase der Kultur, spezielle Strömungszustände und die Anwesenheit von Serum

Tabelle 4.7: Die optimalen Bedingungen für die Kultivierung früher hämatopoetischer Zellen

Parameter	Wert
Temperatur	36–37 °C
Sauerstoffpartialdruck	25 ± 10 % Luftsättigung
pH-Wert	7,2–7,4
Osmolalität	0,31–0,32 Osmol/kg
Inokulumdichte	≤ 5 · 10 ⁴ c/mL

oder von Schutzadditiven wurden nicht speziell berücksichtigt (weitere Untersuchungen zu einzelnen Faktoren finden sich zum Beispiel in [19, 38, 62, 132, 140, 168, 222, 244, 249], Übersichten über das Thema in [37, 201, 270, 269, 273]). Es ist bekannt, dass diese Faktoren einen spürbaren Einfluss auf Zellen haben, auch wenn die konkreten Auswirkungen zum Teil umstritten sind. Zum Beispiel gibt es ganz unterschiedliche Aussagen, ob Serum eine mehr physikalische oder chemisch-biologische Schutzwirkung hat [133, 141].

Im Fall der *ex vivo* Vermehrung hämatopoetischer Zellen sind diese Fragestellungen aber von niedriger Priorität. So hat ein hoher Serumanteil einen sehr positiven Effekt sowohl auf die Expansion, als auch auf die Scherempfindlichkeit der Zellen. In einer klinischen Anwendung ist aber der Einsatz von Serum oder chemischen Schutzadditiven, wenn es vermeidbar ist, nicht zulässig. Die Frage nach der Schutzwirkung dieser Stoffe bei Scherbelastungen ist daher nicht von praktischer Relevanz.

4.5 Schlussfolgerungen aus den Voruntersuchungen

Die vorgestellten Ergebnisse ergeben gemeinsam mit dem Stand der Technik aus der Literatur (siehe Abschnitt 2.5.3 auf Seite 18) ein klares Parameterfeld für die optimale Kultivierung hämatopoetischer Zellen. Eine Zusammenfassung dieser Parameter zeigt Tabelle 4.7. Bei jeder Kultivierung muss jedoch genau das Ziel festgelegt werden. Unterschiedliche Subpopulationen werden auch von unterschiedlichen Kulturbedingungen unterstützt. Für die Kultivierung früher Vorläuferzellen wird im klinischen Umfeld zumeist die Zahl der CFU-GM herangezogen. Dabei ist auch zu beachten, dass CFU-GM hierbei zumeist als Sammelbegriff benutzt wird, der neben den CFU-GM auch die CFU-G und die CFU-M einschließt. Eine genauere Differenzierung findet also nicht statt. Ein ideales Maß für die Kultivierung möglichst früher Zellen ist dies nicht. Eine Ausrichtung der Kultur hinsichtlich einer optimalen Vermehrung von LTC-IC oder MRC ist biologisch wesentlich sinnvoller, jedoch in der Praxis ungleich aufwendiger.

Wenn der hier dargestellte Rahmen der physikalischen Parameter während der gesamten Kultivierung eingehalten wird, kann davon ausgegangen werden, dass bezüglich dieser Parameter die Kultur sehr nahe am Optimum betrieben wird. Eine relevante Verbesserung der Zellexpansion durch Variation dieser physikalischen Rahmenbedingungen kann ausgeschlossen werden. Wesentlich für die weitere Optimierung ist die Medienzusammensetzung. Dabei haben die Untersuchungen zur Fütterungsstrategie mehrere wichtige Erkenntnisse gebracht. In jedem Fall ist es bei Kultivierungen über einen Zeitraum von mehr als sieben Tagen hinaus notwendig, zu füttern. Mögliche Limitierungen liegen dabei zwar zunächst bei niedermolekularen Stoffen, jedoch hat die Fütterung frischer Zytokine immer einen deutlich positiven Effekt. Ebenso wichtig wie die Aufhebung der Aminosäurelimitierung ist daher die Zugabe frischer Zytokine.

Im folgenden Kapitel werden die Kultursysteme vorgestellt, deren zentrale Aufgabe es ist, die in diesem Kapitel vorgestellten optimierten Bedingungen in einem relevanten Maßstab

über die vollständige Kulturzeit zu ermöglichen. Die Optimierung der Medienzusammensetzung durch eine geschlossene Bilanzierung der Bestandteile während der Kultur ist nicht Aufgabe dieser Arbeit, sondern vielmehr deren folgerichtige Weiterführung. Die Kultursysteme sollen die Möglichkeit schaffen, eine geschlossene Bilanz zu erstellen. Darüber hinaus sollen sie auch eine kontrollierte Kultur ermöglichen, so dass einzelne Parameter variiert werden können, ohne dass sich andere zwangsläufig ändern.

Konstruktion der Kultursysteme

In diesem Kapitel werden die grundlegenden konstruktiven Merkmale der neu entwickelten Kultursysteme vorgestellt. Detaillierte technische Zeichnungen finden sich in Kapitel F auf Seite 201. Durch die Rahmenbedingungen, die im vorangegangenen Kapitel sowie in Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23 vorgegeben wurden, ist eine grundlegende Konzeption festgelegt. Die begrenzte Menge an Zellen in einer Spende, die notwendige Zellzahl für klinische Applikationen und die prinzipiell aus Erfahrungen mit tierischen Zellkulturen abschätzbare, erreichbare Zelldichte bestimmen die Kulturvolumina. Darüber hinaus sind die geforderten konstanten physikalischen Kultivierungsparameter nur mit einer geeigneten Messtechnik im Reaktorraum realisierbar. Die notwendige Fütterung kann prinzipiell diskontinuierlich durch manuellen Austausch des Nährmediums erfolgen. Jedoch können so keine konstanten Konzentrationen der Medieninhaltsstoffe gewährleistet werden. Mit einer kontinuierlichen Zufütterung in einer perfundierten Kultur ist dies möglich. Durch die gezielte Rückhaltung der Zellen im Reaktorraum wird eine Verweilzeit-Entkopplung von Biomasse und Nährmedium erreicht. Damit lassen sich durch die gezielte Zufütterung prinzipiell auch alle chemischen Parameter in der Kultur kontrollieren und gegebenenfalls konstant halten. Die spezielle Ausführung dieser Zellrückhaltung ist eine zentrale Problemstellung bei der Konstruktion neuer Kultursysteme. Im immobilisierten System ist die Zellrückhaltung praktisch immanent. Solange die Oberfläche, auf der die Zellen haften, nicht den Reaktor verlässt, was sehr einfach zu verhindern ist, ist eine Zellrückhaltung gegeben. In suspendierten Systemen ist die Frage der Ausführung einer Zellrückhaltung dagegen zunächst offen und bedarf besonderer Aufmerksamkeit.

5.1 Immobilisierte Systeme

Die immobilisierten Systeme basieren auf der Idee, die hämatopoetischen Zellen in Kokultur mit stromalen Zellen auf porösen Mikroträgern mit einem Durchmesser von 400–700 μm zu kultivieren. Dadurch werden die Verhältnisse *in vivo* in zweierlei Hinsicht mimikriert. Zum einen wachsen die hämatopoetischen Zellen wie im menschlichen Körper in direktem Kontakt mit den stromalen Zellen und der extrazellulären Matrix und zum anderen findet dies, genau wie im Knochenmark, in einem dreidimensionalen Verband statt. Hierdurch soll den Zellen ermöglicht werden, alle, auch die noch unbekanntesten, Stimulationen und Wechselwirkungen zu erfahren. Aufgabe des Kultursystems ist es, eine geeignete Umgebung, einschließlich der kontrollierten Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, für diese bewachsenen Mikroträger zu schaffen.

5.1.1 Der Festbettreaktor

Der Festbettreaktor ist die Weiterentwicklung eines Wirbelschichtreaktors für die tierische Zellkultur [18, 76]. Deshalb folgt der prinzipielle Aufbau, wie er in Abbildung 5.1 auf der nächsten Seite dargestellt ist, der Wirbelschichttechnik. Der Reaktor besteht aus einer Glasröhre, die als Kultivierungsraum dient. Hierin liegen die Mikroträger als Festbett auf einem Haltesieb. Das Festbett wird kontinuierlich durch einen externen Umlauf von Medium durchströmt. Die Perfusion des Reaktors erfolgt durch kontinuierliches Einleiten

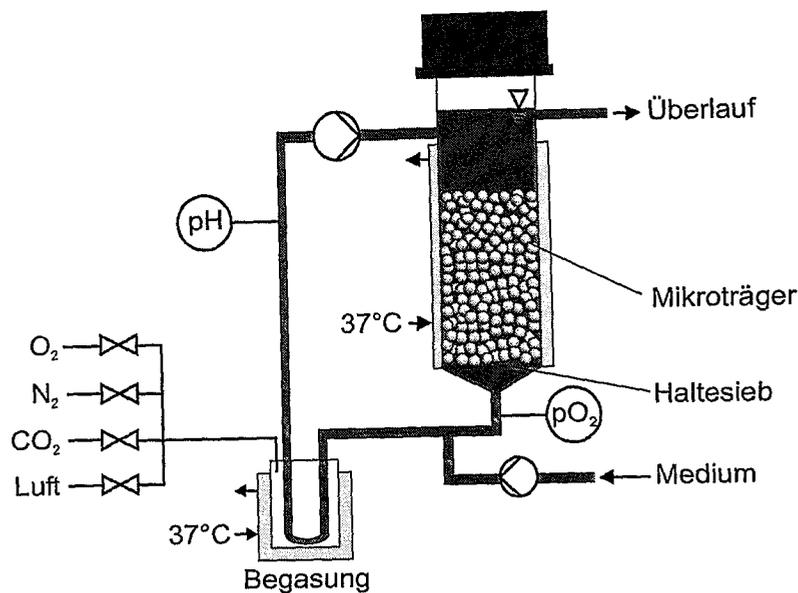


Abbildung 5.1: Das Prinzip des Festbettreaktors

von Frischmedium in den Umlauf. Oben an der Reaktorröhre wird durch einen Überlauf das verbrauchte Medium abgeführt. In den Umlauf ist neben dem Zulauf des Frischmediums, der peristaltischen Umlaufpumpe und der Messtechnik, auch ein Begasungsgefäß integriert. Die Begasung erfolgt dabei diffusiv über dünnwandige Silikonschläuche. Die übrigen Leitungen sind aus Marprene-Schläuchen gefertigt, die keine Diffusion über die Schlauchwand zulassen. Dadurch wird einerseits eine sehr kontrollierte und definierte Begasung ausschließlich über das Begasungsgefäß ermöglicht, andererseits wird ein Ausgasen über die Leitungen des Umlaufs verhindert. Dieses ist besonders im Fall des Wasserdampfes kritisch. Tritt ein Ausgasen auf, so kann wegen der geringen Perfusionsraten des Frischmediums in dem System nur schwer verhindert werden, dass der Wasserverlust zu einem deutlichen Anstieg der Osmolalität führt. Abbildung 5.2 auf der nächsten Seite zeigt eine Fotografie des Festbettreaktors.

Der erste Festbettreaktor, der von SCHRÖDER und MEISSNER verwendet wurde [172, 243], bestand aus einem Wirbelschichtreaktor, bei dem die Richtung des Medienumlaufs umgekehrt wurde, so dass in der Reaktorröhre die Strömung von oben nach unten verlief. Das Haltesieb für die Träger wurde lose in die Röhre gelegt. Zwei Punkte sind bei dieser Konfiguration von Nachteil. Erstens ist es nur sehr schwer möglich zu verhindern, dass Träger seitlich am Sieb vorbei in den Umlauf gelangen, wo sie durch die Pumpe geschädigt werden. Zweitens ist das Verhältnis von Gesamtvolumen des Systems zu Trägerschüttvolumen äußerst ungünstig. Dieses Verhältnis sollte möglichst klein sein, was sowohl ökonomische wie biologische Gründe hat. Je kleiner das Verhältnis, umso geringer ist der Medienbedarf und damit auch die Medienkosten, die den wesentlichen wirtschaftlichen Faktor einer Kultivierung ausmachen. Zudem ist gerade im immobilisierten stromhaltigen System die Bildung von löslichen Wachstumsfaktoren durch die Zellen von großer Bedeutung. Je kleiner das Verhältnis von Gesamtvolumen zu Trägerschüttvolumen ist, umso höher ist die Konzentration dieser Faktoren im Medium.

Der weiterentwickelte Festbettreaktor löst beide Probleme. Der untere Teil der Reaktorröhre wurde mit einem Flansch statt einem Glaskonus versehen, das Haltesieb wird dort fest verklemmt. Zusätzlich wurde statt des Siebes (Maschenweite 0,5 mm) allein eine zweilagige Kombination aus dem Sieb und einem Kunststoff-Gewebe (Quadratmaschengewebe,

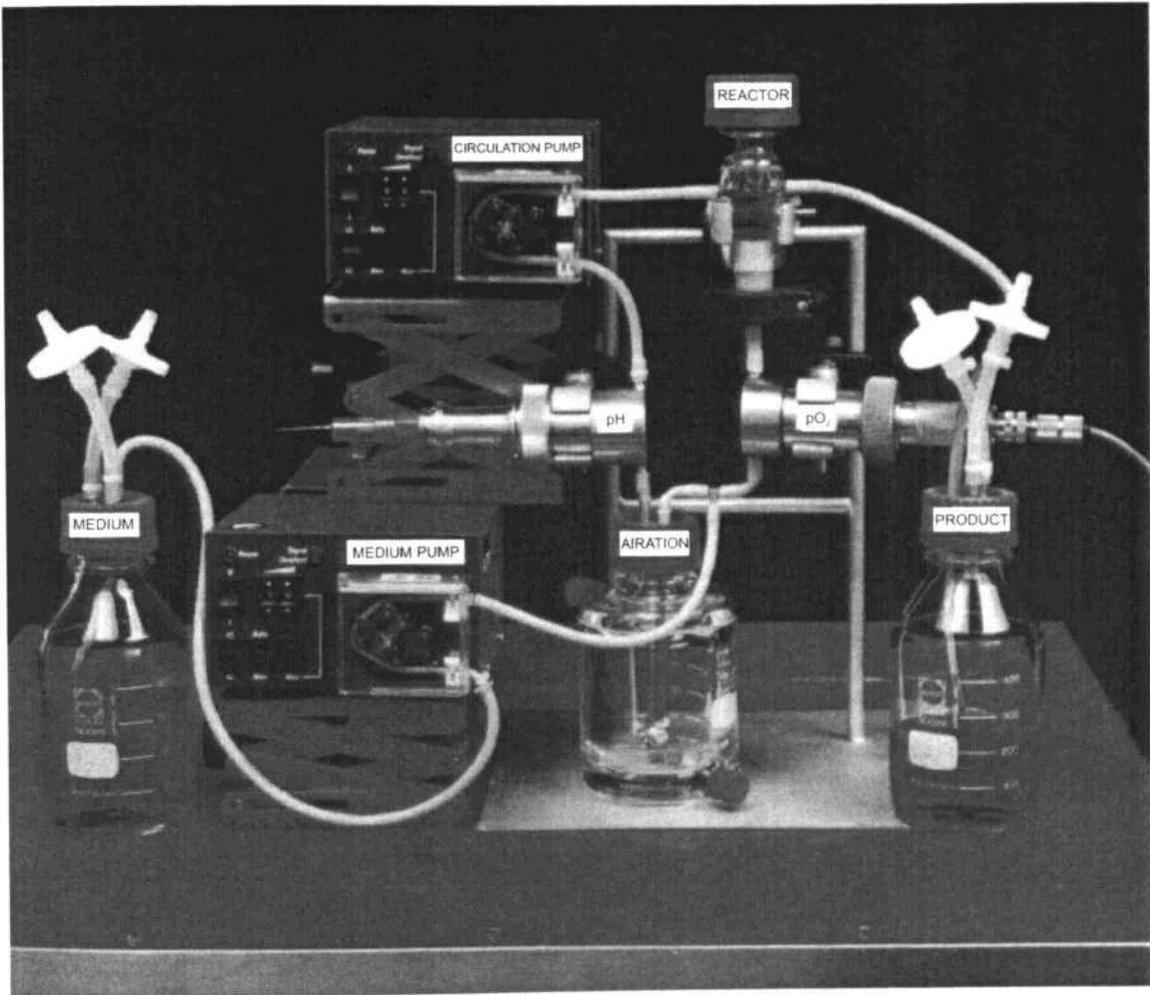


Abbildung 5.2: Fotografie des Festbettreaktors

Maschenweite $40 \mu\text{m}$) verwendet. Dadurch ist es ausgeschlossen, dass Träger in den Umlauf gelangen.

Um das Verhältnis von Gesamtvolumen zu Trägerschüttvolumen zu verbessern, wurden die Volumina im Umlauf stark verringert. Dazu wurden kleinere Schlauchdurchmesser gewählt, die Elektroden-Halterungen umkonstruiert und ein wesentlich kleineres Begasungsgefäß konstruiert. Das Begasungsgefäß zeichnet sich zusätzlich durch eine definierte Geometrie der Stoffübergangsfläche aus.

Insbesondere die externe, das heißt im Umlauf gelegene, Begasung vergrößert das Verhältnis von Gesamtvolumen zu Trägerschüttvolumen stark. In Wirbelschichtreaktoren kann durch eine interne, das heißt im Reaktorraum integrierte, Begasung dieses Verhältnis wesentlich verbessert werden. Die Abbildung 5.3 auf der nächsten Seite zeigt das Volumenverhältnis für verschiedene Reaktortypen. Deutlich ist die Verbesserung im Vergleich zum alten Festbettreaktor (66 mL Gesamtvolumen zu 10 mL Trägerschüttvolumen) zu erkennen. Das erreichte Verhältnis von 2,8 (28 mL Gesamtvolumen zu 10 mL Trägerschüttvolumen) ist bisher nur in Wirbelschichtreaktoren mit integrierter Begasung erreicht worden.

Dieser Reaktor versucht, die Mimikrierung der *in vivo* Verhältnisse über die knochenmarksähnliche dreidimensionale Kokultivierung auf porösen Mikroträgern hinaus zu vervollständigen. Der gesamte Aufbau gleicht dem menschlichen Organismus. Die Analogien zeigt Abbildung 5.4 auf der nächsten Seite. Auf diese Weise besteht die Hoffnung, dass sich

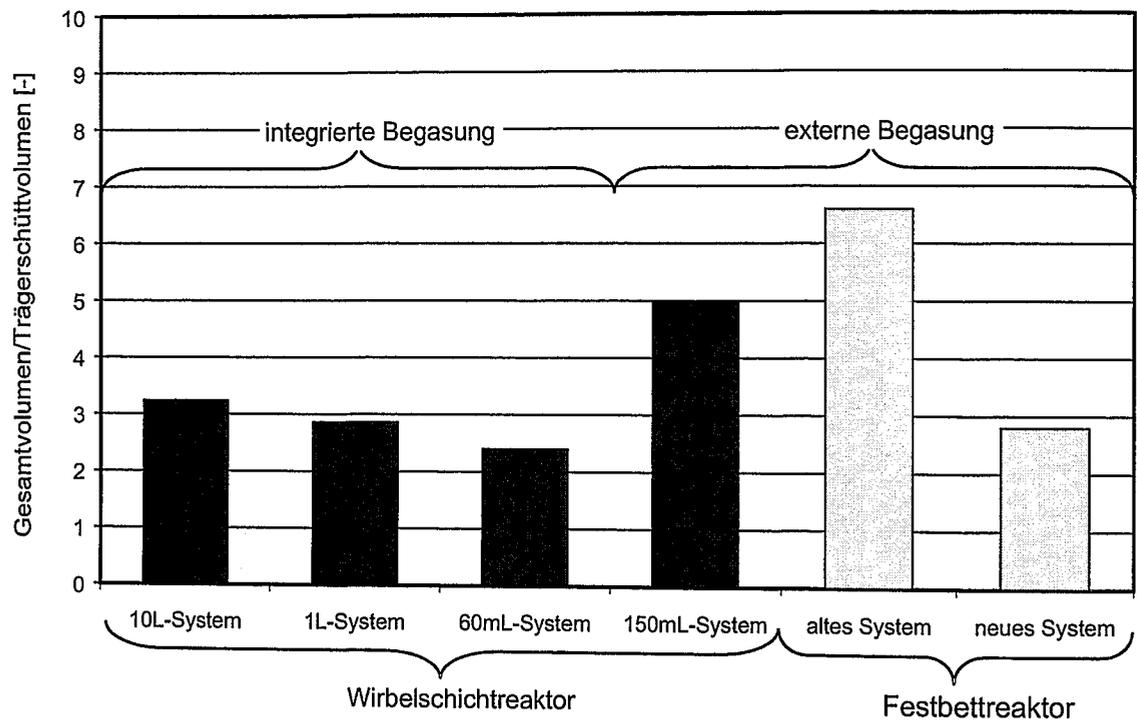


Abbildung 5.3: Vergleich der Volumina verschiedener Reaktoren

die vielen unbekanntenen Einflussfaktoren der Kultivierung, die sich der gezielten Manipulation entziehen, von selbst optimal einstellen, wie es *in vivo* der Fall ist.

5.1.2 Der Miniatur-Schlaufenreaktor

Der Festbettreaktor ist mit einem Trägerschüttvolumen von 10 mL auf den Betrieb mit einer einzelnen Spende ausgelegt. Um vergleichende Untersuchungen mit einer einzelnen Spende durchführen zu können, ist ein Trägerschüttvolumen um 1 mL erstrebenswert. Es existieren derzeit keine Systeme, die Festbettreaktionen in einem solchen Maßstab ermöglichen. Aus diesem Grund wurde der Miniatur-Schlaufenreaktor entwickelt.

Das Grundprinzip dieses neuen Systems zeigt Abbildung 5.5 auf der nächsten Seite. In einem Einsatz aus rostfreiem Edelstahl liegt eine Trägerschüttung von 1 mL auf einem

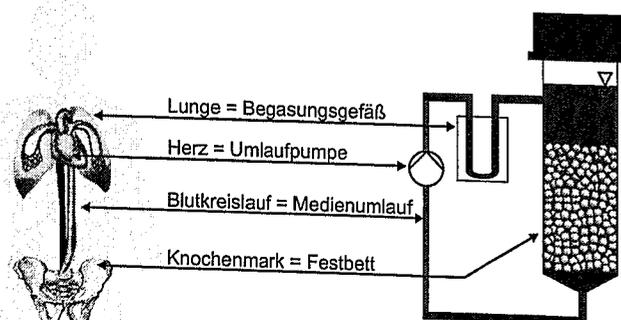


Abbildung 5.4: Der Festbettreaktor als Simulation des menschlichen Organismus

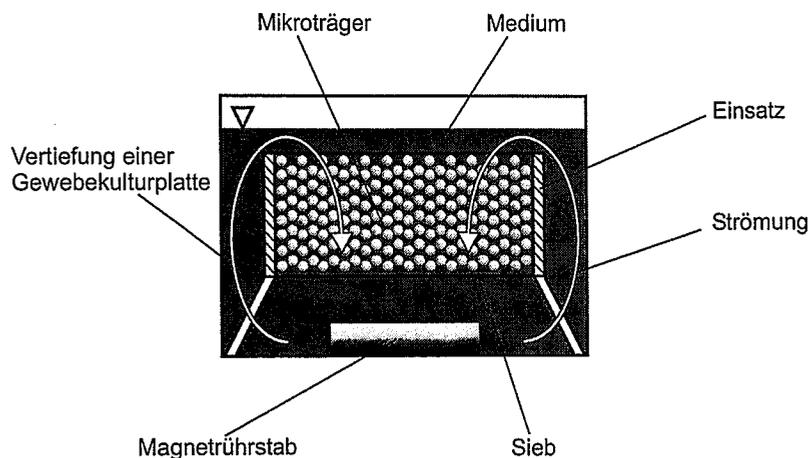


Abbildung 5.5: Das Prinzip des Miniatur-Schlaufenreaktors

Sieb. Der Einsatz ist mit drei Stützen versehen und so dimensioniert, dass er in der Mitte einer Vertiefung einer handelsüblichen Gewebekulturplatte mit zwölf Vertiefungen platziert werden kann.

Auf Mikroträgern können Zellen im besten Fall gewebedicht wachsen. Die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff in einem Gewebe erfolgt durch diffusiven Stofftransport. Um eine Limitierung der Zellen ausschließen zu können, darf der Diffusionsweg und damit die Gewebedicke nicht zu groß sein. Aus den Erfahrungen mit tierischen Zellkulturen kann geschlossen werden, dass die maximale Weglänge der Diffusion 0,5 mm nicht überschreiten sollte [18] (diese Überlegungen gelten natürlich äquivalent auch für den Festbettreaktor). Die Festbettschüttung in dem beschriebenen Einsatz in einer Vertiefung der Gewebekulturplatte hat bei reiner Diffusion in der Schüttung einen minimalen Diffusionsweg von 3,5 mm. Damit wird deutlich, dass es für eine Versorgung der Zellen auf den Trägern unerlässlich ist, innerhalb des Festbetts für Konvektion zu sorgen.

Am Boden der Vertiefung liegt dazu ein Magnetührstab ($7 \times 2 \text{ mm}^2$), durch den das Medium in einer schlaufenförmigen Strömung bewegt wird. Hierdurch wird das Festbett kontinuierlich mit Medium durchströmt. Damit ist außerhalb der Mikroträger ein konvektiver Stofftransport gewährleistet, der Medien- und Sauerstofflimitierungen im Inneren der Schüttung verhindert. Der maximale Diffusionsweg verringert sich damit auf den Radius der Mikroträger und ist somit, bei geeigneter Trägerwahl, unkritisch.

Die Gewebekulturplatte mit den zwölf Miniatur-Schlaufenreaktoren wird dann auf einen speziellen Magnetühr-Antrieb mit zwölf Rührstellen platziert und wie eine übliche Gewebekulturplatte in einem Brutschrank inkubiert (Abbildung 5.6 auf der nächsten Seite). Die kommerziell erhältliche Form des Magnetühr-Antriebs mit zwölf Rührstellen funktioniert elektromagnetisch. Dies führt jedoch zu einer starken Wärmeentwicklung durch den Widerstand der verwendeten elektrischen Spulen. Das Medium kann dadurch im Brutschrank bis auf $56 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt werden. Es ist daher notwendig, zwischen den Antrieb und die Gewebekulturplatte eine dünne doppelwandige Zwischenplatte zu platzieren, durch die aus einem externen Wärmebad $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes Wasser geleitet wird. Der Miniatur-Schlaufenreaktor ist dadurch thermisch von dem Rührantrieb entkoppelt. Durch die geringe Bauhöhe der Zwischenplatte von 9 mm ist die Wirkung der magnetischen Antriebskräfte jedoch nicht beeinträchtigt. Aufgrund der Verwendung von Wasser mit der Temperatur des Brutschranks treten keine weiteren thermischen Effekte auf. Ein Einsatz von kühlerem Wasser führt beispielsweise zur sofortigen Kondensation des Wassers der vollständig gesättigten Atmosphäre im Brutschrank. Die Folgen wären Verdunstungen in den Kultursystemen und damit

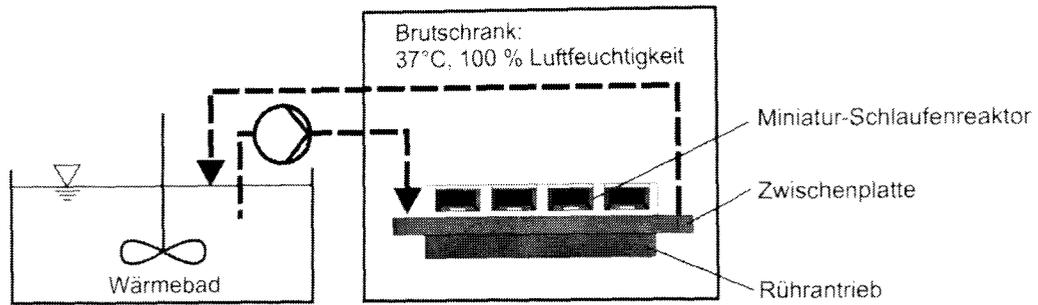


Abbildung 5.6: Der Aufbau des Miniatur-Schlaufenreaktors mit Zwischenplatte

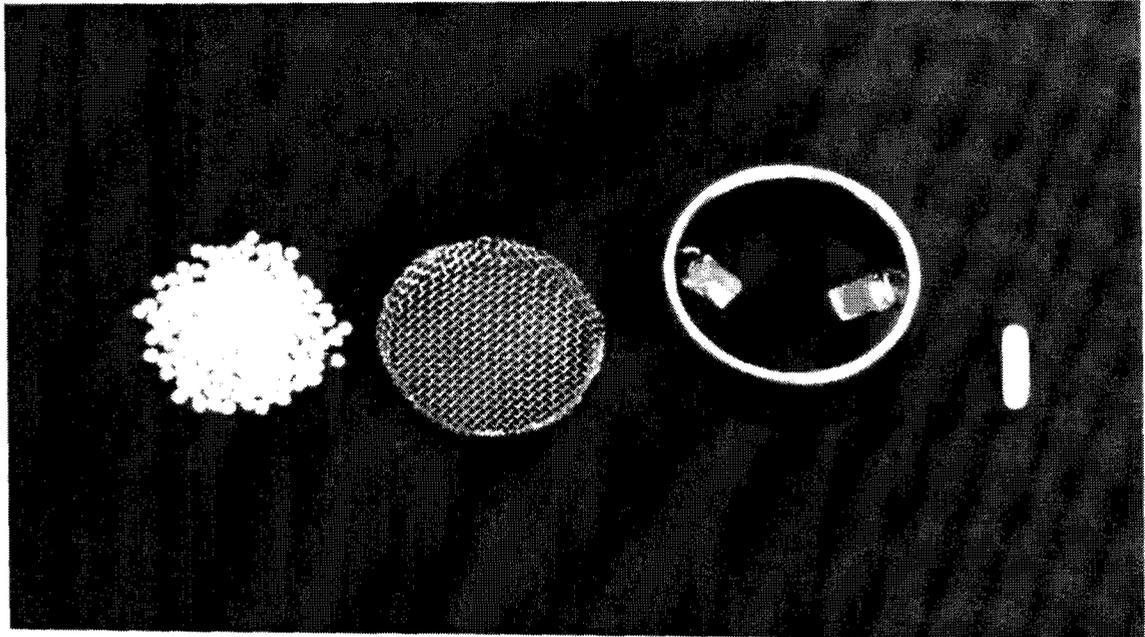


Abbildung 5.7: Fotografie des Aufbaus der Einsätze des Miniatur-Schlaufenreaktors

eine stark steigende Osmolalität.

Die Fotografie in Abbildung 5.7 zeigt (von links nach rechts) die Träger, das Haltesieb, den Edelstahl-Einsatz und den Magnetrührstab. Das Haltesieb (Maschenweite 0,5 mm) wird lose in den Einsatz eingelegt. Der gebördelte Rand sorgt für ein Klemmen des Siebes im Einsatz und damit für eine Abdichtung des Randes gegen das Durchfallen von Mikroträgern. Einen auf diese Weise zusammengesetzten Einsatz zeigt Abbildung 5.8 auf der nächsten Seite.

Alle Teile, die in die Vertiefungen der Gewebekulturplatte einzusetzen sind, werden vor Gebrauch autoklaviert. Anschließend gibt man sie, wie in Abbildung 5.9 auf der nächsten Seite dargestellt, steril in die Vertiefungen. Dazu werden zuerst die Magnetrührstäbe eingesetzt, danach die Vertiefungen mit jeweils 4,5 mL Kulturmedium gefüllt und die Einsätze mit den Haltesieben zugegeben. Abschließend werden 1 mL Mikroträger in jeden Einsatz pipettiert. Nun können die Zellen inokuliert werden und die geschlossene Gewebekulturplatte wird, wie oben beschrieben, im Brutschrank platziert. Abbildung 5.10 auf Seite 80 zeigt eine Gewebekulturplatte mit zwölf Miniatur-Schlaufenreaktoren auf dem Magnetrührantrieb.

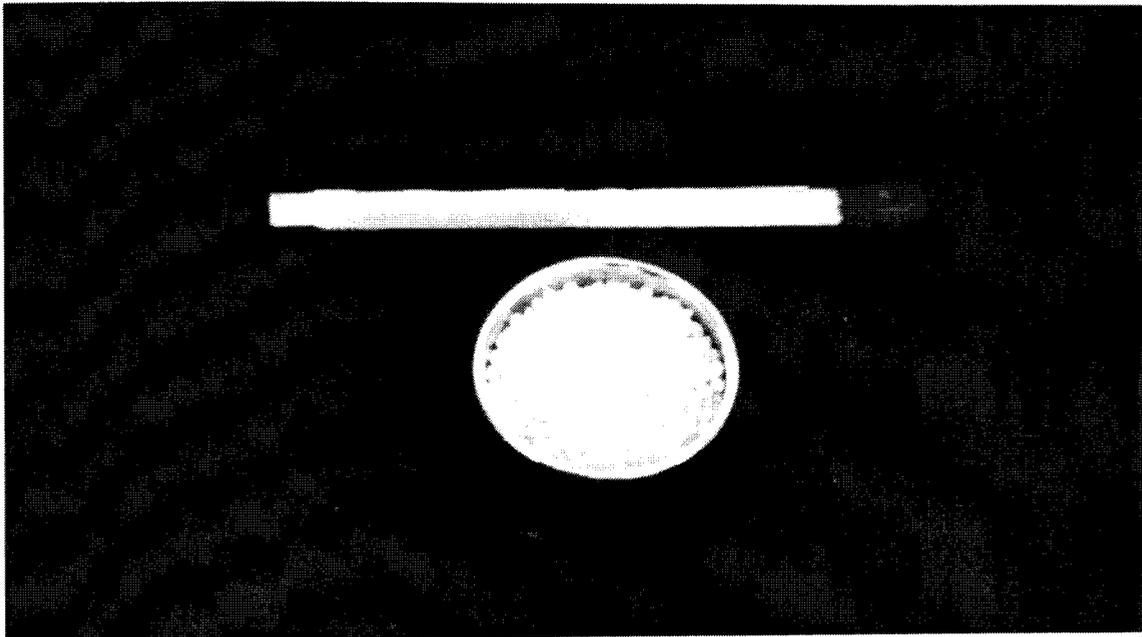


Abbildung 5.8: Fotografie eines Einsatzes des Miniatur-Schlaufenreaktors

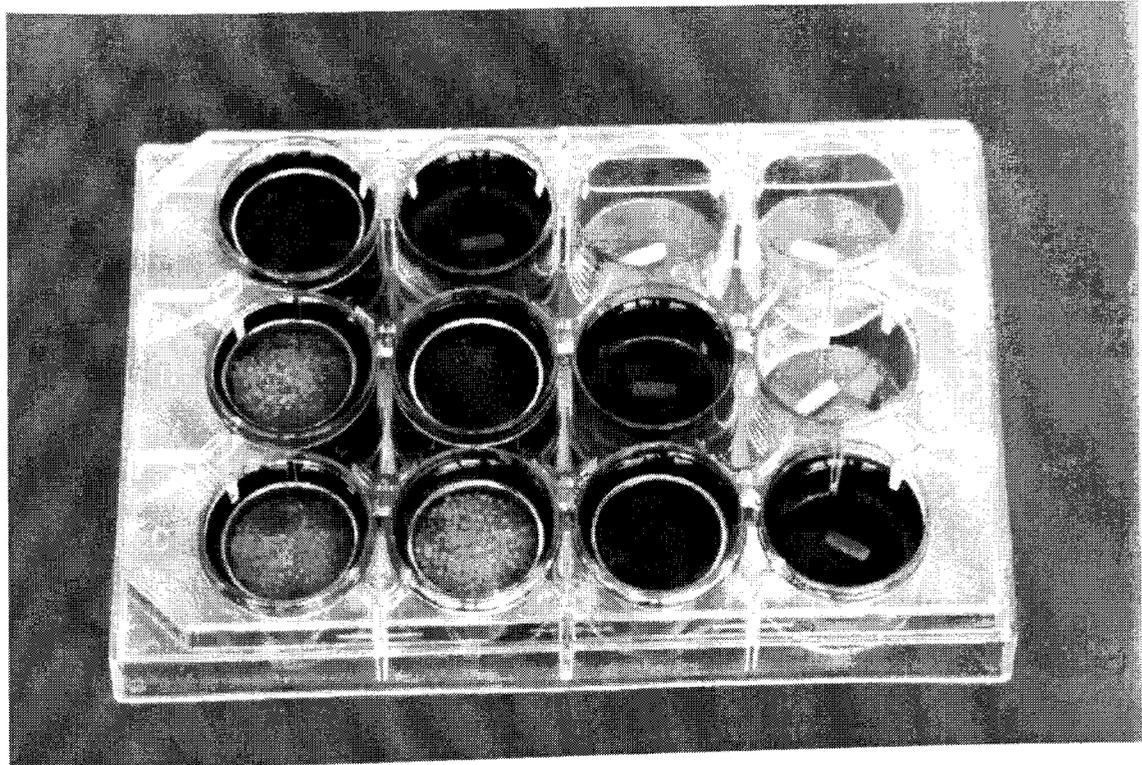


Abbildung 5.9: Fotografie des Aufbaus des Miniatur-Schlaufenreaktors

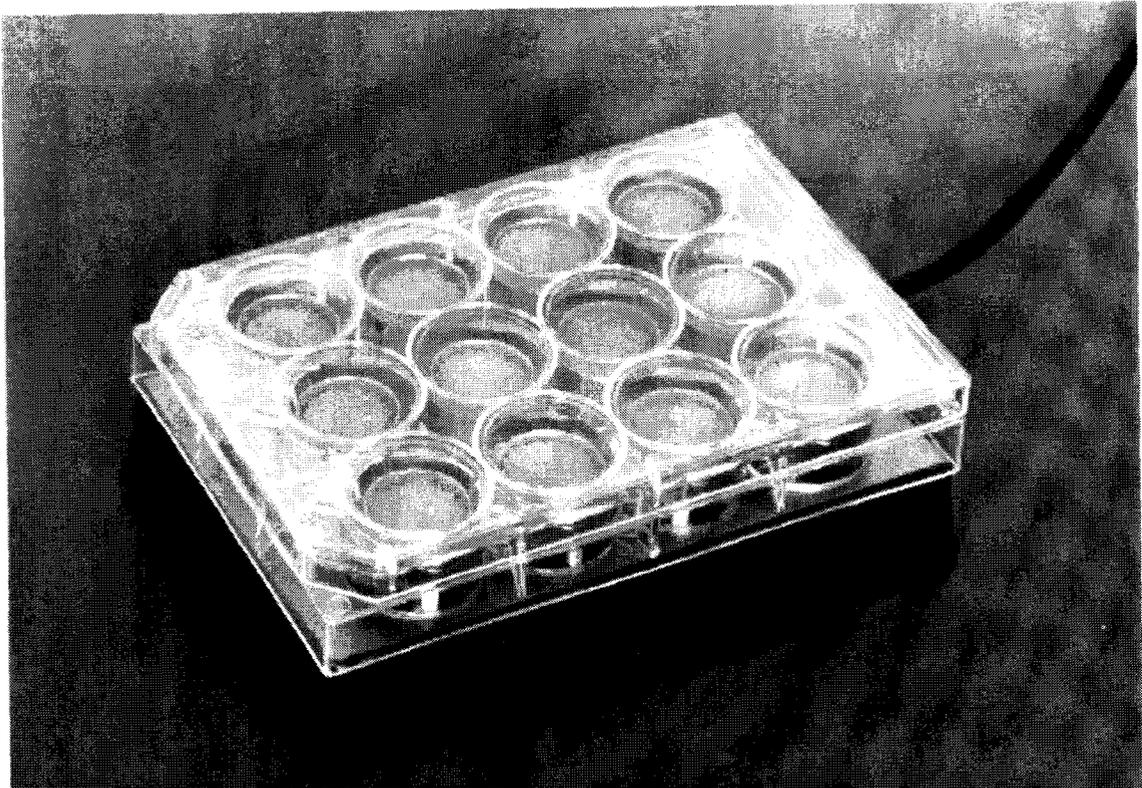


Abbildung 5.10: Fotografie des Miniatur-Schlaufenreaktors

5.2 Suspensionssysteme

Für suspendierte Zellkulturen gibt es eine große Zahl von möglichen Kultursystemen. Diese decken ein breites Spektrum von minimalen Volumina bei Screening-Systemen im Mikrolitermaßstab (z.B. [66]) bis zu großindustriellen Reaktoren mit Volumina von vielen Kubikmetern (z.B. [40, 211, 218]) ab. Kontrollierte Suspensionssysteme mit Zellrückhaltung, wie sie in Abschnitt 4.5 auf Seite 70 gefordert wurden, gibt es allerdings erst ab Volumina über 0.5L. In Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23 wurde für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen ein variables Kulturvolumen von 50–280 mL gewünscht. Eine Neuentwicklung eines Suspensionssystems ist demnach notwendig.

5.2.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor

Die Basis des neuen Suspensionsreaktors für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen ist zunächst eine gerührte Suspensionskultur in dem geforderten Maßstab von 50–280 mL. Die zentrale Fragestellung ist die Art der Zellrückhaltung. Verschiedenste Systeme zur selektiven Rückhaltung der Biomasse im Reaktorraum sind entwickelt worden, darunter solche mit Sedimentation [237, 266], kontinuierlicher Zentrifugation [36, 259], akustischer Filtration [271], dynamischer Mikrofiltration [77, 101, 281] und Spinfiltern [50, 89, 221] (Übersichten findet man in [71, 267]). Die Übertragung eines dieser Systeme auf einen Reaktor mit nur 50 mL ist problematisch, da sie zusätzliches Volumen, das nicht zum eigentlichen Reaktionsvolumen gehört, benötigen. Der Spinfilter ist als einziges System direkt im Reaktorraum integriert, kann aber aus geometrischen Gründen nur schwer in sehr kleinen Volumina etabliert werden.

Für den neuen Suspensionsreaktor wurde daher eine neuartige Zellrückhaltung entwickelt

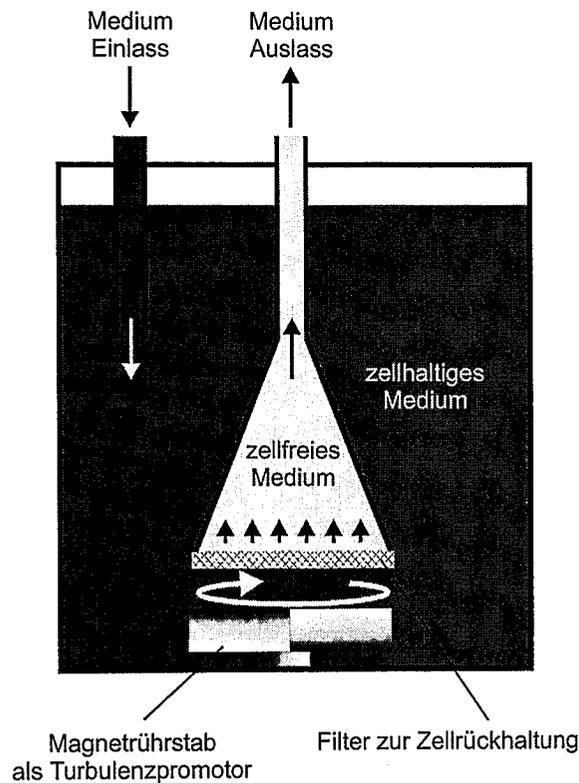


Abbildung 5.11: Das Prinzip der Zellrückhaltung

(Abbildung 5.11). Sie besteht aus einer Filtration, die das Prinzip des Spinfilters umkehrt. Das wesentliche Problem einer Filtration zur Zellrückhaltung ist das Verblocken des Filters durch die Biomasse. Dies kann durch eine starke Strömung über die Filterfläche verhindert werden. Beim Prinzip des Spinfilters erzeugt die Bewegung des Filters diese Strömung. Im neuen Suspensionsreaktor ruht der Filter, liegt aber sehr dicht über dem Rührer (Abstand $< 5\text{ mm}$), der die Filterfläche vollständig überdeckt. Dadurch wird ebenfalls eine hohe Querströmung an der Filterfläche erzeugt. Eine Verblockung des Filters wird zusätzlich dadurch verhindert, dass das Medium aktiv durch den Filter aus dem Reaktor hinausgepumpt wird. Die dazu verwendete peristaltische Pumpe kann erhebliche Drücke erzeugen, was einen Vorteil gegenüber dem Spinfilter darstellt, bei dem das treibende Druckgefälle rein durch den hydrostatischen Druck des Mediums im Reaktorraum entsteht und somit stark begrenzt ist.

Diese Vorteile der neuen Konzeption ermöglichen auch die Verwendung von Filtern mit sehr kleinen Maschenweiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Edelstahl-Köpertresse mit einer nominalen Filterfeinheit von $2\text{ }\mu\text{m}$ (absolute Feinheit $8\text{--}9\text{ }\mu\text{m}$) benutzt. Dieses sehr feine Gewebe zieht eine der wesentlichen konstruktiven Herausforderungen in Form der Abdichtung des Filters im Ablauf nach sich. Das Schweißen oder Lötens eines so feinen Gewebes ist nicht möglich. Es wurden daher zwei unterschiedliche Lösungen mit Dichtungen entwickelt (Abbildung 5.12 auf der nächsten Seite). Im Falle eines einlagigen Filtergewebes wurde der Filter in einen Dichtring mit U-förmigem Dichtungsprofil eingelegt und zwischen der Ablaufglocke und Überwurfmutter verklemmt. Eine zweiteilige Dichtung lässt sich hier nicht realisieren, da das Gewebe zum Faltenwurf neigt und so Undichtigkeiten entstehen können. Um trotzdem die Abdichtung mit zwei Flachdichtungsringen zu ermöglichen, wurde eine spezielle Filterronde hergestellt, die einen aufgedrehten Edelstahlrand als Stützring aufweist, der auch als Dichtfläche dient. Zur Stabilisierung ist ein zweites Fil-

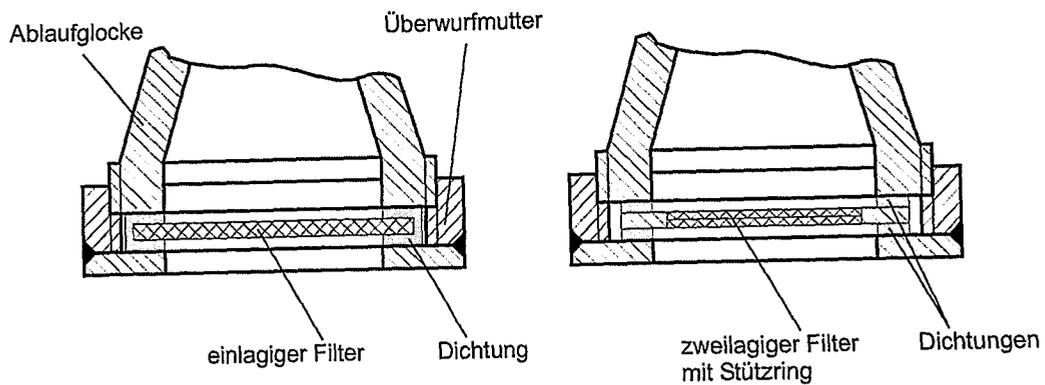


Abbildung 5.12: Verwendete konstruktive Lösungen der Filterdichtung

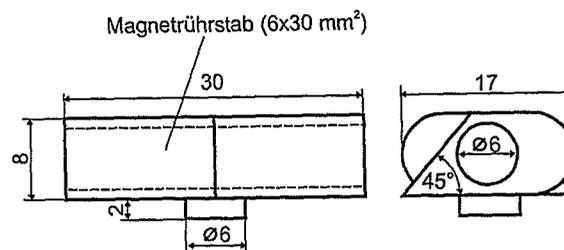


Abbildung 5.13: Der scherarme Magnetrührstab

tergewebe (Quadratmaschengewebe, Maschenweite $500\ \mu\text{m}$) als Stützlage vorhanden. Beide Varianten sind funktionell gleichwertig und wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Während die erste Variante einen erhöhten manuellen Aufwand beim Zusammenbau erfordert, muss in der zweiten Variante die eingelegte Ronde vor der Verwendung ausführlich auf die Dichtigkeit des aufgespressten Randes geprüft werden, da dieses Verfahren stark fehleranfällig ist.

Als Rührer wurde, um eine kompakte Reaktorbauweise zu ermöglichen, ein Magnetrührstab gewählt. Sämtliche handelsübliche Magnetrührstäbe sind aber nicht dazu geeignet, zellhaltige Suspensionen zu durchmischen, da die auftretenden Scherkräfte zur letalen Schädigung der Zellen führen. Dies gilt auch für die vermeintlich scherarmen Bauformen wie der sogenannten Eiform, des Rührstabes mit Mittelring und des Hantelrührers. Durch eine weiter optimierte Rührergeometrie konnte aber eine Vermischung erreicht werden, die keine Zellschädigung zur Folge hat. Der neue Rührer ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Es handelt sich um einen Teflonrührer mit einem handelsüblichen zylinderförmigen Magnetrührstab, der mit einer Presspassung im Kern des Rührers befestigt ist. Die Auflagefläche des Rührers liegt mittig und macht nur 4 % der gesamten vom Rührer überstrichenen Fläche aus. Die Rührer-Vorderkante ist um 45° geneigt und lenkt die Strömung verstärkt gegen die Filterfläche. Die Hinterkante ist abgerundet, um einen zellschädigenden Strömungsabriss zu verhindern oder mindestens abzuschwächen.

Um das geforderte kleine Volumen zu ermöglichen, liegen Filter und Rührer sehr tief im Reaktorraum (Abbildung 5.14 auf der nächsten Seite). Die Elektroden für die pH- und pO_2 -Messung liegen seitlich des Filters und reichen ebenfalls bis direkt über den Boden des Reaktors. Auf diese Weise ist ein Betrieb des Reaktors, inklusive der Zellrückhaltung und der Messtechnik, mit einem minimalen Volumen von 40 mL möglich. Im oberen Bereich des Reaktors weitet sich der Durchmesser. Dadurch wird einerseits Platz für die Deckelkonstruktion und die darin angebrachten Anschlüsse und Verschraubungen geschaf-

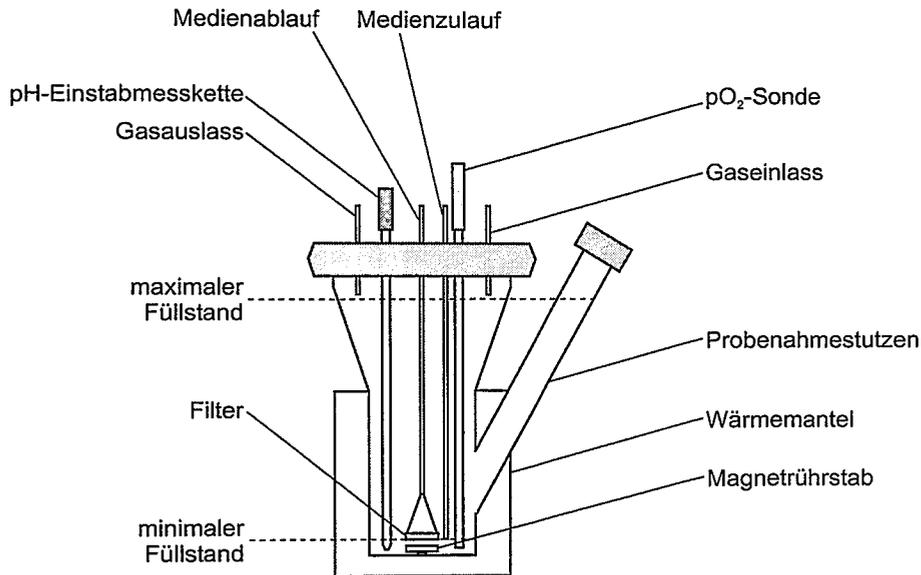


Abbildung 5.14: Der Aufbau des Suspensionsreaktors

fen, andererseits erhöht sich damit die Flüssigkeitsoberfläche bei größeren Füllständen. Da der Reaktor rein oberflächenbegast ist, ist dies ein wichtiger Schritt für eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen. Insgesamt erreicht der Reaktor ein maximales Betriebsvolumen von 550 mL. Damit ist der geforderte Volumenbereich weit überschritten.

Seitlich am Reaktor ist ein großer Probenahmestutzen angebracht, durch den es möglich ist, auch bei kleinstem Füllstand, mit einer Pipette eine Probe zu entnehmen, deren Volumen nur wenige Mikroliter beträgt. Nur mit solch kleinen Proben kann eine Prozessanalyse durchgeführt werden, ohne gleichzeitig unnötig Zellen zu verlieren.

Für die Temperaturkontrolle wird der Wert des Temperaturfühlers in der pH-Einstabmesskette abgegriffen und als Regelgröße des externen Wärmebades verwendet. Dieses ist an den Doppelmantel des Reaktors angeschlossen, wie es in Abbildung 5.15 auf der nächsten Seite gezeigt ist. Die Abbildung zeigt darüber hinaus die Versorgung mit Frischmedium und dem Gasgemisch, das vor dem Reaktor in einer Flasche befeuchtet wird, um das Austragen von Wasser zu verhindern. Bei einem trockenen Gasstrom führt das ausgetragene Wasser zu starken Osmolalitätserhöhungen. Vor und hinter dem Reaktor wird das Gas durch Sterilfilter geleitet, die grundsätzlich aus Sicherheitsgründen redundant ausgeführt sind.

Abbildung 5.16 auf der nächsten Seite zeigt eine Fotografie des Reaktors. Hier, wie auch im Schema von Abbildung 5.15 auf der nächsten Seite, ist ein zweiter Medienablauf zu erkennen. Dieser ist nicht mit einer Zellrückhaltung versehen, sondern besteht aus einem einfachen Absaugrohr, das durch die Kombination mit einem flexiblen Edelschlauch in einer frei wählbaren Höhe im Reaktorraum endet. Ursprünglich war dieses Rohr als Sicherheitsablauf vorgesehen, falls die Zu- und Ablaufpumpen nicht zuverlässig genug den eingestellten Volumenstrom fördern. Damit wäre die Gefahr eines Überlaufens des Reaktors, beispielsweise über Nacht, gegeben. Die praktische Verwendung zeigte, dass diese Maßnahme nicht notwendig ist, da die Pumpen auch bei längerem Betrieb eine sehr hohe Präzision und Stabilität des geförderten Volumenstroms aufweisen. Trotzdem erfüllt dieser zweite Ablauf eine Aufgabe als praktische Möglichkeit zum schnellen Entleeren des Reaktors.

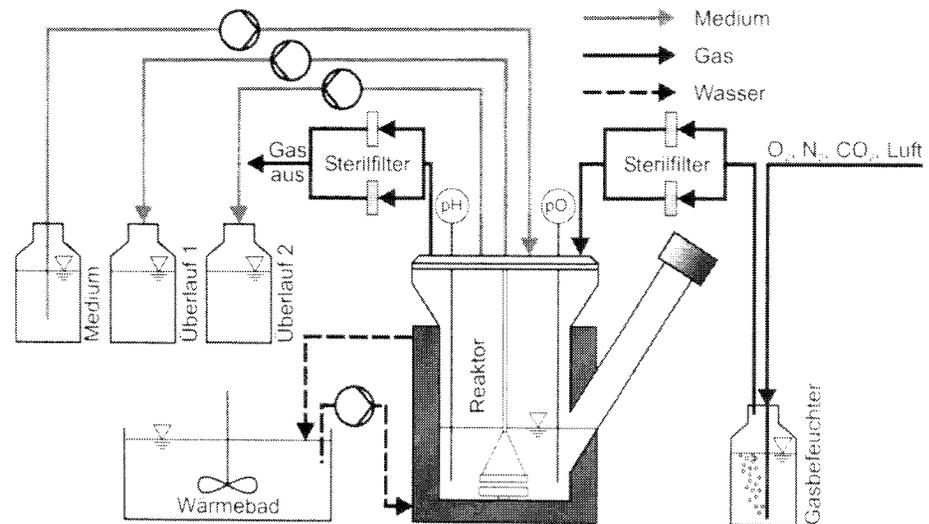


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung des Suspensionsreaktor-Systems

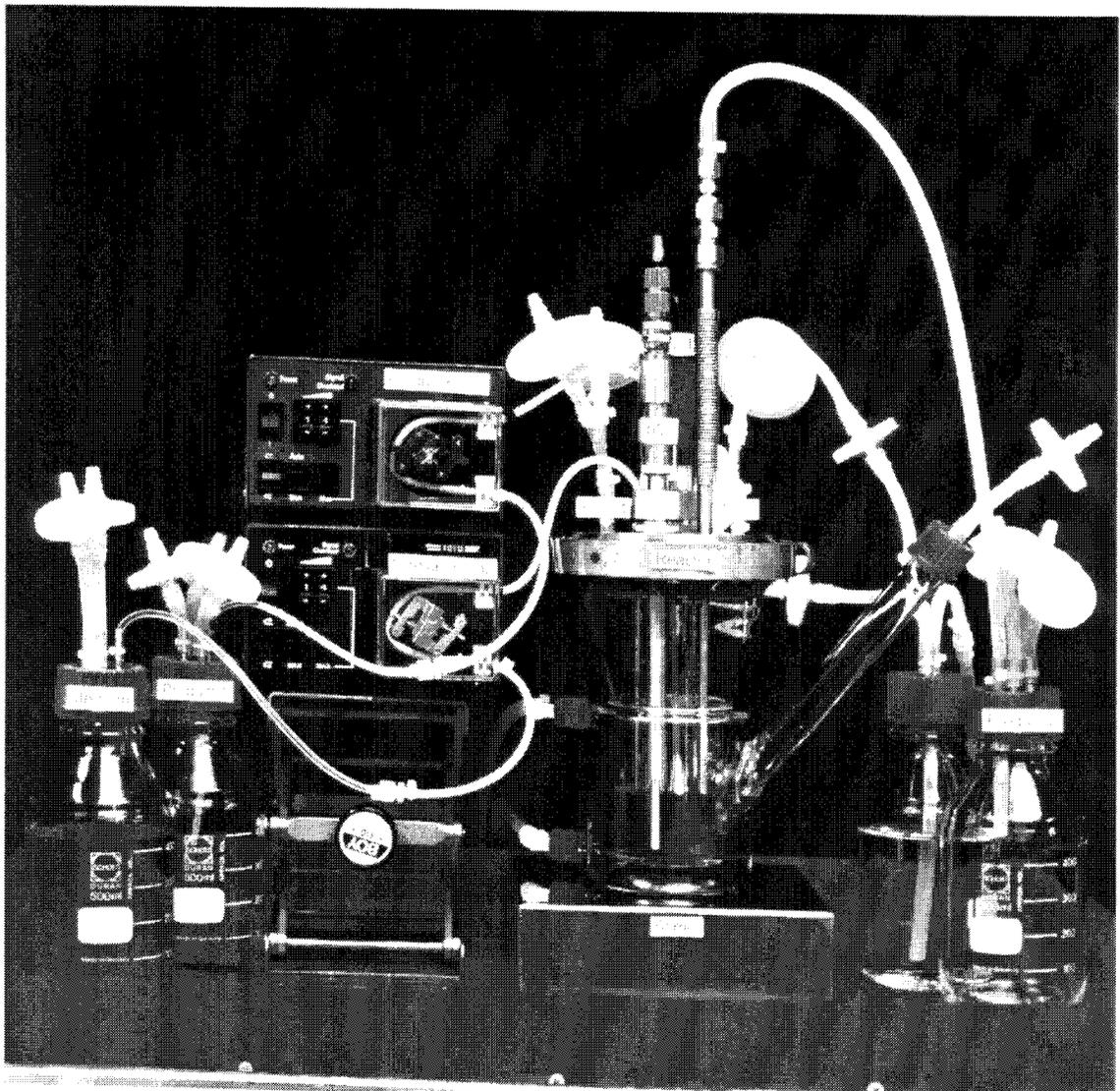


Abbildung 5.16: Fotografie des Suspensionsreaktors

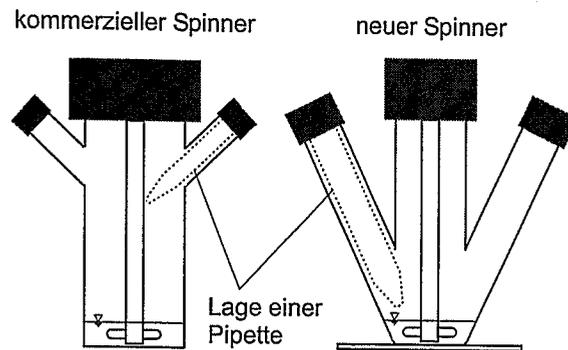


Abbildung 5.17: Vergleich eines kommerziellen Spinners mit dem neuen miniaturisierten Spinner

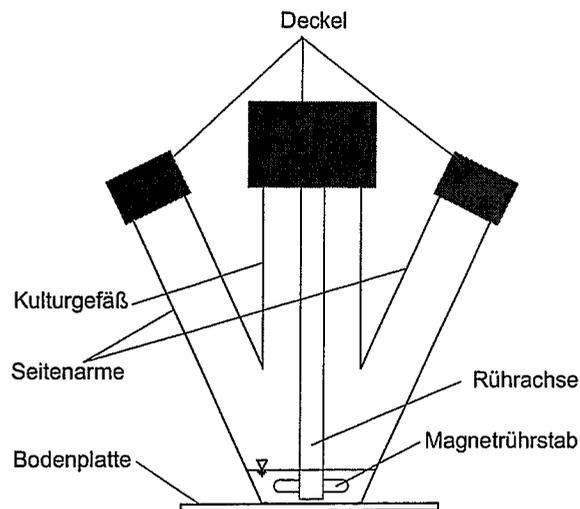


Abbildung 5.18: Das Prinzip des miniaturisierten Spinners

5.2.2 Der miniaturisierte Spinner

Systeme für vergleichende Untersuchungen in Suspension gibt es in großer Zahl. Neben den üblichen Gewebekulturplatten sind dies meistens Gewebekulturflaschen oder Kulturbbeutel. Aber auch Spinnerflaschen wurden bereits erfolgreich eingesetzt (vergleiche Tabelle 2.6 auf Seite 20). Diese ermöglichen zwar keine vollständig kontrollierte, aber zumindest eine gerührte Kultur, weshalb sie, bezüglich des kontrollierten Suspensionsreaktors, relevantere Kulturbedingungen ermöglichen als die ungerührten Systeme. Für vergleichende Untersuchungen sind Spinner mit Reaktionsvolumina von 10 mL oder weniger erforderlich. Solche kleinen Spinner sind kommerziell erhältlich (zum Beispiel von den Firmen BellcoGlass, Inc., Vineland, NJ, USA oder Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA). Die kommerziellen Lösungen zeigen aber in der praktischen Verwendung große Konstruktionsmängel. Die Seitenarme der Flaschen, über die die Befüllung, die Entleerung und die Probenahme mithilfe von Pipetten erfolgen, sind in ihrem Durchmesser so klein, dass nur Pipetten mit einem Volumen von maximal 2 mL verwendet werden können. Desweiteren sind die Lage und der Winkel der Seitenarme so gewählt, dass man den Boden der Gefäße mit der Pipette nicht erreichen kann (Abbildung 5.17). Aus diesem Grund können zwar sehr kleine Volumina kultiviert werden, eine Probenahme ist aber nicht möglich, da das Volumen nicht durch eine Pipette zugänglich ist.

Der neu-konstruierte miniaturisierte Spinner, der in Abbildung 5.18 dargestellt ist, löst dieses Problem. Er besitzt Seitenarme mit einem großen Durchmesser, die so platziert sind,

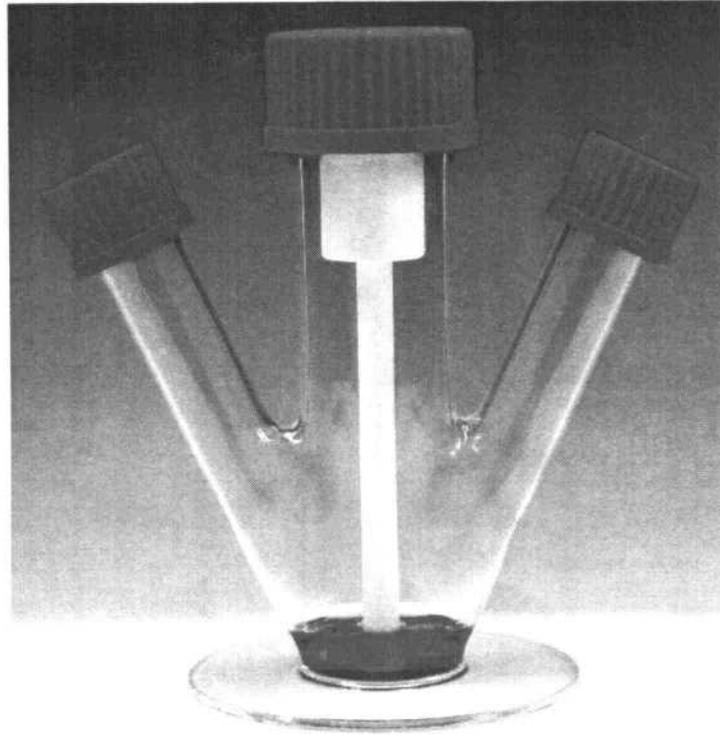


Abbildung 5.19: Fotografie des miniaturisierten Spinners

dass der Kulturraum vollständig mit Pipetten erreicht werden kann. Zusätzlich schafft die große Bodenplatte eine erhöhte Kippsicherheit. Das minimale Kulturvolumen liegt bei 10 mL, wobei dies nur durch die Tatsache festgelegt ist, dass ab diesem Volumen der Rührstab vollständig in das Medium eintaucht. Dies ist aber keine absolut notwendige Bedingung, weshalb eine Kultivierung mit geringeren Volumen durchaus denkbar ist.

Die Konstruktion des Rührers orientiert sich an den Spinnern der Firma Bellco [161, 195]. Der Rührer besteht aus einem Magnetrührstab, der mit einer Presspassung in einer Rührwelle befestigt ist. Diese ist lose drehbar im Deckel gelagert. Abbildung 5.19 zeigt eine Fotografie des miniaturisierten Spinners.

Verfahrenstechnische Charakterisierung

Die verfahrenstechnische Beschreibung der Kultursysteme verfolgt zwei Ziele. Zum einen sollen damit optimale Betriebspunkte ermittelt werden, zum anderen schaffen diese Untersuchungen die Basis für die genaue Analyse und Bilanzierung der Kultivierungen. Mit Ausnahme der Untersuchungen über die Gradientenbildung wurden alle Experimente mit dem Modell-Medium Wasser und ohne den Einsatz von Zellen durchgeführt.

6.1 Immobilisierte Systeme

6.1.1 Der Festbettreaktor

Im Festbettreaktor wurden drei wesentliche Vorgänge charakterisiert. Die Kenntnis des Sauerstoffeintrags, der aufgrund der gasdichten Umlaufschläuche ausschließlich im Begasungsgefäß erfolgt, ist entscheidend für die Sauerstoffbilanzierung der Kultur. Dagegen legen die Untersuchungen über das Verweilzeitverhalten und die Gradientenbildung im Festbett grundlegende Rahmenbedingungen für den Betrieb des Reaktors fest.

6.1.1.1 Sauerstoffeintrag

Der Sauerstoffeintrag wurde wie in Abschnitt 3.7.3 auf Seite 51 beschrieben bestimmt. Der Stoffübergang findet in zwei durchströmten, geraden Schlauchstücken von jeweils 100 mm Länge statt. Die Strömung ist mit einer Rohr-Reynoldszahl $Re_R < 2300$ in jedem Fall laminar. Damit lässt sich der Sauerstoffeintrag aus der Analogie von Wärme- und Stoffübergang mit der dimensionslosen Gleichung (2.22) auf Seite 32 beschreiben. Abbildung 6.1 auf der nächsten Seite zeigt sowohl die experimentell ermittelten Werte als auch den theoretisch aus der dimensionslosen Gleichung erwarteten Zusammenhang. Beide stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Die relativ große Streuung der Messwerte ergibt sich zwangsläufig aus der Ungenauigkeit der Messtechnik bei geringen Mengen an eingetragenen Sauerstoff. Die Differenz der Sauerstoffkonzentration vor und hinter dem Begasungsgefäß lag bei 1–10 mg/L.

Mit diesem Ergebnis lässt sich nun mithilfe eines Messwertes des Sauerstoffpartialdruckes im Umlauf eine geschlossene Sauerstoffbilanz im Prozess durchführen. In einem stabilen Betriebspunkt stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Sauerstoffaufnahme der Zellen und dem im Begasungsgefäß eingetragenen Sauerstoff ein. Dadurch lässt sich der zellspezifische Sauerstoffverbrauch der Zellen aus den bekannten Werten einer Kultivierung bestimmen. Für den Massenstrom des eingetragenen Sauerstoffs gilt:

$$\dot{m} = 0,03156 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \dot{V} \left(1 - \exp \left(- \frac{1,62 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} Sh}{\dot{V} (229300 + 2981 Sh)} \right) \right) (x_g - 2,09 \cdot 10^{-3} p_t^*) \quad (6.1)$$

mit: \dot{m} = Massenstrom des eingetragenen Sauerstoffs [kg/s]
 \dot{V} = Volumenstrom des Umlaufs [m³/s]
 Sh = Sherwoodzahl [-]
 x_g = Sauerstoffanteil in der Gasphase [-]

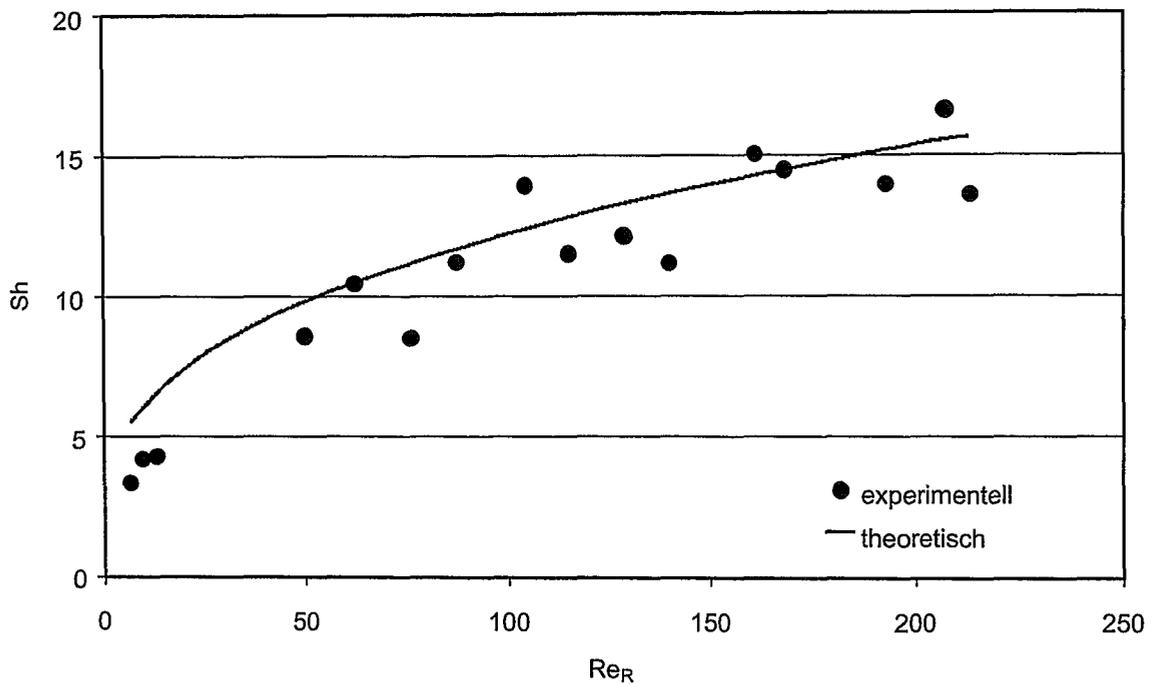


Abbildung 6.1: Theoretischer und experimentell ermittelter Sauerstofftransfer im Begasungsgefäß des Festbettreaktors

$$p_i^* = \text{gemessener Sauerstoffpartialdruck} \quad [\% \text{ Luftsättigung}]$$

Diese Gleichung ist in Kapitel G auf Seite 211 ausführlich hergeleitet.

Der zellspezifische Sauerstoffverbrauch berechnet sich im Falle eines stabilen Betriebspunktes als Quotient aus dem eingetragenen Sauerstoff und der Gesamtzellzahl im Reaktor, also:

$$q_{O_2} = \frac{\dot{m}}{c_T V_T} \quad (6.2)$$

mit: q_{O_2} = zellspezifische Sauerstoffverbrauch [kg/cs]
 c_T = Zellkonzentration auf den Trägern [c/m³]
 V_T = Trägerschüttvolumen [m³]

6.1.1.2 Verweilzeitverhalten

Das Verweilzeitverhalten des Festbettreaktors wurde für verschiedene Umlaufverhältnisse wie in Abschnitt 3.7.2 auf Seite 51 beschrieben bestimmt. Das Umlaufverhältnis des perfundierten Prozesses ist definiert als:

$$U = \frac{\dot{V}_{zu}}{\dot{V}_{um}} \quad (6.3)$$

mit: U = Umlaufverhältnis [-]
 \dot{V}_{zu} = Volumenstrom des Medien-Zulaufs [m³/s]
 \dot{V}_{um} = Volumenstrom des Medien-Umlaufs [m³/s]

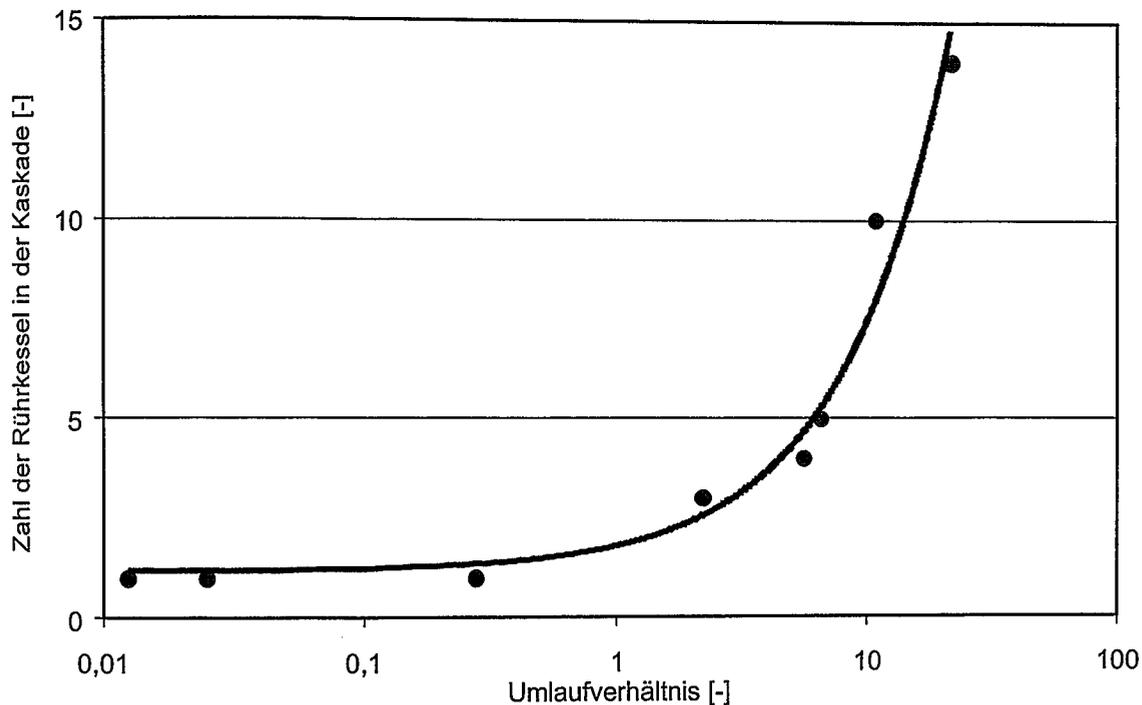


Abbildung 6.2: Zahl der idealen Rührkessel im Modell der Rührkesselkaskade, die zur Modellierung des Verweilzeitverhaltens des Festbettreaktors notwendig sind, in Abhängigkeit vom eingestellten Umlaufverhältnis

Im Falle $U = 0$ ist der Prozess eine ungefütterte, gerührte Kultur, also ein klassisches Batch-Verfahren, im Falle $U \rightarrow \infty$ ein Strömungsrohr.

Das Verweilzeitverhalten wurde mit dem Modell der Rührkesselkaskade angepasst (Gleichung (2.13) auf Seite 29). In Abbildung 6.2 ist die Anzahl der für eine Anpassung notwendigen idealen Rührkessel in einer Kaskade als Funktion des Umlaufverhältnisses aufgetragen. Man sieht, dass bei einem Umlaufverhältnis von $U < 0,5$ das Verhalten des Reaktors dem eines idealen Rührkessels entspricht. Bei höheren Werten kommt es zu deutlichen Kurzschluss-Strömungen, wodurch das Verhalten nicht mehr ideal ist. Für die Modellierung ist hier eine linear steigende Zahl von Rührkesseln in der Modell-Kaskade notwendig. Der Grenzwert von $U = 0,5$ ist dabei im Rahmen des untersuchten Bereiches unabhängig von der absoluten Höhe des Volumenstroms. Der untersuchte Bereich des Zulaufvolumenstroms lag bei 6–1044 mL/h.

In der Praxis ist beim Betrieb des Festbettreaktors kein Umlaufverhältnis größer als 0,5 zu erwarten, weshalb der Reaktor als ideal vermischt angesehen werden kann. Der Volumenstrom des Zulaufs wird maximal bei den untersten Werten des untersuchten Bereiches liegen, da die metabolischen Raten der hämatopoetischen Zellen im Vergleich zu anderen Zellkulturen sehr gering sind.

Zusätzlich wird der Umlaufvolumenstrom im oberen Bereich liegen. Der Sauerstoffeintrag und dessen ideale Vermischung stellen Probleme dar, die von der hier dargestellten Untersuchung nicht erfasst wird. Da die Sauerstoffversorgung nicht durch den Medienzulauf, sondern über das Begasungsgefäß erfolgt, ist hier nicht das Umlaufverhältnis, sondern der Absolutwert des Umlaufvolumenstroms und die Zusammensetzung der Gasphase im Begasungsgefäß entscheidend. Ein hoher Umlaufvolumenstrom ist deshalb notwendig, um eine spürbare Abreicherung des Sauerstoffs über die Betthöhe zu vermeiden. Ein solcher Sauerstoffgradient im Festbett würde inhomogene Kulturbedingungen bedeuten und ist unerwünscht.

Tabelle 6.1: Die Kultivierungsparameter für die Untersuchung der Gradientenbildung beim Inokulieren des Festbettreaktors

stromale Zellen:	Zelllinie M2-10B4 (bestrahlt mit 80 Gy)
hämatopoetische Zellen:	Zelllinie KG-1
Medium:	IMDM + 10% FCS
Mikroträger:	10 mL poröse Siran-Sinterglasträger
Kultursystem:	Festbettreaktor (Gesamtvolumen: 28 mL)
Kulturdauer:	1 bzw. 2 Tage
Inokulumdichte, stromale Zellen:	$5 \cdot 10^6$ c/mL _{Trägerschüttung}
Inokulumdichte, hämatopoetische Zellen:	$5 \cdot 10^5$ c/mL _{Trägerschüttung}
Fütterung:	keine

6.1.1.3 Gradientenbildung

Ein wesentlicher konzeptioneller Nachteil des Festbett-Ansatzes ist die Gefahr der Bildung von Gradienten. Sauerstoff- und Nährstoffgradienten lassen sich bei dem Reaktor durch einen hohen Umlaufvolumenstrom beziehungsweise ein niedriges Umlaufverhältnis, wie oben beschrieben, vermeiden. Dabei bleibt aber die Frage offen, ob sich die Zellen homogen auf den Trägern ansiedeln, oder ob es nach dem Inokulieren ebenfalls zu einer Gradientenbildung kommt, wie bei größeren Festbettreaktoren beschrieben wurde [150].

Ein solcher Gradient in der immobilisierten Zelldichte hätte zwei Nachteile. Zum einen könnten so keine einheitlichen optimierten Zustände bei der Kultivierung garantiert werden und zum anderen wäre keine repräsentative Probenahme mehr möglich. Selbst wenn sich die Zellzahlen real nicht veränderten, würde man eine Veränderung messen, da man entlang des Gradienten Proben zieht.

