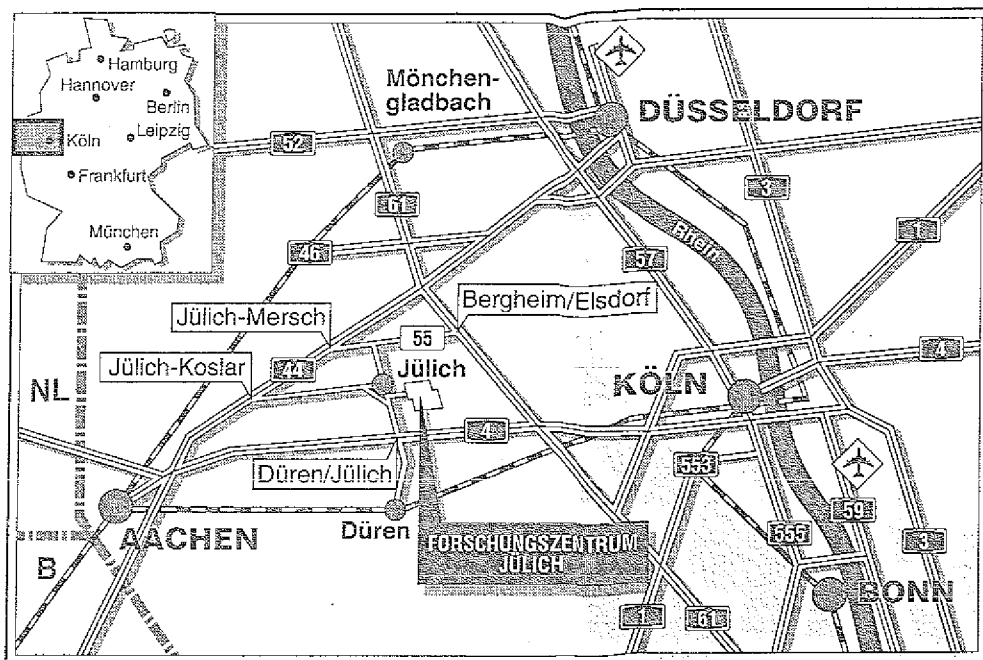


Institut für Biotechnologie

**Verfahrensoptimierung in der Säuger-
zellkultur am Beispiel der Produktion
von monoklonalen Antikörpern mit
Hybridomazellen**

Jörg Thömmes



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2688

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jül-2688

D 5 (Diss. Universität Bonn)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Handwritten text in a cursive script, likely a letter or a page from a manuscript. The text is written in dark ink on a light background. The handwriting is fluid and somewhat slanted, characteristic of 18th or 19th-century cursive. The text is arranged in several lines, with some words appearing to be underlined or written in a slightly larger hand than others. The overall impression is that of a personal or official communication from that era.

Handwritten text in a cursive script, likely a letter or a page from a manuscript. The text is written in dark ink on a light background. The handwriting is fluid and somewhat slanted, characteristic of 18th or 19th-century cursive. The text is arranged in several lines, with some words appearing to be underlined or written in a slightly larger hand than others. The overall impression is that of a personal or official communication from that era.

Verfahrensoptimierung in der Säuger- zellkultur am Beispiel der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen

Jörg Thömmes

1. The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

2. The second part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

3. The third part of the paper discusses the importance of the study of the history of the world, and the role of the world in the development of the human race.

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Symbole und Abkürzungen	1
Liste der Abbildungen und Tabellen	4
1. Einleitung und Problemstellung	8
2. Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen	11
2.1 Antikörper und Immunsystem	11
2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper	13
2.3 Verwendung monoklonaler Antikörper	15
2.4 Reaktorkonzepte zur Kultivierung von Hybridomzellen	16
Exkurs: Produktion von monoklonalen Antikörpern mit immobilisierten Hybridomzellen im Pilotmaßstab	22
3. Grundlagen des Stoffwechsels von Hybridomazellen	28
3.1 Substrate des Energiestoffwechsels	28
3.2 Potentiell inhibitorische Metabolite	36
3.3 Kinetik der Antikörperbildung	39
3.4 Modellierung von Säugerzellkulturen	43
4. Material und Methoden	48
4.1 Zelllinie und Medium	48
4.2 Analytische Methoden	50
4.3 Beschreibung der verwendeten Kultursysteme	60
4.3.1 Stammhaltung	60
4.3.2 Rührkesselfermenter	61
4.3.3 Kleinwirbelschichtreaktor	64
5. Ermittlung der kinetischen Daten von Wachstum und Produktivität in ruhender Kultur	67
5.1 Einführung	67
5.2 Abhängigkeit der zellspezifischen Raten von den Substratkonzentrationen	72
5.3 Einfluß von ausgewählten Metaboliten	83
5.4 Kopplung von Wachstum und Produktivität	89
5.5 Erstellung eines unstrukturierten Modells anhand der Ergebnisse der kinetischen Messungen	89

6.	Kultivierung einer immobilisierten Population der Hybridomalie VX 12 in einem Wirbelschichtreaktor	102
6.1	Einführung	102
6.2	Optimierung des Anfahrverhaltens eines Wirbelschichtreaktors mit immobilisierten Hybridomzellen	103
6.3	Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf den Metabolismus einer immobilisierten VX 12-Population	108
7.	Versuch der Überwindung der Ammoniuminhibierung durch gezielte Dialyse	120
7.1	Einführung	120
7.2	Untersuchungen zum Transport von Ammoniumionen über eine Kationenaustauschermembran	128
7.3	Biokompatibilität des Dialysesystems	133
7.4	Vollständige Integration der Entgiftungseinheit in eine Fermentation	136
7.5	Bewertung des Verfahrens	140
8.	Diskussion und Ausblick	143
9.	Zusammenfassung	148
10.	Literaturverzeichnis	150

Liste der verwendeten Symbole und Abkürzungen

Abkürzungen

AD(T)P	Adenosin-di(tri)phosphat
Amm	Ammonium
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
EDTA	Ethylen-diamino-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F _c	Fraction crystallisable (Kristallisierbares Antikörperfragment)
F _{ab}	Fraction antigen binding (Antigen bindendes Antikörperfragment)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GDH	Glutamatdehydrogenase
Gln	Glutamin
Glc	Glukose
GVR	Glukoseverbrauchsrate
HPLC	High performance liquid chromatography
I	Inhibitor
MAb (MAK)	Monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
NAD(H)	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
OD	Optische Dichte
P	Produkt
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
m-RNA	Messenger-Ribonukleinsäure
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
S	Substrat

TCA	Tri carboxylic acid cycle (Zitrat-Zyklus, Krebs Zyklus)
vc	viable cells (vitale Zellen)

Formelzeichen und Symbole

[a]	Konzentration von a	[mmol/l]
[a] ₀	Anfangskonzentration von a	[mmol/l]
A	Membranfläche	[m ²]
β	globaler Stoffübergangskoeffizient	[cm/h]
d	Durchmesser	[m]
D	Verdünnungsrate	[h ⁻¹]
I _{max}	maximale Inhibitorkonzentration	[mmol/l] [^]
j	Flächenbezogener Flux	[mmol/(m ² *h)]
k	Zerfallskonstante für Glutamin	[h ⁻¹]
k _D	Absterberate	[h ⁻¹]
K _i	Inhibierungskonstante	[mmol/l]
K _S	Monod-Konstante bezüglich S	[mmol/l]
K _P	Monod-Konstante der Produktbildung	[mmol/l]
K _{qS}	Monod-Konstante der Substrataufnahme	[mmol/l]
m _S	Maintenance Koeffizient bezüglich S	[mmol/(10 ⁹ vc. *h)]
MFR	Medium Feed Rate	[l/h]
μ	Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ _{max}	maximale Wachstumsrate	[h ⁻¹]
n	Exponentialfaktor der Inhibierung	[-]
N _{Xges}	Gesamtzellmenge	[10 ⁹ vc.]
N _{Ximm.}	immobilisierte Zellmenge	[10 ⁹ vc.]
ν	kinematische Viskosität	[m ² /s]
q _P	spezifische Produktbildungsrate	[mmol/(10 ⁹ vc. *h)]
q _{Pmax}	maximale spezifische Produktbildungsrate	[mmol/(10 ⁹ vc. *h)]
q _S	spezifische Substrataufnahmerate	[mmol/(10 ⁹ vc. *h)]

q_{Smax}	maximale spezifische Substrataufnahmerate	$[mmol/(10^9 \text{ vc.} \cdot h)]$
Re	Reynoldszahl	$[-]$
t	Zeit	$[h]$
τ	Verweilzeit	$[h]$
V_R	Reaktorvolumen	$[l]$
v	Volumenstrom	$[l/h]$
X	Zellkonzentration	$[10^9/l]$
X_0	Anfangszellkonzentration	$[10^9/l]$
X_{vital}	vitale Zellkonzentration	$[10^9/l]$
$X_{susp.}$	suspendierte Zellkonzentration	$[10^9/l]$
$X_{imm.}$	immobilisierte Zellkonzentration	$[10^9/ml \text{ Schüttvolumen}]$
X_{gesamt}	Gesamtzellkonzentration	$[10^9/l]$
$Y(X/S)$	apparenter Ausbeutekoeffizient bezüglich S	$[10^9 \text{vc.} / mmol \text{ S}]$
$Y(X/S)_{max}$	maximaler Ausbeutekoeffizient bezüglich S	$[10^9 \text{vc.} / mmol \text{ S}]$

Liste der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Zielsetzungen dieser Arbeit

Abb. 2.1.1: Schematische Ansicht eines monoklonalen Antikörpers

Abb. 2.1.2: Klonale Selektionstheorie nach Burnet

Abb. 2.2.1: Herstellung monoklonaler Antikörper

Abb. 2.4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Collagen- und Sinterglas-Mikroträgern

Abb. E1: Schematischer Aufbau des Fermentationssystems

Abb. E2: Photographische Aufnahme des Fermentationssystems

Abb. E3: Verlauf der Testfermentation (Glukose und Glukoseverbrauch)

Abb. E4: Verlauf der Testfermentation (Glutamin, Ammonium, IgG)

Abb. 3.1.1: Vereinfachtes Schema des Hybridoma-Stoffwechsels

Abb. 3.1.2: Regulation von Glukose- und Glutaminstoffwechsel

Abb. 3.1.3: Substratfluß durch den TCA

Abb. 3.3.1: Kinetische Muster der Antikörperbildung

Abb. 3.3.2: Modell des Zellzyklus von Hybridomazellen

Abb. 3.3.3: Korrelation zwischen Antikörperbildung und Wachstumsrate

Abb. 3.4.1: Schematische Darstellung der Zellbilanz von immobilisierten Kulturen

Abb. 4.2.1: Eichgerade der Ammoniumbestimmung

Abb. 4.2.2: Eichgerade der Glutaminbestimmung

Abb. 4.2.3: Prinzip des Sandwich-ELISA

Abb. 4.2.4: Chromatogramm der Antikörperbestimmung mittels HPLC

Abb. 4.2.5: Eichgerade der chromatographischen IgG-Bestimmung

Abb. 4.3.1: Photographische Aufnahme einer T-Flasche und eines Spinner-Gefäßes

Abb. 4.3.2: Schematische Ansicht des Rührkesselfermenters

Abb. 4.3.3: Fließbild des Kleinwirbelschichtreaktors

Abb. 4.3.4: Photographische Aufnahme des Kleinwirbelschichtreaktors

Abb. 5.1.1: Charakteristischer Verlauf einer Wachstumskurve

Abb. 5.1.2: "Wahrer" Verlauf von $S(t)$ gegen $X(t)$

- Abb. 5.1.3: Linearer Verlauf von Glc. (t) und IgG (t) gegen X (t)
- Abb. 5.2.1: Abhängigkeit der Glukoseaufnahme von der Glukosekonzentration
- Abb. 5.2.2: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Glukosekonzentration
- Abb. 5.2.3: Abhängigkeit der Produktivität von der Glukosekonzentration
- Abb. 5.2.4: Einstellbares Verhältnis von chemischer zu metabolischer Ammoniumbildung bei kontinuierlicher Prozeßführung
- Abb. 5.2.5: Chemische und metabolische Ammoniumbildung in der Batch-Kultur
- Abb. 5.2.6: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Glutaminkonzentration
- Abb. 5.2.7: Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von der Glutaminkonzentration
- Abb. 5.2.8: Abhängigkeit der Glutaminaufnahme von der Glutaminkonzentration
- Abb. 5.2.9: Abnehmende Glutaminaufnahme bei steigender Glukosekonzentration
- Abb. 5.2.10: Konstante Glukoseaufnahme bei wechselnder Glutaminkonzentration
- Abb. 5.2.11: Dreidimensionale Darstellung der Kinetik der Glukoseaufnahme
- Abb. 5.2.12: Dreidimensionale Darstellung der Glutaminaufnahme
- Abb. 5.2.13: Bestimmung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels für Glukose
- Abb. 5.2.14: Bestimmung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels für Glutamin
- Abb. 5.3.1: Inhibierung des Zellwachstums durch Ammonium
- Abb. 5.3.2: Inhibierung der IgG-Bildung durch Ammonium
- Abb. 5.3.3: Konstante Glukoseaufnahme bei steigender Ammoniumkonzentration
- Abb. 5.3.4: Anstieg des Maintenance-Koeffizienten mit steigender Ammoniumkonzentration
- Abb. 5.3.5: Paralleler Verlauf von Laktat- und NaCl-Inhibierung
- Abb. 5.4.1: Wachstumsgekoppelte Antikörperbildung
- Abb. 5.5.1: Wachstumskinetik unter Einbeziehung des Erhaltungsstoffwechsels
- Abb. 5.5.2: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 10 mM und $C_0(\text{Gln})$ 5 mM
- Abb. 5.5.3: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 20 mM und $C_0(\text{Gln})$ 5 mM
- Abb. 5.5.4: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 20 mM und $C_0(\text{Gln})$ 3 mM
- Abb. 5.5.5: Simulation einer Kultivierung der VX 12 mit unterschiedlichen Werten für $Y(\text{X/Glc.})_{\text{max}}$
- Abb. 5.5.6: Simulation eines X/D-Diagramms im CSTR
- Abb. 5.5.7: Simulation eines X/D-Diagramms im Wirbelschichtreaktor
- Abb. 5.5.8: Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten von CSTR und Wirbelschichtreaktor

Abb. 6.1.1: Verlauf einer Testfermentation im Kleinwirbelschichtreaktor

Abb. 6.2.1: Anfahren eines Wirbelschichtreaktors mit Glukose als Leitsubstrat

Abb. 6.2.2: Glutamin und Ammoniumkonzentration während des glukostatischen Anfahrens

Abb. 6.2.3: Beschleunigtes Anfahren bei Glutamin als Leitsubstrat

Abb. 6.2.4: Vergleich von Glukose und Glutamin als Leitsubstrat des nutristatischen Anfahrens

Abb. 6.3.1: Konzentrations-Zeit-Verlauf der Fermentation zur Untersuchung des Einflusses des pO_2

Abb. 6.3.2: Bilanz zur Bestimmung der Wachstumsrate der immobilisierten Zellen

Abb. 6.3.3: Einfluß des pO_2 auf Wachstum und Produktbildung

Abb. 6.3.4: Einfluß des pO_2 auf Glutaminaufnahme und Ammoniumbildung

Abb. 6.3.5: Einfluß des pO_2 auf Glukoseaufnahme und Laktatbildung

Abb. 6.3.6: Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels unter Sauerstofflimitierung (Glukose als Substrat)

Abb. 6.3.7: Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels unter Sauerstofflimitierung (Glutamin als Substrat)

Abb. 6.3.8: Parameter des Erhaltungsstoffwechsels

Abb. 6.3.9: Wachstumsgekoppelte IgG-Bildung

Abb. 7.1.1: Prinzip der Ammoniumabtrennung mit Membranmethoden

Abb. 7.1.2: Ammoniumentfernung mit Gasdiffusionsmembranen

Abb. 7.1.3: Die Henderson-Hasselbalch-Beziehung

Abb. 7.1.4: Prinzip der dialytischen Ammoniumabtrennung mit Kationenaustauschermembranen

Abb. 7.1.5: Prinzip der integrierten Entgiftung

Abb. 7.1.6: Aufsicht auf die Bodenplatte der Dialyseeinheit

Abb. 7.1.7: Seitenansicht des Dialysemoduls

Abb. 7.1.8: Dichtungsprinzip des Dialysemoduls

Abb. 7.2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Stofftransports

Abb. 7.2.2: Abhängigkeit des Ammoniumfluxes vom Akzeptor-pH

Abb. 7.2.3: Einfluß des Ammoniumgradienten quer zur Membran auf die Transportrate

Abb. 7.2.4: Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf den Ammoniumtransport

Abb. 7.3.1: Nachweis der Zellkompatibilität des NAFION-Materials

Abb. 7.3.2: Versuchsanordnung des Zellkompatibilitätstests

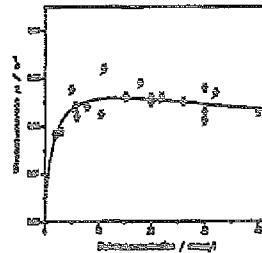
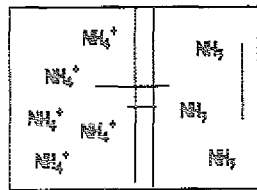
Abb. 7.3.3: Zellkompatibilitätstest der Versuchsanordnung (a)

1. Einleitung und Problemstellung

Im Jahre 1985 erhielten die Immunologen Köhler und Milstein den Nobelpreis für Medizin. Ihnen war es gelungen, durch die Hybridisierung von Antikörper sezernierenden Plasmazellen und Myelomzellen einen Zugang zu nahezu unbegrenzten Mengen sogenannter monoklonaler Antikörper zu finden. Die von ihnen entwickelte Technik bedeutete die Vereinigung zweier zelltypischer Eigenschaften: Der Antikörperproduktion der Lymphozyten, die selbst nur eine beschränkte Vermehrungsfähigkeit aufweisen, mit der unbegrenzten Lebensdauer von Myelomzellen (Köhler und Milstein 1975). Bis dahin war zwar die Bedeutung der hohen Spezifität von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen bereits erkannt worden, die aufwendige Isolierung eines ausschließlich polyklonalen Antiserums aus tierischem oder menschlichem Serum verhinderte aber ihren Einsatz im großen Maßstab. Die bahnbrechende Entwicklung von Köhler und Milstein bedeutete den Einstieg in eine neue Technologie, die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern mit beliebig wählbarer antigener Spezifität durch Kultivierung von Hybridomazellen als kontinuierlichen Zelllinien mit unbeschränkter Vermehrungsfähigkeit in Massenkultur. Die hierdurch vorangetriebenen Entwicklungen in der Kultivierungstechnologie kamen auch der Säugerzellkulturtechnologie insgesamt zugute. Es wurde deutlich, daß eine Beschränkung auf das Auffinden von Bedingungen zum Erreichen maximaler Zelldichten nicht ausreicht, um Prozesse vom Labor- zum Produktionsmaßstab zu bringen. Wachstums- und Produktbildungskinetik sowie daraus resultierende Alternativen zu den klassischen Aufzuchtmethoden rückten in den Mittelpunkt des Interesses.

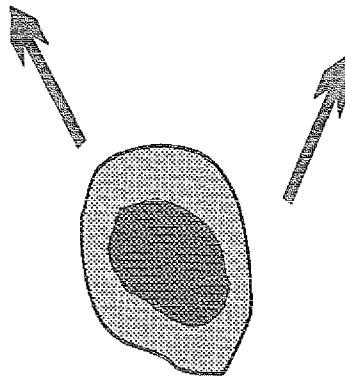
Die bisherigen Fortschritte auf dem Gebiet der Zellbiologie sowie der daraus resultierenden Entwicklung von Kultursystemen sind sehr vielversprechend. Vor allem die Immobilisierung von Säugerzellen in Verbänden von gewebeähnlicher Dichte zeigte sich als erfolgreich. Im Vergleich zur genauen Beschreibung von Prozessen mit Bakterien oder Pilzen steckt die reaktionstechnische Behandlung dieser Kultursysteme jedoch noch in ihren Anfängen. Hier sind mit zunehmender Annäherung an technische Maßstäbe bei der Produktion von Wertstoffen mit Säugerzellen noch viele bioverfahrenstechnisch ausgerichtete Fragen zu beantworten.

Die vorliegende Arbeit soll auf diesem Gebiet einen Beitrag zur Verbesserung der Produktionstechnik von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen leisten. Anhand einer Maus-Maus-Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper der Subklasse IgG_{2A} sezerniert, als biologisches Modell sollen bioverfahrenstechnische Ansätze zur Prozeßoptimierung verfolgt werden. Dies beinhaltet zum einen eine konsequente fermentationskinetische Charakterisierung der verwendeten Zelllinie anhand der Parameter von Wachstum und Produktivität, zum anderen den Einsatz von neuen Methoden zur Kultivierung, um den Erkenntnissen der kinetischen Messungen Rechnung zu tragen. Insbesondere soll versucht werden, die Kinetik beeinflussende Inhibitoren gezielt aus der Kulturflüssigkeit zu entfernen. In der Literatur finden vor allem Ammoniumionen als starke Inhibitoren Erwähnung. Daher wird am Beispiel der Entfernung von Ammonium aus Kulturflüssigkeiten eine integrierte Entgiftung angestrebt. Desweiteren soll die Immobilisierung der Hybridomazellen in offenporigen Mikroträgern vorgenommen werden, um eine für die Zellen möglichst vorteilhafte Mikroumgebung bei gewebeähnlicher Zelldichte zu schaffen. Der Einsatz von in offenporigen Trägermaterialien kultivierten Hybridomazellen in einem Wirbelschichtprozeß ist hierbei einer Untersuchung unter reaktionstechnischen Gesichtspunkten zu unterziehen. Die ermittelten Ergebnisse sollen als Grundlage für eine Prozeßsimulation dienen, um Prozeßoptima in Abhängigkeit von den wichtigsten Einflußgrößen voraussagen zu können.

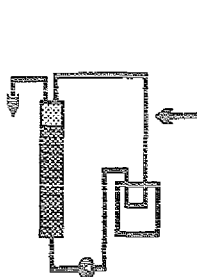


Überwindung der Produktinhibierung
durch Ammoniumionen mittels
dialytischer Methoden

Ermittlung der kinetischen Parameter



VX 12 (Maus - Maus Hybridoma)



Immobilisierung in Collagen-Mikroträgern
(Wirbelschichtreaktor)

Abb. 1: Zielsetzungen dieser Arbeit

Im einzelnen ergibt sich folgende Aufgabenstellung:

- Bestimmung der Parameter von Wachstum und Produktbildung der Maus-Maus-Hybridomalinie
- Erstellen eines kinetischen Modells und Simulation verschiedener Prozeßbedingungen
- Entwicklung einer Methode zur gezielten Abtrennung von Ammoniumionen aus Zellkultursuspensionen
- Integration einer Entgiftungseinheit in einen Fermentationsprozeß
- Immobilisierung der Hybridomazelle VX 12 in offenporigen Mikroträgern
- Einsatz der Mikroträger in einem kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktor
- Auffinden von Produktionsoptima im kontinuierlichen Betrieb

2. Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen

2.1 Antikörper und Immunsystem

Eine tragende Rolle beim Schutz des menschlichen Körpers vor Infektionen spielt das humorale Immunsystem (van den Tweel et al. 1989). Sein Wirkungsmechanismus beruht auf dem Erkennen körperfremder Strukturen durch komplexe Proteine, sogenannte Immunglobuline oder auch Antikörper. Diese binden mit hoher Spezifität an Fremdmoleküle ("non-self") und leiten deren Eliminierung aus dem Körper ein. Die einzigartige Spezifität der Antigen ("non-self")-Antikörperbindung beruht auf der Struktur des Antikörpermoleküls: Es besteht aus insgesamt vier Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Man unterscheidet zwei schwere (Molekulargewicht 50.000 - 70.000 kD) und zwei leichte Proteinketten (Molekulargewicht ca. 23.000 kD). Immunglobuline lassen sich durch die unterschiedliche Art der Verknüpfung ihrer Ketten durch Disulfidbrücken in Subklassen unterteilen. Abb. 2.1.1 zeigt schematisch die Struktur eines Antikörpers. Spaltet man ein Immunglobulinmolekül enzymatisch mit Papain, so erhält man zwei Fragmente: Ein kristallisierbares Fragment (F_C), das für alle Antikörper einer Subklasse gleich ist, und einen sogenannten variablen Anteil. Letzterer stellt die spezifische Antigenbindungsstelle dar und wird daher abgekürzt als F_{ab} (Fraction antigen binding) bezeichnet.

Die Bildung von Immunglobulinen erfolgt im humoralen Immunsystem durch Plasmazellen, die aus Knochenmarkstammzellen durch Differenzierung zum B-Lymphozyten und anschließende Reifung hervorgehen. Den Prozeß der Reifung beschreibt Burnett in seiner klonalen Selektionstheorie (Tonegawa 1987, s. auch Abb.2.1.2): Unaktivierte B-Lymphozyten bilden eine geringe Menge von Antikörpern, die der Zelle an ihrer Oberfläche als Antigenrezeptoren dienen. Das Auftreten von zum Antikörper passenden Antigenen führt zur Bildung des hochspezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes. Hierdurch wird eine Kaskade von Reaktionen eingeleitet, die als Aktivierung der Lymphozyten bezeichnet wird: Die Zelle beginnt mit vermehrter Teilung und steigert gleichzeitig ihre spezifische Antikörperbildungsrate. Somit ist der Prozeß der humoralen Immunantwort in Gang gesetzt. Im allgemeinen besteht eine körperfremde Substanz aus mehreren antigenen Strukturen, sogenannten Epitopen, wobei ein Antigen mit n Epitopen von n Antikörpern erkannt wird. Somit entsteht ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern gegen ein Antigen, das als polyklonales Antiserum bezeichnet wird.

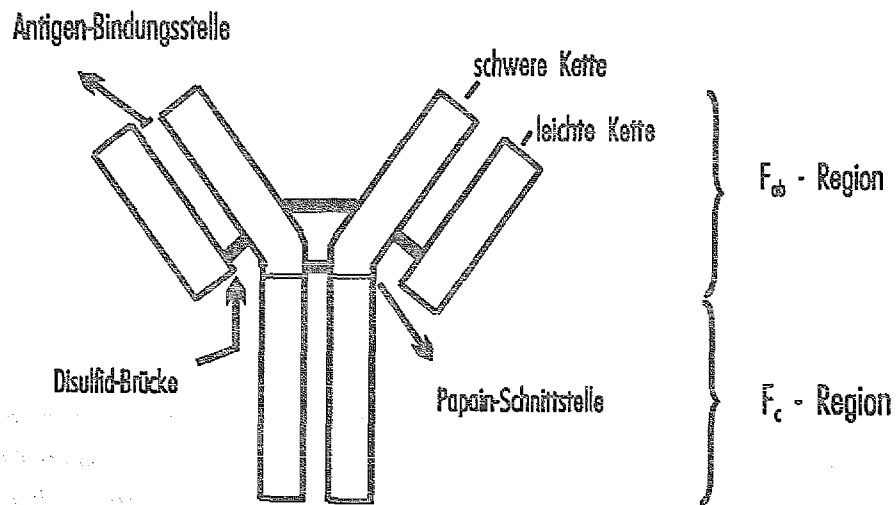


Abb. 2.1.1: Schematische Ansicht eines monoklonalen Antikörpers

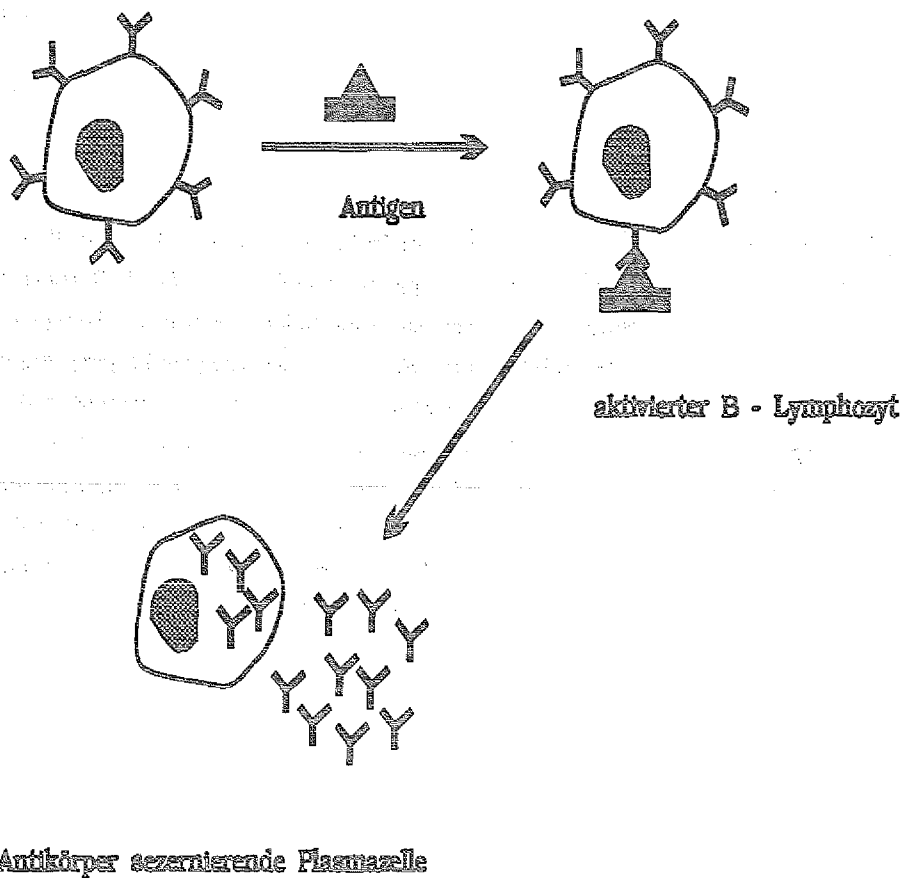


Abb. 2.1.2: Klonale Selektionstheorie nach Burnett

2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Verwendung polyklonaler Antiseren in der Therapie und zur Unterstützung der Immunantwort war durch die mangelnde Reproduzierbarkeit und die aufwendige Abtrennung ungewünschter Antikörper aus den tierischen Antiseren beschränkt. Die Produktion von isolierten Immunglobulinen in Gewebekulturen war durch die limitierte Teilbarkeit der ausdifferenzierten Plasmazellen nicht möglich. Es mußte daher eine Möglichkeit gefunden werden, antikörperproduzierende Plasmazellen zu "unsterblichen" Zelllinien zu transformieren, um einen Produzenten von großen Mengen eines speziellen Antikörpers zu erhalten. Köhler und Milstein nutzten die Technik der Zellfusion zur Verschmelzung von Milzzellen immunisierter Mäuse mit Plasmocytomzellen, Plasmazellen, die zu Tumorzellen transformiert worden waren (Köhler und Milstein, 1975).

Die Herstellung dieser sogenannten "Hybridomazellen" wird folgendermaßen erreicht: Mäuse oder Ratten wird das Antigen des gewünschten Antikörpers injiziert, wodurch die Immunantwort des Tieres, d.h. die Bildung von Antikörpern stimuliert wird. Nach ca. drei Wochen werden die Milzzellen des Tieres mit Myelomazellen fusioniert, wobei der Zusatz von Polyethylenglykol die Fusion ermöglicht. Das entstandene Fusionsgemisch wird nun durch ein spezielles Medium auf Hybridomazellen selektioniert. Die eingesetzte Myelomazelle besitzt einen genetischen Defekt, der die Synthese von Nucleotiden auf dem "salvage pathway", d.h. durch Wiederverwendung von Vorstufen, verhindert. Dem Selektionsmedium, das sogenannte HAT-Medium, wird nun Methotraxat zugesetzt, wodurch die *de novo*-Synthese von Nucleotiden verhindert wird. Auf diese Art und Weise können unfusionierte Myelomazellen in diesem Medium nicht überleben, da sie keine Nucleotide mehr synthetisieren können. Durch Fusion entstandene Hybridomzellen können durch das Methotraxat zwar auch keine *de novo*-Synthese durchführen, die Erbinformation der Milzzellen erlaubt aber den Nucleotidaufbau über den *salvage-pathway*. Unfusionierte Milzzellen sind per se *in vitro* nicht lebensfähig. Somit werden durch das HAT-Medium unfusionierte Zellen ausselektioniert. In weiteren Arbeitsschritten werden nun Zellklone mit maximaler Antikörperproduktivität ausgesucht, bis ein Klon mit den gewünschten Eigenschaften - hohe Antikörperbildungsrate und unbegrenztes Wachstum - gefunden wurde. Dieser Klon kann nun in Massenkultur *in vitro* oder durch Injektion in ein Tiermodell expandiert werden. Abb. 2.2.1 zeigt die Vorgehensweise bei der Herstellung von sogenannten Hybridzellen.

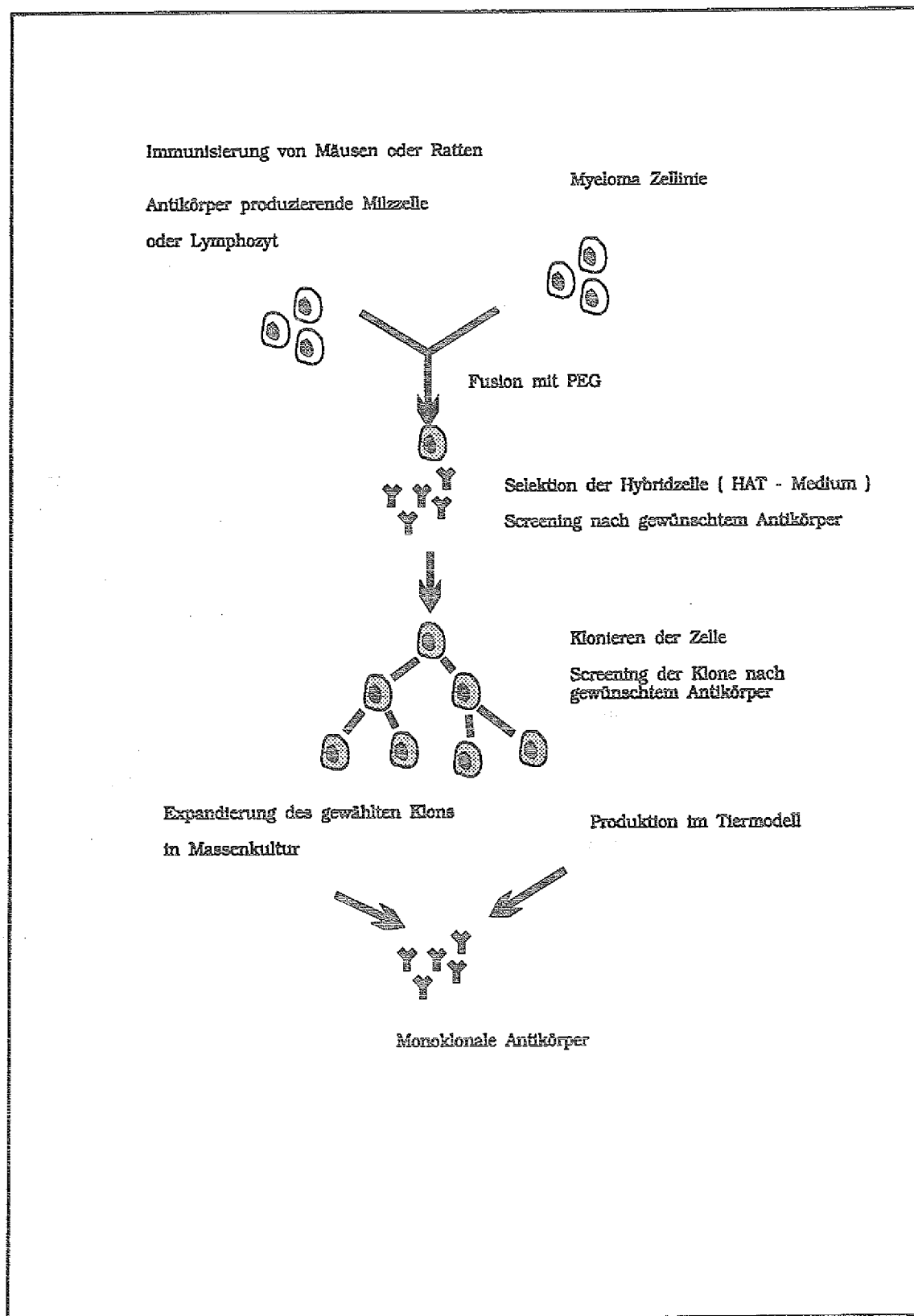


Abb. 2.2.1: Herstellung monoklonaler Antikörper

2.3 Verwendung monoklonaler Antikörper

Die Anwendung monoklonaler Antikörper kann grob in drei Bereiche gegliedert werden: Diagnostik, Therapie und Proteinaufreinigung. In der Diagnostik finden seit langem Antikörper zur Blutgruppenbestimmung Verwendung. Die erweiterte Zugänglichkeit monoklonaler Antikörper hat deren Anwendung in vielen weiteren diagnostischen Bereichen möglich gemacht: Hierzu gehören Radio- und Enzymimmunoassays, Immunofluoreszenzmikroskopie, Biosensoren u.a.m.. Ein besonders wichtiger Bereich der Diagnostik ist die Tumorerkennung mit Hilfe markierter Antikörper gegen Oberflächenantigene von Tumoren sowie die Erkennung des Hepatitis B Antigens (Merten, 1990). Therapeutische Antikörper finden in der Tumorthherapie Anwendung. Zum einen können Antikörper isoliert eingesetzt werden, verbreiteter ist allerdings die Kopplung von therapeutischen Substanzen an einen Antikörper, der die Therapeutika dann gezielt an ihren Wirkort bringt. Dies können einerseits Toxine für die Chemotherapie, andererseits auch Radioisotope für die Strahlentherapie sein. Anti-Idiotyp-Antikörper finden Eingang in die Therapie von viralen und bakteriellen Infektionen. Die Abwehrreaktion des menschlichen Körpers auf nicht menschliche Antikörper (z.B. aus Mäusezellen) soll durch die Entwicklung chimärer Antikörper, modifizierten Proteinen mit humanen Strukturen, umgangen werden. Immunglobuline werden ebenfalls zur Abschwächung der körpereigenen Immunantwort auf fremdes Gewebe bei Organtransplantationen appliziert (Zusammenfassung bei James, 1990). Aufwendig zu produzierende Proteine mit hoher Wertschöpfung können durch eine Chromatographie mit auf Säulenmaterial immobilisierten Antikörpern aufgereinigt werden. Hierbei muß allerdings der Aufwand der Massenproduktion von Antikörpern in Beziehung zum wirtschaftlichen Gewinn der Proteinproduktion gesetzt werden. Trotzdem kann auf diesem Gebiet ein großer Markt für monoklonale Antikörper als Massenprodukt gesehen werden. Tabelle 2.3.1 faßt die Anwendungsbreite monoklonaler Antikörper zusammen.

Diagnostik	Therapie	Proteinaufreinigung
Blutgruppenbestimmung	Tumorthherapie	Immunoaffinitäts- chromatographie
Tumordiagnostik	spezifische Immunotherapie (isolierte Antikörper)	
Immunoassays	Chemoimmunotherapie (Antikörper/Toxin - Konjugat)	
Biosensoren	Radioimmunotherapie (Antikörper/Nuklid - Konjugat)	
Virologie	Anti-Idiotyp-Antikörper (Therapie von bakteriellen und viralen Infektionen)	
	Immunomodulation	

Tab. 2.3.1: Anwendungsbreite monoklonaler Antikörper

2.4 Reaktorkonzepte zur Kultivierung von Hybridomzellen

Die Eigenschaft von Hybridomzellen, in Suspension wachsen zu können, d.h. nicht auf eine Wachstumsfläche angewiesen zu sein, macht die gesamte Palette der Säugerzellkulturreaktoren für diese Zellen zugänglich. Im folgenden soll versucht werden, die Vielfalt der in der Literatur beschriebenen Systeme zu ordnen und ihre Tauglichkeit für die Produktion von monoklonalen Antikörpern zu bewerten.

Lange vor der Entwicklung der Hybridoma-Technologie wurden Säugerzellkulturen als Produktionssysteme für virale Vakzine verwandt. In Anlehnung an die bis dahin entwickelten Prozesse mit Mikroorganismen arbeitete man in Submerskultur. Die Produktion des Maul- und Klauenseuchevirus wurde mit Baby-Hamster-Kidney (BHK)-Zellen in großen Rührkesselverfahren im Satzbetrieb (bis 5.000 l) vorgenommen (Radlett et al. 1985). Die Interferon-Herstellung mit Namalwa-Zellen, einer humanen lymphoblastioiden Zelle, erfolgte im gleichen Verfahren im Maßstab bis 10.000 l. Hierbei wurde die Aufzucht der Stammzellen allerdings in kontinuierlicher Kultur durchgeführt (Finter et al. 1990). Aufbauend auf die positiven Erfahrungen der Vergangenheit fand die Kultivierung von Hybridomzellen zunächst ebenfalls in gerührten Systemen statt. Die Scherempfindlichkeit der Zellen und ihre Abhängigkeit von sehr guten Prozeßbedingungen (Medienkomponenten, pH, Gelöstsauerstoff) führte zu der Entwicklung von einer Reihe von Alternativenkonzepten zur traditionellen Rührkesselfermentation. In Bezug auf große Maßstäbe hat sich am ehesten der Airlift-Fermenter durchgesetzt; es wird von Hybridoma-Fermentationen im Maßstab bis zu 1000 l berichtet (Birch et al. 1985).

Im allgemeinen kann man Zellkulturfermentationssysteme in zwei Hauptgruppen unterteilen, in die offenen betriebenen Suspensionsreaktoren und die Reaktoren mit Zellrückhaltung, die sogenannten Perfusionsreaktoren. Bei ersteren handelt es sich um offene Systeme ohne Biomasserückhaltung, d.h. die erreichbare Zelldichte wird nicht durch konstruktive Maßnahmen erhöht. Die erreichbaren Durchflüsse im kontinuierlichen Betrieb werden durch die Wachstumsrate der Population determiniert (wash-out). Hierzu gehören die oben erwähnten Rührkesselfermenter sowie der Airlift-Fermenter. Beide Systeme unterscheiden sich in der Art der Durchmischung: Im Gegensatz zum gerührten System bewirken beim Airlift-Fermenter Dichtegradienten - hervorgerufen durch den Eintrag eines Gasstroms - die Umwälzung der Flüssigkeit. Perfusionsreaktoren zeichnen sich durch eine erhöhte Zelldichte im System aus: Diese wird durch verschiedene Maßnahmen zur Rückhaltung der Zellen im Reaktor erreicht. Man erhält eine Entkopplung der Verweilzeiten der Flüssigphase von der Verweilzeit der Zellen im Reaktor: Auch bei hohen Durchflußraten des Mediums durch den Fermenter kommt es nicht zum Auswaschen der Zellpopulation. Man erreicht auf diese Art und Weise verbesserte Wachstumsbedingungen für das biologische System, indem undifferenziert Nährstoffe verstärkt zugeführt und eventuell toxische Metabolite schneller abgeführt werden. Griffiths (1992) teilt Systeme mit Zellrückhaltung in drei Hauptgruppen ein: Separierende (Separation), vollständig einschließende (Immurement) und offen immobilisierte Systeme (Entrapment). Separierende Systeme trennen die Zellmasse vom Medien- und Produktstrom, wobei die Zellen im Reaktor frei suspendiert bleiben. Beim vollständigen Einschluß kommt es zu einer räumlichen Trennung von Biomasse und dem restlichen Reaktor; die Versorgung der Zellen erfolgt durch den freien Durchfluß des Mediums durch die Trenneinheit. Offen immobilisierte Systeme bieten den Zellen eine offene Matrix, auf die Biomasse aufwachsen kann, um die o.a. Entkopplung der Verweilzeiten zu erreichen. In Tabelle 2.4.1 sind die verschiedenen Formen der Perfusion zusammengefaßt.

Separation	Immurement	Entrapment
Spinfilter	Cytogenator	Glasspiralen
Filtrationssysteme	Dialysemembranen	Plattenreaktoren
Sedimentationssysteme	Hohlfasersysteme	Glaskugeln
Zentrifugation	Teflonmembranen	Keramische Matrizen (Opticell)
	Mikroenkapsulation	Aggregation
	Membranreaktoren	Schaummatrizen (z.B. Polyurethan) Makroporöse Träger (Glas, Gelatine, Collagen)

Tab. 2.4.1: Einteilung der Systeme zur Zellrückhaltung

Separation

Perfusionssysteme dieser Art unterscheiden sich von herkömmlichen Rührkesselsystemen durch die Integration einer Einheit zur Erhöhung der Biomassekonzentration. Die Biomasse bleibt in Suspension, wobei die Biomasserückhaltung im Fermenter selbst oder extern vorgenommen werden kann.

Die am häufigsten verwendeten Biomasserückhaltungssysteme sind Filtrationseinheiten und Spinfilter. Als externe Filtrationseinheiten kommen Hohlfasermodule unterschiedlicher molekularer Ausschlußgrenze (Cut-off) zum Einsatz, reaktorintegrierte Systeme finden sich beim Dialysefermenter (Comer *et al.* 1990) oder dem sogenannten Doppelmembranrührer (Lehmann 1988). Spinfilter werden im Rührkessel als rotierende Filtrationseinheiten auch im großen Maßstab (bis 40 l) eingesetzt (Feder und Tolbert 1985). Alle hier angeführten Methoden leiden unter dem Nachteil der potentiellen Verstopfung der Biomasserückhaltung mit zunehmender Prozeßdauer. Um diesem Mißstand zu begegnen, wurden Sedimentationssysteme (Griffiths 1988) sowie auf Zentrifugation beruhende Reaktoren (Jäger 1992) entwickelt

Immurement

Beim "Immurement" kommt es zum vollständigen Einschluß des biologischen Systems in eine Einheit, die den Durchfluß des Mediums gestattet. Die älteste Technologie dieser Art ist der sogenannte Cytogenator, eine U-

förmige Anordnung aus Sinterglas, die von einem Mediumreservoir umgeben ist (Graff und Mc Carty, 1957). Die Zellen sind in dem Sinterglasrohr eingeschlossen und werden vom kontinuierlich ausgetauschten äußeren Medium versorgt. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens stellen die Hohlfaserreaktoren dar (Knazek 1972, Tharakan und Chau, 1986, Altshuler *et al.* 1990). Hier werden Zellen im extrakapillaren Raum eines Moduls unterschiedlichen Cut-offs immobilisiert; die Kapillaren selbst werden vom Medium durchströmt, um die Versorgung der Zellen mit Substraten zu sichern. Bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomzellen im kleinen bis mittleren Maßstab finden Hohlfasermodule weit verbreitete Anwendung. Die auftretenden Gradienten über die Faserlänge vor allem bei erhöhten Zelldichten (bis zu 10^8 Zellen /ml sind erreichbar) macht das Scale-up solcher Reaktoren jedoch problematisch.

Der komplette Einschluß von Zellen in Aggregaten wird als Mikroverkapselung bezeichnet. Aggregate lassen sich mit Na- (Rupp 1985) oder Ca-Alginat oder mit Agarose-Gel (Nilsson 1983) bilden. Die entstehenden Aggregate schließen die Zellen vollständig ein und lassen sich daher in konventionellen Systemen kultivieren, was die Scale-up Problematik drastisch verringert. Allerdings sind die Vitalitäten solcherart geschlossener Systeme schwierig aufrechtzuerhalten. Trotzdem werden in Mikro kapseln eingeschlossene Hybridomzellen zur kommerziellen Antikörperproduktion eingesetzt (Rupp 1985).

Entrapment

Techniken dieser Art nutzen strukturierte oder kompartimentierte Oberflächen, auf denen das biologische Material immobilisiert wird. Die Versorgung der Zellen erfolgt durch einen Medienstrom über die Wachstums oberfläche; im Gegensatz zum Immurement findet kein Abschluß der Zellen von der Medienumgebung statt: Es handelt sich um offen immobilisierte Systeme.

Angelehnt an die konventionelle Zellaufzucht in Rollerflaschen ist der "Tubular Liquid Film Reactor" (Borth *et al.* 1990). Das Reaktorkonzept basiert auf der Immobilisierung in einem kompartimentierten Glasrohr, wobei sich die Zellen in einem Flüssigkeitsfilm aus Medium befinden, der kontinuierlich ausgetauscht werden kann. Keramische Wachstumsoberflächen werden im Opticell-System genutzt: Ein offenes Kartuschensystem mit einer rauen Keramikoberfläche wird von konditioniertem Medium durchströmt und erlaubt somit die kontinuierliche Kultivierung von Suspensionszellen wie auch von adhären ten Zellen (Berg 1985, Lydersen *et al.* 1985). Die von van Wezel (1967) entwickelte und für Rührkesselreaktoren geeignete Microcarriertechnik ist eine der wenigen auch kommerziell genutzten Alternativen zu den konventionellen Rührkesselreaktoren (Montagnon *et al.* 1984). Mittlerweile sind mehr als zwanzig Microcarriertypen erhältlich (Butler 1988), die allerdings aufgrund ihrer sphärischen Gestalt und ihrer unstrukturiert glatten Oberfläche mehrheitlich für adhären t wachsende Zellen ausgelegt sind.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist der Einsatz von makroporösen, sphärischen Trägermaterialien als Material zur Zellrückhaltung. Ihr Einsatzgebiet reicht in Abhängigkeit von ihrem spezifischen Gewicht von gerührten Systemen über Festbettreaktoren (Looby 1988) bis hin zu Wirbelschichtreaktoren. Im allgemeinen handelt es sich bei diesen Materialien um kugelförmige dreidimensional vernetzte Strukturen von 0,2 bis 5mm Durchmesser. Die zur Zeit kommerziell erhältlichen Trägertypen sind in Tabelle 2.4.2 zusammengefaßt .