Beim Inokulieren werden die Zellen von oben auf das Festbett gegeben, der Reaktor wieder verschlossen und die Umlaufpumpe in Betrieb genommen. Diese pumpt das Medium von oben nach unten durch das Festbett und zieht dadurch die Zellen in das Bett hinein, wo sie auf den Mikroträgern immobilisieren. Dieser Vorgang ist nach einem Tag abgeschlossen. Um die Gradientenbildung zu untersuchen, wurde ein Festbettreaktor auf diese Weise mit bestrahlten M2-10B4 inokuliert und nach einem Tag vollständig abgeerntet. Die Rahmenbedingungen dieses und des folgenden Versuches zeigt Tabelle 6.1. Bei der Zellernte wurden die Träger in fünf Schichten von oben nach unten entnommen. Für jede Schicht wurden das Trägervolumen und die immobilisierte Zellzahl bestimmt. In Abbildung 6.3 auf der nächsten Seite ist die so ermittelte Zellkonzentration bezogen auf die mittlere Zellkonzentration aller fünf Schichten aufgetragen. Die Messwerte werden dabei auf die Lage der betreffenden Trägerschicht im Festbett bezogen. Die relative Betttiefe gibt diese Lage in standardisierter Form an. Die Betttiefe von null entspricht dabei dem oberen Ende des Festbettes, die Betttiefe eins dem unteren Ende. Deutlich ist in der Abbildung die verstärkte Immobilisierung der Zellen im oberen Bereich des Festbettes zu erkennen. Dieser Gradient bildet sich dabei unabhängig von dem gewählten Volumenstrom aus. Es wurden Volumenströme zwischen 0,84 und 28 mL/min untersucht, wobei der sich ausbildende Gradient davon unbeeinflusst blieb. Dies lässt auf einen Filtrations-Effekt schließen. Die Zellen bleiben bei der dichten Packung der Mikroträger in den oberen Schichten hängen. Nur wenige Zellen gelangen überhaupt in die unteren Schichten und haben so die Chance, sich dort anzusiedeln. Diese Erklärung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass nach dem Inokulieren innerhalb von nur wenigen Minuten das Reaktormedium klar wird, sich also offensichtlich die Zellen nicht mehr im Umlauf befinden.

Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, in eine Wirbelschicht zu inokulieren. Wie

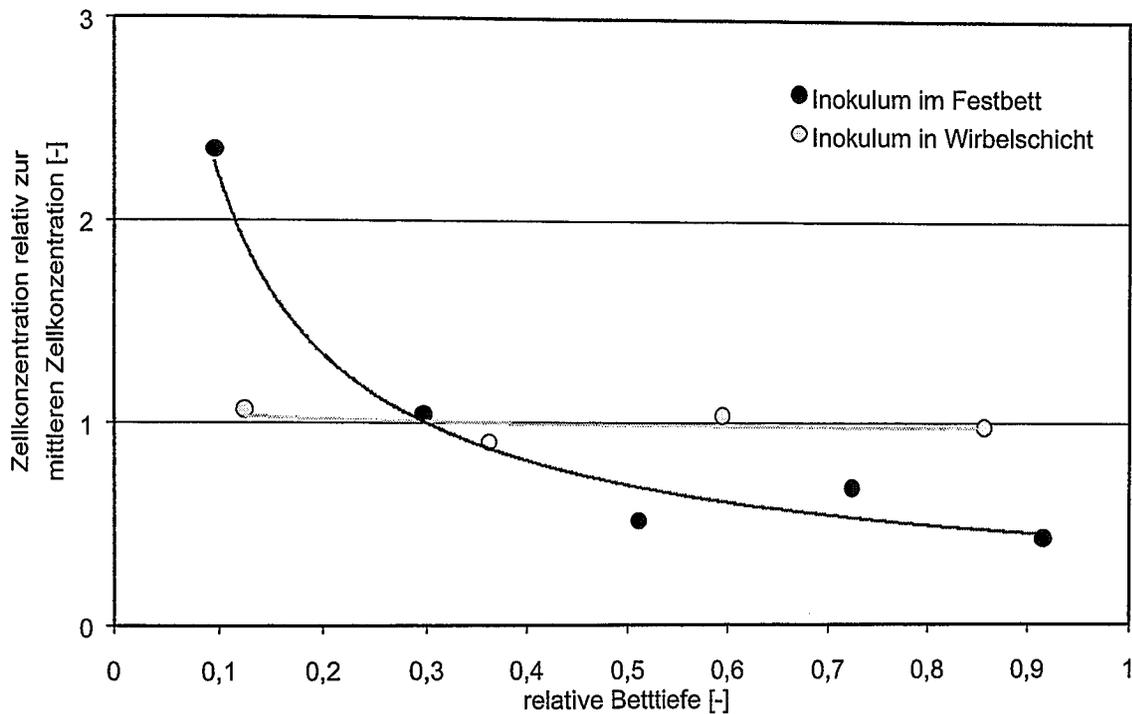


Abbildung 6.3: Gradientenbildung von stromalen Zellen bei unterschiedlichen Inokulumsmethoden im Festbett (Erläuterung siehe Text)

in Abschnitt 10.1.1 auf Seite 152 noch gezeigt werden kann, ist zwar eine Kultivierung der stromalen und hämatopoetischen Zellen in einer Wirbelschicht nicht möglich, die Immobilisierung dagegen schon. Es wurde daher der Medienumlauf umgekehrt, so dass das Festbett von unten nach oben durchströmt war. Bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 28 mL/min werden die Träger in eine nur gering expandierte Wirbelschicht gebracht. Die Zellen werden so nicht mehr durch die Träger zurückgehalten, sondern zufallsverteilt in die Poren der Träger gespült und haben dort die Möglichkeit, sich anzuheften. Dieser Vorgang dauert länger, was auch anhand der längeren Trübung des Mediums durch die Zellen beobachtet werden kann, ist aber ebenfalls nach einem Tag abgeschlossen. Das Ergebnis der Immobilisierung ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Der Gradient ist auf den Trägern, die in Wirbelschicht inokuliert wurden, nicht mehr vorhanden, was wenig überrascht, da alle Variationen der Zelldichte auf den einzelnen Trägern durch die optimale Vermischung in der Wirbelschicht ausgeglichen werden.

Das Ergebnis des gleichen Versuchsansatzes, nur hier für die Kokultivierung hämatopoetischer Zellen, zeigt Abbildung 6.4 auf der nächsten Seite. Die stromalen Zellen wurden vor dem Versuch wie beschrieben innerhalb von einem Tag in einer Wirbelschicht gradientenfrei immobilisiert. Als hämatopoetische Zellen wurde für diesen Versuch die Modell-Zelllinie KG-1 verwendet. Diese zeigt ein äquivalentes Immobilisierungsverhalten, wie die primären CD34⁺-Zellen (siehe Abschnitt 8.1.1.2 auf Seite 113). Die Gradientenbildung beim Inokulieren im Festbett ist nur als schwache Tendenz zu erkennen. Ein ähnlich starker Effekt, wie bei den stromalen Zellen allein, konnte aber ohnehin nicht erwartet werden. Analog zur Kultivierung primärer Zellen wurde in den Inokula ein Verhältnis von stromalen zu hämatopoetischen Zellen von 10:1 gewählt. Dadurch wirkt sich ein eventueller Gradient der hämatopoetischen Zellen in der Gesamtzellzahl nur gering aus. Zudem sind die normalen Schwankungen in den Messwerten für die stromalen Zellen in der gleichen Größenordnung, weshalb es nicht möglich ist, den Anteil der stromalen Zellen einfach herauszurechnen.

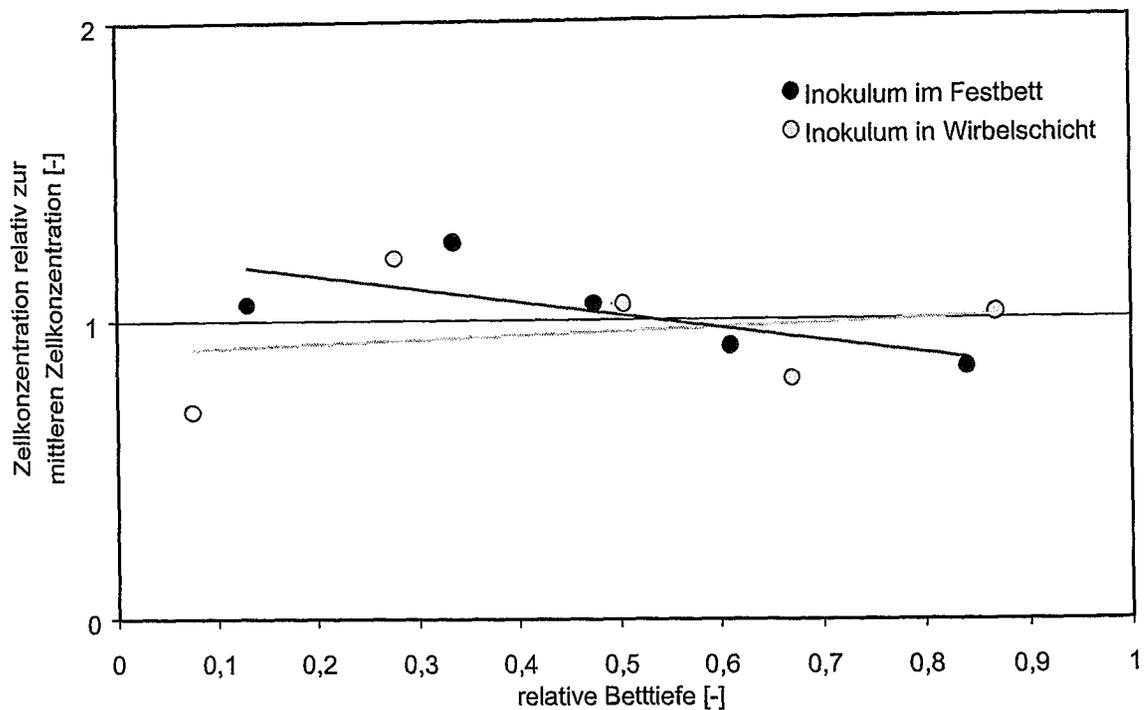


Abbildung 6.4: Gradientenbildung hämatopoetischer Zellen bei unterschiedlichen Inokulumsmethoden im Festbett (Erläuterung siehe Text)

Daher kann der Gradient nicht mit der gleichen Deutlichkeit gezeigt werden.

Es zeigte sich aber insbesondere, dass das Inokulieren der hämatopoetischen Zellen in der Wirbelschicht, genau wie das der stromalen Zellen, keinerlei Nachteile mit sich bringt. Es ist daher empfehlenswert, um jegliche potentielle Gradientenbildung auszuschließen, sowohl die stromalen als auch die hämatopoetischen Zellen in einer Wirbelschicht zu inokulieren. Nach einer jeweils eintägigen Immobilisierungszeit können die Zellen dann im homogenen Festbett weiterkultiviert werden.

6.1.2 Der Miniatur-Schlaufenreaktor

Bei dem Miniatur-Schlaufenreaktor wurden die zwei wesentlichen Vorgänge untersucht, die sich durch die Variation der Rührerdrehzahl verändern sollten, der Sauerstoffeintrag und das Mischzeitverhalten. Ziel der Untersuchungen ist es, eine möglichst optimale Rührerdrehzahl zu ermitteln.

6.1.2.1 Sauerstoffeintrag

Der Sauerstoffeintrag in das Medium wurde in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl bestimmt. Um den Einfluss der in der Vertiefung platzierten Einbauten zu bestimmen, wurde ohne Einbauten, mit dem leeren Einsatz und mit dem Träger gefüllten Einsatz gemessen. Um die geometrischen und damit auch strömungstechnischen Verhältnisse einer Schüttung mit bewachsenen Trägern besser zu simulieren, wurden als Träger keine porösen Mikroträger, sondern solide Glaskugeln der gleichen Größenfraktion verwendet. Die ermittelten $k_L a$ -Werte zeigt Abbildung 6.5 auf der nächsten Seite. Deutlich ist zu erkennen, dass der Sauerstoffeintrag im Rahmen der Messgenauigkeit sowohl von der Art des Einsatzes als auch von der Rührergeschwindigkeit und damit vom Leistungseintrag unabhängig ist.

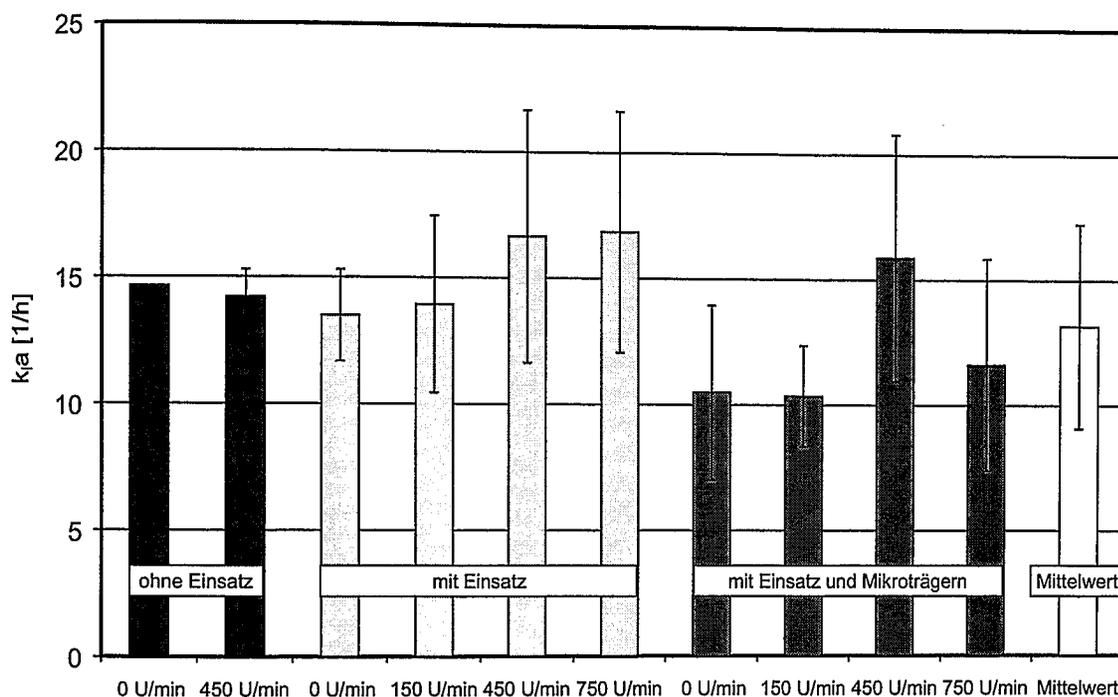


Abbildung 6.5: Die $k_L a$ -Werte im Miniatur-Schlaufenreaktor bei verschiedenen Rührerdrehzahlen sowie mit und ohne Einsätzen und Trägern

Dieses Ergebnis erscheint im hohen Maße ungewöhnlich. Der mittlere $k_L a$ -Wert beträgt etwa 15 1/h , die mittlere OTR bei einer Begasung mit Luft etwa $120 \text{ mgO}_2/\text{L.h}$. Die Höhe der Sauerstofftransfer rate kann in dem vorliegenden Fall, wie aus der Gleichung (2.14) auf Seite 30 erkennbar ist, nur vom Stoffübergangskoeffizienten beeinflusst werden. Die anderen Größen sind weder von der Rührergeschwindigkeit, noch vom Edelstahl-Einsatz oder den Trägern abhängig. Für den Einfluss der Rührerdrehzahl n in Rührkesseln werden in der Literatur verschiedene Angaben gemacht. Ausgehend von der Proportionalität $OTR \sim k_L \sim n^i$ liegt der Wert für den Exponenten i je nach Untersuchung zwischen 0,7 und 1,5 [102]. Bei den vorliegenden Messungen wurde, vernachlässigt man die statischen Messungen, die Drehzahl um einen Faktor 5 variiert. Die OTR sollte demnach mindestens um einen Faktor 3 variieren.

Eine Begründung für diese Diskrepanz von Theorie und Messung kann nicht gegeben werden. Es bieten sich aber drei Überlegungen als mögliche Erklärungen an. Die erste ergibt sich aus der Betrachtung der Größenverhältnisse des untersuchten Systems. Basis der theoretischen Beschreibung ist die Filmtheorie. Nach dieser wird der Stoffübergangswiderstand durch eine Grenzschicht an der Oberfläche der Flüssigkeit erzeugt. Die idealisierte Vorstellung der Theorie besagt, dass in der Grenzschicht reine Diffusion herrscht, und kein chemischer Sauerstoffverbrauch stattfindet. Direkt nach der Grenzschicht beginnt der Bereich der vollständigen konvektiven Vermischung. Hier findet auch der Sauerstoffverbrauch statt.

Es ist einzusehen, dass diese theoretische Vorstellung des Stofftransportes nicht in beliebig kleinen Maßstäben und bei beliebig kleinen Stoffströmen gelten kann. Wird das Gesamtvolumen im System im Verhältnis zum Volumen der Grenzschicht zu klein, ist die idealisierte Vorstellung einer rein diffusiven Grenzschicht ohne Sauerstoffverbrauch nicht mehr haltbar. Man befände sich dann vielmehr im reaktionsbeschleunigten Bereich. Im Extremfall eines Verhältnisses von eins bestünde das gesamte System nur noch aus Grenzschicht, so dass keinerlei Sauerstoffverbrauch stattfinden dürfte. Dies ist offensichtlich nicht

richtig. Ab welchem Maßstab, beziehungsweise Verhältnis von Gesamt- zu Grenzschichtvolumen die klassische Vorstellung ihre Gültigkeit verliert, ist nicht bekannt.

Die zweite mögliche Erklärung ist die, dass nicht die Größe der Grenzschicht, sondern die zu geringe Größe des Sauerstoffeintrages die theoretische Vorstellung ungültig werden lässt. Die idealisierte Vorstellung, dass in der Grenzschicht überhaupt kein Verbrauch stattfindet, entspricht mit Sicherheit nicht der Realität. Vielmehr ist der Verbrauch üblicherweise so gering, dass er vernachlässigt werden kann. Bei einem sehr geringen Stoffeintrag kann sich dies ändern und der bisher vernachlässigbare Verbrauch in der Grenzschicht bekommt Relevanz. In diesem Fall läge man erneut in dem beschleunigten Bereich.

In beiden Fällen wäre also der eingetragene Sauerstoff vollständig verbraucht, bevor er die Grenzschicht ganz durchlaufen hat. Damit wäre der gemessene Sauerstoffeintrag unabhängig von der Grenzschichtdicke und stattdessen nur noch von der Geschwindigkeit der chemischen Reaktion abhängig. Die Hatta-Zahl, das Verhältnis der Reaktions- zur Stofftransportgeschwindigkeit, wäre dann größer als 0,3 [149]. Dies würde prinzipiell gut den sehr hohen Sauerstoffeintrag und die Unabhängigkeit desselben von der Rührergeschwindigkeit erklären.

Die dritte mögliche Erklärung ist, dass keine Diskrepanz von Theorie und Messung existiert. Praktisch alle theoretischen Betrachtungen des Sauerstoffeintrags in Rührkesseln gehen von turbulenten Strömungsverhältnissen aus. Im Miniatur-Schlaufenreaktor liegt die maximale Rührer-Reynoldszahl bei $Re = 807$, also deutlich im laminaren Bereich. Ob die bisher gefundenen Zusammenhänge, wie beispielsweise die oben genannte Proportionalität $k_l \sim n^i$, in diesen Bereichen Gültigkeit besitzen, ist sehr fraglich.

Welche der Erklärungen zutrifft, bleibt offen. Beim Miniatur-Schlaufenreaktor ist aber die genauere mechanistische Aufklärung der Stofftransportvorgänge im Sulfit-System in jedem Fall wünschenswert. Nur so kann der Versuchsablauf eventuell sinnvoll korrigiert und der Sauerstoffeintrag sicher charakterisiert werden.

Die praktische Anwendung des Systems zeigte aber, dass diese Untersuchungen und mechanistischen Erklärungen nicht zwingend für den Betrieb des Systems notwendig sind. Wegen der äquivalenten Ergebnisse der Kultivierungen mit dem kontrollierten Festbettreaktor kann eine Limitierung durch die Sauerstoffversorgung ausgeschlossen werden. Die Betriebsweise während der Kultivierung, und das heißt speziell die erforderliche Rührerdrehzahl, wird durch das Mischzeitverhalten, das im folgenden Abschnitt behandelt wird, und nicht durch den Sauerstoffeintrag bestimmt.

6.1.2.2 Mischzeitverhalten

Durch die Zugabe von Phenolrot konnte qualitativ nachgewiesen werden, dass sich in dem Reaktor eine schlaufenförmige Strömung ausbildet. Die sich dadurch ergebende Durchströmung des Festbetts und die Durchmischung des Mediums sind eine wichtige Charakteristik, die quantifiziert werden konnte.

Dazu wurde die Mischzeit nach der neu entwickelten Methode, die in Abschnitt 3.7.1 auf Seite 48 beschrieben ist, bestimmt. Wie im Falle des Sauerstoffeintrags waren auch hier die Rührerdrehzahl und die Art des Einsatzes die variierten Größen. Allerdings entfallen bei der Mischzeitbestimmung die Messungen ohne Rühren, da die Vermischung dann ein reiner Diffusionsprozess ist. Die Messung der Mischzeit beschäftigt sich jedoch mit der konvektiven Durchmischung, also einem physikalisch andersartigen Problem.

Mit der Videobildanalyse wird der Farbumschlag in einer Vertiefung durch die Veränderung des Grünwertes analysiert. Die ermittelte Verlaufskurve wird so normiert, dass sie von einem Startwert null bis zu einem stationären Endwert eins verläuft. So kann die Kurve als Verlauf des Mischungsgrades M interpretiert und mit Gleichung (2.3) auf Seite 26 eine

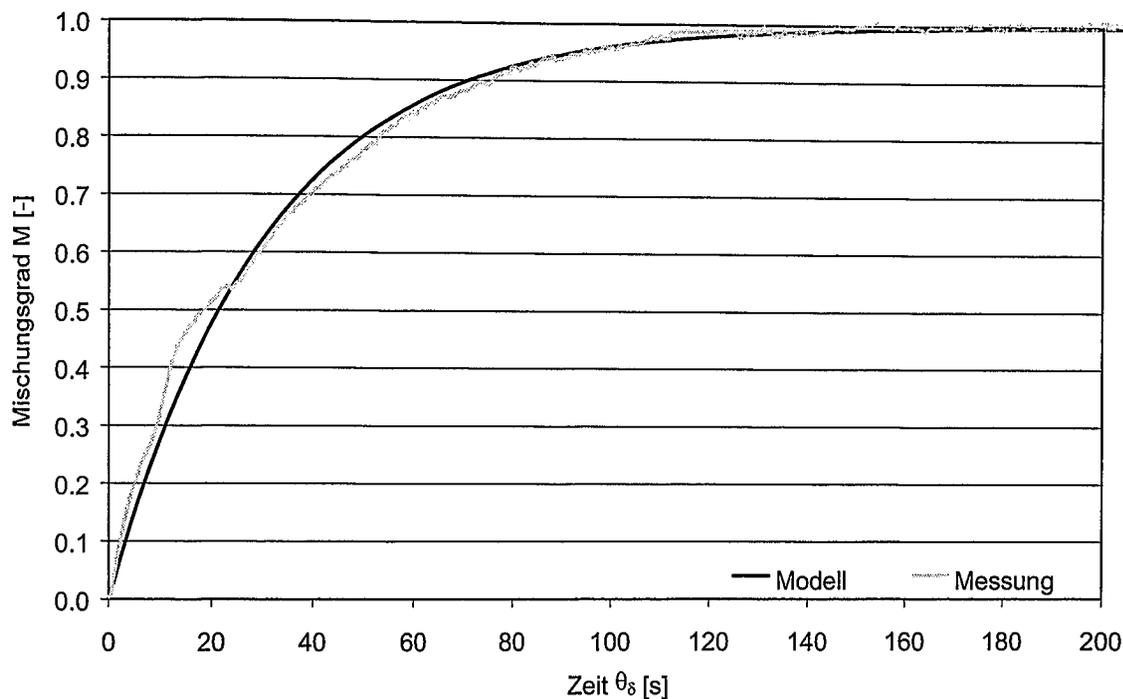


Abbildung 6.6: Beispielhafte Messkurve und Anpassung der Durchmischung des Miniatur-Schlaufenreaktors

Anpassung vorgenommen werden. Abbildung 6.6 zeigt beispielhaft eine solche Anpassung. Als Maß für die Durchmischung dient die Mischzeit bis zum Erreichen eines Homogenisierungsgrades von $\delta = 0,01$. Dieser Wert lässt sich wesentlich zuverlässiger über die angepasste Gleichung des Mischungsgrades ermitteln, da die Schwankungen der Messwerte in der Größenordnung des Homogenisierungsgrades liegen und somit das direkte Ablesen von den Messwertkurven sehr fehlerbehaftet ist.

In Abbildung 6.7 auf der nächsten Seite ist das Ergebnis der Untersuchungen als Mischzeit-Kennzahl in Abhängigkeit von der Rührer-Reynoldszahl aufgetragen. Deutlich ist der lineare Zusammenhang zu erkennen, sowohl für den Betrieb mit und ohne Einsatz als auch den mit Einsatz und Trägern. Letzteres entspricht dem Aufbau bei einer Kultivierung mit Zellen. Der Messwert bei der niedrigsten Reynoldszahl in dieser Konfiguration ($Re_r = 135$; $n \theta_{0,01} = 1012$) fügt sich als einziger nicht in die linearen Verläufe ein. Nach dem linearen Verlauf wäre hier ein Wert von knapp neun Minuten (536 s) zu erwarten, tatsächlich liegt die Mischzeit bei weniger als sieben Minuten (404 s).

Die Erklärung für dieses Verhalten liegt bei der nicht idealen Durchströmung des Festbettes. Hier bildet sich keine einheitliche Durchströmung aus, sondern es sind deutliche Totzonen zu erkennen. Dadurch ist das effektiv durchmischte Volumen stark verkleinert, wodurch die Mischzeit sich zwangsläufig verringert.

Eine Kultivierung mit solchen Totzonen ist im hohen Maße suboptimal, da die Diffusionswege für die Nährstoffe und den Sauerstoff zu lang werden, um Limitierungen ausschließen zu können (vergleiche Abschnitt 5.1.2 auf Seite 76). Ein Ziel ist aber auch eine möglichst schonende Vermischung, um wider Erwarten doch in Suspension befindliche Zellen nicht zu schädigen. Aufgrund dieser Überlegungen lässt sich eine optimale Rührer-Reynoldszahl identifizieren. Dies ist die Zahl, bei der eine vollständige Durchströmung der Trägerschüttung bei möglichst niedriger Rührerdrehzahl vorliegt. Aus Abbildung 6.7 auf der nächsten Seite ergibt sich so eine Reynoldszahl von 404, was einer Rührerdrehzahl von 450 U/min entspricht. In der praktischen Anwendung, also bei den Kultivierungen, wurde folgerich-

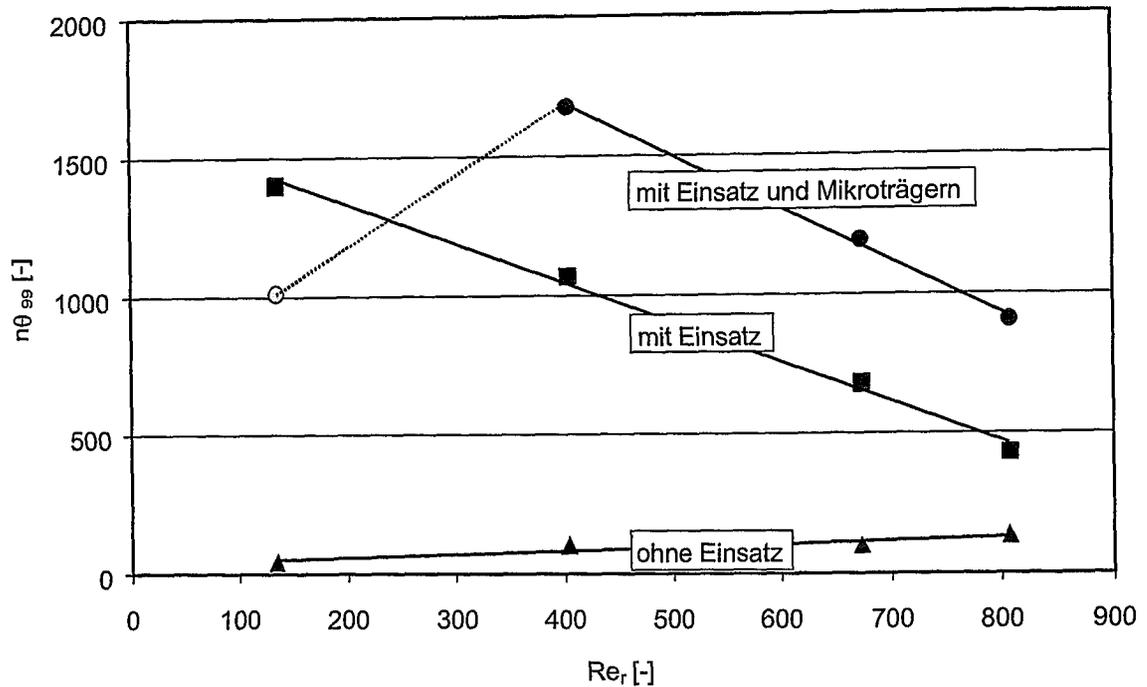


Abbildung 6.7: Mischzeit-Kennzahl als Funktion der Rührer-Reynoldszahl für verschiedene Konfigurationen des Miniatur-Schlaufenreaktors

tig diese Drehzahl verwendet. Zu keinem Zeitpunkt konnten Hinweise auf Stofftransport-Limitierungen oder Schädigungen durch die Scherkräfte des Rührers beobachtet werden. Damit lässt sich zusätzlich auch eine Limitierung durch den Sauerstoffeintrag ausschließen, der oben nicht ausreichend charakterisiert werden konnte.

6.2 Suspensionssysteme

Bei den Suspensionssystemen wurden nur mit dem Suspensionsreaktor spezielle verfahrenstechnische Untersuchungen durchgeführt. Beim miniaturisierten Spinner galt es dagegen, speziell eine Optimierung der Rührerdrehzahl durchzuführen. Dies erfolgte aber während der Kultivierungen und wird in Abschnitt 7.2 auf Seite 107 dargestellt.

6.2.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor

Wie schon beim Festbettreaktor sind auch beim Suspensionsreaktor der Sauerstoffeintrag und das Verweilzeitverhalten die wesentlichen verfahrenstechnischen Charakteristika. Eine Schädigung der Zellen durch den Rührer konnte bei der praktischen Anwendung zu keiner Zeit und bei keiner Drehzahl beobachtet werden, weshalb diese Möglichkeit auch nicht weiter untersucht werden soll. Das Abtrennverhalten der Zellrückhaltung wird, da es direkt mit Zellen geschah, in Abschnitt 7.1 auf Seite 101 besprochen.

6.2.1.1 Sauerstoffeintrag

Das Vorgehen bei der Sauerstoffeintragsmessung im Suspensionsreaktor ist bereits in Abschnitt 3.7.3 auf Seite 51 beschrieben worden. Die bei den Untersuchungen variierten Parameter waren der Füllstand und die Rührerdrehzahl. Während der Füllstand sowohl den k_L - als auch den α -Wert beeinflusst, wird durch die Rührerdrehzahl nur der k_L -Wert verändert. Es kommt bei keiner Drehzahl zu einer sichtbaren Trombenbildung an der Oberfläche des

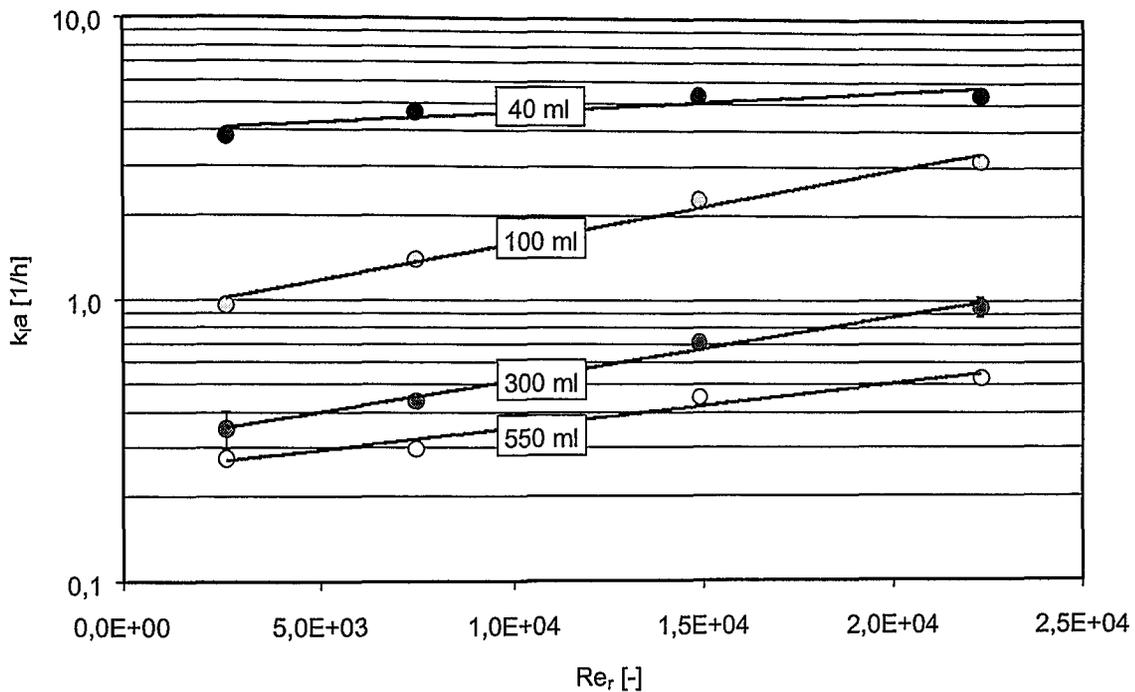


Abbildung 6.8: $k_l a$ -Wert als Funktion der Rührer-Reynoldszahl für verschiedene Füllstände im Suspensionsreaktor

Reaktors, was ebenfalls für alle anderen in dieser Arbeit entwickelten Systeme gilt. Ohne einen Trombus bleibt der a -Wert konstant.

Abbildung 6.8 zeigt das Ergebnis in der Form des $k_l a$ -Werts als Funktion der Rührer-Reynoldszahl. Über die Drehzahl steigt der $k_l a$ -Wert exponentiell an und erreicht ein Maximum von $5,4 \text{ 1/h}$. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden in der halblogarithmischen Auftragung sind uneinheitlich. Es gelingt daher nicht, den Sauerstoffeintrag mit einer einheitlichen Korrelation zu beschreiben. Der Grund dieser Variationen ist die sehr ungleichmäßige Geometrie des Reaktors. Bei minimalem Füllstand blockiert die Zellrückhaltevorrichtung fast ein Drittel der Oberfläche für den Stoffübergang. Bei höheren Füllständen entfällt dieses Problem, ab 250 mL nimmt dann die Oberfläche aufgrund der konischen Form des oberen Reaktorteils kontinuierlich zu. Diese Geometrie ist nicht in einer übersichtlichen mathematischen Form zu beschreiben, weshalb der Stoffübergang, der wesentlich von der verfügbaren Oberfläche abhängt, ebenfalls nicht mit einer praktikablen Gleichung erfassbar ist. In der Praxis ist die Verwendung der Abbildung 6.8 empfehlenswert. Zwischenwerte können linear interpoliert werden.

Eine maximal erreichbare Zellzahl kann aber abgeschätzt werden. Für tierische Zellen liegt die Sauerstoffverbrauchsrate bei $5\text{--}150 \cdot 10^{-10} \text{ mg/ch}$ [85]. Daraus ergibt sich eine maximale Gesamtzellzahl zwischen $6,5$ und $197 \cdot 10^8$ Zellen und damit eine erreichbare Zelldichte von $1,18 \cdot 10^6\text{--}3,6 \cdot 10^7 \text{ c/mL}$

6.2.1.2 Verweilzeitverhalten

Das Verweilzeitverhalten des Suspensionsreaktors entspricht in allen praktisch denkbaren Betriebspunkten dem eines idealen Rührkessels. Abbildung 6.9 auf der nächsten Seite zeigt die Antwort auf eine Stufenfunktion bei den ungünstigsten Betriebsbedingungen, die für die Kultivierung relevant sind (150 U/min , 550 mL Füllvolumen, $\tau = 34,6 \text{ h}$). Damit kann man bei Prozess-Bilanzierungen von einer idealen Durchmischung im Reaktor ausgehen.

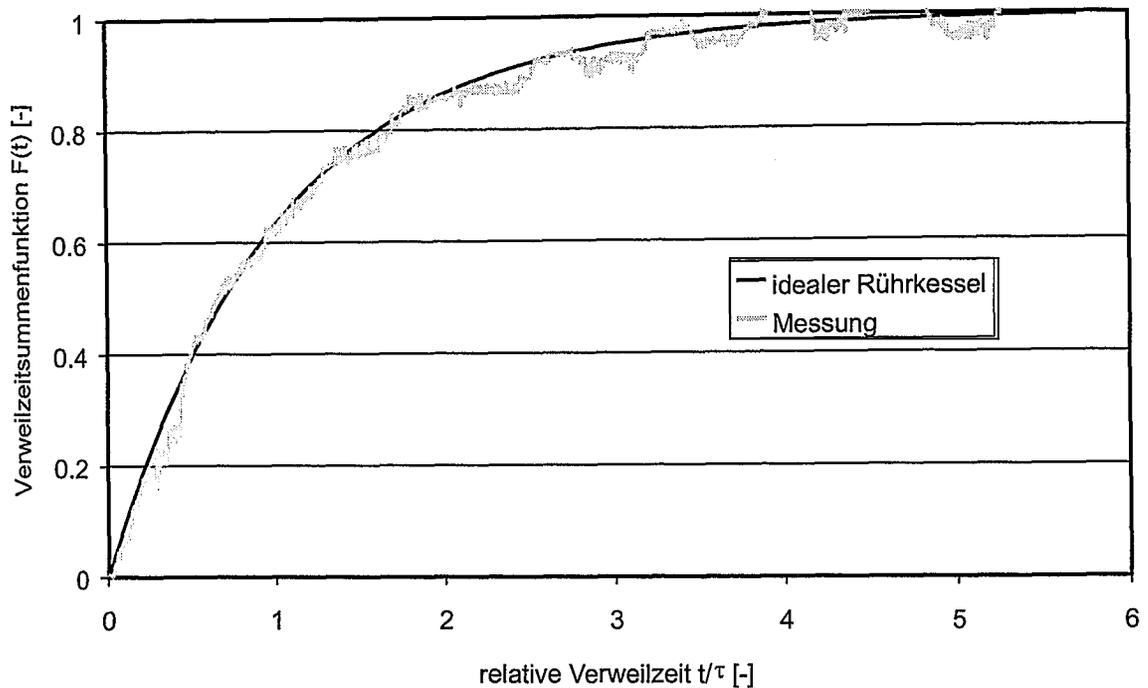


Abbildung 6.9: Verweilzeitsummenfunktion eines idealen Rührkessels und die im Suspensionsreaktor gemessene Funktion

Die bei der Probenahme gemessenen Konzentrationen können also auch für den ganzen Reaktor und besonders den Ablauf angenommen werden.

Weiterhin ist mit diesem Ergebnis sichergestellt, dass im Reaktor keine Totzonen existieren. Besonders der Probenahmestutzen erscheint bezüglich der Durchmischung kritisch. Die Gefahr ist, dass Zellen hier wie in einem Sedimenter auf den Boden absinken. Eine solche Ansammlung von Zellen ist unerwünscht, da diese Zellen zum einen dadurch in Limitierungen geraten können, sie sich zum anderen der Analytik entziehen und so die Bilanzierungen verfälschen. Neben den Ergebnissen der Verweilzeit-Messungen zeigen auch die Strömungsverhältnisse, die mithilfe von Farbstoffen optisch beobachtet werden können, eine gute Durchmischung des Probenahmestutzens. Abbildung 6.10 auf der nächsten Seite zeigt qualitativ die Form der sich ausbildenden Strömung. Zwar ist über die ganze Länge des Stutzens ein Absinken der Zellen zu erkennen, es bildet sich aber eine ausreichend starke Rückströmung aus, die eine Ansammlung der Zellen auf dem Boden verhindert.

6.3 Ein verfahrenstechnischer Vergleich verschiedener Kultursysteme

Die neu entwickelten Kultursysteme sind zuallererst spezielle Lösungen für das sehr begrenzte Problem der *ex vivo* Kultivierung primärer hämatopoetischer Zellen. Ein Vergleich mit anderen Systemen ist deshalb nur in einem eingeschränkten Maß sinnvoll. Die immobilisierten Systeme sind nur mit anderen Systemen vergleichbar, die eine ähnliche Konzeption aufweisen. Das wären beispielsweise das AastromReplicell-System (vergleiche Abschnitt 2.5.2 auf Seite 18) oder der mikroträgergestützte Ansatz von WANG und WU [287, 286, 285]. Von diesen Systemen sind aber keine verfahrenstechnischen Daten veröffentlicht, so dass auch keine Gegenüberstellung von Kenndaten möglich ist.

Anders ist die Situation beim Suspensionsreaktor. Bei Suspensionskulturen gibt es für hämatopoetische Zellen keine spezialisierten Lösungen. Es werden grundsätzlich Standardsysteme verwendet. Diese sind im Allgemeinen gut charakterisiert.

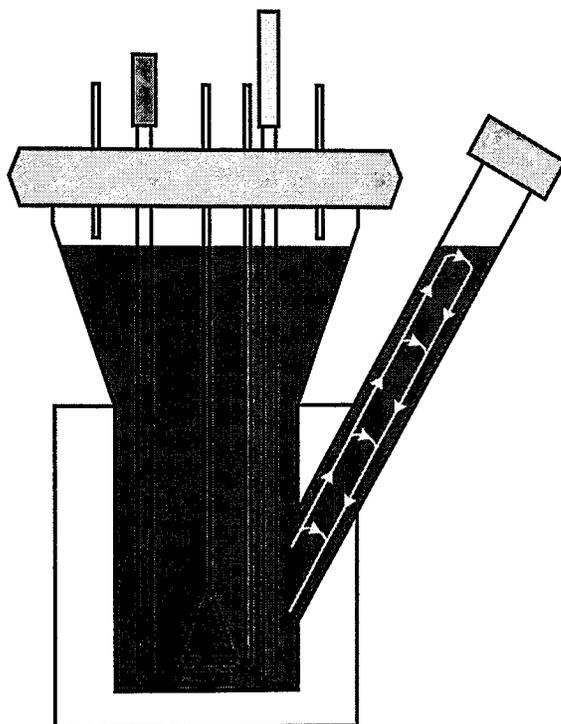


Abbildung 6.10: Schematische Darstellung der Strömung im Probenahmestutzen des Suspensionsreaktors

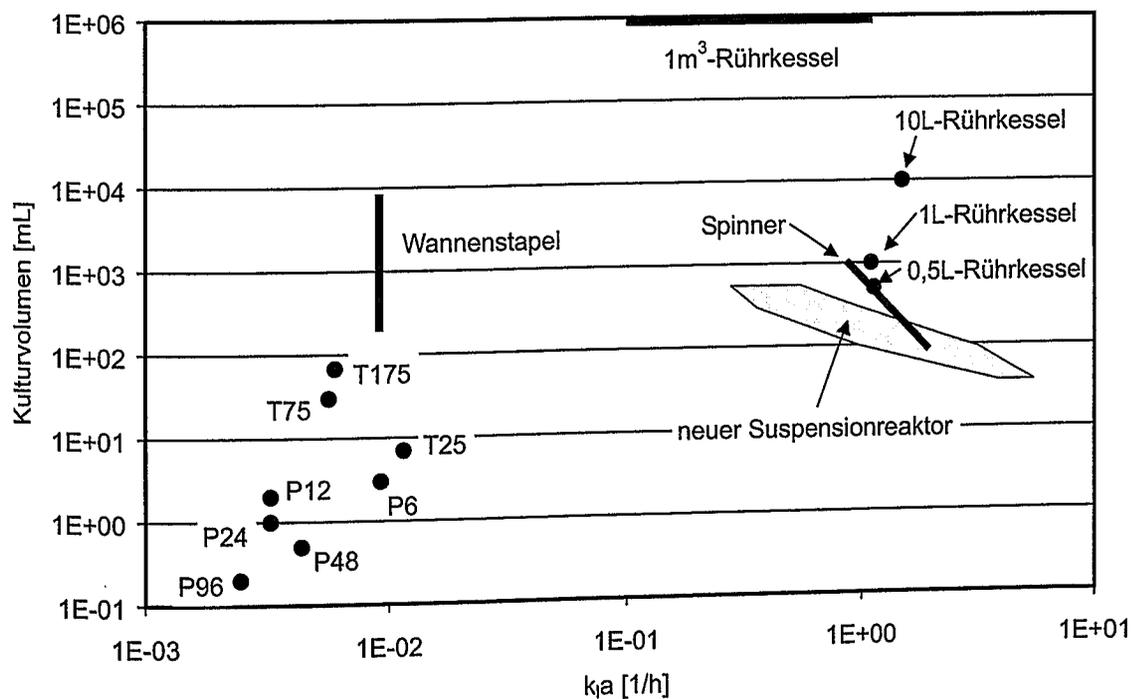


Abbildung 6.11: Vergleich der $k_L a$ -Werte von Kultursystemen verschiedener Volumina („P...“ steht für Gewebekulturplatten mit der entsprechenden Anzahl an Vertiefungen, „T...“ für Gewebekulturflaschen mit der entsprechenden Oberfläche in cm^2)

Der scherarme Sauerstoffeintrag, wie er in der Zellkultur allgemein gefordert ist, ist einer der wesentlichsten Parameter für die suspendierte Kultur. Die meisten statischen Systeme sind hier limitiert. Die Abbildung 6.11 auf der vorherigen Seite zeigt die $k_l a$ -Werte von verschiedenen Kultursystemen, unterschieden nach dem Kulturvolumen. Deutlich sind zwei Gruppen zu erkennen. Die statischen Systeme der Gewebekulturplatten und -flaschen sowie des Wannenstapels haben wegen ihrer rein diffusiven Sauerstoffversorgung deutlich geringere $k_l a$ -Werte als die gerührten Reaktoren. Die Werte für die statischen Systeme lassen sich dabei aus der Diffusion über die Füllhöhe des jeweiligen Kultursystems berechnen. Der Suspensionsreaktor aus dieser Arbeit ist bezüglich seiner Stofftransporteigenschaften im oberen Bereich der bisherigen Reaktoren einzuordnen. Dies gilt sowohl im Vergleich zu Spinnern [250], Reaktorsystemen im Labormaßstab von 0,5–10 Liter [57, 99, 310] als auch für rein oberflächenbegaste Reaktoren im industriellen Maßstab von 1 m³ [85]. Hier zeigt sich das Ergebnis des Versuchs, bei der Entwicklung des neuen Suspensionsreaktors die Technik der größeren Reaktoren durch ein Scale-down einfließen zu lassen. Auf diese Weise gelang es, ein sehr kleines Volumen bei gleicher relativer Sauerstoffversorgung zur Verfügung zu stellen.

Der Wannenstapel ist ein Beispiel für das Ergebnis eines entgegengesetzten Vorgehens. Dieses System ist ein Scale-up der Gewebekulturflaschen und besteht aus bis zu 40 Ebenen, die wie bei den Gewebekulturflaschen als Kulturfläche dienen und sehr dicht übereinander in ein einzelnes System integriert sind. Das System stellt wesentlich mehr Fläche in einer kompakten Bauweise zur Verfügung, allerdings ohne die Kulturbedingungen gegenüber den Gewebekulturflaschen zu ändern. Die logische Folge ist in Abbildung 6.11 auf der vorherigen Seite deutlich zu erkennen. Zwar erreicht man mit diesem System Kulturvolumina bis zu acht Litern, jedoch wird das Problem der Sauerstofflimitierung nicht gelöst.

In der Abbildung kann man eine weitere Problematik erkennen. Bei den sehr kleinen Systemen, speziell bei den Gewebekulturplatten, ist eine Tendenz erkennbar, dass bei kleinerem Systemvolumen auch der $k_l a$ -Wert geringer ist. Dies ist die Folge eines bezüglich des Stofftransportes mangelhaften Scale-downs. Die Verkleinerung der Systeme erfolgt praktisch nur durch eine Verringerung des Durchmessers einer Vertiefung. Gleichzeitig wird das Arbeitsvolumen aber nicht ausreichend verringert. Dies führt zu einem höheren Füllstand in der Vertiefung und dementsprechend zu einem längeren Diffusionsweg und einer schlechteren Sauerstoffversorgung. Das Verhältnis der Flüssigkeitshöhe zum Durchmesser beträgt bei einer Gewebekulturplatte mit 6 Vertiefungen 0,09, bei einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen 0,93. Der Grund für diese Praxis ist nicht ersichtlich, jedoch ist dies heute der Standard bei der Kultivierung hämatopoetischer Zellen im kleinsten Maßstab.

Etablierung der Kultursysteme

Nachdem in Abschnitt 4.4 auf Seite 65 die Eignung der Zelllinie KG-1 als Modell für primäre hämatopoetische Zellen gezeigt wurde, soll in diesem Kapitel die Etablierung der Suspensionssysteme mithilfe der KG-1 vorgestellt werden. Dadurch sollten zum einen die Betriebsparameter optimiert und zum anderen die Leistungsgrenzen der Systeme festgestellt werden.

7.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor

7.1.1 Die Zellrückhaltung

Eine genaue Charakterisierung der Zellrückhaltung ist unter Kulturbedingungen nicht durchführbar. Die Konstruktion des Reaktorablaufes lässt keine Probenahme direkt hinter dem Filter zu. Das in der Ablaufflasche gesammelte Medium ist die einzige Möglichkeit einer Analyse der Zellzahl im Filtrat. Diese unterliegt aber zwei Fehlern, deren Größe nicht angegeben werden kann. Zum einen kann es zum Wachstum von Zellen hinter dem Filter, zum anderen zu Sedimentationen in dem Ablaufkonus oder dem Ablaufschlauch kommen. Sedimentierte Zellen werden bei der Messung in der Ablaufflasche zunächst nicht mit erfasst, können entgegengesetzt durch weiteres Wachstum die Zellkonzentration jedoch theoretisch wieder erhöhen.

Die Abbildung 7.1 zeigt den Mittelwert der Zellrückhalterate aus acht Messwerten während der Kultivierung der Zelllinie KG-1 bei Durchflussraten zwischen 25,2 und 33,2 L/m² h. Eine messbare Veränderung der Rückhalterate bei steigendem Volumenstrom aus dem Reaktor konnte nicht gefunden werden. Zusätzlich ist die Rückhalterate bei maximalem Volumenstrom dargestellt (n=3). Dieser beträgt 6367 L/m² h, ist also so groß, dass man sowohl das Wachstum als auch die Sedimentation der Zellen in einer relevanten Größenordnung ausschließen kann. Die Sedimentationsgeschwindigkeit von Zellen wird mit 2–10 cm/h angegeben [268].

Die mittlere Zellrückhalterate liegt in beiden Fällen bei etwa 90 %, ohne sich signifikant voneinander zu unterscheiden. Man kann daher in der praktischen Anwendung relevante Unterschiede sowohl durch verschiedene Durchflussraten als auch durch längeren Betrieb

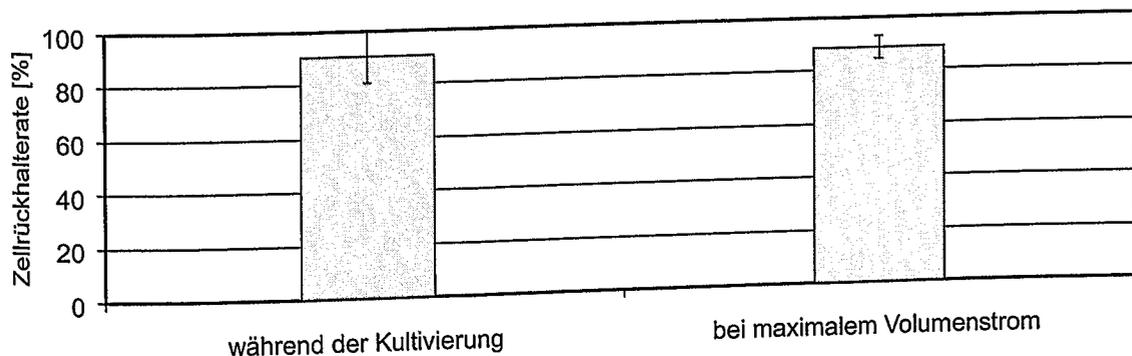
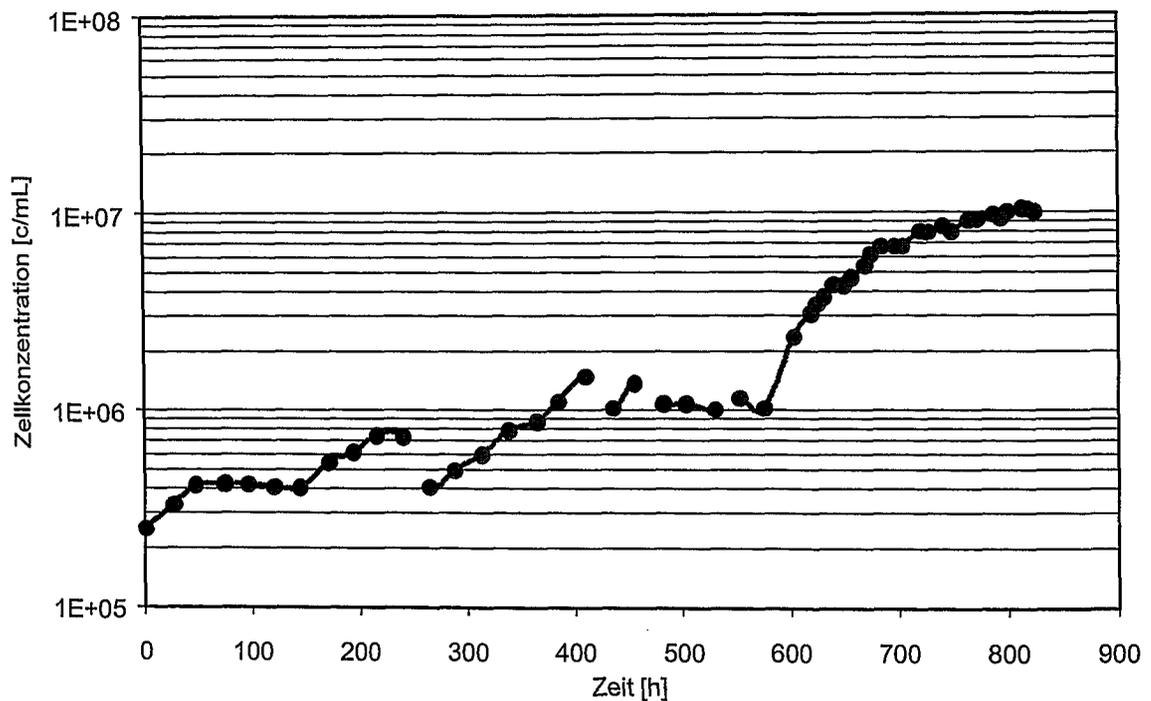


Abbildung 7.1: Die Zellrückhalterate der Zelllinie KG-1 bei der Kultivierung und bei maximalem Volumenstrom

Tabelle 7.1: Die Parameter der Kultivierung der Zelllinie KG-1 im Suspensionsreaktor

Zellen:	Zelllinie KG-1
Medium:	IMDM + 10 % FCS
Kultursystem:	perfundierter Suspensionsreaktor
Kulturdauer:	824 h
Inokulumsdichte:	$2,5 \cdot 10^5$ c/mL in 40 mL

**Abbildung 7.2:** Der Verlauf der Zellkonzentration bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1

ausschließen. Die Höhe der Rückhalterate ist dabei gut vergleichbar mit den kommerziellen, in Abschnitt 5.2.1 auf Seite 80 genannten Rückhaltesystemen, die auch üblicherweise Rückhalteraten um 90 % aufweisen. Eine Ausnahme bildet hier der Spinfilter, der gewöhnlich mit einer großen Maschenweite von $75 \mu\text{m}$ verwendet wird, da es andernfalls schnell zu Verblockungen durch Bewuchs des Filters kommt. Große Poren führen aber auch zu einer geringeren Zellrückhalterate. EISENKRÄTZER berichtet über Werte von nur 30–50 % [57].

7.1.2 Perfundierte Kultivierung

Die Leistungsfähigkeit des neuen kontrollierten Suspensionsreaktors wird mit der Modell-Zelllinie KG-1 demonstriert. Ziel ist es, eine maximale Gesamtzellzahl zu erreichen. Durch die kontinuierliche Zufütterung frischen Mediums im perfundierten Prozess sollen mögliche Substrat-Limitierungen oder Inhibierungen durch Stoffwechselprodukte ausgeschlossen werden.

Die Kultur, die in Tabelle 7.1 zusammengefasst ist, wurde mit dem kleinsten möglichen Arbeitsvolumen von 40 mL und $1 \cdot 10^7$ Zellen in IMDM + 10 % FCS gestartet. Die Abbildung 7.2 zeigt den Verlauf der Zellkonzentration, die Abbildung 7.3 auf der nächsten Seite den der Gesamtzellzahl während der mehr als einmonatigen Kultivierung. An den Punkten, an denen die Auftragung der Zellkonzentration eine Lücke aufweist, wurde das Reaktorvolumen erhöht, wodurch folgerichtig die Zellkonzentration gesenkt wurde. Der Füllstand

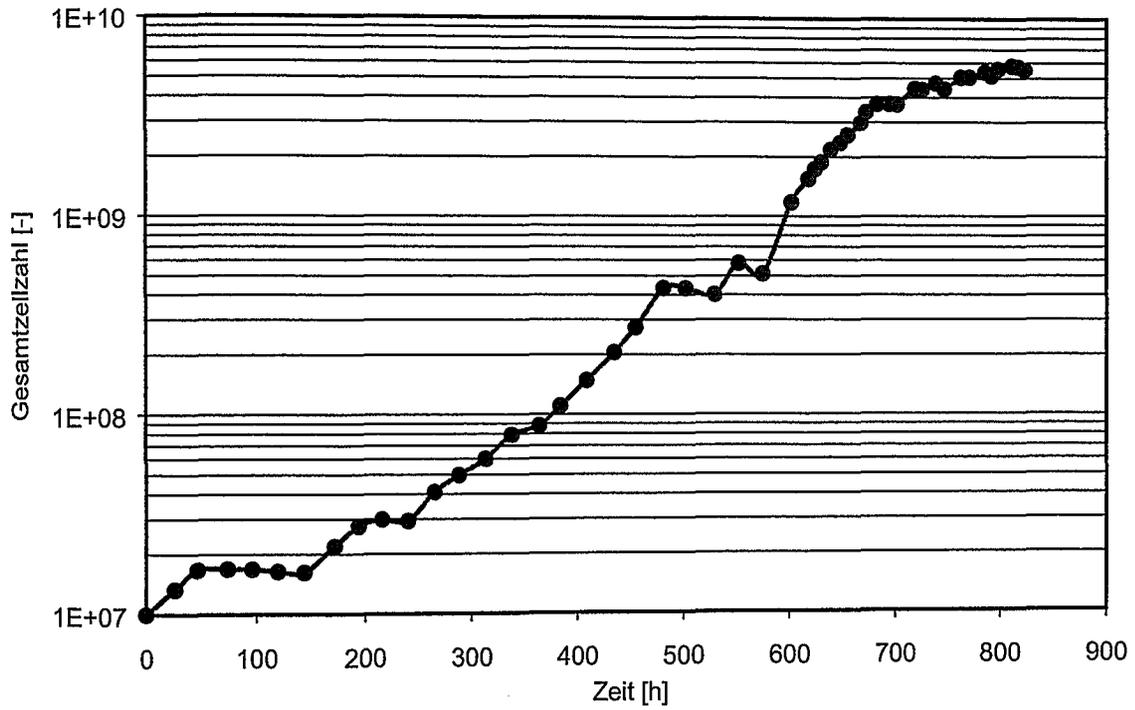


Abbildung 7.3: Der Verlauf der Gesamtzellzahl bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1

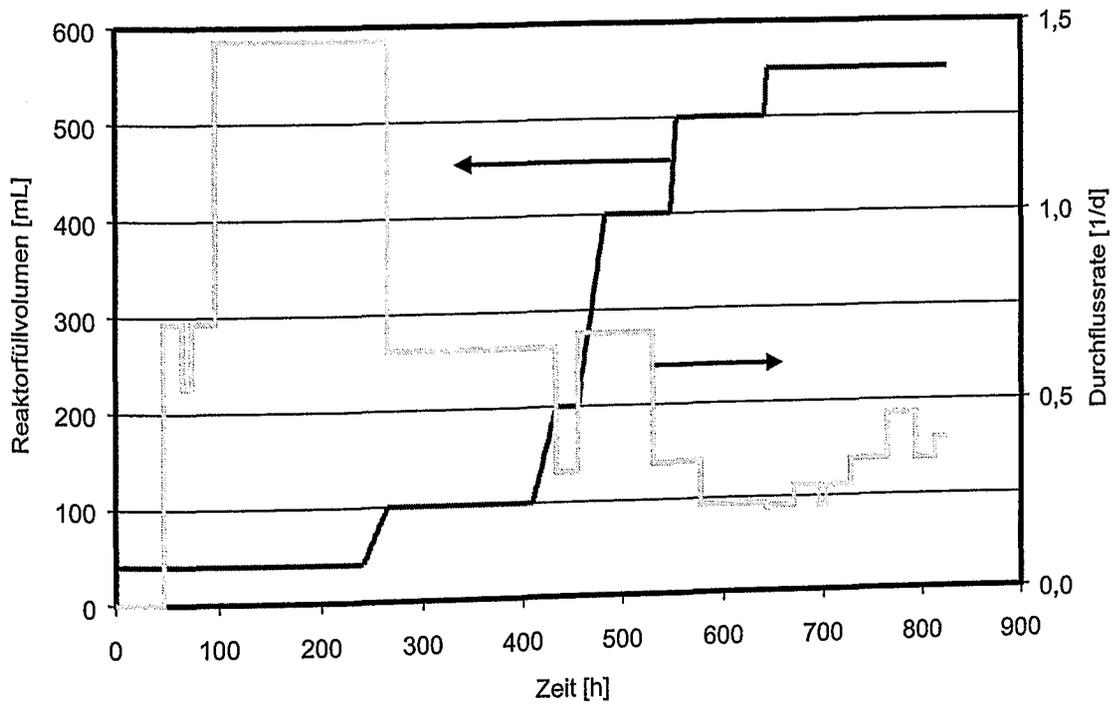


Abbildung 7.4: Das Reaktorfüllvolumen und die Durchflussrate bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1

des Reaktors, der in Abbildung 7.4 auf der vorherigen Seite dargestellt ist, wurde diskontinuierlich erhöht. Die Zugabe des zusätzlichen Mediums geschah langsam jeweils über einen Zeitraum von 24 Stunden (eine Ausnahme sind die letzten beiden Volumenerhöhungen, die in 6 bzw. 2,5 Stunden durchgeführt wurden). Eine plötzliche Volumenverdoppelung mit dem Frischmedium, das im gekühlten Zustand in der Vorlageflasche aufbewahrt wird, kann zu einem Temperatur-Schock bei den Zellen führen. Neben der hier gewählten diskontinuierlichen Volumenerhöhung ist prinzipiell auch eine kontinuierliche Erhöhung denkbar. Diese könnte durch einen dauerhaft größeren Zulaufvolumenstrom im Gegensatz zum Ablaufvolumenstrom realisiert werden. Bei einer solchen Betriebsweise des Reaktors sollte die Wachstumsrate der Zellen jedoch bekannt sein. Andernfalls besteht die Gefahr, dass schlecht proliferierende Zellen durch die zusätzliche Verdünnung durch Frischmedium in zu geringen Zelldichten vorliegen, was wichtige Zell-Zell-Interaktionen unterbinden und das Wachstum weiter einschränken kann. Bei primären Zellen ist eine solche kontinuierliche Volumenvergrößerung wegen der natürlichen Schwankung in der Proliferationsfähigkeit aufgrund der Spendervariabilität nicht zu empfehlen. Vielmehr sollte analog zu der hier beschriebenen Kultivierung der KG-1 das Füllvolumen nach der Analyse der Zelldichte individuell an den vorliegenden Zustand der Kultur angepasst werden.

Ebenfalls in Abbildung 7.4 auf der vorherigen Seite ist die Durchflussrate gezeigt, die als Ablaufvolumenstrom pro Reaktorvolumen berechnet wurde. Die theoretische Durchflussrate, bei der ein Gleichgewicht zwischen dem Zellwachstum und der aus dem Reaktor gespülten Zellzahl besteht, ergibt ausgehend von der mittleren Wachstumsrate der KG-1 von $0,0142 \text{ 1/h}$ und einer durchschnittlichen Zellrückhaltung von 90 % einen Wert von $3,41 \text{ 1/d}$. Während der Kultivierung war zu jedem Zeitpunkt eine Durchflussrate unter $1,5 \text{ 1/d}$ ausreichend, um eine Limitierung zu vermeiden. Der Grad der Zellrückhaltung ist also in jedem Fall ausreichend, um hämatopoetische Zellen zu kultivieren.

Nach 812 Stunden wurde eine Gesamtzellzahl von $5,8 \cdot 10^9$ Zellen erreicht, was gleichbedeutend mit einer Zellkonzentration von $1,1 \cdot 10^7 \text{ c/mL}$ ist. Zu diesem Zeitpunkt war die Kultur sauerstofflimitiert. In Abbildung 7.5 auf der nächsten Seite ist die Zusammensetzung der Gasphase des Reaktors dargestellt. Der Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks kann nicht dargestellt werden, da die Daten von dem Messdatenerfassungsprogramm (MEDUSA, Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH) aus ungeklärten Gründen nicht gespeichert wurden. In den ersten 427 Stunden konnte die Sauerstoffversorgung mit normaler Luft sichergestellt werden. Danach war der pO_2 -Wert auf unter 15 % gesunken. Durch die sukzessive Steigerung des Sauerstoffanteils durch die Beimengung von reinem Sauerstoff zu der Begasung wurde der Sauerstoffpartialdruck auf einem Wert von $25 \pm 10 \%$ gehalten. Ab der 604. Stunde bestand die Gasphase aus reinem Sauerstoff. Um den weiter steigenden Sauerstoffbedarf zu decken, wurde ab diesem Zeitpunkt die Rührerdrehzahl und dadurch mit dem auf diese Weise steigenden $k_l a$ -Wert der *OTR* erhöht.

Der Gasphase wurden variierende Mengen Kohlendioxid beigemischt. Mit der manuellen Einstellung des CO_2 konnte der pH-Wert auf dem Sollwert von 7,3 gehalten werden. Erst nachdem kein CO_2 mehr zudosiert wurde, konnte der pH-Wert nicht mehr kontrolliert werden. Er sank daraufhin bis auf einen Wert von 7,0. Von einer Gegentitrierung mit Lauge wurde abgesehen, da die Abweichung gering war und es sich nicht um primäre Zellen, sondern um eine Zelllinie handelte, die nicht der Gefahr einer Ausdifferenzierung durch den pH-Wert unterliegt.

Bei Erreichen der maximalen Zellzahl war die Kultur sauerstofflimitiert. Der Sauerstoffpartialdruck lag zu diesem Zeitpunkt bei 0 % und es gelang nicht mehr, die *OTR* zu steigern. Die erreichte Rührerdrehzahl von 800 U/min stellt das Maximum dar. Bei höheren Drehzahlen wird die Rotation des Magnetrührstabs instabil, und der Magnetrührstab springt aus der Rührachse.

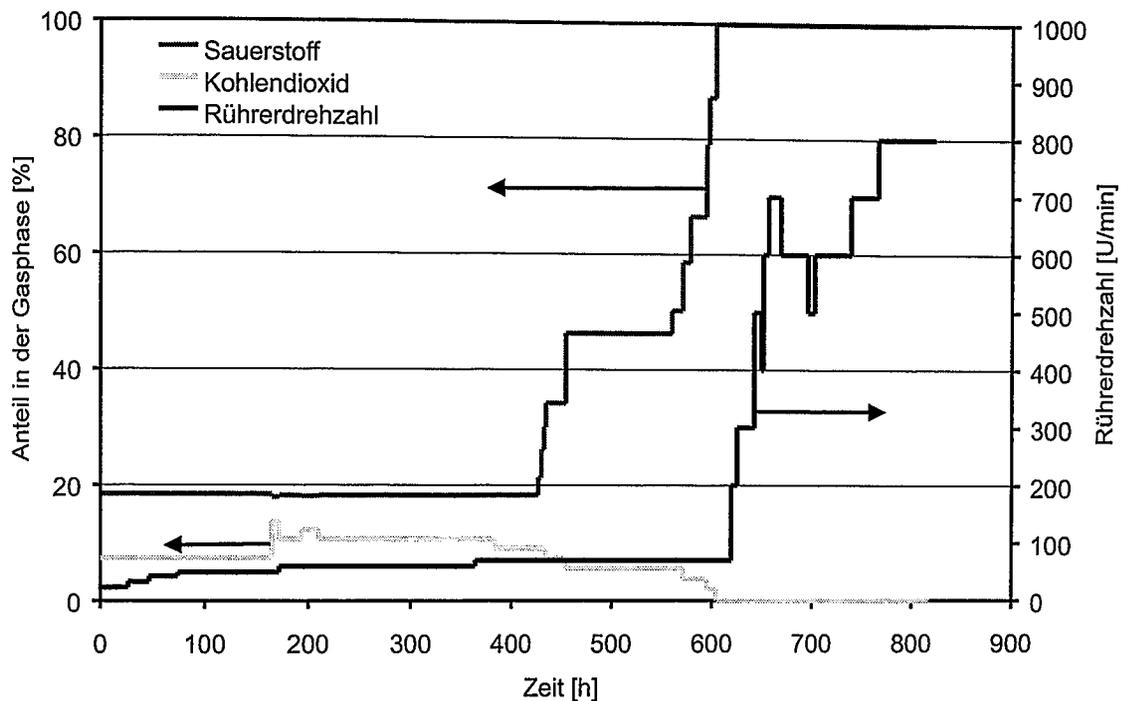


Abbildung 7.5: Die Zusammensetzung der Gasphase und die Rührerdrehzahl bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1

Die Konzentrationen an Nährstoffen und eventuell inhibierenden Stoffwechselprodukten waren in jedem Fall unkritisch (zum Beispiel Glutamin $> 0,5 \text{ mmol/L}$, Laktat $< 20 \text{ mmol/L}$), womit eine mit dem Sauerstoffmangel gleichzeitige Limitierung oder Inhibition durch das Medium ausgeschlossen werden kann. Damit ist die Leistungsfähigkeit des Reaktors durch den rein physikalischen Vorgang des Sauerstoffeintrags begrenzt. Das heißt aber auch, dass die Zellerückhaltung in diesem Reaktor eine ausreichende Leistungsfähigkeit hat, insbesondere da die höchste verwendete Durchflussrate, wie oben bereits erwähnt, weniger als 50 % der maximalen betrug.

Eine weitere Steigerung des Sauerstoffeintrages ist theoretisch erreichbar. Möglich wäre die Vergrößerung der Oberfläche, also geometrische Veränderungen am System, die Erhöhung des Leistungseintrages des Rührers, was ebenfalls eine Umkonstruktion erfordern würde, oder eine zusätzliche Integration einer Membranbegasung, was das verfügbare Gesamtvolumen stark eingrenzen würde. Angesichts der erreichbaren Gesamtzellzahl, die für klinische Anwendungen für Transplantationen nach einer Hochdosis-Chemotherapie bei weitem ausreicht (vergleiche Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23), erscheint eine solche Weiterentwicklung des Suspensionsreaktors derzeit aber nicht notwendig.

Die erreichte Zelldichte lässt sich mit den Zelldichten von tierischen Zelllinien in gewöhnlichen Suspensions-Rührkesselreaktoren vergleichen. In Abbildung 7.6 auf der nächsten Seite werden die maximal erreichten Zelldichten aus dem Bereich der tierischen Suspensions-Zelllinien dem Ergebnis dieser Arbeit gegenüber gestellt. Dabei sind die Betriebsweisen ohne Fütterung (Batch), ohne Perfusion (Fed-Batch) beziehungsweise ohne Zellerückhaltung (Chemostat) dem perfundierten Betrieb mit Zellerückhaltung deutlich unterlegen. Nur mit einer Zellerückhaltung sind überhaupt Zelldichten von über $1 \cdot 10^7 \text{ c/mL}$ erreichbar. Die Leistung des neuen Suspensionsreaktors ist dabei im Vergleich zu den kommerziellen Systemen des Spinfilters und der kontinuierlichen Zentrifugation nur wenig geringer.

Die Vergleichsdaten sind selbstverständlich nur Richtwerte, da sie von unterschiedlichen Zelllinien stammen und damit nur von einem ähnlichen, nicht demselben biologischen Sys-

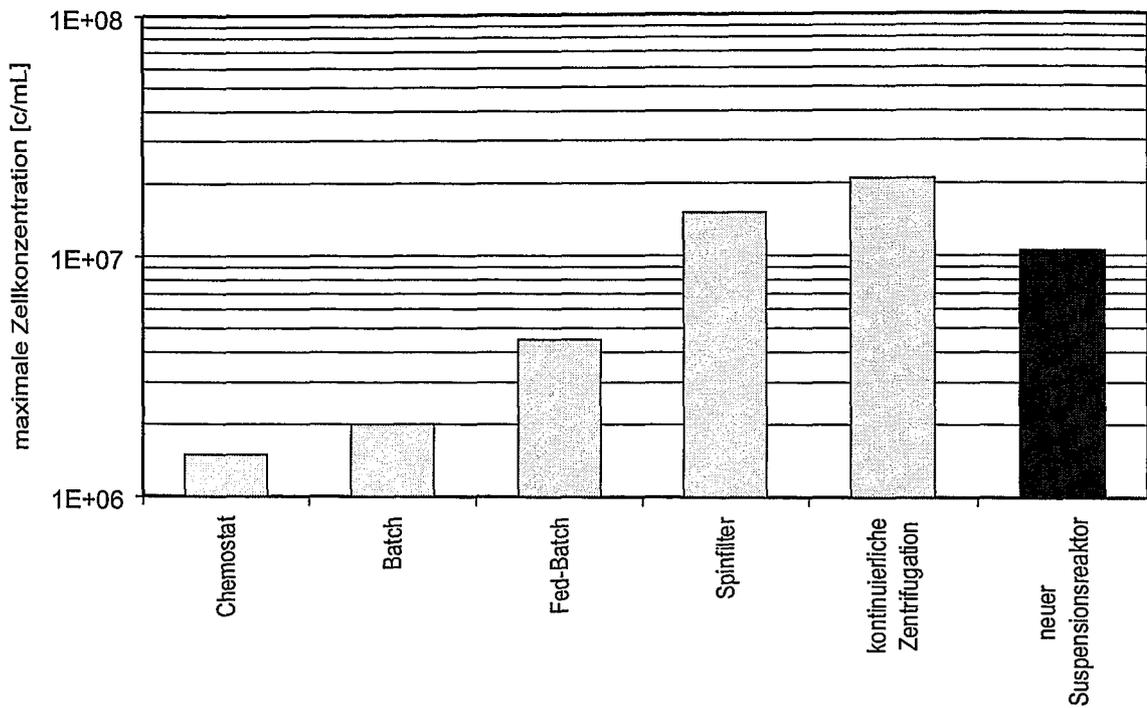


Abbildung 7.6: Ein Vergleich der maximal erreichbaren Zelldichten mit verschiedenen kontrollierten Kultursystemen

tem stammen. Die Daten sind alle am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH, also in demselben Labor, erzielt worden, wodurch relevante Unterschiede durch die oft sensible Handhabung und Analytik der Prozesse ausgeschlossen werden können.

Als Fazit dieses Vergleichs lässt sich feststellen, dass sich die Systeme mit Zellrückhaltung als deutlich überlegen erweisen und dass das neue Filtrations-Rückhaltesystem prinzipiell als gleichwertig mit den herkömmlichen Systemen angesehen werden kann.

Den wesentlichen Vorteil des neuen Suspensionsreaktors erkennt man, wenn man die mögliche Expansion von Zellen in einem einzelnen System betrachtet. Für die medizinische Anwendung ist es dringend geboten, die Expansion der Zellen nach Möglichkeit in einem einzelnen geschlossenen System durchzuführen, so dass keine Kontaminationsgefahr durch ein Öffnen des Systems und Überführen der Zellen entsteht. Ein leistungsfähiges System zeichnet sich daher nicht ausschließlich durch eine hohe Zelldichte, sondern vielmehr durch den erreichbaren Expansionsfaktor aus. In Abbildung 7.7 auf der nächsten Seite werden die möglichen Expansionsraten für die verschiedenen Betriebsweisen und Reaktorkonzepte der tierischen Zellkultur mit dem neuen Suspensionsreaktor verglichen. Die Werte beruhen auf der Annahme eines Inokulums von $1 \cdot 10^5$ c/mL in dem kleinsten Füllvolumen und einer Kultivierung bis zu den oben angegebenen maximalen Zelldichten bei dem höchsten Füllvolumen. Es zeigt sich, dass der neue Suspensionsreaktor hier ein um 72 % höheres Expansionspotenzial aufweist als ein handelsüblicher Reaktor mit kontinuierlicher Zentrifugation als bestes herkömmliches System. Diese Überlegenheit rührt besonders von der Möglichkeit her, das Reaktionsvolumen in einem großen Bereich variieren zu können. Diese Freiheit bieten herkömmliche Rührkessel nicht. Möchte man eine kontrollierte Kultivierung sicherstellen, kann man dort das Volumen maximal um den Faktor 3 variieren. In dem neuen Suspensionssystem dagegen lässt sich das Volumen bei kontrollierter Kultivierung um einen Faktor 13,75 verändern.

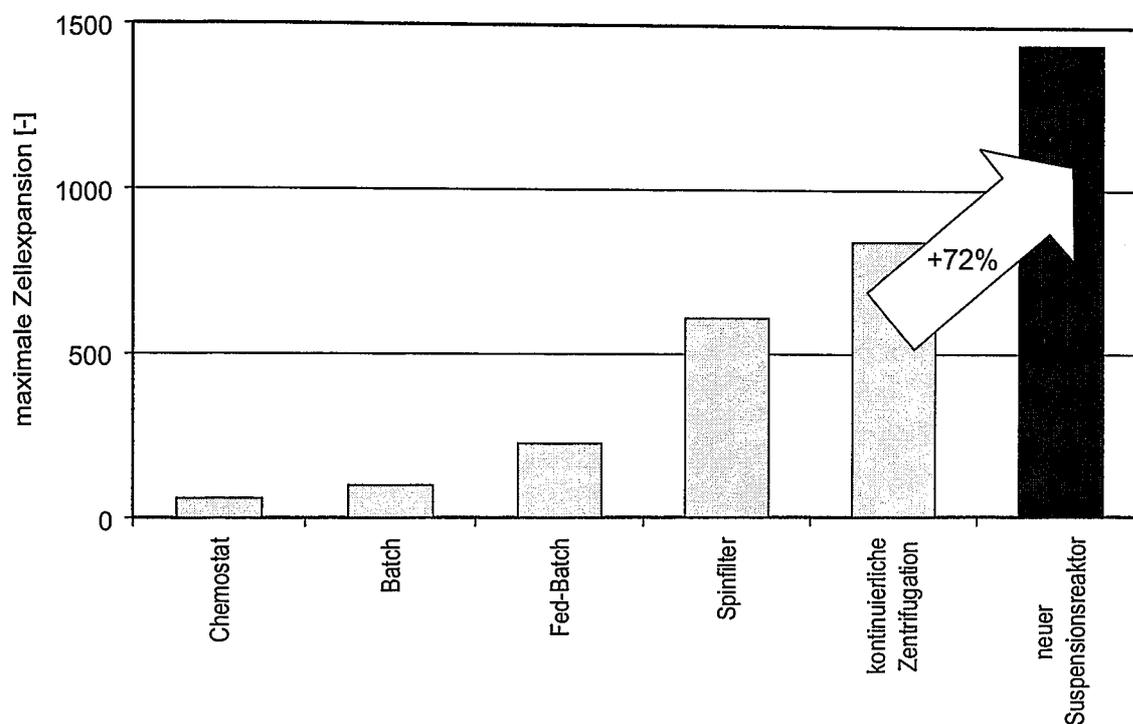


Abbildung 7.7: Ein Vergleich der maximal erreichbaren realen Zellexpansion in verschiedenen Kultursystemen

Tabelle 7.2: Die Parameter der Kultivierung der Zelllinie KG-1 im Spinner

Zellen:	Zelllinie KG-1
Medium:	IMDM + 10 % FCS
Kultursystem:	miniaturisierter Spinner
Kulturdauer:	347 h
Inokulumdichte:	$3,35 \cdot 10^5$ c/mL in 10 mL
Fütterung:	Tag 6 und Tag 10

7.2 Der miniaturisierte Spinner

Die Etablierung des miniaturisierten Spinners verfolgte das Ziel, die optimale Rührergeschwindigkeit für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen zu finden. Darüber hinaus bietet sich an dieser Stelle eine Möglichkeit, die in Abschnitt 4.4 auf Seite 65 gezeigte Modell-Eigenschaft der Zelllinie KG-1 in der praktischen Anwendung zu überprüfen. Der Spinner ist durch seine Auslegung als System für vergleichende Untersuchungen und dem damit einhergehenden kleinen Kulturvolumen prädestiniert für einen solchen Vergleich.