Name	Material	Durchmesser	Porendurchmesser	- freies Volumen
Cultispher-G (Percell Biolytica)	Gelatine	170-200 μm	50 μm	50 %
		300-500 μm	50 μm	50 %
Informatrix (Biomat Corp.)	Collagen-glycosaminoglycan	500 μm	40 μm	99 %
Microsphere (Verax Corp)	Collagen (beschwert mit Edelstahl)	500-600 μm	20-40 μm	75 %
Siran (Schott)	Kalknatron- oder Borosilikatglas	200-5000 μm (verschiedene Fraktionen)	10-400 μm	60 %
Polyethylen Mikroträger (Blüml et al. 1992)	Polyethylen, mit Kationen (Ca, Mg) beladen	1500 - 2000 μm	100 - 300 μm	
Polyhipe P80 (Microporous Materials Braunston UK)	mit Divinybenzol quervernetztes Polystyrol	500 - 1000 μm	80 - 100 μm	90 %
Polyhipe CM80	Chloromethylstyrol	500 - 1000 μm	80 - 100 μm	90 %
Polyhipe DEA80	CM80 mit Dimethyl- amin derivatisiert	500 - 1000 μm	80 - 100 μm	90 %
Polyhipe S80	sulfoniertes Poly- styrol	500 - 1000 μm	80 - 100 μm	90 %

Tab. 2.4.2: Kommerziell erhältliche offenporige Mikroträger

Cultispher Mikroträger werden in zwei unterschiedlichen Chargen angeboten: Eine kleinere Fraktion mit spezifischem Gewicht von 1,04 g/ml zum Einsatz in Rührkesselsystemen und eine größere, beschwerte Version von 1,4 g/ml zum Einsatz in Fließbettssystemen. Die relativ leichten Mikroträger von

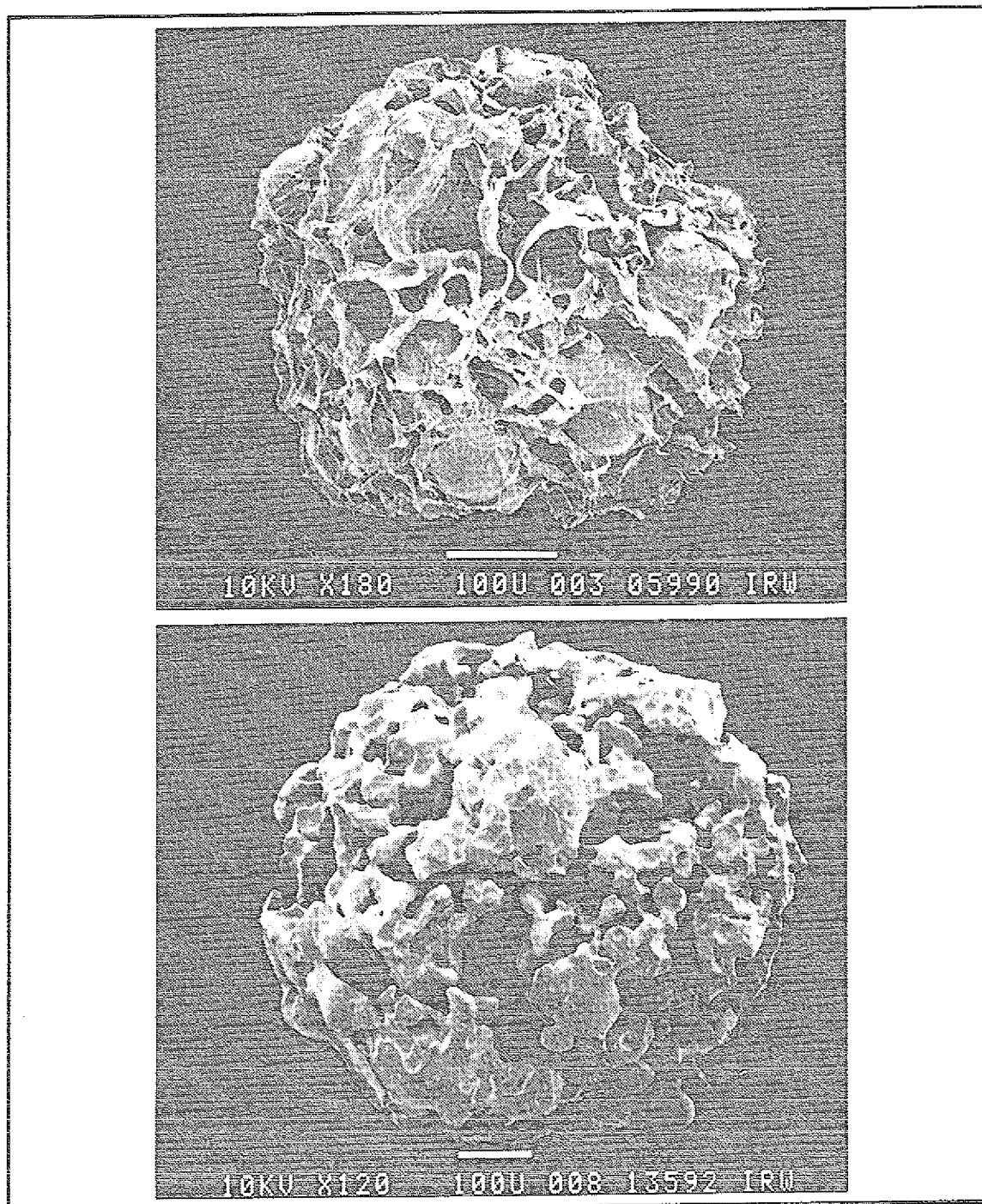


Abb. 2.4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Collagen- und Sinterglas-Mikroträgern. Bei den im oberen Bild zu erkennenden Kugeln handelt es sich um Edelstahlmaterial, das zur Beschwerung der Träger eingebracht wird.

Informatrix sind in hohem Maße porös und eignen sich daher eher für den Einsatz in gerührten Reaktoren. Ähnliches läßt sich über die Polyhipe-Carrier sagen, die sich durch eine besondere Vielfalt an unterschiedlichen Oberflächenderivatisierungen auszeichnen. Lee *et al.* (1992) unterzogen diese Mikroträger einer vergleichenden Untersuchung an BHK-Zellen. Die von Blüml *et al.* (1992) vorgestellten Polyethylen-

Träger eignen sich für den Einsatz in Fließbettssystemen, wobei sie im Hinblick auf ein kommerziell erhältliches System entwickelt wurden (Reiter *et al.* 1991).

Eng gekoppelt mit ebenfalls kommerziell erhältlichen Wirbelschichtreaktoren sind die sogenannten VERAX-Microspheres (Runstadler *et al.* 1988). Es handelt sich hierbei um vernetztes Collagen-Material, das mit Kugeln aus Edelstahl beschwert ist, um die Fluidisierungseigenschaften günstig zu beeinflussen. Die o.a. kommerziellen Systeme erreichen Produktionsmaßstab; das Verax System 2000 hat ein Fließbettvolumen von 24 l bei einem Reaktorvolumen von 60 l (Runstadler *et al.* 1988).

Die Sinterglastechnik bietet die Möglichkeit, verschiedene Porengrößen bei unterschiedlichen Kugeldurchmessern einzustellen. Somit kann die Wahl des Carriers individuell auf die verwendete Zelllinie und das entsprechende Reaktorkonzept abgestimmt werden. Ein Nachteil des Glasmaterials ist die gewissermaßen "unbiologische Oberfläche". Die erreichbaren Zelldichten im "nackten" Glasträgermaterial liegen daher deutlich unter den Gelatine- oder Collagenträgern. Dies liegt in der Tatsache begründet, daß der Prozeß des Aufwachsens von Zellen auf eine Oberfläche von Signalstoffen eingeleitet wird, die dort per se nicht vorhanden sind. Eine entscheidende Rolle in dieser Signalkaskade kommt dem Fibronectin zu, einem Protein, das Bestandteil des Serums ist. Collagen sowie Gelatine sind in der Lage, Fibronectin aus dem Serum zu binden, und somit nach Waschen der Carrier mit Serum enthaltendem Medium das Aufwachsen der Zellen auf diese Materialien zu erleichtern. Lüllau *et al.* (1992) nutzten die gezielte Modifikation von Glasoberflächen mit Skleroproteinen, z.B. Gelatine, um ein verbessertes Wachstum von Säugerzellen auf Glasträgern zu erhalten und erreichten mit Collagenträgern vergleichbare Zelldichten.

Die Technik der Immobilisierung von Säugerzellen auf makroporösen Matrizen hat in letzter Zeit einen erheblichen Aufschwung genommen. Hierzu hat vor allem die Einführung der Wirbelschichttechnik in die Säugerzellkultur beigetragen. Hierbei werden Mikroträger in einem Reaktionsrohr von unten angeströmt und verwirbelt, es entsteht aufgrund des Gleichgewichts zwischen Anströmung und Sedimentation der Träger ein homogenes Fließbett (vgl. Abb. E1 und 4.3.3). Die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und der Abtransport von Inhibitoren aus den porösen Strukturen ist in diesen Systemen kaum diffusionslimitiert. Somit sind Wirbelschichtreaktoren im Gegensatz zu geschlossenen Konzepten, wie z.B. Hohlfaserreaktoren, besonders gut für eine Maßstabsvergrößerung geeignet. Die Probleme bei der Begasung großer Wirbelschichtreaktoren sind durch neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der blasenfreien Begasung gelöst worden (Hambach *et al.* 1992), so daß einem Einsatz dieser Systeme zur Produktion komplexer Proteine mit Säugerzellen im großen Maßstab nichts mehr im Wege stehen sollte.

Exkurs: Produktion von monoklonalen Antikörpern mit immobilisierten Hybridomzellen im Pilotmaßstab

Die erfolgreiche Umsetzung des Konzepts des "cell entrapment" in offenporigen Mikroträgern in einen produktionsrelevanten Maßstab soll an einem Beispiel verdeutlicht werden. Am Institut für Biotechnologie stand ein kommerziell erhältlicher Wirbelschichtreaktor der Fa. Verax, Lebanon NH USA zur Verfügung (VERAX SYSTEM-200). Im Rahmen eines gemeinsamen Projekts sollte die Tauglichkeit dieses Systems für die Antikörperproduktion gezeigt werden.

Beschreibung des Reaktorsystems

Die Grundidee des Systems beruht auf der Immobilisierung der Hybridomazellen in einem offenporigen Träger aus quervernetzten Collagenfasern (Verax Microsphere, s. Kap. 2.4) und dessen Einsatz in einem Wirbelschichtreaktor. Der Reaktor besteht aus einem Reaktionsrohr, das in einen Umlauf eingesetzt wird. Im Umlauf befindet sich eine scherstreßarm operierende Doppelmembranpumpe, Meßeinheiten für pH, Gelöstsauerstoff und Durchflußgeschwindigkeit sowie eine Einheit zur blasenfreien Begasung. Hierbei wird das Medium durch einen verstärkten Silikonschlauch geführt, der sich in einem Begasungsgefäß befindet. Der Gaseintrag erfolgt im Begasungsgefäß durch den diffusiven Übergang aus der Gasphase über die Membran- in die Flüssigphase. Die Fluidisierung der Mikroträger erfolgt durch die Anströmung des Reaktionsrohres mit einer Umlaufgeschwindigkeit von ca. zwei Reaktorvolumina pro Minute. Das Volumen des Reaktionsrohres und somit das maximale Wirbelschichtvolumen beträgt 1,5 l, das Gesamtreaktorvolumen 4,5 l. Das System wird kontinuierlich betrieben, Medium wird mit einer Membranpumpe zudosiert, der Produktablauf erfolgt am oberen Ende des Reaktorrohres. Die pH-Regelung sowie die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium erfolgen über Software-Regler der Steuereinheit. Die Laugedosierung wird mit NaOH, die Säurekorrektur mit CO₂ über die Gasphase vorgenommen. Abb E1 zeigt schematisch den Reaktoraufbau, Abb. E2 eine photographische Aufnahme.

Die hier verwendeten Verax Microspheres^R sind zum Erreichen günstiger Fluidisierungseigenschaften mit Edelstahlkugeln beschwert (spez. Gewicht 1,7 g/l). Die Teilchengröße beträgt 500 µm, das besiedelbare Porenvolumen wird vom Hersteller mit 75 % angegeben. Wie in Kapitel 2.4 erwähnt muß das Collagen-Material mit Serum vorbehandelt werden, um das im Serum enthaltene Fibronectin zu binden und somit das Aufwachsen der Zellen auf den Träger zu ermöglichen.

Zelllinie und Medium

Bei der in diesem Experiment verwendeten Zelllinie handelte es sich um eine Maus-Maus-Hybridomalinie; der sezernierte Antikörper war von der Subklasse IgG_{2A}. Das zur Zellaufzucht sowie im Laufe der Fermentation benutzte Medium bestand aus einer 3:1 Mischung von DMEM und Ham's F-12 Pulvermedium und diversen

Zusätzen. Tabelle E1 zeigt die Medienzusammensetzung (Endkonzentrationen pro l Medium). Die genaue Zusammensetzung der kommerziell erhältlichen Pulvermedien DMEM und F-12 findet sich in Tabelle 4.1.1.

DMEM	9,2 g/l
HAM's F-12	2,61 g/l
HEPES, Na-Salz	20 mM
Insulin	2 mg/l
Transferrin	0,5 mg/l
NaHCO ₃	2,4 g/l
BSA	1 g/l
NaSe ₂ O ₃	10 ⁻⁶ mM
Ethanolamin	0,1 mM
Fettsäuren	0,61 mg/l
(Linolensäure	
(Thioctic Acid)	
Cholinchlorid	20 mg/l
Vitamin A Acetat	5,5 µg/l
Glutamin	255 mg/l
Asparagin	15 mg/l
Ascorbinsäure	25 mg/l

Endkonzentration Glukose 20 mM, Glutamin 4,5 mM

Tab. E1: Zusammensetzung des Fermentationsmediums

Fermentationsverlauf:

Bei der kontinuierlichen Kultivierung von Säugerzellen in makroporösen Trägern müssen zwei Fermentationsphasen unterschieden werden. Die erste Phase beinhaltet das Aufwachsen der Zellen auf das Trägermaterial bis zum Erreichen eines vollständigen Bewuchses, danach setzt die Produktionsphase ein, in der die zur maximalen Produktion notwendigen Bedingungen bei maximaler Zelldichte eingestellt werden. In der Aufwuchsphase wird eine nutritistische Fahrweise vorgenommen, d.h. die Konzentration eines

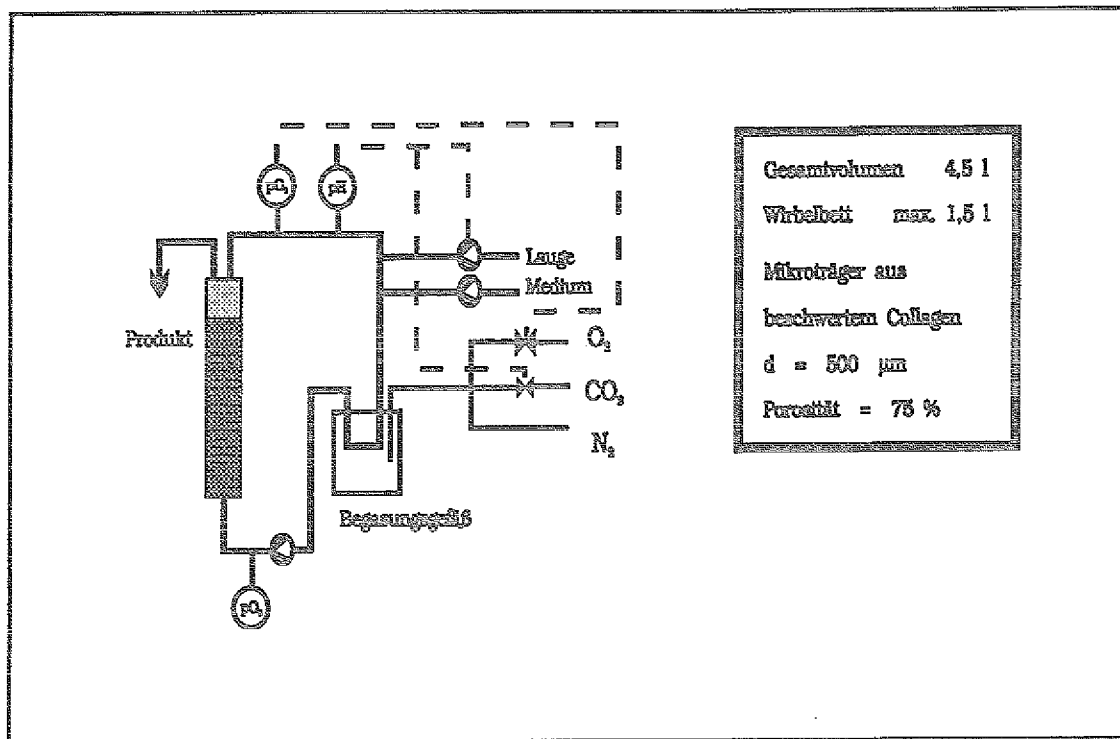


Abb. E1: Schematischer Aufbau des Fermentationssystems

Leitsubstrates im Medium wird durch Anpassen der Verweilzeit an das Zellwachstum konstant gehalten. Als Leitsubstrat bei diesem Experiment wurde Glukose gewählt, die konstant zu haltende Konzentration betrug 8 mmol/l. Abb. E3 zeigt die Konzentrations-Zeit-Verläufe der wichtigsten Substrate und Metabolite. Man erkennt eine lag-Phase von drei Tagen, in der die Fermentation im Satzbetrieb geführt wurde, bis die Glukosekonzentration auf 10 mmol/l abgesunken war. Danach begann die sukzessive Anpassung der Verweilzeit an den durch die Steigerung der Zelldichte im Träger steigenden Glukoseverbrauch. Ab Tag 20 war ein stationärer Betriebszustand erreicht worden, wie an der konstanten Glukoseverbrauchsrate zu erkennen ist. Die Bildung von Laktat folgte der Glukoseaufnahme.

Glutamin stellt ein weiteres wichtiges Substrat bei der Säugerzellfermentation dar: Beim Einhalten konstanter Prozeßbedingungen sollte die Glutaminverbrauchsrate analog zur Glukoseaufnahme ebenfalls konstant bleiben. Man erkennt in Abb. E4 eine abnehmende Glutaminverbrauchsrate von Tag 30 an. Analog dazu nimmt die Bildung von Ammonium, einem Produkt des Glutaminstoffwechsels ab. Eine Erklärung hierfür findet sich wie folgt: Ab Tag 28 war eine Belegung der Sauerstoffsonden mit Zellmaterial erfolgt, so daß keine Kontrolle mehr über den Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase bestand. Die Regelung des Sauerstoffeintrags war somit nicht mehr möglich.

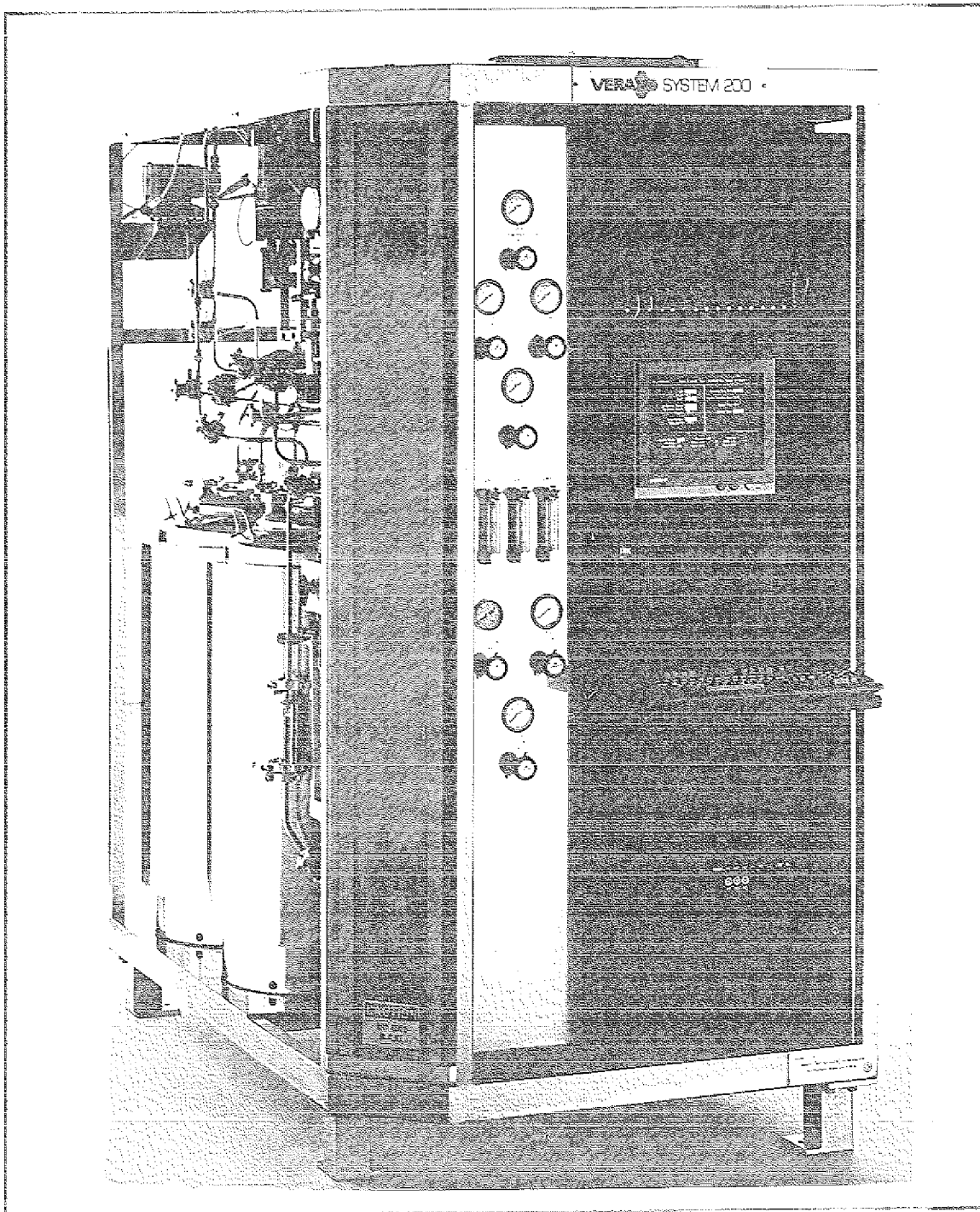


Abb. E.2: Photographische Aufnahme des Fermentationssystems

Die abnehmende Glutaminaufnahme zeigt ein Versagen der Regelung des Sauerstoffeintrags: Sauerstoff stellt den terminalen Elektronakzeptor des oxidativen Glutaminabbaus dar (s. Kapitel 3 und 7). Sinkt der pO_2 ab, so reduziert die Zelle ihren Glutaminstoffwechsel. Da Glutamin die Hauptenergiequelle für Säugerzellen darstellt, verschlechtert sich die energetische Versorgung der Zelle. Dies äußert sich in einer verringerten Produktsynthese; die Bildungsrate der monoklonalen Antikörper sinkt, wie in Abb. E4 ab Tag 25 zu erkennen ist. Die konstante Glukosekonzentration spiegelt den stationären Zustand nur vor; die konstante Glukoseaufnahme bei reduziertem Glutaminmetabolismus erklärt sich durch die Rolle von Glukose als Lieferant von

Maintenance-Energie: Der glykolytische Abbau von Glukose bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck liefert die zum Erhaltungsstoffwechsel notwendigen Energieäquivalente.

Die Ergebnisse der Testfermentation können folgendermaßen zusammengefaßt werden: Die Besiedlung der Collagenträger konnte erreicht werden, ein stationärer Betriebszustand wurde bis zum Versagen der Sauerstoffmessung eingehalten. Die Antikörperproduktion im stationären Zustand betrug 38 mg/(l*d). Berücksichtigt man, daß die hier kultivierte Zelllinie zu den sogenannten "low-producern" gehört, deren spezifische Produktivität um den Faktor zwanzig geringer als in der Literatur beschriebene Zelllinien ist (Katinger 1987), so erkennt man die hervorragende Eignung dieses Reaktorkonzepts zur kontinuierlichen Antikörperproduktion. Raum-Zeit-Ausbeuten in einer Größenordnung von bis zu 250 mg/(l*d) sind leicht vorstellbar. Dies bedeutet für das hier verwendete System eine Reaktorproduktivität von mehr als einem Gramm pro Tag.

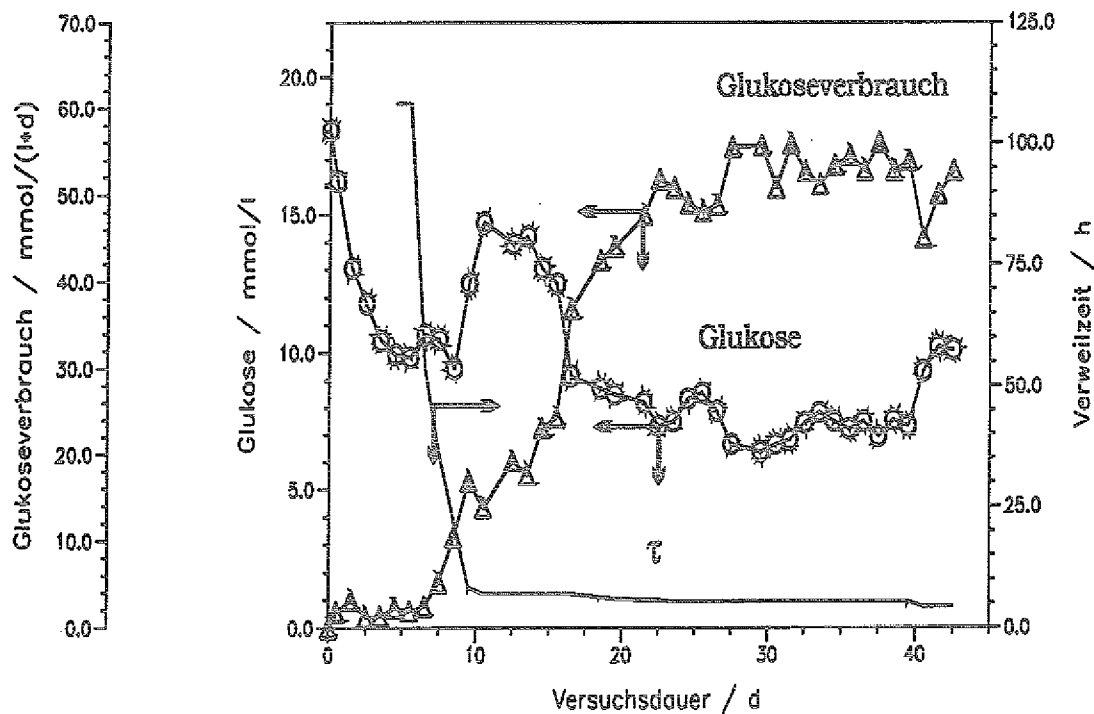


Abb. E3: Verlauf der Testfermentation: Glukose und Glukoseverbrauch

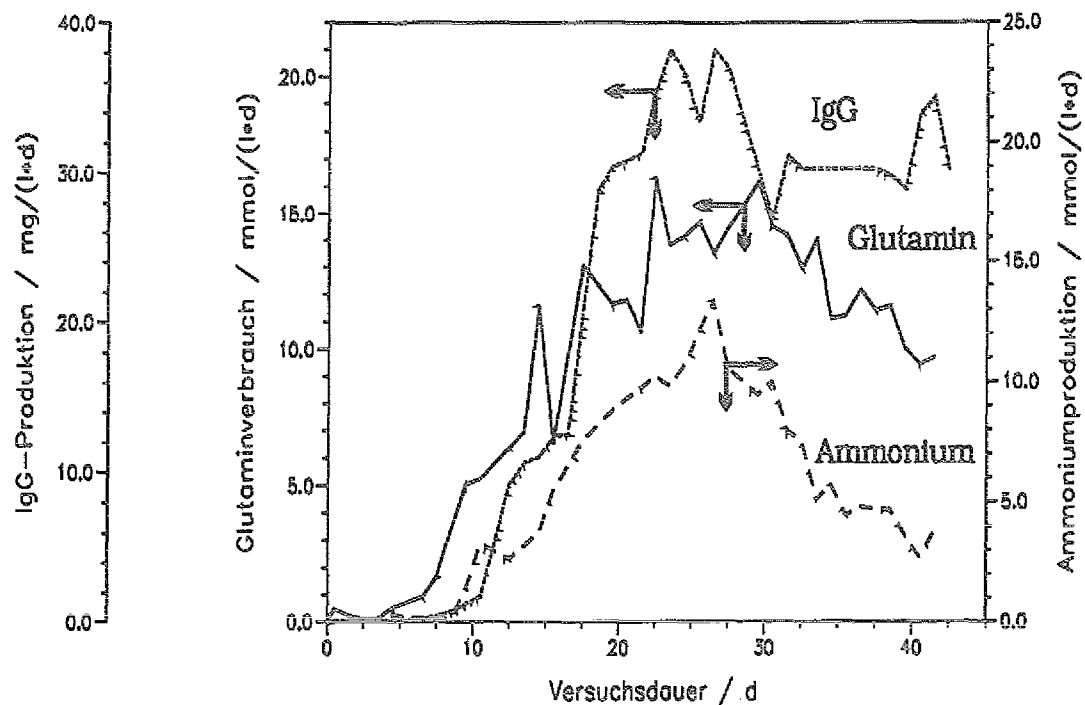


Abb. E4: Verlauf der Testfermentation: Glutamin, Ammonium und IgG

Eine wichtige Erkenntnis aus diesem Experiment für die weitere Arbeit war, daß das Leitsubstrat für die kontinuierliche Führung einer immobilisierten Kultur, bei der kein direkter Zugang zur Zellmasse besteht, sorgfältig ausgewählt werden muß. Zur Entwicklung einer konsequenten Fermentationsstrategie gehört die intensive Beschäftigung mit dem Stoffwechsel der Hybridomazellen sowie die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Reaktorproduktivität und Kultivierungsbedingungen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen solche Untersuchungen gezeigt und eine optimierte Fermentationsstrategie formuliert werden.

3. Grundlagen des Stoffwechsels von Hybridomazellen

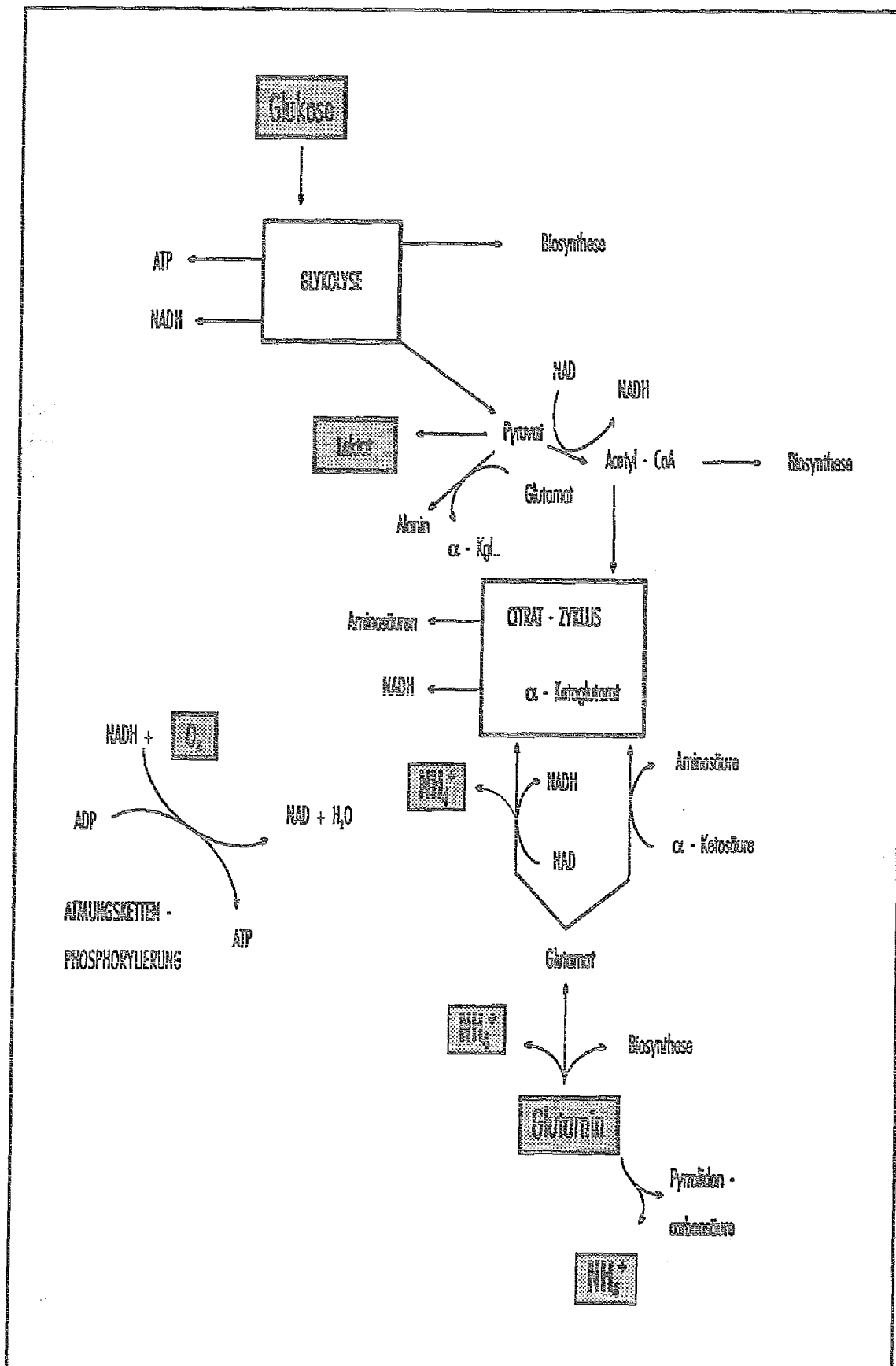
Die genauere Analyse der Medienanforderungen von Säugerzellen geht auf die Arbeiten von Eagle (1955) zurück. Hier wurden erstmals die bis dahin in der Säugerzellkultur verwendeten undefinierten biologischen Medien ersetzt, die unbekannte Wachstumselemente enthielten. Seither sind eine Reihe von komplexen Medien zur Aufzucht von Säugerzellen entwickelt worden, eine genaue Analyse der Rolle der einzelnen Medienkomponenten im Säugerzellstoffwechsel wurde allerdings erst sehr viel später versucht. Bis heute gilt der Metabolismus dieser Zellen als ungemein komplex und viele Prozesse werden als "black box" geführt: Die Zellen werden mit einem Standardmedium versorgt, das alle vermeintlich notwendigen Bestandteile in mittleren Konzentrationen führt. Die Zugabe von dialysiertem tierischem Serum liefert die auch heute noch zum Teil unbekannten spezifischen Wachstumsfaktoren und schützt die Zellen vor mechanischen Beanspruchungen.

Newland (1990) teilt die Medienbestandteile für Hybridomazellen in Energiesubstrate (Glukose, Glutamin), essentielle Substrate (Aminosäuren), Wachstumsfaktoren (Hormone) und potentiell inhibitorische Metabolite (Ammonium, Laktat) ein. Zusätzlich sind hierbei Sauerstoff als Substrat bei der Energieproduktion sowie Lipide bzw. Lipidvorläufer zu betrachten, denen eine vielseitige Rolle zukommt. Die Komplexität des Metabolismus verbietet dem Bioverfahrenstechniker eine explizite Analyse. Es sollte allerdings möglich sein, einige Schlüsselkomponenten gezielt auf ihre Rolle bezüglich Wachstum und Antikörperbildung zu untersuchen. Abbildung 3.1.1 zeigt den Hybridomastoffwechsel stark schematisiert und zum besseren Verständnis auch vereinfacht dargestellt. Die für die Prozeßführung wichtigen Substrate und Produkte sind grau unterlegt. Die Bildung der monoklonalen Antikörper ist nicht integriert; sie erfolgt nach einem später darzustellenden Mechanismus. Im folgenden sollen nun die wichtigsten Bestandteile des Säugerzellstoffwechsels anhand des Schemas von Newland kurz beschrieben und in ihrer Bedeutung für die Führung eines Prozesses betrachtet werden.

3.1 Substrate des Energiestoffwechsels

Glukose

Die traditionellen Medienformulierungen wie z.B. RPMI, DMEM oder HAM's weisen im Vergleich zur im Blut vorhandenen Konzentration ($\approx 5,6$ mM) recht hohe Mengen an Glukose auf. Man findet üblicherweise zwischen 5,5 und 25 mM Glukose. Dies ist auf einen "historischen" Irrtum zurückzuführen, nach dem man den gesamten Energiestoffwechsel von Säugerzellen auf den Abbau von Glukose zu Laktat zurückführte. Ein sehr hoher spezifischer Glukoseverbrauch und eine



damit einhergehende Laktatbildung, wie sie bei Tumorzellen gefunden wird, führten zu dieser Annahme (Fiechter und Gmünder 1989). Säugerzellen zeigen eine starke Abhängigkeit der Glukoseaufnahme von der Glukosekonzentration; steigende Konzentrationen führen zu einem verstärkten Verbrauch (Zielke *et al.* 1978, Renner *et al.* 1972, Miller *et al.* 1989). Die aufgenommene Glukose wird allerdings nur zu einem geringen Teil aerob über den Citrat-Zyklus verstoffwechselt: Abgesehen von geringen Mengen, die zum Nukleotid-Aufbau dienen, wird der überwiegende Teil der Glukose zu Laktat abgebaut. Man findet Verhältnisse von Laktatbildung zu Glukoseaufnahme von 1,5 und mehr, wobei unter sauerstoffarmen Bedingungen auch das theoretische Maximum von 2 erreicht wird. Die Arbeiten von Renner zeigen eine Aufnahme der Glukose durch erleichterte Diffusion vor allem im Falle hoher Medienkonzentrationen; der Abbau zu Laktat soll dazu dienen, überschüssiges Glukose-6-Phosphat loszuwerden. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß der anaerobe Glukoseabbau nur 2/36 der Energieäquivalente in Form von ATP liefert, die der oxidative Abbau via TCA bereitstellen kann, also zum energetischen Zustand der Zelle deutlich ineffektiver beiträgt. Newland (1990) diskutiert eine Anpassung des Energiestoffwechsels von Säugerzellen an ihre Biosyntheserate, was im Falle von überschüssig aufgenommener Glukose zum oben erwähnten ineffizienten Abbau zu Laktat führt. Der Ersatz von Glukose durch andere Zucker bestätigt diese Annahmen: Fruktose wird langsamer aufgenommen und mehrheitlich über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut, wobei die Laktat-Exkretion stark vermindert wird (Reitzer *et al.* 1979).

Allgemein läßt sich sagen, daß Glukose nicht den einzigen Energielieferanten für Säugerzellen darstellt, unter "normalen" Wachstumsbedingungen dient Glutamin als Hauptenergiequelle. Die limitierende Funktion der Glukose liegt offensichtlich weniger in ihrer katabolischen als in ihrer anabolischen Funktion als Precursor für Nukleinsäuren (Zielke *et al.* 1976).

Die Beschreibung des Einflusses der Glukosekonzentration auf die Kinetik des Hybridomawachstums erfolgt üblicherweise nach Monod (Miller 1989, Batt und Kompala 1989, Bree *et al.* 1988, Glacken *et al.* 1988, de Tremblay *et al.* 1992). Die K_S -Werte werden hierbei zwischen 0,15 mM und 1 mM angegeben.

Glutamin

Glutamin gilt als der Hauptenergielieferant für Säugerzellen (Donnelly und Scheffler 1976, Zielke *et al.* 1976, Reitzer *et al.* 1979, Jenkins *et al.* 1992). Der Abbau des Glutamins erfolgt mehrheitlich oxidativ über die sogenannte Glutaminolyse (s. Tab. 3.1.1). Hierbei wird zunächst eine Desamidierung mit Hilfe des Enzyms Glutaminase zu Glutamat vorgenommen. Der Eintritt in den TCA erfolgt via α - Ketoglutarat, das entweder mit Hilfe der Glutamat-Dehydrogenase unter oxidativer Desaminierung oder durch zwei Transaminierungsreaktionen (Alanin-Aminotransferase oder Aspartat-Aminotransferase) entstehen kann.

Der weitere Verlauf des Glutamin-Abbaus erfolgt vollständig zu CO_2 , es wird allerdings auch eine oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat diskutiert; auf diese Art und Weise wird ein Teil des Glutamins zu Laktat verstoffwechselt (Reitzer *et al.* 1979).

Ein wichtiger Faktor bei der Betrachtung des Glutaminstoffwechsels ist die Tatsache, daß Glutamin nach einem zyklischen Mechanismus auch chemisch in einer Reaktion erster Ordnung zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammonium abgebaut wird. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion hängt von der Zusammensetzung des Mediums ab, man kann der Literatur Werte zwischen 0,002 und 0,0048 h^{-1} entnehmen.

Die chemische Instabilität des Glutamins legte schon früh den Versuch nahe, Ersatzstoffe für Glutamin zu finden. Nagle und Brown (1971) setzten Glutamat anstelle von Glutamin ein und erreichten mit drei verschiedenen Zelllinien erhöhte Zelldichten im Vergleich zum Glutamin enthaltenden Medium. Hassel *et al.* (1987) ersetzten ebenfalls Glutamin durch Glutamat und fanden leicht erhöhte Zelldichten in Mikroträger-Kulturen von Mc. Coy-Zellen. Parallel dazu traten deutlich geringere Ammoniumkonzentrationen als mit glutaminhaltigem Medium auf.

Der Einsatz von Ketoglutarat anstelle von Glutamin erbrachte eine drastische Reduktion der Zelldichte, was von Eagle (1957) durch die mangelnde Fähigkeit von Säugerzellen, Ammoniumstickstoff für Biosynthesen zu verwenden, erklärt wird. Offensichtlich sind Säugerzellen auf die N-Übertragung durch Transaminierungen angewiesen.

Ein Problem beim Ersatz von Glutamin durch Glutamat kann die Aufnahme des Glutamats in die Mitochondrien sein. Es existiert ein spezielles Glutamin-Transporterprotein für den Transport über die innere Mitochondrienmembran (Flickinger *et al.* 1992), für Glutamat wird ein solches Protein nicht erwähnt. Dies führt möglicherweise zu einem verlangsamten Glutamat-Abbau im Vergleich zu Glutamin. Flickinger *et al.* stimulierten die Produktion von monoklonalen Antikörpern durch stationäre Hybridomazellen, indem sie zu Beginn der stationären Phase zusätzliche Energiequellen zufütterten (s. auch Kap. 3.3). Die Stärke der Stimulation wurde durch die Natur der Energiequelle bestimmt; so regte die Zugabe von leicht durch die innere Mitochondrienmembran transportierbaren Substanzen wie Glutamin oder Malat die Produktion stärker an als z.B. Glutamat, wodurch die o.a. Argumentation unterstützt wird.

Zusätzlich spielt Glutamin eine wichtige Rolle als Stickstoffdonor bei anabolischen Reaktionen, z.B. als Überträger von Amido-Gruppen. Üblicherweise wird Glutamin hierzu unter ATP-Verbrauch aus Glutamat und Ammonium mit Hilfe des Enzyms Glutamin-Synthetase gebildet. Vielen Hybridomazellen fehlt aber dieses Enzym, d.h. diese Zelllinien sind in ihren biosynthetischen Aktivitäten eingeschränkt, wenn ihnen kein Glutamin als N-Donor zur Verfügung gestellt wird. Der erfolgreiche Ersatz von Glutamin durch Glutamat ist also eng an die Aktivität der Glutamin-Synthetase geknüpft. Bell *et al.* (1992) zeigten, daß zum einen ihre Hybridomazellen ein Minimum an Glutamin im Medium brauchten (0,5 mM), daß andererseits die Transformation mit Hilfe eines Glutamin-Synthetase-Gens die Kultivierung mit Glutamat als Substrat ermöglichte.

a	Glutamin	----->	Glutamat + NH ₄ ⁺
		(Glutaminase)	
b	Glutamat + NAD	----->	α-Ketoglutarat + NH ₄ ⁺ + NADH
		(Glutamat-dehydrogenase)	
c	Glutamat + Pyruvat	----->	α-Ketoglutarat + Alanin
		(Alanin-aminotransferase)	
d	Glutamat + Oxalacetat	----->	α-Ketoglutarat + Aspartat
		(Aspartat-aminotransferase)	

Tab. 3.1.1: Des- und Transaminierungen der Glutaminolyse

Die modellmäßige Beschreibung der Abhängigkeit des Hybridomawachstums von der Glutaminkonzentration erfolgt ebenfalls nach Monod; es werden K_s -Werte in der Größenordnung von 0,15 bis 0,8 mM erwähnt. Die Glutaminaufnahme wird als Funktion der Glutaminkonzentration angegeben, höhere Glutaminkonzentrationen im Zulauf einer kontinuierlichen Fermentation von Hybridomazellen resultierten in einem gesteigerten Glutaminverbrauch pro Zelle (Miller *et al.* 1989, Glacken *et al.* 1986).

Die wichtige Rolle des Glutamins beim Energiestoffwechsel von Hybridomazellen kann man an seinem Einfluß auf die Produktion von monoklonalen Antikörpern ansehen. Dalili *et al.* (1990) beschreiben die Anwesenheit von Glutamin als notwendige Bedingung für die Bildung von Antikörpern. Flickinger *et al.* (1992) konnten zeigen, daß die Zugabe von Glutamin zu langsam wachsenden Kulturen von Hybridomazellen die Antikörpersynthese steigern konnte. Sie wiesen dies einer Stimulation von posttranskriptionalen Schritten bei der Antikörperproduktion zu. Biblia und Flickinger (1991) bezeichnen diese energieintensiven Schritte (Prozessieren der m-RNA in den Ribosomen, Zusammenbau der prozessierten H- und L-Ketten im endoplasmatischen Retikulum, interorganeller Transport der zusammengesetzten H und L-Ketten, Abtransport der Antikörper in Vesikeln) als limitierende Schritte der Antikörperbildung, die bei Verfügbarkeit von zusätzlicher Energie durch Glutaminzugabe angeregt werden.

Reziproke Regulation von Glukose- und Glutaminaufnahme

Sowohl Zielke (1978) als auch Donelly und Scheffler (1976), die sich mit der Rolle der beiden Hauptenergie-substrate Glukose und Glutamin für diploide Menschen- bzw. Hamster-Fibroblastenzellen beschäftigten, stellten eine gegenseitige Beeinflussung der jeweiligen Verbrauchsrate der beiden Substrate fest. In beiden Fällen wurde eine erhöhte Glutaminaufnahme im Falle sehr niedriger Glukosekonzentrationen gefunden. Sumbilla *et al.* (1981) beschreiben für o.a. Fibroblasten eine gemischte Inhibierung der Glutaminaufnahme durch Glukose und liefern für Glukose einen K_i -Wert der Glutamin-Oxidation von 0,095 mM bei einem K_s der Glutamin-Oxidation von 0,38 mM. Die oxidative Verwertung von Glukose via TCA, die wie oben erwähnt ohnehin nur zu einem geringen Teil stattfindet, wird durch Glutamin ebenfalls inhibiert (Zielke *et al.* 1978). Ein ähnliches Verhalten deutet sich nach den Ergebnissen von Miller *et al.* (1989) auch für Hybridomazellen an. Newland *et al.* (1990) beschreiben die Biosyntheserate und nicht die Energieproduktion als limitierend beim Wachstum von Säugerzellen, wobei die Bereitstellung von Energieäquivalenten in Form von ATP an die Syntheserate angepaßt wird. Dies erfolgt durch die Regulation der Substrataufnahme von Glukose und Glutamin.

Anhand von Abb. 3.1.2 soll nun ein möglicher Regulationsmechanismus diskutiert werden. Ausgangspunkt zu Überlegungen über die Regulation von Glukose- und Glutaminmetabolismus muß die Tatsache sein, daß Glukose von Hybridomazellen im Überschuß aufgenommen wird, wobei die Glukose mehrheitlich (ca. 75 %) zu Laktat abgebaut wird. Auf diesem Wege gewinnt die Zelle zwei mol ATP pro mol Glukose, d.h. die Energieladung der Zelle (das Verhältnis von ATP zu der Summe der Adenin-Nukleotide) ist auf diese Art und Weise sehr hoch. Es gibt nun vier besonders wichtige Punkte im TCA, die durch eine erhöhte ATP-Konzentration in ihrer Aktivität reguliert werden: Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (1), die Citrat-Synthetase (2), die Isocitrat-dehydrogenase (3) und die α -Ketoglutarat-dehydrogenase (4). Eine hohe Energieladung inhibiert alle vier Schlüsselenzyme, wobei im Falle des Pyruvat-dehydrogenase-Komplexes die Bildung von C_2 -Einheiten in Form von Acetyl-CoA zum Einbau in den TCA behindert wird. Zusätzlich wird

durch die verringerte Aktivität der Citrat-synthetase(2) der Abfluß von Oxalacetat zu Citrat gestört. Die Inhibierung der beiden Dehydrogenasen im TCA durch die hohe Energieladung wirkt sich ebenfalls verlangsamernd auf den Turnover des TCA aus. Die Inhibierung der α -Ketoglutarat-dehydrogenase läßt sich durch α -Ketoglutarat aufheben, d.h. der Abbau von Glutamin über Glutamat zu α -Ketoglutarat "aktiviert" den TCA. Das bei der Decarboxylierung von α -Ketoglutarat entstehende Succinyl-CoA hemmt wiederum die Citrat-synthetase, sodaß der Fluß von Glutaminabbauprodukten im TCA bei Oxalacetat ins Stocken gerät. Um ein "Überlaufen" der Metabolitpools zu verhindern, wird Oxalacetat über Malat zu Pyruvat umgesetzt, das wiederum zu Laktat abgebaut wird. Auf diesem Wege werden bis zu 13 % des Glutamins zu Laktat metabolisiert (Reitzer *et al.* 1979). Durch die Verzögerung des Flusses im TCA bei der Citrat-synthetase und die gleichzeitige "Reaktivierung" durch α -Ketoglutarat kommt es zu einem teilweisen Durchlaufen des TCA durch Glutamin und seine Abbauprodukte. Auf diese Art und Weise gewinnt die Zelle 50 % ihres Energiebedarfs, beim Einsatz von alternativen C-Quellen (Fruktose, Galaktose) kann sogar bis zu 90 % des Energiestoffwechsels auf diesem Weg ablaufen. Abb. 3.1.3 zeigt noch einmal vereinfacht den Fluß der Substrate Glukose und Glutamin.