Es soll zunächst die optimale Rührerdrehzahl mithilfe der KG-1 ermittelt werden. Später in Abschnitt 8.1.2.2 auf Seite 120 wird dann versucht, diese Ergebnisse mit primären CD34⁺-Zellen zu reproduzieren.

In einem ersten Ansatz wurden KG-1-Zellen gemäß Tabelle 7.2 bei drei verschiedenen Rührerdrehzahlen kultiviert. Neben 60 und 30 U/min wurde ein Ansatz ungerührt durchgeführt. Am sechsten und zehnten Tag erfolgte eine Zufütterung von 10 mL Frischmedium. Dabei muss aber der Volumenverlust durch die Probenahme berücksichtigt werden. Von den ursprünglichen 10 mL waren am Tag 6 noch 8,5 verblieben. Die Fütterung an Tag 10 führte zu einem Endvolumen von 26,5 ml.

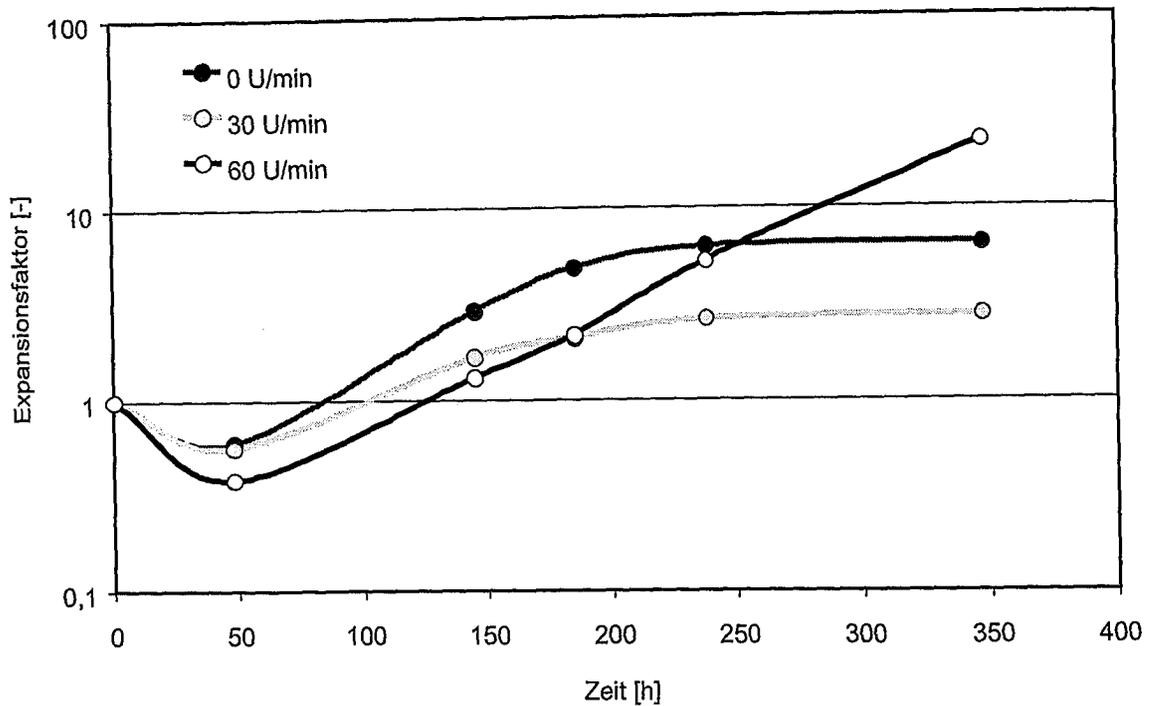


Abbildung 7.8: Zellexpansion bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 bei verschiedenen Rührerdrehzahlen

Die Zellexpansion ist in Abbildung 7.8 dargestellt. Auffallend ist der deutliche Einbruch der Zellzahl zu Beginn der Kultivierung. Besonders stark ist dies bei der Rührerdrehzahl von 60 U/min zu bemerken. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieses Verhalten die Folge eines fehlerhaften Inokulierens und nicht eines schlechten Anwachsens der Zellen ist. Eine so deutliche lag-Phase widerspräche allen Erfahrungen, sowohl mit den Zellen als auch mit dem Kultursystem. Das problemfreie weitere Wachstum lässt deshalb eine wesentlich geringere Inokulumszellzahl vermuten als angenommen. Weiterhin wurde das Inokulum in diesem Fall einzeln in die jeweiligen Spinner gegeben, so dass Unterschiede bei den Ansätzen in der Startzellzahl möglich waren. Bei allen späteren Versuchen wurden die Zellen in einem Volumen vereint inokuliert und die Zellsuspension dann auf die verschiedenen Systeme aufgeteilt. Ein solches Vorgehen stellt sicher, dass die Startzelldichte in allen Systemen gleich ist.

Trotz dieses anfänglichen Problems zeigt sich ein eindeutiges Bild für die Kultivierung bei den verschiedenen Drehzahlen. Der Ansatz mit 60 U/min wächst die gesamte Kulturzeit exponentiell, in den beiden anderen Ansätzen ist ab dem siebten Tag das Wachstum deutlich eingeschränkt. Die Gründe sind unterschiedlich. Während der ungerührte Ansatz mit großer Wahrscheinlichkeit ab der Zufütterung an Tag 6 durch den schlechten Stofftransport sauerstofflimitiert ist, ist dies bei dem Ansatz mit 30 U/min nicht anzunehmen. Bei dieser Drehzahl liegen offensichtlich sehr ungünstige Strömungsverhältnisse vor, so dass sich die Zellen in der Mitte unter der Rührerachse sammeln und ein Zellaggregat bilden. Nach einer Woche ist dieses Aggregat auch mit bloßem Auge gut erkennbar. Man kann vermuten, dass es in dieser Zellansammlung zu Diffusionslimitierungen kommt, entweder bezüglich der Sauerstoff- oder der Nährstoffversorgung. Da sich das Aggregat gut resuspendieren ließ, kann eine nicht repräsentative Probenahme ausgeschlossen werden. Bei 60 U/min entstand kein Zellaggregat, und der Stoffübergang an der Oberfläche war gegenüber der ungerührten Kultur wesentlich verbessert. Dadurch wuchsen die Zellen bis auf eine Zelldichte

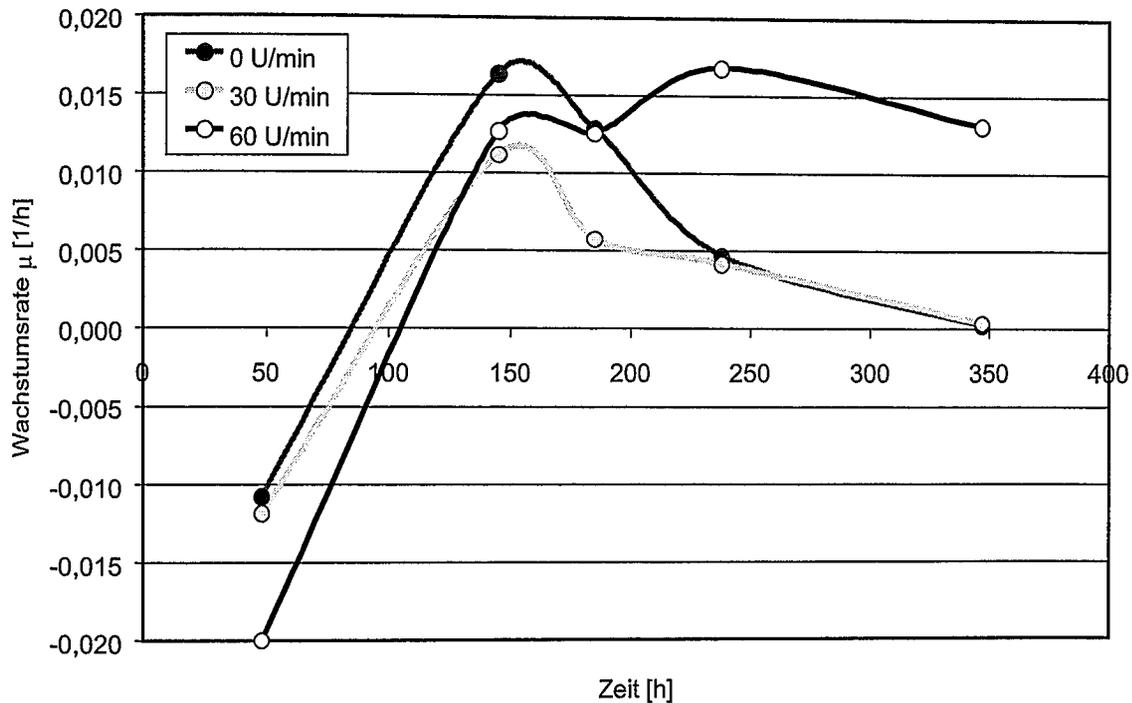


Abbildung 7.9: Wachstumsrate bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 bei verschiedenen Rührerdrehzahlen

von $2,5 \cdot 10^6$ c/mL.

Die frühe Limitierung bei der ungerührten Kultur und der niedrigen Drehzahl wird noch deutlicher, wenn man die Wachstumsraten betrachtet (Abbildung 7.9). Nach der anfänglichen Verringerung der Zellzahl liegt bei 60 U/min eine stabile Wachstumsrate von $0,015$ 1/h vor, die dem normalen Wert für die KG-1 entspricht. Die Wachstumsraten der beiden anderen Ansätze erreichen diesen Wert zwar zunächst auch, sinken dann aber deutlich ab.

Der Folgeversuch verglich die Rührerdrehzahl von 60 U/min mit der maximal möglichen Drehzahl von 77 U/min, die sich aus der Leistungsgrenze des Rührantriebes ergibt, und einer statischen Kultur in einer Gewebekulturflasche. Der Vergleich mit einer statischen Kultur in einem dafür vorgesehenen System, wie der Gewebekulturflasche, ist in jedem Fall sinnvoll, da der Spinner für eine statische Kultivierung, wie sie im vorangegangenen Versuch durchgeführt wurde, durch das schlechte Verhältnis von Oberfläche zu Volumen konzeptionell ungeeignet ist.

Der Versuch wurde prinzipiell analog zum vorangegangenen durchgeführt (Tabelle 7.2 auf Seite 107). Das Inokulum, bei dem nach der oben beschriebenen Methode sichergestellt wurde, dass es für alle Systeme gleich war, betrug in diesem Fall $2,7 \cdot 10^5$ c/mL in 15 mL. Die Mengen zugefütterten Frischmediums betragen am fünften Tag 7 mL, in ein Gesamtvolumen von 20 mL resultierend und am zehnten Tag 10 mL, mit einem Endvolumen von 28 mL.

In Abbildung 7.10 auf der nächsten Seite ist die Zellexpansion dieses Experiments dargestellt. Wieder fällt das konstante exponentielle Wachstum des Ansatzes mit 60 U/min auf, bei dem in diesem Fall die maximale Zelldichte bei $4,75 \cdot 10^6$ c/mL lag. Nach dem Erreichen dieser sehr hohen Dichte fällt diese auch relativ schnell wieder ab. Da die Mediendaten dieser sehr hohen Dichte fällt diese auch relativ schnell wieder ab. Da die Mediendaten keinen Hinweis auf eine entsprechende Limitierung oder Inhibierung gaben, kann man an diesem Punkt, trotz des Rührens, von einer Sauerstofflimitierung ausgehen. Dasselbe gilt für die Kultivierung in der Gewebekulturflasche, wo die Zellen nach acht Tagen schlechter proliferierten. Die erreichte Zelldichte liegt hier nur bei $2,89 \cdot 10^6$ c/mL, was für Gewebekul-

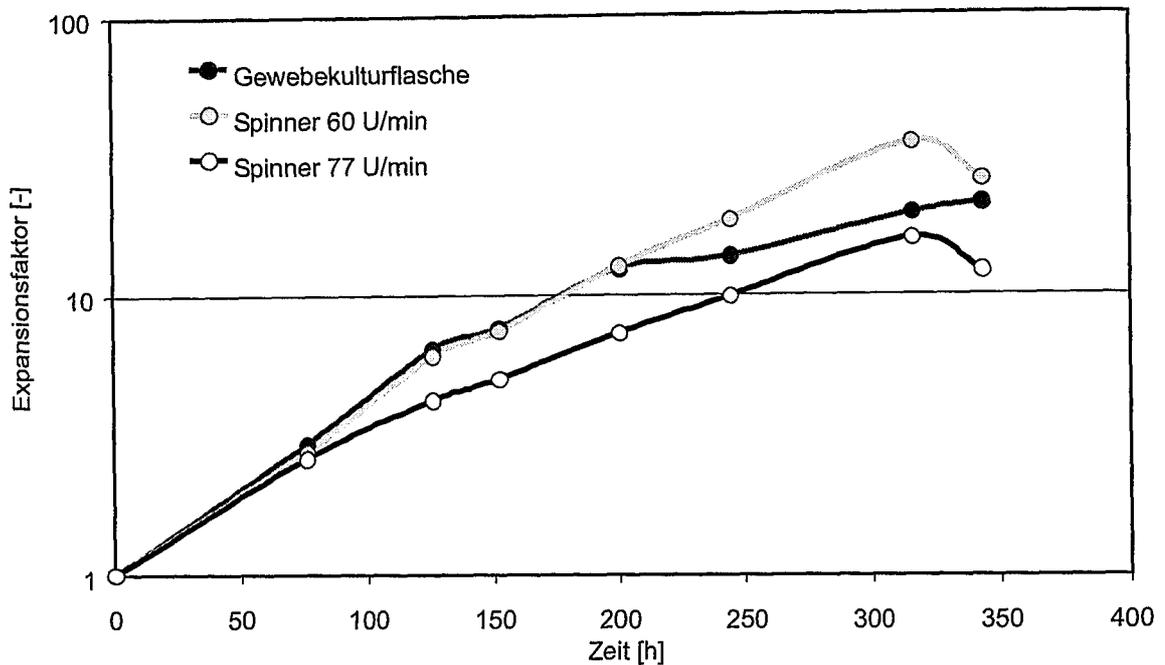


Abbildung 7.10: Zellexpansion bei der Kultivierung der Zelllinie KG-1 in statischer und gerührter Kultur

turflaschen erfahrungsgemäß das Maximum bei der Kultivierung der KG-1 darstellt.

Der mit 77 U/min gerührte Spinner zeigt von Beginn an ein konstant exponentielles Wachstum, das deutlich geringer ist als das der beiden anderen Ansätze. Die maximal erreichte Zelldichte lag bei $2,17 \cdot 10^6$ c/mL. Dieser Verlauf deutet auf eine Schädigung durch Scherkräfte hin, da auch schon bei den sehr geringen Zelldichten am Anfang der Kultur ein niedrigeres Wachstum zu beobachten ist. Eine Limitierung durch das Medium oder den Sauerstoff kann zu diesem Zeitpunkt sicher ausgeschlossen werden.

Insgesamt haben die Untersuchungen eine eindeutig zu bevorzugende Rührerdrehzahl von 60 U/min ergeben. Eine niedrigere Drehzahl führt zu Durchmischungsproblemen und zur Aggregatbildung der Zellen. Eine höhere Drehzahl schädigt die Zellen durch die hohe mechanische Belastung. Dies ist bei 60 U/min offensichtlich noch nicht der Fall, die maximale Wachstumsrate entspricht der einer üblichen statischen Kultur, wo keine Scherkräfte wirken. Deutlich zeigt sich der Vorteil der gerührten Spinnerkultur bei höheren Zelldichten. Durch die Agitation des Mediums wird der Sauerstoffeintrag in das System deutlich verbessert. An dem Punkt, an dem eine statische Kultur durch eine Sauerstofflimitierung ihre maximale Zelldichte erreicht, ermöglicht der Spinner noch eine deutliche Steigerung derselben. Dieses Ergebnis wird in Abschnitt 8.1.2.2 auf Seite 120 für primäre CD34⁺-Zellen noch einmal überprüft.

Kultivierung primärer Zellen

8.1 Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen

8.1.1 Immobilisierte Kulturen

Die Optimierung der immobilisierten und stromahaltigen Kultur hämatopoetischer Zellen ist Inhalt und Aufgabe der Dissertation von NANNI JELINEK, die parallel zu der vorliegenden Arbeit entstand [97]. Daher sollen hier keine vertiefenden Details dargestellt, sondern nur kurze Beispiele der Anwendung beider Kultursysteme vorgestellt werden. Sämtliche Daten dieses Abschnitts wurden freundlicherweise von NANNI JELINEK zur Verfügung gestellt.

8.1.1.1 Der Festbettreaktor

Eine Kultivierung im Festbettreaktor ist durch die Kokultivierung der Stromalen mit den hämatopoetischen Zellen besonders komplex und unterscheidet sich dadurch konzeptionell wesentlich von den bisher betrachteten Suspensionskulturen. Folgerichtig differieren auch die Grundparameter der Kultur, die in Tabelle 8.1 aufgelistet sind.

Die Analytik der immobilisierten Zellen ist durch die notwendige Zellablösung erschwert. Bei der hier vorgestellten Kultivierung kamen poröse Kollagenträger zum Einsatz. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch das Auflösen der Trägermatrix mithilfe von Kollagenase. Um in der Lage zu sein, alle Assays anlegen zu können, ist ein Probenvolumen von etwa 4 mL Trägerschüttung notwendig. Daher ist die Zahl der Probenahmen während einer Kultivierung sehr begrenzt.

In Abbildung 8.1 auf der nächsten Seite ist die Expansion der verschiedenen auf den Trägern immobilisierten Subpopulationen für eine beispielhafte Kultivierung gezeigt. Bei dieser Auftragung ist die Zeitachse so gelegt, dass der Nullpunkt im Moment des Inokulums der hämatopoetischen Zellen liegt. Dies bedeutet einen Tag nach dem Inokulieren der Stromalen Zellen und einen Tag vor der ersten Probenahme. Erst bei der ersten Probenahme kann der Anteil der auf den Trägern tatsächlich immobilisierten Zellen bestimmt werden,

Tabelle 8.1: Die wichtigsten Parameter der Kultivierung im Festbettreaktor

stromale Zellen:	Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
hämatopoetische Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	IMDM + 12,5 % HS + 12,5 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 100 ng/mL anti-TGF- β + 10 ng/mL IL-3 + 50 ng/mL SCF + 50 ng/mL FL + 20 ng/mL TPO
Kultursystem:	Festbettreaktor (Gesamtvolumen: 28 mL)
Mikroträger:	14,4 mL poröse Kollagenträger
Kulturdauer:	14 Tage
Inokulum, stromale Zellen:	$6,95 \cdot 10^5$ c/mL Trägerschüttung
Inokulum, hämatopoetische Zellen:	$5,5 \cdot 10^4$ c/mL Trägerschüttung
Fütterung:	kontinuierlich ab Tag 2, Durchflussrate: 0,69 l/d

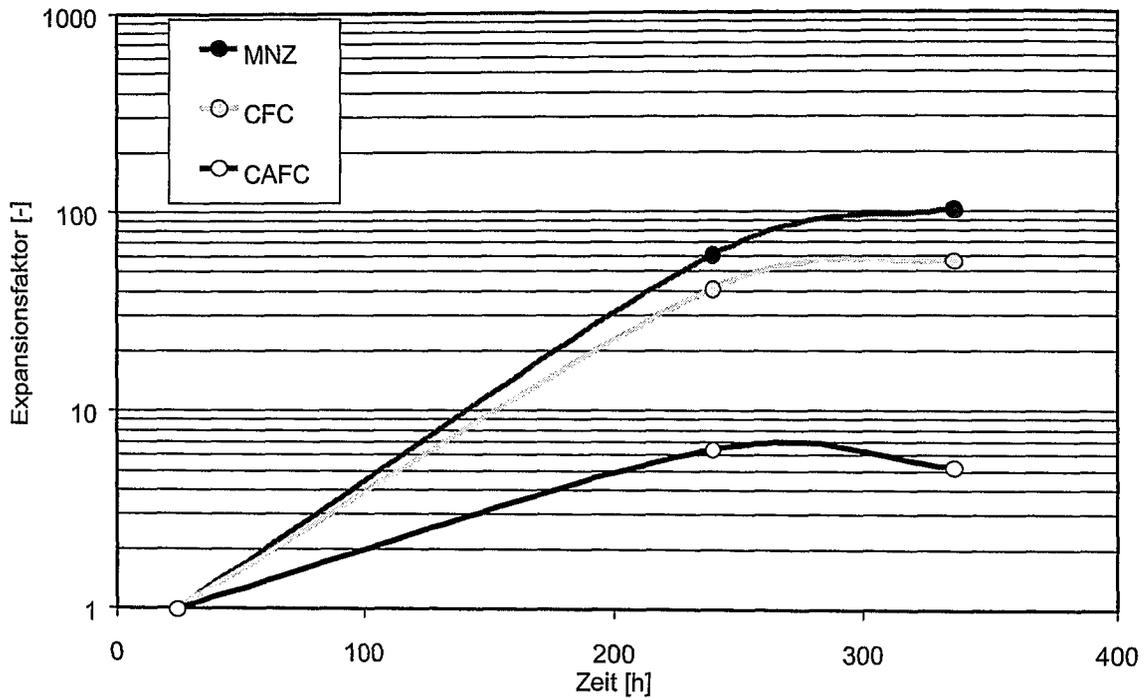


Abbildung 8.1: Die Expansion der auf Kollagenträgern immobilisierten hämatopoetischen Zellen im Festbettreaktor

weshalb an diesem Punkt der Ausgang der in der Abbildung gezeigten Expansionswerte ist.

Man erkennt, dass nicht nur die MNZ, sondern auch alle frühen Vorläuferzellen, das heißt sowohl die CFC als auch die CAFC vermehrt werden. Alle Subpopulationen zeigen gegen Ende der Kultivierung die Tendenz einer stabilen Zellzahl, das heißt eines Steady-states. Es kann daher vermutet werden, dass sich ein insgesamt stabiles System ausbildet. Unterstützt wird diese These durch weitergehende Überlegungen: Der Reaktor ist perfundiert, und die Zellrückhaltung erfolgt nur über die Immobilisierung der Zellen auf den Mikroträgern. Reife Blutzellen sind wenig adhären, lösen sich von den Trägern und gelangen deshalb mit dem Medium aus dem Reaktor. Die Zahl der Zellen im Medium blieb während der Kultivierung konstant. Dies bedeutet, dass sich kontinuierlich eine gleichbleibende Menge Zellen von den Trägern ablöste. Bleibt unter dieser Voraussetzung die Zellzahl der Subpopulationen auf dem Träger konstant, so muss wie *in vivo* eine Quelle der Zellproduktion vorhanden sein. Die Stabilität des Systems lässt vermuten, dass Stammzellen erhalten wurden.

Diese Ergebnisse stellen einen wesentlichen Fortschritt gegenüber dem alten Festbettreaktor dar, der Ausgangspunkt der hier vorgestellten Entwicklung war. In dem alten, aus der Wirbelschicht-Technik stammenden Festbettreaktor konnte zwar auch die Zellzahl insgesamt vergrößert werden, dies gelang jedoch nicht auf den Trägern immobilisiert. Abbildung 8.2 auf der nächsten Seite vergleicht den Verlauf der immobilisierten Zellzahl auf den Mikroträgern im neuen und alten Festbettreaktor. Eine Zellexpansion konnte in dem alten Reaktor nur durch die Addition der immobilisierten Zellzahl mit der akkumulierten Zahl der durch die Perfusion ausgetragenen Zellen errechnet werden. In der Praxis ist die akkumulierte Zahl der ausgetragenen Zellen keine relevante Größe. Für den klinischen Einsatz solcher Zellen wäre es erforderlich, sie bis zum Ende der Kultur zu konservieren. Dies ist nicht mit einem vertretbaren Aufwand durchführbar.

Das prinzipielle Konzept des Mimikrierens der *in vivo* Bedingungen bei der Kultivierung im Festbettreaktor erscheint vielversprechend. Zunächst gelingt es, die Zellen auf den

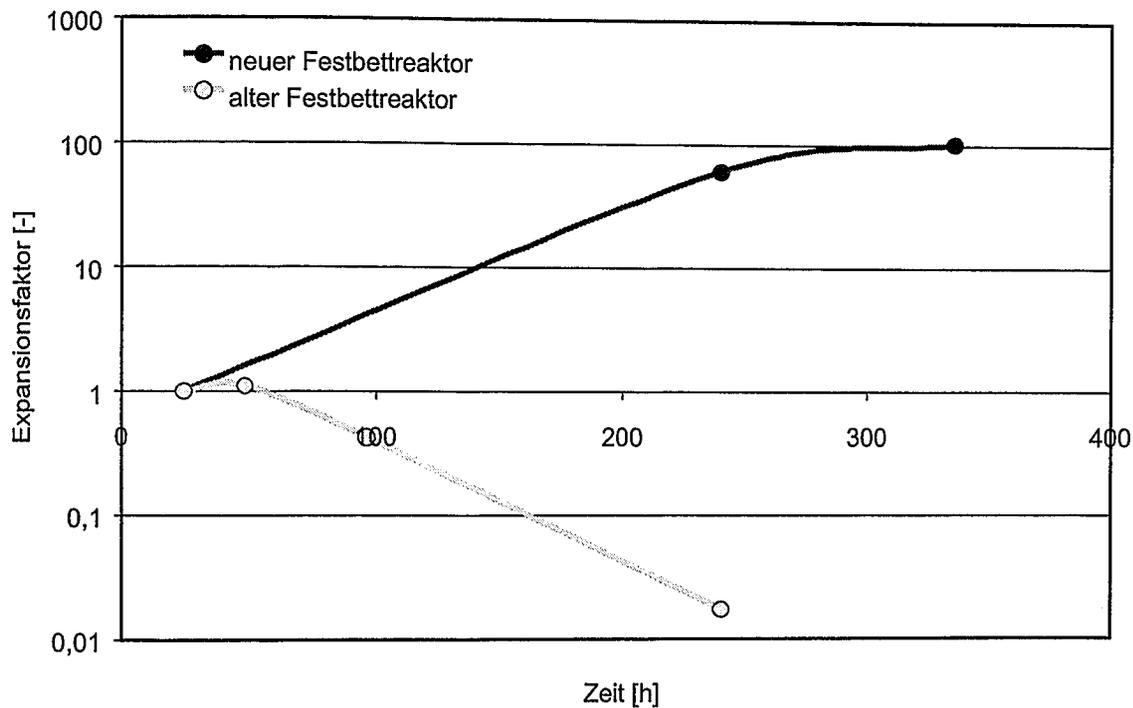


Abbildung 8.2: Ein Vergleich der Expansion der immobilisierten MNZ im alten und neuen Festbettreaktor

Trägern zu immobilisieren. Abbildung 8.3 auf der nächsten Seite zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen eines leeren und eines vollständig bewachsenen Trägers. Auf den Trägern befindet sich ein stabiles Netzwerk aus stromalen und hämatopoetischen Zellen, die unter dem Elektronenmikroskop dem Aufbau des Knochenmarks gleicht, wie in Abbildung 8.4 auf Seite 115 erkennbar ist. Auf der linken Seite ist die *ex vivo* Kultur dargestellt. Man sieht deutlich die einzelnen, langgezogenen stromalen Zellen in der von ihnen gebildeten extrazellulären Matrix. Darauf liegen die runden hämatopoetischen Zellen. In der *in vivo* Situation erkennt man den gleichen Aufbau. Neben der glatten Schicht aus Endothelzellen in der Bildmitte (Markierung „BC“), die einen Schnitt durch eine Blutkapillare darstellt, liegen hämatopoetische Zellen (Markierung „Me“) direkt auf dem Stroma.

8.1.1.2 Beispielhafte Anwendungen des Miniatur-Schlaufenreaktors

Die Einsatzmöglichkeiten des Miniatur-Schlaufenreaktors sind vielfältig. Es können fast alle Kultivierungsparameter variiert und damit deren Einfluss in parallelen Kulturen untersucht werden. Dies können zum Beispiel unterschiedliche Mikroträger, stromale Zelllinien oder Medienzusammensetzungen sein. Bis auf wenige physikalische Parameter, wie dem Sauerstoffpartialdruck und der Perfusion des Mediums, können alle Einflussfaktoren auf die Kultivierung im klinischen Maßstab im Miniatur-Schlaufenreaktor optimiert werden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Festbettreaktor konnte gezeigt werden [97].

Aus der großen Zahl an Untersuchungen wird eine exemplarisch dargestellt. Hier wird das Immobilisierungs-Verhalten der Zelllinie KG-1 mit dem von primären CD34⁺-Zellen verglichen. Das Vorgehen entspricht prinzipiell dem in Abschnitt 6.1.1.3 auf Seite 90 für die Gradientenbildung in Kokultur. Die Rahmendaten zeigt Tabelle 8.2 auf der nächsten Seite. Für die Untersuchung wurden verschiedene Verhältnisse von stromalen zu hämatopoetischen Zellen eingesetzt. Die Dichte der stromalen Zellen blieb konstant. Das Ergebnis zeigt Abbildung 8.5 auf Seite 116. Die Immobilisierungsrate lag in allen Ansätzen über

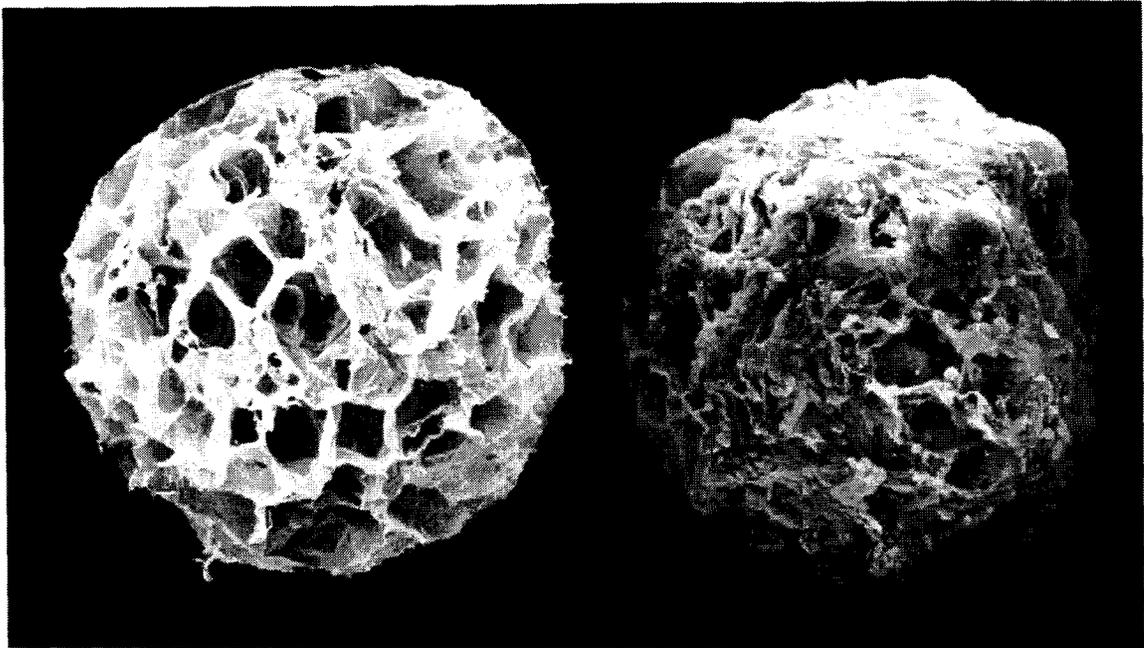


Abbildung 8.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines unbewachsenen und eines vollständig besiedelten porösen Kollagenträgers (Trägerdurchmesser: 0,6 mm)

Tabelle 8.2: Die Parameter des vergleichenden Immobilisierungs-Versuches im Miniatur-Schlaufenreaktor

stromale Zellen:	Zelllinie SI/SI (bestrahlt mit 80 Gy)
hämatopoetische Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut, Zelllinie KG-1
Medium:	IMDM + 12,5 % HS + 12,5 % FCS
Kultursystem:	Miniatur-Schlaufenreaktor
Mikroträger:	1 mL poröse Kollagenträger pro Vertiefung
Kulturdauer:	1 bzw. 2 Tage
Inokulum, stromale Zellen:	$5 \cdot 10^5$ c/mL Trägerschüttung
Inokulum, hämatopoetische Zellen:	$5 \cdot 10^4 - 2,5 \cdot 10^5$ c/mL Trägerschüttung
Fütterung:	keine
Zahl der Versuche:	n=2

75 %. Das Immobilisierungs-Verhalten der KG-1 ist nur geringfügig besser als das primärer Zellen. Insgesamt kann die KG-1 bezüglich der Immobilisierungseigenschaften als gleichwertig mit primären Zellen angesehen werden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Gradientenbildung im Festbettreaktor ist damit nachgewiesen.

8.1.2 Suspensionskulturen

8.1.2.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor

Die Kultivierung von primären CD34⁺-Zellen wurde zunächst parallel im neuen Suspensionsreaktor und in einer 25 cm²-Gewebekulturflasche durchgeführt. Die Kulturparameter sind in Tabelle 8.3 auf der nächsten Seite beschrieben. Die Gewebekulturflasche wurde bis auf die Fütterung identisch wie der Reaktor behandelt. Während die statische Kultur ungefüttert blieb, wurde im Reaktor in den ersten 24 Stunden das Kulturvolumen von 40 auf 80 mL verdoppelt und danach kontinuierlich mit einer Verweilzeit von 8 Tagen perfundiert.

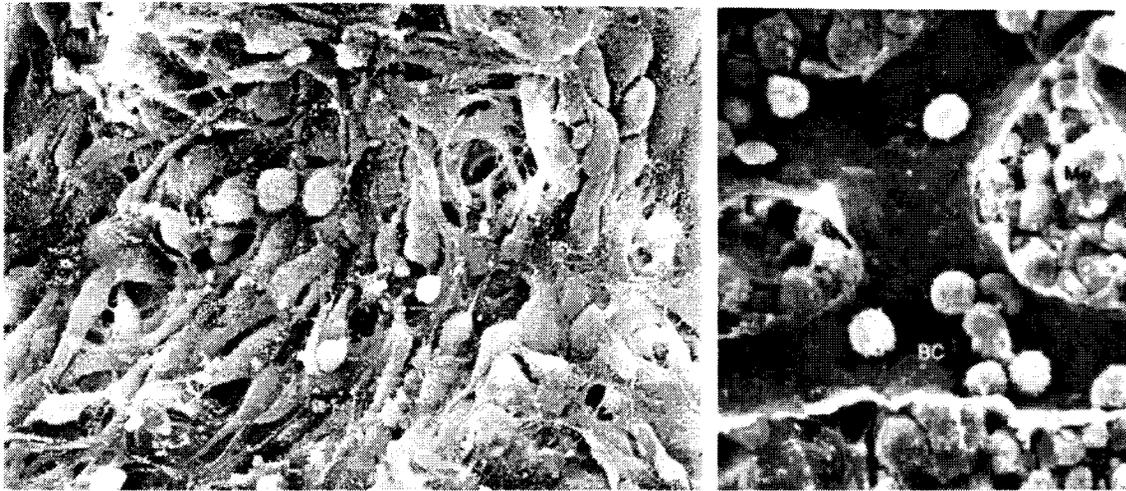


Abbildung 8.4: Kokultivierung hämatopoetischer Zellen auf stromalen Zellen, links auf einem Kollagenträger, rechts *in vivo* im humanen Knochenmark [256]

Tabelle 8.3: Die Parameter der Kultivierung von CD34⁺-Zellen im Suspensionsreaktor

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	CellGro SCGM – Zytokin-Standard 2
Kultursystem:	perfundierter Suspensionsreaktor
Kulturdauer:	662 h
Inokulum:	$8,2 \cdot 10^3$ c./ml. in 40 mL
Rührerdrehzahl:	70 U/min

Der Sauerstoffpartialdruck im Reaktor wurde konstant auf 25 % Luftsättigung geregelt, der pH-Wert auf 7,35.

Da für diese vergleichende Kultur nur wenige Zellen zur Verfügung standen, war das Inokulum sehr klein (vergleiche Abschnitt 2.5.3.5 auf Seite 22). Durch die geringen Zelldichten war der Medienverbrauch entsprechend niedrig. Die Glukose-Konzentration lag am Ende der Kultur im Reaktor bei 1,25 g/L und in der Gewebekulturflasche bei 0,37 g/L. Die letztere Konzentration ist zwar deutlich niedriger, es war aber keine Einschränkung der Wachstumsrate zu beobachten. Die Substrat-Versorgung kann demnach über die Kulturzeit als unkritisch angesehen werden.

In Abbildung 8.6 auf Seite 117 ist die Entwicklung der Zahl der MNZ dargestellt. Man erkennt keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Kultivierung im Suspensionsreaktor und in der Gewebekulturflasche. Dies gilt ebenso für die Expansion der CD34⁺-Zellen (Abbildung 8.7 auf Seite 117) und der koloniebildenden Zellen (Abbildung 8.8 auf Seite 118). Aus diesem Ergebnis ergeben sich zwei Schlussfolgerungen. Die erste ist, dass unter den gegebenen Randbedingungen kein Vorteil der perfundierten Kultur zu erkennen ist. Der positive Effekt der Fütterung, der in Abschnitt 4.3 auf Seite 60 nachgewiesen werden konnte, kommt bei der geringen Inokulumsdichte nicht zum Tragen. Auch kommt es zu keinen Problemen in der Sauerstoffversorgung der Zellen. Der Sauerstoffverbrauch ist vielmehr wegen der niedrigen Zellzahl so gering, dass die theoretisch mögliche Sauerstoffbilanzierung im Suspensionsreaktor nicht sinnvoll ist, da die Messgenauigkeit der verwendeten Elektroden nicht ausreicht.

Die zweite Schlussfolgerung ist die, dass die Kultivierung im neuen System keinen negativen Effekt ausübt. Weder das Wachstum der Zellen, noch das Ausdifferenzierungsver-

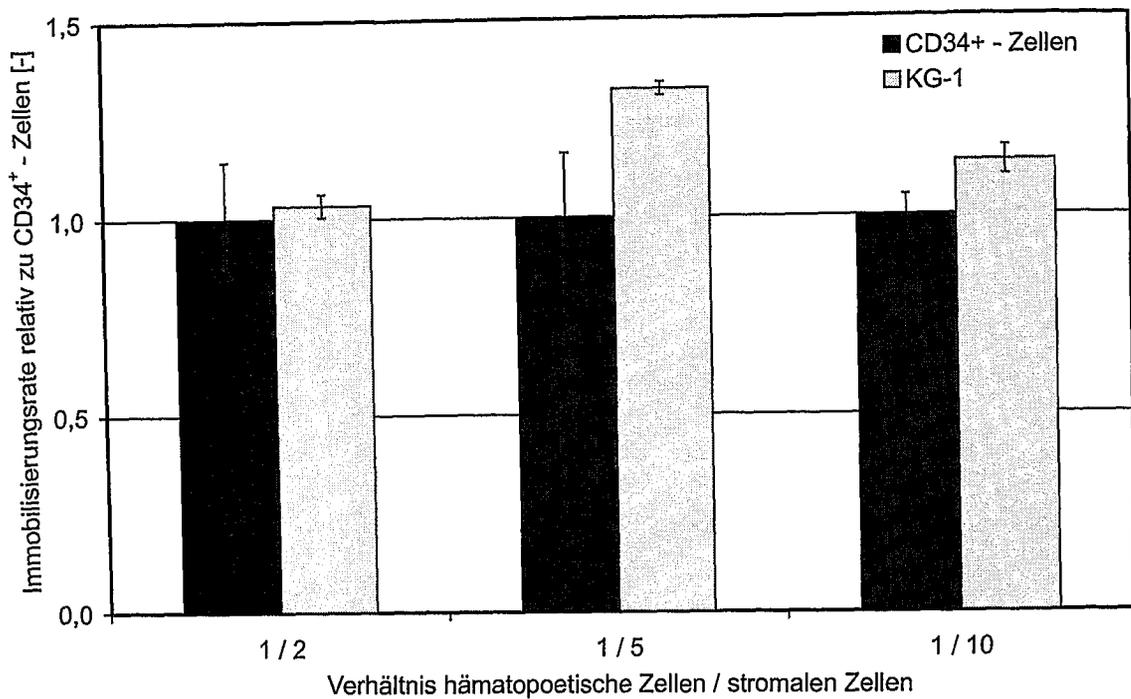


Abbildung 8.5: Die Immobilisierungsrate der Zelllinie KG-1 relativ zu primären Zellen bei verschiedenen Verhältnissen von stromalen zu hämatopoetischen Zellen

halten ist verändert. Es ist keine Schädigung der Zellen durch das Rühren zu erkennen. Es gibt keinen messbaren Zellverlust durch die Zellrückhaltung. Die Kultivierung im neuen Suspensionsreaktor ist den statischen Standardkulturen in den biologischen Aspekten gleichwertig. Sie bietet darüber hinaus aber die ausreichenden Möglichkeiten für klinisch relevante Kulturvolumina.

Die unterschiedliche Expansion der verschiedenen Subpopulationen entspricht dem typischen Verhalten in Suspensionskultur. Die Gesamtzellzahl kann über den gesamten Zeitraum gesteigert werden. Der Anteil der koloniebildenden Zellen nimmt zunächst zu, sinkt aber nach einer Woche wieder ab, so dass in Verbindung mit der Gesamtzellexpansion erst am Tag 10 ein Maximum an koloniebildenden Zellen zu beobachten ist. Die Entwicklung der CD34⁺-Zellen verläuft ähnlich. Da das Inokulum mit einer Reinheit von 99 % ausschließlich aus CD34⁺-Zellen besteht, sinkt der prozentuale Anteil dieser Subpopulation kontinuierlich ab. Wegen der allgemeinen Zellexpansion entsteht trotzdem ein Maximum der CD34⁺-Zellzahl. Dieses ist deutlich niedriger als bei den koloniebildenden Zellen und liegt bereits am Tag 4 vor. Anhand dieser Daten wird die Wichtigkeit der Zielsetzung einer Kultivierung deutlich, durch die erst die optimale Kulturdauer festgelegt werden kann. Die maximale CD34⁺-Zellexpansion erfordert ein Abernten der Kultur an Tag 4, die maximale Expansion koloniebildender Zellen am Tag 10. Möchte man nur MNZ vermehren, ist nach 20 Tagen die größte Zellzahl erreicht.

Der wesentliche Einflussfaktor bei der Suspensionskultur ist die Kombination der Zytokine. Deshalb wurde in einer weiteren Kultivierung mit dem Suspensionsreaktor diese variiert. Die Kulturbedingungen, dargestellt in Tabelle 8.4 auf Seite 118, unterschieden sich von der oben beschriebenen Kultur in der Zytokinkombination und der Inokulumsdichte. Wegen einer größeren Menge an Zellen in der verwendeten Spende konnten zu Beginn der Kultur entsprechend mehr Zellen eingesetzt werden. Statt des Zytokin-Standards 2 wurde

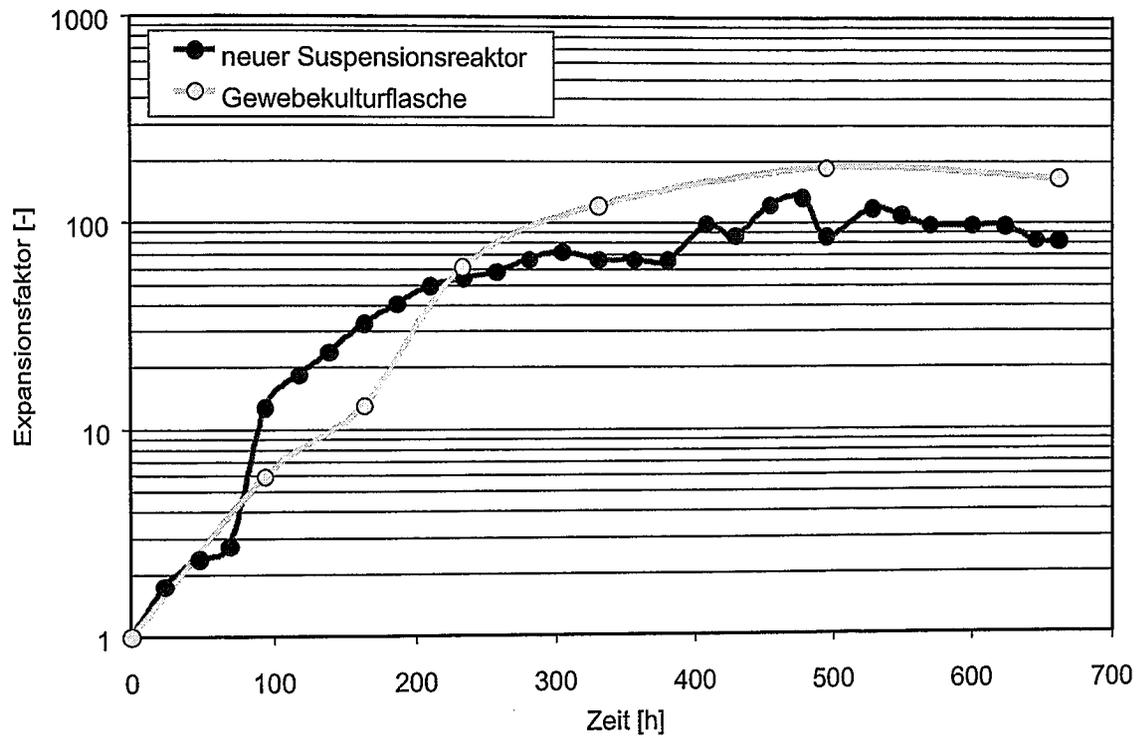


Abbildung 8.6: Die Expansion der MNZ bei der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in perfundierter und statischer Kultur

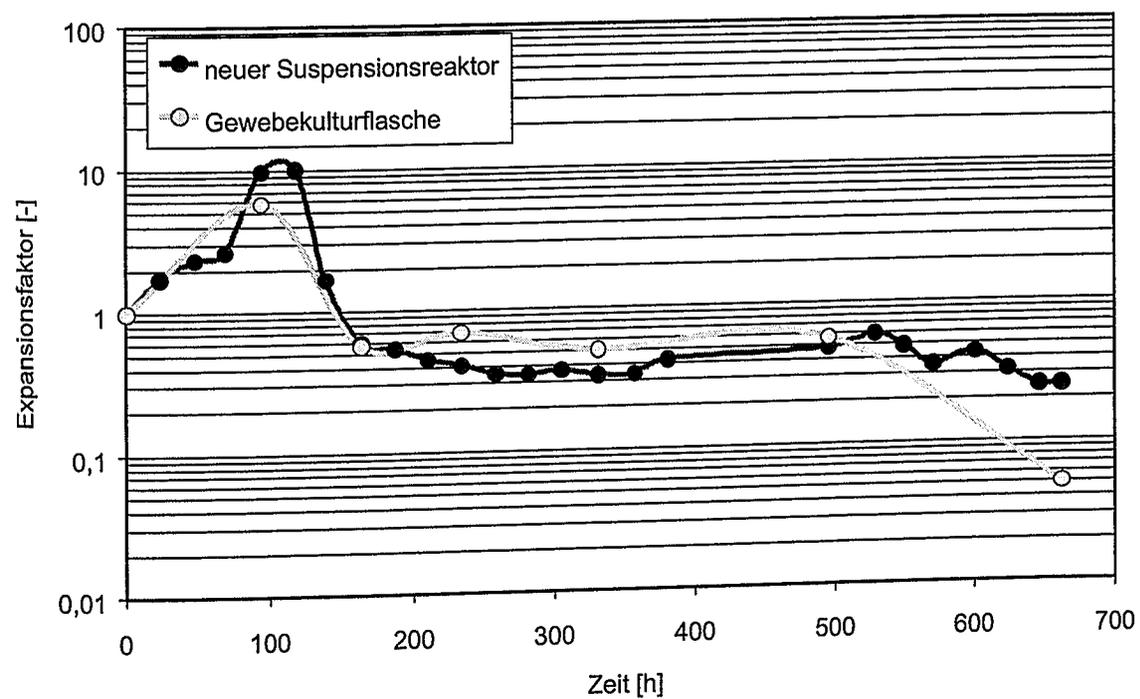


Abbildung 8.7: Die Expansion der $CD34^+$ -Zellen bei der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in perfundierter und statischer Kultur

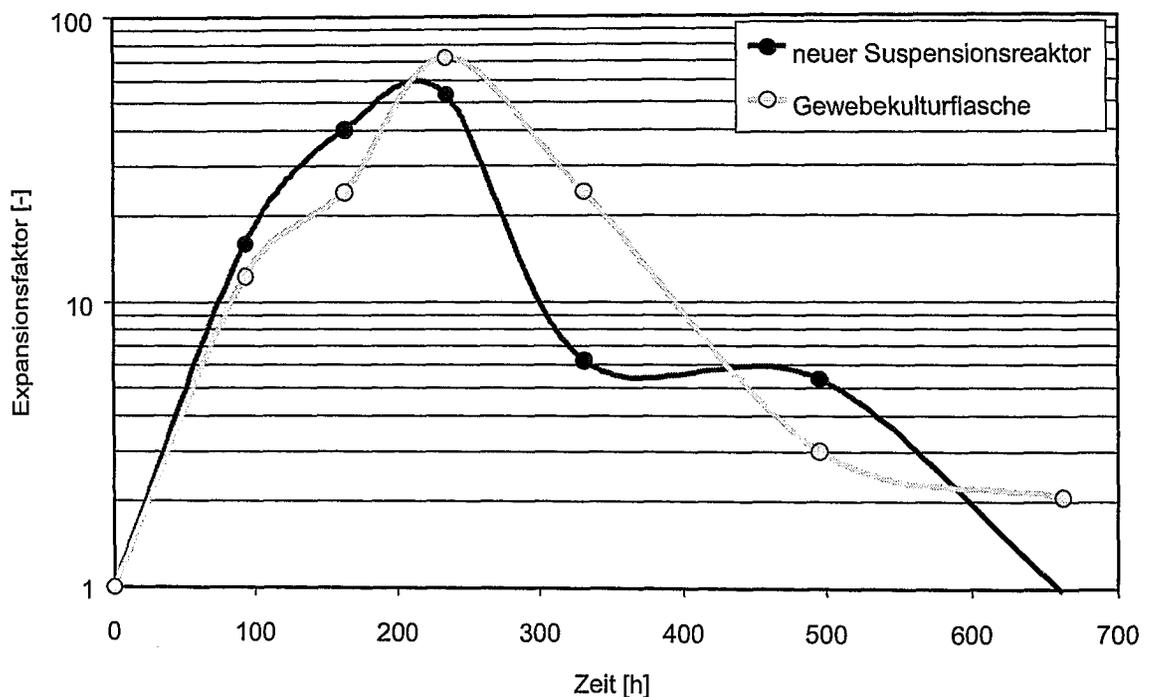


Abbildung 8.8: Die Expansion der koloniebildenden Zellen bei der Kultivierung von CD34⁺-Zellen in perfundierter und statischer Kultur

Tabelle 8.4: Die Parameter der Kultivierung CD34⁺-Zellen im Suspensionsreaktor mit variiertem Medium

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	CellGro SCGM + Zytokin-Standard 3
Kultursystem:	perfundierter Suspensionsreaktor
Kulturdauer:	552 h
Inokulumdichte:	5,7 · 10 ⁴ c/mL in 40 mL
Rührerdrehzahl:	70 U/min

der Zytokin-Standard 3 verwendet. Die Ergebnisse sind im Vergleich zu den oben bereits vorgestellten Ergebnissen des Suspensionsreaktors mit Zytokin-Standard 2 gezeigt.

Abbildung 8.9 auf der nächsten Seite zeigt die Expansion der MNZ, Abbildung 8.10 auf der nächsten Seite die der CD34⁺-Zellen und Abbildung 8.11 auf Seite 120 die der koloniebildenden Zellen. Auffallend ist, dass sich mit der veränderten Zytokinkombination auch bei den MNZ ein Maximum ausbildet. Nach dem zehnten Tag sinkt die Gesamtzellzahl deutlich ab. Es gibt ebenfalls fast keine Expansion der CD34⁺-Zellen, ihre Zahl bleibt für sieben Tage nahezu konstant und fällt dann ab. Allein die koloniebildenden Zellen zeigen qualitativ einen äquivalenten Verlauf zu der Kultur mit dem Zytokin-Standard 2. Quantitativ ist die Expansion der CFC aber um einen Faktor 8,7 größer.

Da bei der Entwicklung des Standards 3 die Zielgröße des verwendeten genetischen Algorithmus die Expansion der CD34⁺-Zellen pro eingesetzter Menge Zytokine war, erscheint das Ergebnis zunächst verwirrend. Im Suspensionsreaktor zeigt der Standard 2 aber eine 7,8fach bessere Expansion der CD34⁺-Zellen, wenngleich unter Verwendung der 2,6fachen Zytokinmenge. Daraus folgt theoretisch ein dreifach höherer Wert der Zielfunktion des genetischen Algorithmus bei Verwendung des nicht optimierten Standards 2. Dieser zeigte sich aber bei der Durchführung des genetischen Algorithmus dem Standard 3 unterlegen.

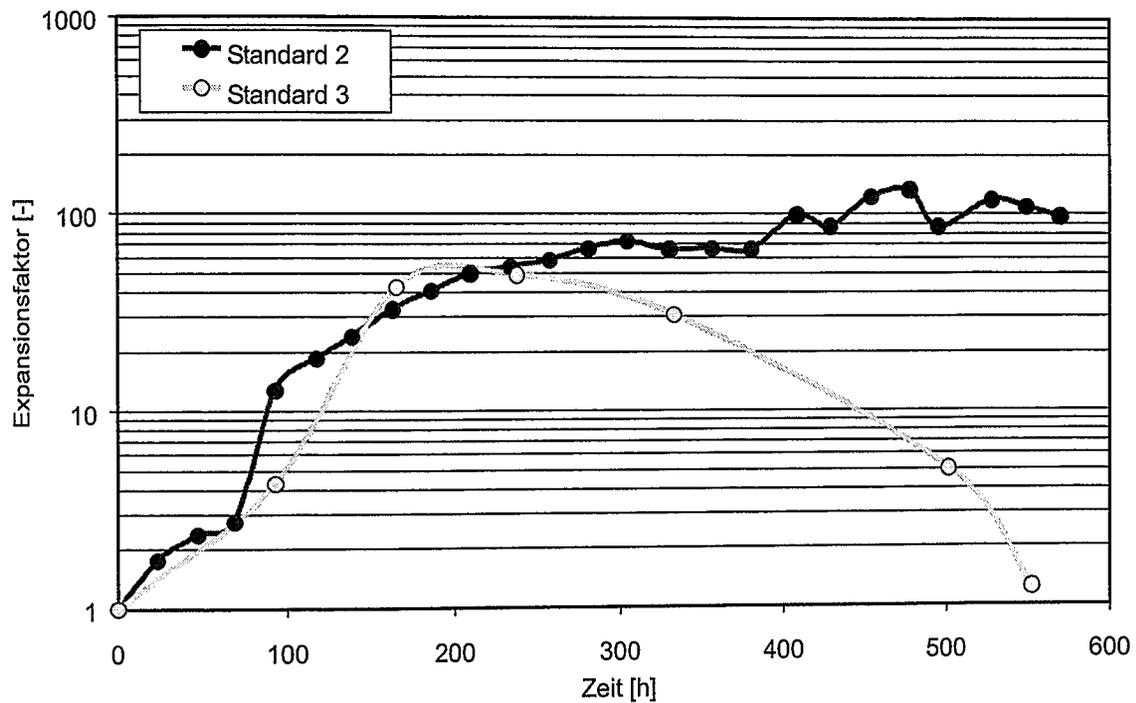


Abbildung 8.9: Die Expansion der Gesamtzellzahl bei der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen

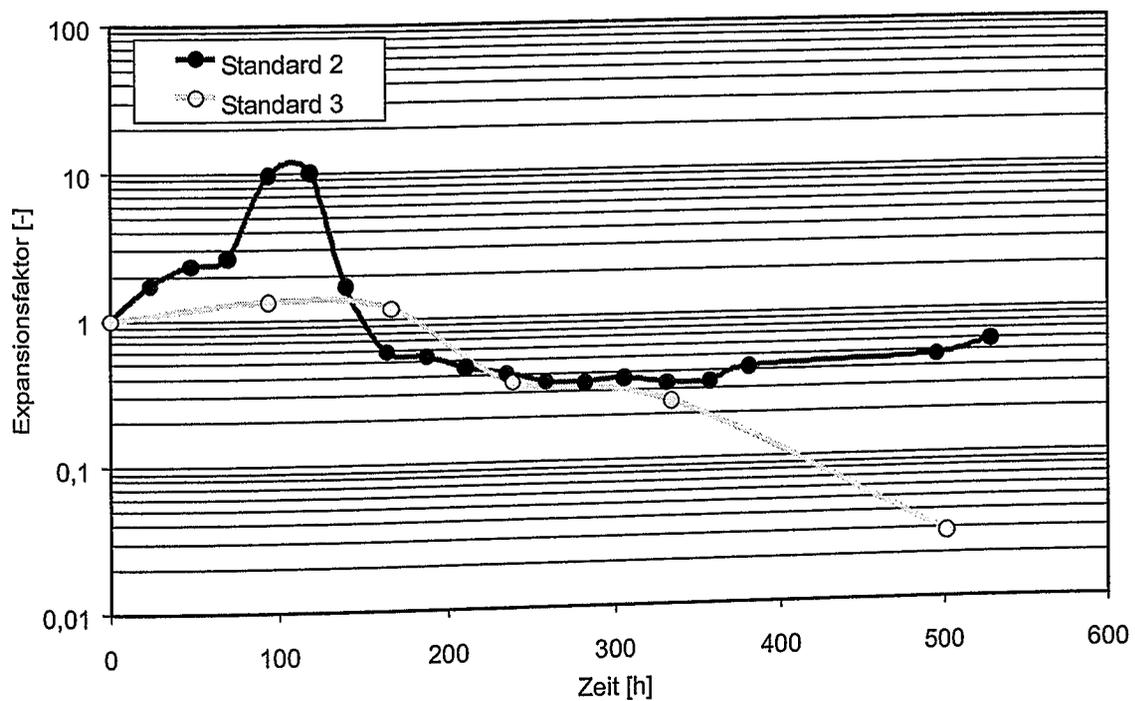


Abbildung 8.10: Die Expansion der $CD34^+$ -Zellen bei der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen

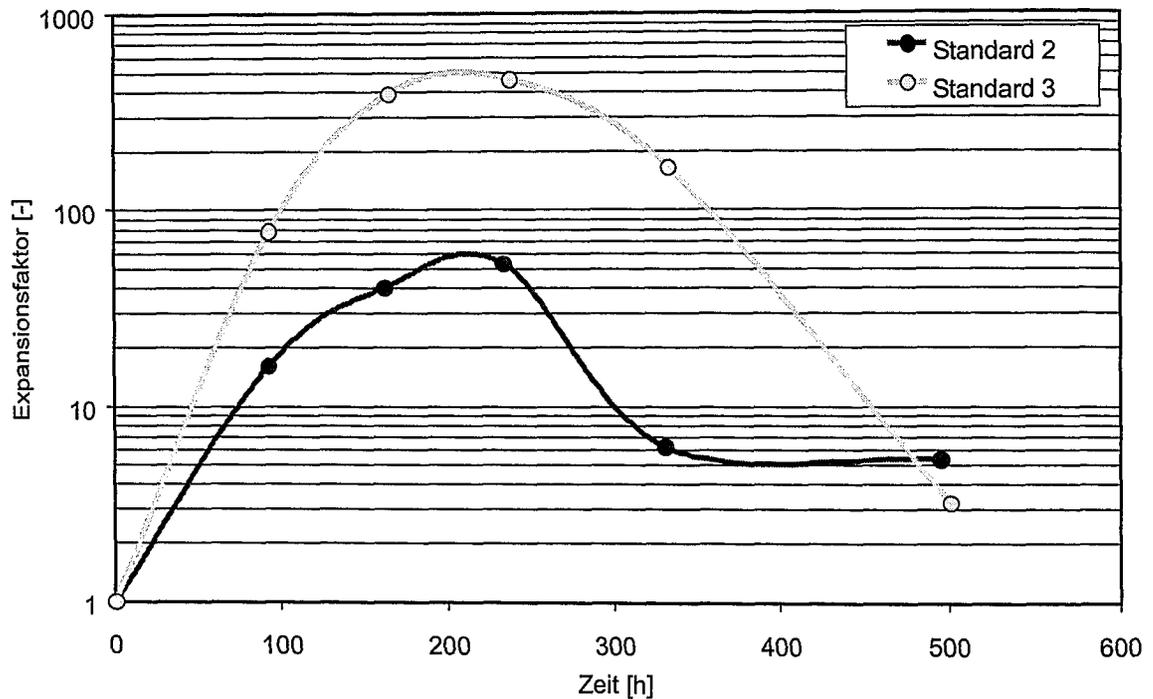


Abbildung 8.11: Die Expansion der koloniebildenden Zellen bei der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in perfundierter Kultur mit unterschiedlichen Zytokinkombinationen

Die Auflösung dieses scheinbaren Widerspruchs liegt in der betrachteten Kulturdauer. Die Kultivierungen im Suspensionsreaktor zeigen deutlich, dass das Maximum der $CD34^+$ -Expansion an Tag 4 liegt. Bei der Zytokin-Optimierung mit dem genetischen Algorithmus wurde aber die Expansion nach sieben Tagen betrachtet. Für die $CD34^+$ -Zellen ist das ein suboptimaler Zeitpunkt. Betrachtet man Tag 7 in Abbildung 8.10 auf der vorherigen Seite, so zeigt sich, dass der optimierte Zytokin-Standard 3 zu diesem Zeitpunkt tatsächlich ein deutlich besseres Ergebnis liefert, da die Expansion der $CD34^+$ -Zellen doppelt so hoch ist. Die Zielfunktion des Algorithmus liegt damit beim Standard 3 um das 5,2fache über dem Standard 2, womit die Optimierung doch bestätigt ist.

Im Reaktor konnte gezeigt werden, dass die optimierte Zytokinkombination keine verbesserte absolute Expansion, sondern nur einen längeren Erhalt der $CD34^+$ -Zellen ermöglicht. Tatsächlich erhöht ist dagegen die Zahl der koloniebildenden Zellen. Dies bestätigt, dass andere frühe Subpopulationen, obwohl sie nicht als Zielgröße des genetischen Algorithmus verwendet wurden, bei der Optimierung der $CD34^+$ -Zellen ebenfalls positiv beeinflusst werden. Dieses konnte bereits während der Optimierung mit dem genetischen Algorithmus beobachtet werden [262].

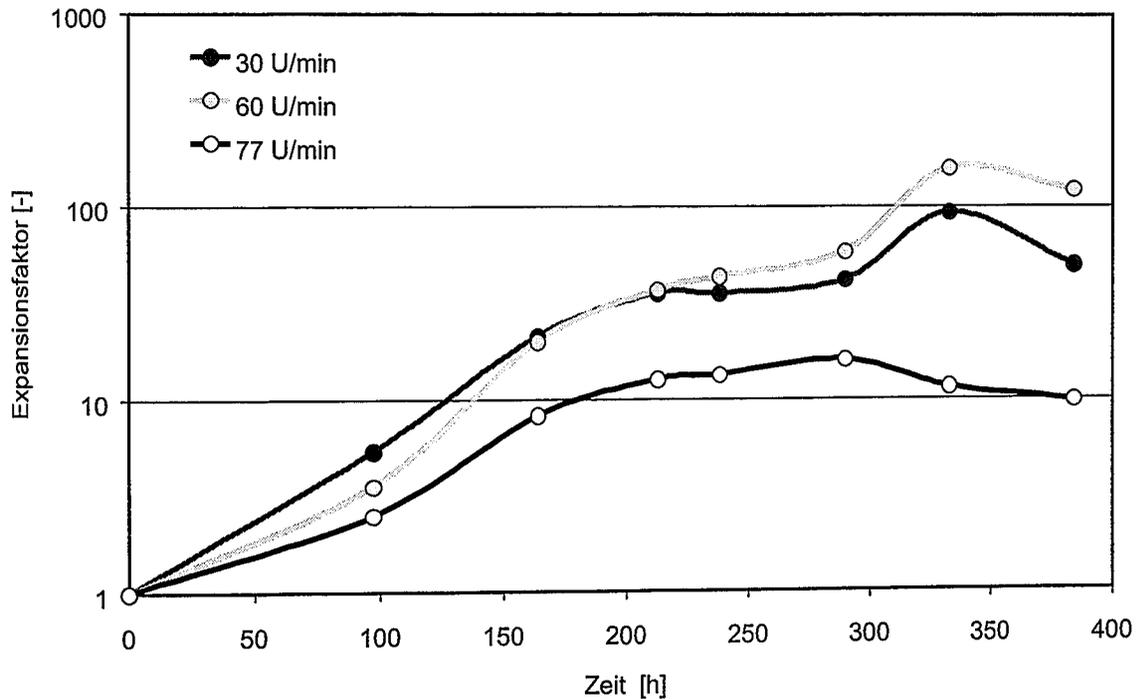
Das Fazit des Vergleichs der Zytokinkombinationen ist erneut die Bedeutung der Definition der Zielgröße der Kultur. Die betrachtete Subpopulation und die Kulturdauer verändern die optimalen Bedingungen. Deutlich konnte zudem der starke Einfluss der gewählten Zytokine auf den Kulturverlauf gezeigt werden.

8.1.2.2 Spinnerkulturen

Die Kultivierungen von $CD34^+$ -Zellen im miniaturisierten Spinner sollten die Ergebnisse aus Abschnitt 7.2 auf Seite 107 für die Zelllinie KG-1 auch für Primärmaterial bestätigen. Die Spinner wurden prinzipiell identisch zu den KG-1 Kulturen betrieben. Eine Ausnahme bildet hier die Inokulumsdichte, die aus Zellmangel wesentlich kleiner war, wodurch ein

Tabelle 8.5: Die Parameter der Kultivierung von CD34⁺-Zellen im Spinner

Zellen:	CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	X-Vivo 10 + Zytokin-Standard 2
Kultursystem:	miniaturisierter Spinner
Kulturdauer:	384 h bzw. 288 h
Inokulumsdichte:	7,61 · 10 ³ c/mL bzw. 1,53 · 10 ⁴ c/mL in 10 mL
Fütterung:	keine

**Abbildung 8.12:** MNZ-Expansion bei verschiedenen Rührerdrehzahlen im Spinner

Nachfüttern entfiel. Die wichtigsten Parameter zeigt Tabelle 8.5.

Im ersten Versuch wurde die Drehzahl der Spinner variiert. Die eingestellten Drehzahlen betragen 30, 60 und 77 U/min. Die Expansion der MNZ ist in Abbildung 8.12 gezeigt, Abbildung 8.13 auf der nächsten Seite zeigt den Verlauf der CFC-Expansion.

Auffällig ist das deutlich schwächere Wachstum der Zellen bei 77 U/min. Die Schädigung der Zellen ist dabei von Beginn an zu beobachten und wirkt sich auf die CFC noch deutlicher aus als auf die Gesamtzellzahl. Bei der Drehzahl von 30 U/min war erneut ein Ansammeln der Zellen unter der Rührwelle zu beobachten. Ein so deutliches Absinken der Wachstumsrate wie bei den KG-1 trat aber nicht auf. Dies ist erklärbar, betrachtet man die erreichten Zellzahlen. Die maximale Zellzahl bei der Kultivierung der CD34⁺-Zellen betrug $7,14 \cdot 10^5$ Zellen. Bis zu dieser Gesamtzellzahl sind in den KG-1 Kulturen ebenfalls keine Limitierungen zu beobachten gewesen. Die Gesamtzellzahl erreichte dort einen Wert von $9,25 \cdot 10^6$ Zellen. Die Tatsache, dass eine Ansammlung von Zellen unter dem Rührer beobachtet werden konnte, legt also die Vermutung nahe, dass auch bei primären Kulturen Diffusionslimitierungen auftreten, wenn höhere Zellzahlen erreicht werden. Darüber hinaus war das Kulturvolumen durch das Nachfüttern bei den KG-1 größer. Der damit verringerte Sauerstoffeintrag ließe die Limitierung bei einer Ansammlung der Zellen noch früher auftreten, falls es sich um eine Sauerstofflimitierung handelt.

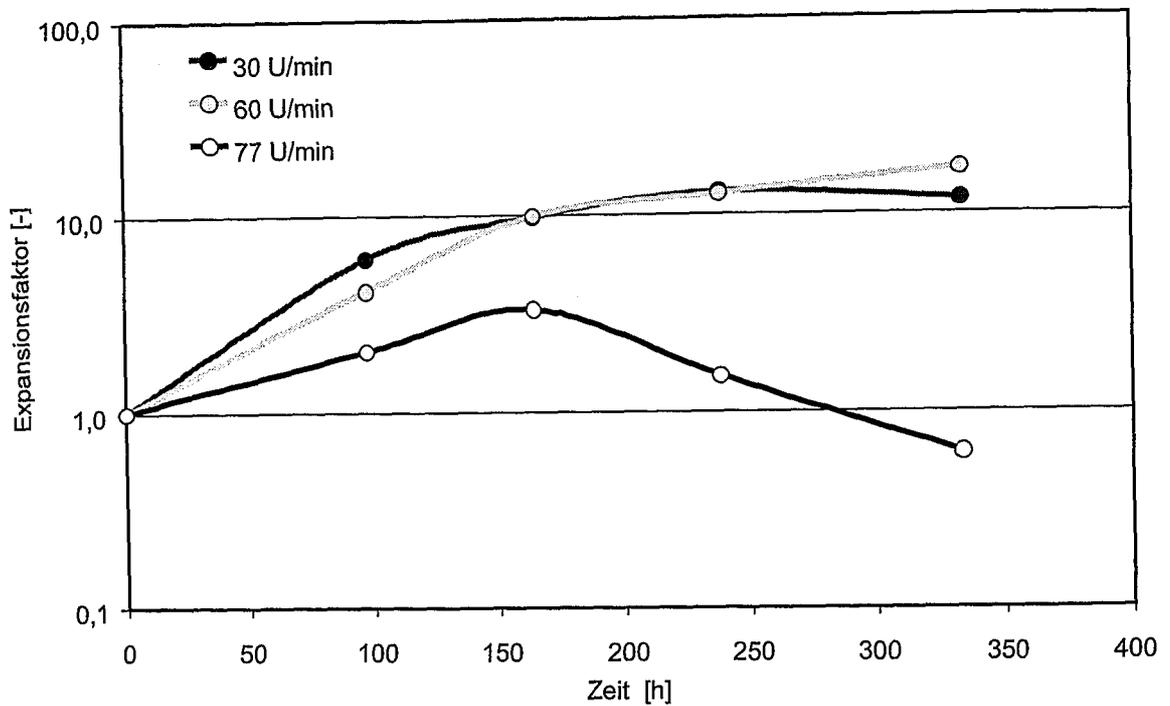


Abbildung 8.13: CFC-Expansion bei verschiedenen Rührerdrehzahlen im Spinner

Die optimale Rührerdrehzahl ist also für primäre CD34⁺-Zellen, wie schon mit der Modellzelllinie ermittelt, 60 U/min. Das Expansionsverhalten der MNZ entspricht sehr genau dem des Suspensionsreaktors, die CFC Expansion liegt dagegen deutlich unter den im Reaktor erreichten Werten. Eine Schlussfolgerung aus dem direkten Vergleich dieser Ergebnisse ist aber wegen der unterschiedlichen Spender nicht möglich. Es wurde daher, wie schon beim Suspensionsreaktor, eine parallele Kultivierung mit einer Gewebekulturflasche als statisches Referenzsystem durchgeführt. Die Versuchsbedingungen sind mit denen des vorangegangenen Experiments in Tabelle 8.5 auf der vorherigen Seite aufgelistet. Die Rührerdrehzahl betrug 60 U/min.

Die Verläufe der Expansion der MNZ und der CFC, beide sind in Abbildung 8.14 auf der nächsten Seite dargestellt, entsprechen gut den vorangegangenen Untersuchungen im Suspensionsreaktor. Wesentlich ist aber, dass im Rahmen der Messgenauigkeit kein Unterschied zwischen dem miniaturisierten Spinner und der Gewebekulturflasche erkennbar ist. Die in diesem Versuch leicht unterschiedliche Expansion der CFC ist durch andere Kultivierungen nicht bestätigt worden (vergleiche Abschnitt 8.1.2.3 auf der nächsten Seite). Es handelt sich um eine statistische Schwankung.

Mit diesem Ergebnis sind zwei wesentliche Punkte gezeigt worden. Zum einen hat der Spinner als System für vergleichende Untersuchungen in gerührter Suspensionskultur im Vergleich zu den statischen Systemen keinen negativen Einfluss auf die Zellen. Gleichzeitig ist damit nachgewiesen, dass die Ergebnisse der Spinner auch auf den Suspensionsreaktor übertragen werden können, da dieser ebenfalls eine äquivalente Zellexpansion wie die statischen Systeme zeigt. Weiterhin sind die Aussagen über den miniaturisierten Spinner, die mit der Zelllinie KG-1 gewonnen wurden, bestätigt worden. Es konnte sowohl die Äquivalenz zur statischen Kultur als auch die optimale Rührerdrehzahl von 60 U/min bestätigt werden. Damit ist auch der Modellcharakter der KG-1 für primäre CD34⁺-Zellen endgültig nachgewiesen.

Vor dem Hintergrund der Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Werkstoffe

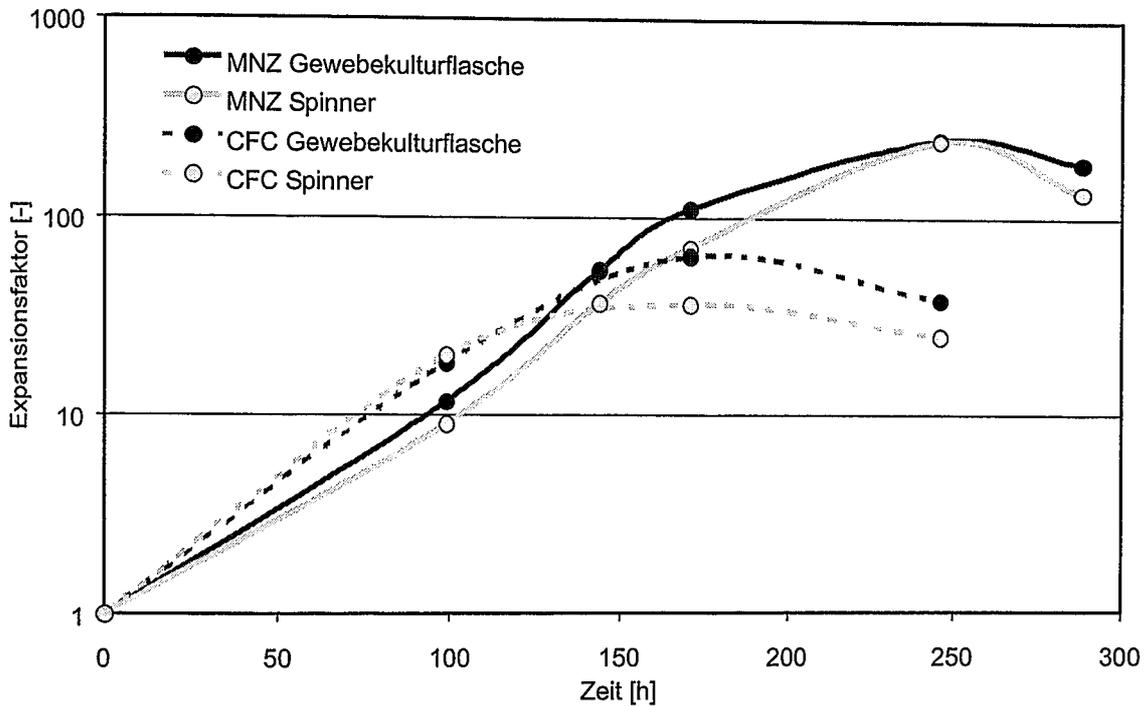


Abbildung 8.14: Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen in statischer und gerührter Kultur

in Abschnitt 4.1.2.2 auf Seite 54 überrascht die Gleichheit der Kultivierung im statischen System aus Polystyrol und dem gerührten Spinner aus Glas. Auf die Abwesenheit des Werkstoffeffekts im technischen Kultursystem wurde in dem entsprechenden Abschnitt bereits hingewiesen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Werkstoffeinfluss von dem Verhältnis von Werkstoffoberfläche zu Kulturvolumen abhängt und dieses bei den hier eingesetzten technischen Systemen so günstig ist, dass es zu keiner Schädigung kommt.

Ein zusätzlicher Nachweis, dass die Werkstoffschädigung vernachlässigt werden kann, wurde mit einer weiteren Vergleichskultur im Spinner durchgeführt. Der schützende Effekt von Serum bei Werkstoffeinflüssen war bereits nachgewiesen worden. Für die Überprüfung, dass das Glas, aus dem die Spinner gefertigt sind, die Zellen nicht wesentlich schädigt, wurde parallel zu der letzten Spinner- und Gewebekulturflaschen-Kultivierung ein weiterer Spinner betrieben. Dieser wurde für zwei Tage mit serumhaltigem Medium (IMDM + 10% FCS) inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und der Spinner exakt gleich dem bereits beschriebenen betrieben. Die Expansionsfaktoren der MNZ und CFC sind in Abbildung 8.15 auf der nächsten Seite dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist kein Unterschied in der Zellexpansion zwischen der mit Serum vorbehandelten und der unbehandelten Kultur zu erkennen. Das gilt auch für die biologische Aktivität, wodurch endgültig die Abwesenheit von relevanten schädigenden Materialeinflüssen bestätigt ist.

8.1.2.3 Ein Systemvergleich

In einem Parallelversuch wurden die potentiell in einem klinischen Protokoll verwendbaren Kultursysteme für die Suspensionskultur verglichen. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit der MainGen Biotechnologie GmbH, Frankfurt/Main durchgeführt. Aus diesem Grund kam eine besondere Zytokin-Kombination zum Einsatz, die mit den anderen Kulturparametern in Tabelle 8.6 auf der nächsten Seite aufgelistet ist und im Folgenden als Standard F bezeichnet wird.

Es wurden parallel ein Suspensionsreaktor (Kulturvolumen: 40 mL), ein miniaturisierter

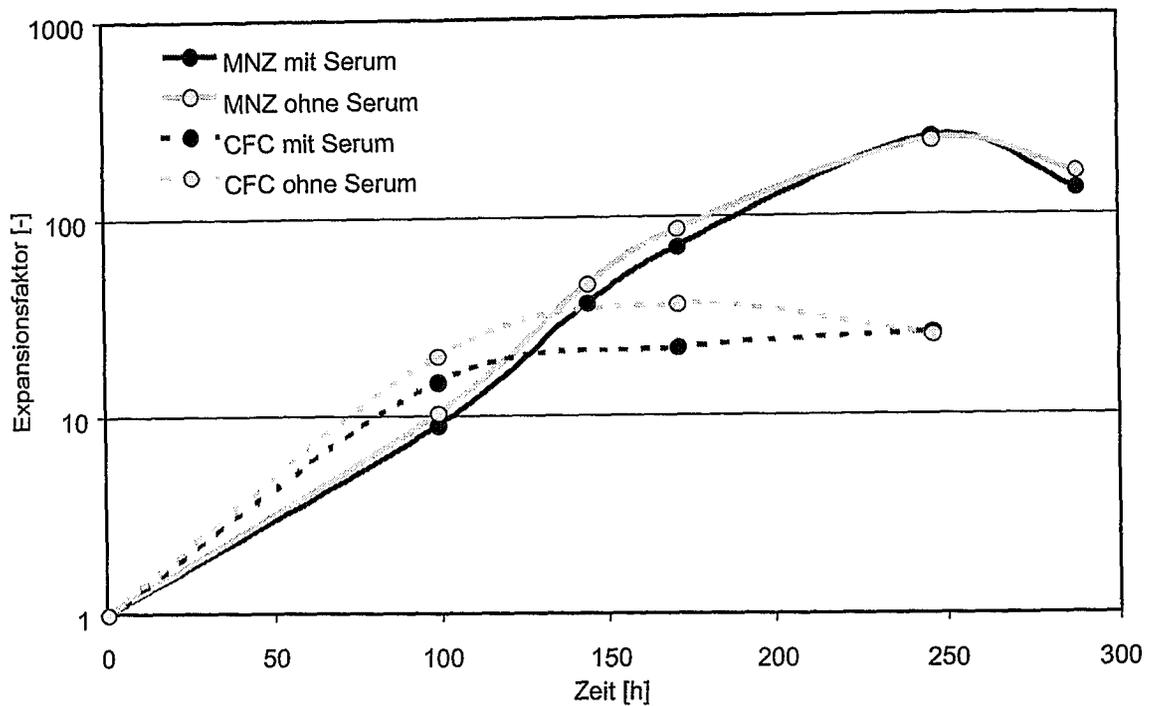


Abbildung 8.15: Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen mit und ohne Vorbehandlung des Spinners mit Serum

Tabelle 8.6: Die Parameter der Kultivierung von $CD34^+$ -Zellen des parallelen Systemvergleichs

Zellen:	$CD34^+$ -Zellen aus Nabelschnurblut
Medium:	X-Vivo 10 + 1 % BSA + 2 mmol/L Glutamin + 50 ng/mL SCF + 10 ng/mL IL-3 + 20 ng/mL TPO + 50 ng/mL FL
Kulturdauer:	7 Tage
Inokulumdichte:	$5 \cdot 10^4$ c/mL
Fütterung:	keine

Spinner (12 mL), drei Kultur-Beutel (je 4 mL) und eine Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit zwölf Vertiefungen (1 mL) inokuliert. Bis auf den Suspensionsreaktor wurden alle Systeme im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) für sieben Tage inkubiert. Die Betriebsweise des Reaktors war identisch mit der in Abschnitt 8.1.2.1 auf Seite 114 beschriebenen. Um die notwendige Zellzahl für das Inokulum zur Verfügung zu haben und um die Spendervariabilität zu mindern, wurde keine Einzelspende verwendet. Vielmehr bestanden die inokulierten Zellen aus einer Mischung von sieben Einzelspenden.