Mit diesen Modellvorstellungen lassen sich nun einige Phänomene des Hybridomastoffwechsels erklären:

Eine erhöhte Glukosekonzentration führt zum Beispiel zu einer Verringerung der oxidativen Verwertung von Glukose (Sumbilla *et al.* 1981). Die unkontrollierte Aufnahme von Glukose erfolgt mittels erleichterter Diffusion, deren treibende Kraft ein Glukosegradient ist. Die vermehrt aufgenommene Glukose wird anaerob zu Laktat abgebaut und das somit entstehende ATP inhibiert den Pyruvat-dehydrogenase-Komplex und behindert somit den oxidativen Abbau von Glukose via TCA.

Eine Zugabe von Glukose behindert ebenfalls die Glutamin-oxidation. Die gesteigerte glykolytische ATP-Bildung durch die deregulierte Aufnahme der Glukose inhibiert die Citrat-Synthetase, d.h. die Totaloxidation des Glutamins zu CO_2 stockt an der Stelle des Oxalacetats und das Glutamin kann nur unvollständig zu Laktat abgebaut werden.

Die bis zu 90 % ige Energiegewinnung aus dem Glutaminmetabolismus bei Verwendung alternativer C-Quellen wie z.B. Galaktose oder Fruktose läßt sich durch deren deutlich langsamere Aufnahme durch Hybridomazellen erklären: Es findet nach Umwandlung zu Glukose-6-Phosphat eine verlangsamte Glykolyse statt, wodurch die TCA-Schlüsselenzyme nicht so stark inhibiert werden, d.h. der Totaloxidation des Glutamins im TCA steht nichts im Wege.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die reziproke Regulation von Glukose- und Glutaminstoffwechsel mit Sicherheit deutlich komplexer ist, als es hier vereinfacht dargestellt wurde. Es sei daran erinnert, daß der TCA nicht alleine zur Energiegewinnung benötigt wird, sondern daß die TCA-Intermediate unerläßliche Biosynthesestufen darstellen, sodaß eine rein energetische Analyse der metabolischen Verläufe unvollständig sein muß. Nichtsdestoweniger können mit den einfachen Annahmen dieses Kapitels einige Zusammenhänge, die in den folgenden experimentellen Kapiteln auftreten anschaulich erklärt werden.

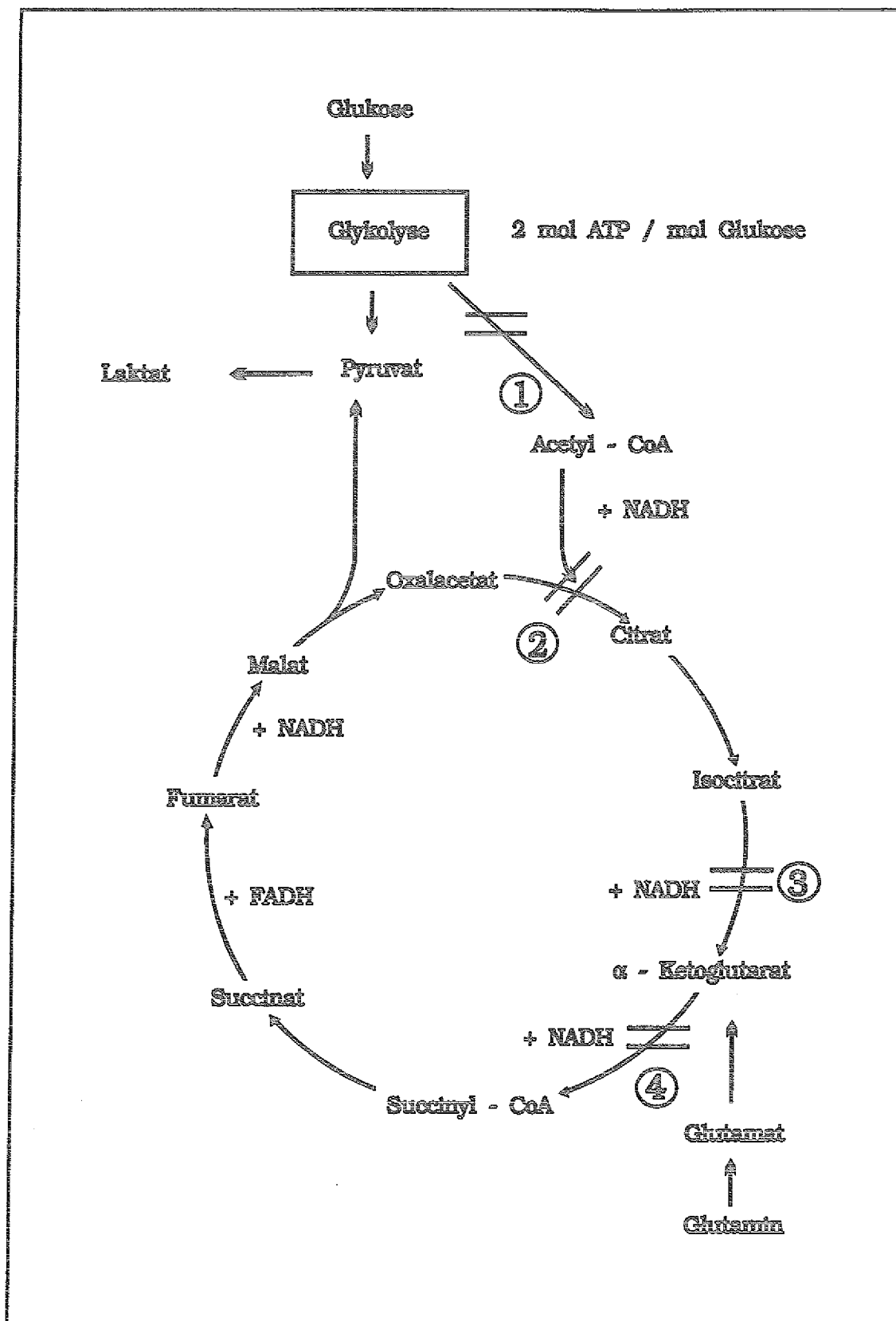


Abb. 3.1.2: Regulation von Glukose und Glutaminabbau

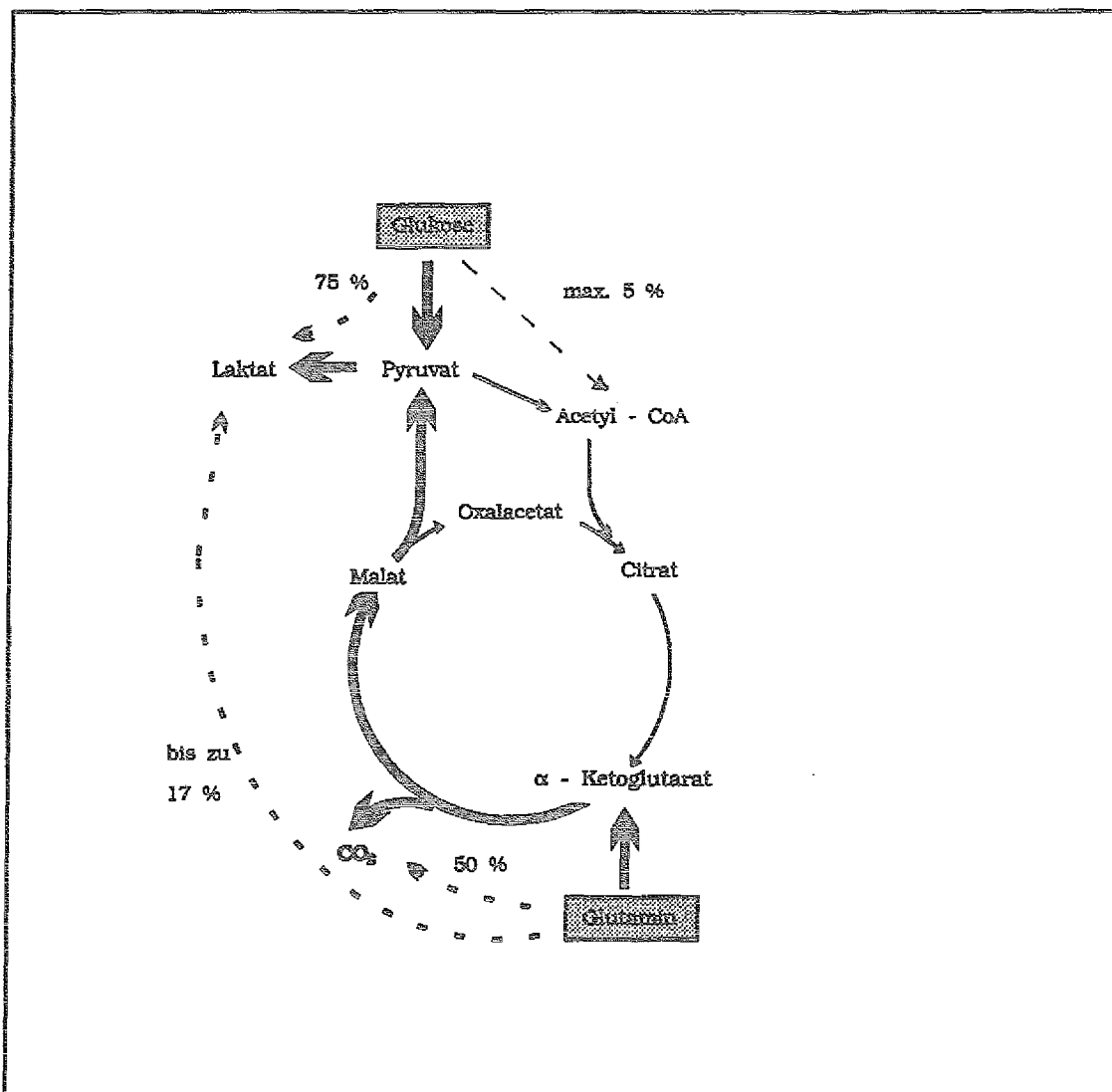


Abb. 3.1.3: Substratfluß durch den TCA

Sauerstoff

Die Tatsache, daß in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers unterschiedliche Sauerstoffpartialdrücke herrschen, weist darauf hin, daß es Optima für die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff gibt. Daher kommt der gelösten Sauerstoffkonzentration eine entscheidende Rolle bei der Proliferation dieser Zellen zu. Die Optimierung der

Versorgung von Zellkulturen mit Sauerstoff ist daher seit Mitte der fünfziger Jahre Gegenstand der Forschung (Cooper 1958, Kilburn 1968). Während frühe Arbeiten ausschließlich das Zellwachstum betrachteten, sind die Auswirkungen des pO_2 auf den Metabolismus später genauer untersucht worden. Vor allem die rasante Entwicklung der Hybridoma-Technologie hat viele neue Arbeiten über den Einfluß der Sauerstoffversorgung einer Kultur auf ihre (Antikörper-) Produktivität als Funktion des Metabolismus hervorgebracht (Mizrahi 1972, Boraston 1984, Miller 1988, Meilhoc 1990, Ozturk 1990, Phillips 1987). Der Grundtenor all dieser Untersuchungen ist, daß ein optimaler pO_2 für das Zellwachstum existiert, der vor allem für Hybridomazellen unterhalb der vollständigen Luftsättigung liegt. Den Bereich des optimalen pO_2 gibt Ozturk in einem

Literaturüberblicks etwa 50 % Luftsättigung an, wobei der optimale Bereich sehr breit angelegt ist; so finden Boraston *et al.* (1984) nur einen geringen Effekt des pO_2 auf das Zellwachstum im Bereich zwischen 8 und 100 % Luftsättigung. Allgemein gilt jedoch eine Inhibierung von Säugerzellen bei höherem pO_2 als anerkannt. Permanente Zelllinien weisen allerdings eine etwas höhere Sauerstofftoleranz auf. Mizrahi (1984) zeigt für lymphoblastoide Zellen einen optimalen pO_2 von 100 % Luftsättigung.

Den Einfluß von Sauerstoff auf den Zellmetabolismus zeigt sich in einem Anstieg der Glukoseaufnahme sowie der Laktatbildung bei niedrigem pO_2 : Sauerstoff stellt den terminalen Elektronenakzeptor der oxidativen Phosphorylierung dar, dessen Konzentration das Ausmaß der oxidativen Energiegewinnung determiniert (Wilson 1979). Ein Ausfallen dieser Energiequelle zwingt die Zelle zu einer verstärkten glykolytischen ATP-Bildung (Kilburn 1969, Self 1968, Miller 1988). Ozturk und Palsson (1990) beschreiben Zellwachstum sogar bei 0 % Luftsättigung als möglich, basierend auf einer ausschließlich glykolytischen Energieerzeugung einer kontinuierlich geführten Hybridoma-Kultur. Auch der Glutaminstoffwechsel wird vom pO_2 beeinflusst. Miller (1988) zeigt eine Limitierung der Glutaminaufnahme durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff, ähnliche Ergebnisse liefern Ozturk und Palsson (1990). Hier werden allerdings im Bereich unterhalb von 1,25 % Luftsättigung wieder ansteigende Glutaminaufnahmeraten gemessen. Die Autoren erklären dies durch einen zunehmenden Einsatz von Glutamin zur Biomasseproduktion.

Die Antikörperproduktion von Hybridomazelllinien reagiert sehr unterschiedlich auf Variationen des pO_2 . Ozturk und Palsson weisen eine Unabhängigkeit der Antikörperbildung vom gelösten Sauerstoff nach, wogegen Miller *et al.* (1988) einen für die Produktivität optimalen pO_2 von 50 % nennen. Mizrahi (1972) bestimmen die maximale IgG-Bildung einer permanenten Lymphozyten-Linie bei ca. 20 % Luftsättigung. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind weniger auf unterschiedliches metabolisches Verhalten zurückzuführen, vielmehr sind sie Ausdruck der Vielfalt an Produktionsmustern, nach denen Hybridomazellen Antikörper bilden. Eine vollständig wachstumsgekoppelte Antikörperbildung bedeutet daher auch eine starke Sauerstoffabhängigkeit, wogegen die Ergebnisse von Ozturk bei wachstumsentkoppelter Antikörperproduktion entstanden sind. Im folgenden Kapitel soll auf die unterschiedlichen Produktionsmuster der Antikörperbildung eingegangen werden.

3.2 Potentiell inhibitorische Metabolite

Laktat

Als Hauptprodukt des Glukose-Stoffwechsels wurde Laktat schon sehr früh als potentieller Inhibitor des Zellwachstums untersucht (Glacken 1987, Reuveny 1987, Miller *et al.* 1988, Omasa *et al.* 1992, Ozturk 1992). Unter in der Hybridomafermentation üblichen Bedingungen (C_0 /Glukose 20 mM) liegt Laktat am Ende einer Batch-Kultur in Konzentrationen um 18-20 mM vor. Die bisher an Hybridomazellen durchgeführten Untersuchungen ergaben Inhibierungen erst in Bereichen von für Standardfermentationen unüblich hohen Laktat-Konzentrationen (> 20 mM). Die Zugabe von Laktat erfolgte bei diesen Untersuchungen in Form des Na-Salzes, so daß die Medienosmolarität verändert wurde. Untersuchungen von Ozturk und Palsson (1991) zeigen eine Inhibierung des Hybridomawachstums durch erhöhte Osmolarität. Somit sind die gemessenen

Wachstumsinhibierungen wohl eher auf die angestiegene Medienosmolarität als auf eine echte Laktat-Inhibierung zurückzuführen. Ozturk *et al.* (1992) bestätigen die in Kapitel 5.3 zu diesem Thema durchgeführten Experimente in einer kürzlich erschienenen Publikation.

Ammonium

Die Inhibierung des Säugerzellwachstums durch Ammoniumionen ist seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen in der Zellkultur. Besonders Hybridomazellen zeigen deutliche Einbußen in Wachstum und Produktivität bei erhöhten Ammoniumkonzentrationen (Glacken 1987, Reuveny 1986, Miller 1988, Ozturk 1992).

Ammonium stellt ein wichtiges Produkt des Glutaminstoffwechsels dar. Es entsteht bei der Desamidierung von Glutamin sowie der anschließenden Desaminierung von Glutamat zu α -Ketoglutarat (s. Tab. 3.1.1). Zusätzlich entsteht Ammonium bei der chemischen Zersetzung von Glutamin nach dem o.a. Mechanismus. Das Verhältnis der vom chemischen Zerfall bereinigten Ammoniumbildung zur Glutaminaufnahme beträgt bei Hybridomazellen zwischen 0,5 und 0,8. Änderungen dieses Verhältnisses lassen auf wichtige Verschiebungen im Stoffwechsel, die durch äußere Einflüsse hervorgerufen worden sein können, schließen.

Als Ursachen der Inhibierung von Säugerzellen durch Ammoniumionen finden sich in der Literatur hauptsächlich zwei Ansätze:

Mc. Queen und Bailey (1991) diskutieren die Auswirkungen der protonierten (NH_4^+) und der neutralen Form (NH_3) auf den intrazellulären pH. Die schnelle Diffusion von NH_3 in das Zellinnere und die anschließend Aufnahme in die Lysosomen erhöht den dortigen pH (üblicherweise leicht saueres Milieu) und behindert somit z.B. die rezeptor-medierte Endozytose von Wachstumsfaktoren. Die Aufnahme der schwachen Säure NH_4^+ in das Cytosol führt zu einer Acidifizierung des dortigen Milieus, wodurch eine signifikante Inhibierung des Zellwachstums hervorgerufen wird. Da ein steigender extrazellulärer pH das Verhältnis von Ammonium zu Ammoniak zugunsten der neutralen Form verschiebt, wirkt sich die Ammoniuminhibierung bei höherem pH aufgrund der schnelleren Diffusion von NH_3 im Vergleich zu NH_4^+ stärker aus.

Der zweite wichtige Ansatz koppelt das verlangsamte Wachstum an den energetischen Zustand der Zelle: Ammoniumionen inhibieren das Enzym Glutamatdehydrogenase, es kommt zu einer Akkumulation von Glutamat, das wiederum selbst die Desamidierung von Glutamin inhibiert. Die Energiegewinnung via Glutaminolyse wird verringert und die Zelle schaltet verstärkt auf glykolytische ATP-Produktion um. Martinelle und Häggström (1992) führen den Einfluß des Ammoniums auf den Energiemetabolismus weiter aus: Ammonium bzw. Ammoniak verändern zusätzlich zum zytoplasmischen pH auch den pH in den Mitochondrien. Hierdurch wird der pH-Gradient quer zur Mitochondrienmembran flacher und somit die treibende Kraft zur ATP-Bildung in den Mitochondrien reduziert.

Alle übrigen Erklärungsversuche der Ammoniuminhibierung lassen sich auf diese beiden Grundgedanken zurückführen. Tab. 3.2.1 faßt die bisher in der Literatur beschriebenen Messungen zur Ammoniuminhibierung zusammen.

Zelllinie	zugesezte Menge NH_4^+	% Wachstumsinhibierung	Literatur
Maus Hybridoma	4 mM	48	Glacken (1988)
Maus Hybridoma	3 mM	42	Reuveny (1986)
Maus Myeloma	2,4 mM	28 (serumhaltig)	Iio (1985)
	2,4 mM	64 (serumfrei)	
BHK	1mM	33	Butler (1984)
	2 mM	67	
Maus Hybridoma	7.6 mM (pH 6,8)	50	Doyle (1990)
	7,5 mM (pH 7,2)	50	
	6,7 mM (pH 7,4)	50	
	4,8 mM (pH 7,6)	50	
	4 mM (pH 7,8)	50	
Maus Hybridoma	3 mM (pH 6,8)	20	McQueen (1991)
	10 mM	60	
	3 mM (pH 7,2)	10	
	10 mM	78	
	3 mM (pH 7,6)	55	
	10 mM "	88	
Maus Hybridoma	4 mM	50	Ozturk (1992)

Tab. 3.2.1: Ammoniuminhibierung verschiedener Zelllinien

Die bisher beschriebenen Daten beziehen sich mehrheitlich auf das Zellwachstum. Eine Inhibierung der Produktbildung ist im Falle von Hybridomazellen selten beschrieben worden. Ozturk (1992) erwähnt sogar einen leichten Anstieg der spezifischen Antikörperbildung bei Zugabe von NH_4Cl zu Hybridomakulturen. Newland (1990) diskutiert den Einfluß von Ammonium als mehr oder weniger ausschließlich beschränkt auf das Wachstum und somit die Zahl der Antikörperproduzenten in einer Kultur. Die Abnahme des Antikörpertiters schreibt er nur der verringerten Zellzahl zu. Kapitel 5 wird zeigen, daß ebenso wie die Wachstumsinhibierung eine von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich starke Produktivitätsinhibierung existieren kann.

3.3 Kinetik der Antikörperbildung

Der Mechanismus der Bildung von monoklonalen Antikörpern durch Hybridomazellen hat lange Zeit nicht die Beachtung erhalten, die dem entscheidenden Schritt bei der Gewinnung eines Wertstoffes - der Produktaus-schüttung selbst - zukommt. Das Erreichen hoher Produktkonzentrationen wurde hauptsächlich mit dem Er-langen hoher Zelldichten gleichgesetzt. Über die Zusammenhänge zwischen Wachstum und Produktivität gab und gibt es unterschiedliche Meßdaten, die Merten (1988) zu drei Hauptproduktionsmustern der Antikörper-produktion im Satzreaktorbetrieb zusammengefaßt hat. Es wird zum einen eine kontinuierliche Abnahme der zellspezifischen Produktivität im Fermentationsverlauf angegeben, während im zweiten Fall die Produktivität ein Minimum im Bereich des exponentiellen Wachstums aufweist. Im dritten Fall existiert eine konstante Pro-duktivität im Bereich des exponentiellen Wachstums, die in der stationären bzw. der Absterbephase abnimmt. Abb. 3.3.1 zeigt die drei Produktionsmuster.

Alle hier angeführten Produktionsmuster ergaben sich aus der Verfolgung der Produktkonzentration und der Zellzahl sowie der daraus abgeleiteten Raten. Intrazelluläre Zusammenhänge wurden nicht untersucht. Die von Zelle zu Zelle unterschiedlichen Produktionsmuster rühren vermutlich vom Hybridisierungsprozeß selbst her. Die dort vorgenommene Selektion beruht auf der statistischen Verteilung zwischen erfolgreicher und nicht er-folgreicher Hybridisierung, daher unterliegen auch die Eigenschaften der erzeugten Hybridzelle einer gewissen statistischen Variation. Eine differenziertere Betrachtung der in der Zelle ablaufenden Vorgänge sollte hier bessere Einsichten liefern. Suzuki und Ollis (1989) versuchten, die von vielen Autoren beschriebene Erhöhung der spezifischen Antikörperproduktivität bei erniedrigter Wachstumsrate (Miller *et al.* 1988, Boraston *et al.* 1984, Reuveny *et al.* 1986) in einem zellzyklenabhängigen Modell zu erklären. In Anlehnung an die Kinetik anderer Säugerzellen teilten sie den Zellzyklus einer Hybridomazelle in G1, S, G2 und M-Phase ein (s. Abb. 3.3.2).

In der G1-Phase findet eine verstärkte Proteinproduktion statt, um die durch die Zellteilung ausgedünnten Pools aufzufüllen, wohingegen in der S-Phase die DNA-Bildung maximal vorangetrieben wird. Die G2-Phase dient der Vorbereitung der Teilung, die in der M-Phase stattfindet. Zwischen der G1- und der S-Phase lokali-sieren sie eine Art Haltepunkt des Zellzyklus, den sogenannten Restriktionspunkt. An diesem Punkt hält die Zelle in der Teilung inne bis sie ein Signal zum Durchlaufen des weiteren Zyklus erhält. Zellen in dieser Ruhephase bezeichnen Suzuki und Ollis als "arrested cells". Es konnte anhand des Modells gezeigt werden, daß die spezifische Antikörperproduktivität in der späten G1-Phase sowie bei den sogenannten "arrested cells" am höchsten ist; zusätzlich steigt die Zahl der Zellen, die sich in der G1-Phase vor dem Restriktionspunkt befinden, mit sinkender Wachstumsrate an. Dies erklärt die negative Korrelation zwischen Wachstumsrate und spezifischer Antikörperproduktion bei vielen Hybridomazelllinien. Ramirez und Mutharasan (1990) kommen in ihren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. Die bei weitem überzeugendsten Untersuchungen stammen von Biblia und Flickinger (1990, 1991, 1992 a & b)). Sie beschäftigten sich mit der Kinetik der intrazellulären Vorgänge bei der Antikörperproduktion. Dem von ihnen aufgestellten Modell liegt folgende Reihenfolge an intrazellulären Einzelschritten zugrunde:

- Transskription der mRNAs für schwere und leichte Ketten (s. Abb. 2.1.1)
- Translation der mRNAs im rauen endoplasmatischen Retikulum

- Zusammenbau der Translationsprodukte (d.h. der leichten und schweren Kettenmoleküle) in den rauen und glatten Regionen des endoplasmatischen Retikulums
- Transport des Antikörpers zum Golgi-Apparat
- Glykosylierung
- Sekretion des fertigen Moleküls

Der Zusammenbau der Translationsprodukte im endoplasmatischen Retikulum erfolgt nach folgendem Muster: Zunächst wird ein Dimer aus zwei schweren Ketten gebildet, im nächsten Schritt erfolgt die Addition der ersten leichten, im darauffolgenden Schritt die der zweiten leichten Kette. Biblia und Flickinger validierten nun ihr Modell anhand von Messungen der intrazellulären Konzentrationen der m-RNA für die schweren und leichten Ketten der Antikörper und durch Verfolgung des Einbaus von radioaktiv markiertem Methionin in die Antikörpermoleküle. Sie bestimmten dann anhand von Simulationen mit Hilfe des validierten Modells die möglicherweise geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Antikörpersekretion für Hybridomazellen. Ihr wichtigstes Ergebnis ist, daß für unterschiedlich schnell wachsende Zellen unterschiedliche Schritte die Antikörperbildungsrate determinieren können. Im Falle von sehr langsam wachsenden Zellen liegt dieser Schritt auf der Ebene der Translation, wogegen bei schnell wachsenden Zellen der Zusammenbau der Translationsprodukte geschwindigkeitsbestimmend ist.

Leno *et al.* (1991) berichten eine negativ korrelierte IgG-Bildung in semikontinuierlicher Kultur, wobei eine Limitierung der Antikörperproduktion auf der Ebene der Transskription durch einen Anstieg der Konzentration an H- und L-Ketten m-RNA mit steigender Wachstumsrate ausgeschlossen wird. Es wird ebenfalls ein Anstieg der cytoplasmischen und zellassoziierten IgG-Menge mit steigender Wachstumsrate festgestellt, so daß Leno *et al.* die Limitierung der Antikörperproduktion bei hohen Wachstumsraten auf dem Schritt der Sekretion folgern.

In den Simulationen von Biblia und Flickinger nimmt der Zusammenbau der Translationsprodukte im endoplasmatischen Retikulum eine wichtige Rolle im Zusammenhang zwischen Wachstum und Antikörpersekretionsrate ein. Ist die Geschwindigkeitskonstante des Zusammenbaus der H- und L-Ketten klein, so erhält man eine negative Kopplung zwischen Wachstumsrate und Antikörperproduktion, ist die Konstante hoch, so ergibt sich eine positive Korrelation. Abb. 3.3.3 zeigt ein Ergebnis der Simulationen von Biblia und Flickinger (Biblia und Flickinger, 1992 b S. 255). Die Existenz eines Umschlagpunktes bei der Auftragung der spezifischen Antikörperproduktion gegen die Rate des Kettenzusammenbaus zeigt die Abhängigkeit der Wachstumskopplung der MAK-Synthese vom Kettenzusammenbau. Niedrige Zusammenbauraten bewirken eine negative Kopplung, eine mittlere Rate führt zu einer Entkopplung (Unabhängigkeit der Synthese vom Wachstum) und eine hohe Rate bedeutet eine positive Wachstumskopplung. Die Bedeutung eines solch energieintensiven Schrittes wie der Zusammenbau der Translationsprodukte für die spezifische Antikörperbildung unterstreicht die Wichtigkeit einer guten energetischen Versorgung des Produzenten. Biblia und Flickinger schlagen eine auf die Bedürfnisse der Zelle abgestimmte Medienzufuhr vor, die die intrazelluläre Energieladung (d.h. das Verhältnis zwischen Adenosintriphosphat und der Summe aller Adenosin-Phosphate) auf möglichst hohem Niveau hält. Somit soll die Antikörpersynthese durch Erzeugen einer guten energetischen Versorgung für stationäre Zellen auf der Ebene der Translation, für schnell wachsende Zellen auf der Ebene des H- und L-Kettenzusammenbaus stimuliert werden.

Durch die Zugabe von Glutamin zu Hybridomafermentationen zu Beginn der stationären Phase sind Flickinger *et al.* (1992) in der Lage, die Produktion von monoklonalen Antikörpern stark anzuregen. Dies wurde ebenfalls durch Zugabe von Metaboliten des Glutaminabbaus wie z.B. Malat, α -Ketoglutarat oder Glutamat erreicht.

Die Stärke der Stimulation der MAK-Bildung hing von der Fähigkeit der Hybridomazellen, dieses Substrat aufzunehmen, ab. So wurde mit Glutamat eine weniger starke Anregung gefunden als mit Glutamin, was die Autoren durch die besonders leichte Aufnahme von Glutamin mit Hilfe eines Transportsystems in die Mitochondrien erklären. Eine ähnlich gute Stimulation wie Glutamin ergab Malat, das mit Hilfe eines Shuttle-Systems ebenfalls sehr gut in Mitochondrien aufgenommen werden kann. Anhand der Zugabe von anderen Aminosäuren zu diesen stationären Kulturen mit dem gleichen stimulierenden Effekt konnte gezeigt werden, daß diese zusätzlich verfügbaren Substrate zur Steigerung des Energiestoffwechsels der stationären Zellen eingesetzt werden, und daß die so frei werdenden Energieäquivalente zur verstärkten Produktsynthese beitragen können.

Die Untersuchungen in Kapitel 6 und 7 werden zeigen, wie diese Thesen durch die gezielte Führung einer Perfusionskultur sowie mit einer gezielten Verbesserung des Energiehaushaltes durch Abtrennung eines Inhibitors unterstützt werden.

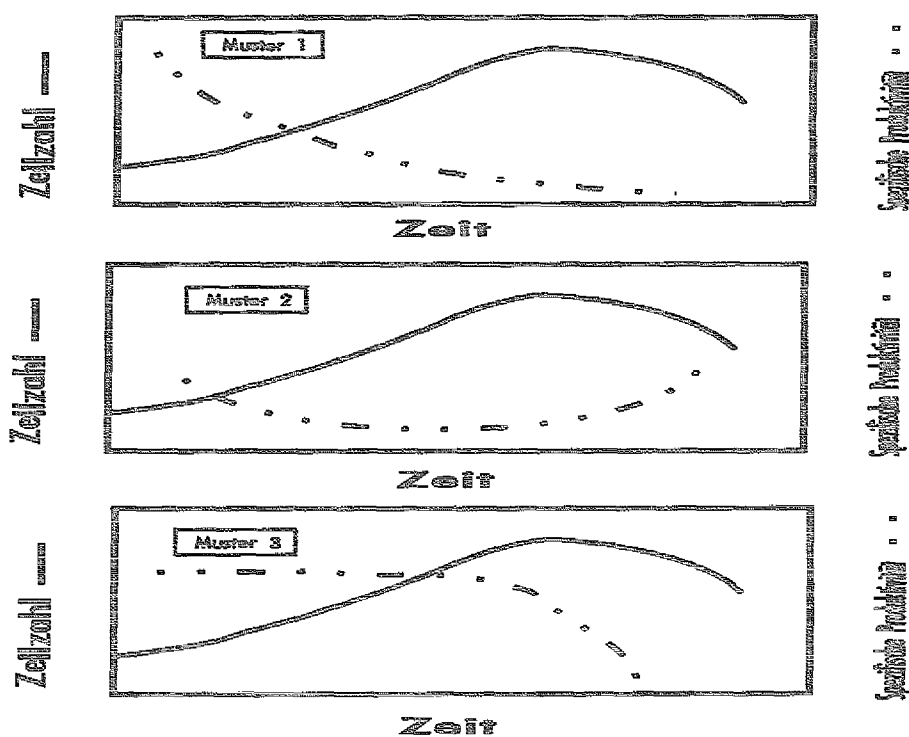


Abb. 3.3.1: Kinetische Muster der Antikörperbildung

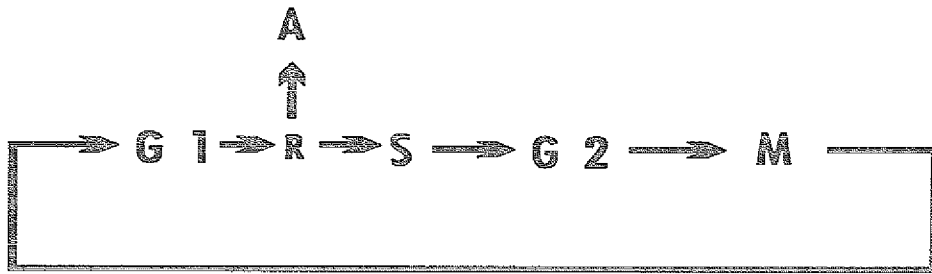


Abb. 3.3.2: Modell des Zellzyklus von Hybridomazellen

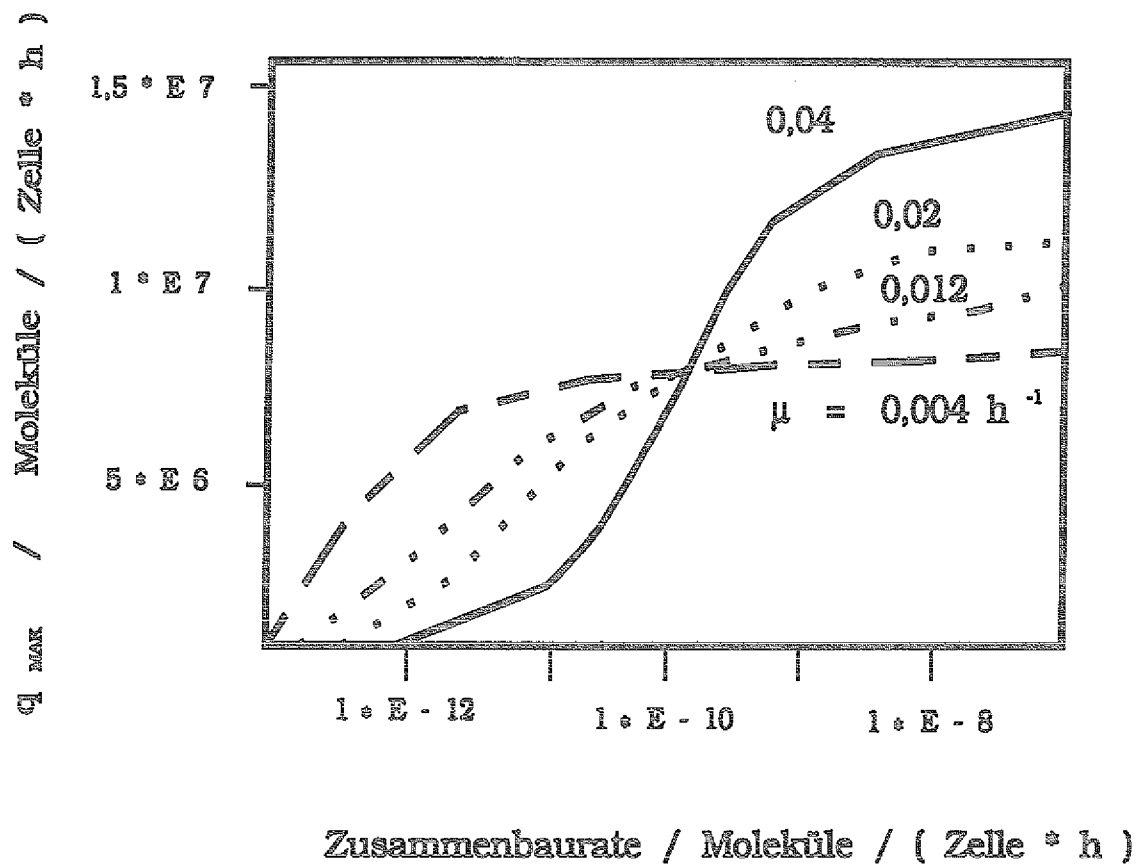


Abb. 3.3.3: Zusammenhang zwischen Wachstum und Antikörperbildung

3.4 Modellierung von Säugerzellkulturen

Einführende Bemerkungen

Im Grunde unterscheidet sich die Wachstumskinetik von Säugerzellen *in vitro* nicht vom Wachstum von Bakterien oder Pilzen, so daß die mannigfaltigen Erfahrungen in der Modellbildung mit diesen Organismen auch in die Säugerzellkultur übertragbar sein sollten. Wie zu Anfang dieses Kapitels gezeigt wurde, stellen Säugerzellen einen erhöhten Anspruch an die Zusammensetzung des Kulturmediums, so daß an diesem Punkt eine enorme Komplexität bezüglich der zu berücksichtigenden Medienkomponenten auftritt. Ein "typisches" Basalmedium besteht aus ca. 50 Einzelkomponenten, zuzüglich einiger Proteine, die zum einen die schereempfindlichen Zellen schützen (z.B. Rinderserumalbumin BSA), zum anderen die Aufnahme der Hauptsubstrate fördern sollen (z.B. Insulin). Hinzu kommt das häufig eingesetzte fötale Kälberserum (FCS), das als undefinierter Medienbestandteil sich fraglos förderlich auf Wachstum und Produktivität von Säugerzellen auswirkt, dessen Einfluß aber nur undifferenziert als Lieferant von wachstumsfördernden Stoffen angegeben werden kann. Man erkennt das Dilemma der Modellbildung in der Säugerzellkultur: Die essentiellen Bestandteile des Mediums sind so zahlreich, daß eine komplette Beschreibung der Abhängigkeit von Wachstum und Produktivität von allen Prozeßparametern sich von vornherein verbietet, andererseits muß bei einer Reduktion der Variablen genau darauf geachtet werden, daß die als limitierend betrachteten Parameter auch in der Tat die wahrhaftig limitierenden sind. Das Vorhandensein der nicht variierbaren Medienkomponenten wie z.B. Spurenelemente, Vitamine sowie essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren im ausreichenden Überschuß ist für eine aussagekräftige Modellierung des Einflusses der in ihrer Konzentration veränderbaren Medienbestandteile unerlässlich.

Wachstum von Säugerzellen in diskontinuierlicher Kultur

Man findet beim Aufwachsen suspendierter Säugerzellen die vier typischen Phasen des Fermentationsverlaufs im Satzbetrieb - lag-, exponentielle-, stationäre- und Absterbephase - wobei eine nur sehr kurze stationäre Phase auftritt. Im Gegensatz zu Bakterien und Pilzen zeigen Säugerzellen einen fast peakartigen Übergang von der Phase exponentiellen Wachstums zur Absterbephase (s. Abb. 5.1.1, Dalili *et al.* 1990). Dieser Übergang wird bei Suspensionszellen durch die Medienbedingungen determiniert (Erschöpfung der Substratreserven, Akkumulation von toxischen Metaboliten), adhärent wachsende Zellen werden auch durch eine vollständige Ausfüllung der zur Verfügung stehenden Wachstumsoberfläche mit einer Monoschicht aus Zellen limitiert; es kommt zur Ablösung der Zellen und zum Absterben der Kultur. Da man mit Hilfe von Anfärbemethoden mikroskopisch sehr gut zwischen lebenden (vitalen) und toten Zellen unterscheiden kann, wird das Zellwachstum nicht nur anhand der vorhandenen Biomasse, sondern durch zwei Größen, die Gesamtzahl der Zellen und die Vitalität der Population beschrieben. Die Vitalität ergibt sich hierbei aus dem Verhältnis der Lebendzellzahl zur Gesamtzellzahl. Typischerweise findet man in der exponentiellen Phase Vitalitäten größer 90 %, die Absterbephase ist von einem rasanten Abfall der Vitalität gekennzeichnet. Den das Zellwachstum

beschreibenden Parameter stellt die Wachstumsrate μ dar, die sich aus der mathematischen Beschreibung des exponentiellen Zellwachstums ergibt:

$$(3.4.1) \quad X_{\text{vital}} = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Zusätzlich wird in der Zellkultur die Absterberate k_D definiert, sie beschreibt die Geschwindigkeit des Zellsterbens.

Wachstums- und Absterberate sind Funktion der Kulturbedingungen, wie z.B. Temperatur, pH, Substrat- und Inhibitorkonzentrationen. Die einfachste und am weitesten verbreitete Beschreibung der Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration stellt die aus der Enzymkinetik entlehnte Monod-Kinetik dar. Sie beschreibt eine Sättigungskinetik entsprechend Gleichung 3.4.2

$$(3.4.2) \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{(K_S + S)}$$

$\mu_{\max}$ beschreibt die maximal mögliche Wachstumsrate, K_S gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsrate an. Eine analoge Auftragung empfiehlt sich für die Beschreibung der spezifischen Produktbildungsrate q_P mit den Parametern $q_{P\max}$ sowie K_P . Da die durchschnittlich gebildete Antikörpermenge sehr klein ist, (in der Größenordnung von mg/l) wird die in das Produkt einfließende Substratmenge vernachlässigt. In gleicher Form kann die Aufnahme der Substrate durch die Zellen geschrieben werden (Gleichung 3.4.3); die Verknüpfung zwischen spezifischer Substrataufnahmerate q_S und Wachstumsrate μ erfolgt über den maximalen Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S\max}$ und den Maintenance-Faktor m_S ; diese beschreiben, welcher Anteil des aufgenommenen Substrates für das Wachstum der Population und welcher Anteil für die Aufgaben des Erhaltungsstoffwechsels der Zellen eingesetzt wird (Gleichung 3.4.4).

$$(3.4.3) \quad q_S = q_{S\max} \cdot \frac{S}{K_{qS} + S}$$

$$(3.4.4) \quad q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S\max}} + m_S$$

Die einfachste Form der Inhibierung wird nach Gleichung 3.4.5 beschrieben.

$$(3.4.5) \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{K_i}{(K_i + I)}$$

K_i bezeichnet hier die Konzentration des Inhibitors I , bei der die Wachstumsrate auf 50 % herabgesenkt wird. Eine weitere Möglichkeit der Beschreibung einer Inhibierung besteht in der Annahme, daß der o.a. Maintenance-Koeffizient m_S nicht konstant ist, sondern mit der Zunahme der Konzentration eines Inhibitors ansteigen kann. Man erhält aus

$$\begin{aligned}
 (3.4.6) \quad m_S &= f(I) \\
 &= m_{S \min} + a \cdot [I]
 \end{aligned}$$

und (3.4.4) nach Umformung

$$(3.4.7) \quad \mu = (q_S - (m_{S \min} + a \cdot [I])) \cdot Y_{X/S \max}$$

Wachstum in kontinuierlicher Kultur

Im Gegensatz zur diskontinuierlichen Fermentation werden im kontinuierlichen Prozeß bei konstantem Volumen ständig neue Substrate zu- und Produkte abgeführt. Die im Fermenter befindliche Zellmenge ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen Zellwachstum und Zellabfluß infolge des Mediendurchflusses durch den Fermenter, der durch die Durchflußrate $D [h^{-1}]$ quantifiziert wird. Es ergibt sich aus der Bilanz des idealen Rührkessels

$$(3.4.8) \quad \frac{dX_{\text{vital}}}{dt} = (\mu - D) \cdot X_{\text{vital}}$$

Für die Konzentrationen der Substrate und Metabolite ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$(3.4.9) \quad \frac{dS}{dt} = (S_{\text{ein}} - S_{\text{aus}}) \cdot D - q_S \cdot X_{\text{vital}}$$

Hier bezeichnet S_{ein} die Zulaufkonzentration im Fermenter, S_{aus} die Konzentration im Auslauf. Ein analoger Zusammenhang ergibt sich für die Metabolite, wobei die Einlaufkonzentration naturgemäß zu null gesetzt wird.

Die in Kapitel 2 beschriebene Immobilisierung der Zellen bedeutet eine Entkopplung der Verweilzeiten der Flüssigphase und der Zellen, d.h. der Term, der das Ausspülen der Zellen im kontinuierlichen Prozeß beschreibt, muß erweitert werden. Dies gelingt durch die Einführung der immobilisierten Zellmenge $N_{X_{\text{imm}}}$ in die Bilanzgleichung als unabhängig von der Durchflußrate in der Flüssigphase. Abb. 3.4.1 zeigt schematisch die Verhältnisse bei immobilisierten Suspensionszellen.

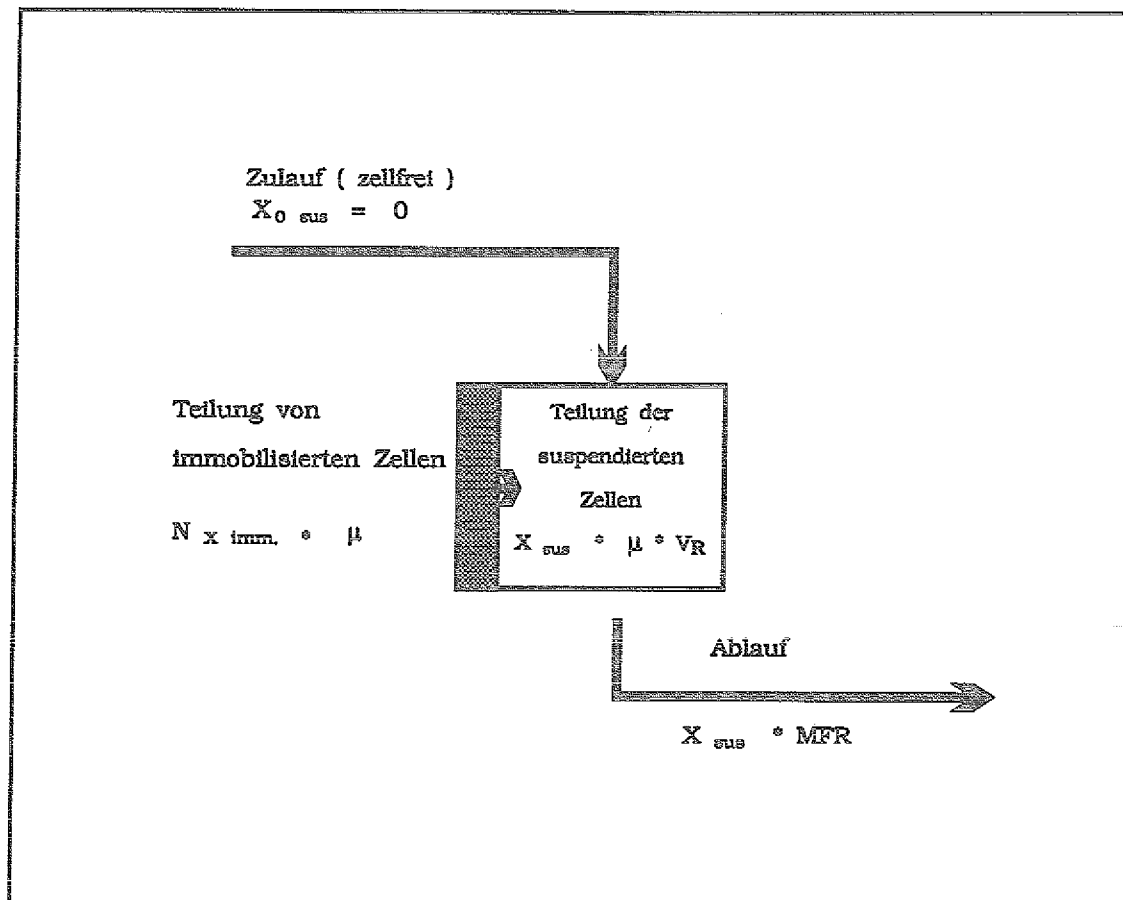


Abb. 3.4.1: Schematische Darstellung der Zellbilanz bei immobilisierten Kulturen

Es ergibt sich aus dieser Bilanzierung folgender Formelzusammenhang:

$$(3.4.10) \quad \frac{dX_{\text{sus.}}}{dt} = \mu \cdot N_{X_{\text{imm.}}} + \mu \cdot X_{\text{sus.}} \cdot V_R - X_{\text{sus.}} \cdot MFR$$

Hierbei gilt $dN_{X_{\text{imm.}}}/dt$ als konstant. Wichtig ist hierbei die Tatsache, daß es sich bei $X_{\text{sus.}}$ um eine Zellkonzentration [10^9vc./l] handelt, wohingegen $N_{X_{\text{imm.}}}$ eine Zellzahl darstellt, die sich aus der Zahl der immobilisierten Zellen pro ml Schüttvolumen an Trägern multipliziert mit der im Reaktor befindlichen Trägersmenge ergibt. An dieser Stelle soll nur kurz die Problematik der Beschreibung von immobilisierten Systemen eingeführt werden, eine genaue Betrachtung findet sich in Kapitel 6 im Zusammenhang mit den Experimenten zur kontinuierlichen Fermentation mit Wirbelschichtreaktoren.

Die in Kapitel 3.1 und 3.2 beschriebenen Substrate und Metabolite stellen die anerkannt wichtigsten Einflußfaktoren auf Wachstum und Produktivität von Säugerzellen dar. Die mathematische Beschreibung der Abhängigkeiten von diesen Faktoren fand in der Säugerzellkultur lange Zeit nicht die Beachtung, die der Modellbildung in der Bakterien- und Pilzfermentation zukommt. Erst in den letzten Jahren sind unstrukturierte Modelle entwickelt worden, die eine Beschreibung des Zellwachstums anhand ausgewählter Einflußfaktoren ermöglichen (Glacken et al. 1988, Bree et al. 1988, Miller 1988, Dalili et al. 1990, Frame und Hu 1991). All diese Ansätze nutzen die oben erwähnten Monod-Kinetiken zur Beschreibung der Abhängigkeit der Wachstumsrate von den Konzentrationen verschiedener Substrate und inhibierender Metabolite, wobei die einzelnen kinetischen Ausdrücke multiplikativ verknüpft werden. Glacken et al. stellen anhand von Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in diskontinuierlichen Hybridomakulturen einen konstitutiven Ausdruck für die Wachstumsrate auf, wobei sie die Glutaminkonzentration sowie den Anteil an fötalem Kälberserum nach Gleichung 3.4.3 und eine Inhibierung durch Ammonium und Laktat nach Gleichung 3.4.5 einbeziehen. Eine Limitierung der Wachstumsrate durch Glukose schließen die Autoren nach ihren Versuchsbedingungen aus. Miller et al. setzen die Glukosekonzentration anstelle des Serumanteils in einen ähnlichen Ausdruck ein. Bree et al. gelingt eine recht gute Beschreibung einer 300 l Hybridoma-Fermentation mittels einer multiplikativen Verknüpfung einer Sättigungskinetik für Glutamin und Inhibierungskinetiken für Ammonium und Laktat. In einer kontinuierlichen Kultur ermittelten Frame und Hu die Parameter einer Glukose-limitierten Hybridoma-Kultur und beschrieben ihre Ergebnisse mit einer Monod-artigen Gleichung.

Einen völlig anderen Ansatz wählen Batt und Kompala (1988). Sie entwickeln ein strukturiertes Modell für den Hybridoma-Stoffwechsel, indem sie der Zelle vier Pools für intrazelluläre Konstituenten zuordnen: Sie stellen Bilanzen für Aminosäuren, Nukleotide, Proteine und Lipide innerhalb ihrer jeweiligen Pools auf und beschreiben die Konzentrationen innerhalb der Pools als Funktion der Substrate, Metabolite und Poolkonzentrationen. Eine Verdünnung der Pools durch Zellwachstum sowie eine feed-back Kontrolle der Pools wird ebenfalls integriert. Ergebnis ist ein System aus zwölf Differentialgleichungen mit 49 Parametern, das zur Modellierung der stationären Zustände sowie der Antwort auf Sprungbefehle bei einer kontinuierlichen Hybridoma-Fermentation herangezogen wird. Die erhaltenen Übereinstimmungen sind zufriedenstellend, es stellt sich allerdings die Frage, ob der Aufwand einer solch komplexen Modellbildung gerechtfertigt ist. Solange das Ziel einer Modellbildung nur das erleichterte Auffinden von Betriebsoptima ist, sollten einfache, unstrukturierte Modelle ausreichen; werden allerdings Einsichten über biochemische Verläufe angestrebt, so müssen die Vorstellungen von einer unkompartimentierten Produktionseinheit, als welche Zellen in unstrukturierten Modellen betrachtet werden, aufgegeben werden. Die in Kapitel 3.3 erwähnten Bemühungen von Biblia und Flickinger zeigen, wie ein gut strukturiertes Modell zum Verständnis biochemischer Zusammenhänge, wie hier der Einzelschritte bei der Antikörpersynthese, entscheidend beitragen kann.

4. Material und Methoden

4.1 Zelllinie und Medium

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Maus-Maus-Hybridomazelllinie VX 12, die uns freundlicherweise von der Fa. VERAX Corp., Lebanon NH, USA zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelle sezerniert einen monoklonalen Antikörper der Subklasse IgG_{2A}, dessen Antigen leider nicht bekannt ist. Da diese Zelllinie nur als Modellsystem für die angestrebten Verfahrensverbesserungen dient, kommt diesem Problem nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

Die Aufzucht der Zellen in allen in dieser Arbeit verwendeten Kultursystemen erfolgte im gleichen Basalmedium, je nach den Erfordernissen der Systeme wurde 1 % V/V hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugesetzt. Das Basalmedium besteht aus einer 3:1 Mischung aus DMEM und HAM's F-12, zwei käuflichen Pulvermedien, der noch diverse Ingredienzien zugesetzt werden. Die Zusammensetzung der Pulvermedien ist aus Tabelle 4.1.1 zu sehen.

Der Ansatz von einem Liter Medium erfolgt nach folgender Rezeptur:

DMEM	9,2 g
HAM's F-12	2,61 g
HEPES	4,47 g
Natriumhydrogencarbonat	2,4 g
Rinderserumalbumin, Fraktion 5	0,1 g
Ethanolamin	0,1 mM
Natriumselenit	10 ⁻⁶ mM
Fettsäuren (Linolensäure, Thioctic acid)	0,61 mg
Insulin	0,5 mg
Transferrin	0,5 mg

Komponenten	DMEM [mg/l]	Ham F-12 [mg/l]
Anorganische Salze		
CaCl ₂ (anhyd.)	200.00	33.22
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	-	0.003
Fe(NO ₃) ₃ * 9 H ₂ O	0.10	-
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	-	0.834
KCl	400.00	223.60
MgCl ₂ (anhyd.)	-	57.22
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67	-
NaCl	6400.00	7599.00
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	125.00	-
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	-	142.04
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	-	0.863
Andere Komponenten		
D-Glukose	4500.00	1802.00
Hypoxanthin (Natriumsalz)	-	4.77
Linosäure	-	0.084
Liponsäure	-	0.21
Phenolrot	15.00	1.20
Putrescin * 2 HCl	-	0.161
Natriumpyruvat	-	110.00
Thymidin	-	0.73
Aminosäuren		
L-Alanin	-	8.90
L-Arginin * HCl	84.00	211.00
L-Asparagin * H ₂ O	-	15.01
L-Asparaginsäure	-	13.30
L-Cystein * HCl * H ₂ O	-	35.12
L-Cystin * 2 HCl	62.57	-
L-Glutaminsäure	-	14.70
L-Glutamin	584.00	146.00
Glycin	30.00	7.50
L-Histidin * HCl * HCL	42.00	20.96
L-Isoleucin	105.00	3.94
L-Leucin	105.00	13.10
L-Lysin * HCl	146.00	36.50
L-Methionin	30.00	4.48
L-Phenylalanin	66.00	4.96
L-Prolin	-	34.50
L-Serin	42.00	16.00
L-Tyrosin	-	-
(Di-Natrium-Salz)	104.20	7.81
L-Valin	94.00	11.70
Vitamine		
D-Ca-Pantothemat	4.00	0,48
Folsäure	4.00	1.30
Inositol	7.20	18.00
Nicotinamid	4.00	-
Biotin	-	0,007
Niacinamid	-	0.037

Pyridoxin * HCl	-	0.062
Pyridoxal * HCl	4.00	-
Riboflavin	0.40	0.038
Thiamin * HCl	4.00	0.34
Vitamin B12	-	1.36

Tab. 4.1.1: Zusammensetzung der verwendeten Pulvermedien. (Die Konzentrationsangaben in mg/l beziehen sich auf die Angaben des Herstellers, wobei 10,2 g DMEM bzw. 13,7 g F-12 auf einen Liter Wasser gelöst werden sollen).

Es ergeben sich damit Endkonzentrationen von 20 mM Glukose, 3 mM Glutamin sowie von 101 mg/l Gesamtprotein. Der pH des Mediums wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt, die Medienosmolarität beträgt zwischen 320 und 335 mOsmol/kg.

4.2 Analytische Methoden

Medienosmolarität

Die Osmolarität des Mediums, d.h. der Anteil an gelösten Stoffen in der Flüssigkeit, beeinflusst das Zellwachstum in hohem Maße. Daher wird die Medienosmolarität vor Benutzung des Mediums mit Hilfe eines Gefrierpunkt-Osmometers kontrolliert. Meßgröße ist hierbei die Kristallisationstemperatur einer Lösung, die Osmolarität wird proportional der auftretenden Gefrierpunktserniedrigung gesetzt. Die Probe (50 µl) wird auf eine Temperatur unterhalb ihres Gefrierpunktes abgekühlt. Danach wird die Lösung mit Impfkristallen zur Kristallisation gebracht, wodurch die Temperatur der Lösung bis zur Kristallisationstemperatur ansteigt. Die Temperaturdifferenz zwischen dem Gefrierpunkt des Lösungsmittels und der Lösung stellt ein Maß für die Konzentration der gelösten Stoffe in der Probe, d.h. die Osmolarität dar.

Zellzahl

Die Konzentration der Hybridomazellen in Lösung wird mit Hilfe einer Zählkammer, einem sogenannten Hämozytometer bestimmt. Die Kammer faßt ein definiertes Volumen (0,1 µl) in einer dünnen Schicht, so daß unter einem Lichtmikroskop die Zahl der in dem Volumen befindlichen Zellen ausgezählt werden kann. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wird die zellhaltige Lösung mit einem Farbstoff (Erythrosin B) versetzt. Dieser Farbstoff kann die infolge Autolyse permeabel gewordene Zellmembran toter Zellen durchdringen. Im mikroskopischen Bild erscheinen tote Zellen daher rot gefärbt, wogegen das Zytosol vitaler Zellen transparent erscheint. Die Vitalität V einer Population ist durch folgende Beziehung definiert:

$$V = \frac{X_{\text{vital}}}{X_{\text{gesamt}}} \cdot 100 \%$$

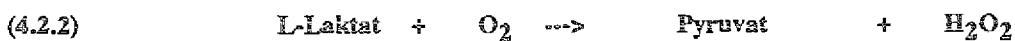
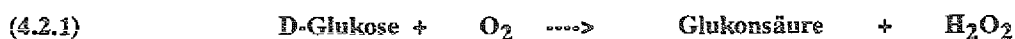
Die Ermittlung der Konzentration von Zellen in Suspension erfolgt durch einfaches Auszählen einer repräsentativen Medienprobe. Um die Anzahl der Zellen, die in einem Collagen-Mikroträger immobilisiert sind, zu bestimmen, muß der Träger aufgelöst werden, wodurch die immobilisierten Zellen freigesetzt und einer Zählung zugänglich gemacht werden. Das Auflösen des Trägers gelingt enzymatisch mit Hilfe der Collagenase.

Vorgehensweise:

0,5 ml abgesetzte Collagen-Mikroträger werden mit 1 ml Collagenase-Lösung (10 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Minuten ist im allgemeinen die Auflösung des Collagen-Materials abgeschlossen, was an einer milchigen Trübung der Lösung sowie am Absitzen der zur Beschwerung des Trägers notwendigen Edelstahlteilchen am Gefäßboden erkannt werden kann. Die freigesetzten Zellen können dann wie oben beschrieben angefärbt und ausgezählt werden. Träger, die sich über längere Zeit in Kultur befunden haben (evtl. mehr als zwei Monate), müssen länger mit Collagenase behandelt werden.

Glukose und Laktat

Die Konzentrationen von Glukose und Laktat werden mit einer enzymatischen Methode in einem automatischen Analysator bestimmt. Die Methode beruht auf der oxidativen Umsetzung von Glukose bzw. Laktat zu Glukonsäure bzw. Pyruvat. Die Umsetzungen werden durch zwischen zwei Membranen immobilisierte Oxidasen katalysiert, wobei die Enzymmembranen vor Platinelektroden angebracht sind. Diese dienen dazu, bei der enzymatischen Reaktion entstehendes H_2O_2 zu Sauerstoff zu oxidieren. Die dabei ablaufenden Reaktionen werden durch folgende Gleichungen beschrieben:



Geschwindigkeitsbestimmend ist hierbei die enzymatische Reaktion, der bei der Elektrodenreaktion entstehende Elektronenstrom ist der jeweiligen Konzentration an Glukose bzw. Laktat proportional.

Die Proben (Konzentrationsbereich für Glukose 0,3 bis 18 g/l; für Laktat 0,1 bis 3 g/l) werden in einen Pufferstrom injiziert und an den Enzymelektroden vorbeigeführt.

Pufferansatz ad 10 l H₂O demin.:

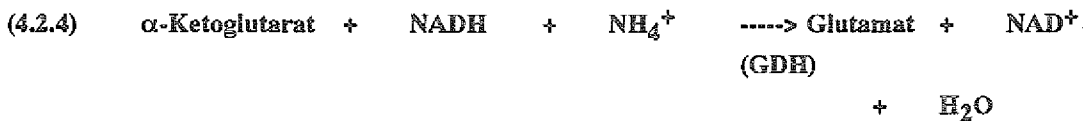
Na ₂ HPO ₄	15,72 g
NaH ₂ PO ₄	71,12 g
EDTA	5,72 g
Na-Benzolat	8,5 g

Der pH der Pufferlösung wird auf 7,0 eingestellt. Beim Ansetzen der Eichlösungen muß darauf geachtet werden, daß sich nach dem Einwiegen der Glukose das Mutarotationsgleichgewicht zwischen α - und β -Glukose einstellen muß, d.h. angesetzte Lösungen müssen vor dem Vermessen mindestens eine Stunde rühren.

Ammonium

Die Ammoniumkonzentration wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt, der aus Kostengründen vom Küvetten- (V = 1,5 ml) auf Mikrotiterplattenmaßstab (V=250 μ l) reduziert wurde. Hierbei können 96 Messungen parallel auf einer Mikrotiterplatte unter beträchtlicher Volumen- und damit Reagenzienreduktion durchgeführt werden.

Das Enzym Glutamatdehydrogenase (GDH) katalysiert die Umsetzung von α -Ketoglutarat mit Ammonium und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid red. (NADH) zu Glutamat.



Die während der Reaktion verbrauchte Menge an NADH ist der eingebauten Menge an NH_4^+ proportional und kann photometrisch bei 340 nm als Differenzmessung ermittelt werden. Abb. 4.2.1 zeigt eine Eichgerade der Ammoniumbestimmung.

Ansatz:

NADH-Lösung: 600 μ mol NADH in einem Puffer aus 15 mM α -Ketoglutarat und 0,5 M Triethanolamin, pH 8

Enzymlösung: Glutamatdehydrogenase in Wasser 1,67 U/ml

Vorgehensweise:

- Eichlösungen von 0,1 bis 1 mM Ammoniumchlorid (linearer Bereich der Methode)
- In alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden 100 μl H_2O , 50 μl NADH-Lösung und 25 μl Probe, Eichstandard oder Wasser als Leerwert zugegeben
- Messung der Startabsorption der Proben
- Start der Reaktion durch Zugabe von 50 μl Enzymlösung
- Messung der Absorption der Proben nach 20 min. Reaktionszeit

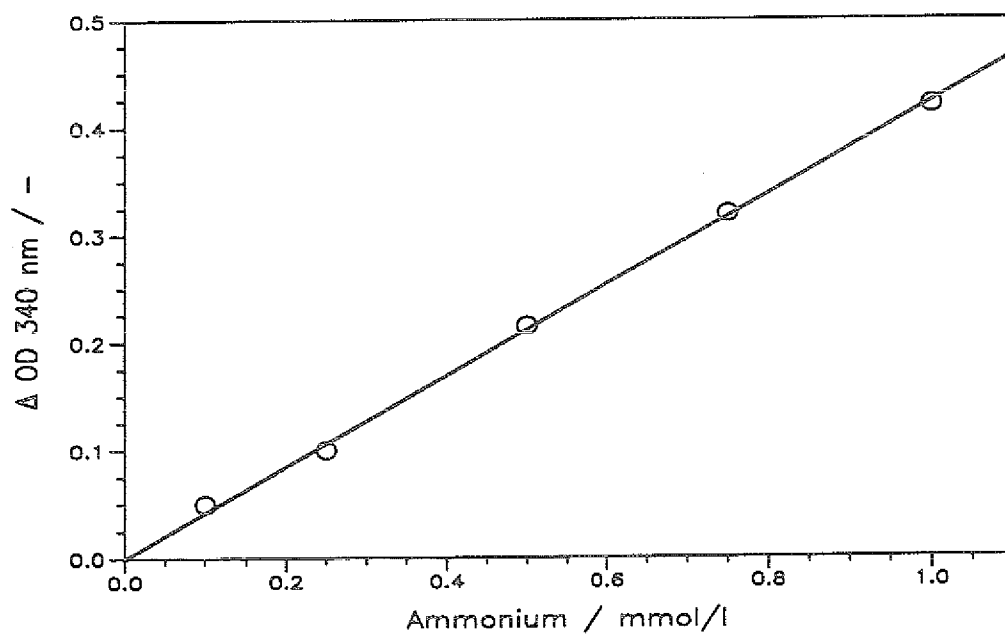


Abb. 4.2.1: Eichgerade der Ammoniumbestimmung

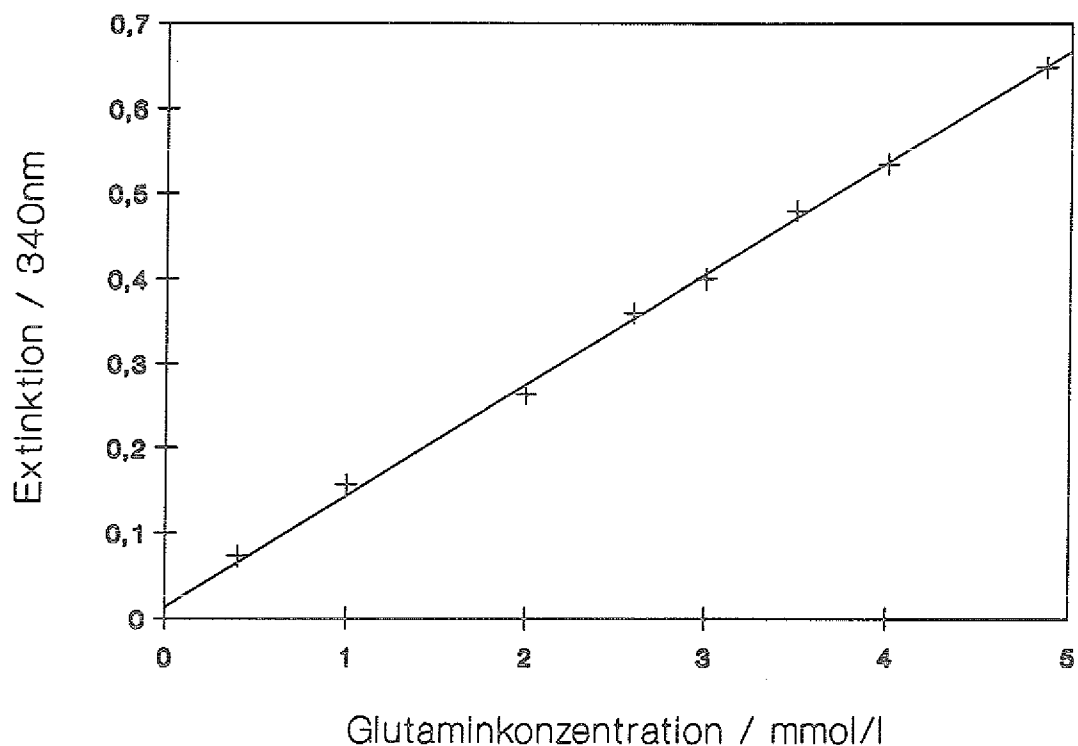
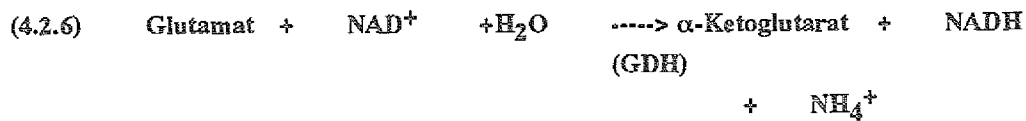


Abb. 4.2.2: Eichgerade der Glutaminbestimmung

Glutamin

Die Konzentration an Glutamin kann nicht in einem Schritt bestimmt werden, es muß eine gekoppelte enzymatische Reaktion durchgeführt werden. In einem ersten Schritt wird Glutamin enzymatisch (Glutaminase) zu Glutamat hydrolysiert, danach wird Glutamat mit Hilfe der GDH zu Ketoglutarat umgesetzt. Diese Reaktion stellt die Rückreaktion der Ammoniumbestimmung dar, d.h. es wird NADH aus NAD^+ gebildet und die Glutamatkonzentration stellt sich als proportional zur entstehenden NADH-Menge dar, die wiederum photometrisch bei 340 nm verfolgt werden kann. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite der Edukte; aus diesem Grund wird dem Reaktionspuffer Hydrazin zugesetzt, um das entstehende Ketoglutarat durch Hydrazonbildung dem Gleichgewicht zu entziehen. Der optimale pH der Hydrazonbildung stimmt allerdings nicht mit dem pH-Optimum der GDH überein, die Reaktion ist daher nur unvollständig. Man führt aus diesem Grunde bei jeder Messung eine komplette Eichreihe mit und bezieht die Meßwerte auf die jeweils aktuelle Eichung. Da im Zellkulturmedium neben Glutamin auch Glutamat vorhanden ist, muß in einem zusätzlichen Test die im Medium vorhandene Menge an Glutamat bestimmt werden, die dann von der durch Hydrolyse des Glutamins erhaltenen Glutamatkonzentration subtrahiert werden muß.



Ansatz

Glutamat-Dehydrogenase-Lösung in ADP-Lösung, 5,91 U/ml

Glutaminhydrolyse:

- Glutamatbestimmung:**

- 55

- 150 μl Glycin-Hydrazin-Puffer, 50 μl NAD-Lösung, 50 μl Hydrolysat, Eichstandard, Glutamat-Probe oder H_2O als Leerwert werden jeweils in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben
- Start der Reaktion durch Zugabe von 50 μl Glutamat-Dehydrogenase-Lösung
- Messung der Absorption bei 340 nm nach 60 min Reaktionszeit.

Es wird zweckmäßigerweise in folgender Reihenfolge vorgegangen: Zunächst wird die Glutamatkonzentration der Proben ermittelt, danach erfolgt die Hydrolyse des Glutamins und anschließend die Bestimmung des entstandenen Glutamats. Die Glutaminkonzentration ergibt sich aus der Differenz der Glutamatbestimmungen nach und vor der Hydrolyse. Abb. 4.2.2 zeigt die Eichgerade der Glutaminbestimmung.

Bestimmung der Konzentration an monoklonalen Antikörpern

Zur Messung der Konzentration an $\text{IgG}_{2\text{A}}$ standen zwei Methoden zur Verfügung: Ein Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (Sandwich-ELISA) sowie eine chromatographische Methode (HPLC). Beide sollen im folgenden beschrieben werden.

Die Sandwich-ELISA-Methode beruht auf dem sandwichartigen Einschluß des $\text{IgG}_{2\text{A}}$ zwischen zwei Anti-Idiotyp-Antikörpern gegen den F_c -Teil (s. Kap. 2.1.1) von IgG . Ein Antikörper ist auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert, der andere ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine charakteristische Farbreaktion, in unserem Fall die Abspaltung von p-Nitrophenol (gelb gefärbt) katalysiert (s. Abb. 4.2.3). Somit wird die Antikörperkonzentration nach folgenden Schritten bestimmt:

- Immobilisierung des anti- IgG -Antikörpers
- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers und der Oberfläche der Mikrotiterplatte mit BSA
- Bindung des $\text{IgG}_{2\text{A}}$ an den immobilisierten Antikörper
- Bindung des enzymgekoppelten zweiten anti- IgG -Antikörpers an den immobilisierten Antikörper/Antigen-Komplex
- Durchführung der enzymatischen Farbreaktion, deren Ausmaß proportional zur Menge des in der Probe befindlichen $\text{IgG}_{2\text{A}}$ ist

Abb. 2.4.3 zeigt das Prinzip des Sandwich-ELISA.

Ansatz:

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aus 81 g/l NaCl , 23,7 g/l Na_2HPO_4 und 3,45 g/l NaH_2PO_4

- Waschpuffer aus 1 % V/V Tween 80 in PBS
- Blockierungspuffer aus PBS und 10 g/l Rinderserumalbumin (BSA)
- Beschichtungslösung aus 0,005 mg/ml Anti-Maus-IgG in Wasser
- 1 mg/ml alkalische Phosphatase-anti-Maus-IgG-Konjugat 1:170 in Wasser verdünnt
- Assay-Mix aus 0,2 g/l $MgCl_2$ und 5,3 g/l Na_2CO_3 in PBS
- Reaktionslösung aus 20 ml Assay-Mix und einer Tablette p-Nitrophenol-Phosphat

Vorgehensweise:

- Eichstandard von 25,6 mg/l in 1:8 Verdünnung, in logarithmischer Verdünnungsreihe, Kontrolllösung von 20 mg/l (1:25 verdünnt)
- 100 μ l Beschichtungslösung werden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben, man inkubiert über Nacht bei Raumtemperatur
- Die Flüssigkeit wird entfernt, die Platte mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 μ l Blockierungspuffer 2 h bei 37 °C inkubiert.
- Die Platte wird mit Waschpuffer gewaschen, anschließend werden 200 μ l Probe, Standard, Kontrolle oder H_2O als Leerwert zugegeben, man inkubiert 1 1/2 h bei Raumtemperatur.
- Man wäscht die Platte mit Waschpuffer, gibt 50 μ l Konjugat-Lösung (1:1500 mit PBS verdünnt) hinzu und inkubiert 1 h bei Raumtemperatur
- Man wäscht die Platte mit Wasser und gibt 100 μ l Reaktionslösung zu
- Nach 30 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l 1 M NaOH gestoppt und die Absorption bei 400 nm gemessen; die Absorptionen der Standards werden halblogarithmisch gegen die Konzentrationen aufgetragen, der Meßbereich ergibt sich als der lineare Bereich dieser Auftragung

Die verwendete HPLC-Methode beruht auf der Adsorption des IgG_{2A} auf einem Chromatographiematerial (PROANAMABS, Biolytika, Lund Schweden) und dessen Desorption in einem Elutionspuffer. Die unterschiedlichen Adsorptions- und Desorptionseigenschaften der im Medium enthaltenen Proteine machen eine Trennung des IgG vom Restprotein möglich. Die Detektion der aufgetrennten Medienproteine erfolgt photometrisch bei 280 nm.

Ansatz:

- Bindungspuffer aus 0,11 M Na-Acetat und 0,002 % Na-Azid, pH 5
- Elutionspuffer aus 0,115 M Glycin/HCl pH 1,6
- Elutionsprofil: Injektion der Probe in Bindungspuffer (Flow 2 ml/min, Meßbereich 1,5 - 150 mg/l IgG), nach 4 min umschalten auf Elutionspuffer, nach weiteren 4 min erneutes Umschalten auf Bindungspuffer zum Spülen der Säule

Abb. 4.2.4 zeigt ein typisches Chromatogramm, Abb. 4.2.5 eine Eichgerade der IgG_{2A}-Bestimmung.

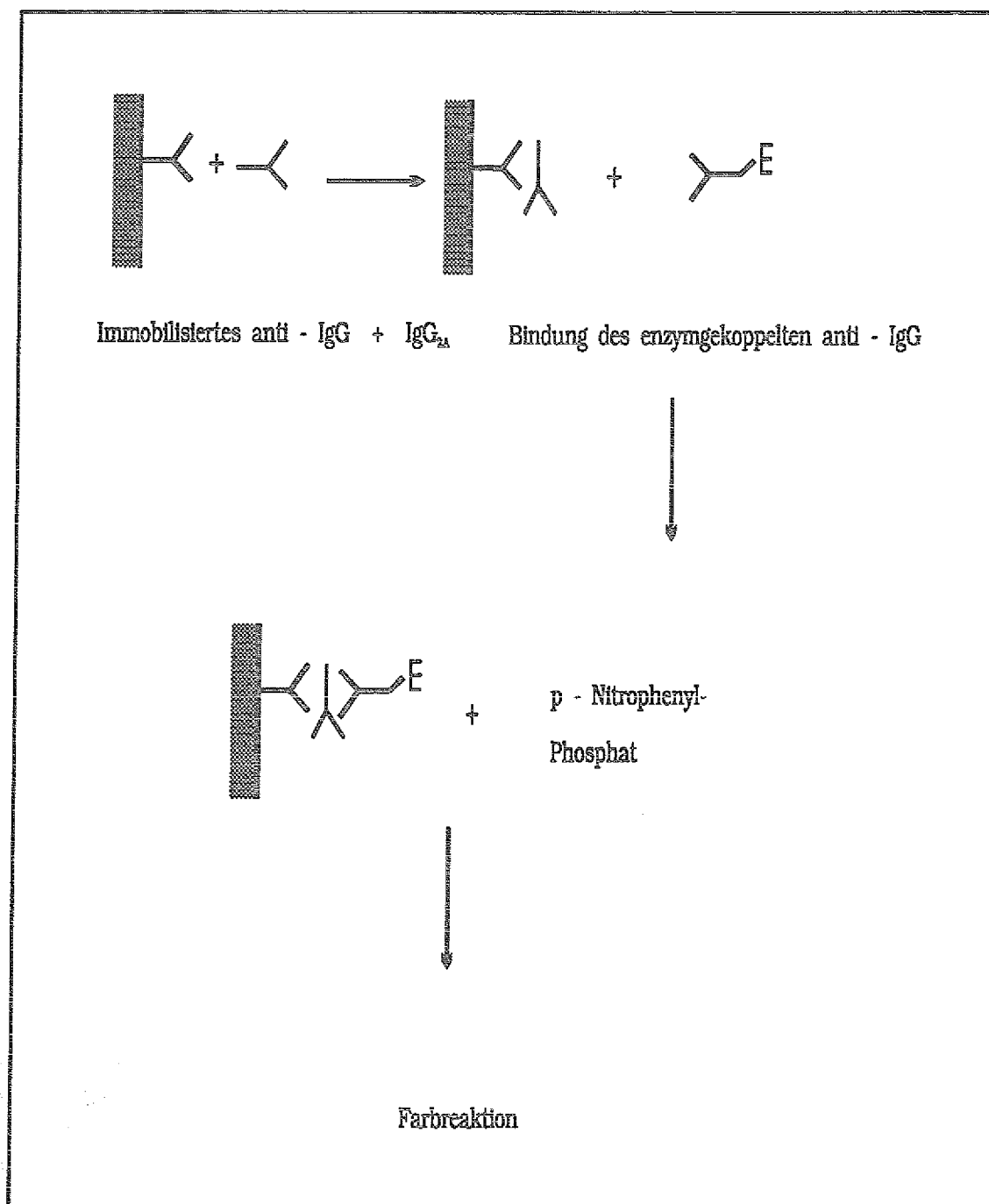


Abb. 4.2.3: Prinzip des Sandwich- ELISA (E = alkalische Phosphatase)

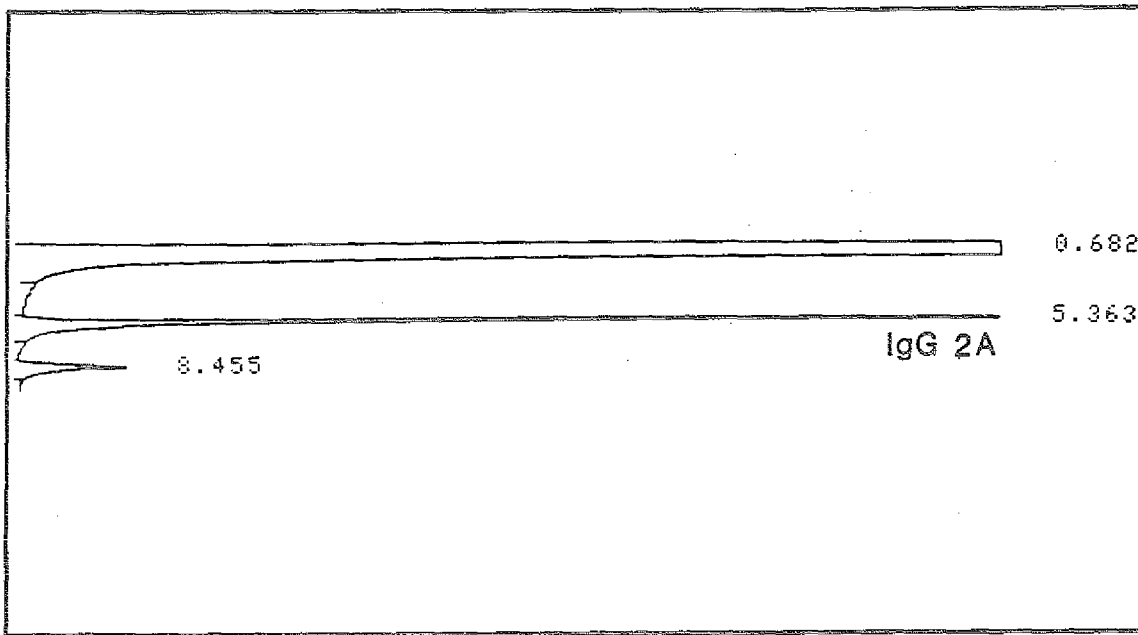


Abb. 4.2.4: Chromatogramm der Antikörperbestimmung mittels HPLC

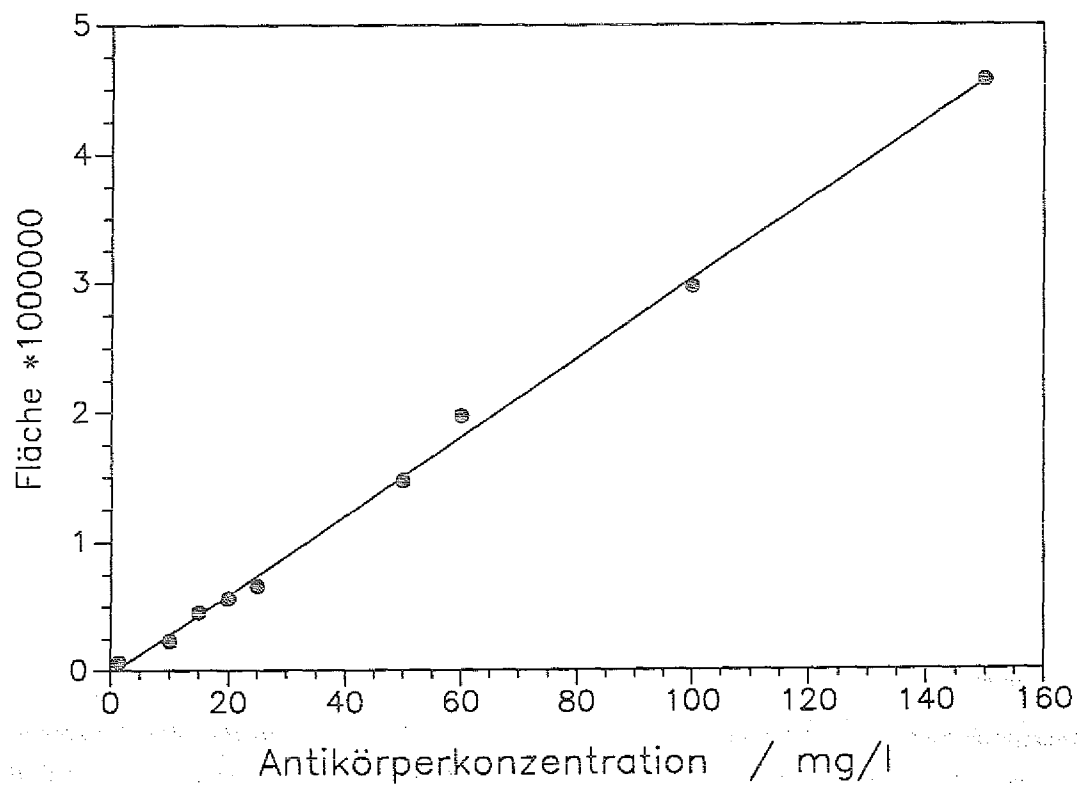


Abb. 4.2.5: Eichgerade der chromatographischen IgG-Bestimmung

4.3 Beschreibung der verwendeten Kultursysteme

4.3.1 Stammhaltung

Zellbank

Die besondere Empfindlichkeit von Säugerzellen im Vergleich zu Bakterien oder Pilzen erfordert eine spezielle Form der Langzeitaufbewahrung. Hybridomazellen lassen sich in einem speziellen Einfriermedium (90 % fötales Kälberserum FCS, 10 % Dimethylsulfoxid DMSO) bei - 80 °C für bis zu drei Monate, bei - 180 °C bis zu einem Jahr unter Erhalt ihrer Aktivität aufbewahren. Es empfiehlt sich, von den eingefrorenen Stammzellen von Zeit zu Zeit probeweise Fraktionen aufzutauen und auf ihr Wachstumsverhalten hin zu überprüfen.

Einfrieren von Zellen

Nach Bestimmung der Zellkonzentration in einer zum Einfrieren vorgesehenen Kultur wird soviel Zellsuspension entnommen, wie einer Gesamtzellzahl von $n \text{ mal } 2 \cdot 10^6$ vitaler Zellen entsprechen. N bezeichnet hierbei die Zahl der einzufrierenden Fraktionen. Man zentrifugiert die Zellsuspension bei 500 U/min fünf Minuten lang und entfernt den Überstand. Das Zellpellet wird in n mal 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und vorsichtig suspendiert. Die Suspension wird in n Portionen à 1,8 ml in Kunststoffröhrchen bei - 80 °C eingefroren. Nach einer Woche wird probeweise eine Fraktion aufgetaut. Bei ordnungsgemäßem Aufwachsen der aufgetauten Kultur kann die gesamte eingefrorene Fraktion nach - 180 °C überführt werden. Hybridomazellen dürfen *niemals* sofort bei - 180 °C eingefroren werden!

Auftauen von Zellen

Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO auf Säugerzellen schädigend wirkt, ist die folgende Prozedur zügig durchzuführen.

Die in Kunststoffröhrchen eingefrorenen Zellen werden bei 37 °C aufgetaut. Sofort nach dem Verschwinden des letzten Eisklumpens muß die Zellsuspension (1,8 ml) in 5 ml frisches Standardmedium (s. Kap. 4.1) überführt werden. Zum Abtrennen des DMSO zentrifugiert man fünf min. bei 500 U/min., verwirft den Überstand und nimmt in fünf ml frischem Medium auf. Die neue Zellsuspension wird zu weiteren fünf ml Medium zugegeben und in ruhender Suspension kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ vitalen Zellen/ml kann die Kultur weiter expandiert werden. Beim Expandieren empfiehlt es sich die Kulturen in der

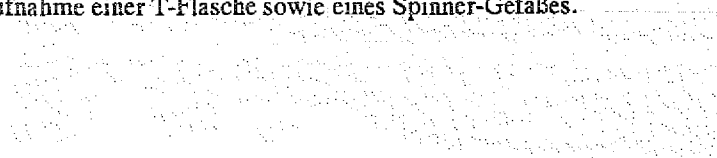
exponentiellen Phase zu belassen, ein Überwachsen einer Hybridomakultur führt zum Entstehen einer verlängerten lag-Phase nach Überimpfen in neues Medium.

Stammhaltung in ruhender Kultur

Die Aufzucht von Hybridomazellen in ruhender Kultur erfolgt in sogenannten T-Flasks aus Polystyrol. Hierbei handelt es sich um Einwegartikel, die steril produziert und nach Benutzung verworfen werden müssen. Die Theorie der Aufzucht in ruhender Kultur beruht auf dem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen dieser Kultursysteme, das je nach Gefäßgröße zwischen 2,5 und 1,9 cm²/cm³ liegt. Die Flaschen werden liegend in einem Begasungsbrutschrank aufbewahrt, wobei durch die geringe Dicke der Flüssigkeitsschicht eine ausreichende Versorgung der Kultur mit Sauerstoff und CO₂ erreicht wird. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem geringen Raumbedarf und der einfachen Handhabbarkeit der T-Flasks. Serienexperimente mit bis zu 20 parallelen Flaschen sind somit problemlos möglich. Die in diesen Kultursystemen erreichbaren Zelldichten unterscheiden sich nicht von denen in anderen Suspensionsreaktoren. Die unter diesen Bedingungen kultivierten Zellen unterliegen mit Sicherheit einer Sauerstoff-Limitierung, nähere Aussagen zu dieser Problematik finden sich in Kapitel fünf und sechs.

Stammhaltung in gerührter Kultur

Zellsuspensionen größeren Volumens werden in sogenannten Spinner-Flaschen kultiviert. Hierbei handelt es sich um autoklavierbare Glasgefäße, die mit einem speziellen Rührsystem ausgestattet sind, das eine scherungsarme Durchmischung der Suspension erlaubt. Der Rührer besitzt einen Magneteisenkern, der von unten mit einem Magnetrührwerk angetrieben wird und eine Art "taumelnde" Rührbewegung vollführt. Spinner-Flaschen werden ebenfalls in Begasungsbrutschränken betrieben, ihre Belüftung erfolgt über die Oberfläche der Flüssigkeit. Obwohl die erreichbaren Zelldichten ähnlich zu der ruhenden Kultur sind, können deutlich höhere Wachstumsraten erreicht werden (0,04 h⁻¹ im Vergleich zu 0,03 h⁻¹ in ruhender Kultur). Dies kann auf eine verbesserte Belüftung der Kultur infolge der Rührung zurückgeführt werden. Abb. 4.3.1 zeigt eine photographische Aufnahme einer T-Flasche sowie eines Spinner-Gefäßes.



4.3.2 Rührkesselfermenter

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Rührkesselfermenter handelt es sich um ein kommerziell vertriebenes Zellkultursystem, den BRAUN BIOSTAT MC. Das Konzept des Reaktors ist aus der Bakterienfermentation übernommen und an einigen Stellen den speziellen Bedürfnissen der Säugerzellkultur angepaßt worden. Die Rührung erfolgt mit schräg gestellten Rührblättern, um eine schonende Durchmischung zu erreichen. Die Begasung wurde blasenfrei ausgelegt, da Suspensionszellen bekanntermaßen empfindlich auf den Energieeintrag

durch platzende Gasblasen bei der Blasenbegasung reagieren. Es wurde ein vier Meter langer armierter Silikonschlauch in den Reaktor eingebracht, wobei ein Gemisch aus Druckluft, Stickstoff und CO_2 den Schlauch durchströmt und aufgrund des Konzentrationsgradienten zur Flüssigkeitsseite hin ins Medium diffundiert. Die Messung des Gelöstsauerstoffs in der Flüssigphase erfolgt mittels einer autoklavierbaren Sauerstoffsonde, die Regelung dieser Größe wird von einem PID-Regler vorgenommen, der den Anteil von Druckluft am Gasstrom durch den Begasungsschlauch regelt. Der pH der Kulturflüssigkeit wird von einer ebenfalls autoklavierbaren pH-Sonde gemessen, wobei die Regelung des pH nach unten durch Eintrag von CO_2 in das Carbonat-gepufferte System vorgenommen, die Regelung nach oben durch die Zugabe von 0,5 M NaOH erreicht wird. Die Temperatur des Mediums bestimmt ein Temperaturfühler, die Regelung erfolgt durch einen thermostatisierten Doppelmantel um das Reaktionsgefäß. Das Gesamtvolumen des Gefäßes beträgt 2 l, das jeweils verwendete Arbeitsvolumen 1,5 l. Inokulieren sowie Probenahme können durch ein Steigrohr vorgenommen werden, das mit einer Sterilkupplung ausgestattet ist. Zur Probennahme wird das Reaktionsgefäß unter leichten Überdruck gesetzt (200 mbar), damit durch das Steigrohr Flüssigkeit in ein Probennahmegefäß gelangen kann. Das Wechseln des Gefäßes erfolgt über die Schnelldkupplung im sterilen Raum über einer Gasflamme. Abb. 4.3.2 zeigt eine schematische Zeichnung des Fermentationssystems.

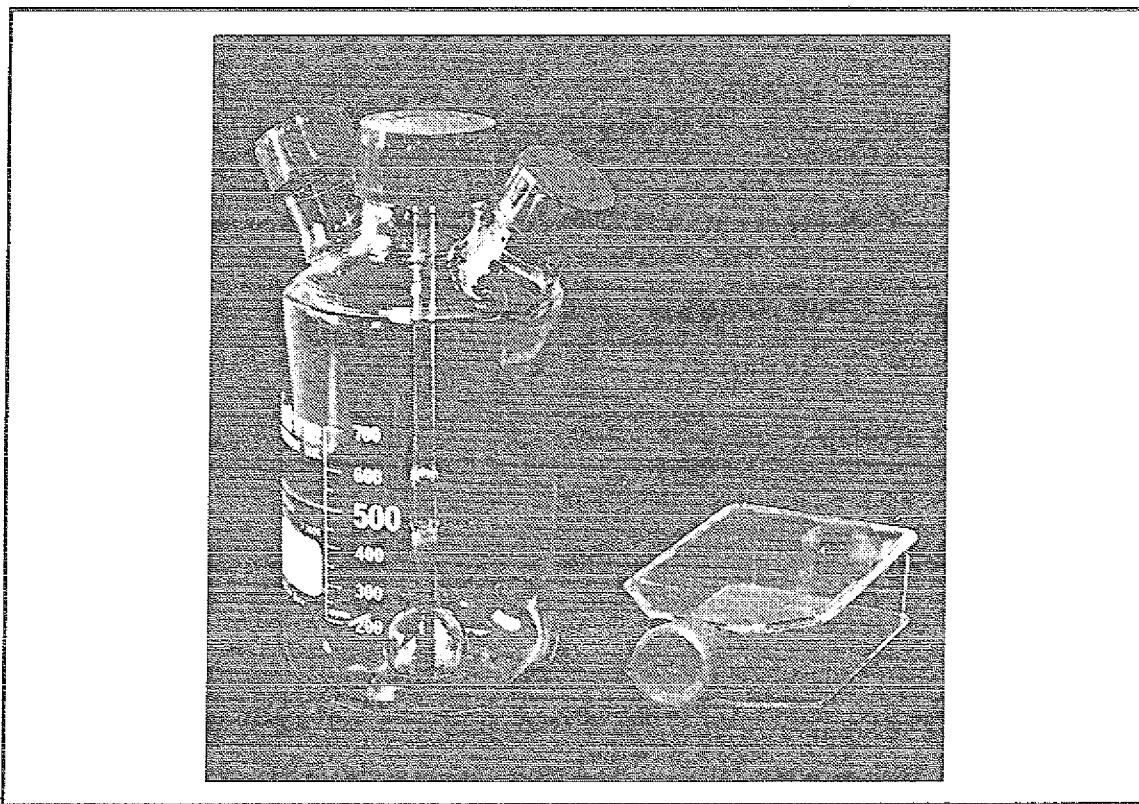


Abb. 4.3.1: Photographische Aufnahme einer T-Flasche und eines Spinner-Gefäßes

Die Inbetriebnahme des Fermenters erfolgt nach folgenden Schritte:

- Zusammenbau des Reaktors, Eichen der Sonden

- Autoklavieren des kompletten Systems mit 50 ml hochreinem, pyrogenfreiem Wasser (incl. Ba-sengefäß)
- Nach Abkühlen Befüllen mit 1,5 l sterilfiltriertem Medium
- Temperieren des Medium
- Zentrifugieren einer Suspension von $1,5 \cdot 10^8$ vitalen Zellen insgesamt für 5 min. bei 500 U/min
- Verwerfen des Überstandes, Aufnehmen in 50 ml frischem Medium
- Überführung der Suspension in ein Inokulationsgefäß
- Anschluß der Inokulationsgefäßes mit einer Schnellkupplung an den Fermenter
- Anlegen von 200 mbar Überdruck an das Inokulationsgefäß
- Überführen des Inokulums mittels Überdruck in den Fermenter
- Inokulumsdichte $1 \cdot 10^5$ vitale Zellen/ml

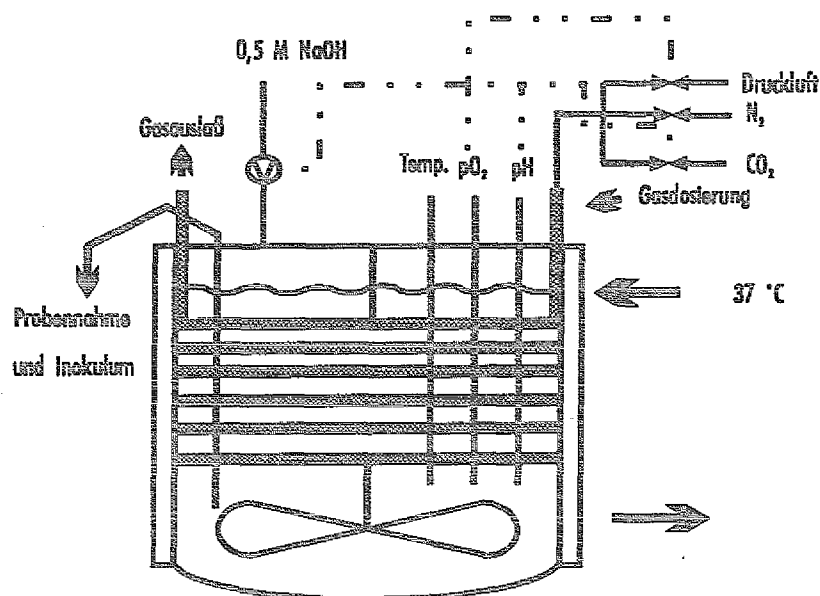


Abb. 4.3.2: Schematische Ansicht des Rührkesselreaktors

4.3.3 Kleinwirbelschichtreaktor

Die Ergebnisse der Antikörperproduktion im Wirbelschichtreaktor im Pilotmaßstab hatten nahegelegt, ein leicht handhabbares Kleinsystem zu entwickeln, mit dem die grundlegenden Untersuchungen zur Arbeit mit immobilisierten Hybridomazellen durchgeführt werden konnten. Es wurde daher in Anlehnung an die Auslegungsdaten des System 200 (s. Exkurs in Kap. 2) eine Maßstabsverkleinerung zum bench-scale konzipiert. Es ergab sich ein Gesamtreaktorvolumen von 150 ml bei einem standardisiert eingesetzten Wirbelschichtvolumen von 30 ml Schüttvolumen, was unter Standardfermentationsbedingungen einem expandierten Volumen von ca. 50 ml entspricht. Hierbei wurde die Expansion des Wirbelbettes mit einer peristaltisch arbeitenden Pumpe bei einer Umlaufgeschwindigkeit von 50 ml/min erreicht. In Analogie zum größeren System erfolgt der Gaseintrag extern blasenfrei im Umlauf, d.h. das Medium wird durch einen dünnwandigen Silikonschlauch geführt, der sich in einem Begasungsgefäß befindet. Dieses wird kontinuierlich von einem Gasgemisch durchströmt, der Gaseintrag erfolgt diffusiv infolge des Konzentrationsgradienten von der Gas- zur Flüssigkeitsseite. Ebenfalls analog zum System 200 werden pH und pO_2 gemessen und geregelt, wobei die Zusammensetzung des das Begasungsgefäß durchströmenden Gasgemischs vom pO_2 bzw. pH-Regler eingestellt wird. Die Korrektur des pH nach oben kann mit 0,5 M NaOH durchgeführt werden, infolge der bei den in Kapitel 6 beschriebenen Experimenten sehr hohen Durchflußraten, konnte auf eine solche Maßnahme verzichtet werden. Durch den verringerten Glukose-Umsatz bei hohen Durchflußraten wird weniger Laktat gebildet, daher erübrigt sich eine pH-Korrektur bei kurzen Verweilzeiten. Die Regelung von pO_2 und pH wird rechnergesteuert von einem am Institut für Biotechnologie entwickelten Meßdatenerfassungs- und Auswertesystem (MEAS) vorgenommen, wobei durch die Regelung Zwei-Wege-Ventile für O_2 und CO_2 geschaltet werden, die die entsprechenden Korrekturgase in einen Trägergasstrom aus Druckluft dosieren. Das System ist kontinuierlich betreibbar, am höchsten Punkt des Reaktors befindet sich ein Ablauf, der zum Produktgefäß führt; die Zudosierung von Frischmedium erfolgt in die Reaktorröhre selbst oberhalb des expandierten Wirbelbettes, um eventuell beim Ausgasen des Mediums entstehende Gasblasen nicht in das Wirbelbett gelangen zu lassen. Dies kann zum Verklumpen der Träger und zu einem Austragen eines Teils des Bettes in den Reaktorumlauf führen. Das Frischmedium wird gekühlt vorgelegt, um den chemischen Zerfall des Glutamins unter Bildung von Ammonium (s. Kap. 3.1 und 3.2) zu minimieren. Das Medium erwärmt sich im Zulaufschlauch auf Raumtemperatur; hierdurch kann das o.a. Ausgasen, z.B. von CO_2 aus dem Carbonat-gespufferten Medium, zustandekommen. Das Reaktorsystem ist so konzipiert, daß es von einer Person alleine betrieben werden kann, alle steril vorzunehmenden Manipulationen am System wie Inokulum, Probennahme, Carrierentnahme u.s.w. können unter einer sterilen Werkbank (Clean-bench) erfolgen. Der Reaktorausgang ist mit einem Schraubdeckel versehen, der im sterilen Bereich abgenommen werden kann; somit ist ein direkter Zugang zum Fließbett möglich, was sich in einer besonders einfachen Probennahme, auch von Carriermaterial äußert.