Nach sieben Tagen Kultivierung wurden alle Systeme abgeerntet und mit jeweils 2 mL der Zellsuspension eine bestrahlte NOD/SCID-Maus transplantiert. Für jedes Kultursystem wurden fünf Mäuse verwendet, wobei bei den Kultur-Beuteln die Suspension aus den drei Einzelbeuteln vorher vereint werden musste. Aus der Gewebekulturplatte, als klinisch nicht relevantes System, wurden keine Zellen im Tierversuch verwendet. Von dem Inokulum waren ebenfalls fünf Mäuse transplantiert worden. Mit den übrigen Zellen wurden die restlichen Assays angelegt.

Abbildung 8.16 auf der nächsten Seite zeigt die Expansion der verschiedenen Zellsubpopulationen. Der Suspensionsreaktor zeigt hier deutlich schlechtere Werte als die übrigen Systeme. Grund hierfür war eine Betriebsstörung nach vier Tagen Kultivierung, bei der wegen einer defekten Pumpe über Nacht das Kulturmedium in die gekühlte Flasche der

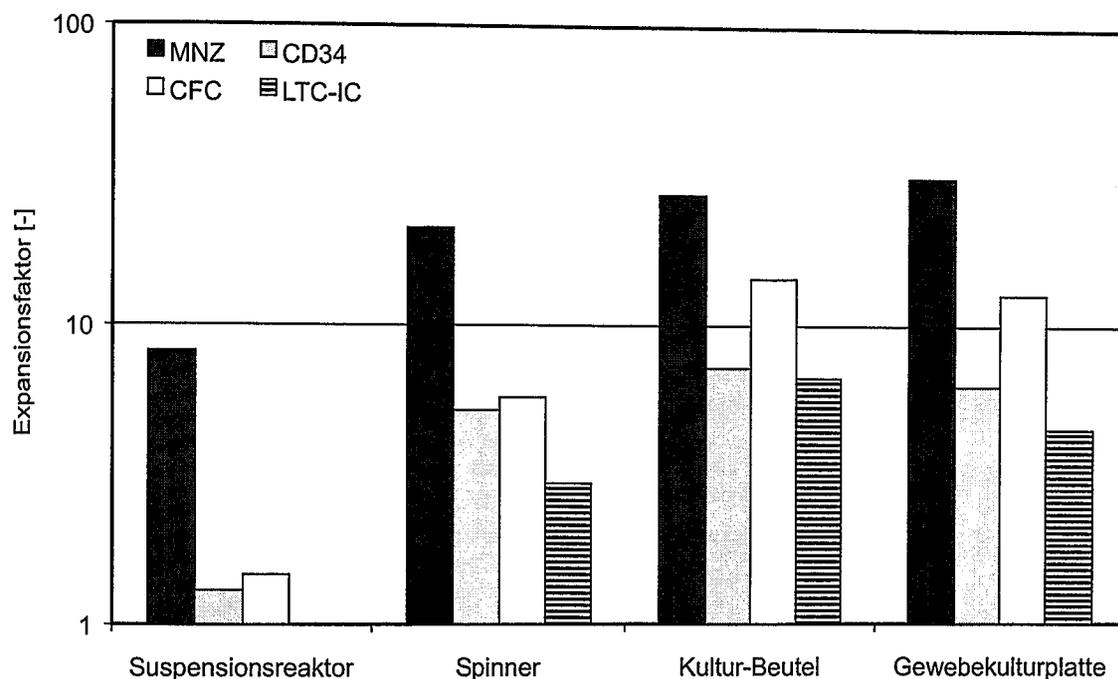


Abbildung 8.16: Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen (1. Experiment)

Medienvorlage zurücklief. Die Zellen konnten zwar wieder in den Reaktor zurückgeführt werden, aber die Proliferation und besonders die biologische Aktivität der Zellen wurden deutlich geschwächt.

Auch bei den anderen Systemen ist die allgemeine Expansion der MNZ niedrig, vergleicht man sie beispielsweise mit den Kultivierungen im Suspensionsreaktor in Abschnitt 8.1.2.1 auf Seite 114. Da sich dieses Verhalten in allen Kultursystemen gleichermaßen zeigt, ist die Ursache bei den Zellen zu suchen. Wahrscheinlich kam es zu Unverträglichkeiten zwischen den Spenden, ein Problem, dass durch die Aufreinigung der Zellen auf die CD34⁺-Fraktion verhindert werden soll, aber grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Expansion der frühen Zellpopulationen ist trotz allem gut. Speziell die Expansion der LTC-IC ist im Vergleich zu Literaturwerten und zu stromahaltigen Kulturen hoch (vergleiche Abschnitt 8.1.1.1 auf Seite 111 und Abschnitt 8.1.3 auf Seite 129). Die verschiedenen Kultursysteme zeigen dabei keinen wesentlichen Unterschied. Der mögliche Eindruck, dass der Spinner die frühen Zellen aufgrund der leicht schwächeren Expansion der CFC und LTC-IC schlechter unterstütze, wird klar von den Daten aus den Tierversuchen widerlegt.

Abbildung 8.17 auf der nächsten Seite zeigt den Anteil der humanen CD45⁺-Zellen in den Mäusen, sechs Wochen nach der Transplantation der Zellen. CD45 ist das allgemeine Merkmal aller Leukozyten. Gemessen wurde sowohl der Anteil im Knochenmark als auch im peripheren Blut. Da mit dem Inokulum und pro Kultursystem jeweils fünf Mäuse beimpft wurden und keine der Mäuse in den folgenden sechs Wochen starb, ist jeder Datenpunkt ein Mittelwert mit der Standardabweichung aus fünf Messungen. Das sehr schlechte Abschneiden des Suspensionsreaktors ist hier erneut deutlich zu erkennen. Der Spinner zeigt sich dagegen absolut gleichwertig mit dem Kultur-Beutel, wodurch die Vermutung, dass der Spinner die Ausdifferenzierung verstärkt, nicht mehr haltbar ist. Allgemein kann man ein wesentlich niedrigeres Niveau an humanen Zellen in den Mäusen feststellen, die mit kultivierten Zellen transplantiert wurden, im Gegensatz zu denen, die die nicht kultivierte Inokulumprobe erhielten. Die Verringerung der Zahl an Stammzellen durch die Kultivie-

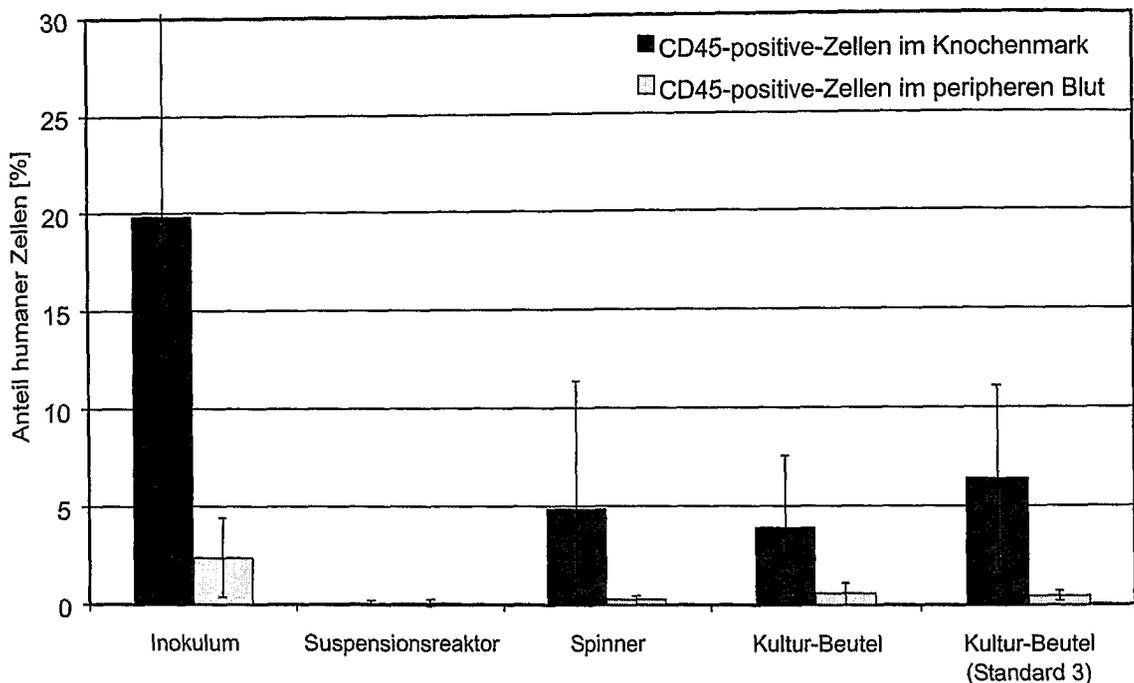


Abbildung 8.17: Anteil der humanen hämatopoetischen CD45⁺-Zellen im Knochenmark und peripheren Blut von NOD/SCID-Mäusen, 6 Wochen nach Transplantation (1. Experiment)

rung ist daher wahrscheinlich. Eine genaue Quantifizierung ist mit NOD/SCID-Mäusen aber erst möglich, wenn man definierte Verdünnungsreihen transplantiert, ähnlich wie es in CAFC- und LTC-IC-Assays durchgeführt wird (siehe Abschnitt 3.5.3.3 auf Seite 44).

Der Tierversuch hat aber eindeutig nachgewiesen, dass auch nach sieben Tagen Kultivierung und unabhängig vom Kultursystem noch MRC in den Kulturen vorhanden sind. Damit konnten die frühesten detektierbaren hämatopoetischen Zellen erfolgreich nachgewiesen werden. Es kommt zwar vermutlich zu einer leichten Ausdifferenzierung, das Potenzial der Zellen reicht dennoch für eine Repopulierung der Mäuse aus.

Zusätzlich zu den beschriebenen Systemen wurden auch Systeme mit dem Zytokin-Standard 3 betrieben. Die Kulturbedingungen waren bis auf die Zytokine identisch mit den bereits beschriebenen und auch die Zellen entstammten derselben Mischung aus sieben Spenden. Der Vergleich fand zwischen einer Gewebekulturflasche (Kulturvolumen: 5 mL), einem miniaturisierten Spinner (12 mL), drei Kultur-Beuteln (je 4 mL) und einer Vertiefung einer Gewebekulturplatte mit zwölf Vertiefungen (1 mL) statt. Ein zweiter Suspensionsreaktor konnte nicht betrieben werden, da die Zellzahl nicht ausreichte.

Die Expansionen sind in Abbildung 8.18 auf der nächsten Seite gezeigt. Erneut sind deutliche Schwankungen zwischen den einzelnen Systemen zu erkennen. Es lässt sich daraus aber kein Trend ermitteln, denn die Proliferation und das Ausdifferenzierungsverhalten waren in allen Systemen gleich.

Auffällig ist darüber hinaus die Tatsache, dass die Expansion der Zellpopulationen mit zwei unterschiedlichen Zytokinkombinationen praktisch identisch ist. Die Mittelwerte der einzelnen Subpopulationen sind in Abbildung 8.19 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Mittelwerte des Standards F wurden dabei ohne die Ergebnisse des Suspensionsreaktors gebildet. Allein bei den LTC-IC ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Hier scheint der Zytokin-Standard 3 die besseren Expansionen zu ermöglichen.

Von den mit dem Zytokin-Standard 3 expandierten Zellen wurden nur im Fall des Kultur-Beutels NOD/SCID-Versuche durchgeführt. Auch die Werte für die MRC liegen demnach

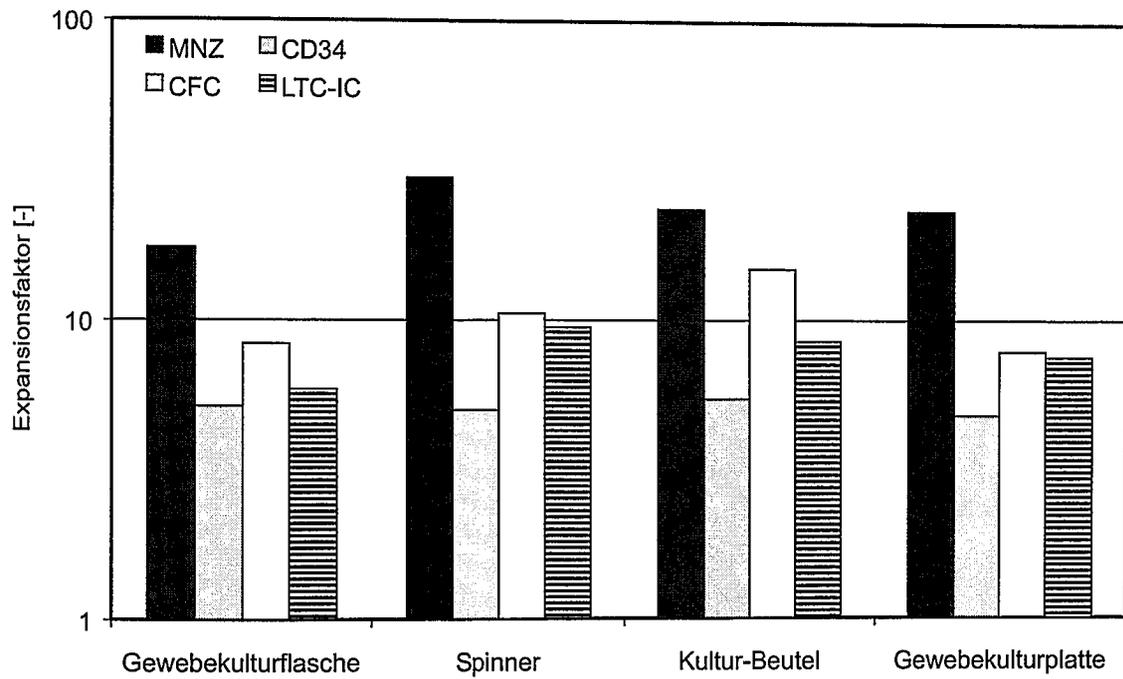


Abbildung 8.18: Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen mit dem Zytokin-Standard 3

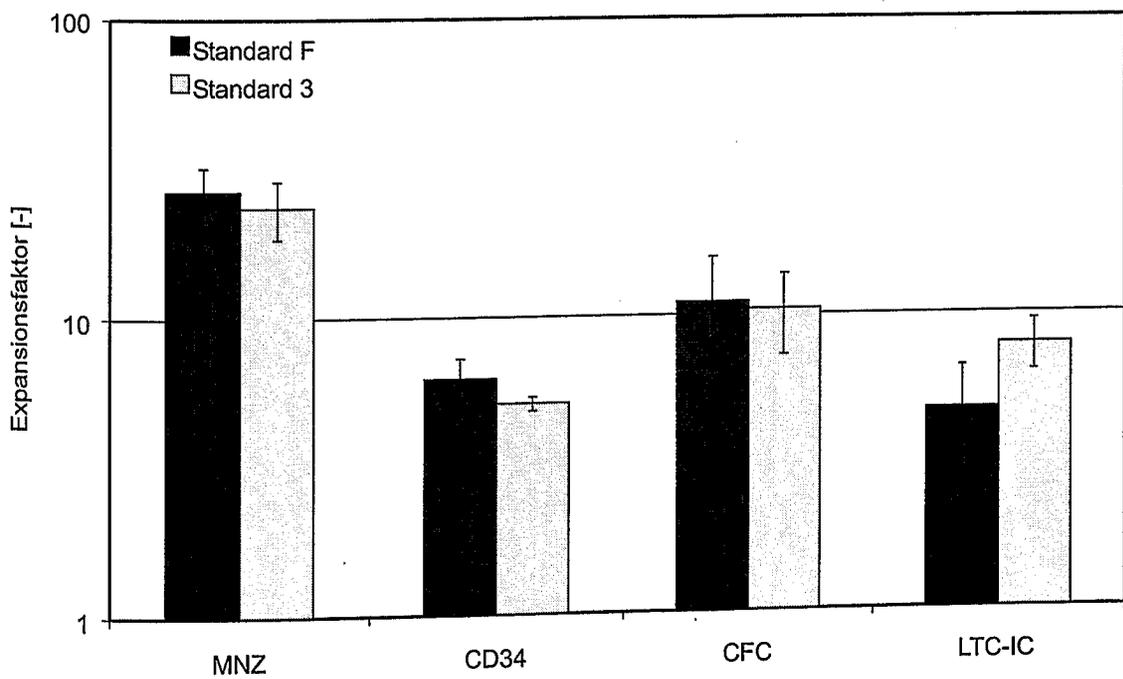


Abbildung 8.19: Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung mit verschiedenen Zytokinkombinationen

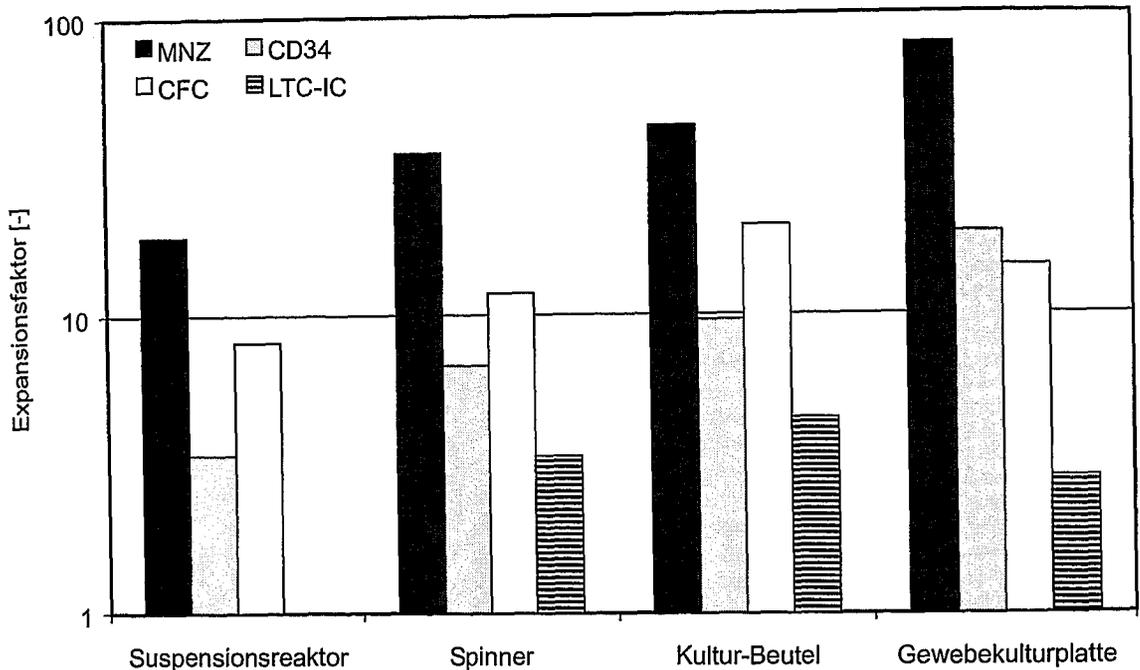


Abbildung 8.20: Expansion verschiedener Zellsubpopulationen nach 7 Tagen Kultivierung in verschiedenen Kultursystemen (2. Experiment)

auf einem identischen Niveau mit dem Standard F. Die Daten sind in Abbildung 8.17 auf Seite 126 mit dargestellt.

Bei der Wiederholung des Versuches wurden keine Änderungen vorgenommen. Das Inokulum bestand aus der Mischung von zehn Spenden. Trotzdem reichte die Gesamtzellzahl nicht aus, um alle Systeme zu inokulieren. Es wurden daher nur die Systeme mit dem Standard F und die Kultur-Beutel mit dem Zytokin-Standard 3 wiederholt. Die Ergebnisse der *ex vivo*-Assays zeigt Abbildung 8.20 und die der NOD/SCID-Versuche Abbildung 8.21 auf der nächsten Seite, die wiederum die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf Tieren darstellen.

Die Expansionen der einzelnen Subpopulationen schwanken zwischen den Kultursystemen beim zweiten Versuch etwas stärker. Im Mittel liegen die Werte leicht höher als beim ersten Versuch. Wesentlich besser war bei der Wiederholung aber der Suspensionsreaktor. Die Vermehrung der MNZ, CFC und CD34⁺-Zellen war nur unwesentlich geringer als in den anderen Kultursystemen. Es gelang allerdings nicht, die Zahl der LTC-IC zu vermehren, sie wurden über die Kulturzeit gerade erhalten. Eine Begründung für diesen Effekt kann nicht angegeben werden.

Die Schlussfolgerung, dass im Suspensionsreaktor die sehr frühen Zellen nicht unterstützt werden, ist aber nicht haltbar. Dies widerlegen die NOD/SCID-Versuche. Hier sieht man zunächst, dass die Repopulation der Mäuse allgemein wesentlich besser war, so dass im Knochenmark der Mäuse sogar relevante Mengen humaner CD34⁺CD45⁺-Zellen detektiert werden konnten. Zwischen den Kultursystemen sind erneut keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Auch die Zellen aus dem Suspensionsreaktor enthielten eindeutig MRC, weshalb die fehlende Expansion der LTC-IC nicht mit einer Ausdifferenzierung zu erklären ist.

Der Kultur-Beutel, bei dem mit dem Zytokin-Standard 3 kultiviert wurde, zeigte erneut die gleichen Werte wie die Zellen der Kulturen mit dem Standard F. Beispielhaft sind dazu die NOD/SCID-Ergebnisse in Abbildung 8.21 auf der nächsten Seite gezeigt.

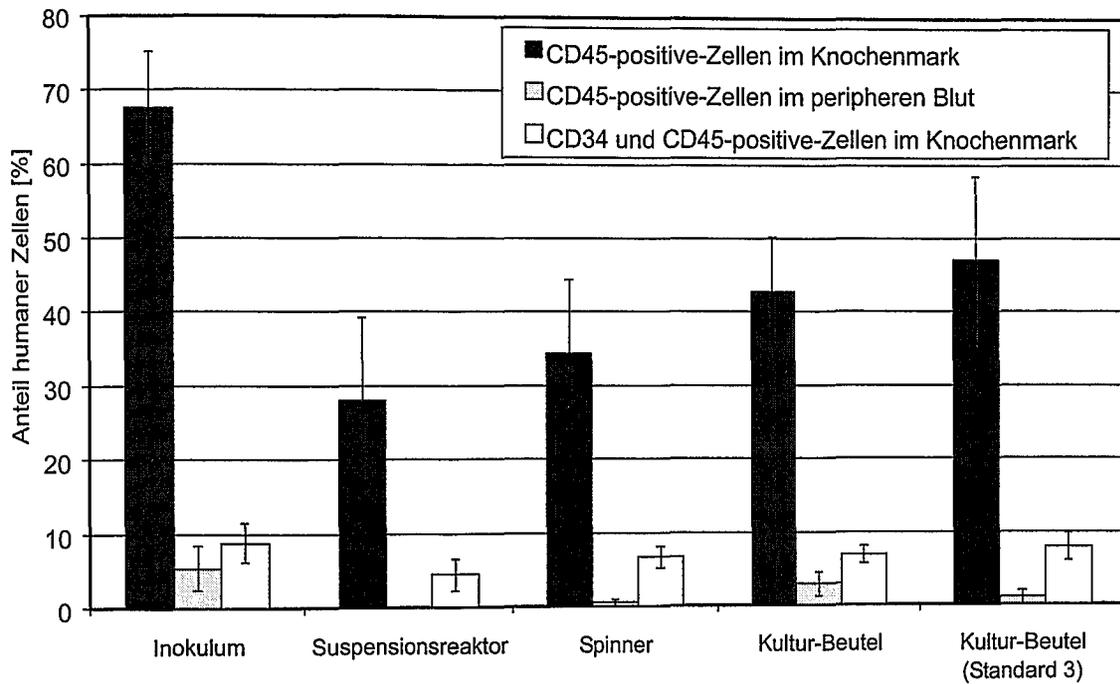


Abbildung 8.21: Anteil der humanen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark und peripheren Blut von NOD/SCID-Mäusen, 6 Wochen nach Transplantation (2. Experiment)

Allgemein entspricht die Expansion der Zellen und ihrer Subpopulationen eher den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Resultaten. Dass es sich bei dem deutlichen quantitativen Unterschied zwischen den beiden identischen Experimenten um eine Schwankung handelt, die durch die Zellen verursacht wurde, zeigt die Repopulation der NOD/SCID-Mäuse durch die beiden Inokula. Bei einem völligen Ausgleich von Spendervariabilitäten und ohne schädliche Zell-Zell-Interaktionen hätte der Anteil an humanen Zellen in den Mäusen identisch sein müssen.

Zu keinem Zeitpunkt der Kultur trat in einem der Systeme eine Limitierung auf. Dies entspricht den Beobachtungen in Abschnitt 4.3 auf Seite 60, wo auch bei höherer Inokulumsdichte erst eine Limitierung nach Tag 7 beobachtet werden konnte. Die kritischen Aminosäuren Serin, Asparagin und Glutamin blieben bei dem vorliegenden Experiment immer über mindestens 40 % ihres Ausgangswertes. Die zellspezifischen Verbrauchsraten entsprachen denen aus den Fütterungsversuchen, erneut waren Serin, Asparagin und Glutamin, die am deutlichsten reduzierten Aminosäuren.

8.1.3 Vergleich und Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Abschnitt verdeutlichen, dass es nur sehr schwer möglich ist, absolute quantitative Daten zu generieren. Die Spendervariabilität ist sehr hoch, und das Mischen von mehreren Spendern kann zu negativen Wechselwirkungen führen. Reproduzierbare qualitative Aussagen sind dagegen gut möglich. Dies zeigten bereits die Ergebnisse in Kapitel 4 auf Seite 53 und es wird in diesem Kapitel erneut bestätigt. Es ist daher wichtig, bei jeder Kultivierung einen Standard zu integrieren. In dieser Arbeit waren das die Gewebekulturflaschen. Erst so sind viele Einflussfaktoren in vergleichbarer Form zu untersuchen. In der Literatur ist ein solcher Standard nicht verbreitet, was einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen erschwert.

8.1.3.1 Die grundlegende Kultivierungsstrategie

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen zur Fütterungsstrategie (Abschnitt 4.3 auf Seite 60), die Kultivierungen im kontrollierten Suspensionsreaktor und die im miniaturisierten Spinner aus diesem Kapitel, so kann eine klare Schlussfolgerung gezogen werden. Das Füttern der Kultur und damit auch die Perfusion ist zunächst nur dann sinnvoll, wenn hohe Zelldichten von über $1 \cdot 10^6$ c/mL erreicht werden. Dabei ist es unerheblich, mit welcher Zelldichte die Kultivierung gestartet wird.

Aufgrund des mangelhaften Wissens über die Zellen sind zum heutigen Zeitpunkt keine wesentlich größeren Expansionen früher hämatopoetischer Zellen möglich, als in dieser Arbeit erreicht wurden (siehe dazu Abschnitt 8.1.3.2 auf der nächsten Seite). Die Berichte über wesentlich höhere Expansionsraten [54, 80, 178, 212, 213, 214, 303] gehen von Langzeitkultivierungen über einen Zeitraum von bis zu einem halben Jahr aus. Solche Kultivierungen sind zwar biologisch interessant, für eine klinische Anwendung wegen ihrer Dauer aber irrelevant.

Der kontrollierte Suspensionsreaktor wurde mit dem Ziel ausgelegt, ausgehend von einer sehr kleinen Zahl an Zellen, Raum für eine möglichst hohe Expansion zu bieten. Hohe Expansionsraten erfordern eine Fütterung, weshalb der Reaktor die Möglichkeit zur Perfusion bietet. Bei den geringen Expansionen, die bei den frühen hämatopoetischen Zellen heute erreicht werden, ist noch immer eine reine Batch-Kultur möglich. Die Möglichkeiten des Reaktors kommen also in dieser Anwendung noch nicht vollständig zum Tragen. Dabei bleibt aber die Frage offen, ob sich bei längerer Kulturdauer eine frühe Perfusion positiv auswirkt. Eine frühe Fütterung wurde in mehreren Untersuchungen als wichtiger Schritt für den langfristigen Erhalt früher Zellen beschrieben [79, 246, 234].

Neben der Expansion der Zellen ist eine zweite Möglichkeit, weshalb eine Perfusion notwendig werden kann, der mögliche Zerfall der Wachstumsfaktoren. Es gibt deutliche Hinweise, dass sich die einzelnen Zytokine in ihrer Stabilität stark voneinander unterscheiden und zum Teil mit Halbwertzeiten von nur wenigen Tagen zerfallen. Die Stabilität von Zytokinen unter Kulturbedingungen ist zwar als Problem bekannt [117], ist aber bisher nicht untersucht worden. Nur in einer perfundierten Kultur können konstante Kulturbedingungen gewährleistet werden, besonders da die physikalische Stabilität der Zytokine im Gegensatz zum Verbrauch unabhängig von den Zellen und der Zelldichte ist. Anders als die oben behandelte Fütterung von Nährstoffen ist das Problem des Zerfalls nicht durch kleine Inokula lösbar oder sogar nur beeinflussbar.

Während die Perfusion erst bei gesteigertem Wissen über die Zellen gezielt genutzt werden kann, können schon heute die Möglichkeiten der kontrollierten Kultur sinnvoll eingesetzt werden. Es ist vielfach festgestellt worden, dass grundlegende Parameter, wie der pH-Wert oder der Sauerstoffpartialdruck, einen großen Einfluss auf die Kultivierung hämatopoetischer Zellen haben (vergleiche Abschnitt 2.5.3 auf Seite 18). Nur mit einer entsprechenden Mess- und Regelungstechnik ist eine Kultivierung möglich, bei der die physikalischen Parameter stabil in dem notwendigen engen Rahmen kontrolliert werden können.

Allerdings sind die einfachen Standardtechniken der Zellkultur so ausgereift, dass die wesentlichen Parameter, solange die Zelldichten nicht zu hoch werden, auch ohne Mess- und Regeltechnik in Bereichen bleiben, die zwar das Ausdifferenzierungs-Muster beeinflussen, aber keine letalen Schäden hervorrufen. Das erklärt das Ergebnis der bisher vorgestellten Kultivierungsdaten, die auf eine Austauschbarkeit der Kultursysteme hinweisen.

Die vielen parallelen Kultivierungen zeigen deutlich, dass es zunächst keinen Unterschied macht, welches System verwendet wird, solange es nicht zu erheblichen Schädigungen oder Limitierungen der Zellen kommt. Eine Entscheidung über das zu verwendende System muss

also anhand von anderen Randbedingungen getroffen werden. Die Vorteile der ungerührten Systeme, wie Gewebekulturflaschen und Kultur-Beutel, sind die einfache Handhabung und die Tatsache, dass es sich um Einwegartikel handelt. Nachteilig sind die schlechte Scale-up-Fähigkeit und die schlechte Möglichkeit, die Kultur kontrolliert zu betreiben. Der in dieser Arbeit entwickelte miniaturisierte Spinner bildet ein Bindeglied zwischen den ungerührten Systemen und dem kontrollierten Bioreaktor. Er hat prinzipiell die gleichen Vor- und Nachteile der ungerührten Systeme, ist aber wieder verwendbar und ermöglicht eine gerührte Kultur, mit der sich die Gefahr einer Sauerstofflimitierung verringert.

Der kontrollierte Suspensionsreaktor bietet ein großes und flexibles Kulturvolumen in einem einzelnen, geschlossenen Gefäß und die Möglichkeit der vollständig kontrollierten Kultivierung. Letzteres kann dann insofern auch nachteilig sein, da es naturgemäß das System komplexer in der Handhabung macht und ein gewisses Maß an Wartung erfordert, da es sich um kein Einwegprodukt handelt.

In diesem Rahmen muss für jede Anwendung genau abgewogen werden, welche Anforderungen die Kultivierung stellt und welche besonders personellen Möglichkeiten bestehen. Danach gilt es, ein passendes System zu wählen. Grundsätzlich scheint dabei in der klinischen Praxis die Tendenz zu herrschen, eher ein schlechteres Kulturergebnis zu akzeptieren, wenn dafür das Kultursystem in der Handhabung einfach ist, als umgekehrt.

8.1.3.2 Ein Vergleich mit bestehenden Systemen

Ein Vergleich der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Kulturen mit Daten aus der Literatur ist sehr schwierig. In Abschnitt 2.5.3 auf Seite 18 wurde bereits die große Variabilität der beschriebenen Kulturbedingungen besprochen. Sinnvolle Vergleichsdaten können nur aus siebentägigen Kultivierungen stammen, die von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut ausgegangen sind und mit serumfreiem Medium gearbeitet haben. Diesen Ansprüchen genügen einzig zwei Untersuchungen von KÖGLER, der die Zellen in handelsüblichen Spinnern beziehungsweise in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen expandierte [112, 113]. Vergleicht man, wie in Abbildung 8.22 auf der nächsten Seite, diese Daten mit den erreichten Expansionen der vorliegenden Arbeit, erkennt man, dass die Werte aus der Literatur einen deutlichen Unterschied zwischen dem gerührten und ungerührten System zeigen. Sowohl der Suspensionsreaktor als auch der miniaturisierte Spinner zeigen deutlich bessere Expansionen als der Spinner aus der Literatur und sind eher der statischen Kultur gleichzusetzen. Letzteres wird auch durch die Tatsache gestützt, dass äquivalentes Wachstum der Zellen in gerührter und statischer Kultur für die Systeme dieser Arbeit nachgewiesen worden ist. Es kann vermutet werden, dass die Spinnerkulturen von KÖGLER eine systematische Schwäche hatten.

Allein eine Vermehrung der LTC-IC ist im Suspensionsreaktor bisher noch nicht nachgewiesen. Wie oben bereits gezeigt, ist diese Tatsache in Anbetracht der nachgewiesenen MRC aber von untergeordneter Bedeutung.

Die Daten von KÖGLER stellen einen Mittelwert aus sieben Versuchen dar. Eine so große Anzahl von Experimenten für eine einzelne Versuchsbedingung ist für die neuen Kultursysteme aus dieser Arbeit noch nicht durchgeführt worden. Die gezeigten Daten stellen daher jeweils die maximal erreichten Werte dar. Es ist selbstverständlich denkbar, dass bei einer größeren Zahl an Wiederholungsversuchen ein Mittelwert nach unten korrigiert werden muss. Unabhängig von diesen Überlegungen muss man berücksichtigen, dass KÖGLER ein anderes Medium (Myelocult H5100) und insbesondere eine andere Zytokinkombination (FL, SCF, IL-3) verwendete. Der hier durchgeführte Vergleich ist demnach zwar möglich, aber es differieren wesentliche Parameter stark, so dass keine absoluten Aussagen getroffen werden können. Das Fazit ist aber, dass mit den neuen Kultursystemen mindestens dem

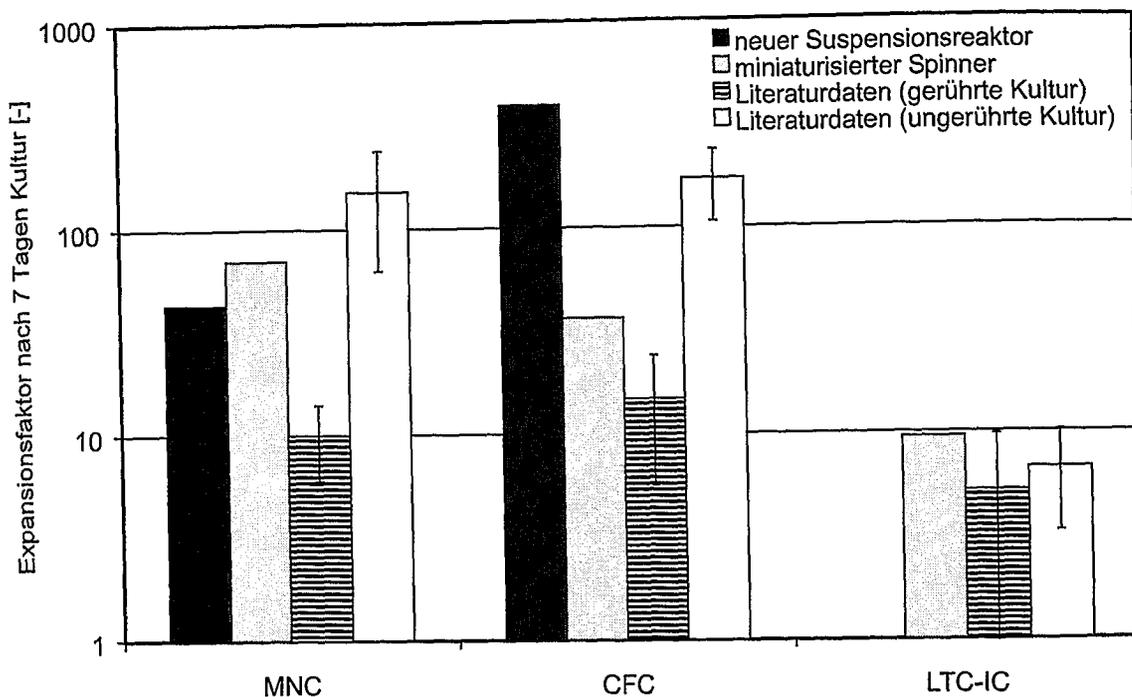


Abbildung 8.22: Vergleich zwischen Daten dieser Arbeit und Literaturwerten der Zellexpansionen verschiedener Subpopulationen nach sieben Tagen Kultivierung

Stand der Forschung entsprechende Ergebnisse erzielt wurden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse der NOD/SCID-Versuche stellen die erste Untersuchung dar, in der gezielt verschiedene Kultursysteme verglichen wurden. Das Ergebnis zeigt einheitlich, dass einerseits die Art des Kultursystems keinen bedeutenden Einfluss auf die Kultivierung hat, andererseits die neuen Systeme den klassischen, etablierten Techniken der Zellkultur ebenbürtig sind.

Für die NOD/SCID-Versuche ist es noch schwieriger, relevante Vergleichsdaten anzugeben. Der Assay selbst erlaubt nur sehr grobe quantitative Aussagen. So betrug der Anteil der humanen $CD45^+$ -Zellen im Knochenmark der Mäuse im Fall der Transplantation kultivierter Zellen zwischen 25 und 50 % des Anteils bei der Transplantation unkultivierter Zellen, also des Inokulums. Im Vergleich dazu konnte in einer Studie von MÖBEST und Mitarbeitern bei statisch kultivierten Zellen maximal 10 % der Repopulationsfähigkeit im Vergleich zum Inokulum erhalten bleiben [176]. Andere Autoren konnten nach einwöchiger Kultur keine Fähigkeit zur Repopulation mehr nachweisen [13, 139]. Mit Zellen aus Nabelschnurblut, die in dem kontrollierten AastromReplicell-System in serumhaltigem Medium kultiviert wurden, konnte ein durchschnittlicher Anteil von 22,4 % humaner Zellen im Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen nachgewiesen werden [67]. Allerdings wurde in 8 von 13 transplantierten Mäusen überhaupt keine Repopulierung festgestellt, oder die Mäuse starben vor Ablauf der sechswöchigen Versuchszeit. In den Versuchen dieser Arbeit zeigten alle Mäuse eine Repopulierung und keine Maus verstarb vorzeitig.

8.2 Kultivierung ausdifferenzierter Zellen am Beispiel der T-Lymphozyten

Neben der Expansion der frühen hämatopoetischen Zellen ist auch die Generierung einer großen Zahl ausdifferenzierter Zellen von klinischer Bedeutung. Als beispielhafte Anwendung des neuen Suspensionsreaktors wurde die Expansion von humanen T-Lymphozyten gewählt. Die T-Lymphozyten nehmen im Rahmen von Immuntherapien eine Schlüsselstel-

Tabelle 8.7: Die Parameter der Kultivierung von T-Lymphozyten

Zellen:	MNZ aus peripherem Blut
Medium:	RPMI 1640 + 10 % hitzeinaktiviertes FCS + 100 U/mL IL-2
Kultursystem:	perfundierter Suspensionsreaktor und 20 L-Rührkessel
Kulturdauer:	456 h
Inokulum:	$2,6 \cdot 10^7$ Zellen

lung ein (vergleiche Abschnitt 2.4.3 auf Seite 14). Bei richtiger Stimulation können sie sich um sieben bis acht Zehnerpotenzen vermehren [87]. Diese Expansionsfähigkeit ist wesentlich höher als die der hämatopoetischen Progenitorzellen. Im Gegensatz zu der Kultivierung der Vorläuferzellen können dadurch die Vorteile eines perfundierten Kultursystems zum Tragen kommen.

Im Forschungsbereich sind statische Kleinstsysteme, wie Gewebekulturplatten, Standard. Für die klinische Anwendung werden aber große Zellzahlen benötigt, die nur in Reaktoren mit mehreren Liter Volumen hergestellt werden können (vergleiche Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23). Der perfundierte Suspensionsreaktor schließt die Lücke zwischen den beiden Systemen. Der Reaktor hat dabei den Vorteil, dass er einerseits schon in sehr kleinen Volumina eine kontrollierte Kultur ermöglicht, wie sie ansonsten erst in einem Großsystem durchgeführt werden könnte, andererseits kann man mit nur einer Zwischenkultivierung von einem Kleinstsystem in einen 20 L-Rührkessel gelangen. Durch die große Expansionsmöglichkeit der Zellen ist ein mehrfaches Umsetzen der Kultur in Systeme steigender Größe nicht notwendig.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kultivierung¹ ging von MNZ aus peripherem Blut aus. Von diesen Zellen trugen etwa 60 % das Oberflächenmolekül CD3, das allgemeine Merkmal der T-Lymphozyten. 38 % der gesamten Zellen gehörten zu den CD4⁺-Lymphozyten (T-Helferlymphozyten), 18 % zu den CD8⁺-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten). Die grundlegenden Parameter der Kultivierung sind in Tabelle 8.7 dargestellt. Vor der Expansion der Zellen wurden die Lymphozyten aktiviert. Dazu wurden die Zellen für vier Tage in einer Gewebekulturflasche zusammen mit einem immobilisierten monoklonalen anti-CD3-Antikörper und einem löslichen monoklonalen Antikörper gegen CD28 inkubiert. Diese Art der Anregung ist unspezifisch, weshalb ein großer Teil der Lymphozyten angesprochen wird [87].

Nach dieser Stimulierung der Zellen, währenddessen die Zellen nicht nennenswert proliferieren, wurde der neue Suspensionsreaktor mit einer Zelldichte von $3,8 \cdot 10^5$ c/mL in 100 mL inokuliert. Die Kultur wurde von Beginn an mit einer Verweilzeit von 2,16 Tagen perfundiert. Die Expansion der Zellen ist in Abbildung 8.23 auf der nächsten Seite dargestellt. Wegen der unmittelbar einsetzenden starken Proliferation der Zellen wurde bereits nach 24 h begonnen, das Kulturvolumen zu erhöhen. Die Entwicklung des Kulturvolumens zeigt Abbildung 8.24 auf Seite 135. Ziel der ersten Volumenerhöhung war ein turbidostatischer Betrieb mit einer Zelldichte von $9 \cdot 10^5$ c/mL. Nach dem Erreichen des maximalen Füllvolumens von 550 mL wurden die Zellen bis zu einer Dichte von $4,9 \cdot 10^6$ c/mL weiterkultiviert. Der Reaktor ist damit nicht an seiner Leistungsgrenze angekommen, womit die Zellen keinen Limitierungen unterlagen. Dadurch sollte eine lag-Phase nach dem Umsetzen in ein größeres System vermieden werden. Die Zellen wurden steril aus dem System entnommen und in einem Volumen von 5 L in den 20 L-Rührkessel inokuliert. Die Inokulumdichte betrug $4,6 \cdot 10^5$ c/mL. Der Rührkessel ist mit keiner Zellrückhaltung ausgestattet, weshalb

¹Die Kultivierung in den Reaktoren wurde in Zusammenarbeit mit ULRIKE HILBERT durchgeführt, die auch freundlicherweise die Daten der Batch-Kulturen zur Verfügung gestellt hat.

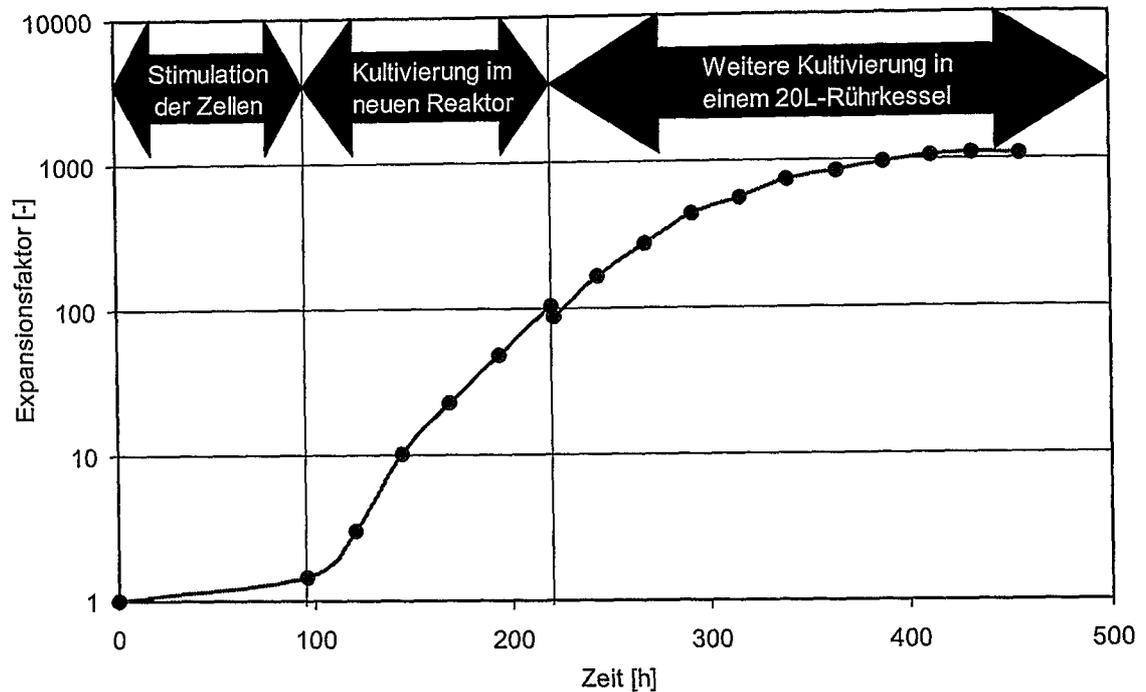


Abbildung 8.23: Expansion der MNZ bei der Lymphozyten-Kultivierung

kein perfundierter Betrieb möglich ist. Daher wurde im weiteren Verlauf der Kultivierung eine nutristatische Betriebsweise gewählt. Durch gezielte Zugabe von Frischmedium, also einem Fed-Batch-Verfahren, konnte die Glukose-Konzentration konstant gehalten werden. Der Rührkessel wurde bis auf ein maximales Volumen von 20 L gefüllt. Insgesamt konnte so eine Gesamtzahl von $2,9 \cdot 10^{10}$ Zellen erreicht werden.

Wie bei den hämatopoetischen Vorläuferzellen muss auch bei den T-Lymphozyten nicht nur die Gesamtzellzahl betrachtet werden, sondern insbesondere auch die Art der generierten Zellen. Abbildung 8.25 auf der nächsten Seite zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmarker zur jeweiligen Kulturzeit. Man erkennt, dass der Anteil der $CD3^+$ -Zellen, also der T-Lymphozyten, durch die Stimulierung von 60 auf über 90 % gesteigert und während der Kultur auf einem hohen Niveau von über 80 % gehalten werden kann.

Alle Subpopulationen werden dabei stark expandiert. In Abbildung 8.26 auf Seite 136 sind die einzelnen Expansionen aufgetragen. Man erkennt, dass die $CD3^+CD8^+$ - und die $CD3^+$ -Zellen eine äquivalente Vermehrung wie die Gesamtzellzahl, also die MNZ aufweisen. Einzig die $CD3^+CD4^+$ -Zellen werden geringer expandiert. Die Kultivierung in der vorliegenden Form ist demnach besonders für die zytotoxischen $CD8^+$ -T-Lymphozyten geeignet. Der Grund hierfür liegt, wie schon bei den Progenitorzellen, in der Medienzusammensetzung, zusätzlich aber auch in der Art der Zellaktivierung.

Ebenso wichtig wie die Art der Zellen ist deren Funktionalität. Am Ende der Kultivierung wurde daher ein Zytotoxizitäts Assay durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 8.27 auf Seite 137 dargestellt ist. Während die Zielzelle K-562 gut lysiert wird, wird die Raji-Zelllinie nur geringfügig angegriffen. Daraus kann zunächst auf die grundsätzliche Zytotoxizität der Zellen geschlossen werden. Der Grund für die fehlende Wirkung auf die Raji-Zellen ist nicht offensichtlich. Es muss berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Effektorzellen eine Mischung verschiedener Subpopulationen waren und vor der Durchführung des Tests

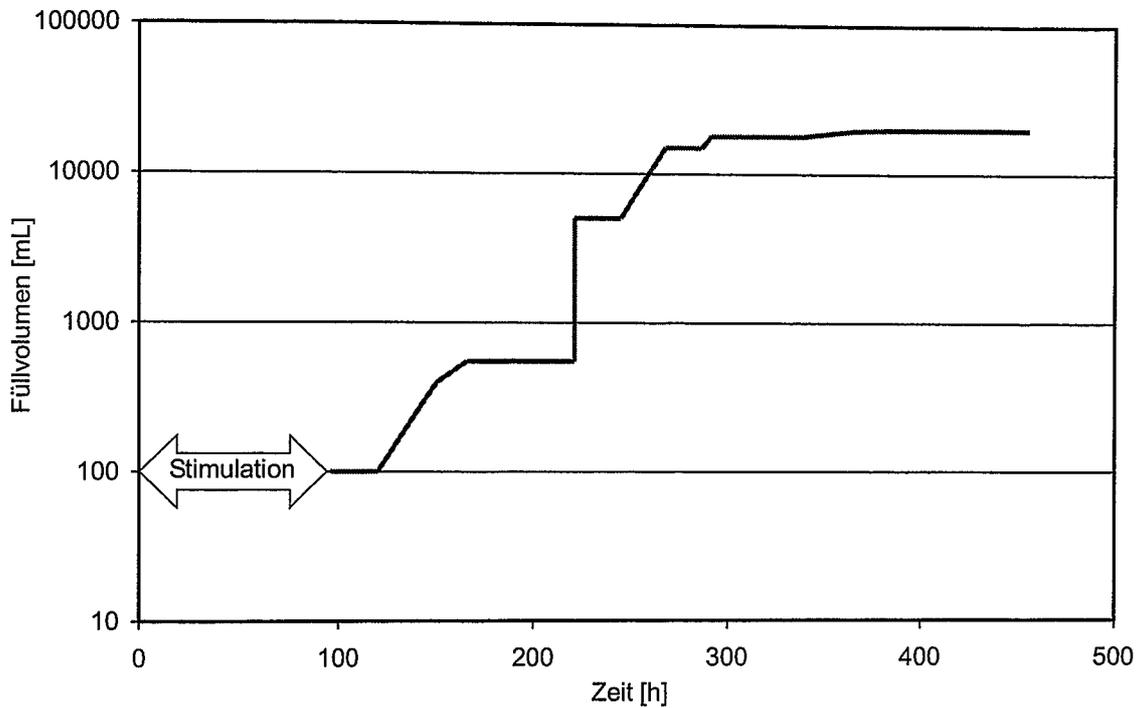


Abbildung 8.24: Verlauf des Kulturvolumens bei der Kultivierung von T-Lymphozyten im neuen Suspensionsreaktor und im 20 L-Rührkessel

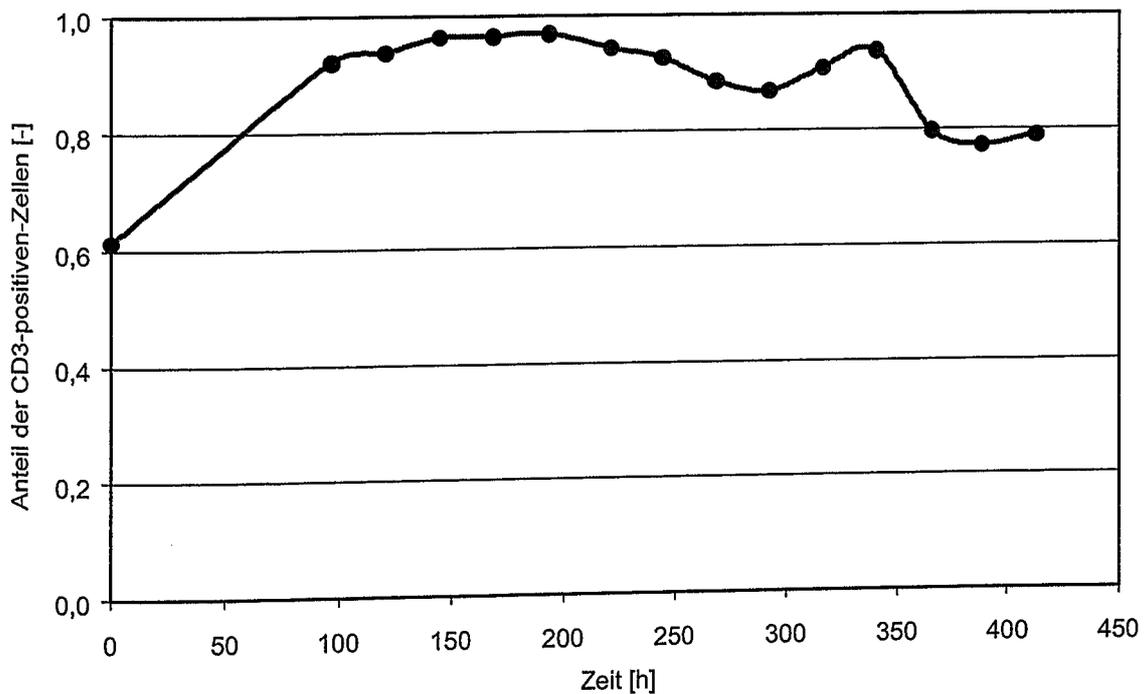


Abbildung 8.25: Anteil der CD3⁺-Zellen während der Kultivierung von T-Lymphozyten

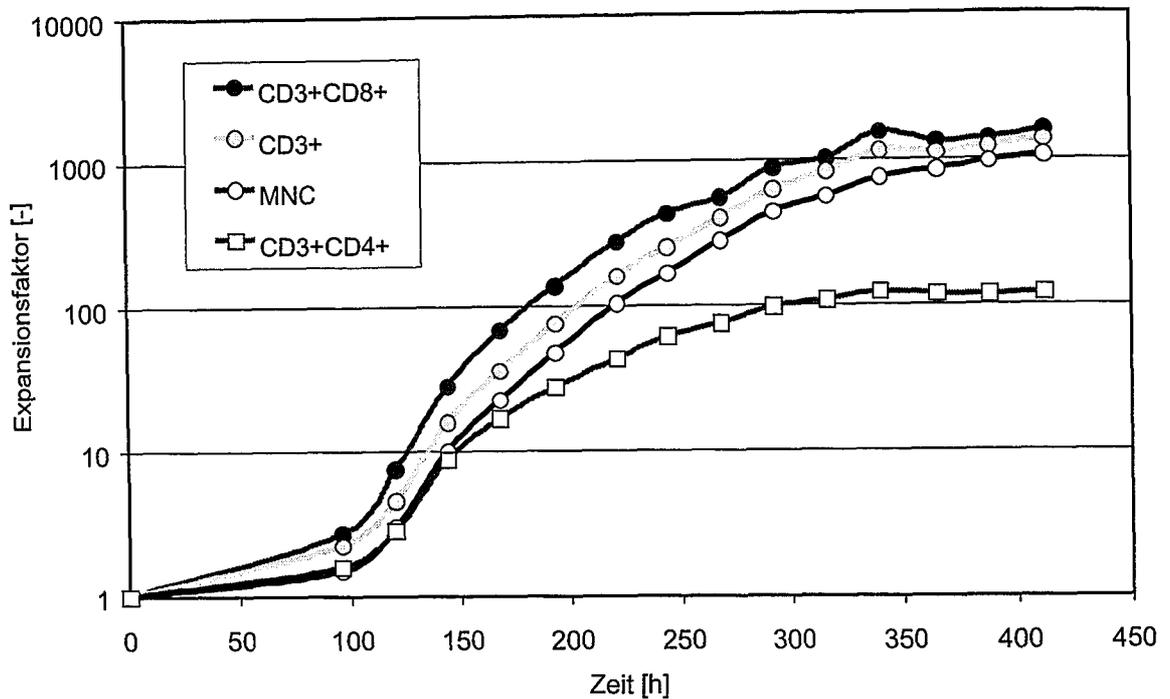


Abbildung 8.26: Expansion verschiedener Subpopulationen während der Kultivierung von T-Lymphozyten

eine Zeit kryokonserviert wurden. Für eine differenzierte biologische Erklärung müssten die Subpopulationen isoliert und jeweils direkt auf ihre Zytolyse-Fähigkeit untersucht werden. Eine intensive Untersuchung ist aber erst bei einer konkreten Anwendung sinnvoll.

Prinzipiell hatte die Kultivierungstechnik keine erkennbaren negativen Einflüsse auf die Zellen. Besonders das Fehlen einer lag-Phase, sowohl zu Beginn der Kultivierung im perfundierten Suspensionsreaktor als auch besonders beim Umsetzen der Zellen in den 20 L-Rührkessel, bestätigt die gute Verwendbarkeit der Kulturgefäße. Vergleicht man die im perfundierten Suspensionsreaktor erreichte Zelldichte von $4,9 \cdot 10^6$ c/mL und den Verlauf der Kultivierung bis zu diesem Zeitpunkt mit den Ergebnissen der Zelllinie KG-1, so ist es wahrscheinlich, dass auch für die T-Lymphozyten Zelldichten im Bereich von $1 \cdot 10^7$ c/mL erreicht werden können.

Für den Fall einer spezifischen Vermehrung von T-Lymphozyten war in Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23 eine minimale Gesamtzellzahl von $1 \cdot 10^9$ gefordert. Schon die tatsächlich erreichte Zellzahl im perfundierten Suspensionsreaktor betrug $2,7 \cdot 10^9$, bei der theoretisch maximalen Zelldichte wären sogar $5,5 \cdot 10^9$ Zellen vorhanden. Damit ist man mit dem Reaktor zumindest technisch in der Lage, klinisch relevante Mengen von spezifischen T-Lymphozyten in einem einzigen geschlossenen System zu generieren. Es wäre eine interessante Fragestellung, ob die Stimulierung der Zellen ebenfalls in dem Suspensionsreaktor erfolgen könnte. Damit wäre der gesamte Prozess in einem geschlossenen System möglich.

Im Falle der unspezifisch vermehrten T-Lymphozyten reicht der neue Reaktor nicht aus, um die in der Anwendung erforderlichen Zellzahlen zu erzeugen. Die hier dargestellte Kultivierung hat aber gezeigt, dass der Reaktor ein leistungsfähiges System ist, um in einem Schritt vom Labormaßstab in die notwendigen Großsysteme zu gelangen. Da so weniger Systemwechsel während der Kultivierung notwendig sind, verringert sich auch die Gefahr einer Kontamination. In der klinischen Umgebung ist dies eine der wesentlichsten Anforderungen.

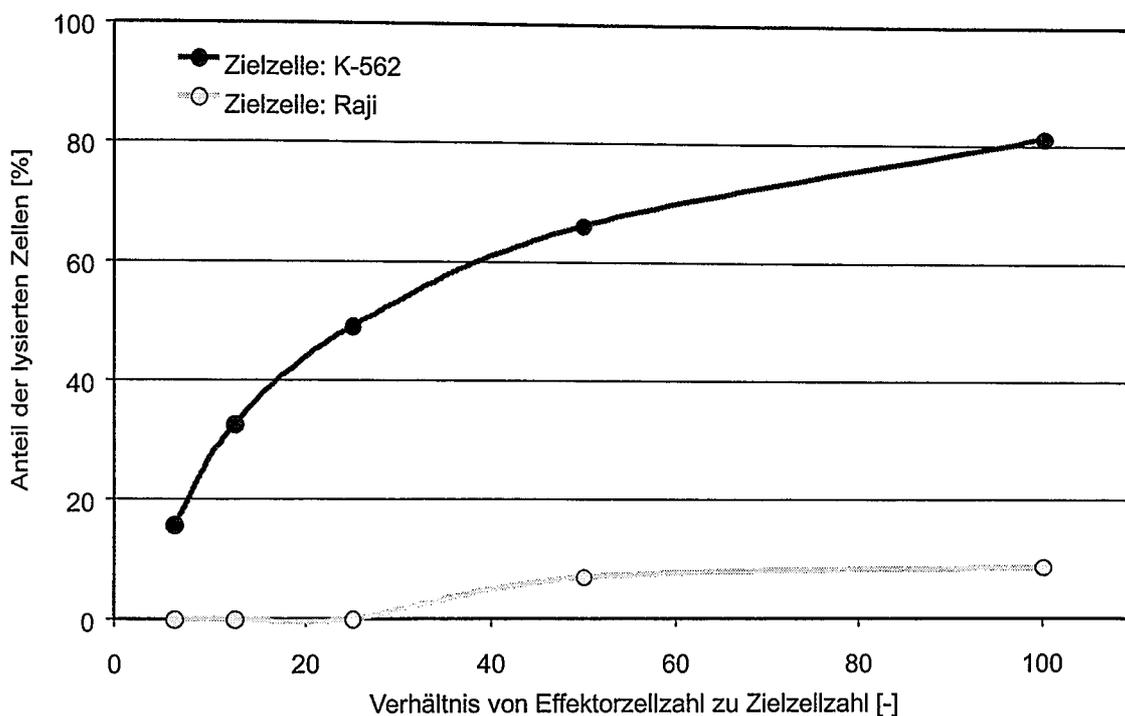


Abbildung 8.27: Anteil der lysierten Zielzellen im Zytotoxizitäts Assay als Funktion des Verhältnisses von Ziel- zu Effektorzelle

Die T-Lymphozyten zeigen auch eine deutliche Reaktion auf die kontinuierliche Fütterung, die durch die kontrollierten Reaktoren ermöglicht wird. Bei den üblichen Batch-Kultivierungen wird nach dem Prinzip der periodischen Batch-Kultur verfahren. Jeden Tag wird die Hälfte der Zellsuspension aus dem Kulturgefäß entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Bei Kultivierungen für Forschungszwecke wird die entnommene Zellsuspension verworfen, bei der Produktion für die praktische Anwendung wird sie äquivalent in einem zweiten Kultursystem weiterkultiviert. Das hat zur Folge, dass sich die Zahl der betriebenen Systeme jeden Tag verdoppelt. Die in diesem Abschnitt vorgestellte Kultivierung dauerte ohne die Zeit für die Stimulierung 15 Tage. Es wären also theoretisch bis zu 2^{14} Kultursysteme notwendig gewesen.

Eine weitere Auswirkung der diskontinuierlichen Fütterung in den Batch-Kulturen ist eine große Schwankung der Konzentration der Substrate über die Kulturzeit. Abbildung 8.28 auf der nächsten Seite zeigt beispielhaft den Verlauf der Glukose-Konzentration einer solchen Kultivierung in einem handelsüblichen Spinner. Die Kultur wurde nach dem gleichen Protokoll wie die oben beschriebene durchgeführt.

Durch die starke Proliferation nehmen die Substrat-Konzentrationen schnell ab, um durch die Fütterung unvermittelt wieder anzusteigen. Die Glukose dient hier nur als Beispiel. Alle Substrate sind dieser Entwicklung mehr oder weniger stark unterworfen. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass es kurzfristig zu Substratlimitierungen kommt. Umgekehrt entfernt man mit der Erneuerung des Mediums autokrine Faktoren, die die Zellen produziert haben. Das Ergebnis dieser uneinheitlichen Bedingungen ist ein ebenfalls stark schwankendes Wachstum der Zellen. In Abbildung 8.29 auf der nächsten Seite ist der Verlauf der Wachstumsrate der Spinnerkultur gezeigt.

Bei der kontinuierlich gefütterten Kultivierung im Suspensionsreaktor und im 20L-Rührkessel kam es zu keinen Schwankungen der Substrat-Konzentrationen. Wie in Abbildung 8.30 auf Seite 139 zu erkennen ist, sank die Konzentration zunächst ab. Dies ist

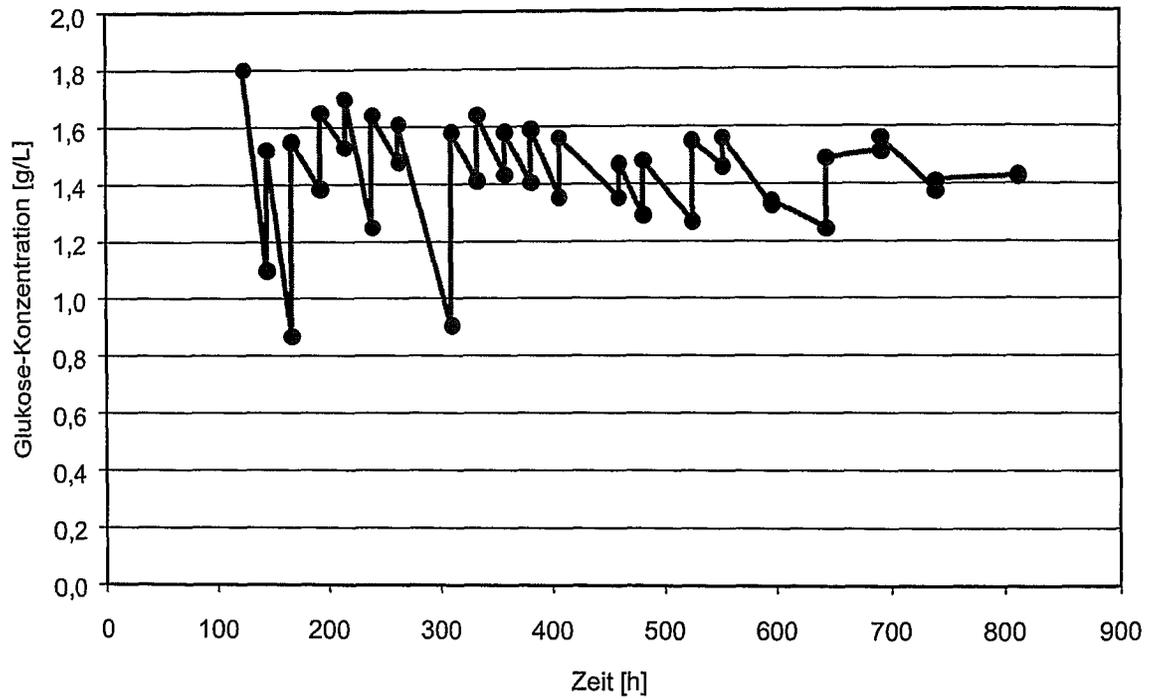


Abbildung 8.28: Der Verlauf der Glukose-Konzentration bei einer diskontinuierlich gefütterten Spinnerkultur von T-Lymphozyten

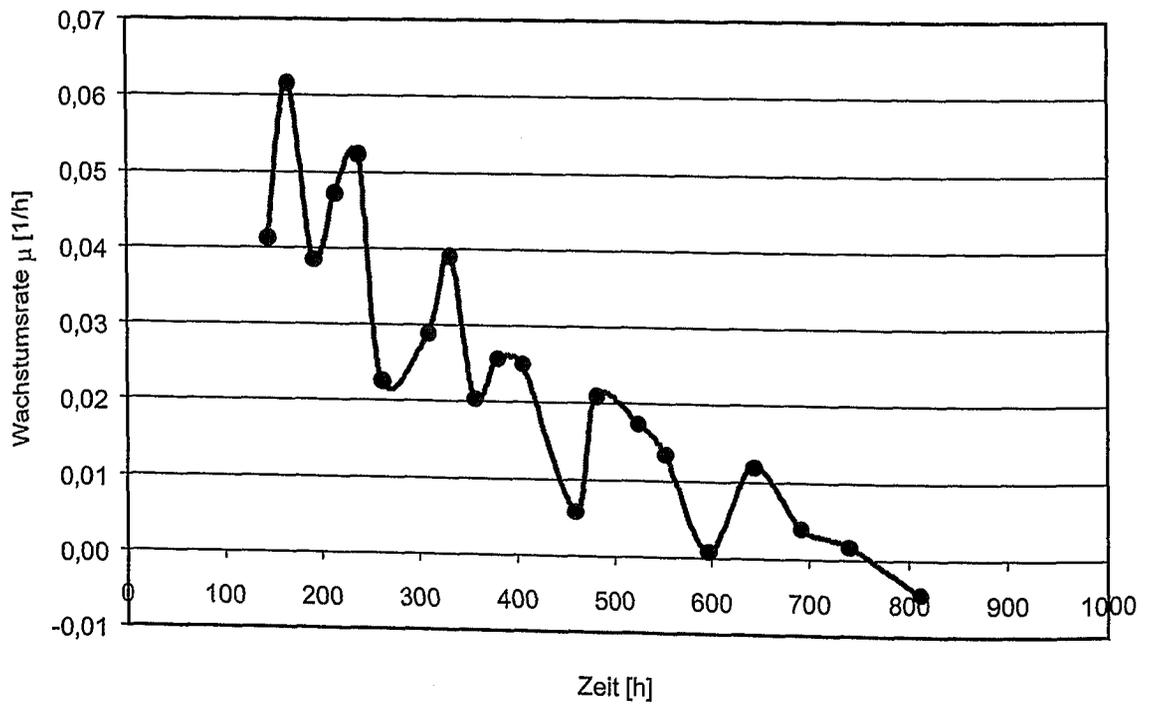


Abbildung 8.29: Der Verlauf der Wachstumsrate bei einer diskontinuierlich gefütterten Spinnerkultur von T-Lymphozyten

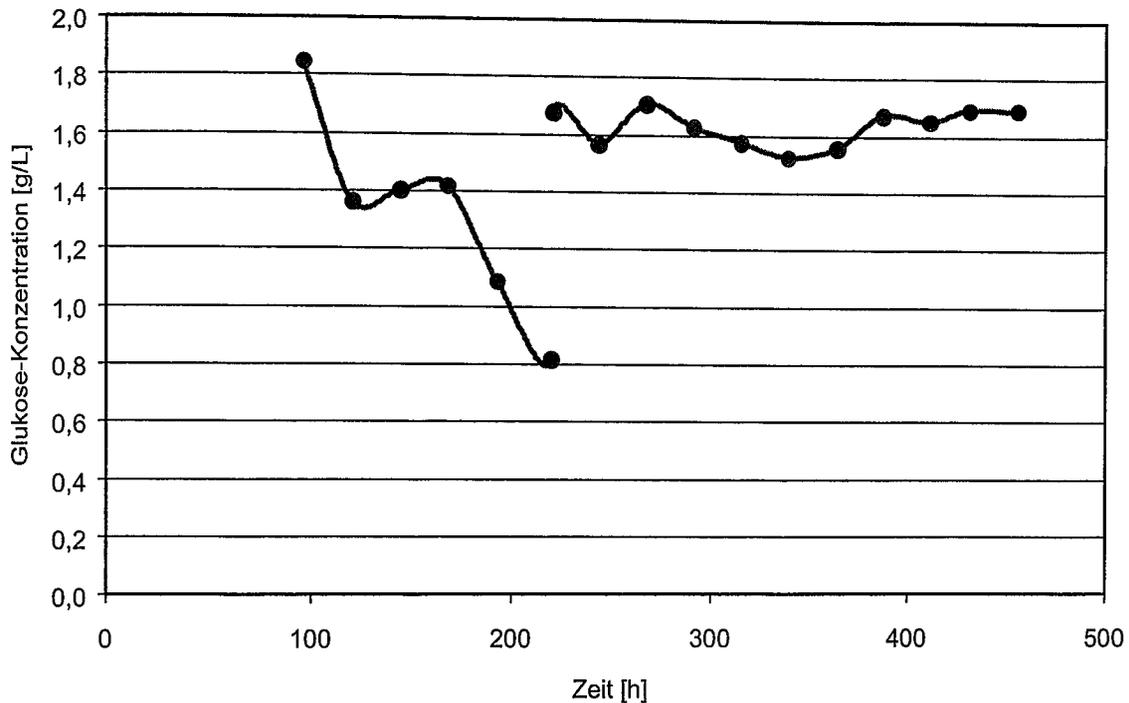


Abbildung 8.30: Der Verlauf der Glukose-Konzentration bei der kontinuierlich gefütterten Kultivierung von T-Lymphozyten in kontrollierten Reaktoren

die Folge der stark ansteigenden Zelldichte im Reaktor und der Tatsache, dass durch den turbidostatischen Betrieb die Konstanz der Substratkonzentration keine Zielsetzung war. Anders war es beim Rührkessel, der nutritiv mit Glukose als Leitsubstrat betrieben wurde. Ab dem Inokulum des Rührkessels bleibt die Glukose-Konzentration deshalb auf einem stabilen Niveau.

Die positive Auswirkung dieser Betriebsweisen zeigt der Verlauf der Wachstumsraten in Abbildung 8.31 auf der nächsten Seite, die zwar kontinuierlich sinkt, aber keine Schwankungen wie bei der Batch-Kultur zeigt. Das allgemeine Absinken der Wachstumsrate, das unabhängig von der Fütterungsart zu beobachten ist, ist eine Folge der langsam abklingenden Stimulierung. Hier gibt es Versuche, durch eine Restimulierung die volle Proliferationsfähigkeit während der Kultivierung wiederherzustellen (zum Beispiel [206]).

Es mag auffallen, dass in der Batch-Kultivierung die Zellen wesentlich länger proliferieren und auch die Wachstumsrate ein leicht höheres Niveau hat. Man darf hier aber keine direkte Schlussfolgerung bezüglich der Betriebsweise oder der Fütterungstaktik ziehen. Vielmehr handelt es sich bei den T-Lymphozyten auch um Primärmaterial, das starke Spendervariabilitäten aufweist. Für eine wertende Aussage müssten wie bei den Vorläuferzellen parallele Kultivierungen mit den unterschiedlichen Strategien durchgeführt werden. Die vorliegende Kultivierung in den Reaktoren hat eine prinzipielle Möglichkeit dazu aufgewiesen. Eine Prozessoptimierung erfordert weitere Versuche.

Ein erster Hinweis kann aber gegeben werden. Am Tag 9 wurde eine kleine Zahl an Zellen aus dem neuen Suspensionsreaktor entnommen und in eine Gewebekulturflasche überführt. Diese wurde an den Reaktor angepasst täglich gefüttert. Die resultierende Wachstumsrate ist ebenfalls in Abbildung 8.31 auf der nächsten Seite dargestellt. Das äquivalente Wachstum beider Kultivierungen ist deutlich zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass es zu keiner Beeinträchtigung der Zellen bei der Kultivierung im 20 L-Rührkessel kommt.

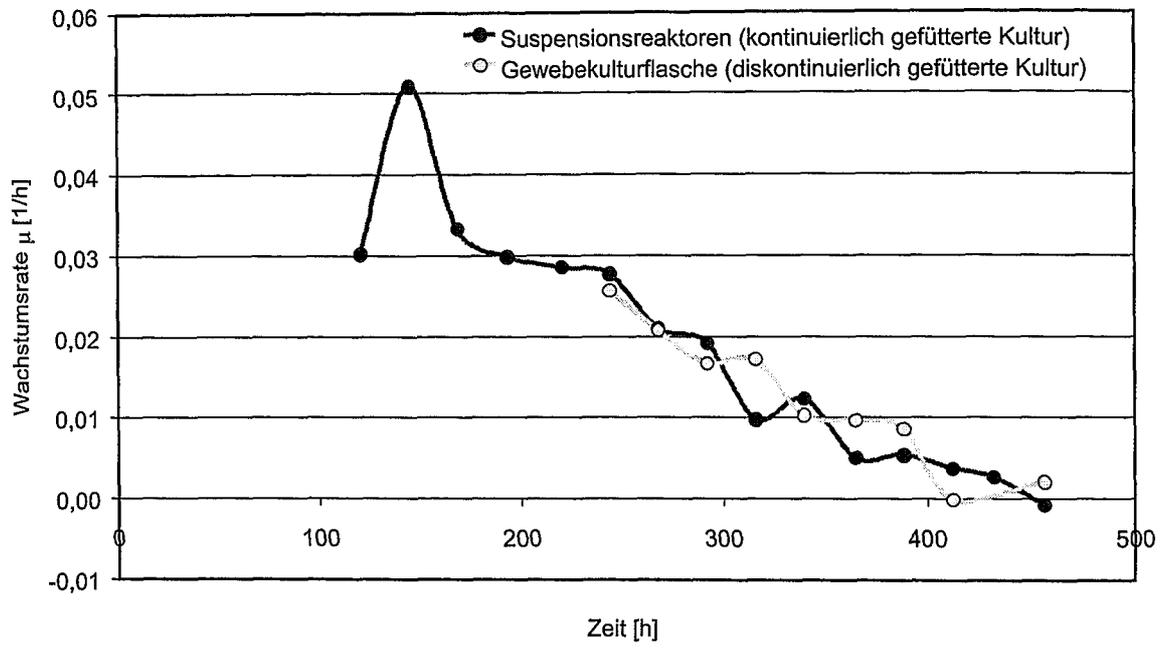


Abbildung 8.31: Der Verlauf der Wachstumsrate bei der kontinuierlich gefütterten Kultivierung von T-Lymphozyten in kontrollierten Reaktoren

NK-92 - Ein Beispiel für eine klinische Anwendung

In einer Zusammenarbeit der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Blutspendedienstes Hessen des DRK (Frankfurt am Main) und dem Bone Marrow Transplant Center des Rush Cancer Institute des Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center (Chicago, USA) wird die Zelllinie NK-92 in einer klinischen Studie Phase I/II verwendet. Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die NK-92 *ex vivo* eine sehr potente Zelllinie ist, die gegenüber einer großen Zahl von Tumorzelllinien und primären Tumoren starke zytotoxische Fähigkeiten besitzt [107, 108, 304, 305], werden die Zellen jetzt therapeutisch *in vivo* eingesetzt.

Bei den Patienten der Studie handelt es sich um Kinder und Jugendliche mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen, wie akuter lymphatischer Leukämie, chronischer myeloischer Leukämie, HODKIN-Lymphomen, Non-HODKIN-Lymphomen, kindlichen Sarkomen, Neuroblastomen und Hirntumoren. Bei allen Teilnehmern der Studie ist es nach einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation zu einem Rückfall gekommen, oder es haben herkömmliche Behandlungsformen versagt. Den Patienten werden NK-92 Zellen verabreicht, die für eine Wachstumsarretierung mit 10 Gy bestrahlt wurden.

In der Phase I einer klinischen Studie wird die Verträglichkeit der therapeutischen Maßnahme geprüft, in Phase II ihre generelle Wirksamkeit. Bei der Studie mit den NK-92 bekommen in der Phase I jeweils drei Patienten eine Dosis von $1 \cdot 10^9$, $3 \cdot 10^9$ beziehungsweise $5 \cdot 10^9$ c/m² Körperoberfläche innerhalb einer Stunde intravenös injiziert. Ein Kind besitzt eine Körperoberfläche von etwa 1 m², ein Erwachsener von ungefähr 2 m². Wird die erste Infusion gut toleriert, wird zwei Tage später die gleiche Menge Zellen noch einmal verabreicht.

Die maximale Dosis, die in der Phase I als verträglich eingestuft werden kann, wird in der Phase II angewandt. Hier sollen zunächst 17 Patienten behandelt werden. Wird bei mehr als drei Patienten eine therapeutische Wirkung, das heißt eine Verringerung der Tumormasse, beobachtet, wird dieser Effekt den NK-92 zugerechnet. Die Phase II wäre in diesem Fall erfolgreich abgeschlossen. Die detaillierte Beschreibung der klinischen Studie in Form des Studienprotokolls befindet sich in Kapitel H auf Seite 213.

In einer zweiten, parallelen klinischen Studie, in der statt der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, die Klinik III, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main beteiligt ist, wird die NK-92 bei erwachsenen Patienten eingesetzt. Diese Studie verläuft identisch mit der Studie für Kinder und Jugendliche, mit Ausnahme der höchsten eingesetzten Dosis. Diese beträgt statt $5 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^{10}$ c/m² Körperoberfläche. Das ausführliche Studienprotokoll findet sich in Kapitel I auf Seite 227.

Grundvoraussetzung der klinischen Studien ist die sichere Produktion der benötigten Zellzahl. Das Ziel dabei ist eine möglichst hohe Zelldichte. Die Infusion der Zellen kann selbstverständlich nur in einem relativ kleinen Volumen erfolgen. Nach der Kultivierung der Zellen sind daher Aufarbeitungsschritte, wie beispielsweise Zentrifugation, notwendig, um eine Volumenreduktion zu erreichen. Je höher die Zelldichte in der Kultur ist, umso geringer ist der notwendige Aufwand bei der Aufarbeitung. Die verfahrenstechnische Aufgabe ist es demnach, eine hohe Zelldichte in einem klinischen System zu generieren.

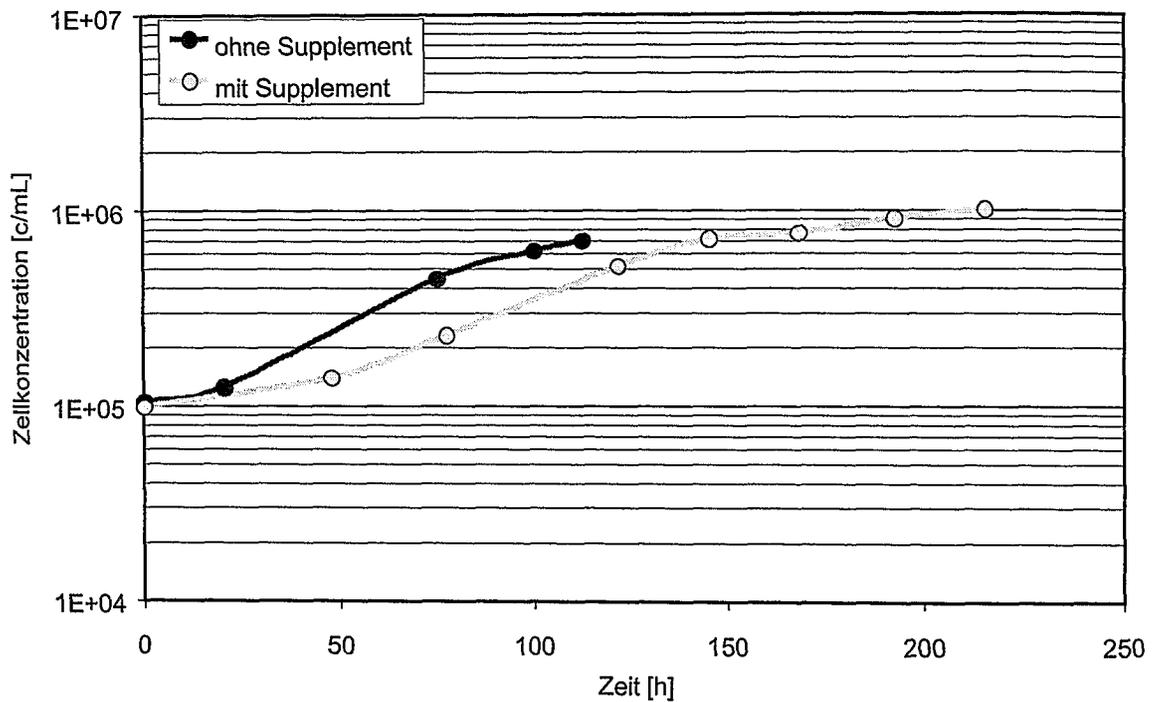


Abbildung 9.1: Kultivierung der Zelllinie NK-92 in einer Batch-Kultur mit unsupplementiertem und supplementiertem Medium

9.1 Die Optimierung der NK-92 Kultur

Die Zelllinie NK-92 wächst nicht serumfrei. In der klinischen Anwendung ist der Einsatz von tierischen Seren aber nicht empfehlenswert. Um eine maximale Prozesssicherheit zu gewährleisten, wird im Rahmen der klinischen Studie X-Vivo 10 mit 5 % hhiQ-Plasma verwendet. Zusätzlich muss das Medium mit 100 U/mL IL-2 ergänzt werden. Die gleiche Menge IL-2 wird während der Kultivierung alle drei Tage frisch zugegeben.

Eine Batch-Kultivierung unter diesen Bedingungen, also ohne Mediensupplement, in einem handelsüblichen 250 mL-Spinner ist in Abbildung 9.1 dargestellt. Die maximal erreichte Zelldichte beträgt $7 \cdot 10^5$ c/mL. Es ist unwahrscheinlich, dass die Limitierung der Kultur bei dem Zytokin liegt, da dieses während der Kultur wie beschrieben supplementiert wurde. Eine Sauerstofflimitierung ist bei einer so niedrigen Zelldichte ebenfalls auszuschließen. Daher ist eine niedermolekulare Limitierung oder Inhibierung wahrscheinlich.

Die Medienanalytik zeigt deutlich die möglichen Limitierungen. In Abbildung 9.2 auf der nächsten Seite ist der relative Konzentrationsverlauf der kritischen Stoffe dargestellt. Interessanterweise handelt es sich um Glutamin, Serin und Asparagin, die Aminosäuren, die schon bei den primären hämatopoetischen Zellen limitierend waren. Zusätzlich sank auch die Glukose-Konzentration deutlich ab. In den weiteren Kultivierungen wurde das Medium deshalb mit Aminosäuren und Glukose supplementiert. Das Supplement ergänzt das Medium um 1,5 mmol/L Glutamin, 1,5 mmol/L Serin, 1 mmol/L Asparagin und 2 g/L Glukose. Zusätzlich zu dem Supplement wurde bei allen folgenden Kulturen das Medium mit 1 000 U/mL IL-2 versetzt, bei gleichbleibender regelmäßiger Nachfütterung des Zytokins. Eine Batch-Kultivierung mit dem auf diese Weise verbesserten Medium zeigt Abbildung 9.1. Die Zelldichte erreicht $1 \cdot 10^6$ c/mL und konnte demnach um über 40 % gesteigert werden.

Für eine weitere Verbesserung der maximalen Zelldichte wurde erneut nach der Limitierung des Prozesses gesucht. Die Sauerstoff- und Zytokinversorgung kann wieder ausgeschlossen werden. Die Medienanalytik ergab auch in diesem Fall keinen Anhaltspunkt einer

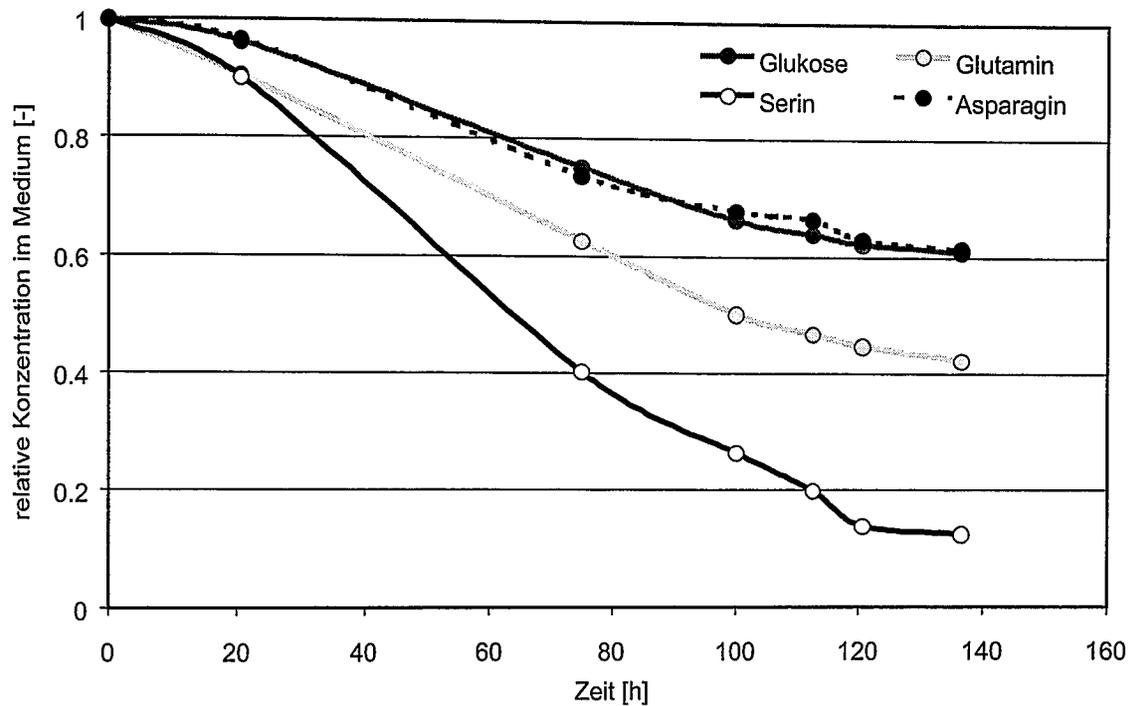


Abbildung 9.2: Entwicklung der Glukose-, Glutamin-, Asparagin- und Serin-Konzentration während der Batch-Kultivierung der Zelllinie NK-92

Limitierung durch Aminosäuren oder Glukose. Bei der supplementierten Kultur fällt aber besonders deutlich das starke Sinken des pH-Wertes des Kulturmediums auf. Dieses wird durch eine hohe Laktatbildung verursacht, die eine Laktat-Konzentration über 30 mmol/L zur Folge hat. Es kann also eine Laktatinhibierung vermutet werden.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine parallele Kultivierung durchgeführt, bei der neben einer üblichen Kultur in drei Kulturen schon zu Beginn Laktat im Medium vorgelegt wurde. Die Konzentrationen betragen 10, 20 und 30 mmol/L. Abbildung 9.3 auf der nächsten Seite zeigt den Verlauf der Laktat-Konzentration über den Kulturzeitraum. Deutlich zu sehen ist, dass die Höhe der Laktat-Konzentration keinen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen hat. Auch die Verläufe der Zellzahl und der Glukose-Konzentration waren identisch. Da bei diesem Versuch eine Laktatkonzentration von beinahe 55 mmol/L erreicht wurde, ohne dass ein negativer Effekt zu beobachten war, und da in den vorangegangenen Kulturen nie ein solch hoher Wert beobachtet werden konnte, kann man eine Laktatinhibierung ausschließen. Dieser Versuch zeigt darüber hinaus, dass die Zellen einen energetisch sehr ungünstigen Stoffwechsel haben. Im Durchschnitt werden 1 Mol Glukose in 1,85 Mol Laktat umgewandelt. Über 90 % der Glukose gelangen also nicht in den Zitratzyklus. Diese erhöhte Laktatproduktion ist eine typische Eigenschaft von Tumorzellen [105, 288].

Eine Limitierung könnte auch durch IL-2 entstehen, was durch die Notwendigkeit des Nachdosierens belegt wird [68]. Die Erhöhung der IL-2 Konzentration auf 1000 U/mL sollte dies zwar verhindern, wegen der entscheidenden Rolle des IL-2 wurde der Konzentrationsverlauf aber trotzdem nachgeprüft. Es zeigte sich, dass IL-2 in der Batch-Kultur schnell verbraucht wird und somit eine potentielle Limitierung darstellt. Gegen die Limitierung spricht aber die Tatsache, dass ein Nachdosieren bei der maximalen Zelldichte zu keiner relevanten Steigerung der Zelldichte führt. Diesen Fall verdeutlicht Abbildung 9.4 auf Seite 145. Die Konzentrationen des IL-2 sind das Ergebnis der ELISA Messungen. Für das

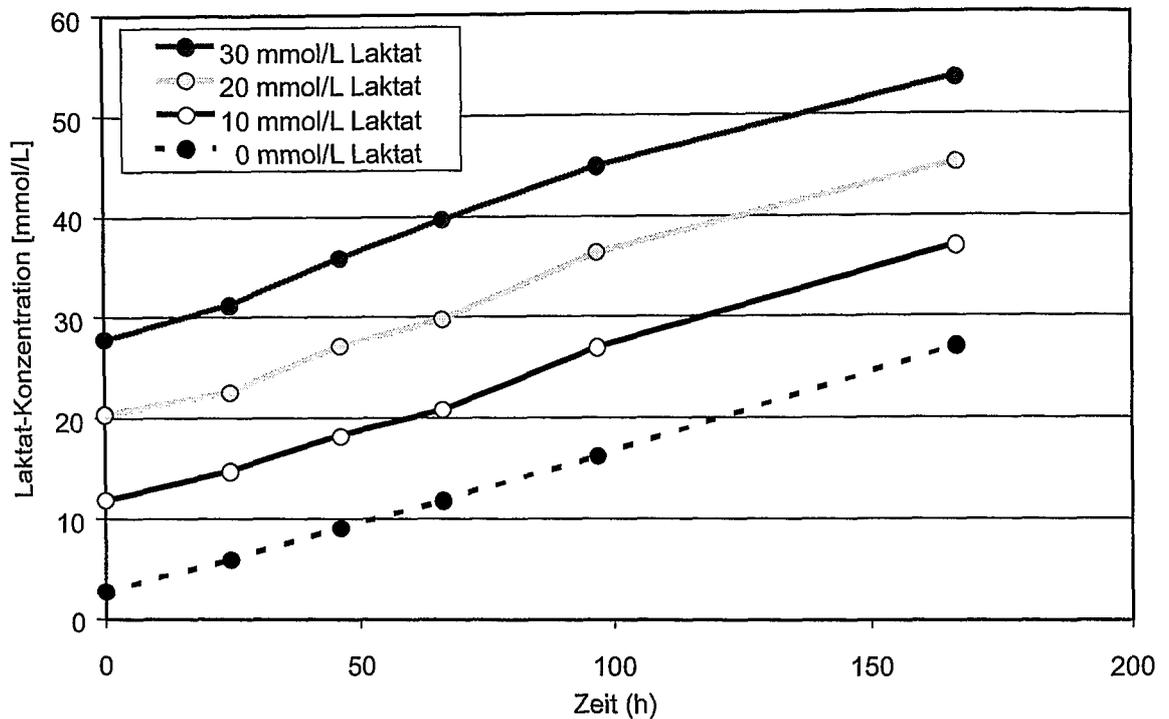


Abbildung 9.3: Entwicklung der Laktat-Konzentration während der Batch-Kultivierung der Zelllinie NK-92 bei unterschiedlichen Mengen vorgelegten Laktats

verwendete IL-2 gilt 1 Unit = 25 pg. Man erkennt in der Abbildung den schnellen Abfall der IL-2 Konzentration durch den Verbrauch der Zellen. Die Zellkonzentration ist dadurch aber fast nicht beeinflusst. Die IL-2 Verbrauchsrate liegt bei $2-3 \cdot 10^{-4}$ pg/(c · h), der gleiche Wert, den man auch in einer proliferierenden Kultur beobachten kann.

Die genauen mechanistischen Vorgänge, die durch IL-2 bei der Zelllinie NK-92 ausgelöst werden, sind nicht bekannt. Sicher ist, dass die Versorgung mit IL-2 essentiell ist. In welcher Weise das Zytokin an den Zellen bindet und auf sie wirkt, wie lange ein gebundenes Zytokin Wirkung zeigt und ob das Zytokinangebot Auswirkungen auf die Ausbildung der entsprechenden Rezeptoren hat, ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass die Erhöhung der IL-2 Konzentration die Zellen so beeinflusst, dass auch der Zytokinbedarf erhöht ist. In jedem Fall kann aber eine Wirkung auf die maximale Zelldichte in der Batch-Kultur durch die Steigerung der IL-2 Zufuhr ausgeschlossen werden.

Weitere Untersuchungen über die Art der Limitierung oder Inhibierung wurden nicht durchgeführt. Stattdessen wurde im Folgenden eine perfundierte Kultur im neuen Suspensionsreaktor etabliert. Diese Anwendung zeigt eine weitere mögliche Verwendung des Reaktors. Obwohl es sich bei der NK-92 um eine Zelllinie handelt, die prinzipiell in beliebigen Mengen vorkultiviert werden kann, um sie anschließend in einem handelsüblichen Suspensionsreaktor verwenden zu können, ist dieses Vorgehen sinnvoll. Bei der NK-92 sprechen ökonomische Gründe für die Prozessentwicklung in einem möglichst kleinen Kultursystem. Die Medienkosten sind zwar deutlich niedriger als bei den primären hämatopoetischen Zellen, trotzdem liegt der Literpreis mit zirka 150 DM etwa bei dem Zehnfachen eines üblichen Mediums für eine tierische Zelllinie. Für die Entwicklung eines perfundierten Prozesses, der relativ hohe Mengen von Medien benötigt, ist ein kleiner Reaktor vorteilhaft. Darüber hinaus ist die Eigenschaft des neuen Suspensionsreaktors, eine hohe Expansion in einem geschlossenen System zu ermöglichen, in Hinblick auf eine klinische Anwendung sehr positiv.

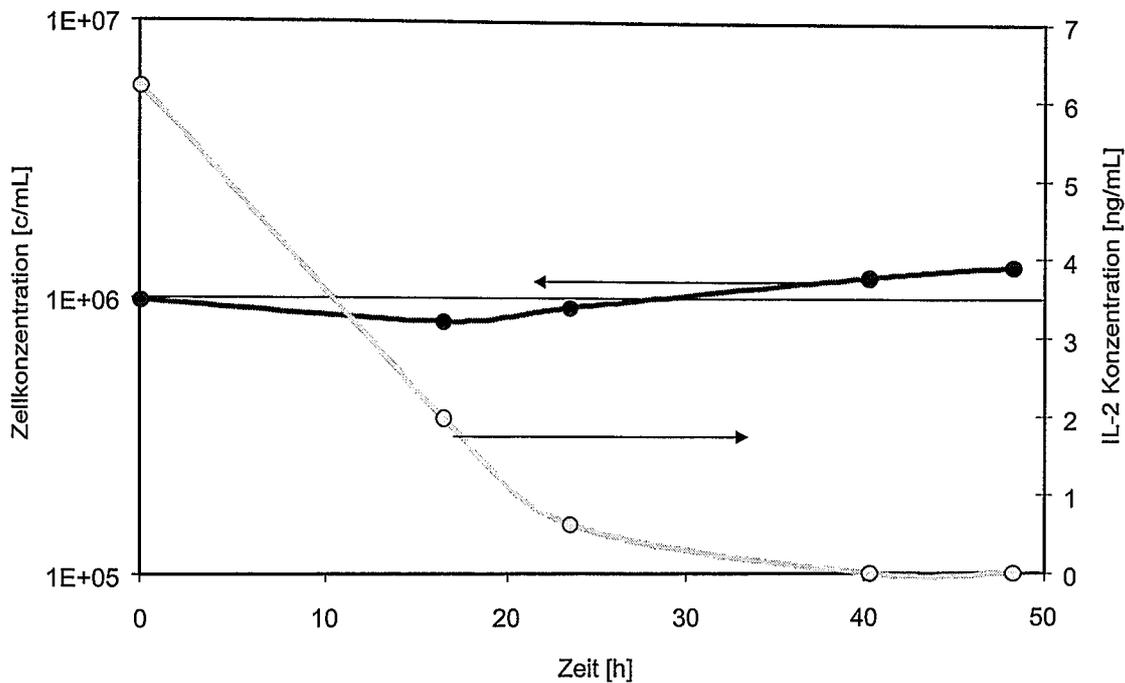


Abbildung 9.4: Verlauf der IL-2 Konzentration und der Zellkonzentration nach der IL-2 Nachdosierung in der stationären Phase einer Batch-Kultur

In Abbildung 9.5 auf der nächsten Seite ist der Verlauf der Zelldichte in perfundierter Kultur dargestellt. Als Medium wurde das supplementierte Medium mit 1000 U/mL IL-2 verwendet. Die Kultivierung startete direkt mit dem maximalen Volumen von 550 mL und wurde mit einer Verweilzeit von 2,75 Tagen perfundiert und war dadurch nutristatisch. Insgesamt wurde eine Gesamtzahl von $2,4 \cdot 10^9$ Zellen bei einer Zelldichte von $4,4 \cdot 10^6 \text{ c/mL}$ erreicht. Die Limitierung lag wie schon bei der Zelllinie KG-1 in der Sauerstoffversorgung. Die NK-92 hat mit $7,6 \cdot 10^{-3} \text{ mgO}_2/(10^6 \text{ c} \cdot \text{h})$ eine etwa doppelt so hohe zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate wie die KG-1, wodurch nur eine geringere Zelldichte möglich ist.

In der perfundierten Kultur ist im Gegensatz zur Batch-Kultivierung erstmals eine konstante Menge IL-2 im Medium zu beobachten. In Abbildung 9.6 auf der nächsten Seite ist der Verlauf der IL-2 Konzentration im Medium gezeigt. Diese Kultivierung widerlegt die Theorie, dass ein hohes Angebot an IL-2 den Verbrauch oder die Bindung durch die Zellen beeinflusst. Die IL-2 Verbrauchsrate lag bei $1 - 4 \cdot 10^{-4} \text{ pg/(c} \cdot \text{h)}$ und war damit identisch mit den Verbrauchsdaten in der Batch-Kultur. Insgesamt kann in der perfundierten Kultur also eine IL-2 Limitierung endgültig ausgeschlossen werden.

Wie bei den T-Lymphozyten ist auch für die NK-92 Zellen die Funktionalität nach der Kultivierung der entscheidende Parameter. Deshalb wurde dieses am Ende der perfundierten Kultur in einem Zytotoxizitäts Assay getestet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 9.7 auf Seite 147. Die K-562 und die Raji-Zielzellen werden von den NK-92 Zellen im gleichen Maße lysiert. Im Vergleich zu den Lymphozyten (Abbildung 8.27 auf Seite 137) ist die Lysefähigkeit der NK-92 deutlich höher. Die Zellen, die für den Assay verwendet wurden, wurden am Ende der Kultivierung, also aus einer Sauerstofflimitierung heraus, dem Reaktor entnommen. Damit waren die denkbar ungünstigsten Bedingungen für die Untersuchung gewählt, so dass aus dem positiven Ergebnis des Zytotoxizitäts Assays geschlossen werden kann, dass die Zellen zu jedem Zeitpunkt einer perfundierten Kultivierung stark lysefähig sind.

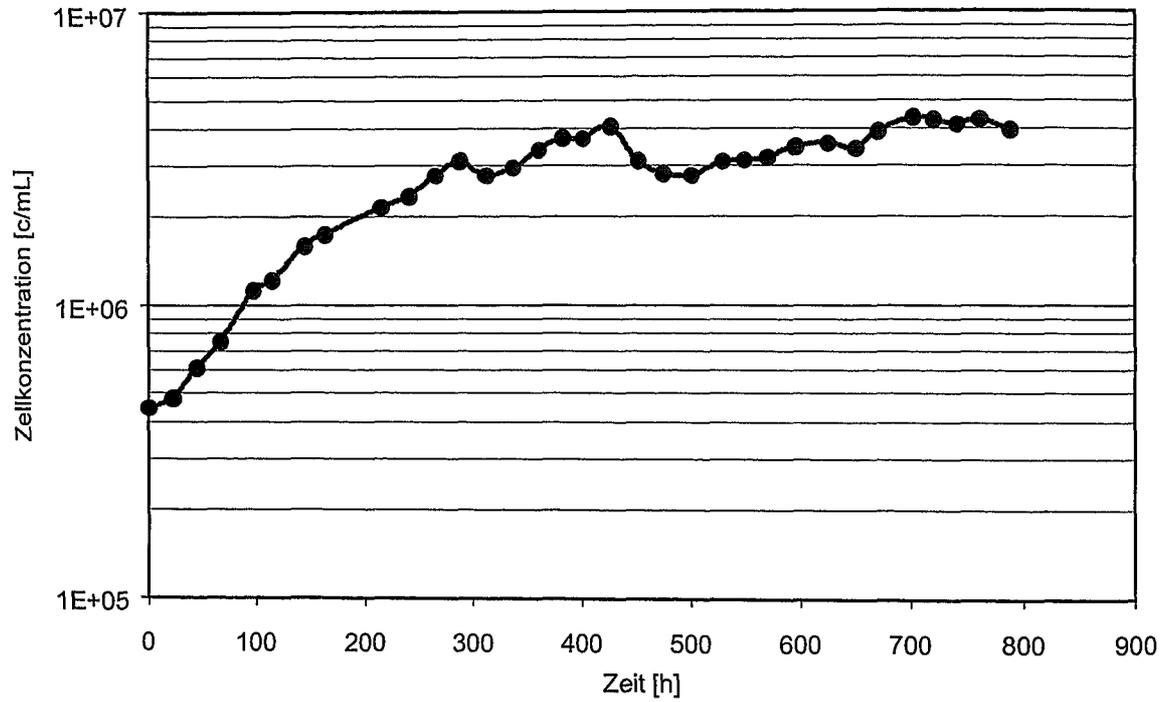


Abbildung 9.5: Verlauf der Zellkonzentration bei der Kultivierung der Zelllinie NK-92 in perfundierter Kultur

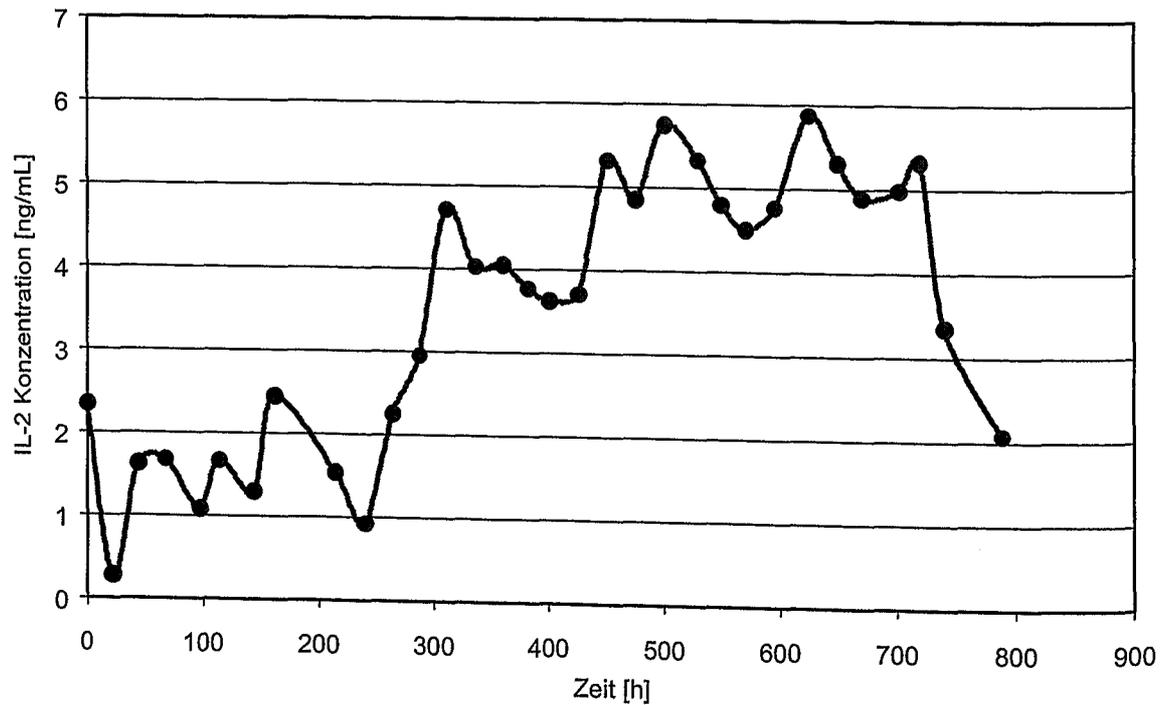


Abbildung 9.6: Verlauf der IL-2 Konzentration bei der Kultivierung der Zelllinie NK-92 in perfundierter Kultur

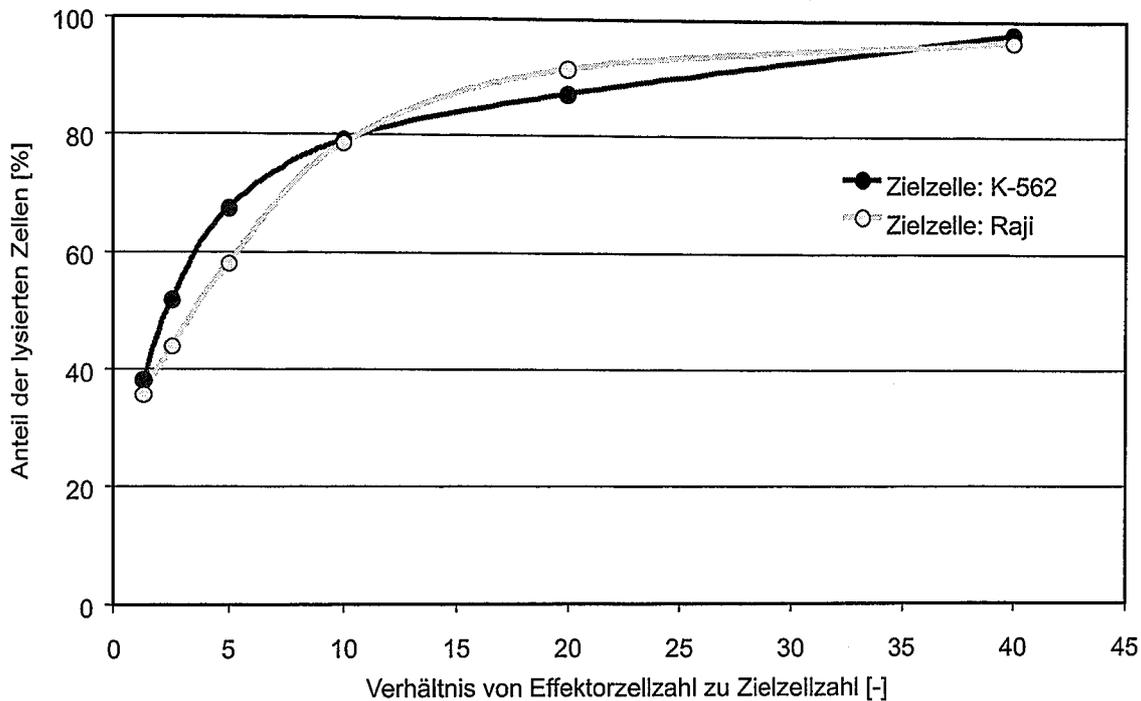


Abbildung 9.7: Anteil der lysierten Zielzellen im Zytotoxizitäts Assay als Funktion des Verhältnisses von Ziel- zu Effektorzelle mit kultivierten NK-92 Zellen

9.2 Konstruktive Veränderungen

Die Entwicklung des kontrollierten Suspensionsreaktors fand von Beginn an vor dem Hintergrund der Anforderungen für klinische Kultursysteme statt (vergleiche Abschnitt 2.5.4 auf Seite 23). Für die Verwendung des Reaktors in der klinischen Studie mit der Zelllinie NK-92 waren daher nur eine geringe konstruktive Änderung notwendig.

Da die Probenahme über den dafür vorgesehenen Stutzen ein Öffnen des Reaktors erfordert, wurde ein neuartiges Probenahmesystem etabliert. Dieses gewährleistet zu jedem Zeitpunkt ein geschlossenes System, weshalb der Reaktor auch für die Probenahme nicht unter eine sterile Sicherheitswerkbank gebracht werden muss, sondern die ganze Kulturzeit an einem Ort verbleiben kann.

Dazu wurde statt des höhenverstellbaren zweiten Medienablaufs an die gleiche Stelle ein kurzes Edelstahlrohr als Schlauchanschluss eingebaut. Von diesem geht im Inneren des Reaktors ein Silikonschlauch bis zum Boden des Gefäßes. Außerhalb des Reaktors führt ein Schlauch zu einem 100 mL Glasgefäß. Diese Verbindung ist mit einem schweißbaren Schlauch versehen. Für die Probenahme wird Zellsuspension in den Schlauch gezogen und ein Stück des gefüllten Schlauchs wird mithilfe eines Schlauchschweißgerätes steril abgetrennt. Die verbliebene Zellsuspension wird wieder in den Reaktor zurückgeführt, während die Zellen aus dem abgeschweißten Stück Schlauch als Probe für die weitere Analytik dienen.

Bei Bedarf kann an den Schlauch, dessen Länge sich durch die Probenahmen mehr und mehr verringert, ein neues Stück steril angeschweißt werden. So ist sichergestellt, dass trotz des Längenverlustes beliebig oft Probe genommen werden kann.

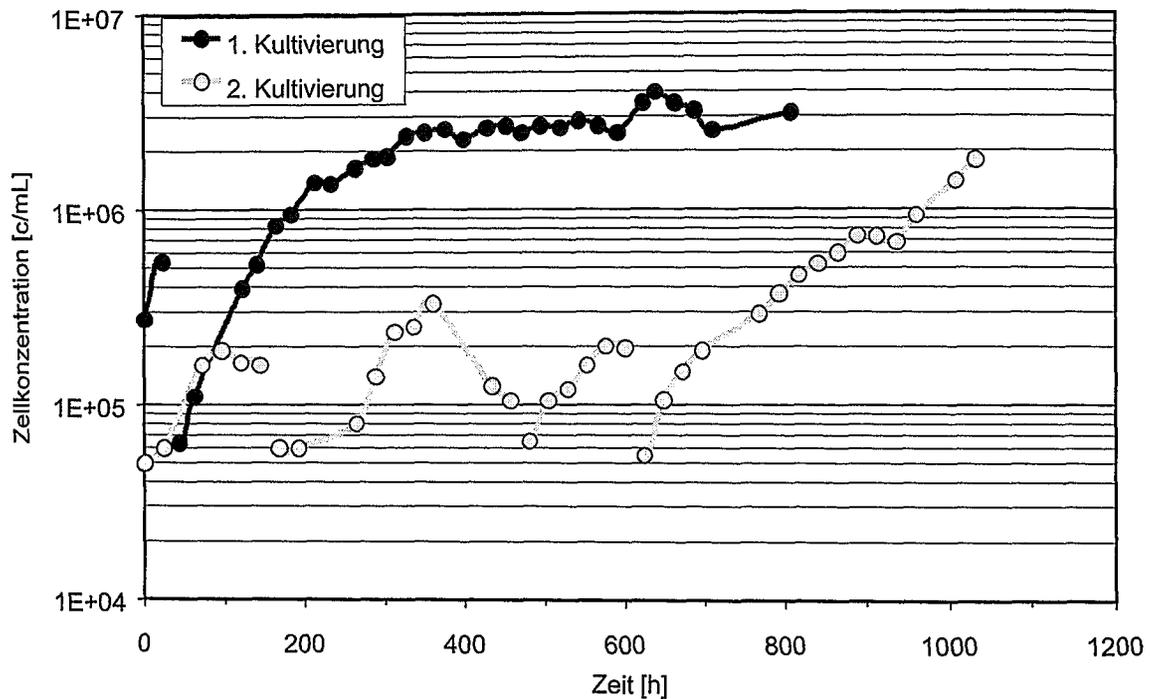


Abbildung 9.8: Kultivierungen der Zelllinie NK-92 im klinischen Umfeld (Sprünge in den Kurvenverläufen entstehen durch die diskontinuierliche Vergrößerung des Kulturvolumens)

9.3 Kultivierungen im klinischen Umfeld

Im Rahmen der klinischen Studien werden die NK-92 beim Blutspendedienst Hessen kultiviert. Die dort etablierten Kulturtechniken sind Gewebekulturflaschen und Wannenstapel. Beide Systeme ermöglichen ausschließlich Batch-Kultivierungen. Die Kulturen werden dabei maximal bis zu einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ c/mL betrieben. Bei einer angenommenen Körperoberfläche eines erwachsenen Patienten von 2 m^2 beträgt die maximale Zelldichte der Phase I $2 \cdot 10^{10}$ Zellen. Dafür benötigt man mit den Batch-Kulturen 40 L Kulturvolumen.

In perfundierter Kultur wäre die gleiche Zellzahl in einem Volumen von etwa 1,1 L erreichbar. Als Unterstützung der Kulturen im Wannenstapel wurde der neue Suspensionsreaktor beim Blutspendedienst Hessen etabliert. Ein einzelner perfundierter Reaktor ersetzt nicht vollständig die Batch-Kultivierung. Die Verwendung des Reaktors ist aber aus zwei Gründen sinnvoll. Erstens ist es zu Beginn empfehlenswert, als Vorsichtsmaßnahme nur einen Teil der verabreichten Zellen aus dem neuen System zu verwenden. Zweitens kann die Handhabung eines perfundierten Systems in einem Stadium der Anwendung eingeübt werden, in dem noch die herkömmliche Batch-Kultivierung notfalls ausreichende Zellzahlen liefern kann. Darüber hinaus kann ein weitergehender Scale-up des Prozesses parallel zu der klinischen Etablierung erfolgen.

Es wurden zwei unabhängige perfundierte Kultivierungen beim Blutspendedienst durchgeführt. Die Verläufe der Zelldichten zeigt Abbildung 9.8. Beide Kultivierungen wurden identisch zu der oben beschriebenen durchgeführt. Das Volumen beim Inokulieren betrug jeweils 100 mL und wurde in der ersten Kultur in einem Schritt auf 550 mL erhöht, in der zweiten Kultur in drei Schritten. Die erreichten Zelldichten betragen $4 \cdot 10^6$ c/mL und $1,79 \cdot 10^6$ c/mL. In beiden Fällen kam es zu keinen Betriebsstörungen.

Die beiden Kultivierungen wurden nach einer Einführung und anfänglicher Anleitung von Mitarbeitern des Blutspendedienstes Hessen eigenständig durchgeführt. Für den Rou-

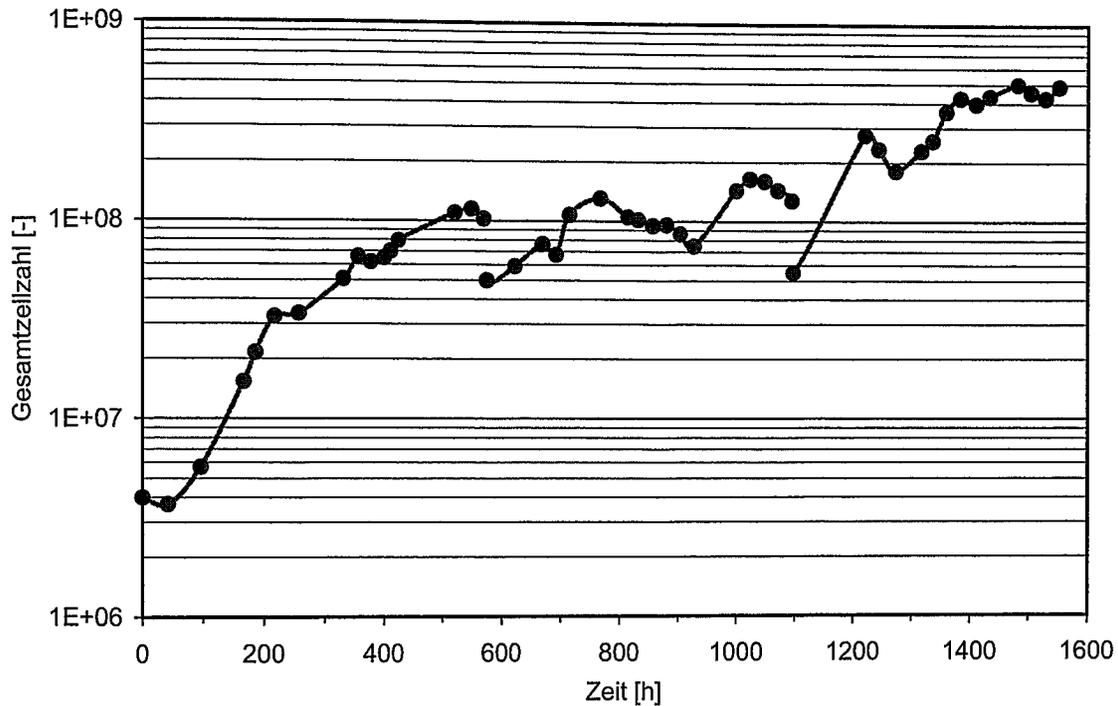


Abbildung 9.9: Verlauf der Gesamtzellzahl der Zelllinie NK-92 vor der Transplantation

tineinsatz einer solchen Technik sind geregelte Handlungsabläufe und eine genaue Dokumentation erforderlich. Daher wurde für den Betrieb des neuen Suspensionsreaktors für die Kultivierung der Zelllinie NK-92 eine Standardarbeitsanweisung verfasst (Kapitel J auf Seite 241). Sie bildete auch die Grundlage für die beiden Kultivierungen im klinischen Umfeld.

9.4 Klinische Anwendung

Im Rahmen der Phase I der Studie für Kinder und Jugendliche wurden, nachdem die ersten Kultivierungen erfolgreich verlaufen waren, Zellen aus einer Kultivierung im Reaktor zusammen mit Zellen aus Kulturen in den bisher üblichen Wannenstapeln einem Patienten transplantiert. Die Kultivierung im Reaktor wurde äquivalent zu den vorangegangenen gemäß der SOP durchgeführt. Entsprechend dem Protokoll der Studie (Kapitel H auf Seite 213) wurde als Medium unsupplementiertes X-Vivo 10 mit 5% hhiQ-Plasma und 100 U/mL IL-2 verwendet.

Abbildung 9.9 zeigt den Verlauf der Gesamtzellzahl. Das Inokulum betrug $4 \cdot 10^6$ Zellen in 200 mL Medium. In den ersten 350 Stunden wurde das Kulturvolumen auf 500 mL erhöht. Danach blieb die Kultur konstant bei diesem Volumen. Nach 570 und 1100 Stunden wurde 250 beziehungsweise 300 mL Zellsuspension aus dem Reaktor abgeerntet und durch Frischmedium ersetzt. Die abgeernteten Zellen wurden verworfen. Durch dieses Vorgehen konnte die Kultur problemlos über die sehr lange Gesamtkulturdauer von 65 Tagen aufrechterhalten werden, ohne dass die Kultur limitiert oder inhibiert war. Die minimale Glukose-Konzentration betrug 2,8 g/L, die Laktat-Konzentration lag zu jeder Zeit unter 19 mmol/L.

Die Möglichkeit, die Kulturzeit beliebig zu verlängern, ist im klinischen Einsatz relevant, da sich so die Kultur nach den Bedürfnissen des Patienten ausrichten lässt. Der Zeitpunkt

der Zellernte für die Transplantation kann gegebenenfalls problemlos verschoben werden.

Nach 1553 Stunden wurde der Reaktorinhalt vollständig abgeerntet. Dazu wird an den Probenahmeschlauch ein handelsüblicher 500 mL-Blutbeutel steril angeschweißt. Die Zellsuspension kann dann ohne Einsatz von zellschädigenden Pumpen in den Beutel geleitet werden. Nachdem der Beutel abgeschweißt wurde, können die Zellen unabhängig vom Reaktor weiterverarbeitet werden.

Die Präparation der Zellen aus dem Reaktor erfolgte zusammen mit den Zellen aus den Wannenstapeln, die ebenfalls in 500 mL-Blutbeutel überführt worden waren. Alle Arbeiten wurden im Produktionsbereich des Blutspendedienstes durchgeführt. Dabei wurden Arbeiten an offenen Behältnissen unter Bedingungen der Reinraumklasse 100 (gemäß US Norm US Federal Standard 209 E) und Arbeiten mit geschlossenen Systemen unter Bedingungen der Reinraumklasse 10 000 durchgeführt.

Die Beutel mit den Zellsuspensionen wurden zentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen und verworfen. Bei dem Überstand des Beutels aus dem Reaktor wurde zuvor eine zusätzliche Sterilprobe entnommen. Die verbleibenden hochzellichten Suspensionen wurden in einem Beutel vereinigt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnten die Zellen in 500 mL X-Vivo 10 aufgenommen werden. Aus diesem Endprodukt wurden Proben zur Sterilkontrolle und für die Zellzahlbestimmung, sowie Rückstellproben entnommen.

Der Patient, der diese Zellen transplantiert bekam, ist ein 25jähriger Mann der unter einem Hirntumor leidet. Die angestrebte Dosis betrug $3 \cdot 10^9$ c/m² Körperoberfläche, wobei der Patient eine Körperoberfläche von 1,44 m² hat. Aus dem Beutel mit dem Produkt wurden demnach nur $4,32 \cdot 10^9$ Zellen benötigt, die in 240 mL enthalten waren. Die überschüssige Zellsuspension wurde in einen separaten Beutel überführt und für Forschungszwecke weiterverwendet. Die Zellen wurden dem Patienten in 1,5 Stunden intravenös verabreicht. Von diesen Zellen stammten 6,41 %, also $2,76 \cdot 10^8$ Zellen, aus dem neuen Suspensionsreaktor.

Diese Transplantation war die zweite, 48 Stunden zuvor hatte der Patient bereits die gleiche Zelldosis erhalten. Beide Transplantationen verliefen komplikationslos und es zeigten sich keinerlei Nebenwirkungen. Damit ist die primäre Zielsetzung der klinischen Phase I erfüllt. Einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Patienten konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt (drei Monate nach der Transplantation) nicht beobachtet werden. Allerdings ist es auch prinzipiell sehr fraglich, ob ein Hirntumor eine passende Indikation für den Therapieansatz darstellt. Solange die Blut-Hirn-Schranke in ihrer Funktion durch den Tumor nicht beeinträchtigt ist, sind die malignen Zellen für die NK-92-Zellen nicht angreifbar. In der Phase II der Studie, in der die Wirksamkeit der Therapie nachgewiesen werden soll, muss diese Schwierigkeit beachtet werden.

Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden neue Kultursysteme entwickelt, etabliert und in klinisch relevanten Anwendungen vorgestellt. Die Ergebnisse lassen Schlussfolgerungen für den sinnvollen Einsatz der hier entwickelten Kultursysteme zu. Daneben bietet sich auch eine Möglichkeit für eine Aussage, welche Strategie weniger sinnvoll ist.

Im Bereich der Kultivierung hämatopoetischer Zellen spielt die gründliche Versuchsplanung eine überdurchschnittlich große Rolle. Durch die hohen Medienkosten, den großen manuellen Aufwand, den die Analytik der Experimente erfordert, und die sehr begrenzte Zahl verfügbaren Spendermaterials ist aus ökonomischen und praktischen Gründen die Zahl der möglichen Versuche sehr begrenzt. Darüber hinaus unterliegen gerade die Experimente mit Primärmaterial einer hohen Spendervariabilität und sind daher oft nur schwer mit anderen Versuchen vergleichbar. Es müssen deshalb vor jedem Experiment unbedingt die folgenden Fragen überdacht werden:

- Was ist das genaue Versuchsziel? Welche Subpopulation soll expandiert werden? Stimmt die Kulturdauer mit der maximalen Expansion der untersuchten Subpopulation überein?
- Ist der Einsatz einer Modellzelllinie möglich?
- Gibt es die Möglichkeit, die eingesetzten Mengen an Medium und Zellen zu reduzieren?
- Ist die Vergleichbarkeit des potentiellen Versuchsergebnisses gewährleistet? Ist ein Standard bezüglich des Kultursystems, des Mediums und der Zytokinkombination im Experiment (eventuell auch ein Zellstandard) integriert?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können bei der Beantwortung mehrerer dieser Fragen helfen. Zum einen konnte die Zelllinie KG-1 als Modellzelllinie für die suspendierte und die immobilisierte Kultur etabliert werden. Zum anderen wurde zu jedem der entwickelten Reaktorsysteme eine beispielhafte Kultivierung durchgeführt. Die Aufgabe der Kultivierungen in dieser Arbeit, mit Ausnahme der Zelllinie NK-92, bestand nicht in der endgültigen Optimierung der einzelnen Kulturbedingungen, sondern in der Entwicklung der geeigneten Kultursysteme und -strategien, dem Nachweis ihrer Funktionsfähigkeit und dem Bereitstellen von Vergleichsdaten.

10.1 Weniger erfolgreiche Konzepte

Eine unvoreingenommene Herangehensweise ist in der Forschung selbstverständlich. Die folgenden kurz dargestellten Punkte sind deshalb in dem im vorherigen Abschnitt dargestellten Zusammenhang der fundierten Versuchsplanung zu sehen. Sie stellen Ansätze mit einem negativen Ergebnis dar, die bei zukünftigen Versuchen eher eine niedrige Priorität erhalten sollten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass diese Konzepte nicht bei einem in der Zukunft erweiterten Wissensstand wieder sinnvoll sind und erfolgreich durchgeführt werden könnten.

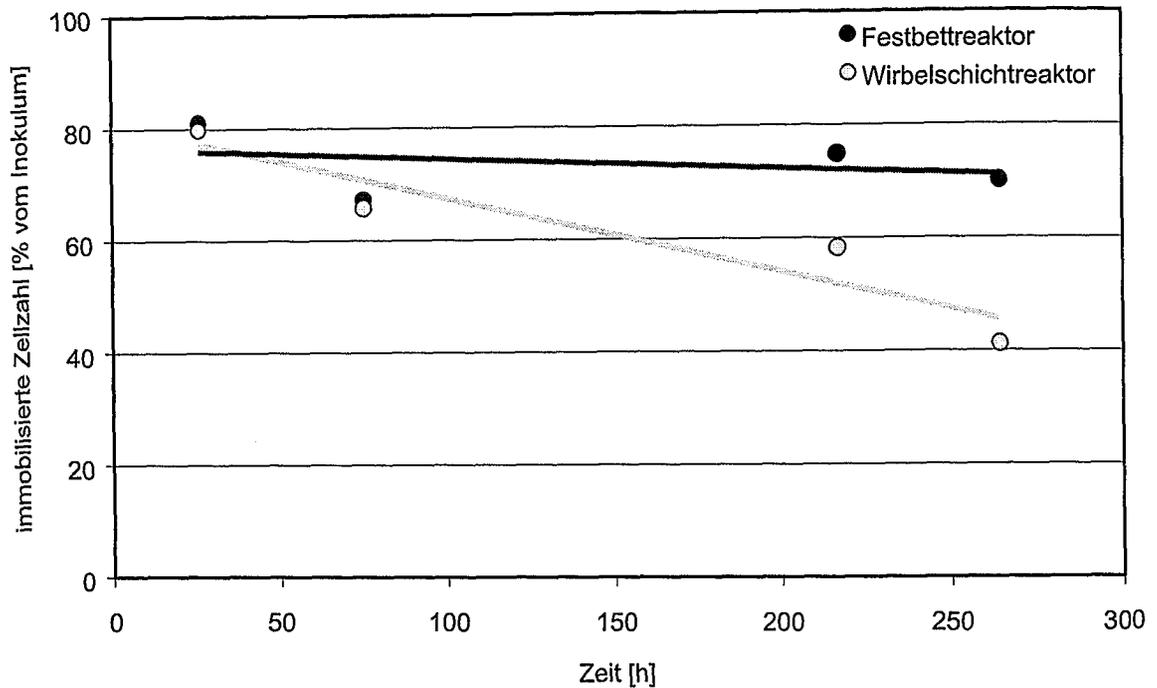


Abbildung 10.1: Vergleich der auf den Mikroträgern immobilisierten Zellzahl der Zelllinie M2-10B4 als Relativwert zum Inokulum

10.1.1 Wirbelschichttechnik

Die Verwendung eines Festbettreaktors war das zentrale Ergebnis der Dissertation von SCHRÖDER [243]. Er zeigte, dass eine Kultivierung in einem Wirbelschichtreaktor nicht möglich ist. Die Wirbelschichttechnik böte Vorteile gegenüber dem Festbett. Die Gradientenbildung über die Betthöhe, sowohl bezüglich der immobilisierten Zelldichte, als auch des Sauerstoffpartialdruckes kann in einer Wirbelschicht leicht verhindert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer Kultivierung hämatopoetischer Zellen in einer Wirbelschicht erneut überprüft. In einem parallelen Versuch konnte die wachstumsarretierte stromale Zelllinie M2-10B4 im Wirbelschicht- wie im Festbettreaktor äquivalent immobilisiert werden (Abbildung 10.1). Im Verlauf der Kultur sank aber die Zellzahl im Wirbelschichtreaktor kontinuierlich ab. Im Festbettreaktor blieb die Zellzahl dagegen konstant. Dies ist dasselbe Ergebnis, das auch SCHRÖDER beobachten konnte.

Über die Gründe dieses Zellverlusts kann nur spekuliert werden. Die Zellen immobilisieren auch in der Wirbelschicht sehr gut, ähnlich wie es bei tierischen Zelllinien in diesem Reaktortyp zu beobachten ist. Erst im Verlauf der Kultivierung lösen sich die Zellen langsam von den Trägern ab. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Ursache in der sich im Laufe der Zeit ausbildenden extrazellulären Matrix zu suchen ist.

In orientierenden Voruntersuchungen zum Scherkräfteeinfluss auf die stromalen Zellen wurden diese auf Objektträgern immobilisiert und definiert laminar überströmt. Es konnte dabei beobachtet werden, dass sich ab einer gewissen Schubspannung die gesamte Extrazellulärmatrix mit den Zellen wie ein Film vom Objektträger ablöste. Ähnliches könnte auch auf den Mikroträgern im Wirbelschichtreaktor geschehen, sobald die sich zunehmend ausbildende extrazelluläre Matrix Angriffspunkte für die Strömung bietet.

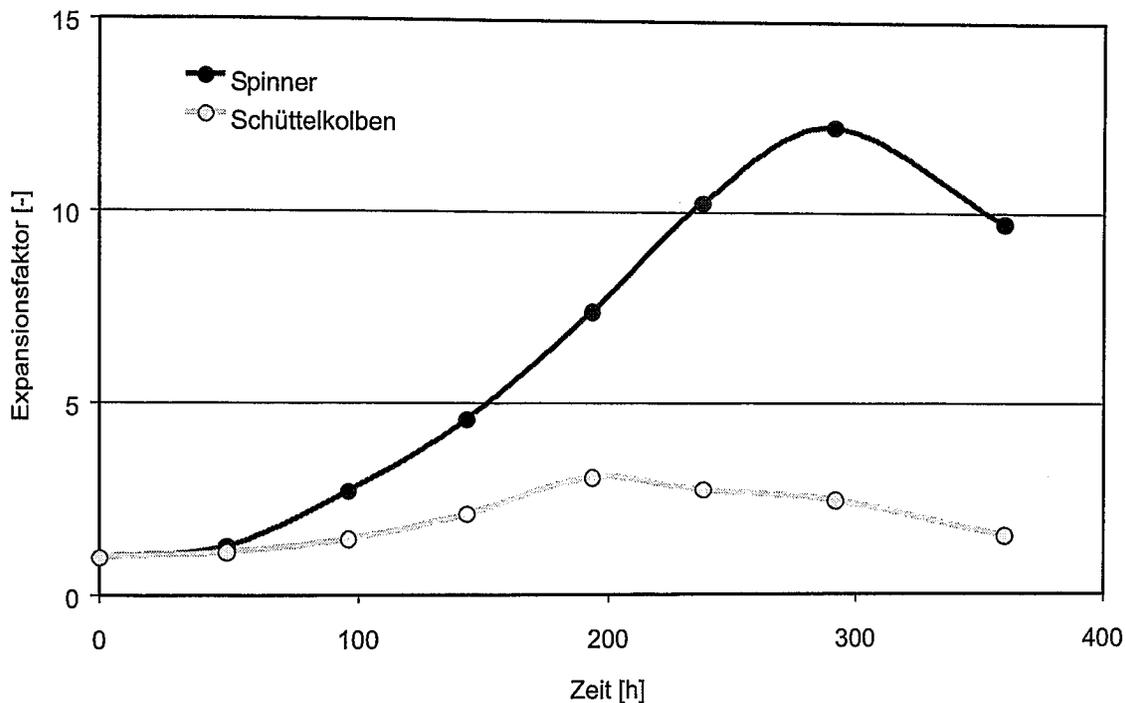


Abbildung 10.2: Vergleich der Zellexpansion der Modellzelllinie KG-1 im Spinner und im Schüttelkolben

10.1.2 Schüttelkolben

Schüttelkolben sind ein Standardsystem in der mikrobiellen Fermentationstechnik. Für die Zellkulturtechnik gilt aber üblicherweise, dass eine Kultivierung von humanen oder tierischen Zellen in Schüttelkolben nicht möglich ist. Die auftretenden Scherkräfte sind zu hoch. Daher werden bis auf vereinzelte Ausnahmen [53] Schüttelkolben für Zellkulturen nicht eingesetzt.

Allerdings ist diese Meinung auch so verfestigt, dass keinerlei Überprüfung stattfindet. Bei der Kultivierung ganz neuer Zelltypen, wie den hämatopoetischen Zellen, sollte man aber auf keinen Fall auf eine Prüfung verzichten. Unterstützt wird dies durch KAZANSKY, der einen Schüttler entwickelte, mit dem er auch Zellen, und explizit Blutzellen, kultivieren möchte [103].

Es wurden daher mit der Zelllinie KG-1 Versuche im Schüttelkolben durchgeführt, wozu handelsübliche 100 mL Erlenmeyer-Kolben mit 10 mL Kulturvolumen zum Einsatz kamen. Als Referenz diente ein miniaturisierter Spinner mit 10 mL Kulturvolumen und einer Drehzahl von 60 U/min, also den optimierten Bedingungen. Die Schüttelfrequenz des Schüttelkolbens betrug ebenfalls 60 U/min.

Der Verlauf der Expansionsrate in Abbildung 10.2 gibt ein eindeutiges Bild. Das Wachstum der Zellen ist im Schüttelkolben deutlich verringert. Die Tatsache, dass sich diese Entwicklung von Beginn an zeigt, legt nahe, dass es sich nicht um eine Limitierung oder Inhibierung handelt, sondern auf die erhöhten Scherkräfte zurückzuführen ist. Der volumenspezifische Energieeintrag im Schüttelkolben über die Außenwand liegt im Gegensatz zu dem des Spinners über den Magnetrührstab bei gleicher Drehzahl wesentlich höher. Eine Kultivierung bei halber Schüttelfrequenz, also verringertem Energieeintrag, brachte keinen Vorteil. Ein Schüttelkolben ist kein geeignetes Kultursystem für hämatopoetische Zellen.

10.2 Die Kultivierungsstrategie für hämatopoetische Zellen

In der vorliegenden Arbeit ist deutlich geworden, dass die Auswahl des richtigen Kultursystems bei der Kultivierung von humanen hämatopoetischen Zellen sowohl nach biologischen als auch nach ökonomischen Gründen erfolgen muss. Eine wirtschaftliche Betrachtung ist wegen der hohen Prozesskosten in jedem Fall sinnvoll. Vorrangig ist aber die Biologie. Erst das Erreichen der biologischen Zielsetzung, zumeist der Erhalt der Zellfunktionalität, macht eine Lösung anwendbar.

Die Grundentscheidung ist die Frage, ob die Kultivierung in einem immobilisierten oder suspendierten System stattfinden soll. Bei Zellen, die *in vivo* in Suspension existieren, wie die reifen Blutzellen, ist die Wahl einfach, da es weder biologisch, noch wirtschaftlich sinnvoll ist, solche Zellen zu immobilisieren.

Wachsen die Zellen allerdings *in vivo* in einem Zellverbund, wie es bei den frühen hämatopoetischen Zellen der Fall ist, ist die Entscheidung nicht eindeutig. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die biologischen Gründe, insbesondere das Ausdifferenzierungsverhalten der Zellen, für die immobilisierte Kultur sprechen. Die Suspensionskultur ist zurzeit aber in einer klinischen Anwendung bedeutend einfacher zu etablieren. Zusätzlich lassen sich in Suspensionskulturen die notwendigen physikalischen Kulturbedingungen wesentlich präziser einstellen.

Die Voruntersuchungen in Kapitel 4 auf Seite 53 konnten den wichtigen Einfluss physikalischer Parameter für die Suspensionskultur verdeutlichen. Durch die Verweilzeitentkopplung von Medium und Zellen im kontrollierten Suspensionsreaktor ist auch eine genaue Steuerung der Substrat-Konzentrationen möglich. Eine weitere Entkopplung von niedermolekularen Substraten und Zytokinen durch eine gezielte Rückhaltung der Wachstumsfaktoren ist aber nur wenig sinnvoll. Die Zytokine sind sowohl aus biologischen als auch aus ökonomischen Gründen prozessbestimmend. Gerade die Zytokinkonzentrationen sollten daher sehr flexibel einstellbar sein.

Eine Fütterung bei hämatopoetischen Vorläuferzellen ist, unabhängig von der Kulturdauer, erst bei Zelldichten von über $1 \cdot 10^6$ c/mL sinnvoll. Diese Regel kann aber sicherlich bei genauerem Wissen, vor allem bezüglich der Zerfallsraten der Zytokine, Einschränkungen erfahren. Beim derzeitigen Stand der Technik kann die Batch-Kultur bei der Kultivierung früher hämatopoetischer Zellen ähnliche Expansionen erreichen wie die perfundierte Kultur. Der entscheidende Vorteil des neuen Suspensionsreaktors liegt momentan in dem vorhandenen Potenzial, für den Fall, dass höhere Expansionsraten möglich werden. Der Reaktor ermöglicht genaue Untersuchungen der Prozessparameter und die unabhängige Regelung derselben. Der Systemvergleich in Abschnitt 8.1.2.3 auf Seite 123 hat gezeigt, dass in den verschiedenen Kultursystemen unter äquivalenten Bedingungen auch äquivalente Zellexpansionen erreicht werden. Das bedeutet insbesondere, dass die Systeme selbst die Zellen nicht beeinflussen. Besonders bei den gerührten Systemen und dem technisch komplexeren Suspensionsreaktor wäre das denkbar.

Für die Kultivierung stärker proliferierender Zellen, wie beispielsweise T-Lymphozyten, ist die perfundierte Kultur im Vorteil. Gerade wenn das Ziel einer Kultur das Erreichen einer hohen Zelldichte ist, wird die Leistungsfähigkeit der Perfusion erst deutlich. Für diese Anwendungen erwies sich der neue Suspensionsreaktor als gut funktionsfähiges Kultursystem. In diesen Bereichen scheint die technische Herausforderung der Kultivierung gelöst. Insbesondere bei den T-Lymphozyten sind die biologischen Aspekte aber noch sehr problematisch. Erst das Zusammenspiel der biologischen und ingenieurwissenschaftlichen Lösungen wird hier eine optimale Kultivierung ermöglichen.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen nur einen Anfang dar. Das Arbeitsgebiet der Kultivierung hämatopoetischer Zellen ist so umfangreich, und das Wissen über diese Zellen steigt so schnell, dass es wohl unmöglich ist, einen Abschluss zu finden. Weiterhin bieten die hier entwickelten Kultursysteme natürlich auch die Möglichkeit, andere Zelltypen als hämatopoetische zu kultivieren. Das könnten beispielsweise Keratinozyten oder Hepatozyten sein. Die Zahl der denkbaren Anwendungen potenziert sich dadurch. Neben diesen allgemeinen Punkten gibt es aber auch eine Reihe ganz konkreter naheliegender Folgearbeiten in den Bereichen Konstruktion, Verfahrensoptimierung und klinische Anwendung.

11.1 Konstruktive Weiterentwicklungen und Scale-Up

Bei zwei der vier neuen Kultursysteme ist die konstruktive Entwicklung praktisch abgeschlossen. Das ist zum einen der Festbettreaktor, der in dieser Arbeit ausgehend von einer bestehenden Variante konstruktiv optimiert wurde. Zum anderen beruht der miniaturisierte Spinner auf einem Konzept, das seit Jahrzehnten in der Zellkultur bewährt ist. Konstruktive Änderungen sind deshalb nicht notwendig.

Anders stellt sich die Situation bei dem Miniatur-Schlaufenreaktor dar. Während der prinzipielle Aufbau des Systems keiner Modifikation bedarf, gibt es in der speziellen Ausführung Verbesserungspotenzial. Die einzelnen Einsätze, die momentan aus einer Edelstahlhalterung und einem eingelegten Edelstahlsieb bestehen, könnten in einem Stück als Spritzgussbauteil aus Polycarbonat gefertigt werden. Damit wären die Einsätze nicht mehr autoklavierbar und somit Einwegartikel. Die Gewebekulturplatte sollte dann mit den Einsätzen zusammen, zum Beispiel mit Ethylenoxid, sterilisiert werden. Vorteil einer solchen Ausführung wäre, dass die Arbeitsschritte des Autoklavierens der Einsätze und des anschließenden sterilen Bestückens der Gewebekulturplatte entfielen. Dies würde sowohl eine Arbeitserleichterung darstellen als auch die Prozesssicherheit bezüglich der Sterilität erhöhen. Die vollständigen Platten könnten, wie momentan normale Gewebekulturplatten, als sterile Einwegprodukte direkt verwendet werden. Nachteilig an dieser Lösung ist, dass für die Produktion des Spritzgussteils ein entsprechendes Werkzeug gefertigt werden muss und die Sterilisierung von Polycarbonatteilen im normalen Laborbetrieb nicht etabliert ist. Die beschriebene Weiterentwicklung ist daher wahrscheinlich nur dann sinnvoll, wenn der Miniatur-Schlaufenreaktor ein kommerzielles Produkt werden soll. Dann allerdings ist die Ausführung als Einwegartikel wahrscheinlich unabdingbar, da dies Standard in der Zellkultur und besonders im klinischen Bereich ist. Die allgemeine Akzeptanz von Mehrwegartikeln ist gering.

Vor dem Hintergrund einer Kommerzialisierung ist auch der Magnetührantrieb mit der durchströmten Zwischenplatte nicht akzeptabel. Die Lösung ist zwar in jedem Fall funktionsfähig, aber in dieser Form kaum zu vermarkten. Ideal wäre ein Rührantrieb, der keinerlei Kabel oder Zuleitungen von außerhalb des Brutschrankes benötigt. Das hieße zunächst, eine batterie- oder akkumulatorbetriebene Ausführung, bei der zusätzlich das Problem der Wärmeentwicklung gelöst sein müsste. Letzteres kann wahrscheinlich durch eine geringere Leistungsaufnahme der Magnetspulen erreicht werden. Andernfalls käme ein Belüftungssystem in Frage, wie es bei Computer-Prozessoren verwendet wird.

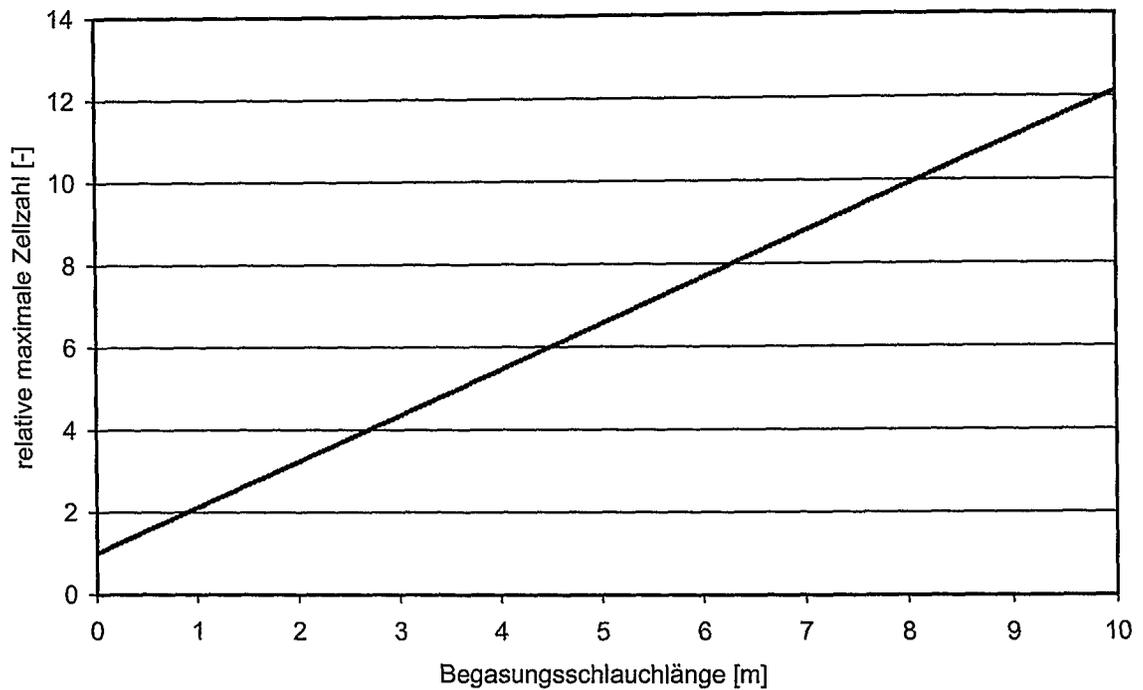


Abbildung 11.1: Mögliche Erhöhung der erreichbaren Zellzahl bei Verwendung einer zusätzlichen Membranbegasung aus Silikonschläuchen

Der kontrollierte Suspensionsreaktor ist konstruktiv ausgereift. Den kritischsten Punkt stellt die Abdichtung des Filters zur Zellrückhaltung dar. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Lösungen sind voll funktionsfähig, erfordern aber einen gewissen Wartungsaufwand und ein manuelles Einlegen des Filters. Dadurch entsteht ein gewisses Risiko einer Undichtigkeit durch fehlerhafte Handhabung. Die Lösung wäre an dieser Stelle ein fest installierter Filter. Damit wären aber auch die Reinigung und ein eventuelles Austauschen des Filters stark erschwert. Beides wären deutliche Nachteile, verglichen mit der jetzigen Situation. Trotzdem dürfte sich ein Vergleich der jetzigen und der fest installierten Lösung lohnen.

Ebenfalls interessant wäre der Scale-up des Suspensionsreaktors. Ein erster einfacher Prototyp wurde bereits gebaut und erfolgreich getestet. Diese sehr einfache Lösung besteht aus dem Suspensionsreaktor, wie er in dieser Arbeit vorgestellt und verwendet wurde, bei dem der Durchmesser des Glasgefäßes auf ganzer Höhe dem maximalen Durchmesser am oberen Flansch entspricht (eine Zeichnung dazu findet sich in Abschnitt F.2.1 auf Seite 205). Ein solches System hat ein maximales Arbeitsvolumen von 1 L. Das Hauptproblem dieser Lösung ist die Sauerstoffversorgung. Bei gefülltem Reaktor ist die Flüssigkeitsoberfläche bei beiden Systemvarianten identisch. Schon die normale Ausführung ist bei hohen Zelldichten sauerstofflimitiert. Der Prototyp wurde deshalb zusätzlich mit einem gewickelten Schlauch als Membranbegasung ausgestattet, vergleichbar mit dem Begasungsgefäß des Festbettreaktors. Durch die zusätzliche Schlauchbegasung lässt sich in einer sauerstofflimitierten Kultur die maximal erreichbare Zellzahl erheblich steigern. In Abbildung 11.1 ist diese mögliche Steigerung in Abhängigkeit von der installierten Schlauchlänge dargestellt. Diese Abschätzung geht von einem Stoffdurchgangskoeffizienten der Schlauchmembran von $K = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ m/h}$ aus, was eine grobe Abschätzung darstellt. Eine genaue Auslegung und Optimierung der Begasung ist in jedem Fall noch notwendig.

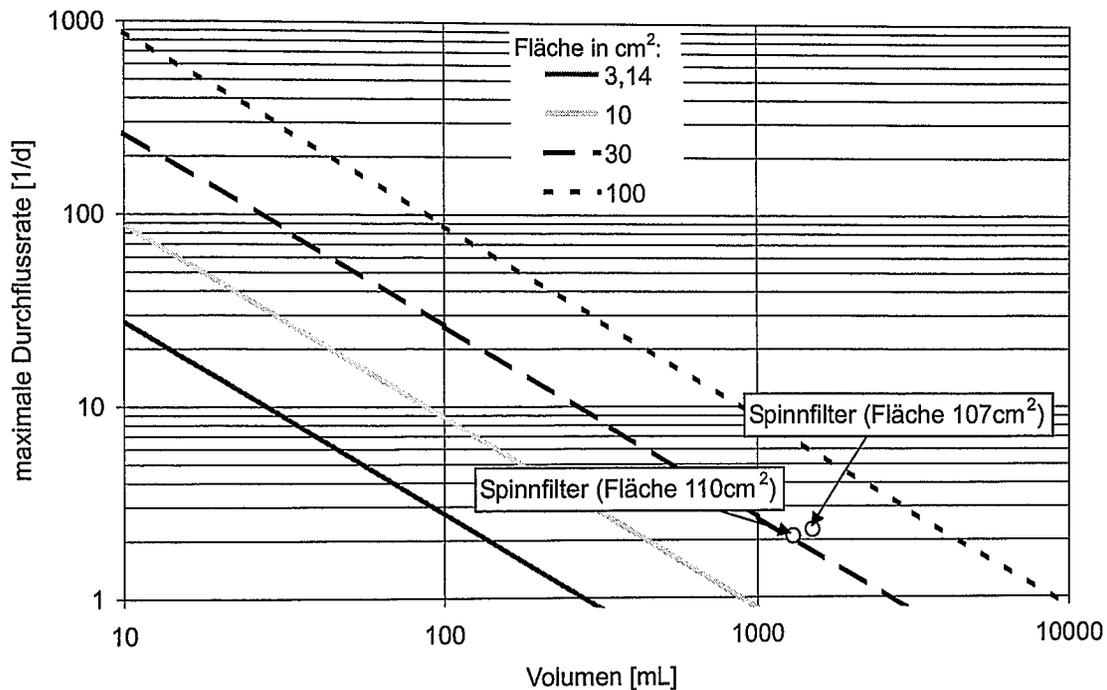


Abbildung 11.2: Abschätzung des neuen Filtrationssystems und Vergleich mit dem Spinnfilter (Daten aus [16, 57])

Über den Scale-up des Suspensionsreaktors hinaus wäre eine separate Verwendung des Zellrückhaltesystems in Standard-Reaktoren von großem Interesse. Das Prinzip müsste dabei erhalten bleiben: Das Medium wird durch den Filter aktiv aus dem Reaktor herausgepumpt, wobei die Filterfläche möglichst dicht an dem Rührorgan platziert sein sollte. Unter diesen Voraussetzungen war im neuen Suspensionsreaktor nie eine Verblockung des Filters bei konstant hohen Rückhalteraten beobachtet worden. Für die großen Standard-Rührkessel müsste der Ablauf mit Filter ein relativ flexibles Modul sein, das sich in das Baukastenprinzip der Reaktoren einpasst, deren Einbauten meistens sehr frei konfigurierbar sind. Eine solche Zellrückhaltung wäre damit eine direkte Konkurrenz zum klassischen Spinnfilter. Abbildung 11.2 zeigt eine Abschätzung der maximalen Durchflussrate für verschiedene Filterflächen und Reaktorvolumina. Zwei typische Betriebspunkte für Reaktoren mit Spinnfiltern sind ebenfalls dargestellt. Man erkennt deutlich, dass das neue System mit einer wesentlich geringeren Filterfläche die gleiche Leistung erbringen kann.

11.2 Verfahrensoptimierung

Wie bereits an entsprechender Stelle erwähnt, sind in der vorliegenden Arbeit nicht die Kultivierungsparameter hämatopoetischer Zellen optimiert worden. Vielmehr bieten die entwickelten Kultursysteme die Voraussetzung dafür. In Bezug auf die immobilisierte strommahaltige Kultur sei an dieser Stelle nur noch einmal auf die parallel durchgeführte Arbeit von NANNI JELINEK verwiesen [97]. Bei der Suspensionskultur der Vorläuferzellen bietet sich der neue Reaktor an, um verschiedene Einflussparameter einzeln und unabhängig voneinander zu untersuchen. Das System ermöglicht die Variation einzelner Faktoren, wie zum Beispiel dem Sauerstoffgehalt oder die Medienbestandteile ohne andere Parameter zu verändern. Dadurch könnte man die Einflüsse einzeln und unabhängig voneinander bestim-

men. Parallel dazu sollten Untersuchungen speziell zu den Zytokinen durchgeführt werden. Dabei sind sowohl die Zytokin-Zerfallsraten unter Kulturbedingungen als auch die Verbrauchsdaten und die Einflüsse verschiedener Parameter auf diese von großem Interesse. Zusätzlich gilt es selbstverständlich, weiter strukturiert, beispielsweise mit dem genetischen Algorithmus, nach besseren Zytokinkombinationen zu suchen.

Für die Kultivierung der T-Lymphozyten ist die technische Umsetzung keine zentrale Aufgabe mehr. Es konnte gezeigt werden, dass der neue Suspensionsreaktor allein oder in Kombination mit einem größeren System sehr gut für eine solche Kultivierung geeignet ist. Die eigentliche Schwierigkeit liegt in der richtigen, an die Anwendung angepassten Stimulation der Zellen. Ein Problem, das zunächst im Kleinstmaßstab gelöst werden muss. Je nach Anwendung ist die Herausforderung, die Zellen richtig zu stimulieren, mit der zu vergleichen, Stammzellen zu vermehren.

11.3 Klinische Anwendungen

Die Etablierung des neuen Suspensionsreaktors im klinischen Umfeld hat die prinzipielle Möglichkeit verdeutlicht, auch ein komplexeres Kultursystem in einer medizinischen Anwendung zu nutzen. In ähnlichen Einsatzgebieten, also der Kultivierung anderer Zelllinien oder von T-Lymphozyten, kann der Reaktor wohl problemlos benutzt werden.

Die Kultivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Suspensionsreaktor ist zwar prinzipiell denkbar, beim heutigen Stand der Kultivierungen ist aber der miniaturisierte Spinner in der klinischen Anwendung vorteilhaft. In den vergleichenden Untersuchungen zeigte sich, dass der Spinner und der Reaktor gleichwertige Ergebnisse liefern. Die Spenderzellzahl und die allgemeine Expansion der Zellen sind dabei nicht so groß, dass die Kapazität des Spinners nicht ausreichen würde, weshalb er problemlos einsetzbar wäre. Der wichtigste Vorteil des Spinners gegenüber dem Suspensionsreaktor ist die einfachere Handhabung. Bei gleicher Kultivierungsleistung ist dies das entscheidende Argument für den Einsatz des Spinners.

Die immobilisierten Systeme werden trotz der überlegenen Ergebnisse keinen einfachen Zugang zur klinischen Anwendung haben. Die Komplexität des Systems und der Anspruch an das Bedienungspersonal sind zu groß für einen Routinebetrieb. Eine zusätzliche Problematik ist die Tatsache, dass die Zellen vor einer Infusion in einen Patienten von den Mikroträgern gelöst werden müssen. Es ist also mindestens ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt notwendig. Darüber hinaus ist zurzeit keine humane stromale Zelllinie verfügbar, die sich für die Kokultivierung eignet. Das bedeutet, dass man auch bei einer patientenspezifischen Kultivierung auf murine Zellen zurückgreifen müsste. Dies ist für den klinischen Zulassungsprozess äußerst kritisch. Eine Abtrennung der murinen Zellen ist zwar möglich, eine Garantie, dass nicht eine einzige murine Zelle in den Patienten gelangt, kann es aber nie geben.

11.4 Schlussgedanken

Die vielen neuen Möglichkeiten, die sich durch die modernen Methoden der Biotechnologie ergeben, wecken auch große Hoffnungen in der Krebstherapie. So einleuchtend diese neuen Ansätze in der Theorie auch sind, die Erfolge stellen sich nur sehr langsam ein. Beispielsweise sind die großen Hoffnungen, durch eine Hochdosis-Chemotherapie die Heilungschancen beim metastasierenden Mammakarzinom zu verbessern, erst vor kurzem enttäuscht worden [254].

Der Glaube, die neuen Methoden brächten den Sieg über die Krebserkrankungen, wird sicherlich ebenso enttäuscht werden, wie er es schon bei der Einführung der Chemothera-

pien wurde. Die Fortschritte werden klein sein und immer von einer viel größeren Zahl von Misserfolgen begleitet werden.

Trotzdem liegen die größten Hoffnungen heute auf den biotechnologischen Methoden. Die vorliegende Arbeit versucht, einen Beitrag zu diesen Entwicklungen zu leisten. Wenn die hier erzielten Ergebnisse irgendwann dazu führen würden, dass auch nur einem einzigen krebskranken Menschen besser geholfen werden konnte, wäre die Arbeit ein Erfolg.

Zusammenfassung

Die *ex vivo* Expansion hämatopoetischer Zellen ist eine Schlüsseltechnologie bei vielen neuen Strategien in der Krebstherapie. Für diese Anwendungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein System von Kultivierungstechniken entwickelt. Dieses wurde verfahrenstechnisch charakterisiert, so dass es flexibel, individuell und an die speziellen Anwendungen angepasst eingesetzt werden kann.

Der Festbettreaktor ermöglicht die Kultivierung hämatopoetischer Zellen in Kokultur zusammen mit Stromalen Zellen und immobilisiert auf porösen Mikroträgern. Das System hat eine ausreichende Größe um klinisch relevante Zellzahlen zu generieren. Dazu passend wurde der Miniatur-Schlaufenreaktor entwickelt, der im 1 mL Maßstab parallele Experimente erlaubt und so trotz der geringen Zellzahl in einer einzelnen Spende für den Festbettreaktor relevante vergleichende Untersuchungen gestattet.