Abb. 4.3.3 zeigt das Fließbild des Kleinwirbelschichtreaktors, Abb. 4.3.4 eine photographische Aufnahme.

Die Inbetriebnahme des Reaktors erfolgt nach folgendem Schema:

- Zusammenbau des Systems, Eichen der Sonden
- Autoklavieren des Systems, gefüllt mit hochreinem, pyrogenfreiem Wasser

- Steriles Ablassen des Kondenswassers nach dem Autoklavieren
- Befüllen des Systems mit sterilfiltriertem Medium incl. 1 % FCS
- Einfüllen von 30 ml (Schüttvolumen) entgaster Mikroträger
- Spülen des Systems über Nacht mit drei Reaktorvolumina serumhaltigem Medium (Trägerkonditionierung)
- Zentrifugation einer insgesamt mindestens $7,5 \cdot 10^7$ vitale Zellen enthaltenden Zellsuspension (5 min. bei 500 U/min)
- Verwerfen des Überstandes, Aufnehmen des Zellpellets in 15 ml serumhaltigem Medium
- Einfüllen des Inokulums in den Reaktor unter der sterilen Werkbank
- Absitzen des Inokulums für 45 min.
- Nach 45 min. Einschalten der Umlaufpumpe
- Anfahren des Reaktors nach dem optimierten Anfahrschema (s. Kap. 6) mit serumhaltigem Medium, nach Erreichen eines stationären Betriebszustandes Umstellen auf serumfreies Medium.

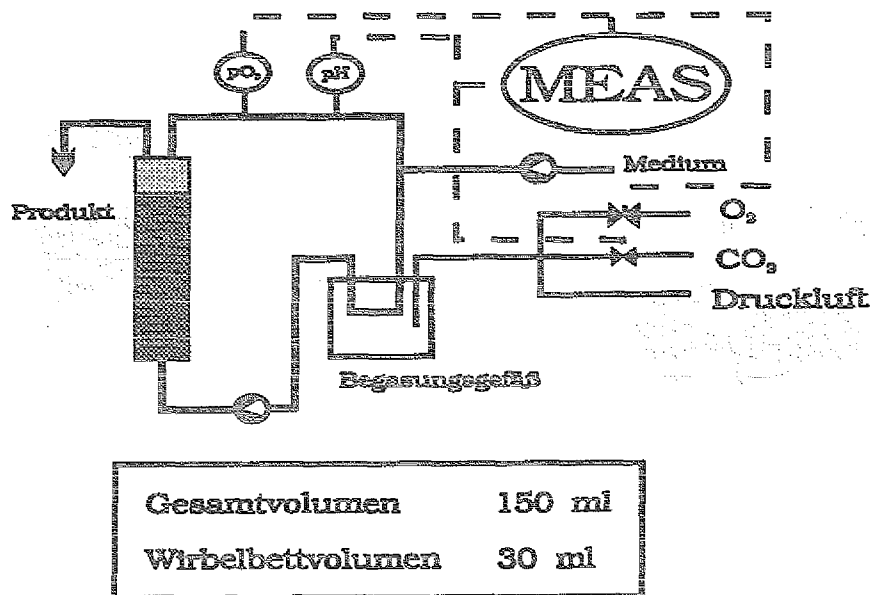


Abb. 4.3.3: Schematische Ansicht des Kleinwirbelschichtreaktors

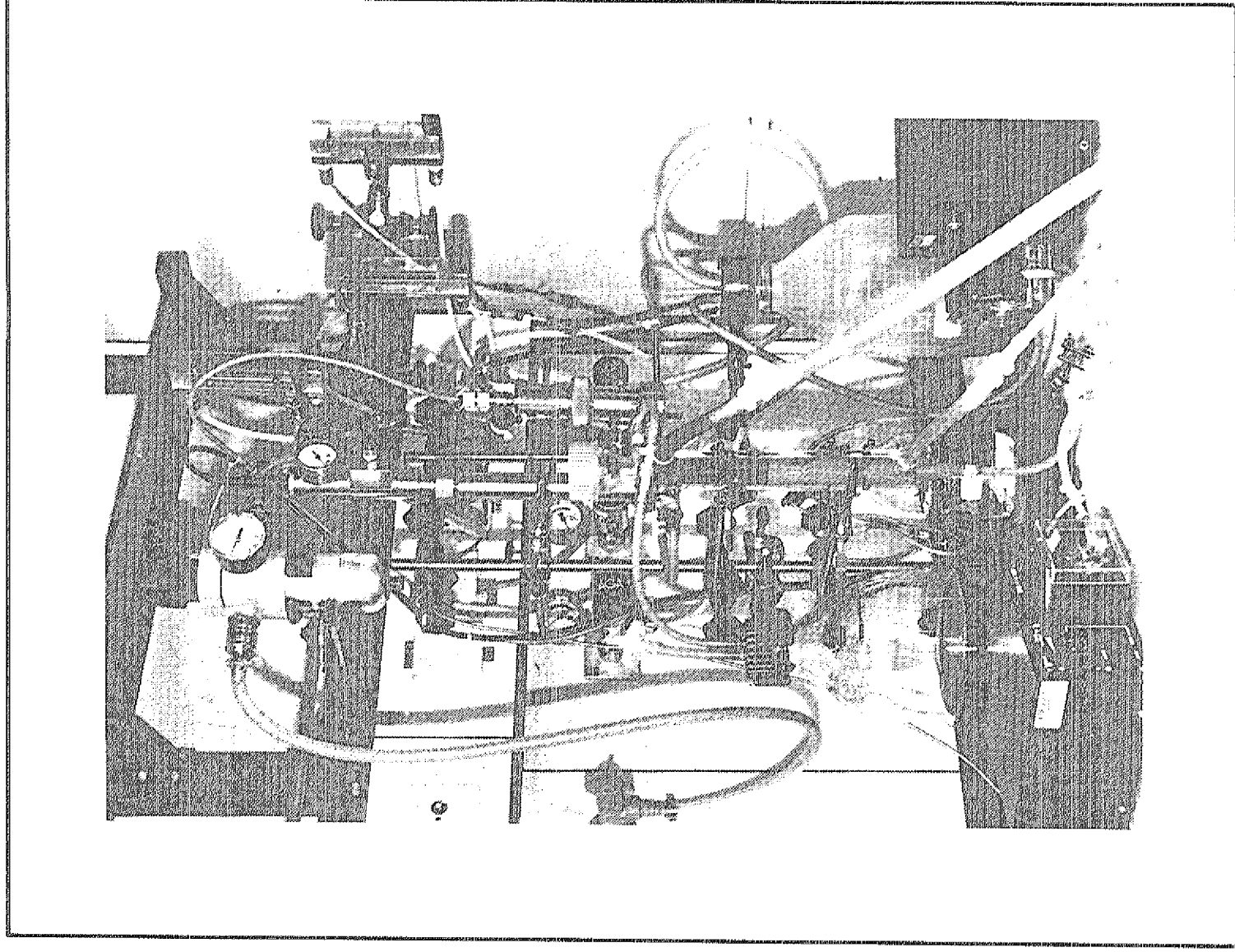


Abb. 4.3.4: Photographische Aufnahme des Kleinwirbelschichtreaktors

5. Ermittlung der kinetischen Daten von Wachstum und Produktivität in ruhender Kultur

5.1 Einführung

Bei der Planung einer Produktion von Wertstoffen mit biologischen Systemen stellen sich dem Betreiber unter anderem folgende Fragen:

- Unter welchen Bedingungen erreicht man eine maximale Biokatalysatorkonzentration, d.h. bei der Arbeit mit wachsenden Kulturen stellt sich die Frage nach den optimalen Wachstumsbedingungen
- Auf welche Art und Weise sind Wachstum und Produktbildung bei dem vorliegenden Organismus verknüpft

Die Beantwortung dieser Fragen stellt die Grundlage der Entscheidung für ein Kulturmedium sowie für ein geeignetes Reaktorsystem dar. Gerade im Fall von Säugerzellkulturen sollte die Wahl des Bioreaktors auf die Bedürfnisse des Produzenten abgestellt sein, da optimierte Kulturbedingungen, die denen *in vivo* nahekommen, der Produktivität *in vitro* am zuträglichsten sind. Im allgemeinen dient die Bestimmung der kinetischen Parameter von Wachstum und Produktivität zur Klärung der o.a. Fragen. Durch die Beschreibung der Abhängigkeiten der Wachstumsrate μ sowie der spezifischen Produktbildungsrate q_p von unterschiedlichen Substrat- bzw. Metabolitkonzentrationen kann ein optimiertes Kulturmedium erstellt werden. Zusätzlich ergibt sich aus der mathematischen Formulierung dieser Abhängigkeiten die Möglichkeit, ein Modell für Wachstum und Produktbildung der Kultur zu erstellen. Dieses Modell kann dann in die Simulation von Betriebszuständen unterschiedlicher Reaktorsysteme Eingang finden und somit eine Entscheidungsfindung bezüglich des Reaktorsystems erleichtern.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter empfiehlt sich die Wahl eines möglichst einfachen und leicht handhabbaren Kultursystems, da die unterschiedlichen Abhängigkeiten eine große Anzahl unabhängiger Messungen erfordern. Eine ausgezeichnete Möglichkeit für kinetische Messungen bietet ein kontinuierlich betriebener Rührkesselreaktor (CSTR). In chemo- oder turbidostatischer Fahrweise können Betriebszustände eingestellt werden, die verlässliche steady-state Daten liefern. Gerade Hybridomazellen können als Suspensionszellen in solchen Reaktoren gut kultiviert werden, haben allerdings den Nachteil sehr langer Generationszeiten ($t_d \max 24 \text{ h}$). Da kinetische Messungen im kontinuierlichen Betrieb im allgemeinen durch Veränderung der Durchflußrate durchgeführt werden ergibt sich eine sehr lange Versuchsdauer. Ein Rechenbeispiel mag dies verdeutlichen: Eine maximale Verdopplungszeit von 24 h ergibt eine maximale Durchflußrate von $0,042 \text{ h}^{-1}$ im Chemostatbetrieb. Soll ein Bereich von $0,005 \text{ h}^{-1}$ bis $0,042 \text{ h}^{-1}$ (dies entspricht Verweilzeiten zwischen 200 und 24 h, als Stationaritätsbedingung wurde das Abwarten von fünf Verweilzeiten (= 99 % steady state) angesetzt) in beispielsweise zehn äquidistanten Meßpunkten abgedeckt werden, ergibt sich eine Versuchsdauer von ca. acht Monaten.

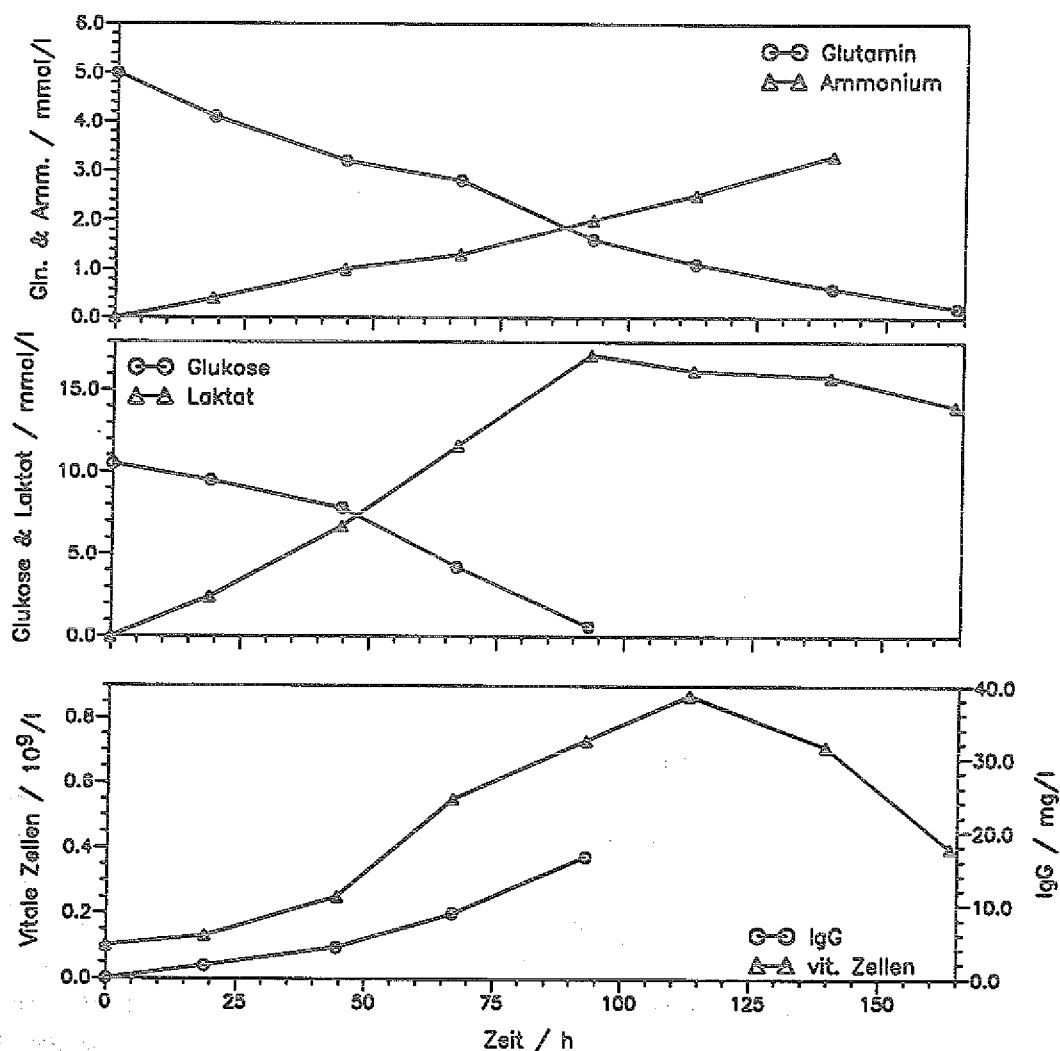


Abb. 5.1.1: Charakteristischer Verlauf einer Wachstumskurve

Hiller *et al.* (1991) haben solche Messungen mit Hybridomazellen durchgeführt und stellten Schwierigkeiten beim Reproduzieren von Meßwerten bei einer solch langen Versuchsdauer fest. Es stellt sich hier deutlich die Frage nach der Sinnfälligkeit solcher Experimente, wenn die dadurch gewonnenen Daten nicht verlässlich sind. Die genetische Instabilität von Hybridomazellen legt die Wahl einer alternativen Methode zur Bestimmung der Kinetik nahe.

Eine besonders einfache Methode der Kultivierung von Hybridomazellen stellt ihre Aufzucht in T-Flaschen (s. Kap. 4.3) dar. Die Ausführung vieler Parallelversuche in relativ kurzer Zeit bietet eine gute Möglichkeit zur Ermittlung der Wachstums- und Produktionskinetik. Man muß allerdings bedenken, daß ein Versuch im Satzbetrieb, wie er in ruhender Kultur vorliegt, ständig wechselnden Medienbedingungen unterliegt, d.h. es werden keine stationären Zustände wie im kontinuierlichen Betrieb erreicht. Mit einer korrekten Bestimmung der

Raten von Wachstum, Produktbildung und Substrataufnahme in der exponentiellen Phase ist jedoch eine Bestimmung der kinetischen Parameter möglich.

Die Planung der Experimente zur Ermittlung der Kinetik von Wachstum und Produktbildung der Hybridomazelllinie VX 12 erfolgte in Anlehnung an die Erkenntnisse aus dem Versuch zur Antikörperproduktion im Pilotmaßstab (s. Exkurs Kap. 2) sowie entsprechend den aus der Literatur entnommenen Erfahrungen (s. Kap. 3). Es wurde daher die Abhängigkeit von den beiden wichtigsten Substraten Glukose und Glutamin sowie von den bisher am besten beschriebenen Inhibitoren Ammonium und Laktat bestimmt.

Die experimentelle Vorgehensweise war die folgende: Es wurden maximal acht Parallelversuche durchgeführt, wobei alle Versuche aus einer Vorkultur inokuliert wurden, eine Kultur wurde als Kontrolle unter Standardmedienbedingungen (20 mM Glukose, 3 mM Glutamin) mitgeführt. Die Kulturen wurden bis zu ihrem Ende, d.h. bis ans Ende der Absterbephase (s. Kap. 3.4) geführt und ihr Fortschreiten in 24 stündigem Rhythmus durch Probenahme überprüft. Ein typischer Kulturverlauf ist in Abb. 5.1.1 zu erkennen, charakteristisch für Säugerzellen ist der überaus scharfe Umkehrpunkt der vitalen Zellzahl ohne echte stationäre Phase. Hierin zeigt sich der hohe Bedarf von Säugerzellen an Maintenance-Energie, der im Gegensatz zu Bakterien bei Substratlimitierung zum sofortigen Absterben der Kultur führt.

Im folgenden soll gezeigt werden, wie sich aus einer solchen Wachstumskurve die notwendigen Daten generieren lassen:

Der Verlauf der Konzentration an vitalen Zellen über die Versuchsdauer bietet Zugang zur maximalen Wachstumsrate ($\mu_{\max}$) unter den existierenden Versuchsbedingungen: Eine Auftragung im halblogarithmischen Maßstab läßt die Phase exponentiellen Wachstums als linearen Bereich erkennen, eine lineare Regression über diesen Bereich liefert $\mu_{\max}$ als Steigung. Die Auswertung der Konzentrations-Zeit-Verläufe der Substrate und Metabolite sowie des Produkts IgG_{2A} erlauben die Bestimmung der zellspezifischen metabolischen Raten unter den herrschenden Medienbedingungen. Die mathematische Auswertung erfolgt nach dem Ansatz von Glacken *et al.* (1988):

$$(5.1.1) \quad dS(t)/dt = -q_S \cdot X(t) = -q_S \cdot X_0 \cdot e^{\mu t}$$

Hierbei wird eine konstante Substrataufnahme, ausgedrückt durch die Rate q_S , während des exponentiellen Wachstums angenommen. Die Lösung dieser Differentialgleichung ergibt folgenden Ausdruck:

$$(5.1.2) \quad S(t) = (S_0 + q_S \cdot X_0 / \mu) - q_S / \mu \cdot X(t)$$

Eine Auftragung von $S(t)$ gegen $X(t)$ liefert eine Gerade, deren Steigung q_S/μ entspricht und durch Multiplikation mit der - wie oben beschrieben ermittelten - Wachstumsrate die spezifische Substrataufnahme ergibt. Dieses Vorgehen kann für Glukose als Substrat und für die Stoffwechselprodukte Laktat sowie IgG wie beschrieben durchgeführt werden.

Hierbei muß bedacht werden, daß dieses lineare Verhalten nicht über den gesamten Kulturverlauf gilt, die Abhängigkeit der Substrataufnahme von der Substratkonzentration fordert eine Beschränkung auf den Bereich geringer Substratumsätze. Abb. 5.1.2 zeigt den "wahren" Verlauf einer Auftragung von $S(t)$ gegen $X(t)$, wobei der auswertbare lineare Bereich zwischen den gestrichelten Markierungen zu erkennen ist.

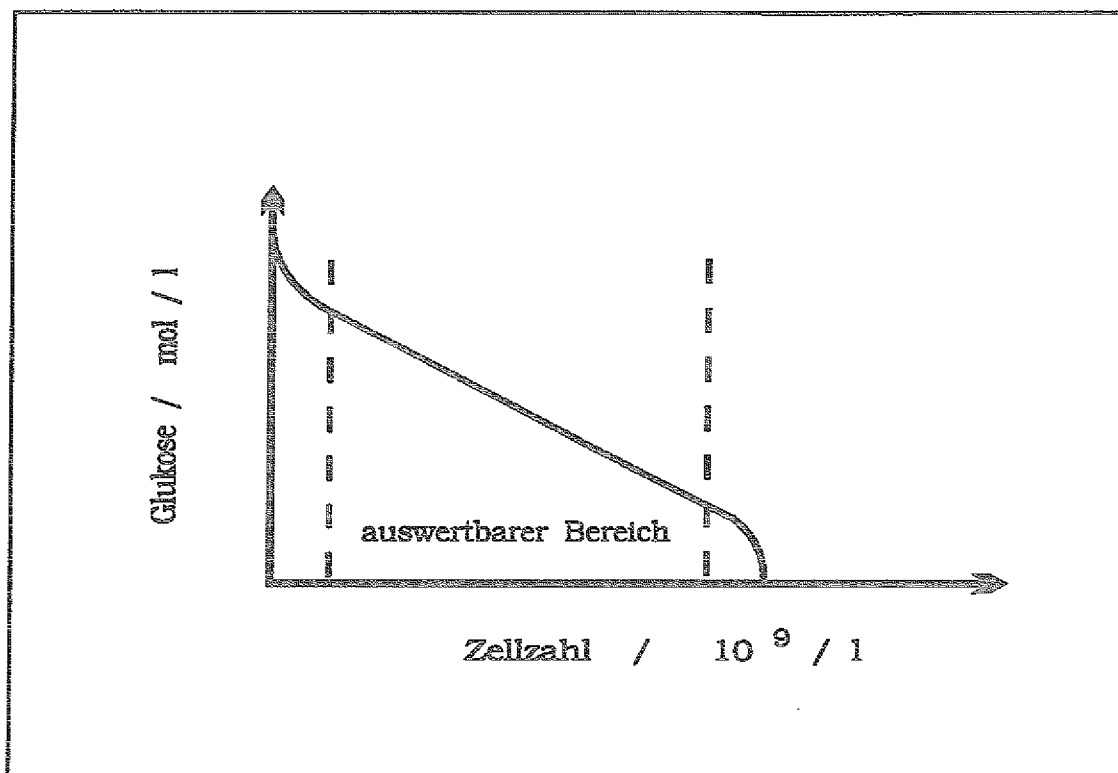


Abb. 5.1.2: "Wahrer" Verlauf von $S(t)$ gegen $X(t)$

Als Nachweis für die Richtigkeit der hier gemachten Annahmen dient Abb. 5.1.3; hier ist der lineare Verlauf der Beziehung $S(t)$ gegen $X(t)$ während der Phase exponentiellen Wachstums exemplarisch für Glukose und IgG gezeigt ($X_0 = 1 \cdot 10^5$ vitale Zellen /ml, $\text{Gluc}_0 = 10$ mM, $\text{Gln}_0 = 3$ mM).

Im Falle von Glutamin muß das Verfahren infolge des chemischen Glutaminzerfalls unter Ammoniumfreisetzung modifiziert werden; in Gleichung 5.1.1 muß der Zerfall nach einer Reaktion erster Ordnung mit einbezogen werden.

$$(5.1.3) \quad \frac{d\text{Gln}}{dt} = -k \cdot [\text{Gln}] - q_{\text{Gln}} \cdot X(t)$$

$$(5.1.4) \quad \frac{d\text{Amm}}{dt} = k \cdot [\text{Gln}] + q_{\text{Amm}} \cdot X(t)$$

Für die Phase exponentiellen Wachstums ($X = X_0 \cdot e^{\mu t}$) ergibt sich folgende Lösung:

$$(5.1.5) \quad \text{Gln}(t) = [\text{Gln}_0] \cdot e^{-kt} + q_{\text{Gln}} \cdot (e^{-kt} \cdot e^{\mu t}) \cdot X_0 / (\mu + k)$$

In Gleichung 5.1.5 existiert nur eine unbekannte Größe, die spezifische Glutaminverbrauchsrate q_{Gln} , alle anderen Größen wie die Animpfdichte X_0 , die Wachstumsrate μ sowie die Konstante des chemischen Zerfalls k

($0,0024 \text{ h}^{-1}$, Hambach 1991) sind bereits bekannt. Man kann nun durch eine Anpassung der Meßwerte der Glutaminkonzentration an den Kurvenverlauf von Gleichung 5.1.5 die zellspezifische Glutaminverbrauchsrate mit Hilfe einer Optimieroutine (Freyer und Wedy 1990) errechnen. Die spezifische Ammoniumbildungsrate ergibt sich analog.

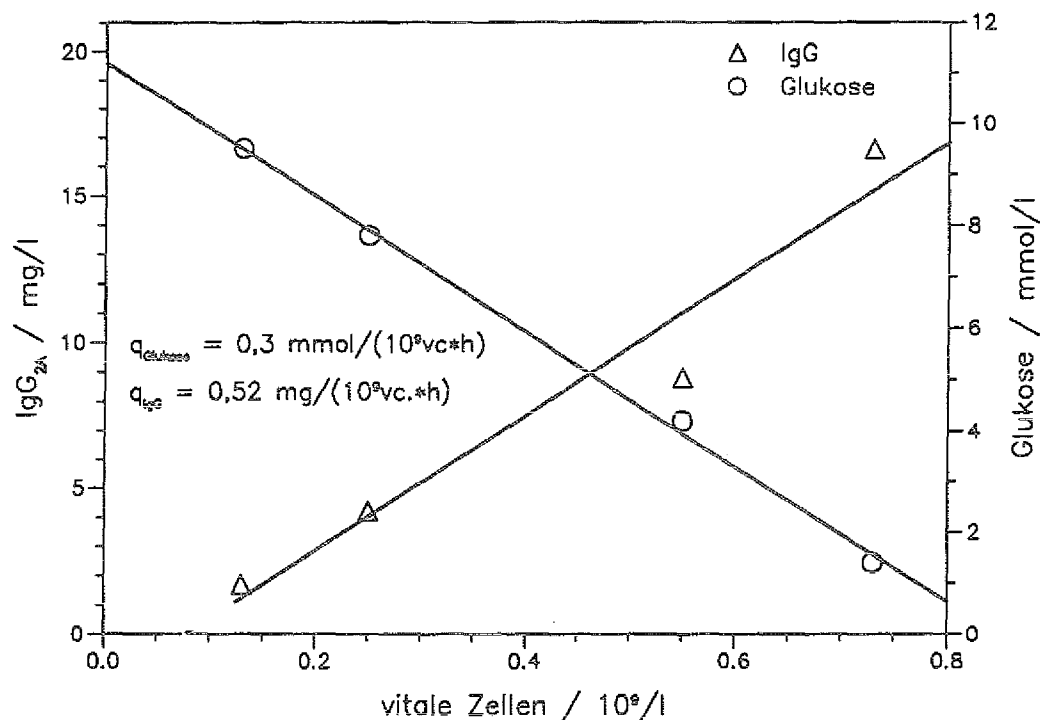


Abb. 5.1.3: Linearer Verlauf von $Gluc(t)$ und $IgG(t)$ gegen $X(t)$

Die ermittelten Werte können als die zellspezifischen Raten unter den durch das Experiment vorgegebenen Anfangsbedingungen angesehen werden; die Auftragung der Raten über den dazugehörigen Anfangskonzentrationen bietet die Möglichkeit, die kinetischen Parameter, wie in Kap. 3.4 gezeigt, zu ermitteln. Die Beschränkung auf relativ niedrige Substratumsätze bedeutet eine Bestimmung der kinetischen Daten unter "Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen", d.h. der Einfluß der Substratkonzentration auf die Substrataufnahme wird vernachlässigbar. Im hier vorliegenden Fall wurden die Experimente bis zu einem Umsatz von maximal 50 % ausgewertet. Dies geht über den Bereich der "Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen" hinaus, d.h. die gemachten Annahmen gelten in abgeschwächter Form. Die hier vorgestellte Methode der Ermittlung von kinetischen Daten in ruhender Kultur ist daher nicht so exakt wie ein kontinuierliches Verfahren im steady-state, nichtsdestoweniger geben die hier gewonnenen Erfahrungen einen guten Einblick in metabolische Zusammenhänge. Kapitel 5.5 wird zeigen, daß solange die Daten quantitativ nicht überbewertet werden, eine Beschreibung des Hybridoma-Wachstums mit diesen Ergebnissen gut vorgenommen werden kann.

Bei der Bestimmung kinetischer Daten von Säugerzellen in ruhender Kultur ist es wichtig, sich die Fehlerbehaftung der Meßwerte genau vor Augen zu führen. Satzreaktorversuche in T-Flaschen bieten zwar die Möglichkeit viele Parallelversuche durchzuführen und damit eine große Anzahl von Daten in relativ kurzer Zeit zu generieren, sie sollen aber mehrheitlich Tendenzen wiedergeben, die dem Experimentator Voraussagen über optimale Betriebsbedingungen bei der Produktion ermöglichen sollen. Eine wichtige Fehlerquelle ist die Bestimmung der Zellzahl in ruhender Kultur. Die Probenahme erfolgt in einem 24-stündigen Rhythmus durch Entnahme eines Aliquots von einem ml Zellsuspension. Hierbei muß auf eine repräsentative Probenahme geachtet werden, wobei Adhäsionsphänomene auch von Suspensionszellen auf der Oberfläche der Kulturflasche eine Rolle spielen. Die Zellzählung selbst erfolgt mikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer definierten Volumens, auf deren sorgfältiges Füllen geachtet werden muß. Der Fehler bei der Bestimmung der Zellkonzentration in Suspension muß infolge dieser Zusammenhänge mit $\pm 10\%$ angesetzt werden. Die Bestimmung der Substrat- und Metabolitkonzentrationen in enzymatischen Tests ist nach eigenen Erfahrungen mit einem durchschnittlichen Fehler von $\pm 5\%$ behaftet. Der zur Antikörpermessung verwendete ELISA-Test weist eine Streubreite von $\pm 10\%$ auf, hier konnte allerdings durch das Umsteigen auf eine chromatografische Methode (s. Kap. 4) der Fehler auf $\pm 2\%$ abgesenkt werden. Aufgrund der hier geschilderten Zusammenhänge dürfen starke Streubreiten der Werte bei Messungen in ruhender Kultur nicht verwundern. Solange man die Interpretation der erhaltenen Parameter nicht überbewertet, sondern eher als Tendenzanzeige versteht, ist der Erkenntnisgewinn aus diesen Messungen nicht zu unterschätzen.

5.2 Abhängigkeit der zellspezifischen Raten von den Substratkonzentrationen

Glukose

Die Variation der Anfangskonzentration an Glukose im Bereich zwischen zwei und 40 mM sollte den Einfluß der Glukosekonzentration auf Wachstum, Produktivität und Glukoseverbrauch zeigen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.2.1 bis 5.2.3 zu sehen, wobei die durchgezogenen Linien eine Simulation anhand der unten formulierten Modellgleichungen darstellen. Es zeigt sich wie zu erwarten ein Anstieg der Glukoseaufnahme mit steigender Glukosekonzentration in Form einer Sättigungskinetik.

Die Existenz eines Crabtree-Effekts bei Hybridomazellen wird an dieser Stelle noch einmal eindrucksvoll unterstrichen. Dieser Effekt beschreibt die Erhöhung der Glukoseaufnahme von Hefen bei einer gesteigerten Glukosekonzentration im Medium. Das Wachstum der Zelllinie VX 12 zeigt zwar auch eine Sättigungskinetik ähnlich der spezifischen Glukoseaufnahmerate, die K_S -Werte unterscheiden sich um mehr als den Faktor zehn. Man erkennt hier, daß wie in Kapitel 3.1 beschrieben Glukose überschüssig aufgenommen werden kann, wobei durch den glykolytischen Abbau zu Laktat die Glukose relativ ineffizient wieder ausgeschleust wird, ohne daß

ein relevanter Energiegewinn erfolgt. Offensichtlich unterscheiden sich Hybridomazellen in ihrem gestörten Glukosestoffwechsel nicht von Tumorzellen (Fiechter und Gmünder 1989). Eine genaue Betrachtung der Verläufe der spezifischen Wachstums- und Produktionsrate mit steigender Glukosekonzentration deutet eine Überschußinhibierung im Bereich von Konzentrationen oberhalb von 30 mM an. Da die Glukose zum unveränderten Standardmedium zugegeben worden war, zeigt eine Bestimmung der Osmolarität der Medien zu Anfang der Kulturen mit mehr als 30 mmol/l Glukose Werte, die oberhalb des für VX 12 und Hybridomazellen im allgemeinen günstigen Bereichs (> 340 mOsmol/kg) liegen. Die Substratüberschußinhibierung für Glukose entpuppt sich also als eine Inhibierung durch zu hohe Medienosmolarität. Daher wird eine mathematische Beschreibung der Abhängigkeit der zellspezifischen Raten von der Glukosekonzentration auch als Sättigungskinetik formuliert.

$$(5.2.1) \quad q_{\text{Glc}} = q_{\text{Glc,max}} \cdot \frac{[\text{Glukose}]}{K_{q\text{Glc}} + [\text{Glukose}]}$$

$$(5.2.2) \quad \mu = \mu_{\text{max}} \cdot \frac{[\text{Glukose}]}{K_{\text{Glc}} + [\text{Glukose}]}$$

$$(5.2.3) \quad q_{\text{P}} = q_{\text{Pg,max}} \cdot \frac{[\text{Glukose}]}{K_{\text{PGlc}} + [\text{Glukose}]}$$

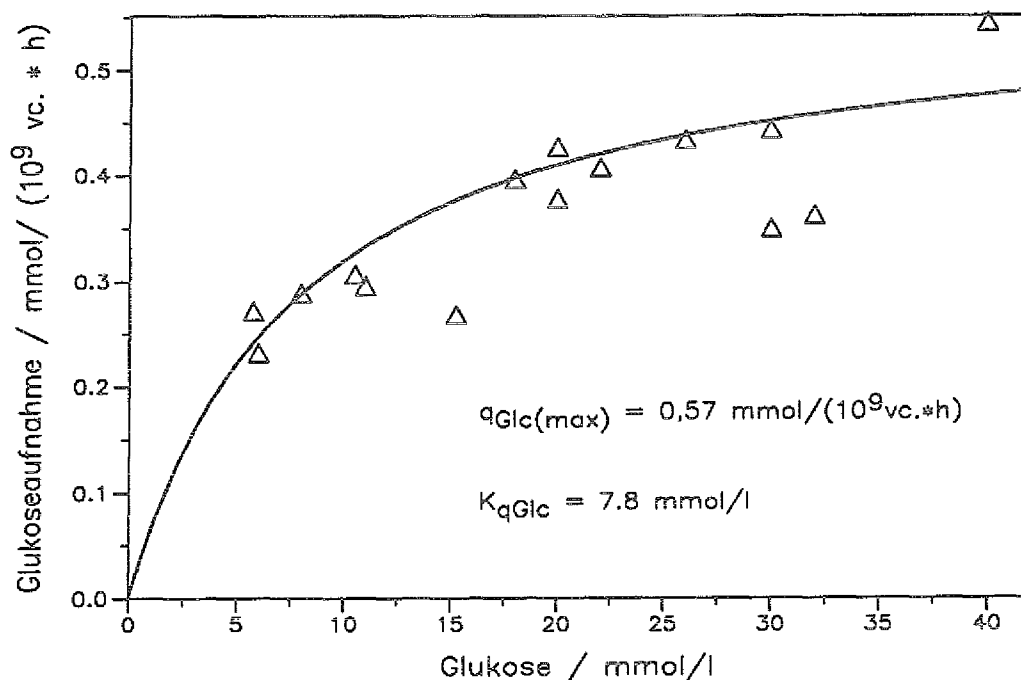


Abb. 5.2.1: Abhängigkeit der Glukoseaufnahme von der Glukosekonzentration ([Gln] = 5 mM)

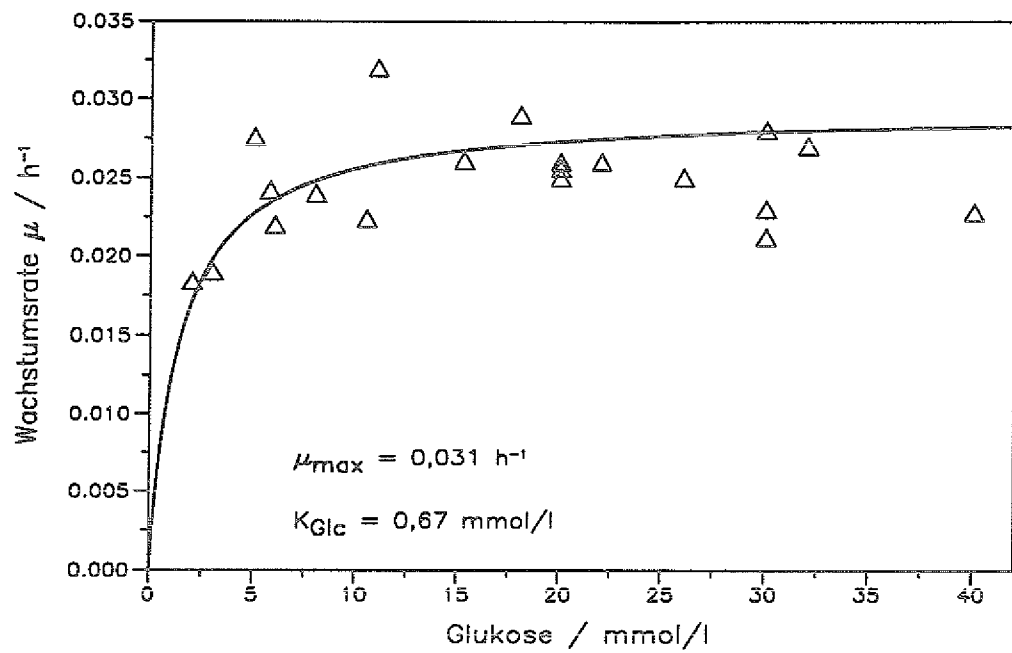


Abb. 5.2.2: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Glukosekonzentration ($[\text{Gln}] = 5 \text{ mM}$)

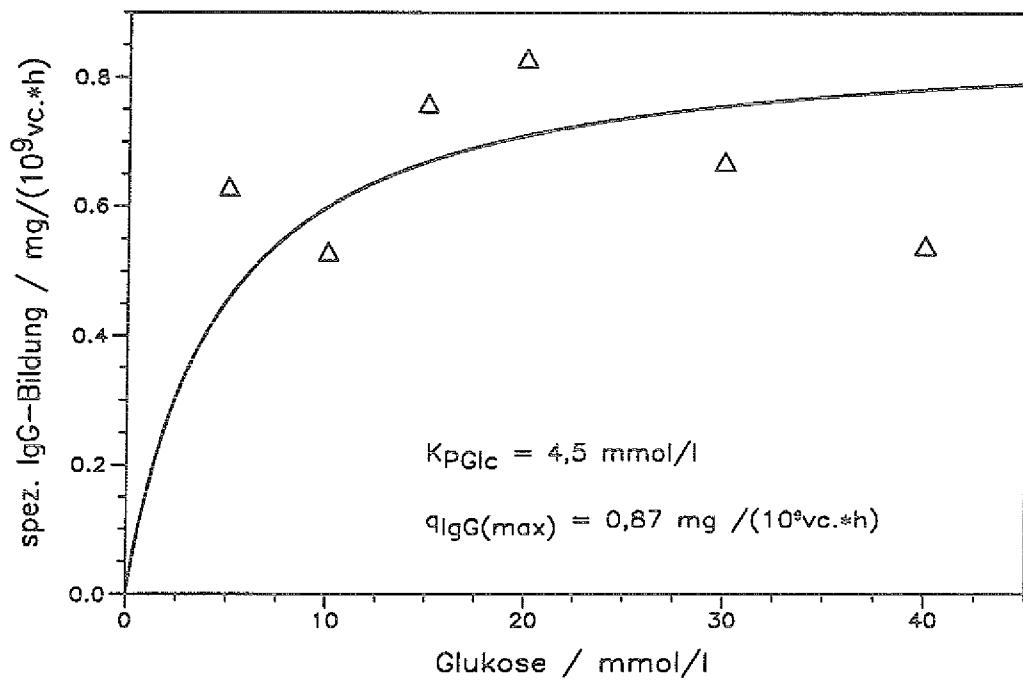


Abb. 5.2.3: Abhängigkeit der Produktivität von der Glukosekonzentration ($[\text{Gln}] = 5 \text{ mM}$)

Glutamin

Bei der Bestimmung der kinetischen Daten des Hybridomawachstums in Satzreaktorversuchen ergibt sich im Falle von Glutamin ein zusätzliches Problem: Wie in Kapitel 3.1 bereits erwähnt, zersetzt sich Glutamin in einer Reaktion erster Ordnung chemisch zu Pyrrolidon-Carbonsäure und Ammonium, wobei die Abbaurate linear mit der Glutaminkonzentration ansteigt. Hohe Anfangskonzentrationen an Glutamin bedeuten also von Anfang an eine hohe Freisetzung von Ammoniumionen unabhängig von der Aktivität der inokulierten Zellen. Da Ammonium bekanntermaßen inhibierend auf Säugerzellen wirkt, findet bei hohen Glutaminkonzentrationen eine Inhibierung durch freigesetztes Ammonium statt. Solange die anfängliche Glutaminkonzentration klein ist, ist die Umsatzrate der Zellen für Glutamin im Vergleich zur chemischen Umsetzung hoch, bei steigenden Glutaminkonzentrationen schlägt dieser Zusammenhang ins Gegenteil um. Man erhält somit einen

Rückgang der Wachstumsrate und der spezifischen Produktivität bei erhöhten Glutaminkonzentrationen, die Auftragung μ bzw. q_p gegen die Glutaminkonzentration zeigt eine typische Überschußinhibierung. Da diese Inhibierung nicht durch Glutamin, sondern durch chemisch freigesetztes Ammonium hervorgerufen wird, findet sie keinen Eingang in die mathematische Beschreibung der Wachstumskinetik. Man begrenzt die einzusetzenden Anfangskonzentrationen an Glutamin auf unbedenkliche Werte bis fünf mmol/l und beschreibt diesen Konzentrationsbereich mit einer Sättigungskinetik analog zu den Gleichungen 5.2.1 und 5.2.2. Die Aufnahme des Glutamins folgt der gleichen Form von Sättigungskinetik wie die Glukoseaufnahme (Gleichung 5.2.3). Abb. 5.2.6 bis 5.2.8 zeigen die Abhängigkeiten von Wachstum, Produktbildung und Glutaminaufnahme von der Anfangskonzentration an Glutamin, die durchgezogenen Linien stellen eine Simulation der Kinetik anhand des erwähnten Modells unter Vernachlässigung der scheinbaren Überschußinhibierung durch Glutamin dar.

An dieser Stelle zeigt sich wiederum die Problematik der Ermittlung kinetischer Daten im Satzreaktorbetrieb. Die biologische Ammoniumbildung ist eine Funktion der Zellzahl, die chemische dagegen eine Funktion der Glutaminkonzentration. Im kontinuierlichen Betrieb läßt sich daher das Verhältnis von chemischer zu biologischer Ammoniumbildung infolge der konstanten Bedingungen über die Verweilzeit fest einstellen (s. Abb. 5.2.4), wobei sich dieses Verhältnis im batch-Modus ständig ändert (Abb. 5.2.5).

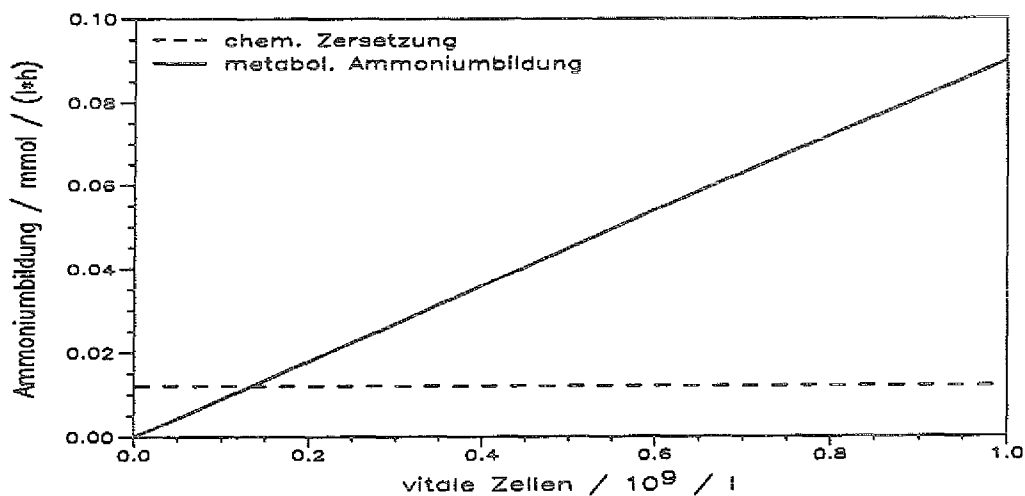


Abb. 5.2.4: Einstellbares Verhältnis von chemischer zu biologischer Ammoniumbildung im kontinuierlichen Betrieb

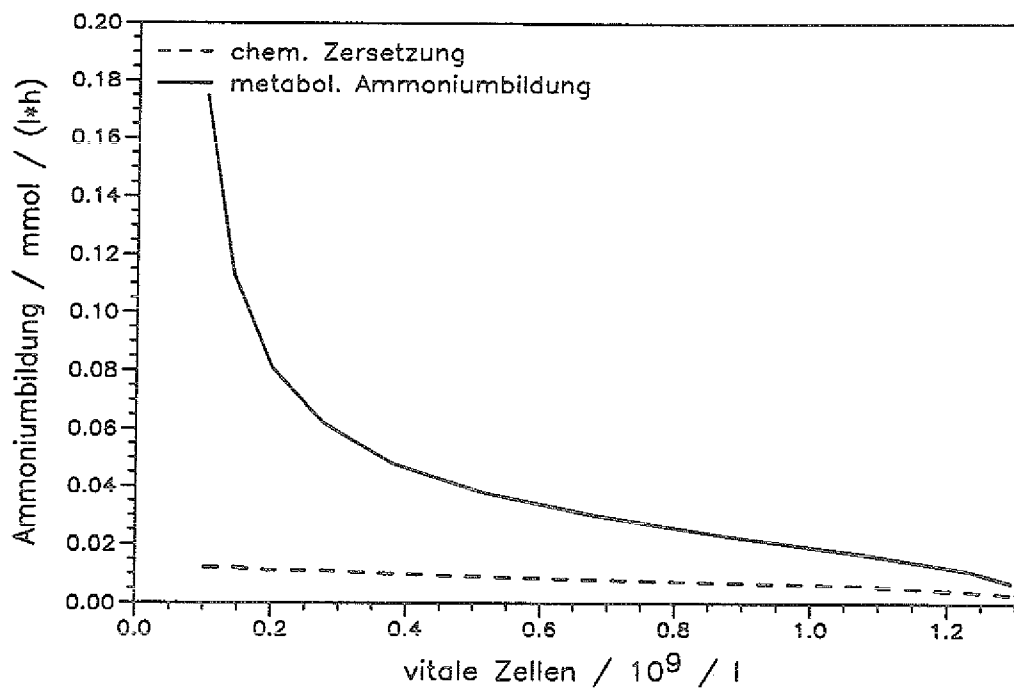


Abb. 5.2.5: Chemische und biologische Ammoniumbildung im batch-Modus

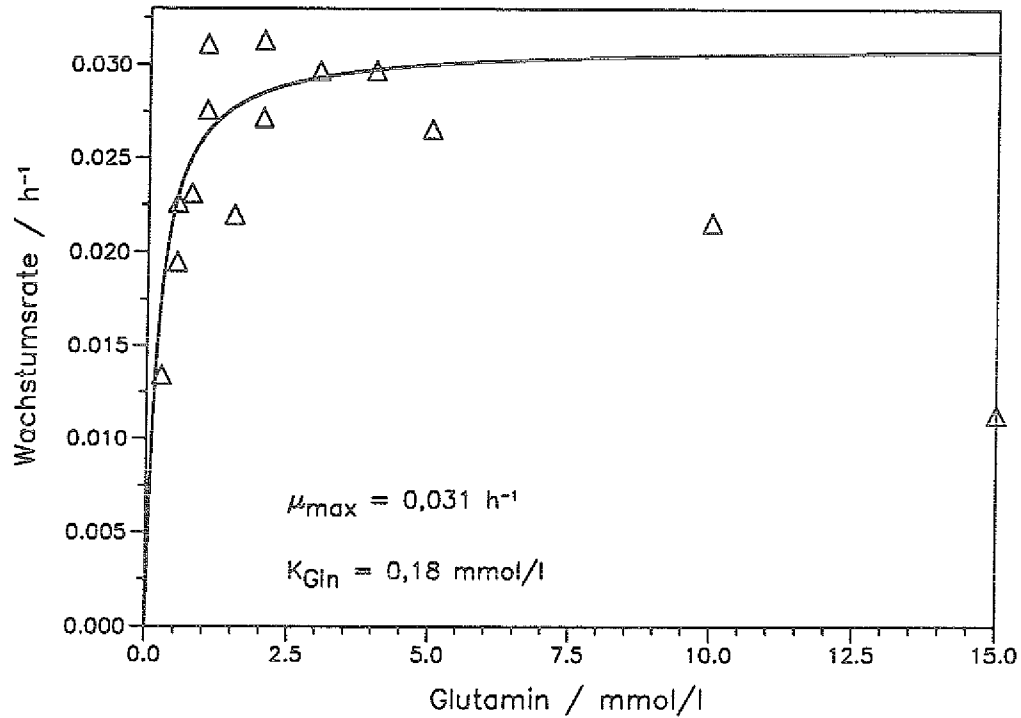


Abb. 5.2.6: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Glutaminkonzentration ([Glc.] = 20 mM)

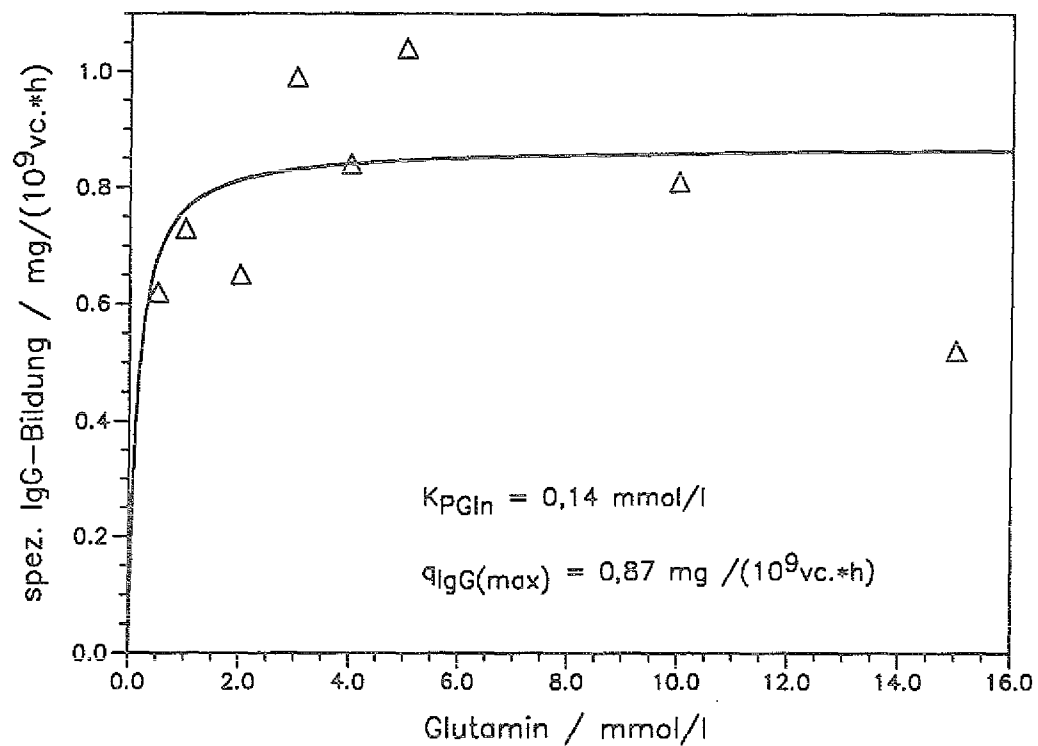


Abb. 5.2.7: Abhängigkeit der spezifischen Produktivität von der Glutaminkonzentration ([Glc.] = 20 mM)

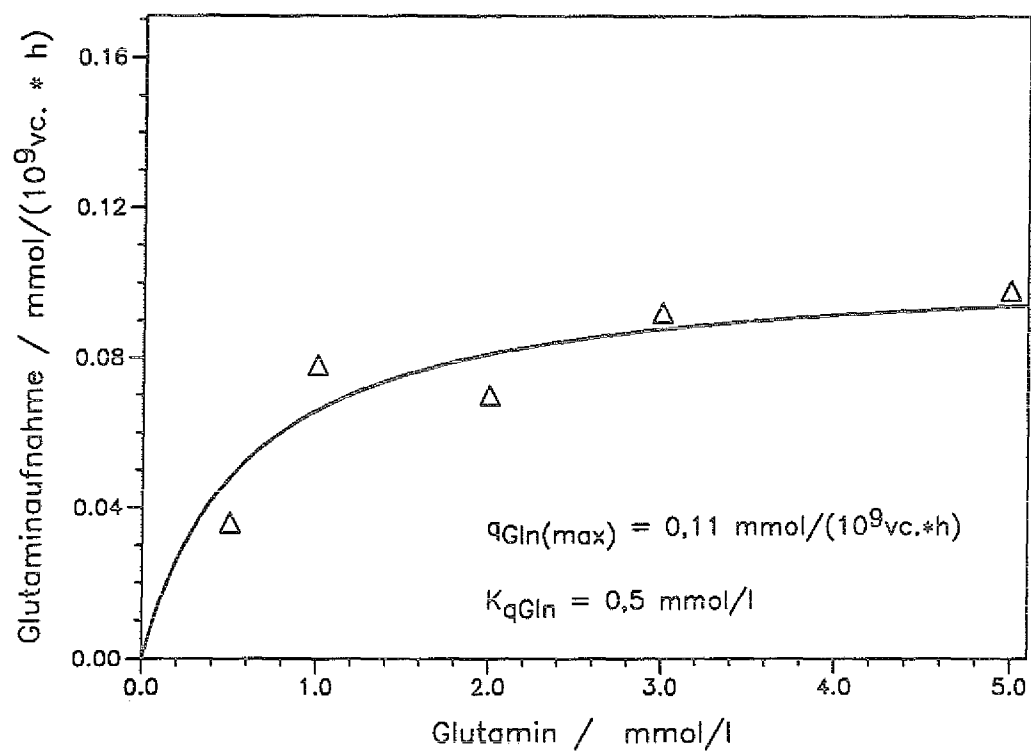


Abb. 5.2.8: Abhängigkeit der Glutaminaufnahme von der Glutaminkonzentration ([Glc.] = 20 mM)

Die in der Literatur beschriebene gegenseitige Beeinflussung der Aufnahmeraten der beiden Hauptenergie-substrate sollte auch im Rahmen der kinetischen Messungen untersucht werden. Die spezifische Glutaminaufnahme erwies sich hierbei als deutlich beeinflußt von der anfänglichen Glukosekonzentration. Man erkennt in Abb. 5.2.9 eine Abnahme des Glutaminverbrauchs mit steigender Glukosekonzentration. Die Ergebnisse von Zielke (1978) sowie von Donnelly und Scheffler (1976) zeigen, daß im Falle sehr niedriger Glukosekonzentrationen Glutamin als C-Quelle mit eingesetzt werden kann, daß andererseits aber überschüssige Glukose die Oxidation von Glutamin inhibieren kann.

Glutamin behindert zwar die oxidative Verwertung von Glukose (Zielke et al. 1978), der Glukoseabbau bei Hybridomazellen findet allerdings nur zu einem geringen Teil aerob via TCA statt, der überwiegende Teil der Glukose wird glykolytisch zu Laktat verstoffwechselt. Hiermit erklärt sich auch die relative Unabhängigkeit der Glukoseaufnahme von der Anfangskonzentration an Glutamin, wie sie in den hier vorgestellten Messungen auftritt (s. Abb. 5.2.10).

Die in Kapitel 3.1 geführte Argumentation bezüglich der reziproken Regulation der Substrataufnahme infolge eines unvollständigen Flusses durch den TCA (Abb. 3.1.2 und 3.1.2) findet sich an dieser Stelle bestätigt.

Eine mathematische Beschreibung der gegenseitigen Beeinflussung der Aufnahme der beiden Substrate muß davon ausgehen, daß eine Aufnahme des einen Substrates nur bei ausreichend großer Konzentration des anderen Substrates einen Sinn ergibt. Die Aufnahme von Glukose in einem Glutamin-freien Medium erscheint aufgrund der Unfähigkeit der Zellen, ohne den wichtigsten Stickstoff-Donor aufzuwachsen, unwahrscheinlich; ähnlich verhält es sich mit Glukose als Precursor für Ribose-Einheiten. Daher sollten multiplikativ verknüpfte, Monod-artige Ansätze zur Beschreibung der Substrataufnahme dienen. Die Inhibierung der Glutaminaufnahme wird dabei in Form einer Substratüberschußinhibierung angeschrieben. Hierbei stellen die unterschiedlichen Monod-Konstanten die Konzentrationen der Substrate dar, bei denen die jeweilige spezifische Substrataufnahmerate halbmaximal ist. K_{qGlc} bezeichnet die Glukosekonzentration, bei der die spezifische Glutaminaufnahmerate wieder auf die Hälfte ihres Maximalwertes abgesunken ist. Die Anpassung der Parameter der Gleichungen 5.2.4 und 5.2.5 an die Ergebnisse der kinetischen Messungen liefert vergleichbare Werte wie die "Einzelanpassungen" entsprechend Gleichung 5.2.1 ($q_{Glc,max} = 0,57 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$ sowie $0,53 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$; $q_{Gln,max} = 0,11 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$ sowie $0,09 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$).

$$(5.2.4) \quad q_{Gln} = q_{Gln,max} \cdot \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{qGln}} \cdot \frac{[Glc]}{[Gln] + K_{qGlc} + [Glc]^2/K_{qGlc}}$$

$$(5.2.5) \quad q_{Glc} = q_{Glc,max} \cdot \frac{[Glc]}{[Glc] + K_{qGlc}} \cdot \frac{[Gln]}{[Gln] + K_{qGln}}$$

Die wechselseitige Abhängigkeit der Substrataufnahmeraten von beiden Substraten empfiehlt eine dreidimensionale Darstellung entsprechend Gleichungen 5.2.4 und 5.2.5. Abb. 5.2.11 und 5.2.12 zeigen diese Darstellung.

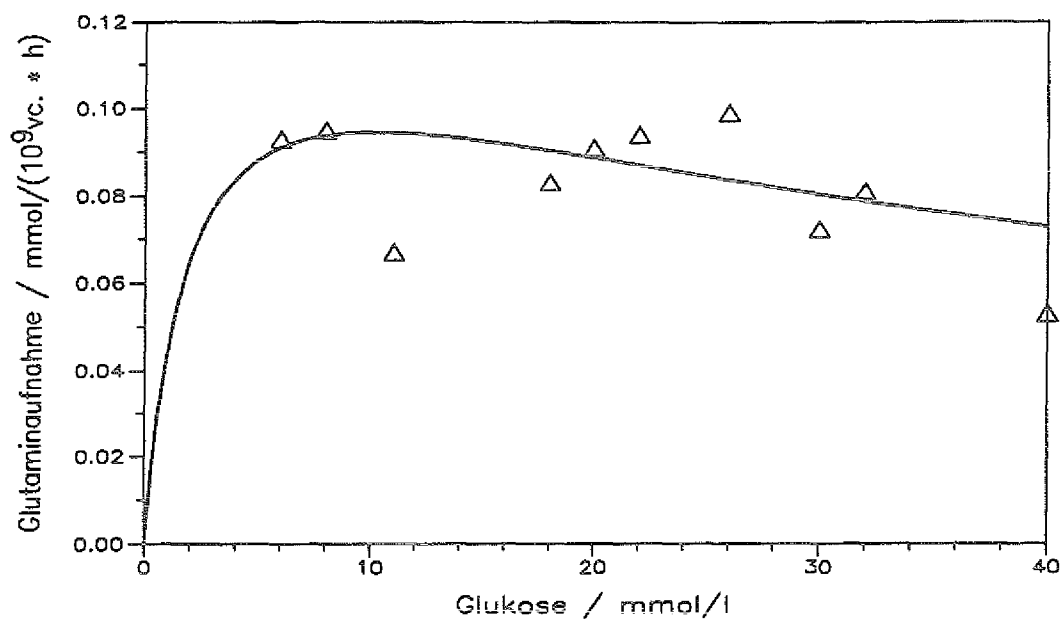


Abb. 5.2.9: Abnehmende Glutaminaufnahme bei steigender Glukosekonzentration

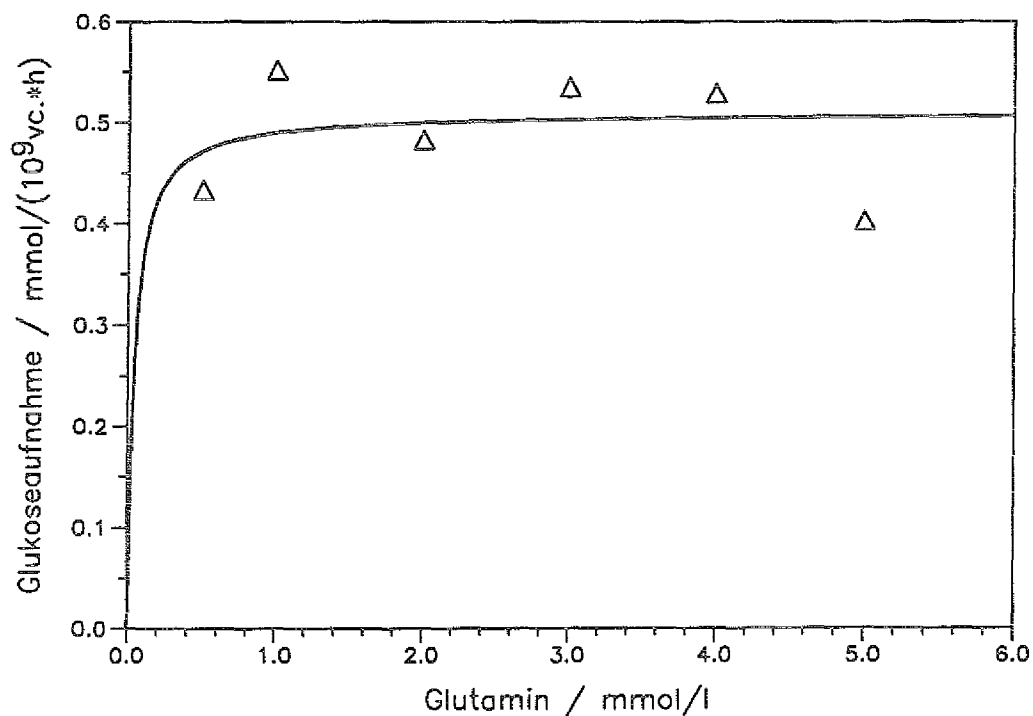


Abb. 5.2.10: Konstante Glukoseaufnahme bei wechselnder Glutaminkonzentration

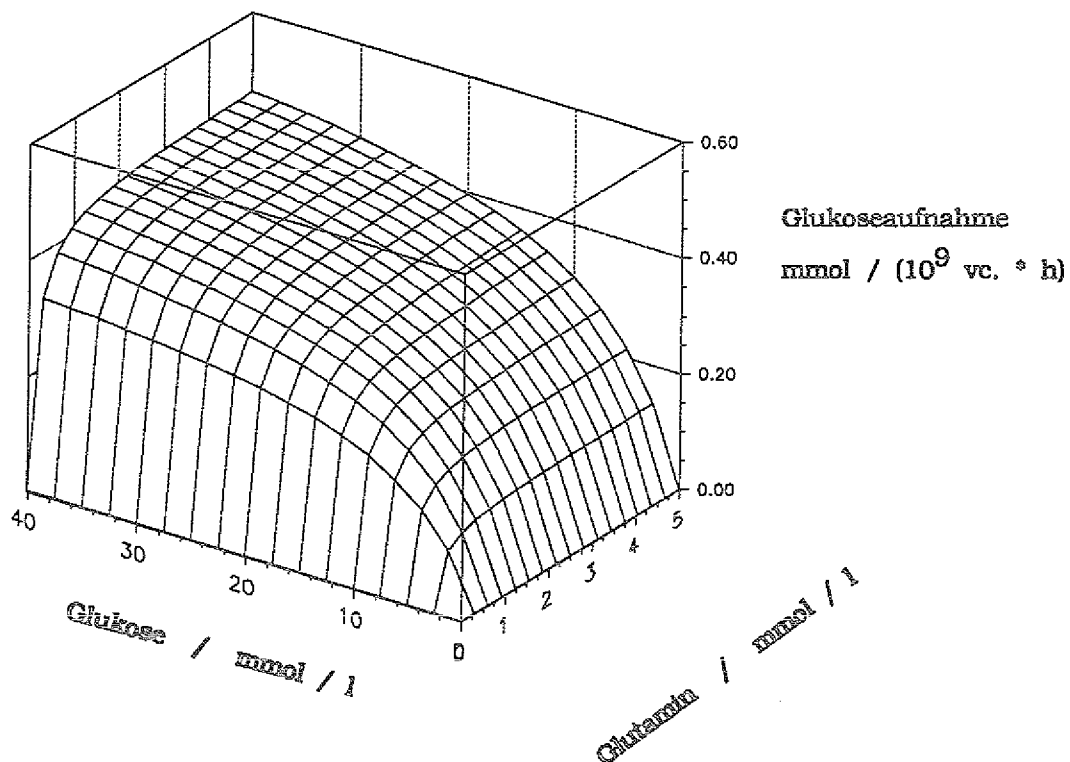


Abb. 5.2.11: Dreidimensionale Darstellung der Kinetik der Glukoseaufnahme

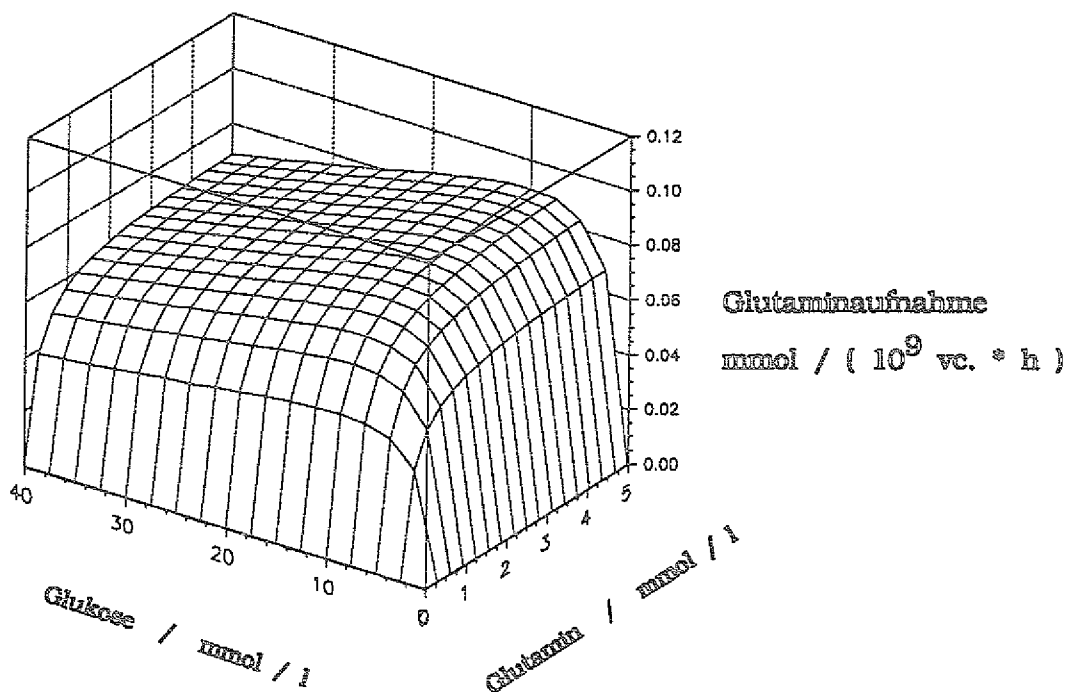


Abb. 5.2.12: Dreidimensionale Darstellung der Kinetik der Glutaminaufnahme

Überlegungen zum Erhaltungsstoffwechsel

Die Aufnahme von Substraten stellt die treibende Kraft zum Zellwachstum dar; nichtsdestoweniger kann nicht die volle Menge der durch eine Zelle aufgenommenen Substanzen für das Zellwachstum verbraucht werden. Die Aufgaben des Erhaltungsstoffwechsels, wie z.B. Reparaturmechanismen, das Aufrechterhalten von Gradienten u.v.m. sind energieintensive Schritte, die den Umsatz gewisser Mengen Substrat zu ihren Gunsten erfordern. Diesem Umstand wird quantitativ durch die Einführung des Maintenance Koeffizienten m_S sowie des maximalen Ausbeutekoeffizienten $Y_{(X/S)\max}$ Rechnung getragen (s. Kap. 3.4). Aus kinetischen Messungen können diese Parameter bestimmt werden, indem man entsprechend Gleichung 5.2.6 die Substrataufnahmerate über der Wachstumsrate aufträgt und die Meßwerte einer linearen Regression unterzieht. Man erhält als Achsabschnitt den Koeffizienten des Erhaltungsstoffwechsels m_S sowie als Steigung den Kehrwert des maximalen Ausbeutekoeffizienten $Y_{(X/S)\max}$.

$$(5.2.6) \quad q_S = \frac{\mu}{Y_{(X/S)\max}} + m_S$$

Führt man den apparenten Ausbeutekoeffizienten $Y_{(X/S)}$ ein und kombiniert dann Gleichung 5.2.6 und 5.2.7, so erhält man einen nicht-linearen Ausdruck zur Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels.

$$(5.2.7) \quad Y_{(X/S)} = \frac{\mu}{q_S}$$

$$(5.2.8) \quad Y_{(X/S)} = \frac{Y_{(X/S)\max} \cdot \mu}{Y_{(X/S)\max} \cdot m_S + \mu}$$

Die Behandlung der Daten aus den kinetischen Messungen nach Gleichung 5.2.6 liefert eine recht breite Streuung der Punkte im Diagramm (s. Abb. 5.2.13 und 5.2.14). Die oben erwähnte Unsicherheit der Messungen in ruhender Kultur bewirkt eine hohe Fehlerbreite bei der Errechnung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels (Standardabweichungen in der Größe der angepaßten Parameter). Ein wichtiges Problem stellt zum Beispiel das Fehlen von Meßpunkten im Bereich von Wachstumsraten kleiner $0,02 \text{ h}^{-1}$ dar. Die enorme Sensibilität von Hybridomazellen bezüglich der Qualität der Medienbedingungen macht Kultivierungen bei solch geringen Wachstumsraten unmöglich. Daher sind diese Parameter weniger von quantitativer als von qualitativer Bedeutung. Ihre Tendenz spiegelt die unterschiedliche Verwendung der beiden Hauptsubstrate Glukose und Glutamin wieder. Dies wird durch die wesentlich exakteren Messungen aus Kapitel 6.3 voll bestätigt.

Die ermittelten Parameter finden Eingang in die Simulation von Konzentrations-Zeit-Verläufen von Satzreaktorkulturen der VX 12 (s. Kap. 5.5). Die guten Übereinstimmungen der dort gemachten Simulationsrechnungen mit experimentell bestimmten Werten zeigen, daß die hier bestimmten Parameter des

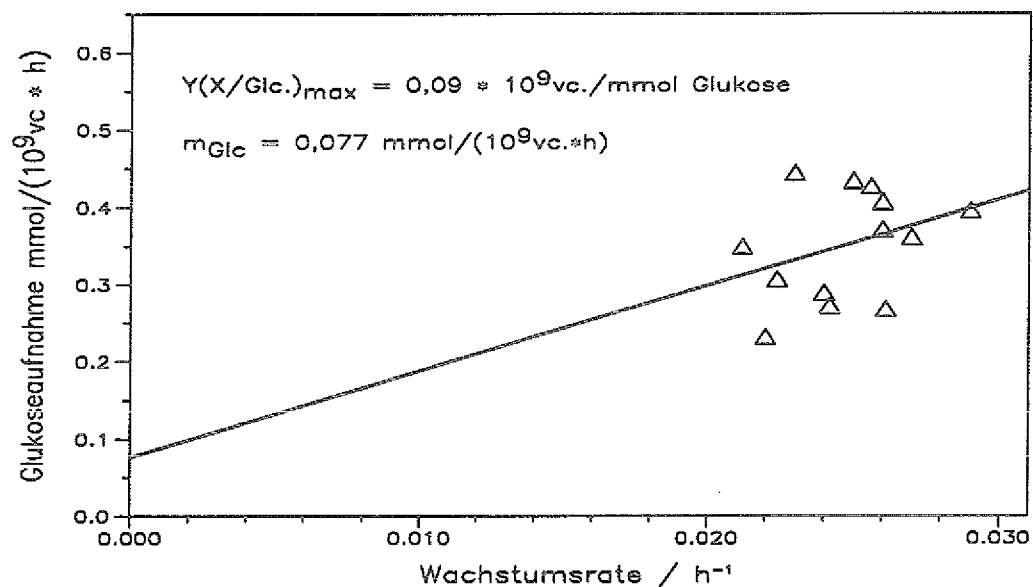


Abb. 5.2.13: Bestimmung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels für Glukose

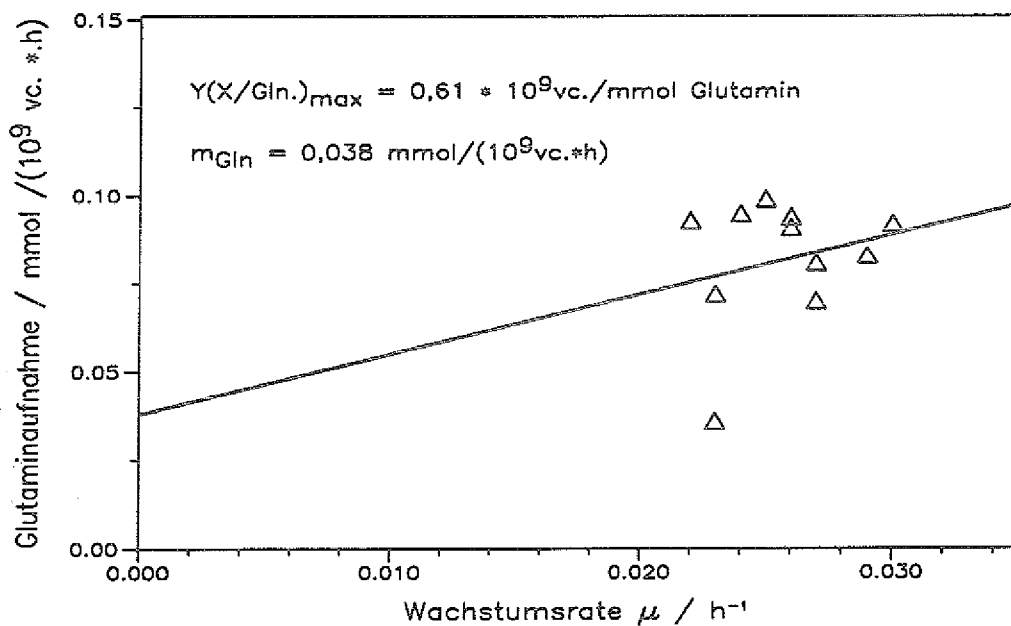


Abb. 5.2.14: Bestimmung der Parameter der Erhaltungsstoffwechsels für Glutamin

Erhaltungsstoffwechsels trotz der hohen Streubreite eine recht gute quantitative Beschreibung der Verhältnisse darstellen. Man erhält durch lineare Regression folgende Größen:

m_{Glukose}	$0,077 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc} \cdot \text{h})$
m_{Glutamin}	$0,03 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc} \cdot \text{h})$
$Y_{(\text{X}/\text{Glukose})\text{max}}$	$0,09 \cdot 10^9 \text{ vc}/\text{mmol Glukose}$
$Y_{(\text{X}/\text{Glutamin})\text{max}}$	$0,38 \cdot 10^9 \text{ vc}/\text{mmol Glutamin}$

Es läßt sich an den unterschiedlichen Größen der einzelnen Parameter unschwer ablesen, daß der mengenmäßige Beitrag der Glucoseaufnahme zum Erhaltungsstoffwechsel der Hybridomalinie VX 12 größer als der Beitrag des Glutaminstoffwechsels ist. Andererseits ist der maximal mögliche Ertrag an vitalen Zellen aus Glutamin größer als der aus Glukose. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache liefert eine Betrachtung der Energieäquivalente, die der Abbau der einzelnen Substrate liefert. Glukose wird von Hybridomazellen mehrheitlich anaerob zu Laktat abgebaut, wohingegen der Glutaminstoffwechsel auf einem oxidativen Abbau des Glutamins im Tricarbonsäurezyklus (TCA) beruht. Der Energiegewinn der Glykolyse in Form von ATP beträgt allerdings nur 2/36 des oxidativen Abbaus (Newland 1990), d.h. zwei mol ATP/mol Glukose. Glacken (1986) errechnet den Energiegewinn der Totaloxidation von Glutamin zu CO_2 zu 21 mol ATP/mol Glutamin. Grob vereinfacht kann man nun davon ausgehen, daß ca. 50 % des Glutamins zu CO_2 abgebaut wird, d.h. man erhält ca. 11,5 mol ATP/mol Glutamin an Energie aus dem Glutaminstoffwechsel. Zieht man nun in Betracht, daß der Erhaltungsstoffwechsel auf der Verwendung zellulärer Energie zu Erhaltungsaufgaben beruht, so lassen sich die Maintenance-Koeffizienten in $\text{mmol ATP}/(10^9 \text{ vc} \cdot \text{h})$ umrechnen. Man erkennt, daß $m_{\text{Gluc.}}$ $0,154 \text{ mmol ATP}/(10^9 \text{ vc} \cdot \text{h})$ ergibt, wohingegen $m_{\text{Gln.}}$ zu $0,345 \text{ mmol ATP}/(10^9 \text{ vc} \cdot \text{h})$ umgerechnet wird. Die ungleich effizientere Energiegewinnung aus Glutamin macht die höhere Glukoseaufnahme wett, sodaß Glutamin sowohl für die Biomassebildung (vgl. die Ausbeutekoeffizienten) als auch für den Erhaltungsstoffwechsel das wichtigere Energiesubstrat darstellt.

5.3 Einfluß von ausgewählten Metaboliten

Ammonium

Die Inhibierung von Zellwachstum und Produktivität von Hybridomazellen durch Ammonium ist in der neueren Literatur häufig Gegenstand der Betrachtungen gewesen (s. Kapitel 3.2). Fazit dieser Betrachtungen ist, daß bei allen Säugerzelllinien eine, wenn auch unterschiedlich ausgeprägte, Ammonium-Sensitivität existiert. Daher war es selbstverständlich notwendig, das Ausmaß der Ammoniuminhibierung der Linie VX 12 kennenzulernen und in die Überlegungen zur Prozeßoptimierung mit einzubeziehen. Die Versuche zeigten, wie in Abb. 5.3.1 zu sehen ist, eine starke Inhibierung sowohl des Wachstums als auch der zellspezifischen

kennenzulernen und in die Überlegungen zur Prozeßoptimierung mit einzubeziehen. Die Versuche zeigten, wie in Abb. 5.3.1 zu sehen ist, eine starke Inhibierung sowohl des Wachstums als auch der zellspezifischen Produktivität. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ozturk (1992) und den Aussagen von Newland (1990), die einen Einfluß von Ammonium auf die Antikörperproduktion nur über die Zahl der vitalen Zellen bei konstanter spezifischer Produktivität diskutieren. Eine mathematische Beschreibung im Form einer einfachen Inhibierungskinetik nach

$$(5.3.1) \quad \mu = \mu_{\max} * \frac{K_i}{([I] + K_i)}$$

ergibt einen K_i von 4,3 mmol/l. Die Anpassung dieses aus der Enzymkinetik entlehnten Modells an die Meßwerte bietet allerdings keine gute Übereinstimmung der Meßwerte mit dem Modell. Eine bessere Anpassung wird mit Hilfe eines allgemeineren, exponentiellen Ansatzes erreicht (von Eysmond 1990).

$$(5.3.2) \quad \mu = \mu_{\max} * \left(1 - \frac{[I]^n}{I_{\max}^n}\right)$$

Die Inhibierung der zellspezifischen Produktivität durch Ammonium läßt sich mit dem gleichen Ansatz beschreiben:

$$(5.3.3) \quad q_p = q_{p\max} * \left(1 - \frac{[I]^n}{I_{\max}^n}\right)$$

Dieser Ansatz bietet hierbei die Möglichkeit, auch einen parabolischen Inhibierungsverlauf anzupassen, wogegen die "klassische" Inhibierungskinetik nur hyperbolische Verläufe vorsieht. Die Anpassung mit Hilfe der o.a. Optimerroutine liefert bezüglich der Wachstumsrate eine maximale Inhibitor-(Ammonium-) Konzentration von 23,5 mmol/l bei einem Exponenten von 3,16. Der Abfall der zellspezifischen Produktivität wird durch ein $I_{\max}$ von 23,6 mmol/l und ein n von 2,2 angegeben.

Die in Kapitel 3.4 angedeutete Möglichkeit der Beschreibung einer Inhibierung durch eine Abhängigkeit des Maintenance-Koeffizienten von der Konzentration eines Inhibitors nach 5.3.4 wurde für die Zelllinie VX 12 im Zusammenhang mit Ammonium untersucht.

$$(5.3.4) \quad m_s = f([Ammonium])$$

$$m_s = m_{s\min} + a * [Ammonium]$$

Abb. 5.3.3 zeigt den konstanten Verlauf der Glukoseaufnahme trotz steigender Ammoniumkonzentration und damit sinkender Wachstumsrate. Analog zu den Überlegungen aus Kap. 5.2 fließt die aufgenommene Glukose nicht mehr in das Zellwachstum, sondern dient zur Gewinnung der Energie des Erhaltungsstoffwechsels. Dies drückt sich in einem verringerten scheinbaren Ausbeutekoeffizienten für Glukose aus (s. Gl. 5.2.7

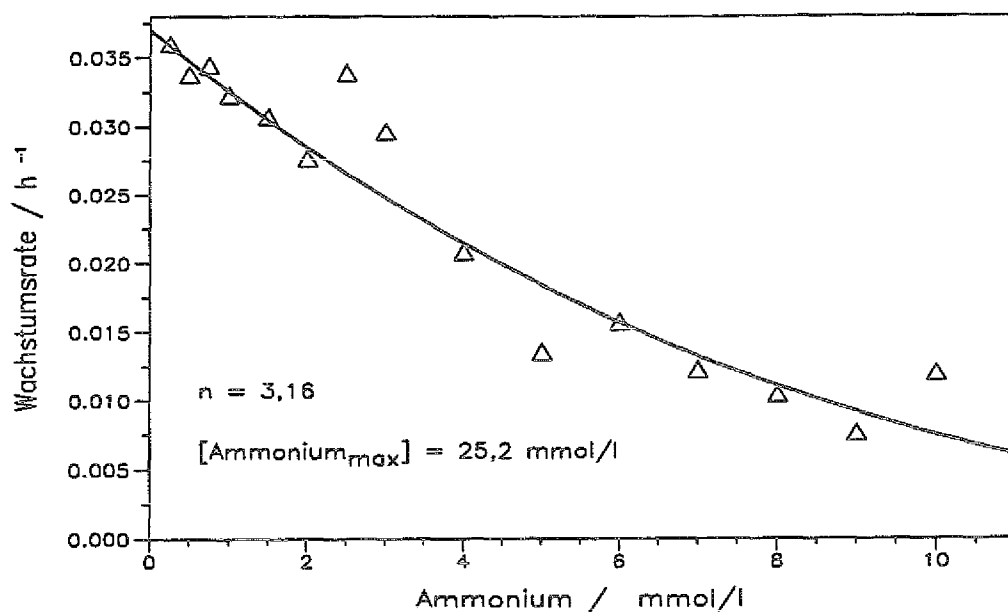


Abb. 5.3.1: Inhibition des Zellwachstums durch Ammonium

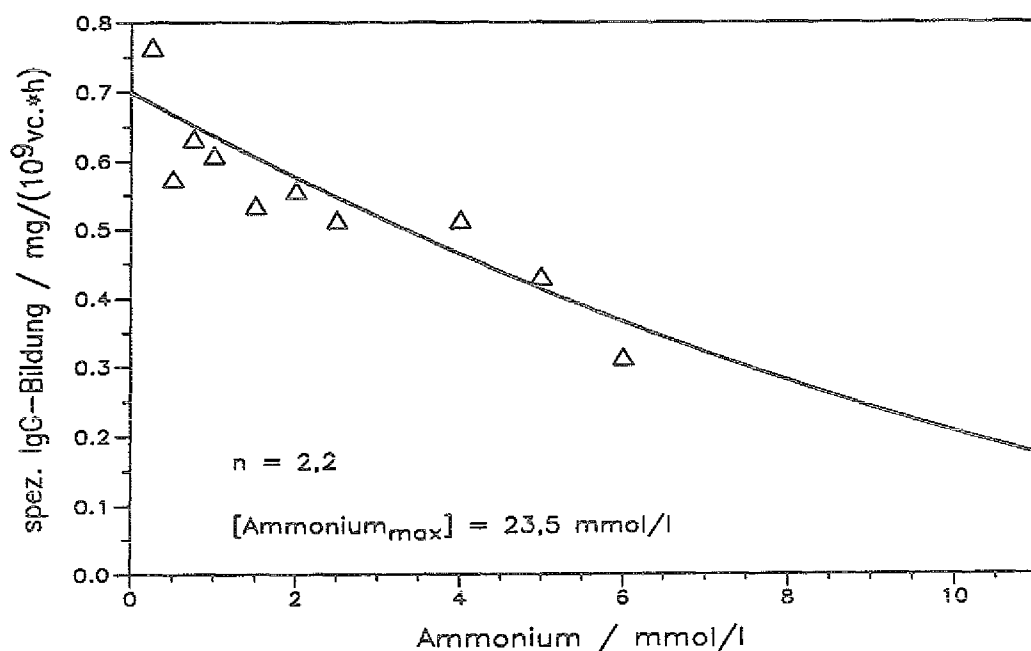


Abb. 5.3.2: Inhibition der IgG-Bildung durch Ammonium

und Abb. 5.2.15). Errechnet man nun aus dem maximalen Ausbeutekoeffizienten $Y_{(X/\text{Glukose})\text{max}}$, der in Kapitel 5.2 bestimmt wurde für jeden Meßpunkt der Ammoniuminhibierungskinetik einen neuen Maintenance-Koeffizienten $m_{\text{Glukose}} = f([\text{Ammonium}])$ und trägt nun den errechneten Maintenancekoeffizienten gegen die Ammoniumkonzentration auf, so erkennt man in der Tat die in Gleichung 5.3.4 vorgeschlagene lineare Beziehung (Abb. 5.3.4). Der quantitative Ausdruck, der sich aus dieser Auftragung für m_{Glukose} ergibt lautet:

$$(5.3.5) \quad m_{\text{Glukose}} = m_{\text{Glukose(min)}} + 0,035 * [\text{Ammonium}]$$

Ähnliche Verhältnisse sollten auch für die Entwicklung des Maintenance-Faktors des Glutaminstoffwechsels mit steigender Ammoniumkonzentration erwartet werden. Die Wichtigkeit der zellulären Energiegewinnung ausgehend von Glutamin legt diese Vermutung nahe. Die große Schwankungsbreite im Datensatz m_{Gln} gegen [Ammonium] läßt eine eindeutige Aussage zu diesem Punkt nicht zu. Nichtsdestoweniger ist eine solche Vermutung aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zum Erhaltungsstoffwechsel logisch.

Laktat

Die in der Literatur schon häufig beschriebene Inhibierung von Säugerzellen durch Laktat sollte auch in dieser Versuchsreihe untersucht werden. Hierzu wurde den Kulturen von Anfang an Laktat in Form seines Na-Salzes zugesetzt und der Verlauf der metabolischen Raten bei unterschiedlichen Na-Laktatkonzentrationen verfolgt. Abb. 5.3.5 zeigt den Abfall der Wachstumsrate von batch-Kulturen mit steigender Laktatkonzentration. Es muß allerdings bedacht werden, daß ein Zusatz von Na-Laktat die Osmolarität des Kulturmediums erhöht. Da Hybridomazellen sehr empfindlich auf Veränderungen der Medienosmolarität reagieren - die Zelllinie VX 12 besitzt ein relativ schmales Wachstumsoptimum zwischen 310 und 340 mOsmol/kg - wurde der Einfluß des Na-Laktats mit dem Einfluß gleicher Mengen NaCl verglichen. Hiermit sollte zwischen einem reinen Osmolaritäts-Effekt, der auch durch NaCl hervorgerufen wird, und einem physiologischen Effekt des Laktates unterschieden werden. Aus Abb. 5.3.5 ersieht man, daß die Laktatinhibierung der Inhibierung durch NaCl folgt, d.h. es existiert offensichtlich kein physiologischer Effekt des Laktats über den schädlichen osmolaren Effekt der Na-Salzes hinaus. Ein nicht zu vernachlässigender Effekt der Wirkung der organischen Säure Laktat, die infolge der Glykolyse in Konzentrationen bis zu 25 mmol/l am Ende einer batch-Kultur auftreten kann, ist die Absenkung des Kultur-pH auf inhibierende Werte. Dies tritt allerdings nur bei Brutschrank-Kulturen ohne pH-Regelung auf (s. Kap. 4.3), eine Fermentation mit geregelterm pH löst dieses Problem.

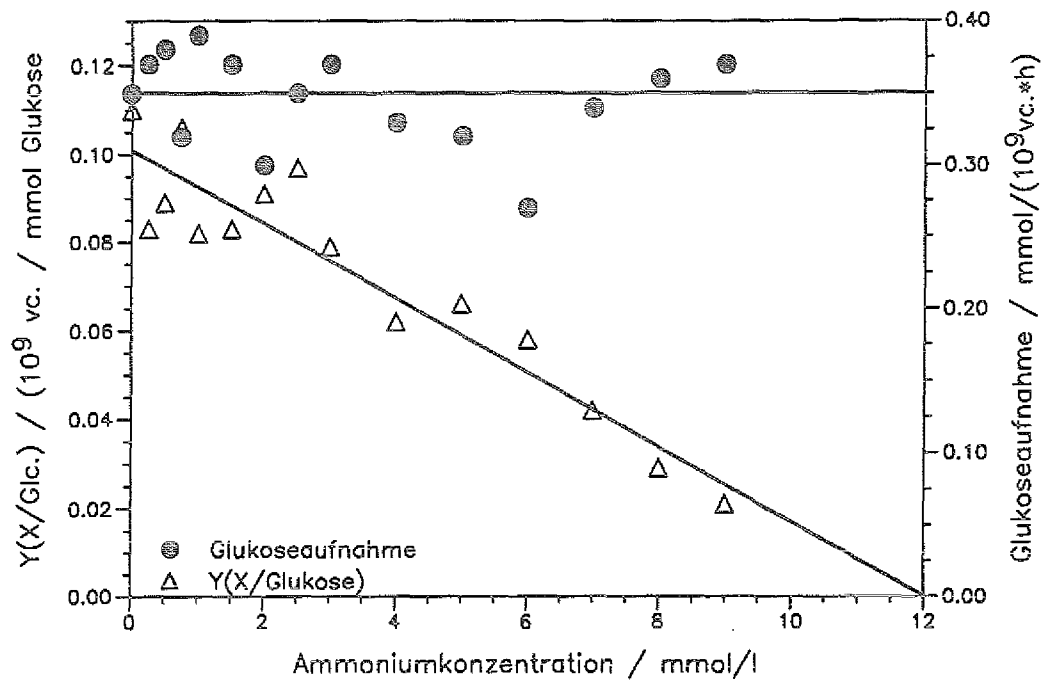


Abb. 5.3.3: Konstante Glukoseaufnahme bei steigender Ammoniumkonzentration ($[Glc_0] = 20 \text{ mM}$)

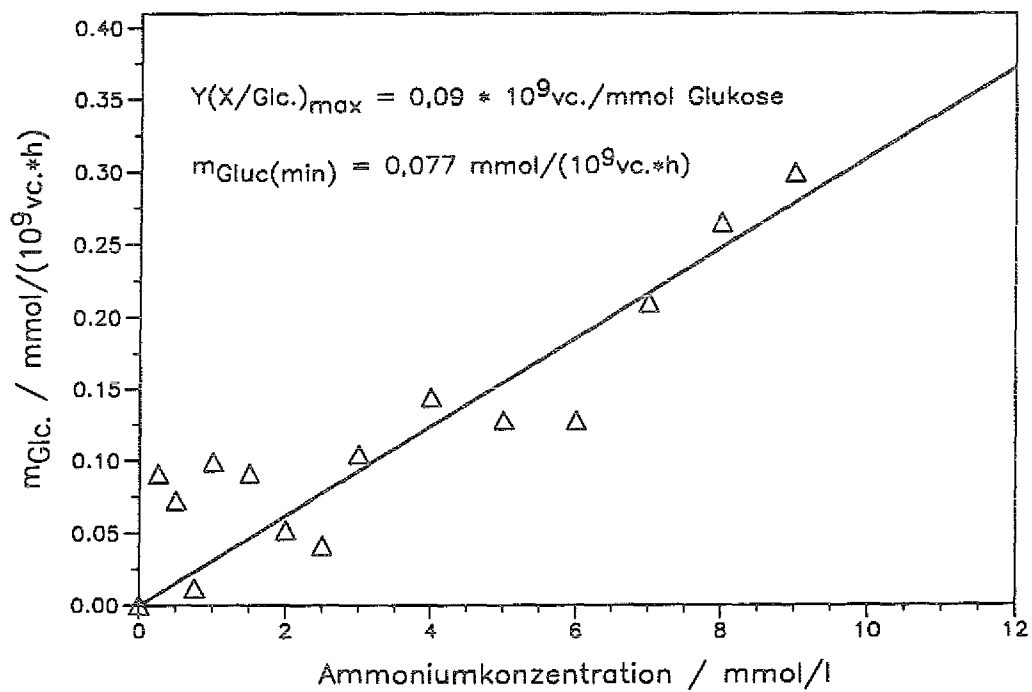


Abb. 5.3.4: Anstieg des Maintenance-Koeffizienten mit steigender Ammoniumkonzentration ($[Glc_0] = 20 \text{ mM}$)

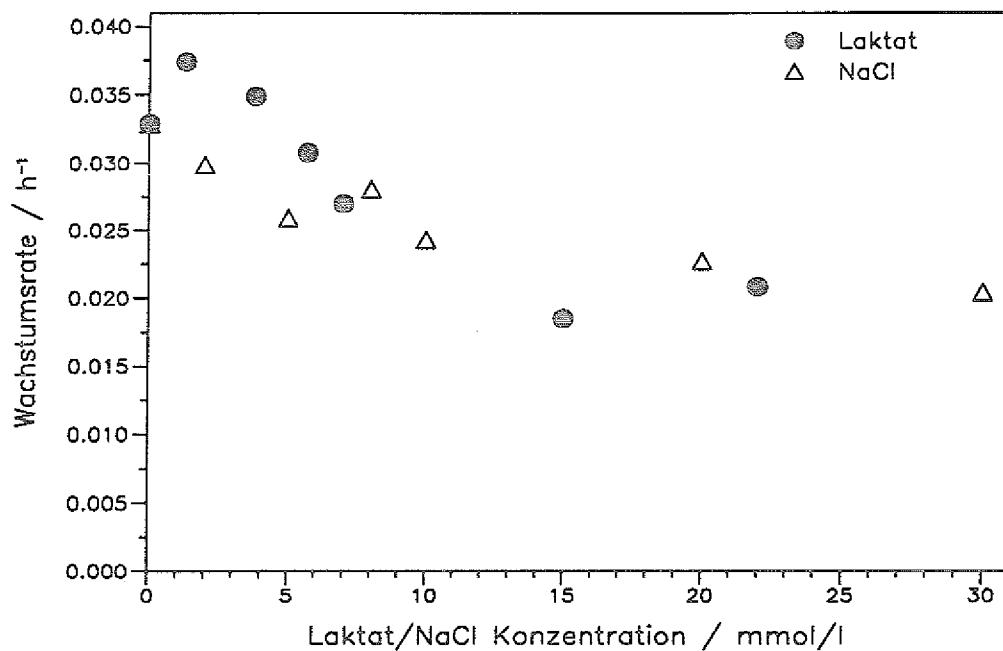


Abb. 5.3.5: Paralleler Verlauf von Laktat- und NaCl-Inhibierung

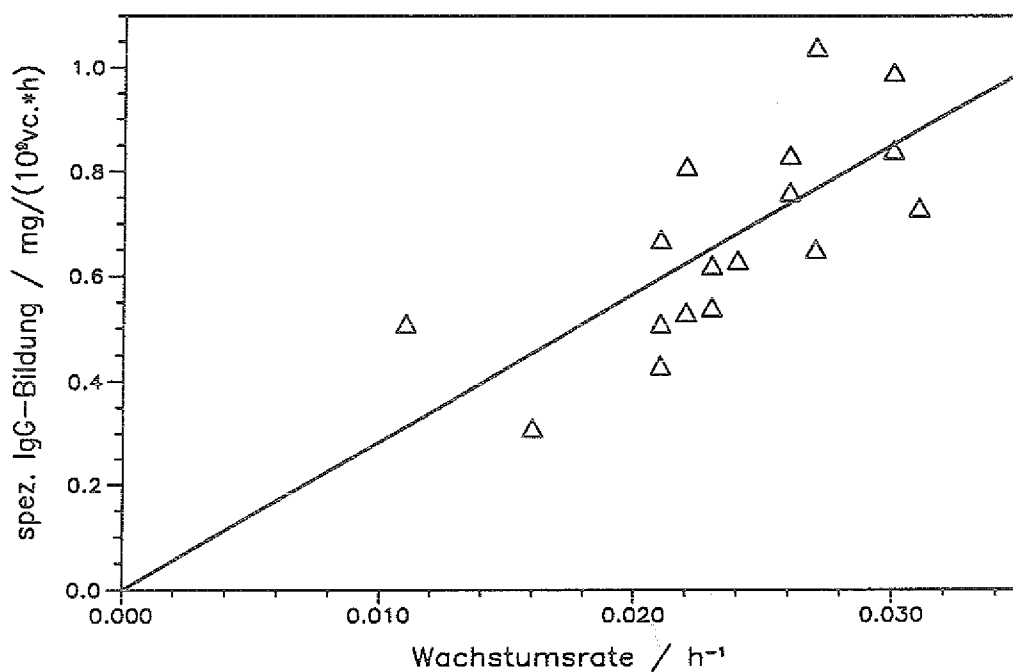


Abb. 5.4.1 : Wachstumsgekoppelte Antikörperbildung

5.4 Kopplung von Wachstum und Produktivität

Aus den Ergebnissen der kinetischen Messungen lassen sich nun Aussagen über den Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktivität der Hybridomalinie VX 12 treffen. Eine Auftragung der zellspezifischen Produktivität über der dazugehörigen Wachstumsrate (Abb. 5.4.1) zeigt trotz einer erheblichen Streuung der Daten, daß in diesem Fall Wachstum und Produktivität positiv korreliert sind. Es läßt sich ein linearer Zusammenhang postulieren, der sich in den Ergebnissen des folgenden Kapitels bestätigen wird.