Eine stromafreie Kultivierung in Suspension ermöglicht der neu entwickelte Suspensionsreaktor. In diesem System ist die kontrollierte Kultivierung der Zellen in einem minimalen Volumen von 40 mL möglich. Durch eine integrierte Zellrückhaltung mittels Filtration kann die Kultur auch perfundiert mit Zelldichten von über $1 \cdot 10^7$ c/mL betrieben werden. Der Filter zur Zellrückhaltung ist dabei so dicht über dem Rührer angeordnet, dass es zu keinen Verblockungen kommt. Der Rührer ist ein ebenfalls neuentwickelter scherarmer Magnetrührstab, der keine Zellen schädigt. Trotz der schonenden Durchmischung werden $k_1 a$ -Werte bis zu $5,4$ 1/h erreicht. Das System erlaubt eine sehr hohe Expansion der Zellen (mehr als Faktor 1400) in einem einzelnen, geschlossenen Kultursystem. Für parallele Versuche im kleineren Maßstab wurde auch für die Suspensionskultur ein miniaturisiertes System entwickelt. Es handelt sich dabei um einen Spinner, der mit einem Kulturvolumen von 10 mL betrieben werden kann.

Alle Kultursysteme konnten erfolgreich für die Kultivierung hämatopoetischer Progenitorzellen eingesetzt werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Kokultivierung im Festbettreaktor, in dem die *in vivo* Situation mimikriert wird, eine stabilere Vermehrung des ganzen hämatopoetischen Systems möglich ist. In Suspension unterliegen die Zellen einer stärkeren Ausdifferenzierung. Trotzdem konnten hier im Tierversuch auch nach sieben Tagen Kultivierung mausrepopulierende Zellen nachgewiesen werden.

Für die Optimierung der Kultivierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, besonders in Suspensionskulturen, konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Ein Einfluss der Werkstoffe, die für die Konstruktion der Kultursysteme verwendet wurden, konnte nachgewiesen werden. Allerdings waren relevante Schädigungen nur bei hämatopoetischen, nicht bei Stromalen Zellen zu beobachten. Die Werkstoffe Glas, Silikon, Viton und Edelstahl erscheinen danach problematisch. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Schädigungen im technischen System vernachlässigbar klein sind.

Einen deutlichen Effekt hat auch die Osmolalität des Mediums, bei der unterschiedliche Optima für verschiedene Zellsubpopulationen gefunden wurden. Der Wert, der die Gesamtheit der hämatopoetischen Zellen am besten unterstützt, liegt bei $0,31$ – $0,32$ Osmol/kg.

Eine Fütterung der Suspensionskultur mit Medium und Zytokinen ist erst bei Zelldichten über $1 \cdot 10^6$ c/mL sinnvoll, üblicherweise also bei Kultivierungen, die länger als sieben Tage dauern.

Als Modell für hämatopoetische Vorläuferzellen konnte die Zelllinie KG-1 erfolgreich etabliert und kultiviert werden. Sie wurde insbesondere bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Scherkräften charakterisiert. Darüber hinaus wurden T-Lymphozyten als Beispiel für einen ausdifferenzierten Zelltyp im neuen Suspensionsreaktor effektiv vorkultiviert, um dann in einem 20 L-Rührkessel eine klinisch relevante Zahl von $2,9 \cdot 10^{10}$ Zellen zu generieren. Die Funktionalität der expandierten Zellen konnte in einem Zytotoxizitäts Assay nachgewiesen werden.

Mit der Zelllinie NK-92 gelang im neuen Suspensionsreaktor mehr als nur die Generierung der für eine Anwendung notwendigen Zellzahl und dem Nachweis der Funktionalität. Das Kultursystem konnte darüber hinaus im klinischen Umfeld etabliert und in eine klinische Studie Phase I/II zur Krebstherapie bei Kindern und Jugendlichen eingebracht werden. Die transfundierten Zellen aus dem Suspensionsreaktor wurden von dem behandelten Patienten gut vertragen und lösten keinerlei Abstoßungsreaktionen aus.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] I. Abu-Reesh, F. Kargi. *Biological responses of hybridoma cells to defined hydrodynamic shear stress*. Journal of Biotechnology, Vol. 9, pp. 167–178, 1989.
- [2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3. edition, 1995.
- [3] W. S. Alexander. *Cytokines in Hematopoiesis*. International Review of Immunology, Vol. 16, pp. 651–682, 1998.
- [4] R. D. Armstrong, W. C. Ogier, J. Maluta. *Clinical Systems for the Production of Human Cells and Tissues*. Bio/Technology, Vol. 13, pp. 449–453, 1995.
- [5] C. Atalay. *Der Einfluß von Aminosäuren auf das Wachstum und die Produktbildung von Hybridomazellen*. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 1995.
- [6] C. R. Bachier, E. Gokmen, J. Teale, S. Lanzkron, C. Childs, W. Franklin, E. Shpall, J. Douville, S. Weber, T. Muller, D. Armstrong, C. F. Lemaistre. *Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer*. Experimental Hematology, Vol. 27, pp. 615–623, 1999.
- [7] J. Bagley, M. Rosenzweig, D. F. Marks, M. J. Pykett. *Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device*. Experimental Hematology, Vol. 27, pp. 496–504, 1999.
- [8] A. N. Barclay, M. H. Brown, S. K. A. Law, A. J. McKnight, M. G. Tomlinson, P. A. van der Merwe. *The Leucocyte Antigen FactsBook*. Academic Press, San Diego, 2. edition, 1997.
- [9] M. J. Barnett, C. J. Eaves, G. L. Phillips, R. D. Gascoyne, D. E. Hogge, D. E. Horsman, R. K. Humphries, H.-G. Klingemann, P. M. Lansdorp, S. H. Nantel, D. E. Reece, J. D. Shepherd, J. J. Spinelli, H. J. Sutherland, A. C. Eaves. *Autografting With Cultured Marrow in Chronic Myeloid Leukemia: Results of a Pilot Study*. Blood, Vol. 84, No. 3, pp. 724–732, 1994.
- [10] E. Bartholome (Hrsg.). *Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 4. edition, 1981.
- [11] N. Becker, J. Wahrendorf. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland/Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990*. Springer Verlag, Heidelberg, 1998.
- [12] J. G. Bender, L. B. To, S. Williams, L. S. Schwartzberg. *Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells*. Journal of Hematotherapy, Vol. 1, No. 4, pp. 329–341, 1992.
- [13] M. Bhatia, D. Bonnet, U. Kapp, J. C. Y. Wang, B. Murdoch, J. E. Dick. *Quantitative Analysis Reveals Expansion of Human Hematopoietic Repopulating Cells After Short-term Ex Vivo Culture*. The Journal of Experimental Medicine, Vol. 186, No. 4, pp. 619–624, 1997.

- [14] M. Bhatia, D. Bonnet, B. Murdoch, O. I. Gan, J. E. Dick. *A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity*. *Nature Medicine*, Vol. 4, No. 9, pp. 1038–1045, 1998.
- [15] R. Bhatia, P. B. McGlave, J. S. Miller, S. Wissink, W.-N. Lin, C. M. Verfaillie. *A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium*. *Experimental Hematology*, Vol. 25, pp. 980–991, 1997.
- [16] H. Bierau, A. Perani, M. Al-Rubeai, A. N. Emery. *A comparison of intensive cell culture bioreactors operating with Hybridomas modified for inhibited apoptotic response*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 62, pp. 195–207, 1998.
- [17] C. Born. *Charakterisierung des Stofftransports über eine Membran bei der blasenfreien Sauerstoffversorgung von Wirbelschichtreaktoren für die Zellkulturtechnik*. Diplomarbeit, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 1992.
- [18] C. Born. *Prozeßintensivierung in der Zellkultur - dargestellt am Beispiel der Antikörperproduktion*. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 1996.
- [19] C. Born, Z. Zhang, M. Al-Rubeai, C. R. Thomas. *Estimation of Disruption of Animal Cells by Laminar Shear Stress*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 40, pp. 1004–1010, 1992.
- [20] H.-J. Bräutigam. *Untersuchungen zum Einsatz von nichtporösen Kunststoff-(Silikonkautschuk)-Membranen als Sauerstoffeintragungssystem*. Dissertation, Technische Universität, Hamburg-Haarburg, 1986.
- [21] D. A. Breems, E. A. W. Blokland, K. E. Siebel, A. E. M. Mayen, L. J. A. Engels, R. E. Ploemacher. *Stroma-Contact Prevents Loss of Hematopoietic Stem Cell Quality During Ex Vivo Expansion of CD34+ Mobilized Peripheral Blood Stem Cells*. *Blood*, Vol. 91, No. 1, pp. 111–117, 1998.
- [22] H. E. Broxmeyer, S. Cooper, T. Gabig. *The effects of oxidizing species derived from molecular oxygen on the proliferation in vitro of human granulocyte-macrophage progenitor cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 554, pp. 177–84, 1989.
- [23] H. E. Broxmeyer, S. Cooper, L. Lu, M. E. Miller, C. D. Langefeld, P. Ralph. *Enhanced Stimulation of Human Bone Marrow Macrophage Colony Formation In Vitro by Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor in Agarose Medium and at Low Oxygen Tension*. *Blood*, Vol. 76, No. 2, pp. 323–329, 1990.
- [24] H. E. Broxmeyer, L. Lu, J. Gaddy, L. Ruggieri, A. Srivastava, G. Risdon. *Human Umbilical Cord Blood Transplantation: The Immunology, Expansion, and Therapeutic Applications of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. In D. Levitt, R. Mertelsmann, Hrsg., *Hematopoietic stem cells; Biology and Therapeutic Applications*, pp. 297–317. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- [25] W. Brugger, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, L. Kanz. *Reconstitution of Hematopoiesis after High-Dose Chemotherapy by Autologous Progenitor Cells Generated Ex Vivo*. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 333, No. 5, pp. 283–287, 1995.
- [26] W. Brugger, W. Möcklin, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, L. Kanz. *Ex Vivo Expansion of Enriched Peripheral Blood CD34+ Progenitor Cells by Stem Cell*

- Factor, Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, Interferon- γ , and Erythropoietin.* Blood, Vol. 81, No. 10, pp. 2579–2584, 1993.
- [27] M. B. Burg, E. D. Kwon, D. Kültz. *Regulation of Gene Expression by Hypertonicity.* Annual Review of Physiology, Vol. 59, pp. 437–455, 1997.
- [28] F. Burke, M. S. Naylor, B. Davies, F. Balkwill. *The Cytokine Wall Chart.* Immunology Today, Vol. 14, No. 4, pp. 165–170, 1993.
- [29] M. S. Cairo, J. E. Wagner. *Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation.* Blood, Vol. 90, No. 12, pp. 4665–4678, 1997.
- [30] A. I. Caplan. *Mesenchymal Stem Cells.* Journal of Orthopaedic Research, Vol. 9, pp. 641–650, 1991.
- [31] K. S. Carswell, E. T. Papoutsakis. *Culture of Human T Cells in Stirred Bioreactors for Cellular Immunotherapy Applications: Shear, Proliferation, and the IL-2 Receptor.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 68, No. 3, pp. 328–338, 2000.
- [32] C. Chabannon, J. L. Blache, I. Sielleur, J. Douville, C. Faucher, G. Gravis, C. Arnoulet, S. Oziel-Taieb, D. Blaise, G. Novakovitch, J. Camerlo, I. Chabbert, D. Genre, M. Appel, D. Armstrong, D. Maraninchi, P. Viens. *Production of ex vivo expanded hematopoietic cells and progenitors in a closed bioreactor, starting with a small volume marrow collection: A feasibility study in patients with poor-risk breast cancer and receiving high-doses of cyclophosphamide.* International Journal of Oncology, Vol. 15, No. 3, pp. 511–518, 1999.
- [33] C. Chabannon, G. Novakovitch, J.-L. Blache, S. Olivero, J. Camerlo, D. Genre, D. Maraninchi, P. Viens. *The role of autologous hematopoietic progenitor and cell reinfusion for intensive chemotherapy in women with poor-prognosis breast cancer. Clinical studies with ex-vivo expanded cells produced with the Aastrom Replacell technology.* Hematology and Cell Therapy, Vol. 41, pp. 78–81, 1999.
- [34] R. Champlin, R. Mehra, J. Gajewski, I. Khouri, D. Geisler, M. Davis, K. Oba, M. Thomas, R. D. Armstrong, J. Douville, S. Weber, S. Silver, T. Muller, A. Deisseroth. *Ex Vivo Expanded Progenitor Cell Transplantation in Patients with Breast Cancer.* Blood, Vol. 86, Supplement 1, 1995.
- [35] N. J. Chao, K. G. Blume. *Reconstruction of Hematopoiesis after Allogenic Bone Marrow Transplantation.* In J. D. Armitage, K. H. Autman, Hrsg., *High-Dose Cancer Therapy. Pharmacology, Hematopoiesis, Stem Cells*, pp. 159–171. Williams and Wilkins, Baltimor, 2. edition, 1995.
- [36] N. Chatzisavido, T. Björling, C. Fenge, S. Boork, E. Lindner-Olsson, S. Apelman. *A Continuous Cell Centrifuge for Lab Scale Perfusion Processes of Mammalian Cells.* In T. Kobayashi, Y. Kitagawa, K. Okumura, Hrsg., *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 6, pp. 463–468. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- [37] R. S. Cherry, E. T. Papoutsakis. *Understanding and Controlling Fluid-Mechanical Injury of Animal Cells in Bioreactors.* In R. E. Spier, J. B. Griffiths, Hrsg., *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 4, pp. 71–121. Academic Press Limited, London, 1990.
- [38] K. K. Chittur, L. V. McIntire, R. R. Rich. *Shear Stress Effects on Human T Cell Function.* Biotechnology Progress, Vol. 4, No. 2, pp. 89–96, 1988.
- [39] M. G. Cipolleschi, P. D. Sbarba, M. Olivotto. *The Role of Hypoxia in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells.* Blood, Vol. 82, No. 7, pp. 2031–2037, 1993.

- [40] T. M. Clayton, I. Jenkins, P. Steward. *The Improvement of Aeration in 8000l Animal Cell Culture Vessels*. In A. Bernard, B. Griffiths, W. Noé, F. Wurm, Hrsg., *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, pp. 277–283. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
- [41] P. C. Collins, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Seeding Density Affects Proliferation, Differentiation, and Metabolic Patterns of Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture*. *Blood*, Vol. 86, Supplement 1, pp. 660a, 1995.
- [42] P. C. Collins, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Stirred Culture of Peripheral and Cord Blood Hematopoietic Cells Offers Advantages over Traditional Static Systems for Clinically Relevant Applications*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 59, pp. 534–543, 1998.
- [43] P. C. Collins, L. K. Nielsen, S. D. Patel, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Characterization of Hematopoietic Cell Expansion, Oxygen Uptake, and Glycolysis in a Controlled, Stirred-Tank Bioreactor System*. *Biotechnology Progress*, Vol. 14, pp. 466–472, 1998.
- [44] P. C. Collins, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Glucose and Lactate Metabolic Rates Predict Numbers of Colony-Forming Cells in Hematopoietic Culture*. *Blood*, Vol. 88, Supplement 1, pp. 607a, 1996.
- [45] E. Conneally, J. Cashman, A. Petzer, C. Eaves. *Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lymphomyeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 94, pp. 9836–9841, 1997.
- [46] C. M. Coze. *Glossary of cytokines*. *Baillière's Clinical Haematology*, Vol. 7, No. 1, pp. 1–15, 1994.
- [47] C. de Bruyn, A. Delforge, D. Bron, M. Bernier, M. Massy, D. de Hemptinne, P. Stryckmans. *Ex Vivo Expansion of CD34+CD38- Cord Blood Cells*. *Journal of Hematology*, Vol. 6, pp. 93–102, 1997.
- [48] A. De León, H. Mayani, O. T. Ramírez. *Design, characterization and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions*. *Cytotechnology*, Vol. 28, pp. 127–138, 1998.
- [49] P. A. Denning-Kendall, A. Nicol, H. Horsley, C. Donaldson, B. Bradley, J. M. Hows. *Is in vitro expansion of human cord blood cells clinically relevant?* *Bone Marrow Transplantation*, Vol. 21, pp. 225–232, 1998.
- [50] Y. M. Deo, M. D. Mahadevan, R. Fuchs. *Practical Considerations in Operation and Scale-up of Spin-Filter Based Bioreactors for Monoclonal Antibody Production*. *Biotechnology Progress*, Vol. 12, pp. 57–64, 1996.
- [51] E. I. Deryugina, C. E. Müller-Sieburg. *Stromal Cells in Long-Term Cultures: Keys to the Elucidation of Hematopoietic Development?* *Critical Reviews in Immunology*, Vol. 13, No. 2, pp. 115–150, 1993.
- [52] T. M. Dexter, T. D. Allen, L. G. Lajtha. *Conditions Controlling the Proliferation of Haemopoietic Stem Cells In Vitro*. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 91, pp. 335–344, 1977.
- [53] S. Dhir, K. J. Morrow Jr., R. R. Rhinehart, T. Wiesner. *Dynamic Optimization of Hybridoma Growth in a Fed-Batch Bioreactor*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 67, No. 2, pp. 197–205, 2000.

- [54] B. Durand, K. Eddleman, A. R. Migliaccio, G. Migliaccio, J. W. Adamson. *Long-term generation of colony-forming cells (CFC) from CD34+ human umbilical cord blood cells*. *Leukemia and Lymphoma*, Vol. 11, No. 3-4, pp. 263–273, 1993.
- [55] C. J. Eaves, K. Lambie. *Atlas of Human Hematopoietic Colonies*. StemCell Technologies Inc., Vancouver, 1995.
- [56] P. Ehrlich. *Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes*. *Archiv für Anatomie und Physiologie/Physiologische Abteilung*, pp. 571–579, 1879.
- [57] D. Eisenkrätzer. *Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen mit Chinese-Hamster-Ovary-Zellen - bioverfahrenstechnische und gentechnische Aspekte der Prozessentwicklung*. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 1999.
- [58] S. G. Emerson, R. Taichman. *The Hematopoietic Microenvironment*. In J. D. Armitage, K. H. Autman, Hrsg., *High-Dose Cancer Therapy. Pharmacology, Hematopoiesis, Stem Cells*, pp. 151–158. Williams and Wilkins, Baltimore, 2. edition, 1995.
- [59] C. E. Ford, J. L. Hamerton, D. W. H. Barnes, J. F. Loutit. *Cytological Identification of Radiation-Chimæras*. *Nature*, Vol. 177, pp. 452–454, 1956.
- [60] D. E. Ford, R. A. Mashelkar, J. Ulbrecht. *Mixing times in Newtonian and non-Newtonian fluids*. *Process Technology International*, Vol. 17, No. 10, pp. 803–807, 1972.
- [61] M. Gabbianelli, E. Pelosi, E. Montesoro, M. Valtieri, L. Luchetti, P. Samoggia, L. Vitelli, T. Barberi, U. Testa, S. Lyman, C. Peschle. *Multi-Level Effects of flt3 Ligand on Human Hematopoiesis: Expansion of Putative Stem Cells and Proliferation of Granulomonocytic Progenitors/Monocytic Precursors*. *Blood*, Vol. 86, No. 5, pp. 1661–1670, 1995.
- [62] A. R. Gardner, J. L. Gainer, D. J. Kirwan. *Effects of Stirring and Sparging on Cultured Hybridoma Cells*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 35, pp. 940–947, 1990.
- [63] S. Gartner, H. S. Kaplan. *Long-term culture of human bone marrow cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 77, No. 8, pp. 4756–4759, 1980.
- [64] M.-C. Giarratana, L. Kobari, T. M. A. Neildez Nguyen, H. Firat, S. Bouchet, M. Lopez, N.-C. Gorin, D. Thierry, L. Douay. *Cell culture bags allow a large extent of ex vivo expansion of LTC-IC and functional mature cells which can subsequently be frozen: interest for large-scale clinical applications*. *Bone Marrow Transplantation*, Vol. 22, pp. 707–715, 1998.
- [65] M.-C. Giarratana, V. Vergé, C. Schmitt, J.-M. Bertho, L. Kobari, C. Barret, L. Douay. *Presence of primitive Lymphoid progenitors with NK or B potential in ex vivo expanded bone marrow cells*. *Experimental Hematology*, Vol. 28, pp. 46–54, 2000.
- [66] P. Girard, P. Meissner, M. Jordan, M. Tsao. *Small Scale Bioreactor System for Process Development and Optimization*. In A. Bernard, B. Griffiths, W. Noé, F. Wurm, Hrsg., *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, pp. 323–327. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.
- [67] K. L. Goltry, J. Leif, R. J. Maher, D. Greiner, A. K. Smith. *Ex Vivo Expanded Cord Blood Cells Generated in a Clinical-Scale Perfusion Culture System are Capable of*

- Engrafting NOD-SCID Mice*. Blood, Vol. 94, Supplement 1 (Part 2 of 2), pp. 347b, 1999.
- [68] J.-H. Gong, G. Maki, H.-G. Klingemann. *Characterization of a Human Cell Line (NK-92) with Phenotypical and Functional Characteristics of Activated Natural Killer Cells*. Leukemia, Vol. 8, No. 4, pp. 652–658, 1994.
- [69] M. A. Goodell. *CD34+ or CD34-: Does it Really Matter?* Blood, Vol. 94, No. 8, pp. 2545–2547, 1999.
- [70] M. Y. Gordon, N. M. Blackett. *Routes to Repopulation - A Unification of the Stochastic Model and Separation of Stem-Cell Subpopulations*. Leukemia, Vol. 8, No. 6, pp. 1068–1073, 1994.
- [71] B. Griffiths. *Perfusion Systems for Cell Cultivation*. In A. S. Lubiniecki, Hrsg., *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, pp. 217–250. Marcel Dekker, Inc., New York, 1990.
- [72] J. B. Griffiths. *Overview of Cell Culture Systems and their Scale-up*. In R. E. Spier, J. B. Griffiths, Hrsg., *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 3, pp. 179–220. Academic Press, Inc., London, 1988.
- [73] G. Güenechea, J. C. Segovia, B. Albella, M. Lamana, M. Ramírez, C. Regidor, M. N. Fernández, J. A. Bueren. *Delayed Engraftment of Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice Transplanted with Ex vivo-Expanded Human CD34+ Cord Blood Cells*. Blood, Vol. 93, No. 3, pp. 1097–1105, 1999.
- [74] A. Guerriero, L. Worford, H. K. Holland, G. R. Guo, K. Sheehan, E. K. Waller. *Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells*. Blood, Vol. 90, No. 9, pp. 3444–3455, 1997.
- [75] M. Guo, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis, J. N. Winter. *Effects of Seeding Density, Autologous Plasma and Cytokine Combination on Ex Vivo Expansion (EVE) of Peripheral Blood Progenitor Cells (PBPC) in Unselected Serum- and Stroma-Free Cultures*. Blood, Vol. 88, Supplement 1, pp. 607a, 1996.
- [76] B. Hambach. *Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren in der Zellkulturtechnik - Beiträge zur Verfahrensentwicklung*. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 1994.
- [77] S. J. Hawrylik, D. J. Wasilko, J. S. Pillar, J. B. Cheng, S. E. Lee. *Vortex flow filtration of mammalian and insect cells*. Cytotechnology, Vol. 15, No. 1-3, pp. 253–258, 1994.
- [78] D. N. Haylock, L. B. To, T. L. Dowse, C. A. Juttner, P. J. Simmons. *Ex Vivo Expansion and Maturation of Peripheral Blood CD34+ Cells Into the Myeloid Lineage*. Blood, Vol. 80, No. 6, pp. 1405–1412, 1992.
- [79] D. N. Haylock, L. B. To, S. Makino, T. L. Dowse, A. Juttner, P. J. Simmons. *Ex Vivo Expansion of Human Hematopoietic Progenitors with Cytokines*. In D. Levitt, R. Mertelsmann, Hrsg., *Hematopoietic stem cells: biology and therapeutic applications*, pp. 491–517. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- [80] S. Heimfeld, D. F. Kalamasz, B. L. Fogarty, R. Fei, Z. N. Tsui, H. M. Jones, R. J. Berenson. *Isolation and ex vivo expansion of CD34+ cells from cord blood using dextran sedimentation and avidin column selection*. Blood Cells, Vol. 20, No. 2-3, pp. 397–403, 1994.

- [81] S. Heimfeld, I. L. Weissman. *Development of Mouse Hematopoietic Lineages*. Current Topics in Developmental Biology, Vol. 25, pp. 155–175, 1991.
- [82] H. Heine. *Inhibierungen bei hochzellichten Hybridomakulturen*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 1998.
- [83] R. Henschler, W. Brugger, T. Luft, T. Frey, R. Mertelsmann, L. Kanz. *Maintenance of Transplantation Potential in Ex Vivo Expanded CD34⁺ Selected Human Peripheral Blood Progenitor Cells*. Blood, Vol. 84, No. 9, pp. 2898–2903, 1994.
- [84] R. Henschler, R. Mertelsmann. *Das pleiotrope Netzwerk der Zytokine*. In W. Wilmanns, Hrsg., *Zytokine*, pp. 3–8. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993.
- [85] H.-J. Henzler, D. J. Kauling. *Oxygenation of cell cultures*. Bioprocess Engineering, Vol. 9, pp. 61–75, 1993.
- [86] J. W. Hiby. *Definition und Messung der Mischgüte in flüssigen Gemischen*. Chemie-Ingenieur-Technik, Vol. 51, No. 7, pp. 704–709, 1979.
- [87] U. Hilbert, N. Jelinek, S. Schmidt, M. Biselli. *Biotechnologische Aspekte der Kultivierung humaner T-Lymphozyten*. Chemie-Ingenieur-Technik, Vol. 72, No. 7, pp. 746–750, 2000.
- [88] H. Hillebrandt (Hrsg.). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 257. edition, 1994.
- [89] P. Himmelfarb, P. S. Thayer, H. E. Martin. *Spin Filter Culture: The Propagation of Mammalian Cells in Suspension*. Science, Vol. 164, pp. 555–557, 1969.
- [90] Hoffman-La Roche-Aktiengesellschaft (Hrsg.). *Roche-Lexikon Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München, 2. edition, 1987.
- [91] D. E. Hogge, P. M. Lansdorp, D. Reid, B. Gerhard, C. J. Eaves. *Enhanced Detection, Maintenance, and Differentiation of Primitive Human Hematopoietic Cells in Cultures Containing Murine Fibroblasts Engineered to Produce Human Steel Factor, Interleukin-3, and Granulocyte Colony-Stimulating Factor*. Blood, Vol. 88, No. 10, pp. 3765–3773, 1996.
- [92] T. L. Holyoake, M. J. Alcorn, L. Richmond, E. Farrell, C. Pearson, R. Green, D. J. Dunlop, E. Fitzsimons, I. B. Pragnell, I. M. Franklin. *CD34 positive PBPC expanded ex vivo may not provide durable engraftment following myeloablative chemoradiotherapy regimens*. Bone Marrow Transplantation, Vol. 19, pp. 1095–1101, 1997.
- [93] J. Hou, H. Zhan. *Expression of Active Thrombopoietin and Identification of its Key Residues Responsible for Receptor Binding*. Cytokine, Vol. 10, No. 5, pp. 319–330, 1998.
- [94] J. A. Hubble, L. V. McIntire. *Platelet Active Concentration Profiles Near Growing Trombi, A Mathematical Consideration*. Biophysical Journal, Vol. 50, pp. 937–945, 1986.
- [95] H. M. Huber, M. Heiden, R. Seitz. *Hämatopoetische Stammzellen: Zulassung und Qualitätskontrollen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, Vol. 42, No. 2, pp. 105–112, 1999.
- [96] Y. Ishikawa, T. Ito. *Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture*. European Journal of Haematology, Vol. 40, pp. 126–129, 1988.

- [97] N. Jelinek. *Kultivierung hämatopoetischer Zellen - Kokultur im Festbettreaktor*. Dissertation (in Vorbereitung), Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen, 2000.
- [98] M. Käppel. *Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Messung des Mischungsverlaufs bei Flüssigkeiten*, Vol. 578 of *VDI-Forschungshefte*. VDI-Verlag, Düsseldorf, 1976.
- [99] H. Katinger, W. Scheirer. *Mass Cultivation and Production of Animal Cells*. In R. E. Spier, J. B. Griffiths, Hrsg., *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 1, pp. 167–193. Academic Press, London, 1985.
- [100] H. Kawada, K. Ando, T. Tsuji, Y. Shimakura, Y. Nakamura, J. Chargui, M. Hagiwara, H. Itagaki, T. Shimizu, S. Inokuchi, S. Kato, T. Hotta. *Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system*. *Experimental Hematology*, Vol. 27, pp. 904–915, 1999.
- [101] H. Kawahara, S. Mitsuda, E. Kumazawa, Y. Takeshita. *High-density culture of FM-3A cells using a bioreactor with an external tangential-flow filtration device*. *Cyotechnology*, Vol. 14, No. 1, pp. 61–66, 1994.
- [102] Y. Kawase, M. Moo-Young. *Mass Transfer at a Free Surface in Stirred Tank Bioreactors*. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part A*, Vol. 68, pp. 189–194, 1990.
- [103] M. N. Kazansky. *Shaker*. The World Intellectual Property Organisation (PCT) Patent WO 98/32838, 1998.
- [104] B.-S. Kim. *Production of human hematopoietic progenitors in a clinical-scale stirred suspension bioreactor*. *Biotechnology Letters*, Vol. 20, No. 6, pp. 595–601, 1998.
- [105] H. Kleinig, P. Sitte. *Zellbiologie: ein Lehrbuch*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1984.
- [106] H.-G. Klingemann, B. Miyagawa. *Purging of malignant cells from blood after short ex vivo incubation with NK-92 cells*. *Blood*, Vol. 87, No. 11, pp. 4913–4914, 1996.
- [107] H.-G. Klingemann, V. Tron, V. Ho. *Preclinical studies with a highly cytotoxic cell line (NK-92) to prevent metastasis of malignant melanoma*. *Journal Of Dermatological Science*, Vol. 12, No. 1, pp. 88, 1996.
- [108] H.-G. Klingemann, E. Wong, G. Maki. *A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Vol. 2, No. 2, pp. 68–75, 1996.
- [109] R. A. Knazek, Y.-W. Wu, P. M. Aebersold, S. A. Rosenberg. *Culture of human tumor infiltrating lymphocytes in hollow fiber bioreactors*. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 127, pp. 29–37, 1990.
- [110] S. Knudtzon. *In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood*. *Blood*, Vol. 43, No. 3, pp. 357–361, 1974.
- [111] H. P. Koeffler, D. W. Golde. *Acute Myelogenous Leukemia: A Human Cell Line Responsive to Colony-Stimulating Activity*. *Science*, Vol. 200, pp. 1153–1154, 1978.
- [112] G. Kögler, J. Callejas, R. V. Sorg, J. Fischer, A. R. Migliaccio, P. Wernet. *The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the ex vivo expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors*. *Bone Marrow Transplantation*, Vol. 21, pp. 233–241, 1998.

- [113] G. Kögler, J. Callejas, R. V. Sorg, P. Wernet. *An eight-fold ex vivo expansion of long-term culture-initiating cells from umbilical cord blood in stirred suspension cultures*. Bone Marrow Transplantation, Vol. 21, Supplement 3, pp. S48–S53, 1998.
- [114] M. R. Koller, J. G. Bender, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Expansion of Primitive Human Hematopoietic Progenitors in a Perfusion Bioreactor System with IL-3, IL-6, and Stem Cell Factor*. Bio/Technology, Vol. 11, pp. 358–363, 1993.
- [115] M. R. Koller, J. G. Bender, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Reduced Oxygen Tension Increases Hematopoiesis in Long-term Culture of Human Stem and Progenitor Cells from Cord Blood and Bone Marrow*. Experimental Hematology, Vol. 20, pp. 264–270, 1992.
- [116] M. R. Koller, J. G. Bender, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Beneficial Effects of Reduced Oxygen Tension and Perfusion in Long-Term Hematopoietic Cultures*. Annals of the New York Academy of Science, Vol. 665, pp. 105–116, 1992.
- [117] M. R. Koller, J. G. Bender, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Effects of Synergistic Cytokine Combinations, Low Oxygen, and Irradiated Stroma on the Expansion of Human Cord Blood Progenitors*. Blood, Vol. 80, No. 2, pp. 403–411, 1992.
- [118] M. R. Koller, S. G. Emerson, B. O. Palsson. *Large-Scale Expansion of Human Stem and Progenitor Cells From Bone Marrow Mononuclear Cells in Continuous Perfusion Cultures*. Blood, Vol. 82, No. 2, pp. 378–384, 1993.
- [119] M. R. Koller, R. J. Maher, I. Manchel, M. Oxender, A. K. Smith. *Alternatives to Animal Sera for Human Bone Marrow Cell Expansion: Human Serum and Serum-Free Media*. Journal of Hematotherapy, Vol. 7, pp. 413–423, 1998.
- [120] M. R. Koller, I. Manchel, D. A. Brott, B. O. Palsson. *Donor-to-donor variability in the expansion potential of human bone marrow cells is reduced by accessory cells but not by soluble growth factors*. Experimental Hematology, Vol. 24, pp. 1484–1493, 1996.
- [121] M. R. Koller, I. Manchel, R. J. Maher, K. L. Goltry, R. D. Armstrong, A. K. Smith. *Clinical-scale human umbilical cord blood cell expansion in a novel automated perfusion culture system*. Bone Marrow Transplantation, Vol. 21, pp. 653–663, 1998.
- [122] M. R. Koller, I. Manchel, B. S. Newsom, M. A. Palsson, B. O. Palsson. *Bioreactor Expansion of Human Bone Marrow: Comparison of Unprocessed, Density-Separated, and CD34-Enriched Cells*. Journal of Hematotherapy, Vol. 4, pp. 159–169, 1995.
- [123] M. R. Koller, I. Manchel, B. O. Palsson. *Importance of Parenchymal:Stromal Cell Ratio for the Ex Vivo Reconstitution of Human Hematopoiesis*. Stem Cells, Vol. 15, pp. 305–313, 1997.
- [124] M. R. Koller, I. Manchel, M. A. Palsson, R. J. Maher, B. O. Palsson. *Different Measures of Human Hematopoietic Cell Culture Performance Are Optimized under Vastly Different Conditions*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 50, pp. 505–513, 1996.
- [125] M. R. Koller, M. Oxender, T. C. Jensen, K. L. Goltry, A. K. Smith. *Direct contact between CD34+lin- cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production*. Experimental Hematology, Vol. 27, pp. 734–741, 1999.
- [126] M. R. Koller, B. O. Palsson. *Tissue Engineering: Reconstitution of Human Hematopoiesis Ex Vivo*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 42, pp. 909–930, 1993.

- [127] M. R. Koller, M. A. Palsson, I. Manchel, R. J. Maher, B. O. Palsson. *Tissue culture surface characteristics influence the expansion of human bone marrow cells*. *Biomaterials*, Vol. 19, pp. 1963–1972, 1998.
- [128] M. R. Koller, M. A. Palsson, I. Manchel, B. O. Palsson. *Long-Term Culture-Initiating Cell Expansion Is Dependent on Frequent Medium Exchange Combined With Stromal and Other Accessory Cell Effects*. *Blood*, Vol. 86, No. 5, pp. 1784–1793, 1995.
- [129] Kono.K., F. Ichihara, H. Iizuka, T. Sekikawa, Y. Matsumoto. *Expression of signal transducing T-cell receptor α molecules after adoptive immunotherapy in patients with gastric and colon cancer*. *International Journal of Cancer*, Vol. 78, No. 3, pp. 301–305, 1998.
- [130] D. S. Krause, M. J. Fackler, C. I. Civin, W. S. May. *CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility*. *Blood*, Vol. 87, No. 1, pp. 1–13, 1996.
- [131] J. C. Krauss. *Therapy with Genetically Modified Hematopoietic Stem Cells*. In D. Levitt, R. Mertelsmann, Hrsg., *Hematopoietic stem cells; Biology and Therapeutic Applications*, pp. 195–217. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- [132] K. T. Kunas, E. T. Papoutsakis. *Damage Mechanisms of Suspended Animal Cells in Agitated Bioreactors with and Without Bubble Entrainment*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 36, pp. 476–483, 1990.
- [133] K. T. Kunas, E. T. Papoutsakis. *The protective effect of serum against hydrodynamic damage of hybridoma cells in agitated and surface-aerated bioreactors*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 15, No. 1-2, pp. 57–69, 1990.
- [134] J. A. LaIuppa. *Defined Culture Conditions for Ex Vivo Expansion of Megakaryocytes and Myeloid Progenitors*. Dissertation, Northwestern University, Evanston, IL, USA, 1996.
- [135] J. A. LaIuppa, T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Polymer and Metal Substrates Affect the Ex Vivo Expansion of CD34+ Cells*. *Blood*, Vol. 86, Supplement 1, pp. 231a, 1995.
- [136] J. A. LaIuppa, T. A. McAdams, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Culture material affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells*. *Biomedical Material Research*, Vol. 36, pp. 347–359, 1997.
- [137] J. A. LaIuppa, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells for transplantation*. In J. N. Winter, Hrsg., *Blood Stem Cell Transplantation*, pp. 159–186. Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [138] L. G. Lajtha, R. Oliver, C. W. Gurney. *Kinetic Model of a Bone-Marrow Stem-Cell Population*. *British Journal of Haematology*, Vol. 8, pp. 443–460, 1962.
- [139] A. Larochelle, J. Vormoor, H. Hanenberg, J. C. Wang, M. Bhatia, T. Lapidot, T. Moritz, B. Murdoch, X. L. Xiao, I. Kato, D. A. Williams, J. E. Dick. *Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy*. *Nature Medicine*, Vol. 2, No. 12, pp. 1329–1337, 1996.
- [140] G. M. Lee, T. K. Huard, M. S. Kaminski, B. O. Palsson. *Effect of Mechanical Agitation on Hybridoma Cell Growth*. *Biotechnology Letters*, Vol. 10, No. 9, pp. 625–628, 1998.

- [141] G. M. Lee, J. M. Savinell, B. O. Palsson. *Serum can act as ashear protecting agent in agitated hybridoma cell cultures*. Hybridoma, Vol. 8, No. 6, pp. 639–645, 1989.
- [142] F. M. Lemoine, R. K. Humphries, S. D. Abraham, G. Krystal, C. J. Eaves. *Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells*. Experimental Hematology, Vol. 16, No. 8, pp. 718–726, 1988.
- [143] R. M. Lemoli, A. Tafuri, A. Strife, M. Andreeff, B. D. Clarkson, S. C. Gulati. *Proliferation of human hematopoietic progenitors in long-term bone marrow cultures in gas-permeable plastic bags is enhanced by colony-stimulating factors*. Experimental Hematology, Vol. 20, No. 5, pp. 569–575, 1992.
- [144] M. G. Levee, G.-M. Lee, S. H. Paek, B. O. Palsson. *Microencapsulated Human Bone Marrow Cultures: A Potential Culture System for the Clonal Outgrowth of Hematopoietic Progenitor Cells*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 43, pp. 734–739, 1994.
- [145] O. Levenspiel. *Chemical Reaction Engineering*. John Wiley & Sons, New York, 3. edition, 1999.
- [146] B. L. Levine, J. Cotte, C. C. Small, R. G. Carroll, J. L. Riley, W. B. Bernstein, D. E. van Epps, R. A. Hardwick, C. H. June. *Large-scale production of CD4+ T cells from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation*. Journal of Hematotherapy, Vol. 7, No. 5, pp. 437–448, 1998.
- [147] W. M. Lewko, R. W. Good, D. Bowman, T. L. Smith, R. K. Oldham. *Growth of Tumor Derived Activated T-Cells for the Treatment of Cancer*. Cancer Biotherapy, Vol. 9, No. 3, pp. 211–224, 1994.
- [148] F. Liepe. *Stoffvereinigen in fluiden Phasen: Ausrüstungen und ihre Berechnung*, Vol. 4 of *Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988.
- [149] V. Linek, V. Vacek. *Chemical Engineering Use of Catalyzed Sulfite Oxidation Kinetics for the Determination of Mass Transfer Characteristics of Gas-Liquid Contactors*. Chemical Engineering Science, Vol. 36, No. 11, pp. 1747–1768, 1981.
- [150] D. Looby, J. B. Griffith. *Optimization of glass-sphere immobilized bed cultures*. In R. E. Spier, J. B. Griffith, Hrsg., *Modern approaches to animal cell culture technology*, pp. 342–352. Butterworth & Co. Ltd., London, 1987.
- [151] C. B. Lozzio, B. B. Lozzio. *Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen*. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 50, No. 2, pp. 535–538, 1973.
- [152] C. B. Lozzio, B. B. Lozzio. *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, Vol. 45, No. 3, pp. 321–334, 1975.
- [153] J.-P. Lévesque, D. N. Haylock, P. J. Simmons. *Cytokine Regulation of Proliferation and Cell Adhesion Are Correlated Events in Human CD34+ Hematopoietic Progenitors*. Blood, Vol. 88, No. 4, pp. 1168–1176, 1996.
- [154] R. Mandalam, M. Koller, A. Smith. *Ex Vivo Hematopoietic Cell Expansion for Bone Marrow Transplantation*. In K. Schindhelm, R. Nordon, Hrsg., *Ex Vivo Cell Therapy*, pp. 273–291. Academic Press, San Diego, 1999.

- [155] A. Mantalaris, P. Keng, P. Bourne, A. Y. C. Chang, J. H. D. Wu. *Engineering a Human Bone Marrow Model: A Case Study on ex Vivo Erythropoiesis*. Biotechnology Progress, Vol. 14, pp. 126–133, 1998.
- [156] J. A. Martinson, M. Loudovaris, S. L. Smith, J. G. Bender, M. Vachula, D. E. Van Epps, H. Kaizer, R. G. Ghalie, B. C. McLeod. *Ex Vivo Expansion of Frozen/Thawed CD34+ Cells Isolated from Frozen Human Apheresis Products*. Journal of Hematotherapy, Vol. 6, pp. 69–75, 1997.
- [157] A. A. Maximow. *Relation of Blood Cells to Connective Tissues and Endothelium*. Physiological Reviews, Vol. IV, No. 4, pp. 533–563, 1924.
- [158] H. Mayani, L. J. Guilbert, A. Janowska-Wieczorek. *Biology of the hemopoietic microenvironment*. European Journal of Haematology, Vol. 49, pp. 225–233, 1992.
- [159] H. Mayani, M. Gutierrez-Rodriguez, L. Espinoza, E. Lopez-Chalini, A. Huerta-Zepeda, E. Flores, E. Sanchez-Valle, F. Luna-Bautista, I. Valencia, O. T. Ramirez. *Kinetics of Hematopoiesis in Dexter-Type Long-Term Cultures Established from Human Umbilical Cord Blood Cells*. Stem Cells, Vol. 16, pp. 127–135, 1998.
- [160] H. Mayani, P. M. Lansdorp. *Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells*. Stem Cells, Vol. 16, pp. 153–165, 1998.
- [161] E. Mazowski. *Magnetic Stirrer Apparatus*. United States Patent 3,622,129, 1971.
- [162] T. A. McAdams. *The Characterization of Extracellular pH and Medium Osmolality as Important Parameters in the Culture of Human Hematopoietic Cells*. Dissertation, Northwestern University, Evanston, IL, USA, 1997.
- [163] T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Hematopoietic cell culture therapies (Part I): cell culture considerations*. Trends in Biotechnology, Vol. 14, No. 9, pp. 341–349, 1996.
- [164] T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Hematopoietic cell culture therapies (Part II): clinical aspects and applications*. Trends in Biotechnology, Vol. 14, No. 9, pp. 388–396, 1996.
- [165] T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Lineage Distribution of Ex Vivo Hematopoietic Cultures is Substantially Influenced by Small Changes in Culture pH*. Blood, Vol. 88, Supplement 1, pp. 607a, 1996.
- [166] T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *pH is a potent modulator of erythroid differentiation*. British Journal of Haematology, Vol. 103, pp. 317–325, 1998.
- [167] T. A. McAdams, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Variations in culture pH affect the cloning efficiency and differentiation of progenitor cells in ex vivo haemopoiesis*. British Journal of Haematology, Vol. 97, pp. 889–895, 1997.
- [168] C. L. McDowell, E. T. Papoutsakis. *Increased Agitation Intensity Increases CD13 Receptor Surface Content and mRNA Levels, and Alters the Metabolism of HL60 Cells Cultured in Stirred Tank Bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 60, No. 2, pp. 239–250, 1998.
- [169] L. V. McIntire, R. R. Martin. *Mechanical Trauma Induced PMN Leukocyte Dysfunction*. In D. R. Gross, N. H. C. Hwang, Hrsg., *The Rheology of Blood, Blood Vessels and Associated Tissues*, pp. 214–235. Sijthoff & Noordhoff, Alphen aan den Rijn, 1981.

- [170] R. C. Meagher, A. J. Salvado, D. G. Wright. *An Analysis of the Multilineage Production of Human Hematopoietic Progenitors in Long-Term Bone Marrow Culture: Evidence That Reactive Oxygen Intermediates Derived From Mature Phagocytic Cells Have a Role in Limiting Progenitor Cell Self-Renewal*. *Blood*, Vol. 72, No. 1, pp. 273–281, 1988.
- [171] P. J. Meier-Abt, K. Mölling. *Somatische Gentherapie*. *unizürich-Magazin*, No. 1, 1996.
- [172] P. Meissner, B. Schröder, C. Herfurth, M. Biselli. *Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells*. *Cytotechnology*, Vol. 30, pp. 227–234, 1999.
- [173] N. Mellado-Damas, J. M. Rodríguez, M. Carmona, J. González, J. Prieto. *Ex-vivo expansion and maturation of CD34-positive hematopoietic progenitors optimization of culture conditions*. *Leukemia Research*, Vol. 23, No. 11, pp. 1035–1040, 1999.
- [174] J. D. Michaels, J. F. Petersen, L. V. McIntire, E. T. Papoutsakis. *Protection Mechanisms of Freely Suspended Animal Cells (CRL 8018) from Fluid-Mechanical Injury. Viscometric and Bioreactor Studies Using Serum, Pluronic F 68 and Polyethylene Glycol*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 38, pp. 169–180, 1991.
- [175] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, A. Radbruch. *High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS*. *Cytometry*, Vol. 11, pp. 231–238, 1990.
- [176] D. Möbest, S.-R. Goan, I. Junghahn, J. Winkler, I. Fichtner, M. Hermann, M. Becker, E. de Lima-Hahn, R. Henschler. *Differential Kinetics of Primitive Hematopoietic Cells Assayed In Vitro and In Vivo During Serum-Free Suspension Culture of CD34+ Blood Progenitor Cells*. *Stem Cells*, Vol. 17, No. 3, pp. 152–161, 1999.
- [177] D. Möbest, R. Mertelsmann, R. Henschler. *Serum-Free ex Vivo Expansion of CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 60, No. 3, pp. 341–347, 1998.
- [178] M. A. Moore, I. Hoskins. *Ex vivo expansion of cord blood-derived stem cells and progenitors*. *Blood Cells*, Vol. 20, No. 2-3, pp. 468–481, 1994.
- [179] C. E. Müller-Sieburg, E. Deryugina. *The Stromal Cells' Guide to the Stem Cell Universe*. *Stem Cells*, Vol. 13, pp. 477–486, 1995.
- [180] L. M. Muul, E. P. Director, C. L. Hyatt, S. A. Rosenberg. *Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy*. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 88, No. 2, pp. 265–275, 1986.
- [181] L. M. Muul, K. Nason-Burchenal, C. S. Carter, H. Cullis, D. Slavin, C. L. Hyatt, E. P. Director, S. F. Leitman, H. G. Klein, S. A. Rosenberg. *Development of an automated closed system for generation of human lymphokine-activated killer (LAK) cells for use in adoptive immunotherapy*. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 101, No. 2, pp. 171–181, 1987.
- [182] N. N. *Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy*. Guidance for industrie, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, 1998.
- [183] N. N. *Points to Consider in Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy*. Docket 91N-0428, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, 1991.

- [184] N. N. *Proposed approach to regulation of cellular and tissue-based products*. Docket 97N-0068, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, 1997.
- [185] N. N. *VDI-Wärmeatlas: Berechnungsblätter für den Wärmeübergang*, Vol. 6. VDI-Verlag, Düsseldorf, 1991.
- [186] T. Nakahata, A. J. Gross, M. Ogawa. *A Stochastic Model of Self-Renewal and Commitment to Differentiation of the Primitive Hemopoietic Stem Cells in Culture*. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 113, pp. 455–458, 1982.
- [187] Y. Nakamura, K. Ando, J. Chargui, H. Kawada, T. Sato, T. Tsuji, T. Hotta, S. Kato. *Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells*. *Blood*, Vol. 94, No. 12, pp. 4053–4059, 1999.
- [188] H. Nakauchi. *Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative?* *Nature Medicine*, Vol. 4, No. 9, pp. 1009–1010, 1998.
- [189] B. A. Naughton, G. K. Naughton. *Hematopoiesis on Nylon Mesh Templates. Comparative Long-Term Bone Marrow Culture and the Influence of Stromal Support Cells*. *Annals of the New York Academy of Science*, Vol. 554, pp. 125–140, 1989.
- [190] B. A. Naughton, A. Tjota, B. Sibanda, G. K. Naughton. *Hematopoiesis on Suspended Nylon Screen-Stromal Cell Microenvironments*. *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 113, pp. 171–177, 1991.
- [191] L. K. Nielsen, J. G. Bender, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Population balance model of in vivo neutrophil formation following bone marrow rescue therapy*. *Cyto-technology*, Vol. 28, pp. 157–162, 1998.
- [192] L. K. Nielsen, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Modeling ex vivo hematopoiesis using chemical engineering metaphors*. *Chemical Engineering Science*, Vol. 53, No. 10, pp. 1913–1925, 1998.
- [193] T. Noto, Y. Tokuda, Y. Nakamura, A. Suzuki, K. Watanabe, M. Yamamura, T. Tajima, T. Mitomi, K. Nishijima. *A new high-yield continuous cell-culture system for lymphokine-activated killer cells*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Vol. 30, No. 1, pp. 1–4, 1989.
- [194] D. J. Oh, M. R. Koller, B. O. Palsson. *Frequent Harvesting from Perfused Bone Marrow Cultures Results in Increased Overall Cell and Progenitor Expansion*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44, pp. 609–616, 1994.
- [195] K. R. Ono. *Stirring apparatus for cell culture*. United States Patent 4,355,906, 1982.
- [196] M. Pahl, W. Gleißle, H.-M. Laun. *Praktische Rheologie der Kunststoffe und Elastomere*. VDI-Verlag, Düsseldorf, 4. edition, 1995.
- [197] B. O. Palsson, R. D. Armstrong, J. Maluta. *Bioreactor for Mammalian Cell Growth and Maintenance*. United States Patent 5,688,687, 1997.
- [198] B. O. Palsson, S. G. Emerson, R. M. Schwartz. *Device for maintaining and growing human stem and/or hematopoietic cells*. United States Patent 5,459,069, 1995.
- [199] B. O. Palsson, D. J. Oh, M. R. Koller. *Replating of bioreactor expanded human bone marrow results in extended growth of primitive and mature cells*. In E. C. Beuvery et al., Hrsg., *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century*, pp. 1073–1081. Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 1995.

- [200] B. O. Palsson, S.-H. Paek, R. M. Schwartz, M. Palsson, G.-M. Lee, S. Silver, S. G. Emerson. *Expansion of Human Bone Marrow Progenitor Cells in a High Cell Density Continuous Perfusion System*. *Bio/Technology*, Vol. 11, pp. 368–372, 1993.
- [201] E. T. Papoutsakis. *Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors*. *Trends in Biotechnology*, Vol. 9, pp. 427–437, 1991.
- [202] A. Pappenheim. *Abstammung und Entstehung der rothen Blutzellen*. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für die klinische Medizin*, Vol. 151, No. XV, pp. 89–158, 1898.
- [203] G. Pasternak, L. Pasternak. *Behavior in vitro of Long-Term Cultured Bone Marrow or Blood Cells from Chronic Myeloid Leukemia: Adhesion Molecules and Differentiation Antigens as Detected by Immunocytochemistry*. *Folia Biologica (Praha)*, Vol. 40, pp. 439–454, 1994.
- [204] C.-A. Peng, M. R. Koller, B. O. Palsson. *Unilineage Model of Hematopoiesis Predicts Self-Renewal of Stem and Progenitor Cells Based on Ex Vivo Growth Data*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 52, pp. 24–33, 1996.
- [205] R. H. Perry. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. McGraw-Hill, Inc., New York, 6. edition, 1984.
- [206] M. V. Peshwa, L. A. Page, L. Qian, D. Yang, W. C. A. van Schooten. *Generation and Ex Vivo Expansion of HTLV-1 Specific CD8+ Cytotoxic T-Lymphocytes for Adoptive Immunotherapy*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, pp. 529–540, 1996.
- [207] J. F. Petersen, L. V. McIntire, E. T. Papoutsakis. *Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 7, pp. 229–246, 1988.
- [208] J. F. Petersen, L. V. McIntire, E. T. Papoutsakis. *Shear Sensitivity of Hybridoma Cells in Batch, Fed-Batch, and Continuous Cultures*. *Biotechnology Progress*, Vol. 6, pp. 114–120, 1990.
- [209] A. L. Petzer, D. E. Hogge, P. M. Lansdorp, D. S. Reid, C. J. Eaves. *Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 93, pp. 1470–1474, 1996.
- [210] A. L. Petzer, P. W. Zandstra, J. M. Piret, C. J. Eaves. *Differential Cytokine Effects on Primitive (CD34+CD38-) Human Hematopoietic Cells: Novel Responses to Flt3-Ligand and Thrombopoietin*. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 183, pp. 2551–2558, 1996.
- [211] A. W. Phillips, G. D. Ball, K. H. Fantes, N. B. Finter, M. D. Johnston. *Experience in the Cultivation of Mammalian Cells on the 8000 l Scale*. In J. Feder, W. R. Tolbert, Hrsg., *Large-Scale Mammalian Cell Culture*, pp. 87–95. Academic Press, Inc., Orlando, 1985.
- [212] W. Piacibello, F. Sanavio, L. Garetto, A. Severino, D. Bergandi, J. Ferrario, F. Fagioli, M. Berger, M. Aglietta. *Extensive Amplification and Self-Renewal of Human Primitive Hematopoietic Stem Cells From Cord Blood*. *Blood*, Vol. 89, No. 8, pp. 2644–2653, 1997.
- [213] W. Piacibello, F. Sanavio, L. Garetto, A. Severino, A. Dané, L. Gammaitoni, M. Aglietta. *Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem*

- cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation.* Leukemia, Vol. 12, pp. 718–727, 1998.
- [214] W. Piacibello, F. Sanavio, A. Severino, A. Dané, L. Gammaitoni, F. Fagioli, E. Perissinotto, G. Cavalloni, O. Kollet, T. Lapidot, M. Aglietta. *Engraftment in Nonobese Diabetic Severe Combined Immunodeficient Mice of Human CD34+ Cord Blood Cells After Ex Vivo Expansion: Evidence for the Amplification and Self-Renewal of Repopulating Stem Cells.* Blood, Vol. 93, No. 11, pp. 3736–3749, 1999.
- [215] G. E. Plautz, G. H. Barnett, D. W. Miller, B. H. Cohen, R. A. Prayson, J. C. Krauss, M. Luciano, D. B. Kangisser, S. Shu. *Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas.* Journal of Neurosurgery, Vol. 89, No. 1, pp. 42–51, 1998.
- [216] A. Poloni, M. C. Giarratana, H. Firat, L. Kobari, N. C. Gorin, L. Douay. *The ex vivo expansion capacity of normal human bone marrow cells is dependent on experimental conditions: role of the cell concentration, serum and CD34+ cell selection in stroma-free cultures.* Hematology and Cell Therapy, Vol. 39, pp. 49–58, 1997.
- [217] F. Prosper, K. Vanoverbeke, D. Streoncek, C. M. Verfaillie. *Primitive Long-Term Culture Initiating Cells (LTC-ICs) in Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilized Peripheral Blood Progenitor Cells Have Similar Potential for Ex Vivo Expansion as Primitive LTC-ICs in Steady State Bone Marrow.* Blood, Vol. 89, No. 11, pp. 3991–3997, 1997.
- [218] K. F. Pullen, M. D. Johnson, A. W. Phillips, G. D. Ball, N. B. Finter. *Very large scale suspension cultures of mammalian cells.* Developments in Biological Standardization, Vol. 60, pp. 175–177, 1985.
- [219] M. H. Purdy, C. J. Hogan, L. Hami, I. McNiece, W. Franklin, R. B. Jones, S. I. Bearman, R. J. Berenson, P. J. Cagnoni, S. Heimfeld, E. J. Shpall. *Large Volume Ex Vivo Expansion of CD34-Positive Hematopoietic Progenitor Cells for Transplantation.* Journal of Hematotherapy, Vol. 4, pp. 515–525, 1995.
- [220] S. Querol, G. Capmany, J. A. Cancelas, J. García. *Expansion of cord blood progenitor cells.* Bone Marrow Transplantation, Vol. 21, Suppl. 3, pp. 77–80, 1998.
- [221] K. M. Radford, S. Reid, P.F. Greenfield. *Enhanced Productivity in Insect Cell Culture by Control of the Chemical Environment.* In T. Kobayashi, Y. Kitagawa, K. Okumura, Hrsg., *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 6, pp. 197–204. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- [222] O. T. Ramírez, R. Mutharasan. *The Role of the Plasma Membrane Fluidity on the Shear Sensitivity of Hybridomas Grown under Hydrodynamic Stress.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 36, pp. 911–920, 1990.
- [223] V. Ramsfjell, D. Bryder, H. Björgvinsdóttir, S. Kornfalt, L. Nilsson, O. J. Borge, S. E. Jacobsen. *Distinct Requirements for Optimal Growth and In Vitro Expansion of Human CD34+CD38- Bone Marrow Long-Term Culture-Initiating Cells (LTC-IC), Extended LTC-IC, and Murine In Vivo Long-Term Reconstituting Stem Cells.* Blood, Vol. 94, No. 12, pp. 4093–4102, 1999.
- [224] R. C. Reid, J. M. Prausnitz, B. E. Poling. *The Properties of Gases and Liquids.* McGraw-Hill, Inc., New York, 4. edition, 1987.
- [225] I. N. Rich, B. Kubanek. *The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro.* British Journal of Haematology, Vol. 52, No. 4, pp. 579–88, 1982.

- [226] C. M. Richman, R. S. Weiner, R. A. Yankee. *Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man*. *Blood*, Vol. 47, No. 6, pp. 1031–1039, 1976.
- [227] S. R. Riddel, E. H. Warren, D. Lewinsohn, C. Yee, P. D. Greenberg. *Reconstitution of Immunity by Adoptive Immunotherapy with T Cells*. In K. Schindhelm, R. Nordon, Hrsg., *Ex Vivo Cell Therapy*, pp. 137–177. Academic Press, San Diego, 1999.
- [228] E. Robinet, J.-M. Certoux, C. Ferrand, P. Maples, A. Hardwick, J.-Y. Cahn, C. W. Reynolds, W. Jacob, P. Hervé, P. Tiberghien. *A Closed Culture System for the Ex Vivo Transduction and Expansion of Human T Lymphocytes*. *Journal of Hematotherapy*, Vol. 7, pp. 205–215, 1998.
- [229] C. M. Rooney, C. A. Smith, C. Y. C. Ng, S. K. Loftin, J. W. Sixbey, Y. Gan, D.-K. Srivastava, L. C. Bowman, R. A. Krance, M. K. Brenner, H. E. Heslop. *Infusion of Cytotoxic T Cells for the Prevention and Treatment of Epstein-Barr Virus-Induced Lymphoma in Allogeneic Transplant Recipients*. *Blood*, Vol. 92, No. 5, pp. 1549–1555, 1998.
- [230] S. A. Rosenberg, M. T. Lotze, L. M. Muul, A. E. Chang, F. P. Avis, S. Leitman, W. M. Linehan, C. N. Robertson, R. N. Lee, J. T. Rubin, C. A. Seipp, C. Simpson, D. E. White. *A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone*. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 316, No. 15, pp. 889–897, 1987.
- [231] S. A. Rosenberg, M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni, J. T. Vetto, C. A. Seipp, C. Simpson, C. M. Reichert. *Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer*. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 313, No. 23, pp. 1485–1492, 1985.
- [232] C. E. Sandstrom. *Ex Vivo Expansion of Human Hematopoietic Cells Using Better Defined Culture Conditions*. Dissertation, Northwestern University, Evanston, IL, USA, 1995.
- [233] C. E. Sandstrom, J. G. Bender, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis. *Development of Novel Perfusion Chamber to Retain Nonadherent Cells and Its Use for Comparison of Human „Mobilized“ Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures with and without Irradiated Bone Marrow Stroma*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, pp. 493–504, 1996.
- [234] C. E. Sandstrom, J. G. Bender, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Effects of CD34+ Cell Selection and Perfusion on Ex Vivo Expansion of Peripheral Blood Mononuclear Cells*. *Blood*, Vol. 86, No. 3, pp. 958–970, 1995.
- [235] C. E. Sandstrom, P. C. Collins, T. A. McAdams, J. G. Bender, E. T. Papoutsakis, W. M. Miller. *Comparison of Whole Serum-Deprived Media for Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells from Cord Blood and Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells*. *Journal of Hematotherapy*, Vol. 5, pp. 461–473, 1996.
- [236] C. A. Sardonini, Y.-J. Wu. *Expansion and Differentiation of Human Hematopoietic Cells from Static Cultures through Small-Scale Bioreactors*. *Biotechnology Progress*, Vol. 9, pp. 131–137, 1993.
- [237] S. Sato, K. Kawamura, N. Fujiyoshi. *Animal Cell Cultivation for Production of*

- Biological Substances with a Novel Perfusion Culture Apparatus.* Journal of Tissue Culture Methods, Vol. 8, No. 4, pp. 167–172, 1983.
- [238] T. Sato, J. H. Laver, M. Ogawa. *Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells.* Blood, Vol. 94, No. 8, pp. 2548–2554, 1999.
- [239] A. B. Satterthwaite, R. Borson, D. G. Tenen. *Regulation of the Gene for CD34, a Human Hematopoietic Stem Cell Antigen, in KG-1 Cells.* Blood, Vol. 75, No. 12, pp. 2299–2304, 1990.
- [240] V. Schlüter. *Charakterisierung und Maßstabsübertragung von Biorührreaktoren,* Vol. 285 of *Fortschrittsberichte VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik.* VDI-Verlag, Düsseldorf, 1992.
- [241] S. Schmitz, H. Franke, J. Brusis, H. E. Wichmann. *Quantification of the cell kinetic effects of G-CSF using a model of human granulopoiesis.* Experimental Hematology, Vol. 21, pp. 755–760, 1993.
- [242] R. Schofield, B. I. Lord, S. Kyffin, C. W. Gilbert. *Self-Maintenance Capacity of CFU-S.* Journal of Cellular Physiology, Vol. 103, pp. 355–362, 1980.
- [243] B. Schröder. *Kultivierung und Charakterisierung von hämatopoetischen und stromalen Zellen zur Knochenmark-Simulation im Bioreaktor.* Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelm Universität, Bonn, 1997.
- [244] U. Schürch, H. Kramer, A. Einsele, F. Widmer, H. M. Eppenberger. *Experimental evaluation of laminar shear stress on the behaviour of hybridoma mass cell cultures, producing monoclonal antibodies against mitochondrial creatine kinase.* Journal of Biotechnology, Vol. 7, pp. 179–184, 1988.
- [245] R. M. Schwartz, S. G. Emerson, M. F. Clarke, B. O. Palsson. *In Vitro Myelopoiesis Stimulated by Rapid Medium Exchange and Supplementation with Hematopoietic Growth Factors.* Blood, Vol. 78, No. 12, pp. 3155–3161, 1991.
- [246] R. M. Schwartz, B. O. Palsson, S. G. Emerson. *Rapid medium perfusion rate significantly increases the productivity and longevity of human bone marrow cultures.* Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 88, pp. 6760–6764, 1991.
- [247] M. G. Scott, J. B. Fleischman. *Preferential idiotypic-isotypic associations in antibodies to dinitrophenyl antigens.* Journal of Immunology, Vol. 128, No. 6, pp. 2622–2628, 1982.
- [248] F. Shapiro, T.-J. Yao, G. Raptis, L. Reich, L. Norton, M. A. S. Moore. *Optimization of Conditions for Ex Vivo Expansion of CD34+ Cells From Patients With Stage IV Breast Cancer.* Blood, Vol. 84, No. 10, pp. 3567–3574, 1994.
- [249] Y. Shi, D. D. Y. Ryu, R. Ballica. *Rheological Properties of Mammalian Cell Culture Suspensions: Hybridoma and HeLa Cell Lines.* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, pp. 745–754, 1993.
- [250] V. Singh. *Disposable Bioreactor for Cell Culture Using Wave-Induced Agitation.* In O.-W. Merten, P. Perrin, B. Griffiths, Hrsg., *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology,* pp. 399–407. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
- [251] M. Sobotka, A. Prokop, I. J. Dunn, A. Einsele. *Review of Methods for the Measurement of Oxygen Transfer in Microbial Systems.* Annual Reports on Fermentation Processes, Vol. 5, pp. 127–210, 1982.

- [252] T. Somville, G. Kögler, J. Enczmann, O. Adams, C. Krempe, W. Däubener, U. Göbel, H. G. Bender, P. Wernet. *Plazentares Restblut als Stammzelltransplantat*. Perinatal-Medizin, Vol. 8, pp. 93–99, 1996.
- [253] E. F. Srour, M. Bregni, C. M. Traycoff, B. Agüero, S. T. Kosak, R. Hoffman, S. Siena, A. M. Gianni. *Long-term Hematopoietic Culture-initiating Cells Are More Abundant in Mobilized Peripheral Blood Grafts Than in Bone Marrow But Have a More Limited Ex Vivo Expansion Potential*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, Vol. 22, No. 5, pp. 68–81, 1996.
- [254] E. A. Stadtmauer, A. O'Neill, L. J. Goldstein, P. A. Crilley, K. F. Mangan, J. N. Ingle, I. Brodsky, S. Martino, H. M. Lazarus, J. K. Erban, C. Sickles, J. H. Glick, S. M. Luger, T. R. Klumpp, M. R. Litzow. *Conventional-Dose Chemotherapy Compared with High-Dose Chemotherapy plus Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Metastatic Breast Cancer*. The New England Journal of Medicine, Vol. 342, No. 15, pp. 1069–1076, 2000.
- [255] D. Stark. *Embryologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- [256] P. F. W. Strengers, W. G. van Aken. *Blut - Von der Magie zur Wissenschaft*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.
- [257] S. Sumida, K. Oshikawa. *How Long Can We Cryopreserve Stem Cells? Eighty Percent of Progenitors Are Viable for 33 Years in Liquid Nitrogen*. Cryobiology, Vol. 39, No. 4, pp. 290, 1999.
- [258] H. J. Sutherland, D. E. Hogge, D. Cook, C. J. Eaves. *Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis*. Blood, Vol. 81, No. 6, pp. 1465–1470, 1993.
- [259] H. Takamatsu, K. Hamamoto, K. Ishimaru, S. Yokoyama, M. Tokashiki. *Large-scale perfusion culture process for suspended mammalian cells that uses a centrifuge with multiple settling zones*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 45, No. 4, pp. 454–457, 1996.
- [260] Y. K. Tam, B. Miyagawa, V. C. Ho, H.-G. Klingemann. *Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92*. Journal of Hematotherapy, Vol. 8, No. 3, pp. 281–290, 1999.
- [261] S. Thoma, S. Schmidt, N. Jelinek, C. Herfurth, R. Takors, M. Biselli. *Genetic Algorithms: Optimization of IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF and flt-3 for ex vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells*. Onkologie, Vol. 22, suppl. 1, pp. 180, 1999.
- [262] S. Thoma, S. Schmidt, N. Jelinek, C. Herfurth, R. Takors, M. Biselli. *Optimization of IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF and flt-3 Ligand by a Genetic Algorithm for the ex vivo Expansion of Hematopoietic Progenitor Cells*. Blood, submitted.
- [263] J. Thömmes. *Verfahrensoptimierung in der Säugerzellkultur am Beispiel der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 1992.
- [264] J. E. Till, E. A. McCulloch, L. Siminovitch. *A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 51, pp. 29–36, 1964.
- [265] L. B. To, D. N. Haylock, P. J. Simmons, C. A. Juttner. *The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells*. Blood, Vol. 89, No. 7, pp. 2233–2258, 1997.

- [266] M. Tokashiki, K. Hamamoto, Y. Takazawa, Y. Ichikawa. *High-Density Culture of Mouse-Human Hybridoma Cells Using a New Perfusion Culture Vessel*. Kagaku kogaku Ronbun shu, Vol. 14, pp. 337–341, 1988.
- [267] M. Tokashiki, H. Takamatsu. *Perfusion culture apparatus for suspended mammalian cells*. Cytotechnology, Vol. 13, No. 3, pp. 149–159, 1993.
- [268] M. Tokashiki, S. Yokoyama. *Bioreactor Designed for Animal Cells*. In H. Hauser, R. Wagner, Hrsg., *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, pp. 279–317. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1997.
- [269] J. Tramper, K. D. de Gooijer, J. M. Vlak. *Scale-Up Considerations and Bioreactor Development for Animal Cell Cultivation*. In M. F. A. Goosen, A. J. Daugulis, P. Faulkner, Hrsg., *Insect Cell Culture Engineering*, pp. 139–177. Marcel Dekker, 1993.
- [270] J. Tramper, J. M. Vlak. *Bioreactor Design for Growth of Shear-sensitive Mammalian and Insect Cells*. In Avshalom Mizrahi, Hrsg., *Upstream Processes: Equipment and Techniques*, pp. 199–228. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.
- [271] F. Trampler, S. A. Sonderhoff, P. W. S. Pui, D. G. Kilburn, J. M. Piret. *Acoustic Cell Filter for High Density Perfusion Culture of Hybridoma Cells*. Bio/Technology, Vol. 12, No. 3, pp. 281–284, 1994.
- [272] H. W. v. Heyden. *Die ortsständigen Knochenmarkzellen*. In W. Queißer, Hrsg., *Das Knochenmark: Morphologie, Funktion, Diagnostik*, pp. 99–107. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978.
- [273] L. van der Pol, J. Tramper. *Shear sensitivity of animal cells from a culture-medium perspective*. Trends in Biotechnology, Vol. 16, pp. 323–328, 1998.
- [274] G. van Zant, S. A. Rummel, M. R. Koller, D. B. Larson, I. Drubachevsky, M. Palsson, S. G. Emerson. *Expansion in Bioreactors of Human Progenitor Populations from Cord Blood and Mobilized Peripheral Blood*. Blood Cells, Vol. 20, pp. 482–491, 1994.
- [275] C. Verfaillie, R. Hurley, R. Bhatia, J. B. McCarthy. *Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, Vol. 16, pp. 201–224, 1994.
- [276] C. M. Verfaillie, P. Catanzaro. *Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells*. Leukemia, Vol. 10, pp. 498–504, 1996.
- [277] C. M. Verfaillie, R. S. McIvor, R. C. H. Zhao. *Gene therapy for chronic myelogenous leukemia*. Molecular Medicine Today, Vol. 5, No. 8, pp. 359–366, 1999.
- [278] K. Vilmar, K.-D. Bachmann, R. Kurth. *Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen*. Deutsches Ärzteblatt, Vol. 94, No. 23, pp. 53–61, 1997.
- [279] K. Vilmar, K.-D. Bachmann, R. Kurth. *Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB = Cord Blood)*. Deutsches Ärzteblatt, Vol. 96, No. 19, pp. 69–76, 1999.
- [280] H. Vogel, H. Niewisch, G. Matioli. *The Self Renewal Probability of Hemopoietic Stem Cells*. Journal of Cellular Physiology, Vol. 72, pp. 221–228, 1968.
- [281] J. H. Vogel, K.-H. Kroner. *Controlled Shear Filtration: A Novel Technique for Animal Cell Separation*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 63, No. 6, pp. 663–674, 1999.

- [282] C. von Kalle, H.-P. Kiem, F. G. Schuening. *Therapeutic Applications of HSC: Retroviral-Mediated Gene Transfer and Gene Therapy*. In D. Levitt, R. Mertelsmann, Hrsg., *Hematopoietic stem cells; Biology and Therapeutic Applications*, pp. 243–273. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- [283] D. Graf von Keyserlingk. *Anatomie des Knochenmarks*. In W. Queißer, Hrsg., *Das Knochenmark: Morphologie, Funktion, Diagnostik*, pp. 78–98. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978.
- [284] J. R. Wands, V. R. Zurawski Jr. *Process for producing antibodies to hepatitis virus and cell lines therefor*. United States Patent 4,271,145, 1981.
- [285] T.-Y. Wang, J. K. Brennan, J. H. D. Wu. *Multilineal hematopoiesis in a three-dimensional murine long-term bone marrow culture*. *Experimental Hematology*, Vol. 23, pp. 26–32, 1995.
- [286] T.-Y. Wang, A. Mantalaris, J. H. D. Wu. *A Novel Three-dimensional Long-term Bone Marrow Bioreactor Culture System*. In T. Kobayashi et al., Hrsg., *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 6, pp. 115–120. Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 1994.
- [287] T.-Y. Wang, J. H. D. Wu. *A Continuous Perfusion Bioreactor for Long-Term Bone Marrow Culture*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 665, pp. 274–284, 1992.
- [288] O. Warburg. *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Springer Verlag, Berlin, 1926.
- [289] H. R. Warner, J. W. Athens. *An Analysis of Granulocyte Kinetics in Blood and Bone Marrow*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 113, pp. 523–536, 1964.
- [290] C. Waymouth. *Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells*. *In Vitro*, Vol. 6, No. 2, pp. 109–127, 1970.
- [291] R. Weber-Nordt, R. Mertelsmann, R. Henschler. *Hematopoietic cell proliferation and hematopoietic growth factors*. *Current Opinion in Hematology*, Vol. 2, No. 4, pp. 309–321, 1995.
- [292] R. Weber-Nordt, E. Schott, J. Finke, R. Henschler, G. Schulz, R. Mertelsmann. *Umbilical cord blood: an alternative to the transplantation of bone marrow stem cells*. *Cancer Treatment Reviews*, Vol. 22, No. 5, pp. 381–391, 1996.
- [293] T. A. Welch. *High Speed Data Compression and Decompression Apparatus and Method*. United States Patent 4,558,302, 1985.
- [294] W. H. West, K. W. Tauer, J. R. Yannelli, G. D. Marshall, D. W. Orr, G. B. Thurman, R. K. Oldham. *Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer*. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 316, No. 15, pp. 898–905, 1987.
- [295] D. Weuster-Botz. *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*, Vol. 2 of *Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences*. Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek, Jülich, 1999.
- [296] C. A. Whitlock, D. Robertson, O. N. Witte. *Murine B Cell Lymphopoiesis in Long Term Culture*. *Journal of Immunological Methods*, Vol. 67, pp. 353–369, 1984.
- [297] H. E. Wichmann. *Computer modeling of erythropoiesis*. In C. D. R. Dunn, Hrsg., *Current Concepts in Erythropoiesis*, pp. 99–141. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1983.

- [298] H. E. Wichmann, M. Loeffler, S. Schmitz. *A Concept of Hemopoietic Regulation and Its Biomathematical Realization*. Blood Cells, Vol. 14, pp. 411–429, 1988.
- [299] B. S. Wilkins. *Histology of normal haemopoiesis: Bone marrow histology I*. Journal of Clinical Pathology, Vol. 45, pp. 645–649, 1992.
- [300] S. F. Williams, W. J. Lee, J. G. Bender, T. Zimmerman, P. Swinney, M. Blake, J. Carreon, M. Schilling, S. Smith, D. E. Williams, F. Oldham, D. Van Epps. *Selection and Expansion of Peripheral Blood CD34+ Cells in Autologous Stem Cell Transplantation for Breast Cancer*. Blood, Vol. 87, No. 5, pp. 1687–1691, 1996.
- [301] N. A. Wright. *The Cell Proliferation Kinetics of the Epidermis*. In L. A. Goldsmith, Hrsg., *Biochemistry and Physiology of the Skin*, pp. 203–229. University Press, Oxford, 1983.
- [302] C. Wrotnowski. *Trends in Bioreactor Technology*. Genetic Engineering News, 15. April 1999.
- [303] M. Xiao, H. E. Broxmeyer, M. Horie, S. Grigsby, L. Lu. *Extensive proliferative capacity of single isolated CD34 human cord blood cells in suspension culture*. Blood Cells, Vol. 20, No. 2-3, pp. 455–467, 1994.
- [304] Y. Yan. *Leukemia Cells derived from relapsed and/or refractory patients that express multidrug resistant (MDR) protein P-gp 170 are sensitive to lysis by natural killer cell line*. Blood, Vol. 88, No. Supplement 1, pp. 354a, 1996.
- [305] Y. Yan, P. Steinherz, H.-G. Klingemann, D. Dennig, B. H. Childs, J. McGuirk, R. J. O'Reilly. *Antileukemia Activity of a Natural Killer Cell Line against Human Leukemias*. Clinical Cancer Research, Vol. 4, No. 11, pp. 2859–2868, 1998.
- [306] J. R. Yannelli, G. B. Thurman, S. G. Dickerson, A. Mrowca, E. Sharp, R. K. Oldham. *An improved method for the generation of human lymphokine activated killer cells*. Journal of Immunological Methods, Vol. 100, No. 1-2, pp. 137–145, 1987.
- [307] P. W. Zandstra, E. Conneally, J. M. Piret, C. J. Eaves. *Ontogeny-associated changes in the cytokine responses of primitive human haemopoietic cells*. British Journal of Haematology, Vol. 101, pp. 770–778, 1998.
- [308] P. W. Zandstra, C. J. Eaves, J. M. Piret. *Expansion of Hematopoietic Progenitor Cell Populations in Stirred Suspension Bioreactors of Normal Human Bone Marrow Cells*. Bio/Technology, Vol. 12, pp. 909–914, 1994.
- [309] P. W. Zandstra, A. L. Petzer, C. J. Eaves, J. M. Piret. *Cellular Determinants Affecting the Rate of Cytokine Depletion in Cultures of Human Hematopoietic Cells*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 54, No. 1, pp. 58–66, 1997.
- [310] S. Zhang, A. Handa-Corrigan, R. E. Spier. *A Comparison of Oxygenation Methods for High-Density Perfusion Cultures of Animal Cells*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, No. 7, pp. 685–692, 1993.
- [311] D. Zipori, T. Sasson. *Myelopoiesis in the Presence of Stromal Cells from Mouse Bone Marrow: II. Mechanism of Glucose Dependent Colony Formation*. Experimental Hematology, Vol. 9, No. 6, pp. 663–674, 1981.
- [312] M. Zlokarnik. *Rührtechnik: Theorie und Praxis*. Springer Verlag, Berlin, 1999.

Die Modellierung des hämatopoetischen Systems

Die Aufgabe, die Hämatopoese mathematisch zu beschreiben, ist sehr reizvoll. Ein Modell, das die gesamte Blutbildung oder auch nur relevante Teile davon korrekt beschreibt, wäre für die Kultivierungstechnik dieser Zellen ein entscheidender Durchbruch. Daher bemühte sich schon seit Anfang der 60er Jahre des vorigen Jahrhunderts LAJTHA darum, entsprechende Modellierungen vorzunehmen [138]. Und auch heute ist dieses Vorhaben noch aktuell [191, 192].

Die Grundlage praktisch aller heutigen Modelle ist eine Kompartimentierung, wie sie in Abbildung A.1 auf der nächsten Seite dargestellt ist. Das hämatopoetische System wird hier extrem vereinfacht, die lymphoide Reihe üblicherweise völlig vernachlässigt. Meistens wird auch nur eine einzelne Differenzierungs-Richtung betrachtet, während alle anderen negiert werden. Die Einflüsse auf die verschiedenen Differenzierungs-Stufen sind ebenfalls stark simplifiziert. So geht man von einer Rückkopplung zwischen reifen Blutzellen und Vorläuferzellen sowie Vorläufer- und Stammzellen aus. Den Stammzellen werden zudem Fähigkeiten zur Autoregulation zugeschrieben. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den verschiedenen Modellen ergibt sich aus der jeweiligen Einteilung der Vorläuferzellen in verschiedene Zwischenstufen. Beispielsweise wird die Erythropoese von WICHMANN in Progenitoren, proliferierende Blasten, nicht-proliferierende Progenitoren, Retikulozyten und Erythrozyten eingeteilt [297]. NIELSEN teilt die Erythropoese dagegen in BFU-E, CFU-E, proliferierende Progenitoren, nicht-proliferierende Progenitoren und Erythrozyten ein [192]. Beide Aufstellungen sind immer noch starke Vereinfachungen der heute bekannten realen Ausdifferenzierungs-Stufen.

Das Konzept der hämatopoetischen Stammzelle wurde 1924 eingeführt [157] und 1956 auch erstmals im Tierversuch experimentell nachgewiesen [59]. Die prinzipielle Regulierung eines solchen stammzellbasierten Systems ist recht intensiv untersucht worden [138, 264, 280, 242, 186, 298, 70, 204]. Diese Untersuchungen liefen mit der Entwicklung von Stammzellkonzepten anderer Gewebe parallel [30, 301]. Das Grundkonzept der Stammzelle folgt praktisch bei allen Autoren dem Prinzip der symmetrischen Teilung und ist in Abbildung A.2 auf der nächsten Seite dargestellt. Man erkennt den regulativen Einfluss der Vorläuferzellen (E , G) und den autoregulativen Einfluss der Stammzellen (S) auf zwei Vorgänge. Der eine ist die Selbsterneuerungswahrscheinlichkeit p einer Stammzelle. Dieser Wert entscheidet, welcher Anteil an Stammzellen, die sich gerade symmetrisch geteilt haben, in die Ausdifferenzierung geht. Der andere Mechanismus regelt, welcher Anteil α_S der Stammzellen sich im Zellzyklus (S -, G_2 -, M -, G_1 -Phase) befindet und welcher Anteil $1 - \alpha_S$ der Zellen in der G_0 -Phase ruht. Die in Abbildung A.2 auf der nächsten Seite dargestellten Wahrscheinlichkeiten α_E und α_G , die entscheiden, in welche Richtung eine Zelle sich ausdifferenziert ($\alpha_E + \alpha_G = 1$), gehören nicht mehr zum Stammzellkompartiment, sondern zu den Vorläuferzellen. Da aber $E = E(\alpha_E)$ bzw. $G = G(\alpha_G)$ ist und E bzw. G direkt über die intramedulläre Rückkopplung auf die Stammzellen wirken, wirken α_E und α_G indirekt auch auf die Stammzelle. Insgesamt kann das Wachstum der Zellzahl c_{Stamm} der Stammzellen und deren Veränderung mit der Zeit t ausgedrückt werden als:

$$\frac{dc_{Stamm}}{dt} = (2p(S,E,G) - 1)\mu_{max}(S,E,G)\alpha_S c_{Stamm} \quad (A.1)$$

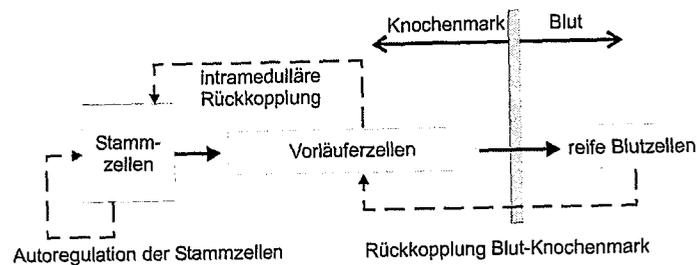


Abbildung A.1: Modellvorstellung des hämatopoetischen Systems (nach [298])

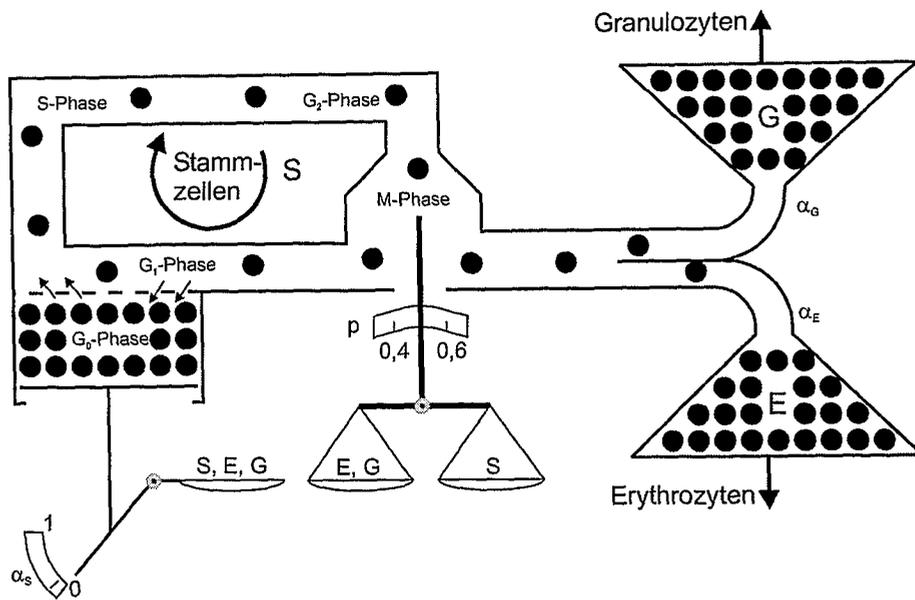


Abbildung A.2: Modellvorstellung der Stammzellen (nach [298])

mit: $\mu_{max}(S, E, G)$ = maximale Wachstumsrate der Stammzellen [$1/s$]

Sowohl diese Vorstellung über die Stammzellregulation als auch die über die Regulation des gesamten hämatopoetischen Systems ist entscheidend davon abhängig, dass die Einflussparameter korrekt gewählt und bestimmt werden können. Dieses ist aber zum heutigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die Einflussparameter sind nur teilweise bekannt, wie etwa die Auswirkungen der Wachstumsfaktoren oder des Stromas, und bei den bekannten Einflüssen scheitert die Quantifizierung an den ungenauen analytischen Methoden. So können auch die Einflüsse auf die Stammzellen aus Gleichung (A.1) auf der vorherigen Seite nur durch sehr vage Rückschlüsse festgestellt werden, da die Zellen selbst nicht detektierbar sind. Aus diesem Grund werden die Modelle üblicherweise an bestimmte Spezialfälle angepasst und sind dementsprechend stark vereinfacht. So betrachtet man einzelne Differenzierungs-Richtungen als singuläres Ereignis (zum Beispiel die Erythropoese [297, 192], die Granulopoese [289, 241], die Neutropoese [191] und die Thrombopoese [94]) oder behilft sich mit Mausmodellen [81]. Im strengen Sinne reduzieren sich diese Modelle zu sehr spezialisierten Korrelationen, die nur in einem sehr spezifischen Parameterraum Gültigkeit besitzen. Daher kann auch wie in der jüngsten Veröffentlichung von NIELSEN nur zusammengefasst werden, dass der mathematische Rahmen eines Modells der Hämatopoese zwar entwickelt wurde und einsatzbereit ist, allein die biologischen Kenntnisse heute nicht dazu ausreichen, ein solches generelles Modell wirklich mit Leben zu erfüllen [192].

ANHANG B

Herstellernachweis der verwendeten Chemikalien und Geräte

Chemikalien:

Chemikalie	Hersteller
Adenosin	SIGMA, Deisenhofen
Collagenase Typ IA	SIGMA, Deisenhofen
D-Glukose	SIGMA, Deisenhofen
Diethylenetriamine-Pentacetic Acid (DT-PA)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Enhancementsolution	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbad
Ethanol	Werner Hofmann, Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Europium-III-Acetat	Aldrich, Deisenhofen
FACS-Puffer	BD PharMingen, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Geneticin	Life Technologies, Karlsruhe
Gentamicin	Life Technologies, Karlsruhe
Heparin-Natrium	B. Braun Melsungen, Melsungen
HEPES, Dinatriumsalz	Biochrom, Berlin
Hygromycin	SIGMA, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kobaltsulfat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Kristallviolett	Serva, Heidelberg
L-Asparagin·H ₂ O	Fluka Chemie, Deisenhofen
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
L-Serin	Fluka Chemie, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	SIGMA, Deisenhofen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbenzoat	SIGMA, Deisenhofen
Natriumchlorid	Biochrom, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natrium-EDTA	Serva, Heidelberg
Natriumsulfit, 98%ig	Carl Roth, Karlsruhe
o-Phthaldialdehyd	Hewlett-Packard, Waldbronn
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Phenolrot	SIGMA, Deisenhofen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Theophyllin	SIGMA, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Trypanblau	SIGMA, Deisenhofen
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe
Zitronensäure	SIGMA, Deisenhofen

Zytokine:

Zytokin	Hersteller
FL	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
GM-CSF	CellSystems Biotechnologie Vertrieb, St. Katharinen
IL-2, Proleukin	Chiron Behring, Marburg
IL-3	Forschungszentrum Jülich, Jülich
IL-6	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
SCF	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
TPO	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA

Antikörper:

Antikörper	Hersteller
anti-human-CD3	Forschungszentrum Jülich, Jülich
anti-human-CD3-Cy-Chrome	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-CD4-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-CD8-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-CD28	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-CD34-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-CD45-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-maus-IgG1-Cy-Chrome	BD PharMingen, Heidelberg
anti-maus-IgG1-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-maus-IgG1-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti-TGF- β	R&D Systems, Wiesbaden
VIA-Probe	BD PharMingen, Heidelberg

Zellkulturmedien:

Medium	Hersteller
CellGro SCGM	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Life Technologies, Karlsruhe
Methylzellulose-Medium, MethoCult GF H4434	CellSystems Biotechnologie Vertrieb, St. Katharinen
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe
X-Vivo 10	BioWhittaker, Taufkirchen

Seren und Plasma:

Bezeichnung	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Karlsruhe
Humanes Quarantäne-Plasma	Blutspendedienst Hessen des DRK, Frankfurt/Main
Pferdeserum (HS)	Boehringer Mannheim, Mannheim

Werkstoffe der Untersuchungen über den Materialeinfluss:

Werkstoff	Hersteller
Blei, Pb99,94Cu, Werkstoffnr.: 2.3035	Röhr + Stolberg, Solingen
Edelstahl, X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571	Thyssen Schulte, Aachen
Glas, Borofloat Tafelglas	Schott Glaswerke, Mainz
Polydimethylsiloxan (Silikon)	Norton MG Silikon, Lindau
Poly-ether-ether-keton (PEEK), TECA-PEEK GF 30	Ensinger, Nufrigen
Polystyrol (PS)	Corning, Asbach
Virginales Polytetrafluorethylen, PTFE	Thyssen Schulte, Aachen
Viton	DuPont Dow elastomeres, Bad Homburg

Geräte:

Gerät	Hersteller
Aminosäure HPLC, Amino Quant 1090 AX	Hewlett Packard, Waldbronn
Anschlussstutzen für Wärmebadzuleitung	Schott Glaswerke, Mainz
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Deckel für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Deckeldichtungen für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Druckluftkompressor	JUN-AIR Deutschland, Ahrensburg
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporator, Gen Pulser II System	Bio-Rad, München
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nalgene, Wiesbaden
Einmalsterilfilter	Pall Deutschland, Dreieich
Einsätze für Deckel für Glasflaschen	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Filterronden	Spörl, Sigmaringendorf
Finn-Pipetten	Labsystem, Helsinki, Finnland
Fluorometer, Wallac Victor ²	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbad
Gewebekulturflaschen	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten	Falcon, Heidelberg
Gewebekulturschalen	Corning, Asbach

Gerät	Hersteller
Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Glukose Analysator, Ebio compact	Eppendorf, Hamburg
Glutamin/Glutamat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
Inversmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Düren
Kühlzentrifuge, GPKR	Beckmann Instruments, München
Kultur-Beutel	American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD, USA
Kulturschalen für MC-Assays	Greiner, Solingen
Laborzentrifuge, Typ 302	Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz
Laktat Analysator	YSI, Yellow Springs, OH, USA
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Leitfähigkeitsmessverstärker, LF537	WTW Wissenschaftlich-Technische Werk- stätten, Weilheim
Leitfähigkeitsmesszelle, LTA100 (K=1 1/cm)	WTW Wissenschaftlich-Technische Werk- stätten, Weilheim
Luftfilter	Pall Deutschland, Dreieich
Magnetic Cell Separator, VarioMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührantrieb mit einer Rührstelle	IKA-Werke, Staufen
Magnetrührantrieb mit zwölf Rührstellen	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Magnetrührstäbe	neoLab Migge, Heidelberg
Massendurchflussventile (O ₂ , CO ₂ , Luft)	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Mediensterilfilter	Sartorius, Göttingen
Mehrkanalpipetten	Biohit Deutschland, Köln
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Mikroträger aus Glas	Schott Glaswerke, Mainz
Mikroträger aus Kollagen	Cellex Bioscience, Minneapolis, MN, USA
Neubauer-Zählkammer, Hämozytometer	Brand, Wertheim
Osmometer, Osmomat O 30	Gonotec, Berlin
Partikelzählgerät, CASY1	Schärfe System, Reutlingen
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
pH-Einstabmesskette	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Greiner, Solingen und Eppendorf, Ham- burg
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
Pumpenschläuche, Marprene	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktordeckel	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Reaktorgefäß	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Reinstwasseranlagen, RO-80 und Milli-Q	Millipore, Eschborn

Gerät	Hersteller
Rührkessel (20 L)	Applikon Biotek, Knüllwald
Rundbodenröhrchen	BD PharMingen, Heidelberg
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Schlauchverbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Schnellkupplungen für Wärmebadzuleitung	Walther, Wuppertal
Schweißbarer Schlauch	Baxter Deutschland, München
Silikonschlauch	BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Spinner	Techne, Cambridge, GB
Steuereinheit für Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Teflonschlauch	Bohlender, Lauda
Tischzentrifuge, Biofuge B	Heraeus Instruments, Hanau
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Videokamera, DXC-950P	Sony Deutschland, Köln
Videokamera Adapter, CMA-D2	Sony Deutschland, Köln
Viskosimeter, VT550	HAAKE, Karlsruhe
Wärmebäder	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda
Wasserbeständiger Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Wirbelschichtreaktor	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Solingen

Sonstiges:

Bezeichnung	Hersteller
MACS-CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Trennsäulen (RS ⁺ /VS ⁺)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-2 ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden

ANHANG C

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Phosphate-Buffered Saline (PBS):

In Reinstwasser gelöst:

- 8,0 g/L NaCl
- 0,917 g/L Na₂HPO₄
- 0,2 g/L KH₂PO₄
- 0,2 g/L KCl

Der pH-Wert wird auf 7,2–7,3 eingestellt.

Puffer für die Glukose-, Glutamin- und Glutamat-Analysatoren:

In Reinstwasser gelöst:

- 5,1 g/L NaCl
- 5,0 g/L Na₂HPO₄
- 1,0 g/L NaH₂PO₄
- 0,3 g/L Na-Benzoat
- 0,5 g/L Na₂-EDTA
- 50 mg/L Gentamicin

Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt, die Osmolalität auf 0,27 Osmol/kg.

Kristallviolettlösung:

In Reinstwasser werden gelöst:

- 0,1 mol/L Zitronensäure
- 21 mg/L Kristallviolett

Markierungspuffer für den Zytotoxizitäts Assay:

In Reinstwasser werden gelöst:

- 50 mmol/L HEPES
- 93 mmol/L NaCl
- 5 mmol/L KCl
- 2 mmol/L MgCl
- 10 mmol/L DTPA
- 2 mmol/L Europium-III-Acetat

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt.

Natriumsulfitlösung:

In Reinstwasser werden gelöst:

- 12 g/L Na₂HPO₄
- 12 g/L NaH₂PO₄
- 0,5 mol/L Na₂SO₃
- 1 μmol/L CoSO₄

Der pH-Wert wird mit 30 % Schwefelsäure auf 8,0 eingestellt.

ANHANG D

Protokolle der verwendeten Methoden

Zellzahlbestimmung auf Mikroträgern mit Kristallviolett:

- 15 mL-Zentrifugenröhrchen auswiegen und Leergewicht notieren.
- Mindestens 0,5 mL bewachsene Kollagenträger in das Zentrifugenröhrchen überführen.
- Überstand entfernen.
- Mit 1–2 mL Kristallviolettlösung versetzen und schütteln.
- Für mindestens 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.
- Zellsuspension mischen und Zellzahl mit einem Hämozytometer bestimmen.
- Überstand absaugen und Mikroträger gründlich mit Reinstwasser waschen.
- Mikroträger für 48 h bei 70 °C trocknen.
- Zentrifugenröhrchen mit den Mikroträgern auswiegen.
- Mit dem Leergewicht vom Beginn ergibt sich das Trockengewicht, auf das die bestimmte Zellzahl bezogen wird.

Zellzahlbestimmung auf Mikroträgern durch Trägerlyse:

- 15 mL-Zentrifugenröhrchen auswiegen und Leergewicht notieren.
- Mindestens 0,5 mL bewachsene Kollagenträger in das Zentrifugenröhrchen überführen.
- Überstand entfernen.
- Träger mit 10 mL PBS waschen.
- Träger ein zweites Mal mit 5 mL PBS waschen.
- Waschlösungen jeweils auffangen und in einem gesonderten Zentrifugenröhrchen vereinen.
- Inkubation der Träger mit 1 mL Kollagenase unter gelegentlichem, leichtem Schwenken bei 37 °C im Wasserbad oder Brutschrank.
- Nach völliger Auflösung der Träger den Prozess mit 5 mL PBS/EDTA abstoppen.
- Sämtliche Flüssigkeit aus dem Zentrifugenröhrchen entfernen (die Edelstahlkugeln verbleiben am Boden).
- Edelstahlkugeln nochmals mit 5 mL PBS/EDTA waschen und vereinigte Lösungen für 10 min bei 400 × g abzentrifugieren.
- Das Pellet in 1 mL Medium aufnehmen und Zellzahl bestimmen.
- Verbliebene Edelstahlträger für 24 h bei 70 °C trocknen und Gewicht ermitteln.

Zytotoxizitäts Assay:

- Zentrifugenröhrchen mit Medium (RPMI 1640 + 5% FCS) vorbereiten. Pro Ansatz (pro Zielzelle): 1×50 mL Zentrifugenröhrchen, 4×15 mL Zentrifugenröhrchen.
- Zellen mit kaltem Medium waschen.
- 5·10⁶ Zellen in 800 µL Markierungspuffer aufnehmen und in Elektroporations-Kuvette Überführen.
- 6 min auf Eis lagern.
- Elektroporation: 250 V, 960 µF, 200 Ω
- 10 min auf Eis lagern.

- Zellen mit einer Pasteurpipette in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführen.
- 5× waschen: Zentrifugation bei 300×g, 10 min, 15–20 °C. Pellet jeweils recht trocken legen.
- Zellen auf $1 \cdot 10^5$ c/mL (bei $1 \cdot 10^4$ Zielzellen), beziehungsweise $5 \cdot 10^4$ c/mL (bei $5 \cdot 10^3$ Zielzellen) einstellen.
- In einer Mikrotiterplatte mit Rundboden werden vorbereitet:
 - Medienprobe für die Backgroundmessung (1:1 mit Medium verdünnen).
 - Für die Spontan-Freisetzung: 100 μ L Zielzellen ($1 \cdot 10^4$ oder $5 \cdot 10^3$) + 100 μ L Medium.
 - Für die Maximum-Freisetzung: 100 μ L Zielzellen + 100 μ L Reinst-Ethanol.
 - Zusätzlich verschiedene Effektor/Targetzell-Verhältnisse zwischen 1:2 und 1:100 einstellen.
- 2–4 h inkubieren.
- Für die Messung: In jede Vertiefung einer Flachboden-Mikrotiterplatte 200 μ L Enhancementlösung vorlegen.
- Die Rundboden-Mikrotiterplatte für 5 min bei 500 × g zentrifugieren.
- 20 μ L Kulturüberstand in Flachboden-Mikrotiterplatte überführen und 10–15 min schütteln.
- Im Fluorometer messen.

CAFC- und LTC-IC-Assay:

- In die Vertiefungen einer Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen jeweils $6 \cdot 10^3$ mit 80 Gy bestrahlte Zellen der Zelllinien M2-10B4mod und S1/SL in 100 μ L Medium (IMDM + 12,5 % FCS + 12,5 % HS + 1 % Penicillin/Streptomycin) zugeben.
- Die Platte für 24 h im Brutschrank inkubieren.
- Im Zehnfach-Ansatz 6 verschiedene Verdünnungsstufen der hämatopoetischen Zellen einsetzen: Die Verdünnungen folgen der Formel $c = b \cdot 3^{n-1}$, mit der Zellzahl c , der Basis-Zahl und der Nummer des Verdünnungsschrittes n . Die Basis-Zahl beträgt bei einer Zellprobe vom Tag des Inokulums 1, nach vier bis sieben Tagen Kultur 5 und danach 10.
- Die Zellen jeweils in 100 μ L Medium zugeben.
- Die Platte 6 Wochen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubieren.
- Einmal pro Woche die Hälfte des Mediums austauschen.
- Für den CAFC-Assay die Vertiefungen unter dem Invertmikroskop auszählen.
- Für den LTC-IC-Assay die Platte zentrifugieren (15 min, 300 × g) und das Medium entfernen.
- Jede Vertiefung mit 100 μ L Methylzellulose-Mediumüberschichten.
- Die Platte 2 Wochen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubieren.
- Die Vertiefungen unter dem Invertmikroskop auszählen.

Durchflusszytometrische Messung:

- In zwei Rundbodenröhrchen jeweils zwischen $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ L vorlegen.
- In ein Rundbodenröhrchen jeweils 5 μ L der Antikörper gegen die zu messenden Antigene zugeben. Es müssen immer mindestens zwei Antigene gemessen werden, deren Antikörper unterschiedlich markiert sein müssen.
- Als Negativkontrolle in das andere Rundbodenröhrchen 5 μ L anti-maus-IgG1-FITC und 5 μ L anti-maus-IgG1-PE zugeben.
- 30 min bei 4 °C inkubieren.
- Zweimal mit 1 ml PBS waschen.

- Pellet in 100 μL PBS resuspendieren.
- Bei einer Vitalitätsbestimmung 5 μL VIAProbe zugeben und 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Die Probe muss am selben Tag im Durchflusszytometer gemessen werden.

Berechnungen zur Sauerstoffeintragsmessung mit der Sulfit-Methode:

Nach dem Befüllen eines Miniatur-Schlaufenreaktors mit frisch angesetzter Natriumsulfitlösung wird die Abdeckplatte mit der eingebauten Sauerstoffelektrode aufgesetzt. Die Messung erfolgt sofort und dauert etwa 15 min. In dieser Zeit misst man einen exponentiellen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks in der Gasphase. Man erhält eine Kurve der Form:

$$f(t) = \exp(-k' t) \quad (\text{D.1})$$

mit: k' = Koeffizient [1/s]
 t = Zeit [s]

Mit dem gemessenen Koeffizienten k' kann der OTR berechnet werden. Die theoretische Überlegung geht davon aus, dass sich die Gasphase ideal verhält. Es gilt also die ideale Gasgleichung:

$$p_{O_2,g} V_g = n R_{O_2} T \quad (\text{D.2})$$

mit: $p_{O_2,g}$ = Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase [bar]
 V_g = Gasvolumen [L]
 n = Gasmenge [mol]
 R_{O_2} = molspezifische Gaskonstante für Sauerstoff [bar L/mol K]
 T = Temperatur [K]

Die zeitliche Änderung des Sauerstoffpartialdrucks durch den Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase erhält man durch die Differenzierung nach der Zeit:

$$\frac{dp_{O_2,g}}{dt} = \frac{dn}{dt} \frac{RT}{V_g} \quad (\text{D.3})$$

Die zeitliche Änderung der Gasmenge n entspricht aber gerade dem absoluten Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase, also dem Term $OTR V_l$. Damit ergibt sich aus der Gleichung (D.3):

$$\frac{dp_{O_2,g}}{dt} = OTR V_l \frac{RT}{V_g} \quad (\text{D.4})$$

mit: OTR = volumenbezogener Sauerstoffeintrag [mol/Ls]
 V_l = Flüssigkeitsvolumen [L]

Aus Gleichung (2.14) auf Seite 30 ist der OTR bekannt, wobei der flüssigkeitsseitige Sauerstoffpartialdruck gleich Null ist. Daraus folgt:

$$\frac{dp_{O_2,g}}{dt} = \frac{k_l a}{H} p_{O_2,g}(t) \frac{RT V_l}{V_g} \quad (\text{D.5})$$

mit: k_l = flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient [m/s]
 H = Henrykoeffizient [Pa m³/kg]

Diese Differentialgleichung kann durch die Trennung der Variablen gelöst werden:

$$\frac{p_{O_2,g}(t)}{p_{O_2,g}(t=0)} = \exp\left(-\frac{k_l a}{H} \frac{RT V_l}{V_g} t\right) \quad (\text{D.6})$$

Der Vergleich dieser Gleichung mit Gleichung (D.1) auf der vorherigen Seite ergibt:

$$k' = \frac{k_l a}{H} \frac{RT V_l}{V_g} \quad (\text{D.7})$$

Diese Beziehung in Gleichung (2.14) auf Seite 30 eingesetzt ergibt einen Ausdruck für den gemessenen *OTR*:

$$OTR = k' \frac{V_g}{RT V_l} p_{O_2,g}(t=0) \quad (\text{D.8})$$

Es sind die Gaskonstante $R_{O_2} = 0,08314 \text{ bar L/mol K}$ und der Sauerstoffpartialdruck der Gasphase zu Beginn des Experiments $p_{O_2,g}(t=0) = 0,2095 \text{ bar}$ bekannt. Damit ergibt sich die endgültige Formel für den gemessenen *OTR*:

$$OTR = 9071,45 k' \frac{V_g}{T V_l} \quad (\text{D.9})$$

Die Temperatur ist dabei in [K] einzusetzen, der Koeffizient k' in [1/s]. Der *OTR* ergibt sich daraus in [mol/Lh].

Source-Code des Programms für die automatische Bildanalyse

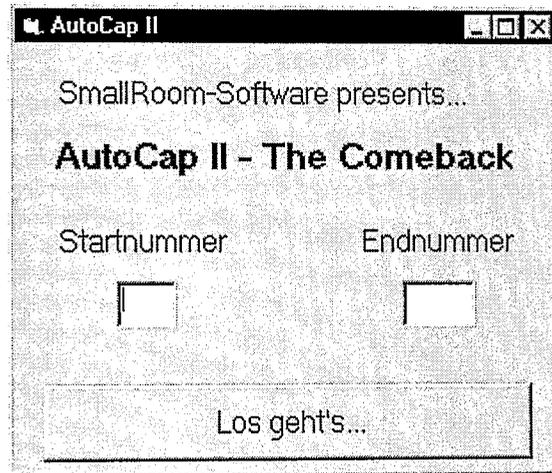


Abbildung E.1: Dialogfenster des Programms, mit Feldern für die Start- und Endnummer der Videobilder und der Schaltfläche zum Starten der Programmroutine

```
Private Sub Command1_Click()
```

```
'Das Programm wurde in Microsoft Visual Basic 4.0 geschrieben. Es  
'benötigt ein geöffnetes Programm Video Capture Version 5.02  
'(Ulead 'Systems, Inc.) mit der geöffneten AVI-Datei, deren Name  
'"test.avi" sein muss. Weiterhin muss das Programm ScionImage  
'geöffnet sein.
```

```
'Programmroutine nach dem Drücken der Starttaste.
```

```
    'Akkustisches Signal  
    For k = 1 To 40  
        Beep  
    Next k
```

```
    'Aufruf des Video Capture Programmes  
    AppActivate "Video Capture - test.avi"
```

```
    'Speichern der Einzelbilder im TIF-Format  
    For i = Text1.Text To Text2.Text  
        SendKeys "{F8}", True  
        j = i + 10000
```

```
SendKeys j & ".tif", True
SendKeys "{Enter}", True
  For k = 1 To 2000000
  Next k
SendKeys "{Right}", True
Next i

'Akkustisches Signal und kurze Pause
For k = 1 To 40
  Beep
Next k
For k = 1 To 2000000
Next k

'Einlesen und Auswerten der Einzelbilder in ScionImage
For i = Text1.Text To Text2.Text
  AppActivate "Scion Image"
  SendKeys "%F", True
  SendKeys "I", True
  j = i + 10000
  SendKeys j & ".tif", True
  SendKeys "{ENTER}", True
  For k = 1 To 500000
  Next k
  SendKeys ">", True
  For k = 1 To 200000
  Next k
  SendKeys "^1", True
  For k = 1 To 500000
  Next k
  SendKeys "^w", True
  SendKeys "n", True
  For k = 1 To 200000
  Next k
Next i

'Akkustisches Signal
For k = 1 To 40
  Beep
Next k

End Sub
```

Konstruktionszeichnungen der Kultursysteme

F.1 Immobilisierte Systeme

F.1.1 Der Festbettreaktor

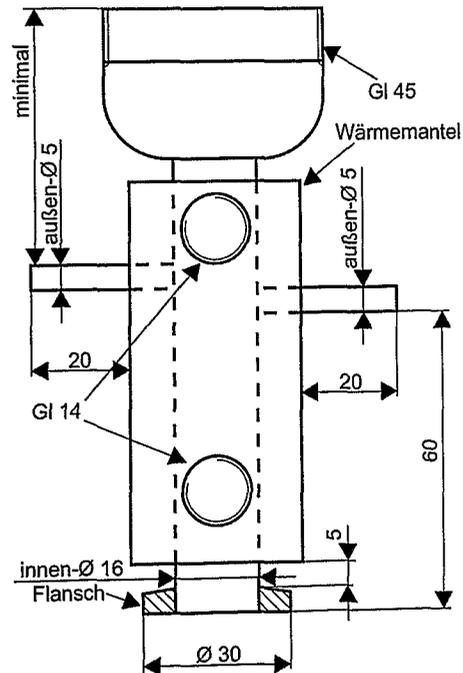


Abbildung F.1: Kultivierungsraum des Festbettreaktors (Werkstoff: Glas)

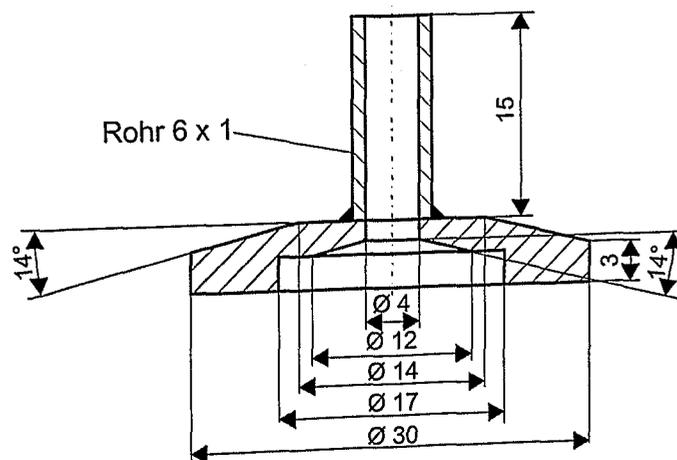


Abbildung F.2: Unterer Flansch des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

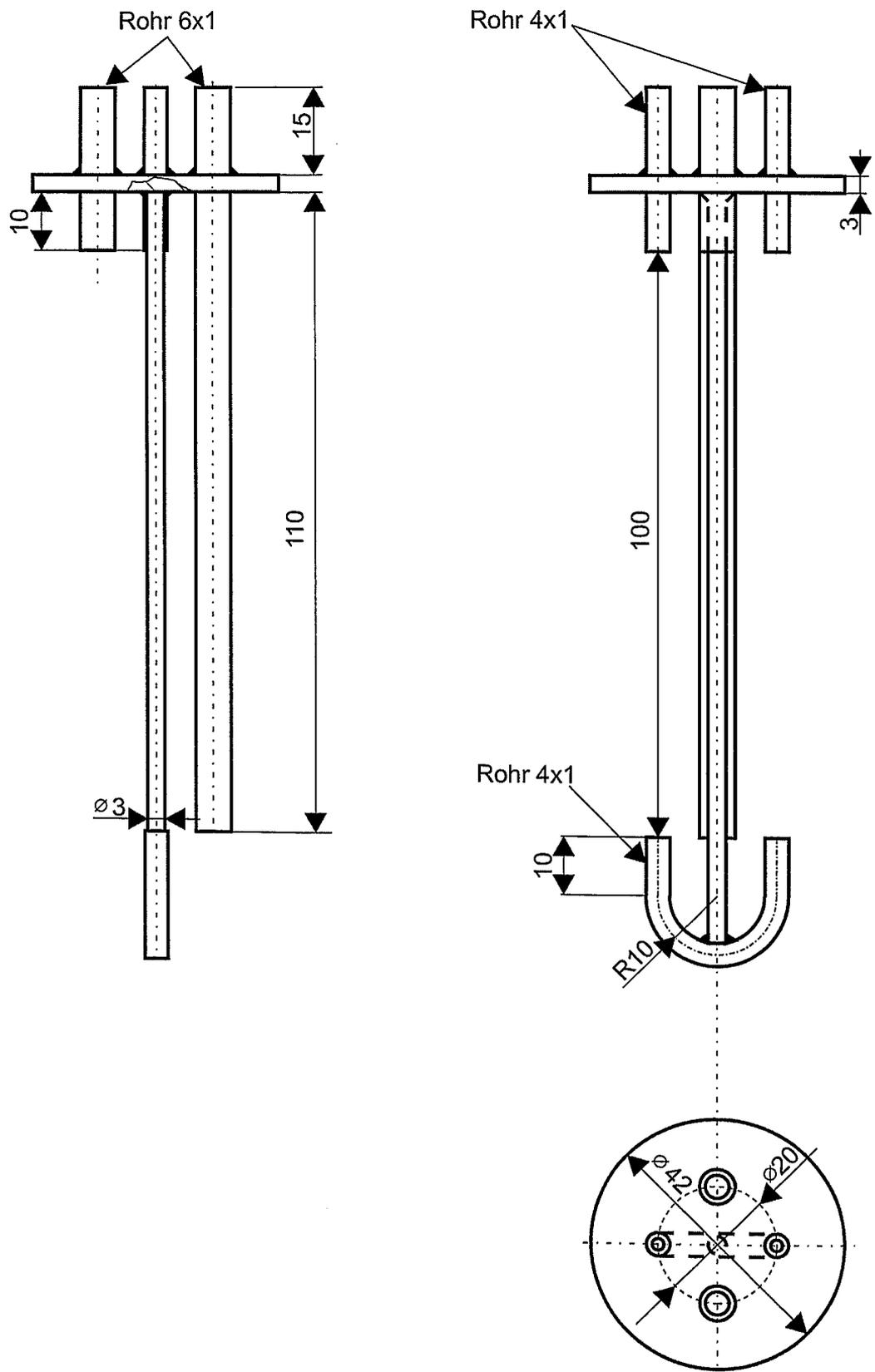


Abbildung F.3: Einsatz des Begasungsgefäßes des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

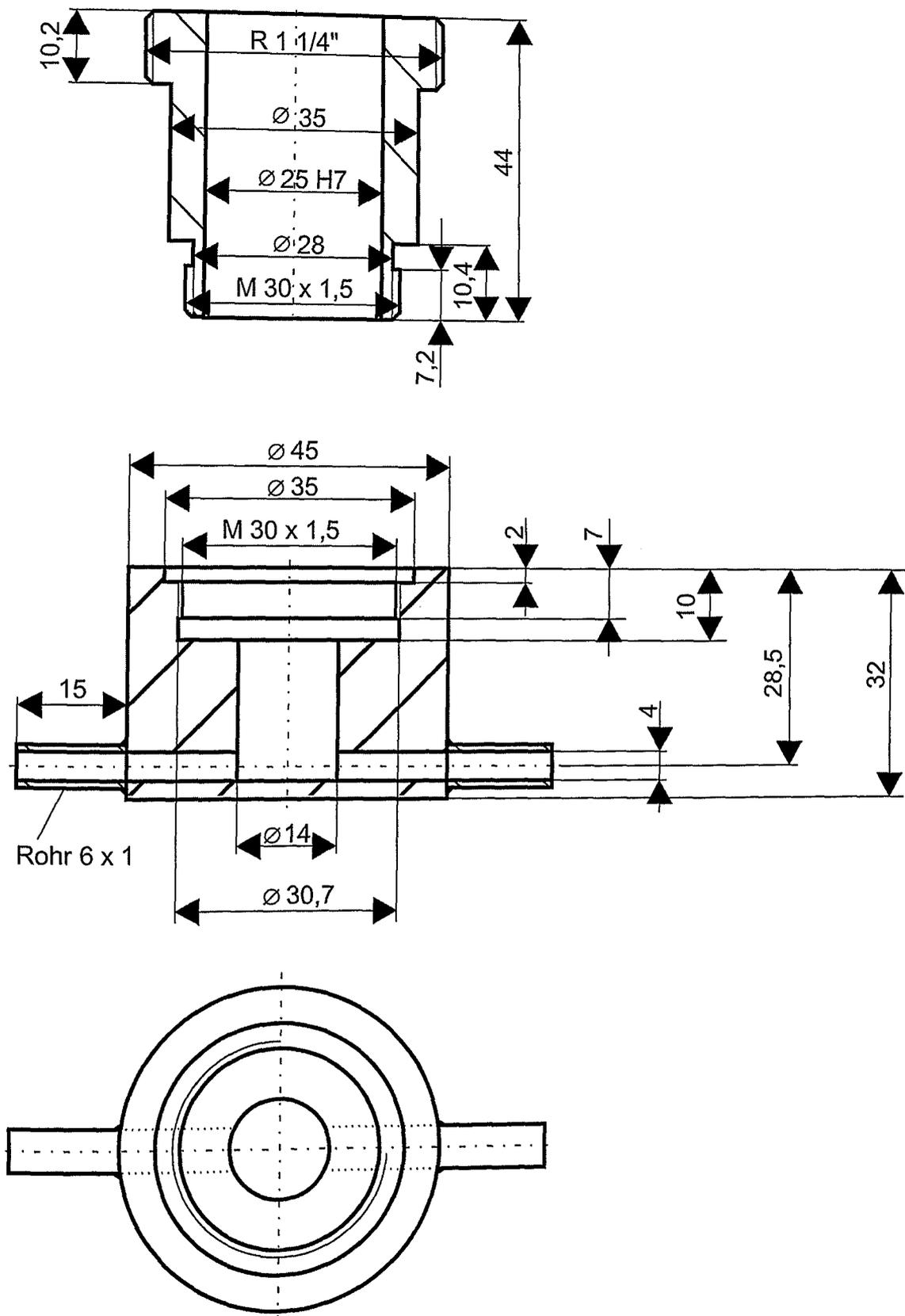


Abbildung F.4: Volumenverringerte Elektrodenhalterung des Festbettreaktors (Werkstoff: X6 Cr-NiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

F.1.2 Der Miniatur-Schlaufenreaktor

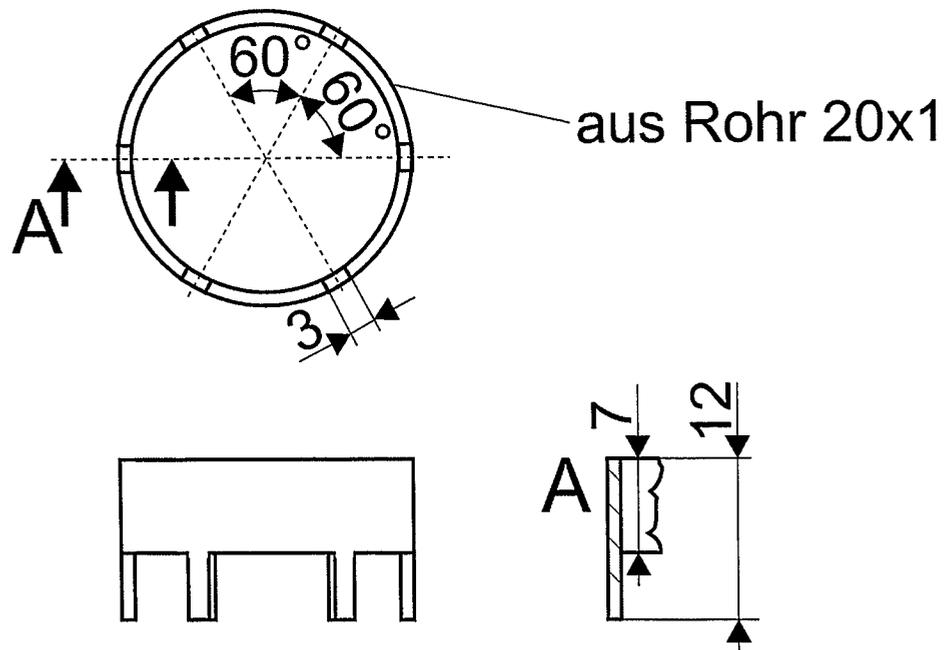


Abbildung F.5: Einsatz des Miniatur-Schlaufenreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

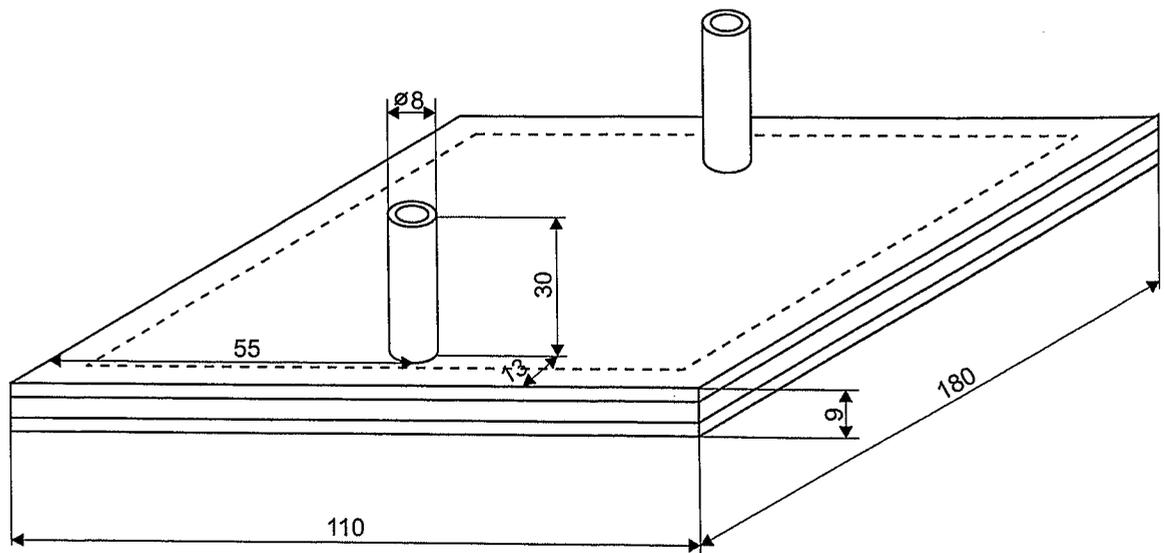


Abbildung F.6: Zwischenplatte des Miniatur-Schlaufenreaktors (Werkstoff: Glas)

F.2 Suspensionssysteme

F.2.1 Der kontrollierte Suspensionsreaktor

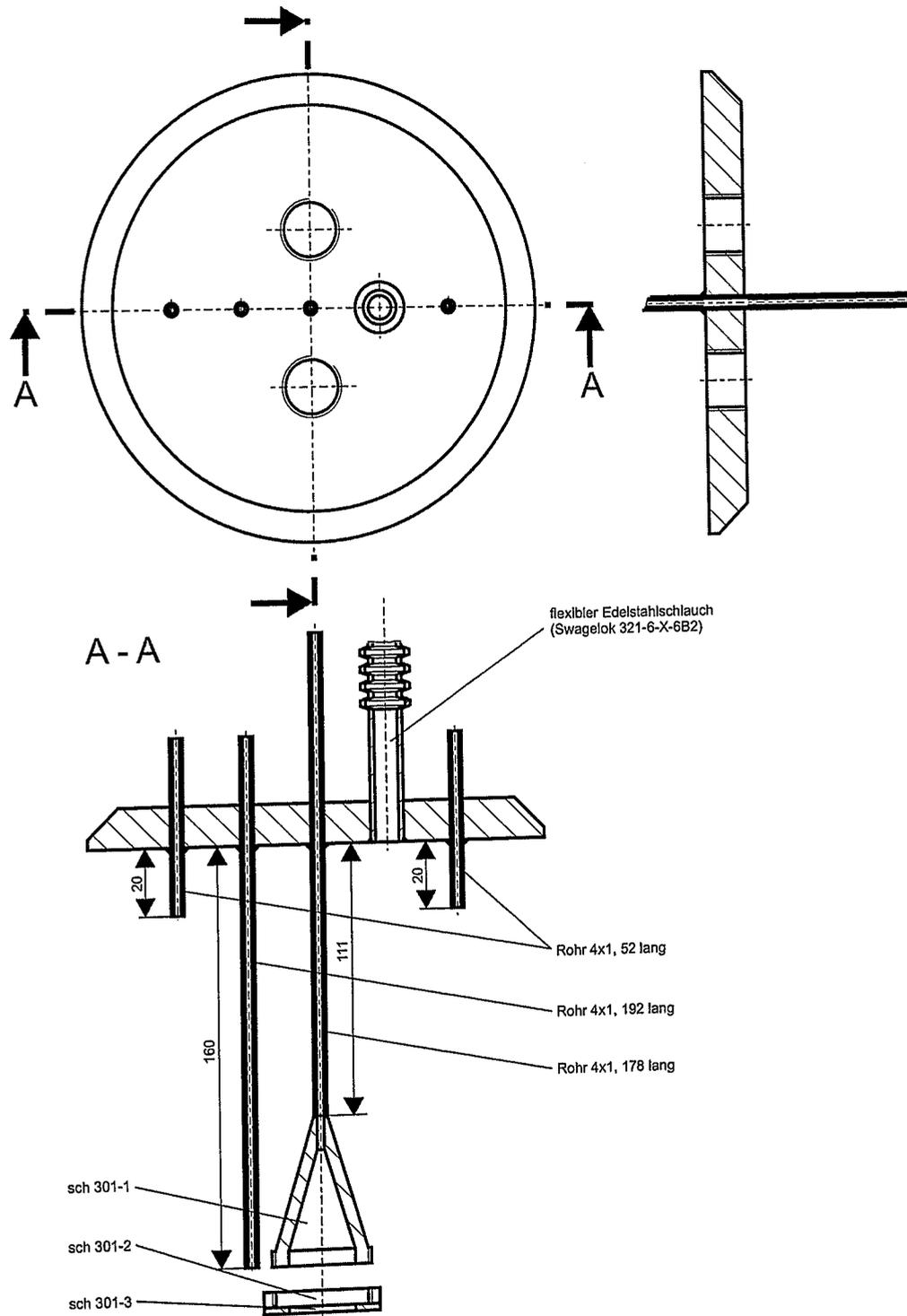


Abbildung F.7: Zusammenstellungszeichnung des Deckels des kontrollierten Suspensionsreaktors

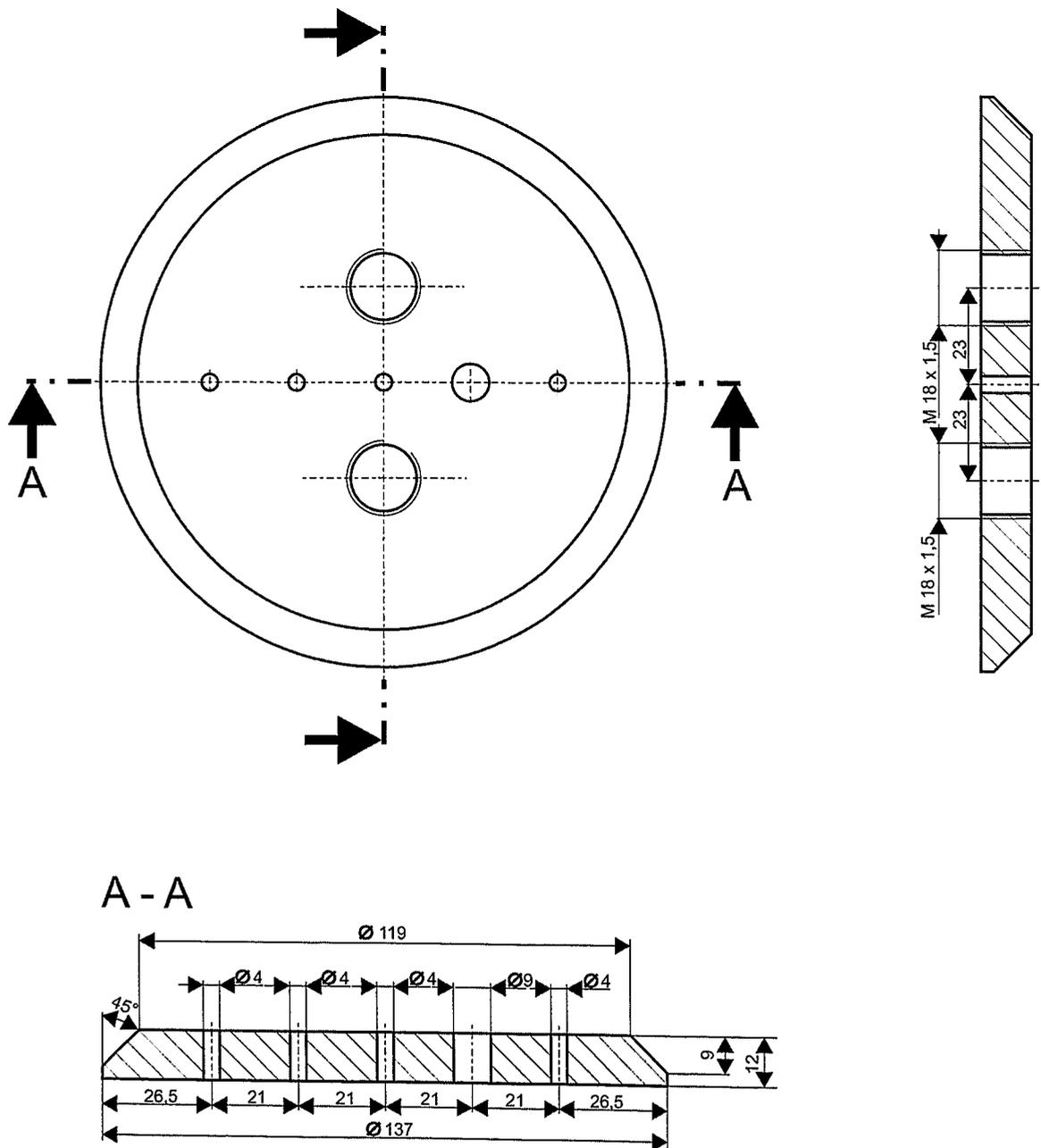
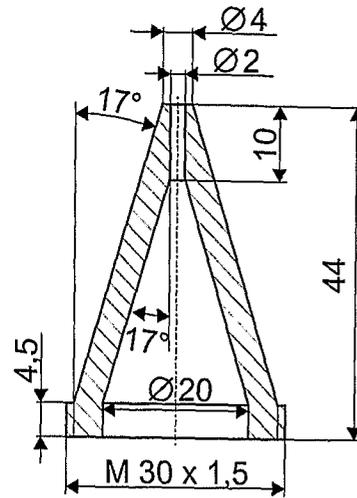
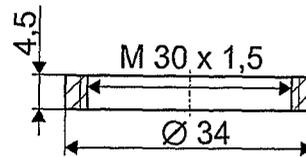


Abbildung F.8: Deckelplatte des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

sch 301-1



sch 301-2



sch 301-3

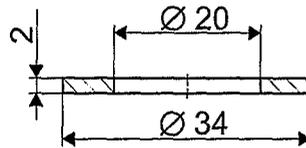


Abbildung F.9: Reaktorablauf des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: X6 CrNiMoTi 17 12 2, Werkstoffnr.: 1.4571)

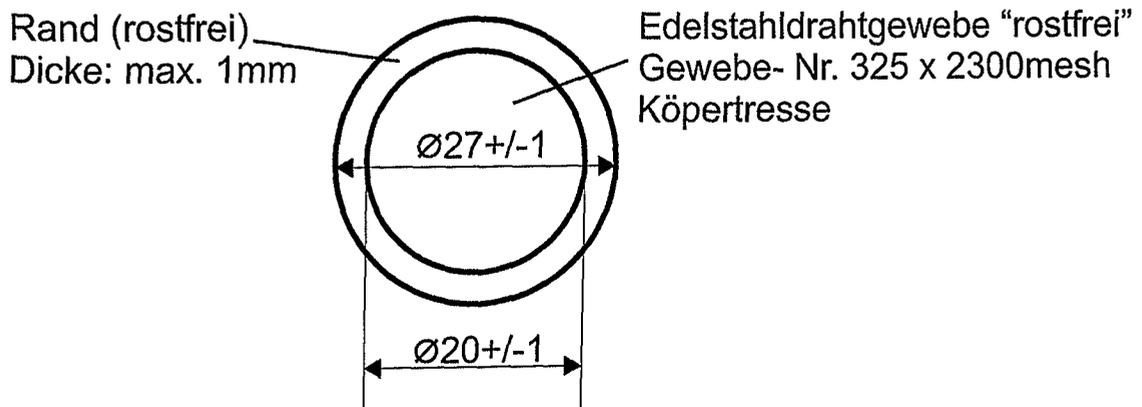


Abbildung F.10: Zellrückhaltefilter des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: Hastelloy)

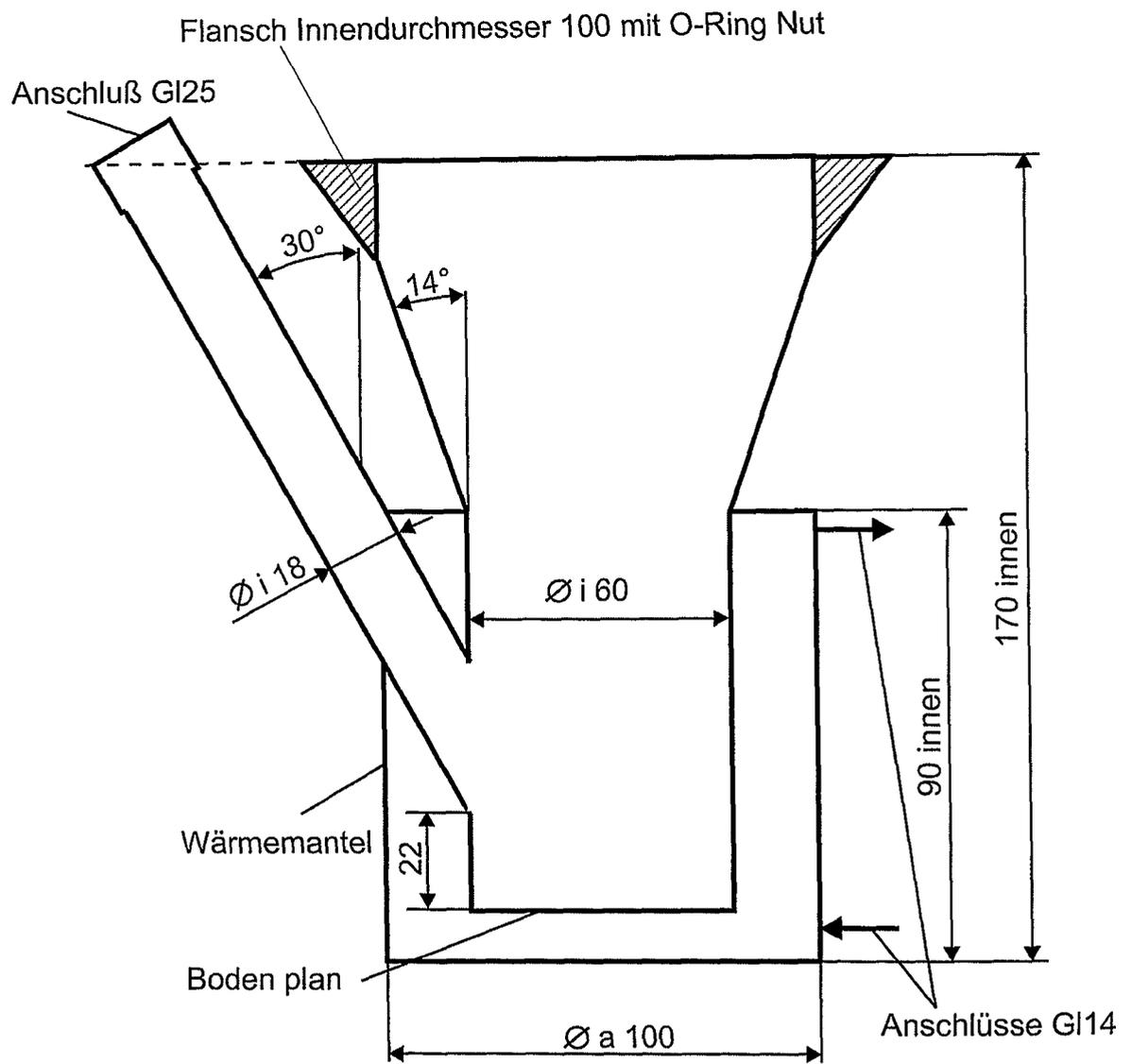


Abbildung F.11: Reaktorgefäß des kontrollierten Suspensionsreaktors (Werkstoff: Glas)

F.2.2 Der miniaturisierte Spinner

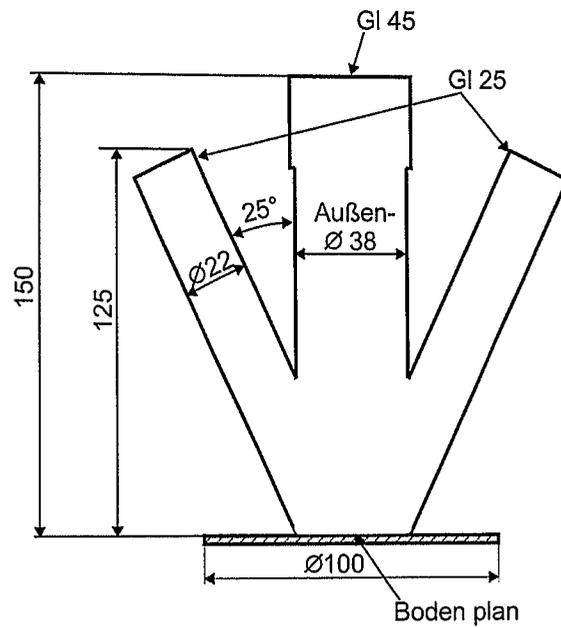


Abbildung F.12: Reaktorgefäß des miniaturisierten Spinners (Werkstoff: Glas)

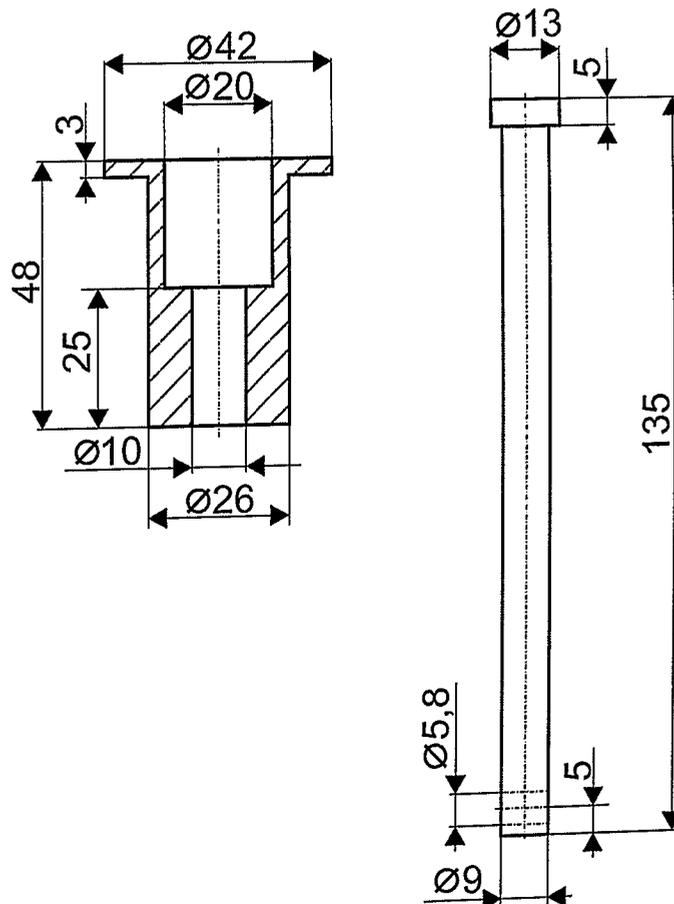


Abbildung F.13: Rührerwelle des miniaturisierten Spinners (Werkstoff: virginales PTFE)

ANHANG G

Die Herleitung der Sauerstoffbilanz-Gleichung für den Festbettreaktor

Es gelten die Beziehungen für die Membranbegasung aus Abschnitt 2.6.3 auf Seite 29. Aus Gleichung (2.18) auf Seite 32 erhält man eine Gleichung für den Partialdruck am Ausgang der Membran:

$$p_{l,A} = p_g - \exp\left(-\frac{K A}{\dot{V}}\right) (p_g - p_{l,E}) \quad (\text{G.1})$$

Setzt man diese Beziehung erneut in Gleichung (2.18) auf Seite 32 ein, ergibt sich:

$$\dot{m} = \frac{K A}{H} \frac{\left(p_g - \exp\left(-\frac{K A}{\dot{V}}\right) (p_g - p_{l,E})\right) - p_{l,E}}{\ln\left(\frac{p_g - p_{l,E}}{p_g - \left(p_g - \exp\left(-\frac{K A}{\dot{V}}\right) (p_g - p_{l,E})\right)}\right)} \quad (\text{G.2})$$

Darüber hinaus gelten die Beziehungen:

$$p_{l,E} = \frac{p_l^*}{100} 0,209 (p_U - p_D) \quad (\text{G.3})$$

und:

$$p_g = x_g (p_U - p_D) \quad (\text{G.4})$$

mit: x_g = Sauerstoffanteil in der Gasphase [-]
 p_U = Umgebungsdruck [Pa]
 p_D = Wasserdampfdruck [Pa]
 p_l^* = gemessener Sauerstoffpartialdruck [% Luftsättigung]
 (der Faktor 0,209 entspricht dem Sauerstoffanteil in Luft)

Diese beiden Gleichungen können nun in Gleichung (G.2) eingesetzt werden und man erhält:

$$\dot{m} = \frac{K A (p_U - p_D)}{H} \frac{\left(x_g - \exp\left(-\frac{K A}{\dot{V}}\right) \left(x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100}\right)\right) - \frac{0,209 p_l^*}{100}}{\ln\left(\frac{x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100}}{x_g - \left(x_g - \exp\left(-\frac{K A}{\dot{V}}\right) \left(x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100}\right)\right)}\right)} \quad (\text{G.5})$$

Zusammen mit Gleichung (2.15) auf Seite 31, Gleichung (2.16) auf Seite 31 und Gleichung (2.17) auf Seite 31, mit denen man einen Ausdruck für den Stoffdurchgangskoeffizienten K bilden kann, ergibt sich daraus:

$$\dot{m} = \frac{A(p_U - p_D)}{H d_i \left(\frac{1}{Sh D} + \frac{\ln\left(\frac{d_a}{d_i}\right)}{2 P H} \right)} \left(x_g - \exp \left(- \frac{A}{\dot{V} d_i \left(\frac{1}{Sh D} + \frac{\ln\left(\frac{d_a}{d_i}\right)}{2 P H} \right)} \right) \left(x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100} \right) - \frac{0,209 p_l^*}{100} \right) \ln \left(\frac{x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100}}{x_g - \exp \left(- \frac{A}{\dot{V} d_i \left(\frac{1}{Sh D} + \frac{\ln\left(\frac{d_a}{d_i}\right)}{2 P H} \right)} \right) \left(x_g - \frac{0,209 p_l^*}{100} \right)} \right) \quad (G.6)$$

und in vereinfachter Schreibweise:

$$\dot{m} = \frac{\dot{V} (p_U - p_D)}{H} \left(1 - \exp \left(- \frac{2 A Sh D P H}{\dot{V} d_i \left(2 P H + Sh D \ln \left(\frac{d_a}{d_i} \right) \right)} \right) \right) \left(x_g - 2,09 \cdot 10^{-3} p_l^* \right) \quad (G.7)$$

Die Geometriedaten des Reaktors sind bekannt. Für die Stoffwerte können näherungsweise die Werte von Wasser bei 37 °C angenommen werden (vergleiche [17]). Damit ergeben sich folgende Werte:

Bezeichnung:	Wert:	Quelle:
äußerer Membrandurchmesser d_a	0,005 m	-
innerer Membrandurchmesser d_i	0,004 m	-
Membranlänge L	0,2 m	-
kinematische Viskosität ν	$0,70205 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$	[205, 224]
Umgebungsdruck p_U	10^5 Pa	Annahme eines mittleren Wertes
Wasserdampfdruck p_D bei 37 °C	$6\,275 \text{ Pa}$	[205]
Henry-Koeffizient H	$2,97 \cdot 10^6 \text{ Pa m}^3/\text{kg}$	[205]
Diffusions-Koeffizient D	$3,34 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$	[10]
Permeabilität P	$9,65 \cdot 10^{-15} \text{ kg/Pa m s}$	[20]

Eingesetzt erhält man damit die Gleichung:

$$\dot{m} = 0,03156 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \dot{V} \left(1 - \exp \left(- \frac{1,62 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} Sh}{\dot{V} (229300 + 2981 Sh)} \right) \right) \left(x_g - 2,09 \cdot 10^{-3} p_l^* \right) \quad (G.8)$$

ANHANG H

Originaltext des Studienprotokolls der klinischen Studie mit der Zelllinie NK-92 bei Kindern und Jugendlichen

Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*,
Johann Wolfgang von Goethe Universität-Frankfurt
Theodor Stern Kai 7, 60528 Frankfurt am Main

und

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie,
Blutspendedienst Hessen des DRK[§]
Sandhofstr. 1, 60528 Frankfurt am Main

und

Bone Marrow Transplant Center, Rush Cancer Institute⁺, Chicago, USA

Protokoll: NK 99-1

**Klinische Studie (Phase I/II) zur Untersuchung der Verträglichkeit und
Effizienz einer Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit
fortgeschrittenen Krebserkrankungen mit der immortalisierten Natürlichen
Killer Zell-Linie NK-92**

Studienteilnehmer: Priv. Doz. Dr. med. D. Schwabe*
Dr. med. T. Tonn[§]
Dr. phil. nat. R. Esser*
Dr. phil. nat. U. Koehl*
Prof. Dr. med. H.G. Klingemann⁺
Prof. Dr. med. E. Seifried[§]
Dr. med. M. Keyser[§]
Dr. med. H.P. Grüttner*

Protokoll-Synopsis

- Titel:** Klinische Studie (Phase I,II) zur Untersuchung der Verträglichkeit und Effizienz einer Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen mit der immortalisierten Natürlichen Killer Zell-Linie NK-92.
- Ziel:** Die Studie der Phase I/II soll die Verträglichkeit einer intravenösen Infusion von bestrahlten, höchst zytotoxischen NK-92 Zellen bei Krebspatienten untersuchen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die verabreichte Dosis bestrahlter NK-92 Zellen zu einer Regression des Tumors führt.
- Indikationen:** Maligne Erkrankungen von Kindern und Jugendlichen, wie z. B.:
 Akute lymphatische Leukämie
 Chronische myeloische Leukämie
 Non-Hodgkin Lymphom
 Hodgkin Lymphom
 kindliche Sarkome
 Neuroblastom
 Hirntumore
bei denen es zu einem Rückfall nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation gekommen ist oder herkömmliche Behandlungsformen versagt haben, so daß nur durch experimentelle Ansätze eine Aussicht auf Heilung besteht.
- Alter:** Es ist keine Altersbeschränkung vorgesehen
- Behandlung:** Es handelt sich um eine offene, einarmige klinische Studie der Phase I/II, die zum Ziel hat die Nebenwirkungen und die Effizienz einer Infusion von bestrahlten NK-92 Zellen bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung zu ermitteln. Die 1. Phase der Studie dient der Findung einer Patienten-verträglichen Zelldosis. Sollte die erste Infusion mit NK-92 Zellen vom Patienten gut toleriert werden, ist geplant, eine zweite Infusion mit der gleichen Zelldosis zwei Tage nach der ersten Infusion zu verabreichen. Gemäß dem Studienprotokoll der Phase I sollen je drei Patienten mit 10^9 , $3 \cdot 10^9$ oder $5 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen pro m^2 Körperoberfläche behandelt werden.
 Die Dosis NK-92 Zellen, die nach dieser Phase I Studie als verträglich eingestuft werden kann, wird in der Phase II Studie Anwendung finden, für die initial 17 Patienten vorgesehen sind. Wie bereits erwähnt, werden die NK-92 Zellen vor Infusion bestrahlt, um eine Proliferation der Zellen *in vivo* zu vermeiden.

1 Einleitung

1.1 Charakteristika von Natürlichen Killer Zellen und ihre klinische Anwendung

Natürliche Killer (NK) Zellen treten im peripheren Blutkreislauf auf und machen etwa 1 % aller zirkulierender Lymphozyten aus. NK-Zellen können entartete oder viral infizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung, wie es etwa für die zytotoxische Aktivität von T-Zellen Bedingung ist, erkennen und abtöten. Einige Zielzellen sind durch Expression von humanen Leukozyten Antigenen (HLA) der Klasse I in der Lage, die zytolytische Aktivität von NK-Zellen zu vermindern und so einer Zytolyse durch NK-Zellen zu entkommen. Eine verminderte Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Zielzellen, deren Inhibition oder Blockierung, können im Gegensatz dazu die NK-Aktivität steigern(1).

Natürliche Killer Zellen können durch Zytokine stimuliert werden, und so zu sogenannten Lymphokin aktivierten Killer-Zellen (LAK) werden, welche im Vergleich zu nicht aktivierten NK-Zellen ein breites Spektrum maligner Zielzellen abtöten können. Interleukin-2 (IL-2) ist das am besten charakterisierte Zytokin in Bezug auf eine Generierung und Aktivierung von LAK-Zellen. Aber auch andere Zytokine wie zum Beispiel Interleukin-12 und Interleukin-15 können diese Funktion erfüllen. Eine Therapie mit *ex vivo* aktivierten und expandierten NK-Zellen fand bereits bei Patienten mit verschiedensten fortgeschrittenen Tumoren Anwendung und hat bei Patienten mit malignem Melanom, Nierenzellkarzinom sowie Leukämien gewisse Erfolge erzielt (2,3). Obwohl diese Behandlung einigen Patienten Vorteile verschaffte, ist sie doch sehr kosten- und arbeitsintensiv und ist insbesondere durch die Nebenwirkungen der hohen, systemischen Interleukin-2 Dosen nur unter Intensivtherapie-Bedingungen durchführbar.

Higuchi und Kollegen aus Seattle sammelten periphere Blutlymphozyten (PBL's) durch Leukapherese bei Patienten mit AML nach Hochdosis-Chemotherapie und autologer Knochenmarktransplantation, um diese wiederholt zur Behandlung der Patienten einzusetzen (4). Die Zellen wurden *ex vivo* expandiert und durch Kultivierung in IL-2-haltigem Medium aktiviert, bevor sie den Patienten verabreicht wurden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer Phase I/II Studie durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind mit einem 60 %-igen rückfallfreien Überleben bemerkenswert und weisen darauf hin, daß eine Behandlung mit LAK-Zellen durchaus zu einem anti-leukämischen Effekt führen kann. Nachteile liegen bei der hier praktizierten Behandlungsweise in einem hohen Thrombozytenverlust während der Leukapheresen und in den Nebenwirkungen der zusätzlich applizierten IL-2 Dosen. Die hohen, systemischen IL-2 Dosen verursachten bei den Patienten ernstzunehmende Nebenwirkungen.

Um zu untersuchen, ob es zu Nebenwirkungen kommt, wenn man LAK-Zellen Patienten nach Hoch-Dosis Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation transfundiert, hat eine Gruppe aus Pittsburg 6 Patienten mit autologen, vorher kryokonservierten LAK-Zellen behandelt und keine Beeinträchtigung des Engraftment oder andere signifikante Nebenwirkungen festgestellt (5).

1.2 Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit therapierefraktärer maligner Erkrankung und/oder Rückfall nach Stammzelltransplantation

Die Behandlung von Krebspatienten, welche auf konventionelle Chemo- und Radiotherapie nicht ansprechen und unter einem progressiven Krankheitsverlauf leiden, ist zur Zeit auf experimentelle Ansätze beschränkt. Patienten, die nach einer Hoch-Dosis Chemotherapie und unterstützender Radiotherapie mit allogenen oder autologem Stammzellsupport einen Rückfall erleiden, haben generell eine schlechte Prognose.

Die Immuntherapie durch Verabreichung von Interleukinen, Tumorantigen-präsentierenden dendritischen Zellen oder zytotoxischen T- und NK-Zellen findet zunehmend Berücksichtigung. Die Anwendung dieser Therapieformen hat den Vorteil, daß sie andere Behandlungsmethoden, wie die Hochdosis-Chemotherapie, nicht ausschließen.

Zur Gewinnung von LAK-Zellen muß der Patient nach bisherigen Protokollen einige Tage systemisch mit IL-2 behandelt werden und sich anschließend einer Leukapherese unterziehen. Die NK-Zellen können so in der Fraktion der mononukleären Zellen gewonnen werden. Durch darauffolgende *ex vivo* Inkubation der Zellen mit IL-2 werden die NK-Zellen zu LAK-Zellen. Werden die LAK-Zellen schließlich retransfundiert, müssen dem Patient erneut hohe Dosen IL-2 systemisch verabreicht werden, um den Aktivierungszustand der Zellen aufrecht zu erhalten. Die hohen IL-2 Dosen sind jedoch mit ernstzunehmenden Nebenwirkungen für den Patienten verbunden. Diese Form der Immuntherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen hat daher keine Akzeptanz unter den behandelnden Kollegen gefunden.

1.3 Charakteristika der NK-92 Zell-Linie

1992 wurde in dem Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann eine Zell-Linie aus den peripheren Blutlymphozyten eines Patienten mit granulärem Lymphom, einer aggressiven Form der Non-Hodgkin Lymphome, isoliert (6). Diese Zell-Linie, genannt NK-92, zeigte die gleichen Charakteristika wie LAK-Zellen, mit der Ausnahme, daß sie das CD16 Antigen (Fc-Rezeptor) nicht exprimiert. Der Fc-Rezeptor bindet den Fc-Teil von Immunglobulinen und ist somit in die Antikörper vermittelte Zytotoxizität (ADCC) von NK-Zellen involviert. Die zytotoxische Aktivität von NK-92 Zellen wird in erster Linie durch die Freisetzung von Perforin durch Granulozyten vermittelt, welches die Membran der Zielzelle für die von LAK- und NK-92 Zellen abgegebenen Esterasen durchgängig macht. Die Esterasen führen schließlich zu einer Zerstörung der betroffenen Zellen.

Im Vergleich zu LAK-Zellen sind NK-92 Zellen um ein Vielfaches zytolytischer, bzw. zytotoxischer, bezogen auf die für eine Zytolyse notwendige Zellzahl. Darüber hinaus vermögen NK-92 Zellen ein weitaus breiteres Spektrum von Tumor Zell-Linien und primärer Tumoren abzutöten (7-9). Die Kulturbedingungen, die IL-2 Abhängigkeit, die Oberflächenmoleküle und das zytotoxische Profil der NK-92 Zellen wurden bereits ausführlich beschrieben (6).

Da NK-92 Zellen den p58 Oberflächenmarker nicht exprimieren - ein Oberflächenantigen, welches eine entscheidende Rolle in der Interaktion von LAK- und Zielzellen spielt - zeigen NK-92 Zellen eine weit gefächerte zytotoxische Aktivität gegenüber Krebs- und virusinfizierten Zellen. Die Expression des p58 Rezeptors unterdrückt die NK-Zellaktivität, so daß kein Abtöten der Zielzelle erfolgt. Im Gegensatz zu aus peripherem Blut isolierten NK- und LAK-Zellen exprimieren NK-92 Zellen diesen Rezeptor nicht (10).

1.4 Untersuchungen zu NK-92 Zellen in der Zellkultur und in Tierexperimenten

Eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen zeigen die Überlegenheit der NK-92 Zellen im Vergleich zu LAK-Zellen. NK-92 Zellen zeigten eine effektive zytotoxische Aktivität gegen Zell-Linien, die sich von den folgenden malignen Erkrankungen ableiteten:

Akute Myeloische Leukämie: HL-60, KG1a, U937, DHL-10

Akute Lymphoblastische Leukämie: NALM6, TALL-104, CEM/S, CEM/T

Chronisch Myeloische Leukämie: K562

Malignes Lymphom: Daudi, Jurkat, Raji, Ly3, Ly8, Ly13.2

Neuroblastom: SKNAS

Malignes Myelom: NCI H929, RDMI 8226, U266
 Melanom der Haut: MBWO, WMI 341, SK-mel-28, WM35
 Prostata Karzinom: 81.HTB, 1435.CRL
 Mamma Karzinom: MCF-7

Darüber hinaus wurden maligne Zell-Linien und Leukämiezellen von Patienten immundefizienten (SCID) Mäusen injiziert. Eine Injektion von bestrahlten NK-92 Zellen konnte die Überlebenszeit der so behandelten Mäuse deutlich steigern und führte in einigen Fällen sogar zu einer kompletten Heilung der Mäuse. Diese Untersuchungen wurden unabhängig voneinander am Sloan Kettering Cancer Center in New York (9) und dem Terry Fox Labor in Vancouver im Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann durchgeführt.

Die NK-92 Zellen zeichnen sich einerseits durch ihre hohe Zytotoxizität und andererseits durch ihr breites Wirkspektrum aus. NK-92 Zellen wurden mit einer zytotoxischen Zell-Linie verglichen, welche im Wistar Institut in den USA gewonnen wurde. Diese TALL-104 Zell-Linie ist von T-Zellen abgeleitet und vermag, ebenso wie NK-92 Zellen, maligne Zell-Linien in vitro und Leukämiezellen selektiv im peripheren Blut abzutöten (11). Die Gruppe im Wistar Institut hat gegenwärtig Studien abgeschlossen, in denen die Wirksamkeit der TALL-104 Linie an Hunden getestet wurde, die an malignen Erkrankungen litten. Sie konnten zeigen, daß durch die intravenöse Verabreichung der TALL-104 Zellen eine Remission der Tumore hervorgerufen wurde.

Yan und Mitarbeiter verglichen am Sloan Kettering Krebsforschungszentrum in New York die zytotoxische Aktivität der Tall-104 und NK-92 Zellen und konnten zeigen, daß NK-92 Zellen wesentlich zytotoxischer gegenüber malignen Zellen waren und ein breiteres Spektrum an Zielzellen erkannten (8). Es ist anzumerken, daß die TALL-104 Zellen gegenwärtig in einer Phase I Studie an Krebspatienten getestet werden.

Aus den folgenden Gründen erwartet man von einer Behandlung mit NK-92 Zellen eine effektivere Abtötung maligner Zellen als durch LAK-Zellen, die aus peripherem Blut gewonnen wurden:

1. LAK-Zellen werden aus peripheren mononukleären Blutzellen gewonnen, in denen sie etwa 10% der Lymphozytenfraktion repräsentieren. Um bei einer Expansion bzw. Voraktivierung der NK-Zellen nicht auch die mit ca. 60% vorhandenen und für eine Graft versus Host-Reaktion verantwortlichen T-Zellen zu expandieren, ist eine aufwendige Anreicherung der NK-Zellen über Magnetsäulen notwendig.
2. Dem Tumorwachstum im Patienten liegen wahrscheinlich Mechanismen zugrunde, die es den malignen Zellen erlaubt haben, dem Immunsystem des Patienten zu entkommen. Verwendet man die NK-Zellen eben dieses Patienten, ist anzunehmen, daß solche Mechanismen immer noch wirksam sind. Einer dieser Mechanismen könnte zu einer Toleranzinduktion gegenüber den Tumorzellen geführt haben, so daß die T- und NK-Zellen des Patienten die Tumorzellen nicht als fremd erkennen. NK-92 Zellen dagegen stellen allogene NK-Zellen dar, die nicht tolerant gegenüber den Tumorzellen sein sollten.
3. Vergleichende Studien zwischen LAK-Zellen, die von gesunden Spendern gewonnen wurden, und NK-92 Zellen bestätigen die überlegene zytotoxische Aktivität der NK-92 Zellen. NK-92 Zellen töten ein breiteres Spektrum maligner Zellen. Dies trifft noch für Effektor/Zielzellen Verhältnisse zu, bei denen keine LAK-Aktivität mehr nachweisbar ist (7).

1.5 Präklinische Experimente zur Untersuchung der Sicherheit einer NK-92 Therapie

Um die immortalisierte NK Zell-Linie für eine Therapie bei Patienten einsetzen zu können, mußte zunächst eine Bestrahlungsdosis bestimmt werden, bei der die Zellen selbst nicht mehr proliferieren, in ihrer zytotoxischen Aktivität jedoch nicht eingeschränkt sind.

Untersuchungen im Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann (7) und am Memorial Sloan Kettering Krebsforschungs Institut haben ergeben, daß eine Bestrahlung mit geringen Dosen von 500-1000 cGy das weitere Wachstum der NK-92 Zellen zuverlässig verhindert. Diese Daten konnten zum einen durch ³H-Thymidin Proliferationsassays, aber auch durch klonogene Assays in Methylzellulose bestätigt werden. Bei den hier beschriebenen Bestrahlungsdosen ist die Viabilität und die zytotoxische Aktivität der NK-92 Zell-Linie nicht beeinflusst. Diese Untersuchungen waren eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Zell-Linie beim Patienten.