5.5 Erstellung eines unstrukturierten Modells anhand der Ergebnisse der kinetischen Messungen

Die im Verlauf der kinetischen Messungen erhaltenen Daten sollen nun in einem Modell zusammengefaßt werden, mit dessen Hilfe Voraussagen über die Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Reaktorsysteme zur Produktion von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridomalinie VX 12 gemacht werden können. Die Aussagekraft des Modells kann allerdings nicht unüberprüft bleiben. Als Gradmesser für die Sinnfälligkeit der gemachten Annahmen und die Konsistenz der errechneten Parameter soll die Beschreibung von batch-Wachstumskurven der VX 12 mit dem aufgestellten Modell dienen. Der Vergleich der Simulation mit tatsächlichen Meßwerten hilft bei der Bewertung der Qualität des Modells.

Modellbildung

Die Beschreibung der Wachstumsrate in Abhängigkeit der Konzentration der beiden Hauptsubstrate Glukose und Glutamin erfolgt in Form einer Sättigungskinetik. Die "scheinbare" Überschußinhibierung durch Glutamin wird hierbei vernachlässigt, sie findet Eingang in der Inhibierung durch Ammonium. Ein wichtiger Punkt, in dem sich die Modellierung des Hybridomawachstums von der Beschreibung des Wachstums von Mikroorganismen unterscheidet, ist die Tatsache, daß durch die routinemäßige Bestimmung der Vitalität einer Kultur die genaue Beschreibung des Zellsterbens erforderlich wird. Dies geschieht im allgemeinen durch die Einführung der Absterberate k_d , deren Größe in Abhängigkeit der Inhibitorakkumulation und der Substratlimitierung formuliert werden kann. In dem hier angewendeten Ansatz soll das Zellsterben durch negative Wachstumsraten einbezogen werden, auf diese Art und Weise sollen eine weitere Gleichung und zusätzliche Parameter vermieden werden. Negative Wachstumsraten werden durch die Einführung des Maintenance-Koeffizienten m_s möglich, dessen Größe im Falle von limitierenden Substratkonzentrationen den Wert für q_s übersteigt. Abb. 5.5.1 Zeigt den Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate μ und der Substratkonzentration bei

Einbeziehung des Erhaltungsstoffwechsels, wobei bei sehr kleinen Substratkonzentrationen auch negative Wachstumsraten auftreten können.

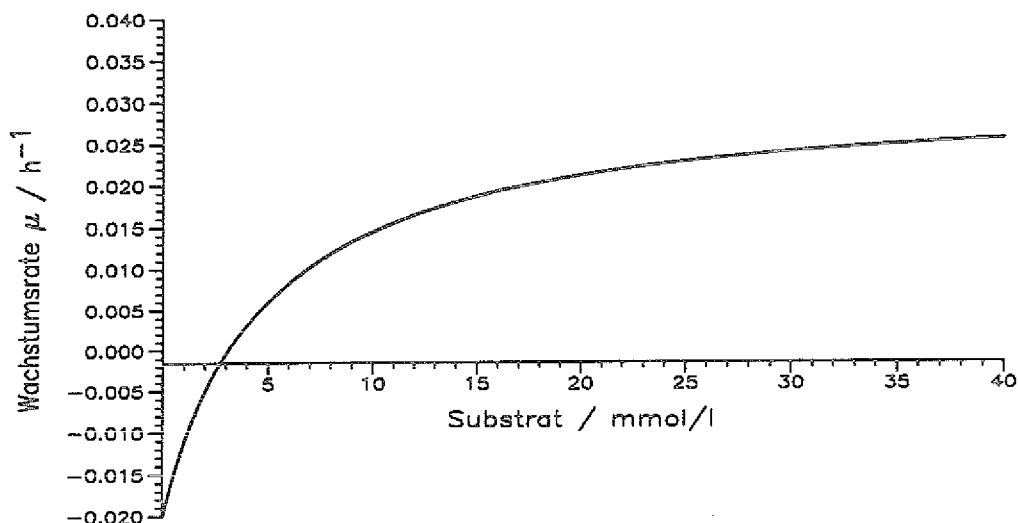


Abb. 5.5.1: Wachstumskinetik unter Einbeziehung des Erhaltungsstoffwechsels

Die Ammoniuminhibierung soll in einem Anstieg des Maintenance-Koeffizienten für Glukose mit steigender Ammoniumkonzentration entsprechend Gleichung 5.3.5 erfaßt werden. Somit ergibt sich eine gute Möglichkeit, das schnelle Absterben einer Kultur mit dem gleichen Datensatz wie das Aufwachsen zu beschreiben. Es ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$(5.5.1) \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[\text{Glc.}]}{[\text{Glc.}] + K_{\text{Glc.}}} \cdot \frac{[\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_{\text{Gln}}} - (m_{\text{Glc.}(\min)} + 0,035 \cdot [\text{Amm}]) \cdot Y_{(\text{X/Glc.})\max}$$

Der Beitrag des Glutamins zum Erhaltungsstoffwechsel wird aus Gründen der Einfachheit vernachlässigt; ein Einfluß einer steigenden Ammoniumkonzentration auf die Glutaminaufnahme war experimentell nicht eindeutig nachweisbar gewesen, daher wird dies in der Modellbildung nicht berücksichtigt.

Die Aufnahme der Substrate kann entsprechen der Ergebnisse aus Kapitel 5.2 ebenfalls nach Monod beschrieben werden, wobei die gegenseitige Beeinflussung in dem bereits erwähnten multiplikativen Ansatz berücksichtigt wird.

$$(5.5.2) \quad q_{\text{Gln}} = q_{\text{Gln(max)}} * \frac{[\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_{q\text{Gln}}} * \frac{[\text{Glc.}]}{[\text{Gln}] + K_{q\text{Glc.}} + [\text{Glc.}]^2 / K_{qi\text{Glc.}}}$$

$$(5.5.3) \quad q_{\text{Glc.}} = q_{\text{Glc.(max)}} * \frac{[\text{Glc.}]}{[\text{Glc.}] + K_{q\text{Glc.}}} * \frac{[\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_{q\text{Gln}}}$$

Die Abhängigkeit der spezifischen Antikörperbildung von den einzelnen Substraten und Produkten kann analog zur Wachstumsrate quantifiziert werden, allerdings findet die Ammoniuminhibierung in Form des exponentiellen Ansatzes (s. Kap. 4.3) Eingang.

$$(5.5.4) \quad q_{\text{IgG}} = q_{\text{IgGmax}} * \frac{[\text{Glc.}]}{[\text{Glc.}] + K_{p\text{Glc.}}} * \frac{[\text{Gln}]}{[\text{Gln}] + K_{p\text{Gln}}} * \left(1 - \frac{[\text{Amm}]^n}{[\text{Amm}]_{\text{max}}^n} \right)$$

Die Parameter der Modellgleichungen entsprechen den im Rahmen der kinetischen Messungen ermittelten Werte und sollen im folgenden noch einmal zusammengefaßt werden:

Zellwachstum:

μ_{max}	:	0,031 h ⁻¹
$K_{\text{Glc.}}$	:	0,67 mmol/l
$K_{\text{Gln.}}$	:	0,18 mmol/l
$m_{\text{Glc.}}(\text{min})$	:	0,077 mmol/(10 ⁹ vc.*h)

Substrataufnahme:

$q_{\text{Gln(max)}}$	:	0,09 mmol/(10 ⁹ vc. * h)
$K_{q\text{Gln.}}$	:	0,28 mmol/l
$K_{q\text{Glc.}}$	:	1,9 mmol/l
$K_{qi\text{Glc.}}$	:	54 mmol/l

$q_{\text{Glc.}}(\text{max})$	:	$0,57 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$
$K_{q\text{Glc.}}$	:	$7,8 \text{ mmol/l}$
$K_{q\text{Gln.}}$	:	$0,15 \text{ mmol/l}$

Produktbildung

$q_{\text{IgG}}(\text{max})$	:	$0,87 \text{ mg}/(10^9 \text{ vc.} \cdot \text{h})$
$K_{p\text{Glc.}}$	:	$4,5 \text{ mmol/l}$
$K_{p\text{Gln.}}$	:	$0,14 \text{ mmol/l}$
$\text{Amm.}(\text{max})$	:	$23,6 \text{ mmol/l}$
n	:	$2,2$

Beschreibung von Wachstum und Produktbildung in Satzreaktor-Fermentationen

Anhand der oben aufgestellten Geschwindigkeitsgleichungen (μ , q_p , $q_{\text{Glc.}}$, $q_{\text{Gln.}}$) soll ein System von Differentialgleichungen erstellt werden, mit dem sich das Wachstum der VX 12 in batch-Kulturen beschreiben lässt. Mit Hilfe eines numerischen Verfahrens zur Lösung gekoppelter Differentialgleichungssysteme (Runge-Kutta-Verfahren, Jösch 1988) können die Konzentrations-Zeit-Verläufe unter verschiedenen Startbedingungen vorausgesagt und mit experimentell ermittelten Werten verglichen werden. Folgende Differentialgleichungen werden verwendet:

$$\begin{aligned}
 (5.5.5) \quad & d[\text{vit.Zellen}]/dt = \mu \cdot X \\
 & d[\text{Glc.}]/dt = -q_{\text{Glc.}} \cdot X \\
 & d[\text{Gln.}]/dt = -q_{\text{Gln.}} \cdot X - k \cdot [\text{Gln.}] \\
 & d[\text{Amm.}]/dt = 0,7 \cdot q_{\text{Gln.}} \cdot X + k \cdot [\text{Gln.}] \\
 & d[\text{IgG}]/dt = q_p \cdot X
 \end{aligned}$$

Hierbei bedeutet k die Geschwindigkeitskonstante des chemischen Zerfalls von Glutamin unter Bildung von Ammonium in einer Reaktion erster Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (37°C , serumfreies Medium) $0,0024 \text{ h}^{-1}$ (Hambach 1992). Die Ammoniumbildungsrate $q(\text{Amm.})$ wird über die Glutaminaufnahme beschrieben, wobei ein konstantes Verhältnis von Ammoniumbildung zu Glutaminaufnahme von 0,7 vorausgesetzt wird. Dieses Verhältnis ist der Literatur (Runstadler 1991) entnommen und in eigenen Experimenten bestätigt worden.

Anhand von drei Beispielfermentationen soll nun der Vergleich von Simulation und Experiment vorgenommen werden. Abb. 5.5.2 bis 5.5.4 zeigen batch-Kulturen unterschiedlicher Medienbedingungen, wobei die durchge-

zogenen Linien die Ergebnisse der Simulationsrechnungen darstellen. Die eingezeichneten Punkte bezeichnen die tatsächlich gemessenen Werte.

Man erkennt eine gute Übereinstimmung von Modell und Experiment in allen drei Fällen. Besonders bemerkenswert erscheint hierbei die gute Voraussage der Konzentrations-Zeit-Verläufe von Glukose und Glutamin. Die einfachen Annahmen bei der reziproken Regulation der Aufnahme der beiden Hauptsubstrate sind offensichtlich in der Lage den Substratverbrauch der VX 12 ausreichend gut zu beschreiben. Das Absterben der Kultur infolge Substratlimitierung und Produktinhibierung wird durch negative Wachstumsraten bei linearer Zunahme des Maintenance-Faktors ebenfalls sehr gut erfaßt.

Es muß allerdings beachtet werden, daß die hier verwendeten kinetischen Parameter in ruhender Kultur im Brutschrank bestimmt worden sind. Die Verhältnisse in den T-Flaschen sind mit Sicherheit sauerstofflimitiert. Da die Sauerstoffkonzentration bekanntlich einen großen Einfluß auf Wachstum und Produktivität von Hybridomazellen hat (s. Kap. 3), ist bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf Produktionssysteme diesem Umstand Rechnung zu tragen. Bei Voraussetzung einheitlicher Sauerstoffversorgung dieser Produktionssysteme können dann vergleichende Betrachtungen vorgenommen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die gemachten Annahmen über die Zusammenhänge zwischen Substrat- sowie Produktkonzentrationen und dem Zellwachstum bzw. der Produktbildung zu einer guten Beschreibung der Verhältnisse einer batch-Kultur der Maus-Maus-Hybridomazelle VX 12 führen. Hierbei kommt ein recht einfaches, unstrukturiertes Modell zum Einsatz, das mit einer vertretbaren Anzahl von Parametern in der Lage ist, komplexe Zusammenhänge deutlich zu machen und Einblicke in die Beziehungen zwischen konkurrierenden Substraten erlaubt.

Aus diesem Grunde soll dieses Modell dazu verwendet werden, Wachstum und Produktbildung in unterschiedlichen Reaktionssystemen in kontinuierlicher Kultur vorauszusagen, um eine Entscheidungsfindung bei der Auswahl eines geeigneten Reaktorkonzepts zur Produktion des monoklonalen Antikörpers zu erleichtern.

Eine zusätzliche Simulation soll nun dazu dienen, die Konsistenz des in Kapitel 5.2 als unsicher bezeichneten Parameters $Y_{(X/Glc.)max}$ zu überprüfen. Hierzu wird der Parameter im Bereich einer Zehnerpotenz bei sonst gleichen Simulationsbedingungen variiert, um den Einfluß des Parameters auf das Ergebnis der Simulation zu zeigen. Ein Vergleich mit realen Meßwerten zeigt dann die Verläßlichkeit des Wertes dieses Parameters.

Die Kultivierung der VX 12 in ruhender Kultur bei 20 mM Glukose und 3 mM Glutamin wurde als Vergleichsmessung herangezogen. Als relevante Meßgröße sollte die vitale Zellzahl dienen. $Y_{(X/Glc.)max}$ wurde hierbei auf 0,018 und $0,18 \cdot 10^9$ vc./mmol festgesetzt und mit dem experimentell ermittelten Wert von $0,09 \cdot 10^9$ vc./mmol verglichen. Man sieht in Abb. 5.5.5, daß der Wert von 0,09 als einziger zur guten Simulation des Verlaufs der vitalen Zellzahl beiträgt. Obwohl die beiden anderen Werte noch innerhalb einer Zehnerpotenz des Ergebnisses der linearen Regression nach Gleichung 5.2.6 lagen, liefert die Simulation mit diesen Parametern eine ungenügende Anpassung an die Meßwerte.

Man kann aus diesen Simulationen schließen, daß trotz der großen Streuung der Werte bei der Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels vernünftige Zahlenwerte erhalten wurden, die zur Beschreibung der Kultivierung der VX 12 in ruhender Kultur gut beitragen können.

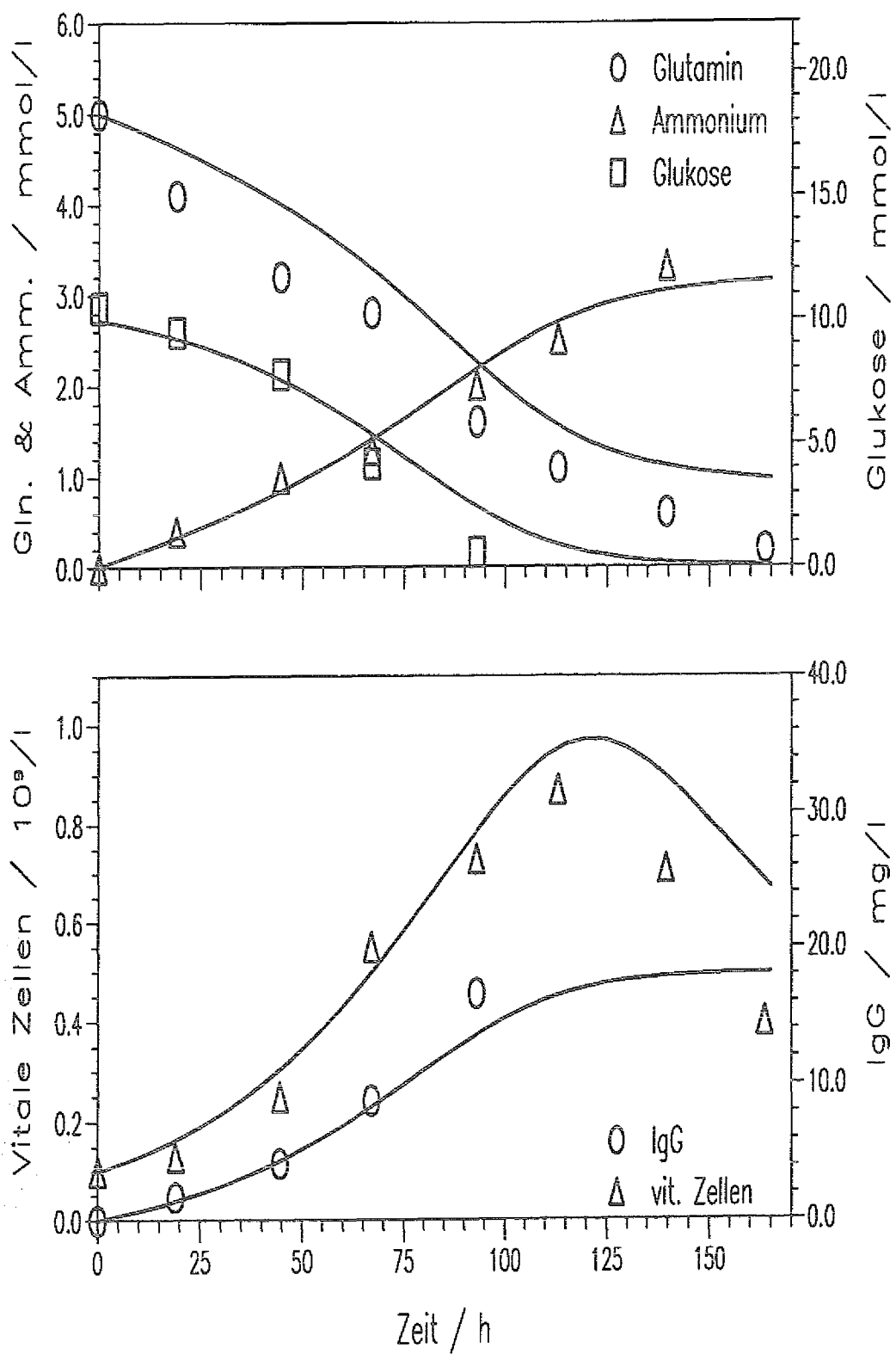


Abb. 5.5.2: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 10 mM, $C_0(\text{Gln.})$ 5 mM

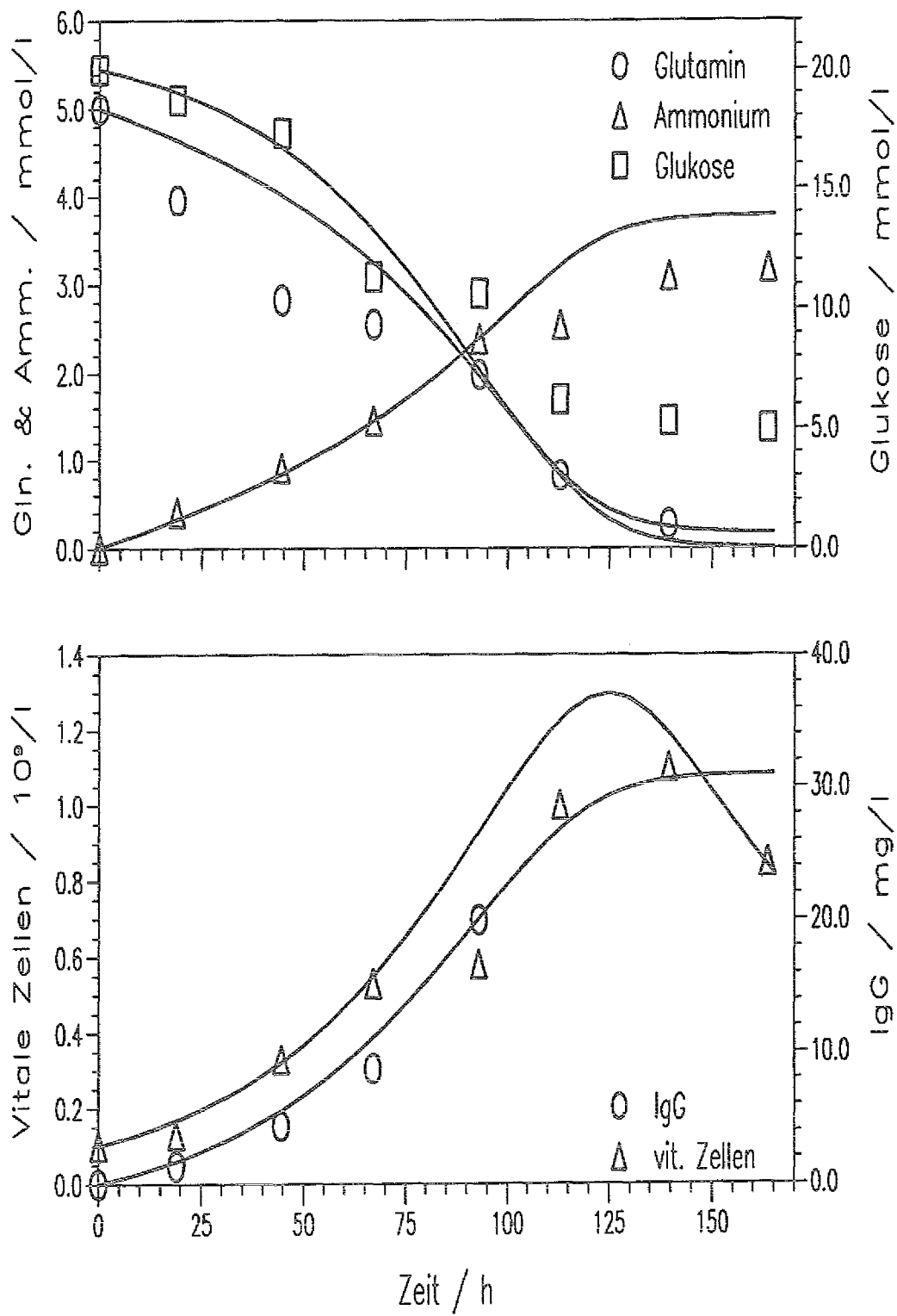


Abb. 5.5.3: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 20 mM, $C_0(\text{Gln.})$ 5 mM

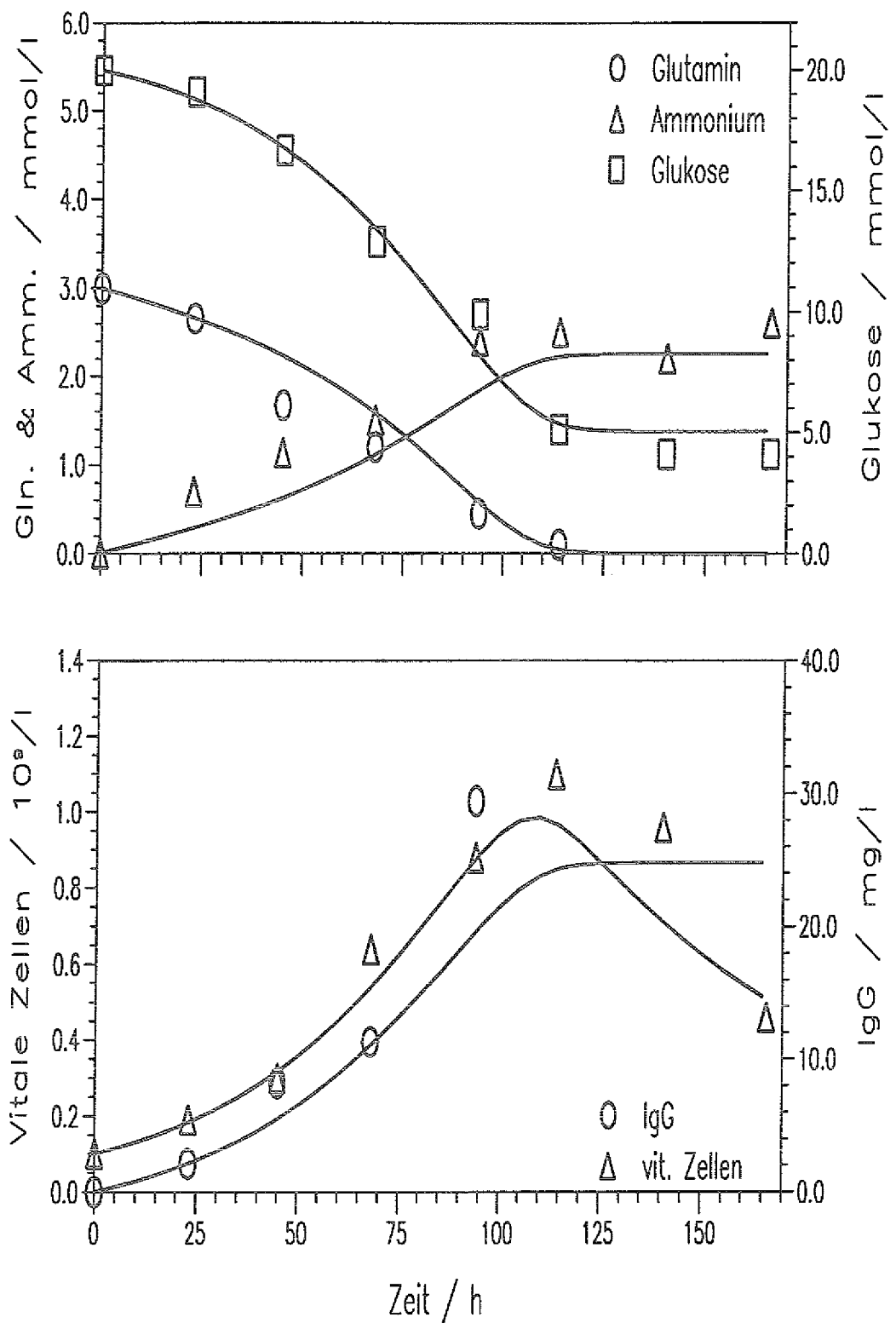


Abb. 5.5.4: Batch-Kultivierung mit $C_0(\text{Glc.})$ 20 mM, $C_0(\text{Gln.})$ 3 mM

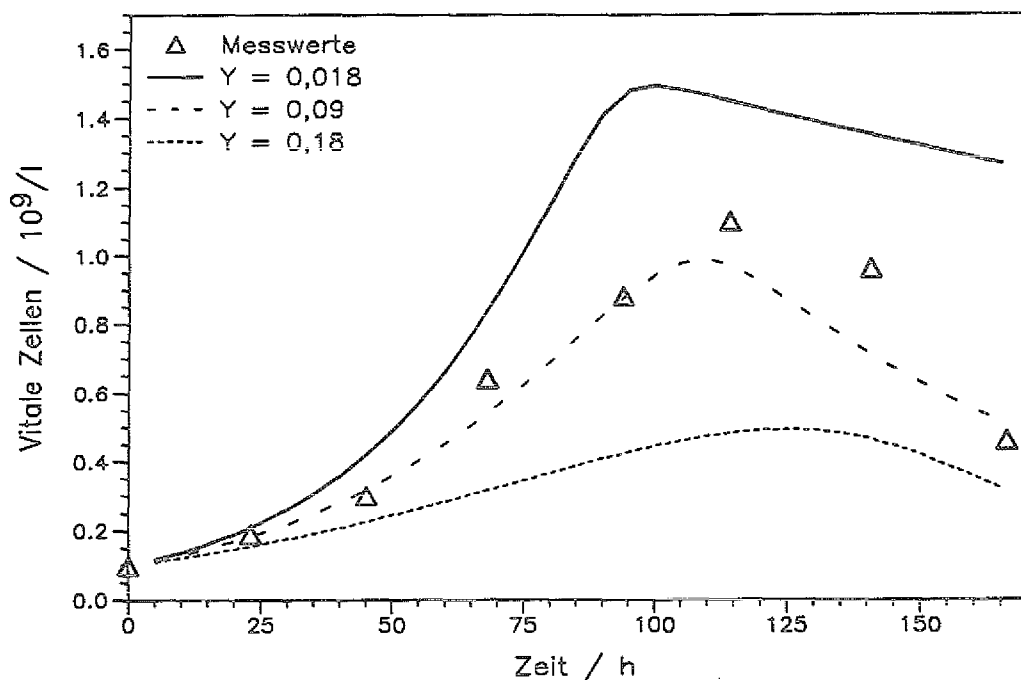


Abb. 5.5.5: Simulation einer Fermentation mit VX 12 mit unterschiedlichen Werten für $Y_{(X/Glc.)max}$.
 $([Glc.]_0 = 20 \text{ mM}, [Gln]_0 = 3 \text{ mM})$

Simulation einer Chemostat-Fermentation

Das "klassische" Fermentationssystem für Hybridomazellen stellt ein kontinuierlich betriebener Rührkessel im Chemostatbetrieb (CSTR) dar. Die Leistungsfähigkeit dieser Technologie soll in einer Simulation mit dem oben als tauglich bewiesenen Modell untersucht werden.

Die Bilanzgleichungen für den CSTR werden für die vitale Zellkonzentration, die Substrate Glukose und Glutamin sowie die Produkte Ammonium und IgG angeschrieben.

$$\begin{aligned}
 (5.5.6) \quad \frac{dX}{dt} &= (\mu - D) \cdot X \\
 \frac{d[Glc.]}{dt} &= ([Glc.]_{ein} - [Glc.]_{aus}) \cdot D - q_{Glc.} \cdot X \\
 \frac{d[Gln.]}{dt} &= ([Gln.]_{ein} - [Gln.]_{aus}) \cdot D - q_{Gln.} \cdot X - k \cdot [Gln.] \\
 \frac{d[Amm.]}{dt} &= (-[Amm.]_{aus}) \cdot D + 0,7 \cdot q_{Gln.} \cdot X + k \cdot [Gln.] \\
 \frac{d[IgG]}{dt} &= (-[IgG]_{aus}) \cdot D + q_p \cdot X
 \end{aligned}$$

D	:	Verdünnungsrate	/	h ⁻¹
[] _{ein}	:	Einlaufkonzentration	/	mmo/l
[] _{aus}	:	Auslaufkonzentration	/	mmo/l

Das Gleichungssystem 5.5.6 wird mit Hilfe des oben erwähnten Simulationsprogramms numerisch gelöst. Die Abhängigkeit der stationären Konzentrationen von Zellen, Substraten und Produkten im kontinuierlichen Betrieb von der Verweilzeit ist in Abb. 5.5.6 zu sehen. Die Simulation zeigt das zu erwartende Bild, sie weicht aber insofern vom "klassischen" X/D-Diagramm ab, als die vitale Zellzahl bei sehr hohen Verweilzeiten infolge der Ammoniuminhibition wieder absinkt.

Simulation eines X/D-Diagramms eines kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktors mit offenporigen Mikroträgern

Als Alternative zur Rührkesselfermentation soll eine Perfusionskultur (s. Kap. 2) zum Produktivitätsvergleich herangezogen werden. Als Beispiel für ein gut beschriebenes und praktikables Perfusionssystem dient hier die Immobilisierung von Hybridomazellen in offenporigen Mikroträgern (s. Exkurs in Kap. 2). Im kontinuierlichen Betrieb eines solchen Systems gelten die gleichen Differentialgleichungen wie beim CSTR, es muß jedoch bedacht werden, daß die Verweilzeiten von Zellen und Medium durch die Immobilisierung entkoppelt sind. Zusätzlich existiert eine suspendierte Population von aus den Trägern infolge des vollständigen Bewuchses ausgetragenen Zellen. Wie bereits in Kapitel 3.4 erwähnt, muß die Bilanzgleichung für die vitalen Zellen um einen Ausdruck für die immobilisierte Zellmenge erweitert werden. Es ergibt sich:

$$(5.5.7.) \quad dX_{(sus)}/dt = (\mu - D) * X_{(sus)} + N_{X(imm)} * \mu$$

Zur Simulation werden folgende Annahmen gemacht, die beide für VX 12 schon experimentell verifiziert worden sind (Runstadler 1991).

- Die immobilisierte Zellzahl ist konstant über den variierten Bereich der Verweilzeit
- Die Wachstumsraten der immobilisierten und der suspendierten Population sind gleich

Abb. 5.5.7 zeigt das Ergebnis der Simulation. Die Einlaufkonzentrationen wurden analog zur Chemostat-Simulation gewählt. Als immobilisierte Zelldichte wurden $3 \cdot 10^7$ vitale Zellen pro ml Schüttvolumen Mikroträger gewählt, ein Wert, der für VX 12 mehrmals experimentell ermittelt worden ist und für Hybridomazellen im allgemeinen als am unteren Limit des Erreichbaren angesehen werden kann. Die Gesamtmenge an eingesetztem Träger bei einem Liter Gesamtreaktorvolumen wurde auf 200 ml festgesetzt, was einem Verhältnis von Wirbelschicht- zu Reaktorvolumen entspricht, wie es im in Kapitel 4 beschriebenen Kleinwirbelschichtreaktor vorliegt. Somit können alle Produktionsraten auf einen Liter Reaktorvolumen bezogen werden.

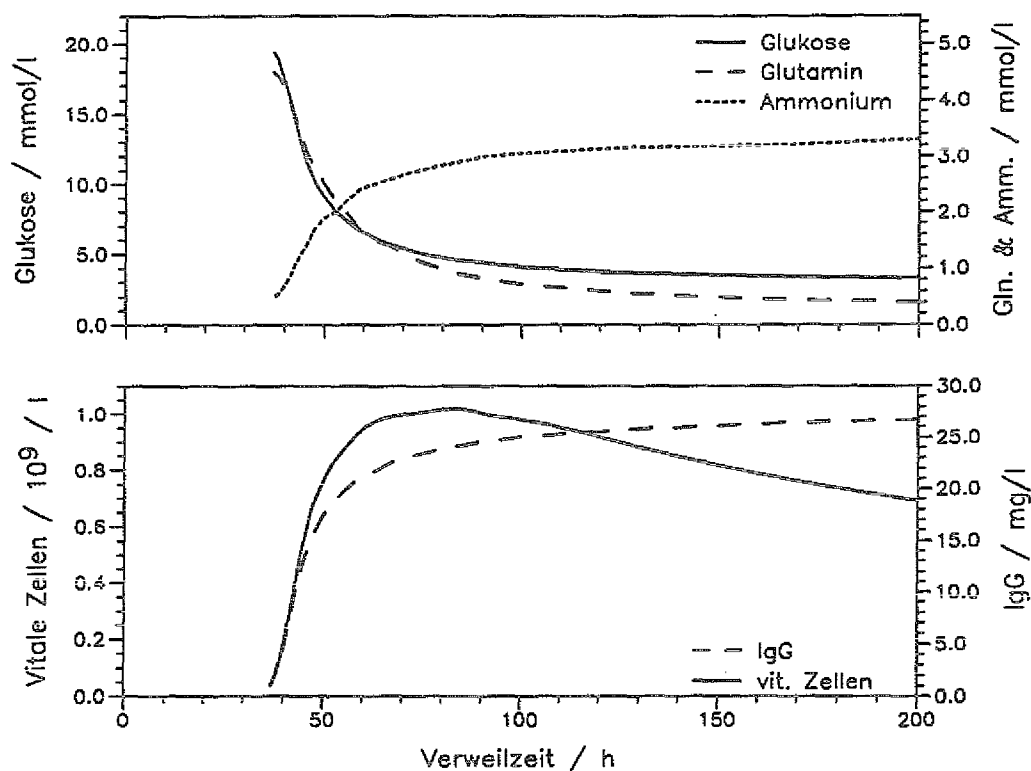


Abb. 5.5.6: Simulation eines X/D-Diagramms im CSTR; $[Glk.]_{ein} 20 \text{ mM}$, $[Gln.]_{ein} 5 \text{ mM}$

Man erkennt sehr gut die Vorteile des Perfusionssystems gegenüber dem offenen Chemostatbetrieb. Bei kürzeren Verweilzeiten als sie im CSTR infolge des Auswaschens der Population möglich sind erhält man eine gute Versorgung der immobilisierten Zellen bei gleichzeitig erniedrigter Ammoniumkonzentration. Die führt zu einer mehr oder weniger gleichbleibend hohen Produktkonzentration trotz erhöhten Mediendurchflusses. Die zellspezifische Produktbildungsrate wird infolge der verbesserten Medienbedingungen erhöht.

Ein gutes Maß für die Produktivität eines Reaktorsystems stellt die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) dar. Sie gibt an, wieviel Produkt pro Zeiteinheit und Liter Reaktorvolumen gebildet wird. In der Wirbelschichttechnologie bezieht man die RZA auf das Gesamtflüssigvolumen. Bei Vergleichen zwischen verschiedenen Wirbelschichtreaktoren muß dann auf das Verhältnis zwischen Wirbelschichtvolumen und Gesamtvolumen geachtet werden. Wie oben erwähnt ist die vorliegende Simulation bei einem Verhältnis von 1:5 angesetzt worden, was im Vergleich zu in der Zellkultur üblichen Fließbettsystemen einen vernünftigen Wert darstellt. Abb. 5.5.8 zeigt einen Vergleich zwischen den Raum-Zeit-Ausbeuten im CSTR und im Wirbelschichtreaktor anhand der durchgeführten Simulationen. Man erkennt den steilen Anstieg der RZA der immobilisierten

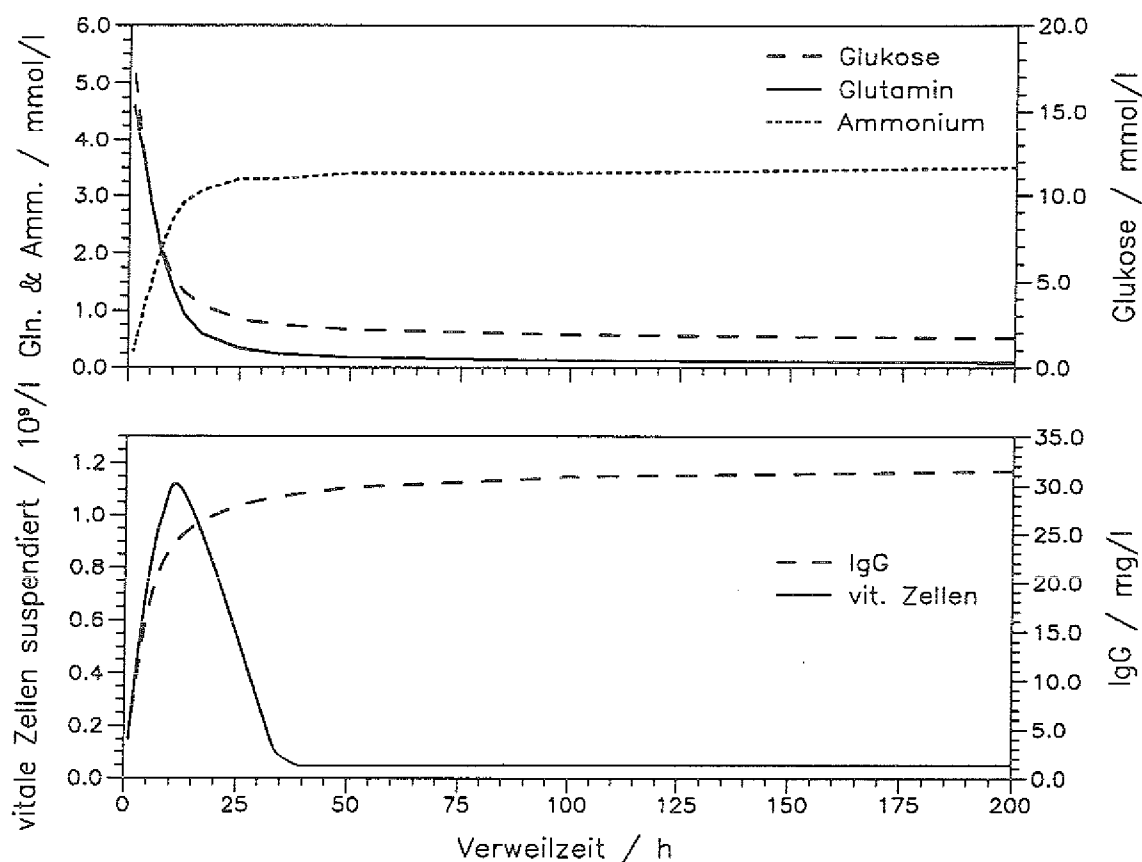


Abb. 5.5.7: Simulation eines X/D-Diagramms in einem Wirbelschichtreaktor; 200 ml Carrier, 1 l Gesamtvolumen, $[\text{Glk.}]_{\text{ein}} 20 \text{ mM}$, $[\text{Gln.}]_{\text{ein}} 5 \text{ mM}$

Kultur bei Verweilzeiten unterhalb des wash-out der offenen Chemostatkultur. Es sollte allerdings bedacht werden, daß diese sehr kurzen Verweilzeiten hohe Mediendurchflüsse erfordern, wobei anhand von Abb. 5.5.7 ersehen werden kann, daß bei sehr kurzen Verweilzeiten der Medienumsatz sehr gering ist. In Anbetracht des hohen Preises von Zellkulturmedien muß hier ein Kompromiß zwischen Medienausnutzung und Reaktorproduktivität gefunden werden. Insgesamt läßt sich jedoch die Überlegenheit des Wirbelschichtreaktors mit immobilisierten VX 12 Zellen über eine offene Chemostatkultur deutlich erkennen. In Kapitel 6 soll nun ein solches Reaktionssystem dargestellt und seine Leistungsfähigkeit auch experimentell nachgewiesen werden.

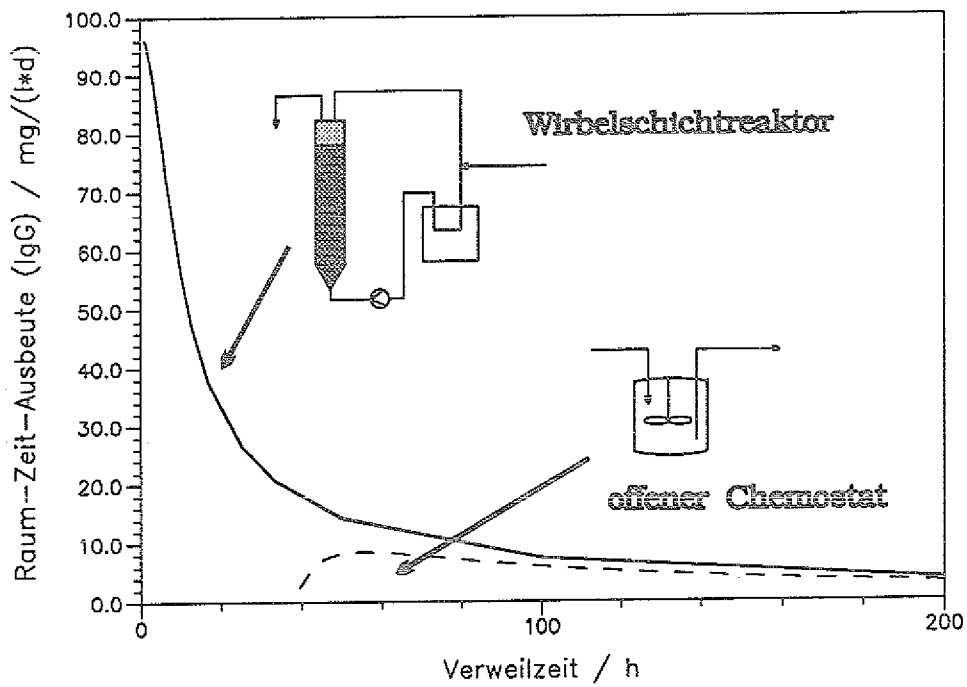


Abb. 5.5.8: Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten von CSTR und Wirbelschichtreaktor

6. Kultivierung einer immobilisierten Population der Hybridomazelllinie VX 12 in einem Wirbelschichtreaktor

6.1 Einführung

Die Ergebnisse der kinetischen Messungen aus Kapitel 5 und der daraus abgeleiteten Simulation der kontinuierlichen Produktion von IgG mit der Zelllinie VX 12 zeigten die deutliche Überlegenheit eines Perfusionssystems gegenüber dem offenen Chemostatbetrieb. Aus diesem Grunde sollte eine Perfusionskultur mit VX 12 diese Überlegenheit auch praktisch demonstrieren. Aufgrund der positiven Ergebnisse einer Testfermentation mit einer Maus-Maus-Hybridomazelle im Pilotmaßstab (s. Exkurs Kap. 2) wurde eine Entscheidung zugunsten der Immobilisierung der VX 12 in einem offenporigen Collagen-Material (VERAX-Microspheres, s. Kap. 2) gefällt. Der Einsatz dieses Trägermaterials sollte in einem Wirbelschichtreaktor analog zu dem im Exkurs vorgestellten System-200 erfolgen. Um eine leichte Handhabbarkeit zu gewährleisten, wurde ein Kleinwirbelschichtreaktorsystem von 150 ml Gesamtvolumen (s. Kap.4) verwendet.

Zu untersuchen war zunächst die prinzipielle Tauglichkeit des Reaktorsystems. Anhand einiger Testfermentationen wurde die Steriltechnik des Systems validiert, zusätzlich konnte die Eignung des Kleinwirbelschichtreaktors für die Kultivierung von VX 12 in ersten Besiedlungsexperimenten unter Beweis gestellt werden.

Abb. 6.1.1 zeigt den Verlauf einer solchen Testfermentation: Das Wirbelbett aus 30 ml Collagenträgern wurde zunächst im kontinuierlichen Betrieb durch Anpassen der Verweilzeit (s. Kapitel 6.2) vollständig besiedelt und anschließend in einem stationären Betriebszustand gehalten. Man erkennt die stationären Bedingungen an der konstanten Glukoseverbrauchsrate (GVR) der Kultur. Die Simulation des Wirbelschichtreaktors in Kapitel fünf sagte eine erniedrigte Ammoniumkonzentration unterhalb des inhibierenden Bereichs bei kurzen Verweilzeiten voraus. Ebenso wird eine stark erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute bezüglich des monoklonalen Antikörpers erwartet, da die kurzen Verweilzeiten die Produktionsbedingungen stark verbessern. Die Daten der Kultur bestätigen diese Voraussagen. Die im Rahmen der Simulation für die in der Fementation eingestellte Verweilzeit von 5 h errechnete Raum-Zeit-Ausbeute von 100 mg/(l*d) wird von dem tatsächlich erreichten Wert von ca. 170 mg/(l*d) deutlich übertroffen. Dies erklärt sich aus der bereits angesprochenen Tatsache, daß die der Simulation zugrundeliegenden Daten in ruhender Kultur unter Sauerstofflimitierung gewonnen worden waren. Die Kultivierung in der angesprochenen Fermentation wurde bei 75 % Luftsättigung vorgenommen. Vom Einfluß des pO_2 auf die Produktbildung wird im folgenden noch zu sprechen sein.