Darüber hinaus waren Untersuchungen wichtig, die zeigten, daß NK-92 Zellen maligne Zellen spezifisch erkennen und abtöten, aber allogene und gesunde Zellen des Patienten nicht beeinträchtigten. Hierzu wurden NK-92 Zellen mit hämopoetischen Vorläuferzellen inkubiert und die Proliferation der Stammzellen anschließend in einem clonogenen Assay ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, daß NK-92 Zellen die Funktion der Stammzellen nicht beeinflussen. Darüber hinaus ergab eine Untersuchung mit humanen Hautzellen keine zytotoxische Aktivität der NK-92 Zellen (13).

Untersuchungen an immuninkompetenten SCID Mäusen haben ebenfalls bestätigt, daß die NK-92 Zellen selbst nicht tumorigen sind. In Mäusen, welche mit verschiedenen Konzentrationen NK-Zellen intravenös behandelt wurden, ließ sich auch 1 Jahr nach Behandlung keine Tumorbildung nachweisen.

Wie bereits erwähnt, ist die systemische Verabreichung von IL-2, wie sie bei einer Therapie mit autologen oder allogenen LAK-Zellen notwendig wäre, der limitierende Faktor für eine entsprechende Therapie. Ein großer Vorteil der NK-92 Zellen besteht unter anderem darin, daß noch 48 Stunden, nachdem man ihnen das IL-2 entzogen hat, ihre zytotoxische Aktivität in vollem Umfang erhalten bleibt (7). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine NK-92 Therapie ohne die zusätzliche systemische Gabe von IL-2 und den damit einhergehenden Nebenwirkungen möglich ist.

Mit Hilfe der PCR konnte gezeigt werden, daß NK-92 Zellen negativ für die Erbsubstanz der Viren HTLV 1, HIV, HCV, HSV1, HSV2 und CMV1 sind. Sie sind allerdings positiv für das Epstein-Barr-Virus (EBV).

1.6 Expansion der NK-92 Zellen

Die Expansion der NK-92 Zellen findet in Spinnerflaschen statt, in denen die Zellen unter ständiger Agitation in 14 Tagen auf $1 \cdot 10^9$ Zellen pro Ansatz hochgezüchtet werden können.

Die Kultivierung findet in serumfreien und FDA-zugelassenem Medium (X-Vivo 10, BioWhittaker) statt. Vor Anwendung am Patienten wird die entsprechende Charge NK-92 Zellen hinsichtlich bakterieller Kontaminationen und zytotoxischer Aktivität gegenüber der K562 Zell-Linie geprüft.

2 Rationale

Zieht man die zur Verfügung stehenden Daten in Betracht, kann davon ausgegangen werden, daß einige Patienten mit malignen Erkrankungen von einer Behandlung mit in vitro expandierten NK-92 Zellen profitieren werden.

Es ist anzunehmen, daß die Immuntherapie mit NK-92 Zellen eine Behandlungsform darstellt, die andere Behandlungsformen wie z.B. chirurgische Intervention, Radiotherapie oder Chemotherapie nicht beeinträchtigt.

Wir gehen davon aus, daß all jene Erkrankungen sensitiv gegenüber einer Behandlung mit NK-92 Zellen sind, bei denen die NK-92 Zellen einen zytotoxischen Effekt gegen von diesen Erkrankungen abgeleitete Zell-Linien gezeigt haben. Darüber hinaus kommen auch all jene Erkrankungen in Frage, bei denen in der Vergangenheit positive Effekte durch LAK-Zellen erzielt werden konnten. Hierzu zählen: Malignes Melanom der Haut, Nierenzell-Karzinom (Hypernephrom), Leukämien, Multiples Myelom und Non-Hodgkin Lymphome, sowie Neuroblastome.

3 Kriterien zur Auswahl der zu behandelnden Patienten

3.1 Eingangskriterien

3.1.1 Alter: keine Beschränkung

3.1.2 Modifizierter Karnofsky Index > 50

3.1.3 Patient hat sich von den toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapie erholt

3.1.4 Serum Kreatinin $< 2.0 \text{ mg/dL}$

3.1.5 Keine Einschränkung der Leberfunktion, d.h. Serum-Bilirubin $< 2 \text{ mg/dL}$

3.1.6 Bei Frauen im gebärfähigen Alter muß eine Schwangerschaft ausgeschlossen sein

3.1.7 Der Patient muß im Vollbesitz seiner geistigen Kräfte sein und seine Einwilligung zu der Behandlung geben

3.1.8 Hat der Patient das 18. Lebensjahr noch nicht erreicht, so ist die Zustimmung der Erziehungsberechtigten notwendig

3.1.9 Die folgenden Erkrankungen sind für eine Therapie mit NK-92 Zellen vorgesehen:

Akute lymphatische Leukämie

Chronische myeloische Leukämie

Non-Hodgkin Lymphom

Hodgkin Lymphom

kindliche Sarkome

Neuroblastom

Hirntumore

bei denen es zu einem Rückfall nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation gekommen ist oder herkömmliche Behandlungsformen versagt haben, so daß nur durch experimentelle Ansätze eine Aussicht auf Heilung besteht.

3.2 Ausschlußkriterien

3.2.1 Aktive, symptomatische Beeinträchtigung des Zentralen Nervensystems (ZNS), wenn eine andere Grunderkrankung als ein Hirntumor vorliegt.

3.2.2 Unkontrollierte, lebensbedrohliche Infektionen

3.2.3 Modifizierter Karnofsky Index < 50

3.2.4 Stillende Mütter

4 Studien Aufbau

Bei dieser Studie handelt es sich um eine offene, nicht kodierte, einarmige Phase I/II Studie, bei der die Durchführbarkeit und Effizienz einer Infusion von bestrahlten NK-92 Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen untersucht werden soll. Wenn die erste Infusion gut vertragen wird, ist geplant eine zusätzliche Dosis (gleiche Zellzahl) 2 Tage später zu geben. Gemäß dem Protokoll der Phase I, sollen 3 Patienten mit jeder Zelldosis (10^9 , $3 \cdot 10^9$, $5 \cdot 10^9$ pro m^2 Körperoberfläche) behandelt werden.

Die Dosis, bei der sich keine ernstzunehmenden Nebenwirkungen für den Patienten ergeben haben wird in der Phase II eingesetzt, die zunächst 17 Patienten beinhalten soll.

5 Ablauf der Behandlung

5.1 Expansion der NK-92 Zellen

Die in vitro Expansion der NK-92 Zellen findet durch ca. 14-tägige Kultivierung der Zellen in X-Vivo 10 Medium (BioWhittaker) statt. Anschließend werden die Nk-92 Zellen mit 1 000 cGy bestrahlt. Die Zellen werden dann innerhalb von 3 Stunden transfundiert.

5.2 Zusatzbehandlung der Patienten

Die an der Studie teilnehmenden Patienten werden ab 2 h vor NK-92 Gabe mit 0,45% NaCl/2,5% Glucose ($3000\text{ml}/24\text{h m}^2\text{Körperoberfläche}$) und 7,45% KCl ($60\text{ml}/24\text{h m}^2\text{Körperoberfläche}$) hydriert. Beginnend am Tag der NK-92 Behandlung und für die darauffolgenden 5 Tage werden täglich $200\text{mg}/\text{m}^2\text{Körperoberfläche}$ Allopurinol in drei Einzeldosen per os verabreicht. Eine zweite NK-92 Gabe wird nur verabreicht, wenn bei der ersten Infusion keine ernsthaften Nebenwirkungen (Grad II) aufgetreten sind.

Fünfzehn Minuten vor Transfusion der NK-92 Zellen wird die folgende Prämedikation verabreicht:

Prednison $2\text{mg}/\text{kg}$

Clemastin (Tavegil®) $2\text{mg}/\text{m}^2\text{Körperoberfläche}$ i. v.

Die Prämedikation ist notwendig, da die NK-Zellen noch einige Zytokine freisetzen könnten, welche beim Patienten zu ungewollten Nebenwirkungen führen könnten.

5.3 Parallel durchgeführte Medikation

Gestattet:

Alle Medikamente zur symptomatischen Behandlung der malignen Erkrankung.

Nicht gestattet:

Zytostatika innerhalb der letzten 3 Wochen und Bestrahlungen innerhalb der letzten 6 Wochen vor Beginn der NK-92 Therapie.

Die Verabreichung von Zytokinen, außer der Patient leidet unter einer lebensbedrohenden Infektion aufgrund einer Neutropenie. Hydroxyurea sollte 24 Stunden vor Beginn der NK-92 Therapie abgesetzt werden.

5.4 Behandlung akut auftretender Nebenwirkungen:

Fieber	Paracetamol, Metamizol
Schmerzen	Paracetamol, Metamizol, Morphin
Übelkeit	Ondansetron 0.15 mg/kg i.v.
Pruritus	Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v.
Rash, Urticaria	Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v.
Anaphylaxie	NK-92 Infusion abbrechen, Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v. Epinephrine (1:10 000) 5 ml i. v. Prednison 2 mg/kg O ₂ und NaCl 0,9 % p. i. nach Bedarf

5.5 Die Patienten werden bis auf weiteres stationär aufgenommen. Wenn keine Komplikationen auftreten, können sie am Morgen nach der zweiten Dosis der Immuntherapie entlassen werden.

6 Statistische Beurteilungen

6.1. Die **Phase I** Komponente dieser Studie untersucht, ob die Infusion von $5 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen/m² gut toleriert wird, wenn sie im Abstand von 2 Tagen insgesamt 2 Mal verabreicht wird. Hierbei wird zunächst bei 3 Patienten mit einer Dosis von $1 \cdot 10^9$ Zellen/m² begonnen. Wenn bei mindestens einem Patienten eine Toxizität auftritt, werden 6 weitere Patienten mit der gleichen Zelldosis behandelt, um festzustellen, ob die aufgetretene Nebenwirkung reproduzierbar ist. Zur Steigerung der Dosis wird das modifizierte Fibonacci Schema angewandt, bis eine Toxizität des Grades = I bei zwei Patienten oder = II bei einem Patienten auftritt. In der 2. und 3. Dosis-Steigerung werden $3 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen/m² und $5 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen/m² infundiert. Es wird angenommen, daß damit die geringste toxische Dosis erreicht wird, wobei die geringste toxische Dosis definiert wird als die minimale Dosis bei der eine Toxizität auftreten kann.

Die **Phase II** Komponente dieser Studie wird in zwei Schritten gemäß der Methode von Simon (14) angelegt. Diese Methode ist darauf angelegt, die Exposition von Patienten gegenüber einer ineffektiven Therapie so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig zu bestimmen, ob eine bestimmte Behandlung eine ausreichende Wirksamkeit hat, um eine Weiterentwicklung der Therapieform zu begründen. Nach der Behandlung von 17 Patienten (1. Schritt) werden die ermittelten Daten beurteilt und über eine Fortsetzung der Studie entschieden (2. Schritt) (siehe 6.2).

6.2 Die 0-Hypothese (H_0) testet, ob die Behandlung zu keinem nennenswerten Effekt führt. Die Alternativhypothese besagt, daß die Wahrscheinlichkeit für Erfolg mindestens dem gewünschten Zieleffekt entspricht. Die unten aufgeführte Tabelle gibt die Ablehnungskriterien der Hypothesen wieder, bei denen die mögliche Ansprechbarkeit auf ein nicht wirksames Medikament (d.h. kein nennenswerter Effekt) 0.20 ist und die Ansprechbarkeit auf ein gut wirksames Medikament (d.h. gewollter Zieleffekt) 0.40 ist, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($\alpha = 0.1$; $\beta = 0.1$).

Kalkulation für den 1. Schritt der Phase II-Studie nach Simon (14)Wahrscheinlichkeit ein nicht wirksames Medikament für effektiv zu halten $\alpha = 0.1$ Wahrscheinlichkeit ein wirksames Medikament fälschlich abzulehnen $\beta = 0.1$

Möglicher Effekt eines nicht wirksamen Medikamentes	Möglicher Effekt eines gut wirksamen Medikamentes	Studiengröße des 1. Schritts der Phase II	Kein Erfolg der Studie wenn der mögliche Effekt \leq
0,20	0,40	17 Patienten	3 Patienten

Das bedeutet, daß der NK-92 Therapie kein Effekt zugeschrieben wird, wenn nur bei 3 oder weniger Patienten ein therapeutischer Effekt zu beobachten ist. Ist bei mehr als 3 von 17 Patienten ein Ansprechen auf die Therapie zu beobachten, wird dieser Effekt der NK-92 Therapie zugeschrieben.

7 Auswertung**7.1 Untersuchungen, die aus Sicherheitsaspekten durchgeführt werden**

Komplette Anamnese, körperliche Untersuchung, Röntgenuntersuchung des Thorax und EKG vor Behandlung. Körperliche Untersuchung täglich an Tag 1-5. Am Tag 1 und Tag 3 der Therapie werden die Elektrolyte, AST, Bilirubin, Kreatinin, Harnsäure und Harnstoff kontrolliert.

Differentialblutbild vor Behandlung und Tag 1-5.

Feststellung der Infektionsparameter (HBV, HCV, HIV, CMV, EBV).

Zur Feststellung einer möglichen *in vivo* Proliferation der NK-92 Zellen ist eine Untersuchung des peripheren Blutes auf das Vorliegen eines Chimerismus vorgesehen. Diese Untersuchung erfolgt semiquantitativ mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in engen Zeitabständen nach Therapie. Bei Erfolg der Therapie ist darüber hinaus eine halbjährliche Kontrolle der Patienten vorgesehen.

7.2 Untersuchungen zur Feststellung der Effizienz der NK-92 Behandlung**7.2.1 Definition des Ansprechens auf die Behandlung**

- **Leukämie:**

Komplette Remission (KR):

Der Patient hat eine komplette Remission erreicht, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Im peripheren Blut sind keine leukämischen Blasten nachweisbar.
- Der Prozentsatz an leukämischen Blasten im Knochenmark beträgt weniger als 5 %.

- Innerhalb von zwei Wochen nach einer Knochenmark-Punktion, bei der weniger als 5 % Blasten festgestellt wurden, erholt sich das periphere Blutbild und erreicht Werte von Hb > 9 g/dL, Thrombozyten > $100 \cdot 10^9$ 1/L, weiße Blutzellen > $1,5 \cdot 10^9$ 1/L.
- Der Patient ist nicht transfusionspflichtig, d.h. unabhängig von Erythrozyten- und Thrombozyten-Konzentraten.

Partielle Remission (PR):

Der Patient hat eine partielle Remission erreicht, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Der Prozentsatz an leukämischen Blasten hat sich um die Hälfte verringert.
- Bei Vorhandensein von karyotypischen Abnormalitäten hat sich die Anzahl positiver Metaphasen um die Hälfte verringert.

Dauer einer KR oder PR:

Die Dauer einer kompletten bzw. partiellen Remission ist definiert als die Zeit zwischen der ersten Dokumentation der Remission, basierend auf dem Datum der Knochenmarkentnahme bis zu der Dokumentation des Rückfalls. Um die Effizienz der NK-92 Zelltherapie zu untersuchen, werden die Patienten, die eine Remission erreichen nur dann zusätzlich mit Chemotherapeutika behandelt, wenn sie einen Rückfall erleiden.

• **Lymphome und solide Tumoren**

Die Tumorgöße wird sowohl vor als auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung bestimmt. Durch bildgebende Verfahren wird möglichst objektiv das Tumolvolumen bestimmt (Länge x Breite x Tiefe x 0,5). Bei mehreren Lokalisationen wird die Summe aller Einzelvolumina bestimmt. Je nach Lokalisation des Tumors finden Ultraschall, Computer-Tomographie, NMR oder Röntgen-Untersuchungen Anwendung. Kann die Größe nicht direkt ermittelt werden, wie z.B. bei Knochen-Szintigrammen, sollte der prozentuale Unterschied von mindestens zwei Beobachtern geschätzt werden.

Komplette Remission (CR):

Abwesenheit jeglicher Manifestationen, Anzeichen und Symptome des zugrundeliegenden Tumors, einschließlich biochemischer und röntgenologischer Nachweise, an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten für mindestens 30 Tage.

Partielle Remission:

Reduktion des gesamten Tumolvolumens um mindestens 1/3 für mindestens 30 Tage, d. h. das Tumolvolumen wird an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Es dürfen keine neuen Läsionen entstanden sein oder sich bereits bestehende Läsionen vergrößert haben.

Stabile Krankheit/Keine Veränderung:

Keine objektive Veränderung bei meßbaren Tumoren ($< 1/3$ Zunahme oder Abnahme des Tumolvolumens), sowie kein Auftreten von neuen Läsionen oder der Progression von Läsionen während der ersten 90 Tage nach Studienbeginn.

Fortschreitende Krankheit (PD):

Auftreten von neuen Läsionen oder Zunahme von meßbaren Läsionen um wenigstens $1/3$ des Tumolvolumens.

Gesamt-Überleben und Progressionsfreies Überleben (PFS):

Kalkulation ab dem Tag der Behandlung.

8 Referenzen

1. Yokoyama WM, 1995, Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules, Proc Natl Acad Sci 92: 3081
2. Rosenberg SA et al., 1987, Prospective randomized trial of high dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer, N Engl J Med 316: 889
3. Kimoto, Y et al., 1995, Use of human leukocyte antigen-mismatched allogeneic lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 in the adoptive immunotherapy of patients with malignancies, Biotherapy 8: 41
4. Higuchi, C. M. et al., 1991, Toxicity and immunomodulatory effects of interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies, Blood 12: 2561
5. Lister J et al., 1995, Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period, Clin Canc Res 1: 607
6. Gong J, Maki G, Klingemann H-G, 1994, Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells, Leukemia 8: 652
7. Klingemann H-G, Wong E, Maki G., 1996, A cytotoxic NK-cell line (NK92) for ex vivo purging of leukemia from blood, Biol Blood Bone Marrow Transplant 2: 68
8. Yan Y et al, 1996, Leukemia cells derived from relapsed and/or refractory patients that express multidrug resistant (MDR) protein P-gp 170 are sensitive to lysis by natural killer cell line NK-92, Blood 88 (Suppl 1): 354a
9. Yan Y, Steinherz P, Klingemann H-G, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, O'Reilly RJ, 1998, Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias,

Clin Cancer Res 4: 2859

10. Burshtyn DN et al., 1996, Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer inhibitory receptor, *Immunity* 4: 77
11. Cesano A, 1996, Use of a lethally irradiated major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic cell line for effective purging of marrows containing lysis sensitive or -resistant targets, *Blood* 87: 393
12. Cesano A et al., 1996, Phase I clinical trial with a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line (TALL-104) in dogs with advanced tumors, *Cancer Res* 56: 3021
13. Klingemann H-G, Tron V, Ho V, 1996, Preclinical studies with a highly cytotoxic cell line (NK-92) to prevent metastasis of malignant melanoma, *J Dermatol Sci* 12: 88
14. Simon R, 1989, Optimal Two-Stage Designs for Phase II Clinical Trials. *Controlled Clinical Trials* 10:1-10

ANHANG I

Originaltext des Studienprotokolls der klinischen Studie mit der Zelllinie NK-92 bei erwachsenen Patienten

Klinik III, Abteilung für Hämatologie und Onkologie* ,
Johann Wolfgang von Goethe Universität-Frankfurt
Theodor Stern Kai 7, 60528 Frankfurt am Main

und

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie,
Blutspendedienst Hessen des DRK[§]
Sandhofstr. 1, 60528 Frankfurt am Main

und

Bone Marrow Transplant Center, Rush Cancer Institute⁺, Chicago, USA

Protokoll: NK 99-2

**Klinische Studie (Phase I/II) zur Untersuchung der Verträglichkeit und
Effizienz einer Behandlung von erwachsenen Patienten mit fortgeschrittenen
Krebserkrankungen und Leukämien mit der immortalisierten Natürlichen
Killer Zell-Linie NK-92**

Studienleiter: Dr. med. O. Ottmann*
Studienteilnehmer: Dr. med. G. Bug*
Prof. Dr. med. Hoelzer*
Dr. med. M. Keyser[§]
Prof. Dr. med. H.G. Klingemann⁺
Prof. Dr. med. E. Seifried[§]
Dr. med. T. Tonn[§]

Protokoll-Synopsis

- Titel:** Klinische Studie (Phase I/II) zur Untersuchung der Verträglichkeit und Effizienz einer Behandlung von erwachsenen Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen und Leukämien mit der immortalisierten Natürlichen Killer Zell-Linie NK-92.
- Ziel:** Die Studie der Phase I/II soll die Verträglichkeit einer intravenösen Infusion von bestrahlten, höchst zytotoxischen NK-92 Zellen bei Krebspatienten untersuchen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die verabreichte Dosis bestrahlter NK-92 Zellen zu einer Regression des Tumors führt.
- Indikationen:** Hämatologische, maligne Erkrankungen ohne kurative Behandlungsmöglichkeit. Im einzelnen:
 Patienten mit Akuter lymphatischer oder myeloischer Leukämie (ALL/AML)
 Chronisch myeloischer Leukämie
 Non-Hodgkin Lymphom
 Multiplem Myelom
 Hodgkin Lymphom
 Mamma-Ca (sofern die Patienten im Rahmen einer Stammzelltherapie von der Med. Klinik III betreut werden)
 und bei denen es zu einem Rückfall nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation gekommen ist oder herkömmliche Behandlungsformen versagt haben, so daß nur durch experimentelle Ansätze eine Aussicht auf Heilung besteht.
- Alter:** > 18 Jahre
- Behandlung:** Es handelt sich um eine offene, einarmige klinische Studie der Phase I/II, die zum Ziel hat die Nebenwirkungen und die Effizienz einer Infusion von bestrahlten NK-92 Zellen bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung zu ermitteln. Die 1. Phase der Studie dient der Findung einer Patienten-verträglichen Zelldosis. Sollte die erste Infusion mit NK-92 Zellen vom Patienten gut toleriert werden, ist geplant, eine zweite Infusion mit der gleichen Zelldosis zwei Tage nach der ersten Infusion zu verabreichen. Gemäß dem Studienprotokoll der Phase I sollen je drei Patienten mit 10^9 , $3 \cdot 10^9$ oder $1 \cdot 10^{10}$ NK-92 Zellen pro m^2 Körperoberfläche behandelt werden.
 Die Dosis NK-92 Zellen, die nach dieser Phase I Studie als verträglich eingestuft werden kann, wird in der Phase II Studie Anwendung finden, für die initial 17 Patienten vorgesehen sind. Wie bereits erwähnt, werden die NK-92 Zellen vor Infusion bestrahlt, um eine Proliferation der Zellen *in vivo* zu vermeiden.

1 Einleitung

1.1 Charakteristika von Natürlichen Killer Zellen und ihre klinische Anwendung

Natürliche Killer (NK) Zellen treten im peripheren Blutkreislauf auf und machen etwa 1 % aller zirkulierender Lymphozyten aus. NK-Zellen können entartete oder viral infizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung, wie es etwa für die zytotoxische Aktivität von T-Zellen Bedingung ist, erkennen und abtöten. Einige Zielzellen sind durch Expression von humanen Leukozyten Antigenen (HLA) der Klasse I in der Lage, die zytolytische Aktivität von NK-Zellen zu vermindern und so einer Zytolyse durch NK-Zellen zu entkommen. Eine verminderte Expression von HLA Klasse I Molekülen auf Zielzellen, deren Inhibition oder Blockierung, können im Gegensatz dazu die NK-Aktivität steigern(1).

Natürliche Killer Zellen können durch Zytokine stimuliert werden, und so zu sogenannten Lymphokin aktivierten Killer-Zellen (LAK) werden, welche im Vergleich zu nicht aktivierten NK-Zellen ein breites Spektrum maligner Zielzellen abtöten können. Interleukin-2 (IL-2) ist das am besten charakterisierte Zytokin in Bezug auf eine Generierung und Aktivierung von LAK-Zellen. Aber auch andere Zytokine wie zum Beispiel Interleukin-12 und Interleukin-15 können diese Funktion erfüllen. Eine Therapie mit *ex vivo* aktivierten und expandierten NK-Zellen fand bereits bei Patienten mit verschiedensten fortgeschrittenen Tumoren Anwendung und hat bei Patienten mit malignem Melanom, Nierenzellkarzinom sowie Leukämien gewisse Erfolge erzielt (2,3). Obwohl diese Behandlung einigen Patienten Vorteile verschaffte, ist sie doch sehr kosten- und arbeitsintensiv und ist insbesondere durch die Nebenwirkungen der hohen, systemischen Interleukin-2 Dosen nur unter Intensivtherapie-Bedingungen durchführbar.

Higuchi und Kollegen aus Seattle sammelten periphere Blutlymphozyten (PBL's) durch Leukapherese bei Patienten mit AML nach Hochdosis-Chemotherapie und autologer Knochenmarktransplantation, um diese wiederholt zur Behandlung der Patienten einzusetzen (4). Die Zellen wurden *ex vivo* expandiert und durch Kultivierung in IL-2-haltigem Medium aktiviert, bevor sie den Patienten verabreicht wurden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen einer Phase I/II Studie durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind mit einem 60 %-igen rückfallfreien Überleben bemerkenswert und weisen darauf hin, daß eine Behandlung mit LAK-Zellen durchaus zu einem anti-leukämischen Effekt führen kann. Nachteile liegen bei der hier praktizierten Behandlungsweise in einem hohen Thrombozytenverlust während der Leukapheresen und in den Nebenwirkungen der zusätzlich applizierten IL-2 Dosen. Die hohen, systemischen IL-2 Dosen verursachten bei den Patienten ernstzunehmende Nebenwirkungen.

Um zu untersuchen, ob es zu Nebenwirkungen kommt, wenn man LAK-Zellen Patienten nach Hoch-Dosis Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation transfundiert, hat eine Gruppe aus Pittsburg 6 Patienten mit autologen, vorher kryokonservierten LAK-Zellen behandelt und keine Beeinträchtigung des Engraftment oder andere signifikante Nebenwirkungen festgestellt (5).

1.2 Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit therapierefraktärer maligner Erkrankung und/oder Rückfall nach Stammzelltransplantation

Die Behandlung von Krebspatienten, welche auf konventionelle Chemo- und Radiotherapie nicht ansprechen und unter einem progressiven Krankheitsverlauf leiden, ist zur Zeit auf experimentelle Ansätze beschränkt. Patienten, die nach einer Hoch-Dosis Chemotherapie und unterstützender Radiotherapie mit allogenen oder autologem Stammzellsupport einen Rückfall erleiden, haben generell eine schlechte Prognose.

Die Immuntherapie durch Verabreichung von Interleukinen, Tumorantigen-präsentierenden dendritischen Zellen oder zytotoxischen T- und NK-Zellen findet zunehmend Berücksichtigung. Die Anwendung dieser Therapieformen hat den Vorteil, daß sie andere Behandlungsmethoden, wie die Hochdosis-Chemotherapie, nicht ausschließen.

Zur Gewinnung von LAK-Zellen muß der Patient nach bisherigen Protokollen einige Tage systemisch mit IL-2 behandelt werden und sich anschließend einer Leukapherese unterziehen. Die NK-Zellen können so in der Fraktion der mononukleären Zellen gewonnen werden. Durch darauffolgende *ex vivo* Inkubation der Zellen mit IL-2 werden die NK-Zellen zu LAK-Zellen. Werden die LAK-Zellen schließlich retransfundiert, müssen dem Patient erneut hohe Dosen IL-2 systemisch verabreicht werden, um den Aktivierungszustand der Zellen aufrecht zu erhalten. Die hohen IL-2 Dosen sind jedoch mit ernstzunehmenden Nebenwirkungen für den Patienten verbunden. Diese Form der Immuntherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen hat daher keine Akzeptanz unter den behandelnden Kollegen gefunden.

1.3 Charakteristika der NK-92 Zell-Linie

1992 wurde in dem Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann eine Zell-Linie aus den peripheren Blutlymphozyten eines Patienten mit granulärem Lymphom, einer aggressiven Form der Non-Hodgkin Lymphome, isoliert (6). Diese Zell-Linie, genannt NK-92, zeigte die gleichen Charakteristika wie LAK-Zellen, mit der Ausnahme, daß sie das CD16 Antigen (FC-Rezeptor) nicht exprimiert. Der Fc-Rezeptor bindet den Fc-Teil von Immunglobulinen und ist somit in die Antikörper vermittelte Zytotoxizität (ADCC) von NK-Zellen involviert. Die zytotoxische Aktivität von NK-92 Zellen wird in erster Linie durch die Freisetzung von Perforin durch Granulozyten vermittelt, welches die Membran der Zielzelle für die von LAK- und NK-92 Zellen abgegebenen Esterasen durchgängig macht. Die Esterasen führen schließlich zu einer Zerstörung der betroffenen Zellen.

Im Vergleich zu LAK-Zellen sind NK-92 Zellen um ein Vielfaches zytolytischer, bzw. zytotoxischer, bezogen auf die für eine Zytolyse notwendige Zellzahl. Darüber hinaus vermögen NK-92 Zellen ein weitaus breiteres Spektrum von Tumor Zell-Linien und primärer Tumoren abzutöten (7-9). Die Kulturbedingungen, die IL-2 Abhängigkeit, die Oberflächenmoleküle und das zytotoxische Profil der NK-92 Zellen wurden bereits ausführlich beschrieben (6).

Da NK-92 Zellen den p58 Oberflächenmarker nicht exprimieren - ein Oberflächenantigen, welches eine entscheidende Rolle in der Interaktion von LAK- und Zielzellen spielt - zeigen NK-92 Zellen eine weit gefächerte zytotoxische Aktivität gegenüber Krebs- und virusinfizierten Zellen. Die Expression des p58 Rezeptors unterdrückt die NK-Zellaktivität, so daß kein Abtöten der Zielzelle erfolgt. Im Gegensatz zu aus peripherem Blut isolierten NK- und LAK-Zellen exprimieren NK-92 Zellen diesen Rezeptor nicht (10).

1.4 Untersuchungen zu NK-92 Zellen in der Zellkultur und in Tierexperimenten

Eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen zeigen die Überlegenheit der NK-92 Zellen im Vergleich zu LAK-Zellen. NK-92 Zellen zeigten eine effektive zytotoxische Aktivität gegen Zell-Linien, die sich von den folgenden malignen Erkrankungen ableiteten:

Akute Myeloische Leukämie: HL-60, KG1a, U937, DHL-10

Akute Lymphoblastische Leukämie: NALM6, TALL-104, CEM/S, CEM/T

Chronisch Myeloische Leukämie: K562

Malignes Lymphom: Daudi, Jurkat, Raji, Ly3, Ly8, Ly13.2

Neuroblastom: SKNAS

Malignes Myelom: NCI H929, RDMI 8226, U266

Melanom der Haut: MBWO, WMI 341, SK-mel-28, WM35

Prostata Karzinom: 81.HTB, 1435.CRL

Mamma Karzinom: MCF-7

Darüber hinaus wurden maligne Zell-Linien und Leukämiezellen von Patienten immundefizienten (SCID) Mäusen injiziert. Eine Injektion von bestrahlten NK-92 Zellen konnte die Überlebenszeit der so behandelten Mäuse deutlich steigern und führte in einigen Fällen sogar zu einer kompletten Heilung der Mäuse. Diese Untersuchungen wurden unabhängig voneinander am Sloan Kettering Cancer Center in New York (9) und dem Terry Fox Labor in Vancouver im Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann durchgeführt.

Die NK-92 Zellen zeichnen sich einerseits durch ihre hohe Zytotoxizität und andererseits durch ihr breites Wirkspektrum aus. NK-92 Zellen wurden mit einer zytotoxischen Zell-Linie verglichen, welche im Wistar Institut in den USA gewonnen wurde. Diese TALL-104 Zell-Linie ist von T-Zellen abgeleitet und vermag, ebenso wie NK-92 Zellen, maligne Zell-Linien in vitro und Leukämiezellen selektiv im peripheren Blut abzutöten (11). Die Gruppe im Wistar Institut hat gegenwärtig Studien abgeschlossen, in denen die Wirksamkeit der TALL-104 Linie an Hunden getestet wurde, die an malignen Erkrankungen litten. Sie konnten zeigen, daß durch die intravenöse Verabreichung der TALL-104 Zellen eine Remission der Tumore hervorgerufen wurde.

Yan und Mitarbeiter verglichen am Sloan Kettering Krebsforschungszentrum in New York die zytotoxische Aktivität der Tall-104 und NK-92 Zellen und konnten zeigen, daß NK-92 Zellen wesentlich zytotoxischer gegenüber malignen Zellen waren und ein breiteres Spektrum an Zielzellen erkannten (8). Es ist anzumerken, daß die TALL-104 Zellen gegenwärtig in einer Phase I Studie an Krebspatienten getestet werden.

Aus den folgenden Gründen erwartet man von einer Behandlung mit NK-92 Zellen eine effektivere Abtötung maligner Zellen als durch LAK-Zellen, die aus peripherem Blut gewonnen wurden:

1. LAK-Zellen werden aus peripheren mononukleären Blutzellen gewonnen, in denen sie etwa 10 % der Lymphozytenfraktion repräsentieren. Um bei einer Expansion bzw. Voraktivierung der NK-Zellen nicht auch die mit ca. 60 % vorhandenen und für eine Graft versus Host-Reaktion verantwortlichen T-Zellen zu expandieren, ist eine aufwendige Anreicherung der NK-Zellen über Magnetsäulen notwendig.
2. Dem Tumorwachstum im Patienten liegen wahrscheinlich Mechanismen zugrunde, die es den malignen Zellen erlaubt haben, dem Immunsystem des Patienten zu entkommen. Verwendet man die NK-Zellen eben dieses Patienten, ist anzunehmen, daß solche Mechanismen immer noch wirksam sind. Einer dieser Mechanismen könnte zu einer Toleranzinduktion gegenüber den Tumorzellen geführt haben, so daß die T- und NK-Zellen des Patienten die Tumorzellen nicht als fremd erkennen. NK-92 Zellen dagegen stellen allogene NK-Zellen dar, die nicht tolerant gegenüber den Tumorzellen sein sollten.
3. Vergleichende Studien zwischen LAK-Zellen, die von gesunden Spendern gewonnen wurden, und NK-92 Zellen bestätigen die überlegene zytotoxische Aktivität der NK-92 Zellen. NK-92 Zellen töten ein breiteres Spektrum maligner Zellen. Dies trifft noch für Effektor/Zielzellen Verhältnisse zu, bei denen keine LAK-Aktivität mehr nachweisbar ist (7).

1.5 Präklinische Experimente zur Untersuchung der Sicherheit einer NK-92 Therapie

Um die immortalisierte NK Zell-Linie für eine Therapie bei Patienten einsetzen zu können, mußte zunächst eine Bestrahlungsdosis bestimmt werden, bei der die Zellen selbst nicht mehr proliferieren, in ihrer zytotoxischen Aktivität jedoch nicht eingeschränkt sind.

Untersuchungen im Labor des Mitantragstellers H.G. Klingemann (7) und am Memorial Sloan Kettering Krebsforschungs Institut (9) haben ergeben, daß eine Bestrahlung mit geringen Dosen von 500-1000 cGy das weitere Wachstum der NK-92 Zellen zuverlässig verhindert. Diese Daten konnten zum einen durch ³H-Thymidin Proliferationsassays, aber auch durch klonogene Assays in Methylzellulose bestätigt werden. Bei den hier beschriebenen Bestrahlungsdosen ist die Viabilität und die zytotoxische Aktivität der NK-92 Zell-Linie nicht wesentlich beeinflusst(10). Untersuchungen an immuninkompetenten SCID Mäusen haben ebenfalls bestätigt, daß die NK-92 Zellen selbst nicht tumorigen sind. In Mäusen, welche mit verschiedenen Konzentrationen NK-Zellen intravenös, subcutan oder intraperitoneal behandelt wurden, ließ sich keine Tumorbildung nachweisen (9). Diese Untersuchungen waren eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Zell-Linie beim Patienten.

Darüber hinaus waren Untersuchungen wichtig, die zeigten, daß NK-92 Zellen maligne Zellen spezifisch erkennen und abtöten, aber allogene und gesunde Zellen des Patienten nicht beeinträchtigen. Hierzu wurden NK-92 Zellen mit hämopoetischen Vorläuferzellen inkubiert und die Proliferation der Stammzellen anschließend in einem clonogenen Assay ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, daß NK-92 Zellen die Funktion der Stammzellen nicht beeinflussen(7). Darüber hinaus ergab eine Untersuchung mit humanen Hautzellen keine zytotoxische Aktivität der NK-92 Zellen (14).

Wie bereits erwähnt, ist die systemische Verabreichung von IL-2, wie sie bei einer Therapie mit autologen oder allogenen LAK-Zellen notwendig wäre, der limitierende Faktor für eine entsprechende Therapie. Ein großer Vorteil der NK-92 Zellen besteht unter anderem darin, daß noch 48 Stunden, nachdem man ihnen das IL-2 entzogen hat, ihre zytotoxische Aktivität in vollem Umfang erhalten bleibt (7). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine NK-92 Therapie ohne die zusätzliche systemische Gabe von IL-2 und den damit einhergehenden Nebenwirkungen möglich ist.

Mit Hilfe der PCR konnte gezeigt werden, daß NK-92 Zellen negativ für die Erbsubstanz der Viren HTLV 1, HIV, HCV, HSV1, HSV2 und CMV1 sind. Sie sind allerdings positiv für das Epstein-Barr-Virus (EBV)(6). Weiterführende Untersuchungen zu SV 40, Hepatitis A und B, sowie Mykoplasmen sind jeweils vor einer Behandlung geplant.

1.6 Expansion der NK-92 Zellen

Die Expansion der NK-92 Zellen findet in Spinnerflaschen statt, in denen die Zellen unter ständiger Agitation in 14 Tagen auf $1 \cdot 10^9$ Zellen pro Ansatz hochgezüchtet werden können.

Die Kultivierung findet in serumfreien und FDA-zugelassenem Medium (X-Vivo 10, BioWhittaker) statt. Vor Anwendung am Patienten wird die entsprechende Charge NK-92 Zellen hinsichtlich bakterieller, virologischer und fungaler Kontaminationen mittels etablierter Methoden im Blutspendedienst oder durch Hinzuziehen eines externen Labors überprüft. Zusätzlich wird die zytotoxische Aktivität der expandierten und bestrahlten NK-92 Zellen gegenüber der Zell-Linie K562 geprüft.

2 Rationale

Zieht man die zur Verfügung stehenden Daten in Betracht, kann davon ausgegangen werden, daß einige Patienten mit malignen Erkrankungen von einer Behandlung mit in vitro expandierten NK-92 Zellen profitieren werden.

Es ist anzunehmen, daß die Immuntherapie mit NK-92 Zellen eine Behandlungsform darstellt, die andere Behandlungsformen wie z.B. chirurgische Intervention, Radiotherapie oder Chemotherapie nicht beeinträchtigt.

Wir gehen davon aus, daß all jene Erkrankungen sensitiv gegenüber einer Behandlung mit NK-92 Zellen sind, bei denen die NK-92 Zellen einen zytotoxischen Effekt gegen von diesen Erkrankungen abgeleitete Zell-Linien gezeigt haben. Darüber hinaus kommen auch all jene Erkrankungen in Frage, bei denen in der Vergangenheit positive Effekte durch LAK-Zellen erzielt werden konnten. Hierzu zählen: Malignes Melanom der Haut, Nierenzell-Karzinom (Hypernephrom), Leukämien, Multiples Myelom und Non-Hodgkin Lymphome, sowie Neuroblastome.

3 Kriterien zur Auswahl der zu behandelnden Patienten

3.1 Eingangskriterien

3.1.1 Alter: > 18 Jahre

3.1.2 Modifizierter Karnofsky Index > 50

3.1.3 Patient hat sich von den toxischen Nebenwirkungen der Chemotherapie erholt

3.1.4 Serum Kreatinin < 2.0 mg/dL

3.1.5 Keine Einschränkung der Leberfunktion, d.h. Serum-Bilirubin < 2 mg/dL

3.1.6 Bei Frauen im gebärfähigen Alter muß eine Schwangerschaft ausgeschlossen sein

3.1.7 Der Patient muß im Vollbesitz seiner geistigen Kräfte sein und seine Einwilligung zu der Behandlung geben

3.1.8 Folgende Erkrankungen sind für eine Behandlung mit NK-92 vorgesehen:

Hämatologische maligne Erkrankungen ohne kurative Behandlungsmöglichkeit. Im einzelnen:

Patienten mit Akuter lymphatischer oder myeloischer Leukämie (ALL/AML)

Chronisch myeloischer Leukämie

Non-Hodgkin Lymphom

Multiplem Myelom

Hodgkin Lymphom

Mamma-Ca

und bei denen es zu einem Rückfall nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation gekommen ist oder herkömmliche Behandlungsformen versagt haben, so daß nur durch experimentelle Ansätze eine Aussicht auf Heilung besteht.

3.2 Ausschlusskriterien

3.2.1 Aktive, symptomatische Beeinträchtigung des Zentralen Nervensystems (ZNS).

3.2.2 Unkontrollierte, lebensbedrohliche Infektionen

3.2.3 Modifizierter Karnofsky Index < 50

3.2.4 Schwangerschaften oder stillende Mütter

4 Studien Aufbau

Bei dieser Studie handelt es sich um eine offene, nicht kodierte, einarmige Phase I/II Studie, bei der die Durchführbarkeit und Effizienz einer Infusion von bestrahlten NK-92 Zellen bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen untersucht werden soll. Wenn die erste Infusion gut vertragen wird, ist geplant eine zusätzliche Dosis (gleiche Zellzahl) 2 Tage später zu geben. Gemäß dem Protokoll der Phase I, sollen 3 Patienten mit jeder Zelldosis (10^9 , $3 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^{10}$ pro m^2 Körperoberfläche) behandelt werden.

Die höchste Dosis, bei der sich keine ernstzunehmenden Nebenwirkungen für den Patienten ergeben haben wird in der Phase II eingesetzt, die zunächst 17 Patienten beinhalten soll.

5 Ablauf der Behandlung

5.1 Expansion der NK-92 Zellen

Die in vitro Expansion der NK-92 Zellen findet durch ca. 14-tägige Kultivierung der Zellen in X-Vivo 10 Medium (BioWhittaker) statt. Anschließend werden die NK-92 Zellen mit 1 000 cGy bestrahlt. Die Zellen werden dann innerhalb von 3 Stunden transfundiert.

5.2 Zusatzbehandlung der Patienten

Die an der Studie teilnehmenden Patienten werden ab 2 h vor NK-92 Gabe mit 0,45% NaCl/2,5% Glucose ($3000\text{ml}/24\text{h } m^2\text{Körperoberfläche}$) und 7,45 % KCl ($60\text{ml}/24\text{h } m^2\text{Körperoberfläche}$) hydriert. Beginnend am Tag der NK-92 Behandlung und für die darauffolgenden 5 Tage werden täglich $200\text{mg}/m^2\text{Körperoberfläche}$ Allopurinol in drei Einzeldosen per os verabreicht. Eine zweite NK-92 Gabe wird nur verabreicht, wenn bei der ersten Infusion keine ernsthaften Nebenwirkungen (Grad II) aufgetreten sind.

Fünfzehn Minuten vor Transfusion der NK-92 Zellen wird die folgende Prämedikation verabreicht:

Prednison $2\text{mg}/\text{kg}$

Clemastin (Tavegil®) $2\text{mg}/m^2\text{Körperoberfläche}$ i. v.

Die Prämedikation ist notwendig, da die NK-Zellen noch einige Zytokine freisetzen könnten, welche beim Patienten zu ungewollten Nebenwirkungen führen könnten.

5.3 Parallel durchgeführte Medikation

Gestattet:

Alle Medikamente zur symptomatischen Behandlung der malignen Erkrankung.

Nicht gestattet:

Zytostatika innerhalb der letzten 3 Wochen und Bestrahlungen innerhalb der letzten 6 Wochen vor Beginn der NK-92 Therapie.

Die Verabreichung von Zytokinen, außer der Patient leidet unter einer lebensbedrohenden Infektion aufgrund einer Neutropenie. Hydroxyurea sollte 24 Stunden vor Beginn der NK-92 Therapie abgesetzt werden.

5.4 Behandlung akut auftretender Nebenwirkungen:

Fieber	Paracetamol, Metamizol
Schmerzen	Paracetamol, Metamizol, Morphin
Übelkeit	Ondansetron 0.15 mg/kg i.v. o.a. Substanz
Pruritus	Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v.
Rash, Urticaria	Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v.
Anaphylaxie	NK-92 Infusion abbrechen, Clemastin (Tavegil®) 2 mg/m ² Körperoberfläche i. v. Epinephrine (1:10 000) 5 ml i. v. Prednison 2 mg/kg O ₂ und NaCl 0,9 % p. i. nach Bedarf

5.5 Die Patienten werden bis auf weiteres stationär aufgenommen. Wenn keine Komplikationen auftreten, können sie am Morgen nach der zweiten Dosis der Immuntherapie entlassen werden.

6 Statistische Beurteilungen

6.1. Die **Phase I** Komponente dieser Studie untersucht, ob die Infusion von $5 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen/m² gut toleriert wird, wenn sie im Abstand von 2 Tagen insgesamt 2 Mal verabreicht wird. Hierbei wird zunächst bei 3 Patienten mit einer Dosis von $1 \cdot 10^9$ Zellen/m² begonnen. Wenn bei mindestens einem Patienten eine Toxizität \geq II auftritt, werden 6 weitere Patienten mit der gleichen Zelldosis behandelt, um festzustellen, ob die aufgetretene Nebenwirkung reproduzierbar ist. Zur Steigerung der Dosis wird das modifizierte Fibonacci Schema angewandt, bis eine Toxizität des Grades \geq I bei zwei Patienten oder \geq II bei einem Patienten auftritt. In der 2. und 3. Dosis-Steigerung werden $3 \cdot 10^9$ NK-92 Zellen/m² und $1 \cdot 10^{10}$ NK-92 Zellen/m² infundiert. Es wird angenommen, daß damit die geringste toxische Dosis erreicht wird, wobei die geringste toxische Dosis definiert wird als die minimale Dosis bei der eine Toxizität auftreten kann.

Die **Phase II** Komponente dieser Studie wird in zwei Schritten gemäß der Methode von Simon (14) angelegt. Diese Methode ist darauf angelegt, die Exposition von Patienten gegenüber einer ineffektiven Therapie so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig zu bestimmen, ob eine bestimmte Behandlung eine ausreichende Wirksamkeit hat, um eine Weiterentwicklung der Therapieform zu begründen. Nach der Behandlung von 17 Patienten (1. Schritt) werden die ermittelten Daten beurteilt und über eine Fortsetzung der Studie entschieden (2. Schritt) (siehe 6.2).

6.2 Die 0-Hypothese (H_0) testet, ob die Behandlung zu keinem nennenswerten Effekt führt. Die Alternativhypothese besagt, daß die Wahrscheinlichkeit für Erfolg mindestens dem gewollten Zieleffekt entspricht. Die unten aufgeführte Tabelle gibt die Ablehnungskriterien der Hypothesen wieder, bei denen die mögliche Ansprechbarkeit auf ein nicht wirksames Medikament (d.h. kein nennenswerter Effekt) 0.20 ist und die Ansprechbarkeit auf ein gut wirksames Medikament (d.h. gewollter Zieleffekt) 0.40 ist, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($\alpha = 0.1$; $\beta = 0.1$).

Kalkulation für den 1. Schritt der Phase II-Studie nach Simon (14)Wahrscheinlichkeit ein nicht wirksames Medikament für effektiv zu halten $\alpha = 0.1$ Wahrscheinlichkeit ein wirksames Medikament fälschlich abzulehnen $\beta = 0.1$

Möglicher Effekt eines nicht wirksamen Medikamentes	Möglicher Effekt eines gut wirksamen Medikamentes	Studiengröße des 1. Schritts der Phase II	Kein Erfolg der Studie wenn der mögliche Effekt \leq
0,20	0,40	17 Patienten	3 Patienten

Das bedeutet, daß der NK-92 Therapie kein Effekt zugeschrieben wird, wenn nur bei 3 oder weniger Patienten ein therapeutischer Effekt zu beobachten ist. Ist bei mehr als 3 von 17 Patienten ein Ansprechen auf die Therapie zu beobachten, wird dieser Effekt der NK-92 Therapie zugeschrieben.

7 Auswertung

7.1 Untersuchungen, die aus Sicherheitsaspekten durchgeführt werden

Komplette Anamnese, körperliche Untersuchung, Röntgenuntersuchung des Thorax und EKG vor Behandlung. Körperliche Untersuchung täglich an Tag 1-5. Am Tag 1 und Tag 3 der Therapie werden die Elektrolyte, AST, Bilirubin, Kreatinin, Harnsäure und Harnstoff kontrolliert.

Differentialblutbild vor Behandlung und Tag 1-5.

Feststellung der Infektionsparameter (HBV, HCV, HIV, CMV, EBV).

Zur Feststellung einer möglichen *in vivo* Proliferation der NK-92 Zellen ist eine Untersuchung des peripheren Blutes auf das Vorliegen eines Chimerismus vorgesehen. Diese Untersuchung erfolgt semiquantitativ mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in engen Zeitabständen nach Therapie. Es ist darüber hinaus eine halbjährliche Kontrolle der Patienten vorgesehen. Um eventuelle immunologische Abwehrreaktionen des Empfängers feststellen zu können, wird vor jeder Behandlung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfusion ein Crossmatch durchgeführt, mit dem Antikörper gegen NK-92 Antigene festgestellt werden können. Durch eine Mixed Lymphocyte Culture (MLC) soll untersucht werden ob die NK-92 Transfusion ebenfalls zur Induktion einer T-Zell Antwort führt.

7.2 Untersuchungen zur Feststellung der Effizienz der NK-92 Behandlung

7.2.1 Definition des Ansprechens auf die Behandlung

- **Leukämie:**

Komplette Remission (KR):

Der Patient hat eine komplette Remission erreicht, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Im peripheren Blut sind keine leukämischen Blasten nachweisbar.

- Der Prozentsatz an leukämischen Blasten im Knochenmark beträgt weniger als 5%.
- Innerhalb von zwei Wochen nach einer Knochenmark-Punktion, bei der weniger als 5% Blasten festgestellt wurden, erholt sich das periphere Blutbild und erreicht Werte von Hb > 9 g/dL, Thrombozyten > $100 \cdot 10^9$ 1/L, weiße Blutzellen > $1,5 \cdot 10^9$ 1/L.
- Der Patient ist nicht transfusionspflichtig, d.h. unabhängig von Erythrozyten- und Thrombozyten-Konzentraten.

Partielle Remission (PR):

Der Patient hat eine partielle Remission erreicht, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Der Prozentsatz an leukämischen Blasten hat sich um die Hälfte verringert.
- Bei Vorhandensein von karyotypischen Abnormalitäten hat sich die Anzahl positiver Metaphasen um die Hälfte verringert.

Dauer einer KR oder PR:

Die Dauer einer kompletten bzw. partiellen Remission ist definiert als die Zeit zwischen der ersten Dokumentation der Remission, basierend auf dem Datum der Knochenmarkentnahme bis zu der Dokumentation des Rückfalls. Um die Effizienz der NK-92 Zelltherapie zu untersuchen, werden die Patienten, die eine Remission erreichen nur dann zusätzlich mit Chemotherapeutika behandelt, wenn sie einen Rückfall erleiden.

• Lymphome und solide Tumoren

Die Tumorgöße wird sowohl vor als auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung bestimmt. Durch bildgebende Verfahren wird möglichst objektiv das Tumolvolumen bestimmt (Länge x Breite x Tiefe x 0,5). Bei mehreren Lokalisationen wird die Summe aller Einzelvolumina bestimmt. Je nach Lokalisation des Tumors finden Ultraschall, Computer-Tomographie, NMR oder Röntgen-Untersuchungen Anwendung. Kann die Größe nicht direkt ermittelt werden, wie z.B. bei Knochen-Szintigrammen, sollte der prozentuale Unterschied von mindestens zwei Beobachtern geschätzt werden.

Komplette Remission (CR):

Abwesenheit jeglicher Manifestationen, Anzeichen und Symptome des zugrundeliegenden Tumors, einschließlich biochemischer und röntgenologischer Nachweise, an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten für mindestens 30 Tage.

Partielle Remission:

Reduktion des gesamten Tumolvolumens um mindestens 1/3 für mindestens 30 Tage, d. h. das Tumolvolumen wird an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Es dürfen keine neuen Läsionen entstanden sein oder sich bereits bestehende Läsionen vergrößert haben.

Stabile Krankheit/Keine Veränderung:

Keine objektive Veränderung bei meßbaren Tumoren ($< 1/3$ Zunahme oder Abnahme des Tumolvolumens), sowie kein Auftreten von neuen Läsionen oder der Progression von Läsionen während der ersten 90 Tage nach Studienbeginn.

Fortschreitende Krankheit (PD):

Auftreten von neuen Läsionen oder Zunahme von meßbaren Läsionen um wenigstens 1/3 des Tumolvolumens.

Gesamt-Überleben und Progressionsfreies Überleben (PFS):

Kalkulation ab dem Tag der Behandlung.

8 Referenzen

1. Yokoyama WM, 1995, Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules, Proc Natl Acad Sci 92: 3081
2. Rosenberg SA et al., 1987, Prospective randomized trial of high dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer, N Engl J Med 316: 889
3. Kimoto, Y et al., 1995, Use of human leukocyte antigen-mismatched allogeneic lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 in the adoptive immunotherapy of patients with malignancies, Biotherapy 8: 41
4. Higuchi, C. M. et al., 1991, Toxicity and immunomodulatory effects of interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies, Blood 12: 2561
5. Lister J et al., 1995, Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period, Clin Canc Res 1: 607
6. Gong J, Maki G, Klingemann H-G, 1994, Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells, Leukemia 8: 652
7. Klingemann H-G, Wong E, Maki G., 1996, A cytotoxic NK-cell line (NK92) for ex vivo purging of leukemia from blood, Biol Blood Bone Marrow Transplant 2: 68

8. Yan Y et al, 1996, Leukemia cells derived from relapsed and/or refractory patients that express multidrug resistant (MDR) protein P-gp 170 are sensitive to lysis by natural killer cell line NK-92, *Blood* 88 (Suppl 1): 354a
9. Yan Y, Steinherz P, Klingemann H-G, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, O'Reilly RJ, 1998, Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias, *Clin Cancer Res* 4: 2859
10. Burshtyn DN et al., 1996, Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer inhibitory receptor, *Immunity* 4: 77
11. Cesano A, 1996, Use of a lethally irradiated major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic cell line for effective purging of marrows containing lysis sensitive or -resistant targets, *Blood* 87: 393
12. Cesano A et al., 1996, Phase I clinical trial with a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line (TALL-104) in dogs with advanced tumors, *Cancer Res* 56: 3021
13. Klingemann H-G, Tron V, Ho V, 1996, Preclinical studies with a highly cytotoxic cell line (NK-92) to prevent metastasis of malignant melanoma, *J Dermatol Sci* 12: 88
14. Simon R, 1989, Optimal Two-Stage Designs for Phase II Clinical Trials. *Controlled Clinical Trials* 10:1-10

Standardarbeitsanweisung für den Betrieb des Suspensions-Bioreaktors

1 Ziel

Diese Standardarbeitsanweisung legt den Aufbau, den Betrieb sowie die Sterilisation und Reinigung des perfundierten Suspensionsbioreaktors für die Kultivierung der natürlichen Killerzelllinie NK-92 fest.

2 Geltungsbereich

Dieser Abschnitt muss an den jeweiligen Betrieb angepasst ausgefüllt werden.

3 Verantwortlichkeiten

Dieser Abschnitt muss an den jeweiligen Betrieb angepasst ausgefüllt werden.

4 Allgemeines

4.1 Baugruppen des Bioreaktors

- Reaktor (bestehend aus Reaktorgefäß mit Magnetrührstab, pH- und pO₂-Elektroden, Magnetrührantrieb und Reaktorgestell)
- Zulaufpumpe.
- Ablaufpumpe.
- Medienvorlageflasche mit Verbindungsschlauch.
- Medienablaufflasche mit Verbindungsschlauch.
- Probenahmeschlauch mit Flasche.
- Wärmebad mit Zuleitungen.
- Filtereinheit für Gaszulauf mit Verbindungsschläuchen.
- Kondensatorflasche mit Verbindungsschlauch.
- Gasversorgungseinheit (bestehend aus Steuereinheit für die Gasmischung, Massendurchflussventile für O₂, CO₂ und Druckluft, Gasflaschen für O₂ und CO₂, Druckluftkompressor).

4.2 Verwendete Bauteile

Bauteil	Hersteller
Reaktorgefäß	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Reaktordeckel	Forschungszentrum Jülich, Jülich

Bauteil	Hersteller
pH-Einstabmesskette	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verstärker	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pH-Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
pO ₂ -Verbindungskabel	Mettler-Toledo, Steinbach/Ts
Magnetrührantrieb	IKA-Werke, Staufen
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Wärmebad	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda
Schnellkupplungen für Wärmebadzuleitung	Walther, Wuppertal
Anschlussstutzen für Wärmebadzuleitung	Schott Glaswerke, Mainz
Massendurchflussventile (O ₂ , CO ₂ , Luft)	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Steuereinheit für Massendurchflussventile	Brooks Instrument, Veenendaal, NL
Druckluftkompressor	JUN-AIR Deutschland, Ahrensburg
Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Deckel für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Deckeldichtungen für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Einsätze für Deckel für Glasflaschen	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Sterilfilter	Gelman Sciences, Dreieich
Wasserbeständiger Sterilfilter	Satorius, Göttingen
Schlauchverbinder	Carl Roth, Karlsruhe
Pumpenschläuche	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Schweißbarer Schlauch	Baxter Deutschland, München
Silikonschlauch	BIW Isolierstoffe, Ennepetal
Teflonschlauch	Bohlender, Lauda
Kabelbinder	Carl Roth, Karlsruhe

4.3 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
X-Vivo 10	Bio Whittaker, Maryland, USA
Hitzeinaktiviertes humanes Plasma	Blutspendedienst Hessen, Frankfurt am Main
Mediensupplement	Blutspendedienst Hessen, Frankfurt am Main
Proleukin (IL-2)	Chiron GmbH, Ratingen
Destilliertes Wasser	Blutspendedienst Hessen, Frankfurt am Main

5 Detaillierte Arbeitsanweisung

Alle Arbeiten sind nach den geltenden Vorschriften in einer gentechnischen Anlage Sicherheitsstufe 1 durchzuführen. Bei allen Arbeiten unter der Sterilbank sind Kittel, Handschuhe und Armschützer zu tragen. Die Bedienung von Gasflaschen, Druckluftkompressor, Massendurchflussventilen, Steuereinheit für die Gasmischung, pH- und pO₂-Verstärker, Wärmebad, Zulaufpumpe, Ablaufpumpe und Magnetrührantrieb erfolgt nach den Anleitungen der Hersteller.

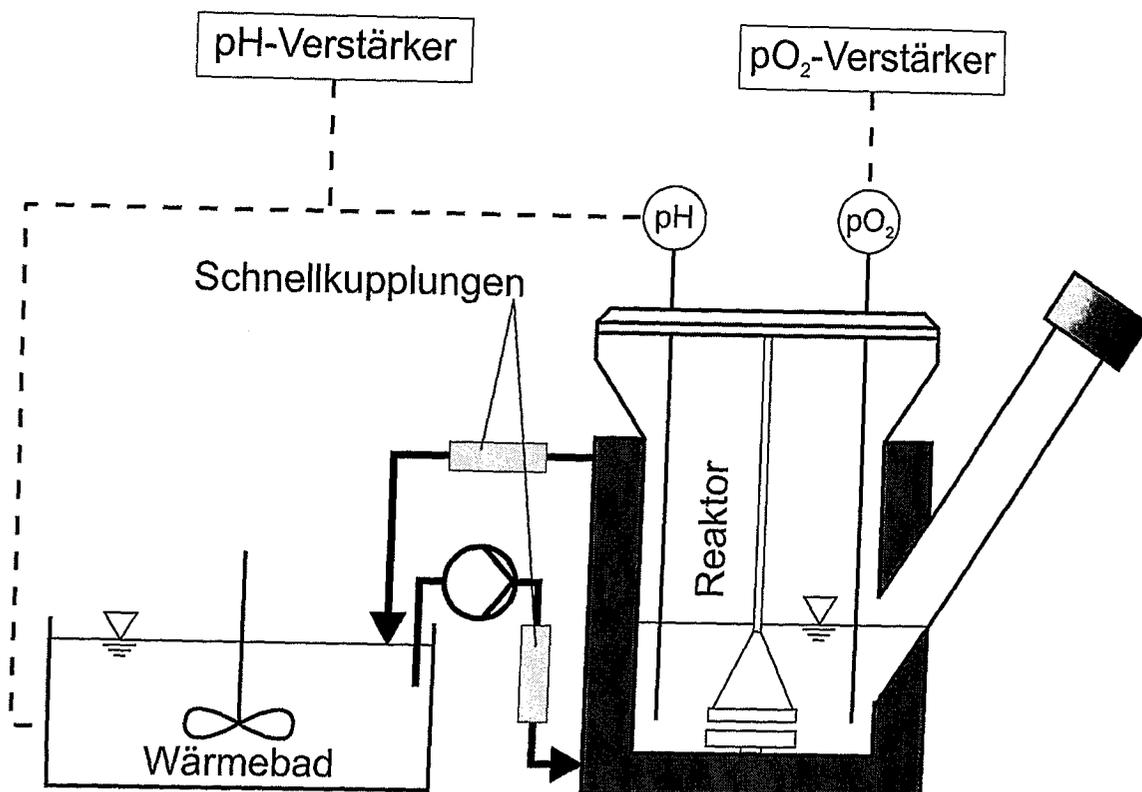


Abbildung J.1: Wärmekreislauf und Messtechnik

5.1 Montage und Aufbau des Bioreaktors

Vor Montage des Bioreaktors sind alle Bauteile auf Sauberkeit zu prüfen und eventuell mit einem Reinigungsmittel rückstandsfrei zu säubern. Die pH-Elektrode mit zugehörigem Verstärker ist vor Einbau gemäß der Herstellerangaben zu kalibrieren. Das Zellrückhaltesieb im Deckel des Bioreaktors ist auf Dichtigkeit zu überprüfen. Der Aufbau des Bioreaktors erfolgt gemäß der Abbildung J.1 bezüglich Wärmekreislauf und Messtechnik, gemäß Abbildung J.2 auf der nächsten Seite bezüglich der Begasung und gemäß Abbildung J.3 auf der nächsten Seite bezüglich des Medienz- und Ablaufs. Alle nicht näher bezeichneten Verbindungen sind mit Silikonschläuchen auszuführen. Alle Schlauchverbindungen sind zusätzlich mit einem Kabelbinder zu sichern.

5.2 Sterilisation des Bioreaktors

- Vor Sterilisation ist der Reaktor komplett zu montieren. Der Wärmekreislauf ist vom Reaktor vollständig zu entfernen.
- pH- und pO₂-Verstärker mit Verbindungskabeln sind vom Reaktor zu entfernen.
- Massendurchflussventile für O₂, CO₂ und Luft, inklusive Steuereinheit sowie die Gasflaschen und der Druckluftkompressor sind vom Reaktor zu entfernen.
- Alle anhängenden Flaschen und der Reaktor selbst sind mit destilliertem Wasser bis zu einer Füllhöhe von 1 cm zu befüllen.
- Es ist darauf zu achten, dass kein Schlauch des Reaktors in irgendeiner Weise blockiert ist.
- Ein Druckausgleich jedes Gefäßes muss durch Sterilfilter gewährleistet sein.
- Alle Sterilfilter sind mit Aluminiumfolie zu umhüllen und müssen mit ihrer Öffnung nach oben zeigen.

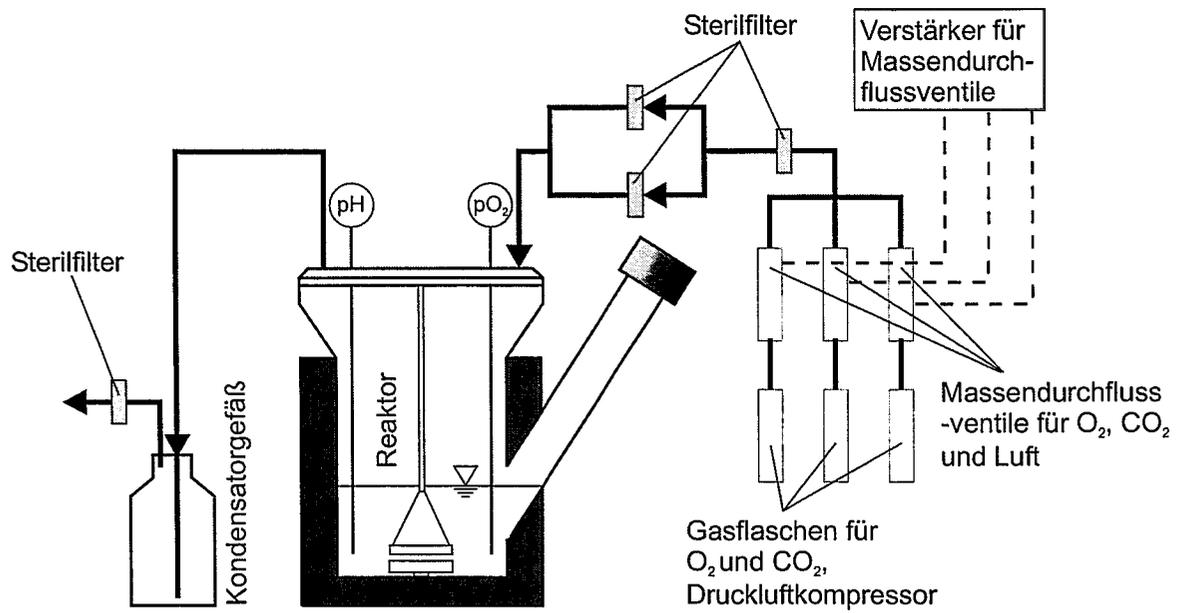


Abbildung J.2: Schema der Begasung

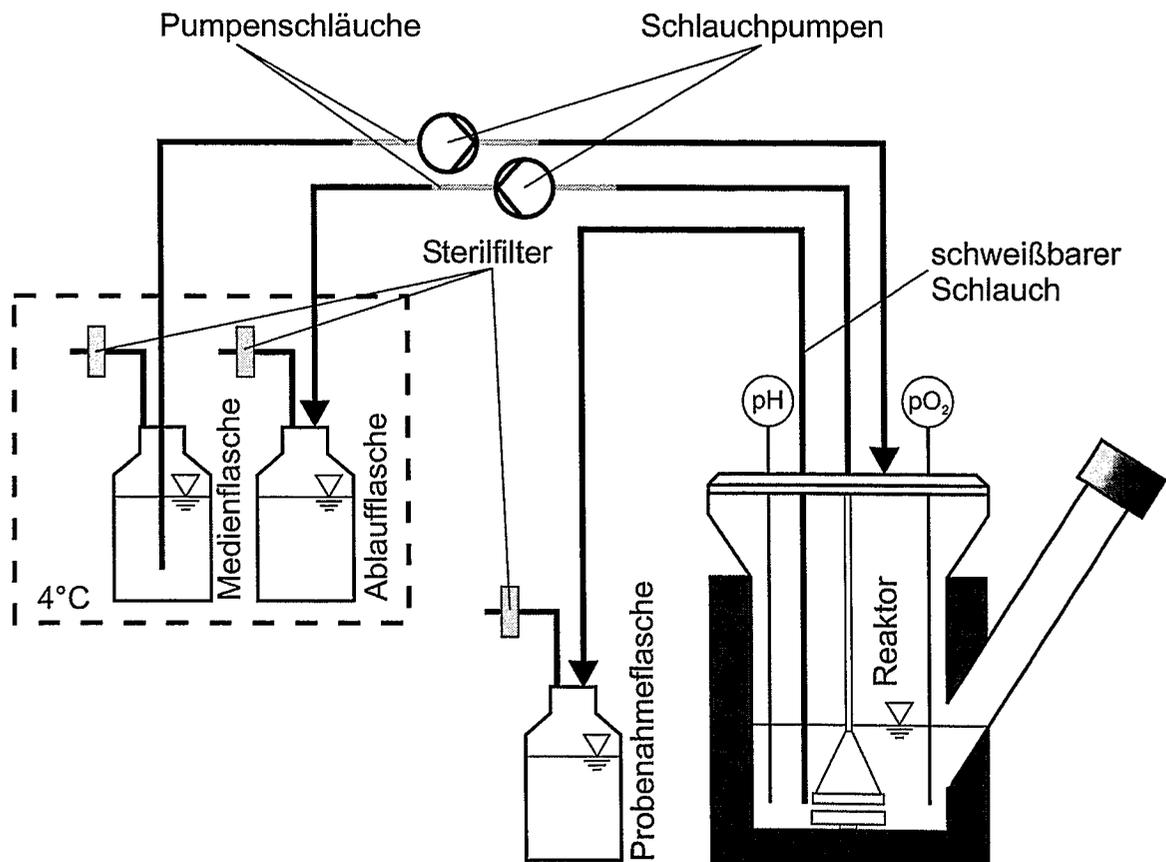


Abbildung J.3: Medien Zu- und Abläufe

- Die Anschlüsse am Kopf der pH- und pO₂-Elektroden sind mit Aluminiumfolie zu umhüllen.
- Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven bei 121 °C und 1,2 bar für 60 min.

5.3 Steriltestung, Inokulieren und Anfahren des Bioreaktors

- Die Verbindung des Filters am flexiblen Edelstahlschlauch des Bioreaktordeckels ist mit einer Klemme zu verschließen.
- Die Verbindung des Filters des Deckels auf dem Probenahmestutzen des Bioreaktors ist mit einer Klemme zu verschließen.
- Die Gaszuleitung sowie die Kondensatorflasche mit Verbindungsschlauch sind offen zu halten.
- Während des Steriltests ist mit reiner Druckluft zu begasen.
- An dem sterilen Reaktor ist unter einer Sterilbank 0,5 L X-Vivo 10 in die Medienflasche zuzugeben und innerhalb von 48 h als Steriltest durch den Reaktor zu leiten.
- Während des Steriltests ist die pO₂-Elektrode gemäß Herstellerangaben zu kalibrieren.
- Nach erfolgreichem Steriltest ist das komplette Kulturmedium unter einer Sterilbank in die Medienflasche zu füllen.
- Unter einer Sterilbank sind über den seitlichen Stutzen des Bioreaktors die Zellen zu inokulieren.
- Vom Inokulum ist aus dem Reaktor eine Sterilprobe zu entnehmen.
- Die Verbindungsschläuche der Medienvorlage- und Medienablaufflasche sind mit einer Klemme zu verschließen.
- Der Probenahmeschlauch darf nicht mit Flüssigkeit gefüllt sein.
- Medienzu- und Medienablaufpumpe bleiben zum Anfahren des Reaktors ausgeschaltet (Batch-Betrieb).
- Magnetrührtrieb auf 300 U/min.
- Gaszulauf: 5 L/h bestehend aus 91 % Druckluft und 9 % CO₂.
- Wärmebad: externe Temperatur des Wärmebades zwischen 36,5 und 37 °C. Die Regelung des Wärmebades erfolgt am internen Wert.

5.4 Betrieb des Bioreaktors

Der Betrieb des Bioreaktors erfolgt in einer Wanne, die das gesamte Volumen des Reaktors inklusive aller anhängenden Flaschen auffangen kann. Alle Arbeiten, die ein Öffnen des Bioreaktors erfordern, müssen unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank erfolgen. Die Medien- und die Abfallflasche sind bei 4 °C zu lagern.

5.4.1 Während des Betriebes einzuhaltende Parameterbereiche

- pH-Wert $\leq 7,3$.
- pO₂ zwischen 30 und 100 % Luftsättigung.
- Temperatur des Bioreaktors (= externe Temperatur des Wärmebades): 36,5–37 °C.
- Drehzahl des Magnetrührtriebs zwischen 150 und 700 U/min.
- Vordruck vor den Massendurchflussventilen: 1,5–2 bar.

5.4.2 Tägliche Wartung

- Optische Kontrolle der Dichtigkeit aller Schläuche und Verbindungen.
- Kontrolle des Füllstandes des Reaktors.
- Kontrolle der Funktion des Gaszulaufs und des Gasablaufs.
- Ablesen und Protokollieren des pH- und pO₂-Wertes.
- Kontrolle des Füllstandes und der Temperatur des Wärmebades.
- Kontrolle der Medien- und Abfallflasche.
- Kontrolle des Füllstandes im Probenahmestutzen und eventuelle Entlüftung desselben (eine Entlüftung darf grundsätzlich nur bei unterbrochener Gaszufuhr durchgeführt werden).
- Probenahme (siehe Abschnitt „Vorgehen bei der Probenahme“).

5.4.3 Wöchentliche Wartung

- Kontrolle des Drucks der Gasflaschen und der Druckhalteventile.
- Entlüftung des Ölfilters am Druckluftkompressor.

5.4.4 Vorgehen bei der Probenahme

- Vor der Probenahme muss der Probenahmeschlauch gespült werden.
- Die Probenahme erfolgt durch Einleiten von Zellsuspension in den Probenahmeschlauch und anschließendes steriles Abschweißen eines 16 cm langen Schlauchstückes.
- Nach der Probenahme ist die restliche Zellsuspension im Probenahmeschlauch wieder vollständig in den Reaktor zurückzuführen.
- Das abgeschweißte Stück Schlauch wird in ein kleines Reaktionsgefäß entleert.
- Die Zellen werden gezählt, die restliche Zellsuspension wird abzentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -20 °C eingefroren.

5.4.5 Vorgehen bei außergewöhnlichen Betriebszuständen

- Es ist darauf zu achten, dass der Betriebszustand stabil ist und sich nicht in kurzer Zeit (30 min) stark ändert. Andernfalls ist ein stabiler Betriebszustand abzuwarten.
- Sollte der Betriebszustand von in Abschnitt „Während des Betriebes einzuhaltende Parameterbereiche“ genannten Parametergrenzen abweichen, ist der entsprechende Betriebsparameter so zu ändern, dass er die in Abschnitt 5.4.1 genannten Grenzen einhält. In folgenden Fällen ist speziell entsprechend der Tabelle vorzugehen:

Ereignis	Vorgehen
pH-Wert > 7,3	CO ₂ -Anteil im Gaszulauf um zwei Prozentpunkte erhöhen, eine Stunde abwarten, den pH-Wert neu beurteilen.
pO ₂ -Wert > 100 %	O ₂ -Anteil im Gaszulauf um zehn Prozentpunkte verringern. (Falls nur mit Druckluft mit oder ohne CO ₂ begast wird, ist kein Vorgehen notwendig.)
pO ₂ -Wert < 30 %	Falls CO ₂ zudosiert wird und der pH-Wert unter 7,1 liegt, die CO ₂ -Zufuhr abstellen. Unabhängig von der CO ₂ -Zufuhr O ₂ -Anteil im Gaszulauf um zehn Prozentpunkte erhöhen. Ist dies nicht mehr möglich, ist die Drehzahl des Magnetrührantriebs um 100 U/min zu erhöhen.

5.4.6 Steuerung des Medienzulaufs und des Medienablaufs

- Vor Betrieb des Medienzu- oder Medienablaufs sind die Klemmen von den Schläuchen zu entfernen.
- Ist eine Zelldichte von über $6 \cdot 10^5$ vitale Zellen/mL überschritten, ist das Füllvolumen mit Frischmedium innerhalb von maximal 24 h zu verdoppeln. Dabei ist die maximale Füllmenge des Bioreaktors von 550 mL in jedem Falle einzuhalten.
- Ist der Reaktor vollständig gefüllt, ist nach folgender Tabelle vorzugehen:

Überschrittene Zellkonzentration [vitale Zellen/mL]	Entsprechende Gesamtzellzahl [vitale Zellen]	Einzustellender Volumenstrom des Medienzulaufs und Medienablaufs (jeweils) [mL/d]
$6,0 \cdot 10^5$	$3,30 \cdot 10^8$	127
$1,5 \cdot 10^6$	$8,25 \cdot 10^8$	190
$3,0 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^9$	254
$6,0 \cdot 10^6$	$3,30 \cdot 10^9$	381

5.4.7 Abernten der Zellen

- Vor dem Abernten ist eine Probe für einen Sterilttest zu entnehmen.
- Für das Abernten der Zellen ist an die Stelle der Probenahmeflasche ein steriler Beutel mit mindestens 550 mL Volumen angeschweißt.
- Der vollständige Reaktorinhalt ist in den Beutel zu leiten, der danach steril abgeschweißt wird.

5.4.8 Sterilisation und Reinigung des Bioreaktors

- Der Wärmekreislauf ist vom Reaktor vollständig zu entfernen.
- pH- und pO_2 -Verstärker mit Verbindungskabeln sind vom Reaktor zu entfernen.
- Massendurchflussventile für O_2 , CO_2 und Luft, inklusive Steuereinheit sowie die Gasflaschen und der Druckluftkompressor sind vom Reaktor zu entfernen.
- Es ist darauf zu achten, dass kein Schlauch des Reaktors in irgendeiner Weise blockiert ist oder mit Flüssigkeit gefüllt ist.
- Ein Druckausgleich jedes Gefäßes muss durch Sterilfilter gewährleistet sein.
- Alle Sterilfilter sind mit Aluminiumfolie zu umhüllen und müssen mit ihrer Öffnung nach oben zeigen.
- Die Anschlüsse am Kopf der pH- und pO_2 -Elektroden sind mit Aluminiumfolie zu umhüllen.
- Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven bei 121 °C und 1,2 bar für 60 min.
- Nach dem Sterilisieren sind alle Bauteile gründlich zu reinigen.

6 Dokumentation

Die folgenden Werte sind mindestens einmal täglich in dem zugehörigen Datenblatt schriftlich zu protokollieren:

- pH-Wert.
- pO_2 -Wert.

- Zellkonzentration.
- Zellvitalität.

Für die folgenden Daten und Einstellungen ist jede Änderung in dem zugehörigen Datenblatt schriftlich zu protokollieren:

- Gasmischungsverhältnis.
- Gasvolumenstrom.
- Reaktorfüllstand.
- Einstellung der Medienzulaufpumpe.
- Einstellung der Medienablaufpumpe.
- Rührerdrehzahl.

DANKSAGUNG

Die schwierigste Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, den vielen Menschen, die zum Gelingen beigetragen haben, auf nur einer einzigen Seite in angemessener Form zu danken.

Mein Dank gilt besonders:

- Herrn Professor Dr. rer. nat. Christian Wandrey für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die ebenso hervorragenden Arbeitsbedingungen
- Herrn Professor Dr.-Ing. Jochen Büchs für das Interesse an der Arbeit, die Übernahme des Koreferates und die vielen hilfreichen Gespräche
- Herrn Professor Dr. rer. nat. Manfred Biselli für die sehr gute Betreuung, anregende Diskussionen und die gewährten Freiheiten
- Frau Dipl.-Biol. Nanni Jelinek für die perfekte Symbiose und Synergie
- Frau Dr. rer. nat. Petra Meissner und Herrn Dr. rer. biol. hum. Stefan Thoma für viel Hilfe und ihre bewundernswerte Geduld mit einem Ingenieur
- Herrn Dr. rer. nat. Thomas Noll für seine Blutspende und sein geduldiges Zuhören
- Herrn Dr.-Ing. Detlef Eisenkrätzer für die vielen fruchtbaren ingenieurtechnischen Gespräche
- Frau Dipl.-Biol. Ulrike Hilbert für die sehr gute Zusammenarbeit bei den Lymphozyten
- Frau Dipl.-Ing.(FH) Angela Kucera für den Fleiß und das Engagement während ihrer Diplomarbeit
- Frau Cornelia Herfurth für die ungezählte Hilfe im Laboralltag
- Herrn Jochem Gätgens für die großartige Hilfe bei den NK-Zellen und die täglichen Theorien
- Allen Mitarbeitern der Werkstätten, insbesondere den Herren Ruhrig, Milz und d'Orsaneo, ohne deren Hilfe eine ingenieurtechnische Arbeit unmöglich wäre
- Herrn Siegfried Peters für die fotografischen Aufnahmen
- Allen Mitarbeitern des Forschungszentrums, des Instituts für Biotechnologie und speziell der Zellkulturgruppe, die hier nicht namentlich erwähnt wurden
- Herrn Dr. med. Torsten Tonn, Herrn Dr. rer. nat. Sven Becker und allen Mitarbeitern des Blutspendedienstes Hessen für ihre freundliche Aufnahme, ihr Engagement und ihre vorurteilsfreie Haltung zu neuen Techniken
- Herrn Dipl.-Ing. Robert Hermann für die Unterstützung bei der Sauerstoffeintragungsmessungen im Miniatur-Schlaufenreaktor
- Herrn Dr. med. Dartsch und den Hebammen des St. Elisabeth-Krankenhauses Jülich für die Abnahme der Nabelschnurblutspenden
- Der Firma MainGen für die Unterstützung der Arbeit
- Herrn cand.-Ing. Frank Müller für die Hilfe beim Kampf gegen den Computer
- Den vielen Menschen, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben, insbesondere Frau Marlies Ulrich für die Unterstützung bei der neuen deutschen Rechtschreibung
- Der größte Dank gilt meinen Eltern, deren Liebe und Unterstützung mir all dies erst ermöglicht haben

Forschungszentrum Jülich



Jül-3830
Dezember 2000
ISSN 0944-2952