Nach dem Nachweis der Systemtauglichkeit sollte der Wirbelschichtreaktor zu weiteren Untersuchungen des Metabolismus von Hybridomazellen im Hinblick auf eine Optimierung der Produktivität solcher Systeme eingesetzt werden. Als Konsequenz der Ergebnisse der Testfermentation aus Kapitel 2 stellten sich folgende wichtige Fragen, denen im Rahmen der Experimente ein besonderer Stellenwert zukommen sollte:

- Auf welche Art und Weise kann ein solcher Wirbelschichtreaktor in möglichst kurzer Zeit in eine Produktionsphase gebracht werden, d.h. wie ist die vollständige Kolonisierung des Wirbelbettes schnellstmöglich zu erreichen

- Welchen Einfluß hat die Gelöstsauerstoffkonzentration auf den Metabolismus einer immobilisierten Hybridoma-Population

Im folgenden sollen Experimente zur Beantwortung dieser Fragen dargestellt und deren Ergebnisse interpretiert werden.

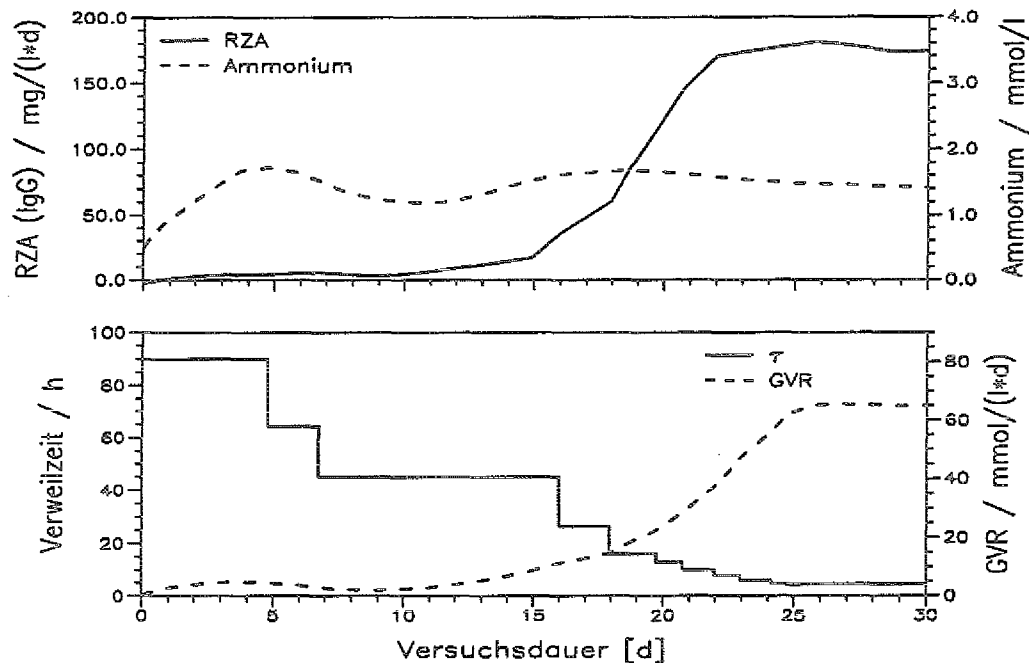


Abb. 6.1.1: Verlauf einer Testfermentation mit dem Kleinwirbelschichtreaktor

6.2 Optimierung des Anfahrverhaltens eines Wirbelschichtreaktors mit Immobilisierten Hybridomazellen

Ein besonders kritischer Punkt bei der Beurteilung von Reaktorsystemen für die Produktion von Wertstoffen mit biologischen Systemen ist die Bewertung des Anfahrverhaltens des Bioreaktors. Unter dem Anfahren eines Bioreaktors im allgemeinen versteht man den Versuch, einen stationären Zustand optimierter Produktivität in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Im Falle des Einsatzes von in Collagen-Mikroträgern immobilisierten Hybridomazellen in einem Wirbelschichtreaktor bedeutet dies die Zeit, die bis zur vollständigen Kolonisierung des Wirbelbettes benötigt wird. In einem vollständig bewachsenen Wirbelbett ist das zur Kolonisierung zur Verfügung stehende Volumen optimal ausgenutzt und es existiert ein Fließgleichgewicht zwischen Zellwachstum, Zelltod und dem Austrag von Tochterzellen aus den Mikroträgern infolge deren vollständiger Besiedlung. Dieses Fließgleichgewicht bietet nun die Möglichkeit, in einem stationären Zustand den monoklonalen Antikörper unter optimierten Medienbedingungen zu produzieren.

Das Anfahren von Wirbelschichtreaktoren mit immobilisierten Zellen erfolgt im allgemeinen *nutristatisch*. Dies bedeutet die Auswahl eines Leitsubstrates, dessen Konzentration im kontinuierlichen Betrieb konstant gehalten werden soll. Die gesteigerten Bedürfnisse der auf den Träger aufwachsenden Population nach Substraten werden durch eine Verkürzung der Verweilzeit im kontinuierlichen Betrieb befriedigt. Man erhält somit eine konstante Erhöhung der Verbrauchsrate des Leitsubstrates parallel zum Fortschreiten des Aufwachsens der Zellen im Wirbelbett. Das Erreichen des stationären Zustandes infolge der vollständigen Besiedlung der Mikroträger erkennt man an der konstant bleibenden Verbrauchsrate des Leitsubstrates.

Das "klassische" Leitsubstrat beim Anfahren von Bioreaktoren mit Säugerzellen war bisher Glukose. Dies war zum einen durch die "historische" Fehleinschätzung der Rolle der Glukose als Hauptenergielieferant (Newland 1990) begründet, zum anderen aber auch durch seine leichte Meßbarkeit in Auto-Analysatoren (s. Kap. 4). In Anlehnung an bereits existierende Erfahrungen mit VX 12 (Runstadler 1991) wurden die ersten Experimente ebenfalls mit Glukose als Leitsubstrat angefahren. Abb. 6.2.1 zeigt exemplarisch die Anfahrphase eines kontinuierlichen Experiments mit VX 12 in offenen Collagen-Mikroträgern.

Man erkennt am Verlauf der Glukoseverbrauchsrate (GVR) die Fermentationsstrategie: Durch die kontinuierliche Verkürzung der Verweilzeit bei konstanter Glukosekonzentration wird eine stetige Steigerung der Glukoseverbrauchsrate erreicht, die parallel zur immobilisierten Zellzahl verläuft. Ein Ende des Aufwachsorgangs läßt sich an der konstanten Glukoseverbrauchsrate ab Tag 25 erkennen. Die zu diesem Zeitpunkt erreichte Zelldichte betrug $3 \cdot 10^7$ vitale Zellen pro ml Schüttvolumen Collagen-Mikroträger. Dies entspricht der mit dieser Zelllinie unter den gegebenen Medienbedingungen (serumfrei) maximal erreichbaren Zelldichte.

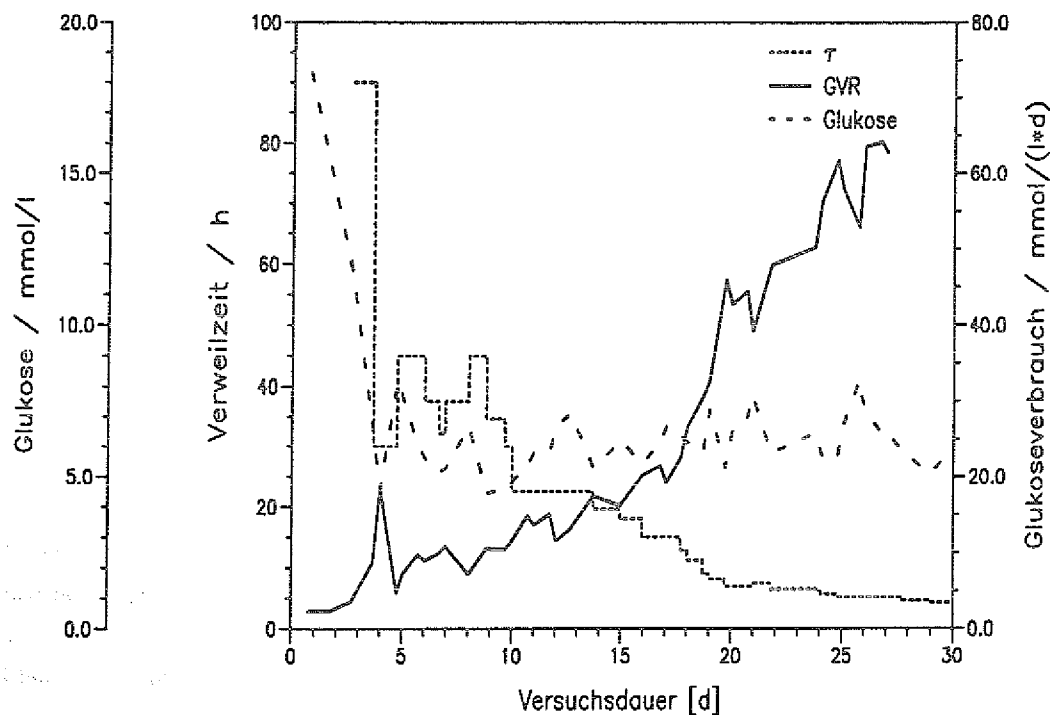


Abb. 6.2.1: Anfahren eines Wirbelschichtreaktors mit Glukose als Leitsubstrat

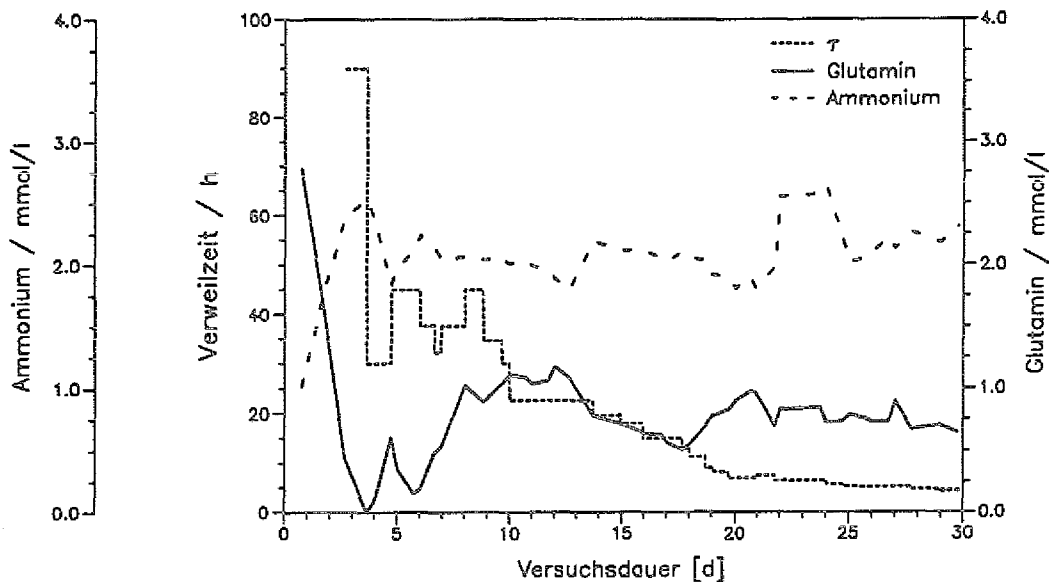


Abb. 6.2.2: Glutamin- und Ammoniumkonzentration während des glukostatischen Anfahrens

Alle im Verlauf der im folgenden beschriebenen Experimente gemessenen Besiedlungsdichten lagen im Rahmen von $2,5$ bis $3 \cdot 10^7$ vitalen Zellen pro ml Schüttvolumen. Bei Einsatz von serumbhaltigem Medium konnten $9 \cdot 10^7$ vitale Zellen pro ml erreicht werden.

Das Anfahrverhalten im vorliegenden Experiment ist unbefriedigend, da eine 25-tägige lag-Phase vor dem Beginn der Produktionsphase eine zu lange Totzeit eines solchen Reaktorsystems darstellt. Um dieser ungewöhnlich langen Aufwuchszeit auf den Grund zu gehen, wurden neben der Glukosekonzentration die Konzentrationen weiterer Substrate und Metabolite gemessen. Abb 6.2.2 zeigt den Verlauf von Glutamin und Ammonium während der Aufwuchsphase. Man erkennt deutlich eine außerordentlich geringe Glutaminkonzentration an Tag 3 bis 7. Das Absinken der Glutaminkonzentration auf stark limitierende Werte verlangsamt ganz offensichtlich das Aufwachsen der Zellen; reziprok hierzu stellt sich eine inhibierend hohe Ammoniumkonzentration ein. Nach einem Wiederanstieg der Glutaminkonzentration erfolgt der zunächst verlangsamte Wiederbeginn der Besiedlung.

Die Auswahl von Glukose als Leitsubstrat liefert ein suboptimales Anfahren des Wirbelschichtreaktors. Die Rolle des Glutamins als Hauptenergiesubstrat, die in Kapitel 5 beschrieben wurde, muß sich in einer gesteigerten Aufmerksamkeit bezüglich der Glutaminkonzentration während des Aufwachsens der Population auf den Mikroträger niederschlagen. Eine Glutamin-limitierte Kultur erfüllt nur noch Aufgaben des Erhaltungsstoffwechsels, die zum Aufbau von Zellmasse notwendige Energie aus dem Glutaminstoffwechsel kann nicht mehr zur Verfügung gestellt werden. Ein optimiertes Anfahren muß daher Glutamin als Leitsubstrat in nicht limitierender Konzentration halten. Da Ammonium mehrheitlich infolge des Glutaminstoffwechsels entsteht, kann die Ammoniumkonzentration bei kontrolliertem Glutaminniveau ebenfalls in unkritischen Bereichen gehalten werden.

Der Wechsel zu einer Fahrweise, die die Glutaminkonzentration oberhalb limitierender Konzentrationen hält, sollte eine deutlich verkürzte Aufwuchszeit auf die Mikroträger einbringen. Abb. 6.2.3 zeigt ein solcherart angefahrenes Experiment. Man erkennt deutlich das kontinuierliche Fortschreiten der Besiedlung infolge des Anstiegs im Glukoseverbrauch. Die Glutaminkonzentration liegt infolge der konsequenten Verkürzung der

Die Vorteile eines Wechsels des Leitsubstrates werden in Abb. 6.2.4 noch einmal besonders deutlich. Betrachtet man das Anwachsen der Glukoseverbrauchsrate als Zeichen für eine fortschreitende Besiedlung des Reaktors und setzt einen konstanten Glukoseverbrauch mit einer abgeschlossenen Besiedlung gleich, so kann man das Verhältnis von aktuellem zu maximal möglichem Glukoseverbrauch als eine Art "Besiedlungsgrad" interpretieren. Trägt man nun dieses Verhältnis über der Aufwuchszeit auf, so kann man sehr gut die Eignung der beiden Substrate Glukose und Glutamin als Leitsubstrat vergleichen. In Abb. 6.2.4 erkennt man die bessere Eignung des Glutamins deutlich an der verkürzten Besiedlungszeit.

Eine solcherart verkürzte Anfahrzeit sollte in verstärktem Maße zur Akzeptanz von Wirbelschichtprozessen in der Säugerzellkultur beitragen. Eine automatisierte Regelung des glukostatischen Aufwachsens einer Population in einem Wirbelschichtreaktor ist für die Ethanolproduktion mit immobilisiertem *Zymomonas mobilis* bereits beschrieben worden (Weuster 1991). Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Adaption von FIA-Techniken als on-line Analytik für die Säugerzellkultur (van der Pol 1991) sollten ein noch stärker verkürztes Anfahren durch eine computergestützte Fermentationsführung möglich machen. Im oben beschriebenen Experiment konnte nur darauf geachtet werden, daß die Glutaminkonzentrationen oberhalb eines limitierenden Niveaus lagen, durch eine Automatisierung läßt sich hier auch eine glutaminostatische Fahrweise durchführen.

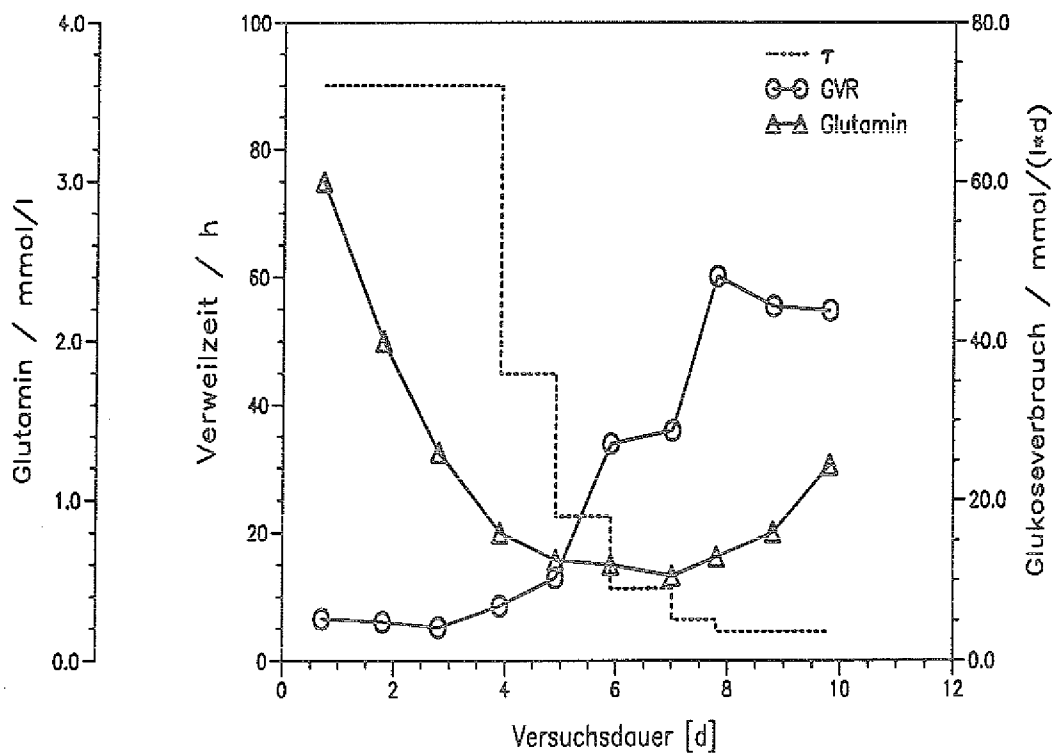


Abb. 6.2.3: Beschleunigtes Anfahren bei Glutamin als Leitsubstrat

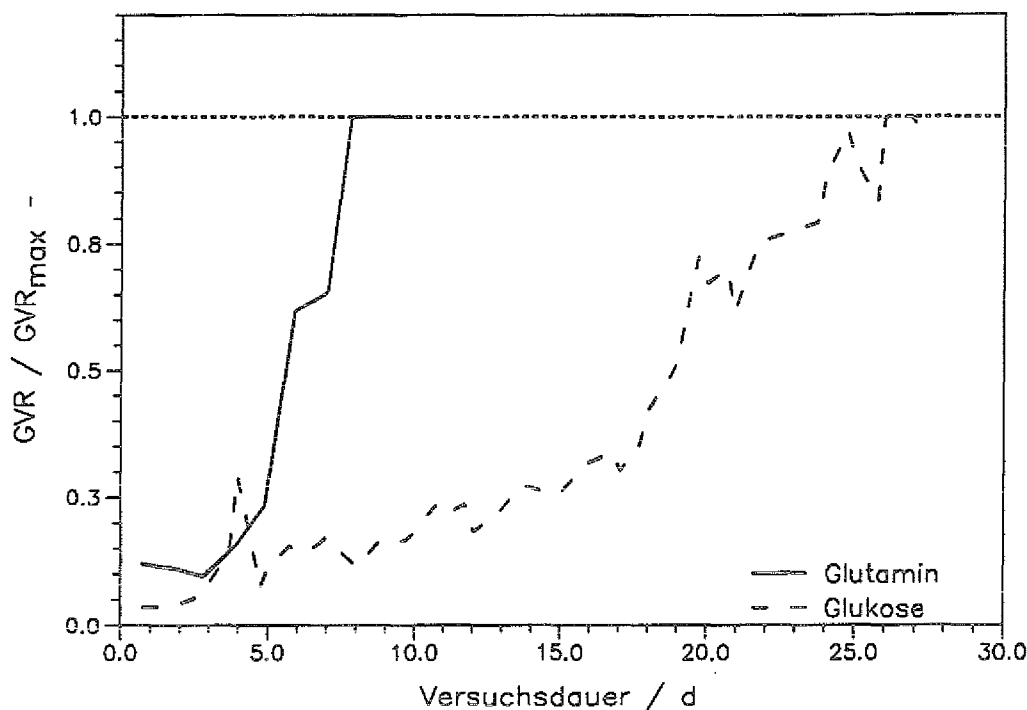


Abb. 6.2.4: Vergleich von Glukose und Glutamin als Leitsubstrat des nutritativen Anfahrens

6.3 Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf den Metabolismus einer immobilisierten VX 12-Population

Einführung

Die drastischen Veränderungen im Metabolismus der immobilisierten Hybridompopulation infolge des Versagens der Sauerstoffregelung im Laufe der Testfermentation aus Kapitel 2 legten eine gezielte Untersuchung des Einflusses des pO_2 auf eine immobilisierte Kultur nahe. Die erfolgreiche Arbeit mit dem Kleinwirbelschichtreaktor machte Experimente auf diesem Gebiet in ebendiesem System möglich.

Es wurden zwei Fermentationen von 120 und 40 Tagen Länge durchgeführt, in denen die Antwort einer in offenporigen Collagen-Mikroträgern kolonisierten VX 12-Kultur auf Veränderungen der Gelöstsauerstoffkonzentration gemessen wurde. Die Fermentationen wurden jeweils glukostatisch angefahren, nach Erreichen der Produktionsphase erfolgte die sukzessive Veränderung des pO_2 in Lösung bei konstanter Verweilzeit. Als Medium diente das in Kapitel 4 beschriebene Standardmedium, während der Aufwuchsphase wurde jeweils 1 % fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Nach Erreichen der Produktionsphase wurde auf serumfreies Medium umgestellt, diese Bedingungen wurden dann bis zum Ende der Fermentationen eingehalten. Der pH war auf 7,2, die Reaktortemperatur auf 37 °C eingeregelt worden. Im Verlauf der Experimente wurden mehrere Be-

7,2, die Reaktortemperatur auf 37 °C eingeregelt worden. Im Verlauf der Experimente wurden mehrere Betriebszustände wiederholt angefahren, wobei die gemessenen Werte im Rahmen des Meßfehlers reproduziert werden konnten. Die Stabilität der Zelllinie VX 12 in immobilisierter Kultur wurde damit nachgewiesen.

Abb. 6.3.1 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt von 32 Tagen aus der 120-tägigen Fermentation. Man erkennt die unterschiedlichen stationären Substrat- und Metabolitkonzentrationen infolge des veränderten pO_2 .

Aus den Stationärkonzentrationen der Substrate ([S]) und Produkte ([P]) lassen sich nun die Verbrauchs- und Produktionsraten des Reaktors berechnen. Einen Kenntnis der Gesamtzellmenge im Reaktor ($N_{X(gesamt)}$) erlaubt dann den Zugang zu den zellspezifischen Raten.

Man erhält aus Gleichung 6.3.1 und 6.3.2 unter der Voraussetzung $d[S]/dt$ und $d[P]/dt = 0$ (Stationaritätsbedingung) Gleichungen 6.3.3 und 6.3.4:

$$(6.3.1) \quad d[S]/dt = ([S]_{ein} - [S]_{aus}) / \tau - \frac{q_S * N_{X(gesamt)}}{V_R}$$

$$(6.3.2) \quad d[P]/dt = - [P]_{aus} / \tau + \frac{q_P * N_{X(gesamt)}}{V_R}$$

$$(6.3.3) \quad q_S = \frac{([S]_{ein} - [S]_{aus}) * V_R}{N_{X(gesamt)} * \tau}$$

$$(6.3.4) \quad q_P = \frac{([P]_{aus}) * V_R}{N_{X(gesamt)} * \tau}$$

Die Gesamtzahl der vitalen Zellen ergibt sich aus der Summe der immobilisierten sowie der suspendierten vitalen Zellen. Die immobilisierte Zellzahl wurde wie in Kapitel 4 beschrieben durch Auflösen des Collagen-Trägermaterials mit Hilfe des Enzyms Collagenase und anschließendes Auszählen der freigesetzten Zellen bestimmt. Es wurden zu unterschiedlichen Zeiten und Sauerstoffpartialdrücken im Medium Trägerproben gezogen und gezählt, wobei sich im ersten Versuch eine konstante immobilisierte Zellmenge von $3 * 10^7$ vitalen Zellen pro ml Schüttvolumen ergab. Im zweiten Experiment lag der Wert mit $2,8 * 10^7$ vitalen Zellen absolut in der gleichen Größenordnung. Offensichtlich zeigt sich die Dichte der immobilisierten Kultur unbeeinflusst von den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen im Medium, die unterschiedlichen Stationärkonzentrationen der Substrate und Produkte rühren von Veränderungen der metabolischen Raten der Zellen her. Ein ähnliches Ergebnis wird von Runstadler *et al.* (1991) berichtet. Sie beschreiben die immobilisierte Zelldichte einer Hybridomazelle in Collagen-Mikroträgern als unabhängig von der Verweilzeit im kontinuierlichen Betrieb eines Wirbelschichtreaktors.

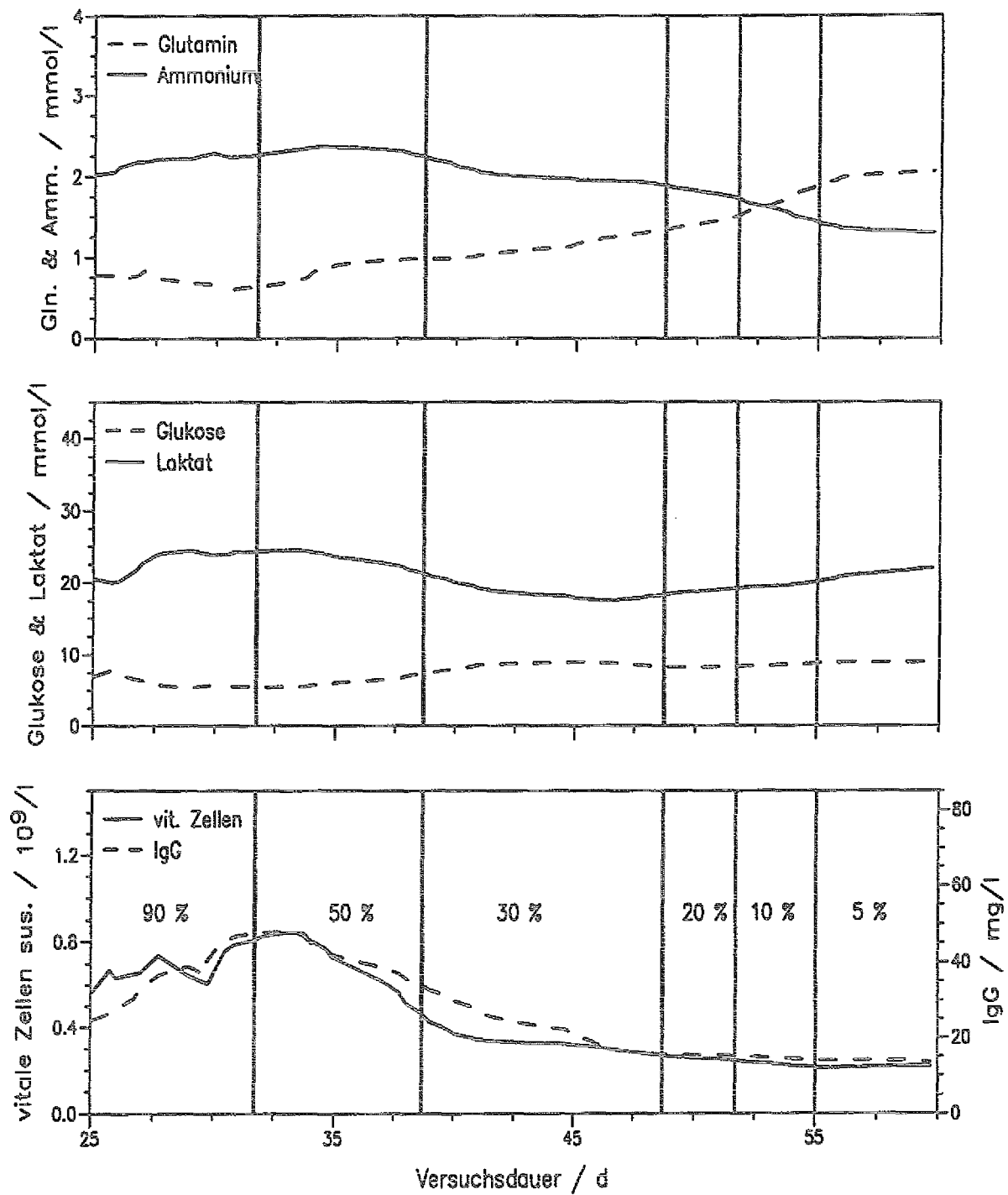


Abb. 6.3.1: Konzentrations-Zeit-Verlauf eines Ausschnitts einer Fermentation zur Untersuchung des Einflusses des pO_2

Eine wichtige Größe bei der Beurteilung des Einflusses der Sauerstoffkonzentration auf den Metabolismus einer immobilisierten Kultur stellt die Wachstumsrate der Population dar. Diese ist nicht direkt zugänglich, läßt sich allerdings durch eine Bilanzierung der Zellproduktion errechnen, wie bereits in Kapitel 3.4 angedeutet wurde. Dieser Zusammenhang soll im folgenden noch einmal genau hergeleitet werden. Hierzu müssen zwei Annahmen gemacht werden:

- Die immobilisierte Zellmenge ist konstant; diese Annahme ist bereits als korrekt nachgewiesen
- Die Wachstumsrate der immobilisierten sowie der suspendierten Zellen ist gleich. Diese Annahme ist dadurch zu begründen, daß die Verweilzeiten in der Suspension viel geringer sind als die Generationszeiten der Zellen (5 h im Vergleich zu ca. 24 h), so daß die aus den Mikroträgern in die Suspension freigesetzten Zellen keine Zeit zur Adaption an die Suspension haben, bevor sie ausgespült werden. Somit behalten sie alle charakteristischen Merkmale der immobilisierten Population.

Abb. 6.3.2 zeigt die Vorgehensweise bei der Bilanzierung der Zellproduktion durch die immobilisierte Population. Man betrachtet ein Volumenelement der Flüssigphase und bilanziert die ein- und auslaufenden Ströme im kontinuierlichen Prozeß. Im Zulauf zum Fermenter befinden sich keine Zellen, die Teilung der immobilisierten Zellen kann jedoch als Quellterm für die Zellproduktion geschrieben werden, da man davon ausgehen kann, daß eine sich teilende Zelle aufgrund der vollständigen Besiedlung des Mikroträgers keinen Platz mehr für die Tochterzelle findet und diese in die Suspension ausgetragen wird. Der Abaufterm ergibt sich aus der Bilanz des CSTR. Als Reaktionsterm kann die Teilung der suspendierten Zellen angegeben werden, die aufgrund der kurzen Verweilzeiten nur eine geringe Rolle spielt. Man kann nun schreiben

$$(6.3.5) \quad dX_{(sus.)}/dt = \mu \cdot N_{Ximm.} + \mu \cdot X_{sus.} \cdot V_R - X_{sus.} \cdot MFR$$

In Gl. 6.3.5 stellt $N_{Ximm.}$ eine Gesamtzellzahl dar, sie ergibt sich aus der immobilisierten Zellkonzentration pro ml Schüttvolumen und der eingesetzten Carriermenge. Im stationären Zustand ($d/dt = 0$) ergibt sich für die Wachstumsrate der immobilisierten Kultur

$$(6.3.6) \quad \mu = \frac{X_{sus.} \cdot MFR}{X_{sus.} \cdot V_R + N_{Ximm.}}$$

Anhand der Gleichungen 6.3.3 bis 6.3.6 können nun die Abhängigkeiten der einzelnen zellspezifischen Raten von der Gelöstsauerstoffkonzentration in der Flüssigphase formuliert werden.

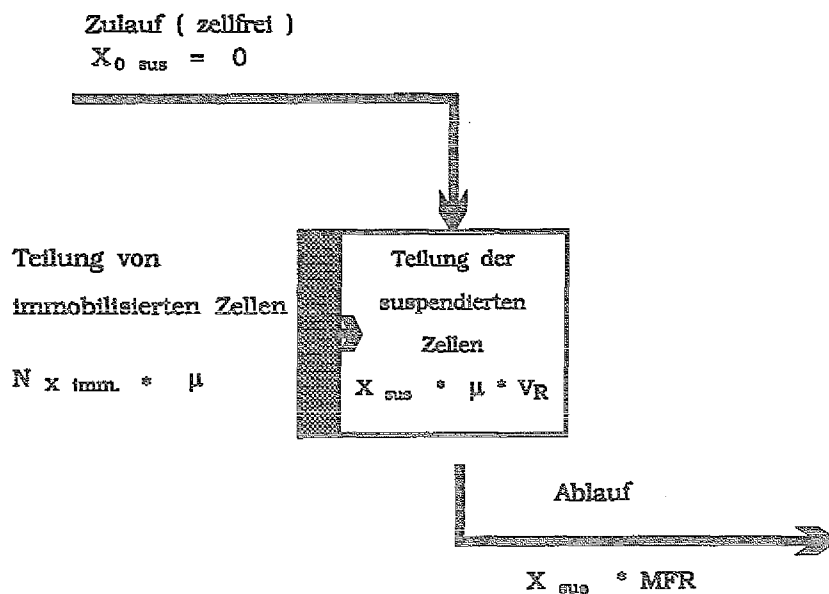


Abb. 6.3.2: Bilanz zur Bestimmung der Wachstumsrate der immobilisierten Zellen (MFR = Medienzulauf)

Einfluß des pO_2 auf die zellspezifischen Raten

Abb. 6.3.3 zeigt den Einfluß des pO_2 auf die Wachstumsrate und die spezifische Antikörperbildungsrate der Zelllinie VX 12. Man erkennt eine Sättigungskinetik bezüglich beider Größen, wobei der ähnliche Kurvenverlauf wiederum den Eindruck der wachstumsgekoppelten Produktbildung (s. Kap. 5.4) bestätigt.

Die Abhängigkeit der Aufnahmeraten der beiden Hauptsubstrate wurde ebenfalls untersucht. Im Falle des Glutamins (Abb. 6.3.4) findet sich eine ähnliche Sättigungskinetik wie für Wachstum und Produktbildung, eine parallele Entwicklung nimmt die Ammoniumbildungsrate bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen. Hierin kann eine Bestätigung der Annahme eines konstanten Verhältnisses von Ammoniumbildung zu Glutaminaufnahme bei der Modellierung des Wachstums in ruhender Kultur (s. Modellbildung Kap. 5.5) gesehen werden. Zu hohen Sauerstoffkonzentrationen wird weniger Ammonium pro aufgenommenes Glutamin gebildet.

Eine Erklärung hierfür kann die spezifische Aktivität der ammoniumübertragenden Transaminasen sein (s. Kap. 3.1), die im Falle der Sauerstofflimitierung niedriger sein mag. Die Desaminierung von Glutamat zu α -Ketoglutarat erfolgt mit Hilfe von Dehydrogenasen (GDH) unter Freisetzung von Ammonium. Die Desaminierung mit Transaminasen überträgt Ammonium auf andere Ketoverbindungen (s. Tab. 3.1.1). Hierbei

wird der Ammoniumstickstoff erhalten und kann zum Proteinaufbau eingesetzt werden. Größere Wachstumsraten, wie sie im Fall erhöhter Gelöstsauerstoffkonzentrationen auftreten, führen zu einem verstärkten zellulären Stickstoffbedarf. Die gesteigerte Transaminaseaktivität bei höherem pO_2 kann also durch das beschleunigte Zellwachstum hervorgerufen werden, das den verstärkten Einsatz des Ammoniumstickstoffs bei der Biomassebildung und der Proteinsynthese fordert.

Abb. 6.3.5 zeigt den geringen Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Glukoseaufnahme. Die zellspezifische Laktatproduktion nimmt unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken einen uneinheitlichen Verlauf. Die Auftragung des Anteils der Glukose, der zu Laktat umgesetzt wird gegen den Sauerstoffpartialdruck zeigt einen zunehmenden Anteil des anaeroben glykolytischen Abbaus mit abnehmender Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen werden fast 100 % der Glukose zu Laktat umgesetzt; selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung beträgt dieser Anteil mehr als 70 %, wodurch die in Kapitel drei gemachten Annahmen eindrucksvoll bestätigt werden.

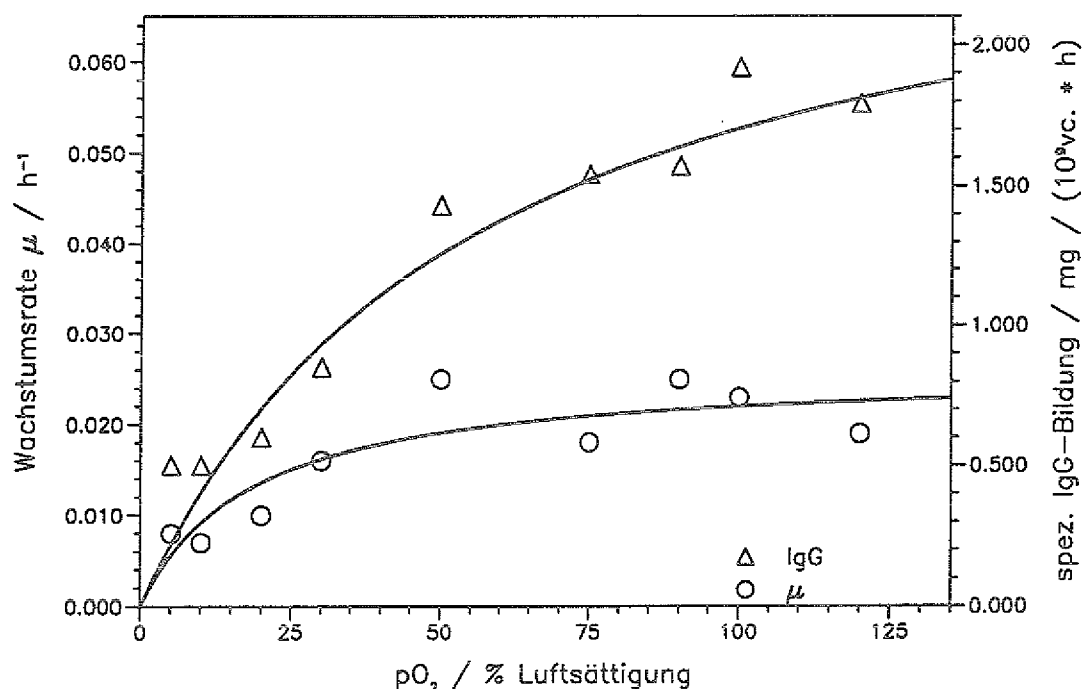


Abb. 6.3.3: Einfluß des pO_2 auf Wachstum und Produktbildung

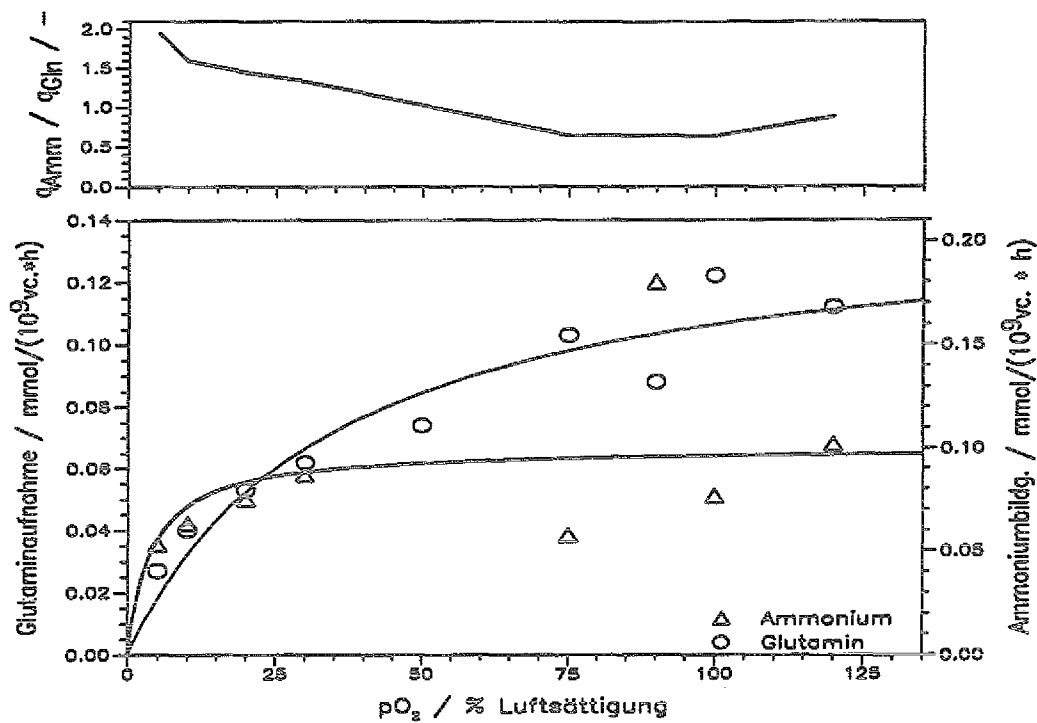


Abb. 6.3.4: Einfluß des pO_2 auf Glutaminaufnahme und Ammoniumbildung

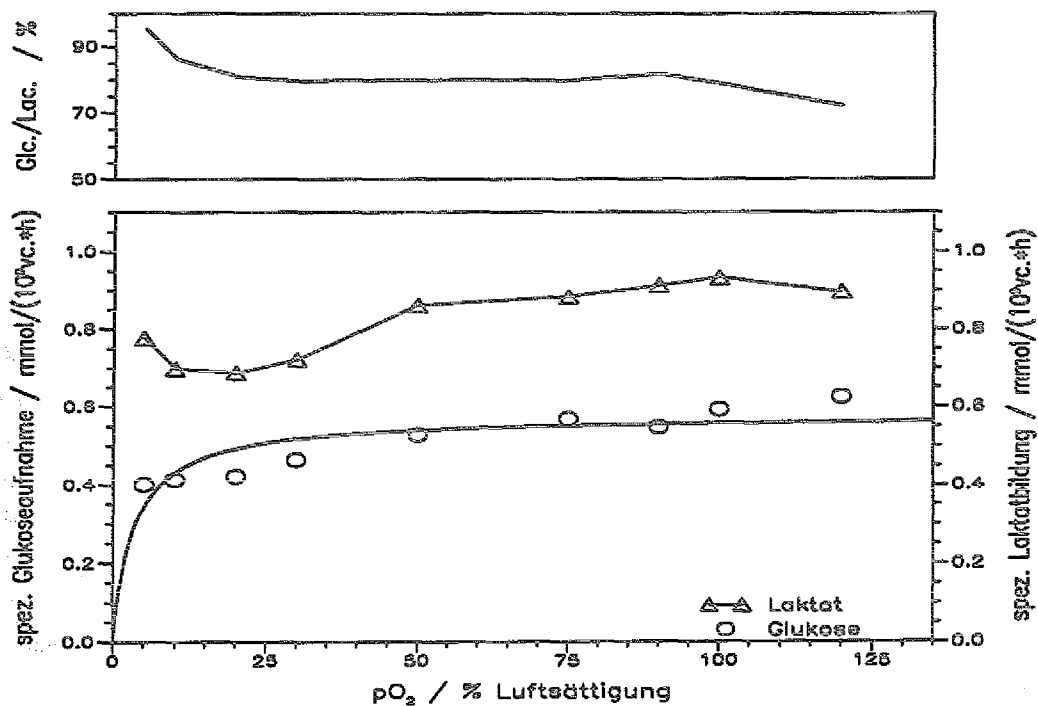


Abb. 6.3.5: Einfluß des pO_2 auf Glukoseaufnahme und Laktatbildung

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Interpretation des Sauerstoffeinflusses auf den Zellmetabolismus ist die Frage, ob sich durch die veränderten Medienbedingungen, wie z.B. verringerte oder erhöhte Stationärkonzentrationen an Mediensubstraten, überlagernde Effekte bilden. Dies könnte zum Beispiel eine wechselseitige Beeinflussung der Substrataufnahmeraten zum einen durch Sauerstoff und zum anderen durch ein verändertes Stationärniveau des Substrates selbst bedeuten. Eine genaue Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Verläufe in Abb. 6.3.1 zeigt, daß die Stationärkonzentrationen von Glukose und Glutamin im Bereich des doppelten bis dreifachen K_S liegen und daher nicht limitierend sind. Die Ammoniumkonzentrationen befinden sich mit maximal zwei mmol/l immer auf einem unkritischen Niveau. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer ausreichenden Medienperfusion, d.h. kurzer Verweilzeiten, bei kinetischen Messungen mit immobilisierten Zellen.

Überlegungen zum Einfluß des pO_2 auf den Stoffwechsel von Hybridomazellen

Eine Erklärung für den entscheidenden Einfluß des pO_2 auf die einzelnen Raten muß im Hybridomametabolismus gesucht werden (zur besseren Anschaulichkeit der Argumentation s. Abb. 3.1.1).

Glutamin wird von Hybridomazellen mehrheitlich oxidativ verstoffwechselt (Literaturüberblick s. Kap. 3). Hierbei wird es infolge zweier Desaminierungen in den Tricarbonsäure-Zyklus (TCA) eingeschleust, wo es zur Gewinnung von NAD bzw. FAD für die oxidative Phosphorylierung weiter abgebaut wird. Sauerstoff stellt nun den terminalen Elektronenakzeptor dieser Reaktionskette dar. Sinkt dessen Konzentration ab, so kann Glutamin nicht mehr oxidativ verstoffwechselt werden und die Zelle muß ihre Glutaminaufnahme senken, da es sonst zu einem Aufstauen von TCA-Intermediaten kommt.

Der Eintritt in den TCA kann über die Glutamatdehydrogenase (GDH) oder mit Hilfe von Transaminasen geschehen. Hierbei wird mit Hilfe der GDH Ammonium freigesetzt, während die Transaminasen Ammonium auf Pyruvat oder Oxalacetat übertragen, ohne daß Ammonium ins Kulturmedium gelangt. Offensichtlich ist die Aktivität der Transaminasen sauerstoffabhängig reguliert; dies erklärte das bei niedrigen pO_2 relativ konstante Verhältnis von Glutaminaufnahme zu Ammoniumfreisetzung (s. Abb. 6.3.4), das sich bei steigendem pO_2 zugunsten der Glutaminaufnahme verschiebt.

Säugerzellen verstoffwechseln Glukose nur zu einem sehr geringen Teil oxidativ, die überwiegende Mehrheit der Glukose wird anaerob via Glykolyse zu Laktat verarbeitet. Daher ist der geringe Einfluß des pO_2 auf die Glukoseaufnahme nicht verwunderlich. Die Laktatbildung hängt nun von der Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase ab. Diese nimmt mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu, die leicht zurückgehende Glukoseaufnahme hat aber einen dazu gegenläufigen Effekt. Hierdurch ist der uneinheitliche Verlauf der zellspezifischen Laktatbildung mit variierendem pO_2 zu erklären. An dieser Stelle ist deutlich zu sehen, daß selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung (<75 % Luftsättigung) mehr als 70 % der Glukose zu Laktat umgesetzt werden, wodurch noch einmal eindrucksvoll die Argumentation der unkontrollierten Glukoseaufnahme und der anschließenden Umsetzung zu Laktat unterstützt wird (s. Kap. 3).

Der Einfluß des Sauerstoffs auf Wachstum und Produktbildung wird deutlich, wenn man sich die unterschiedlichen Aufgaben der beiden Hauptsubstrate Glukose und Glutamin vor Augen führt. Dies kann quantitativ durch die Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels unter dem Einfluß variierender Sauerstoffkonzentrationen (s. Kap. 5.2) erreicht werden. Gleichung 5.2.8 bietet die Möglichkeit, die maximalen Ausbeutekoeffizienten $Y_{(X/Glc.)max}$ und $Y_{(X/Gln.)max}$ sowie die Maintenance-Koeffizienten $m_{Glc.}$ und $m_{Gln.}$ zu bestimmen.

$$(5.2.8) \quad Y(X/S) = \frac{Y(X/S)_{\max} \cdot \mu}{Y(X/S)_{\max} \cdot m_S + \mu}$$

Die graphische Auswertung der Experimente nach Gleichung 5.2.8 sind in Abb. 6.3.6 und 6.3.7 dargestellt. Die nichtlineare Regression (Freyer und Wedy 1990) liefert die folgenden Größen (s. auch Abb. 6.3.8):

$Y(X/\text{Glc.})_{\max}$	:	$0,151 \cdot 10^9$ vit. Zellen / mmol Glukose
$Y(X/\text{Gln.})_{\max}$	:	$0,26 \cdot 10^9$ vit. Zellen / mmol Glutamin
$m_{\text{Glc.}}$	:	$0,39 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vit. Zellen} \cdot \text{h})$
$m_{\text{Gln.}}$	:	$0,008 \text{ mmol}/(10^9 \text{ vit. Zellen} \cdot \text{h})$

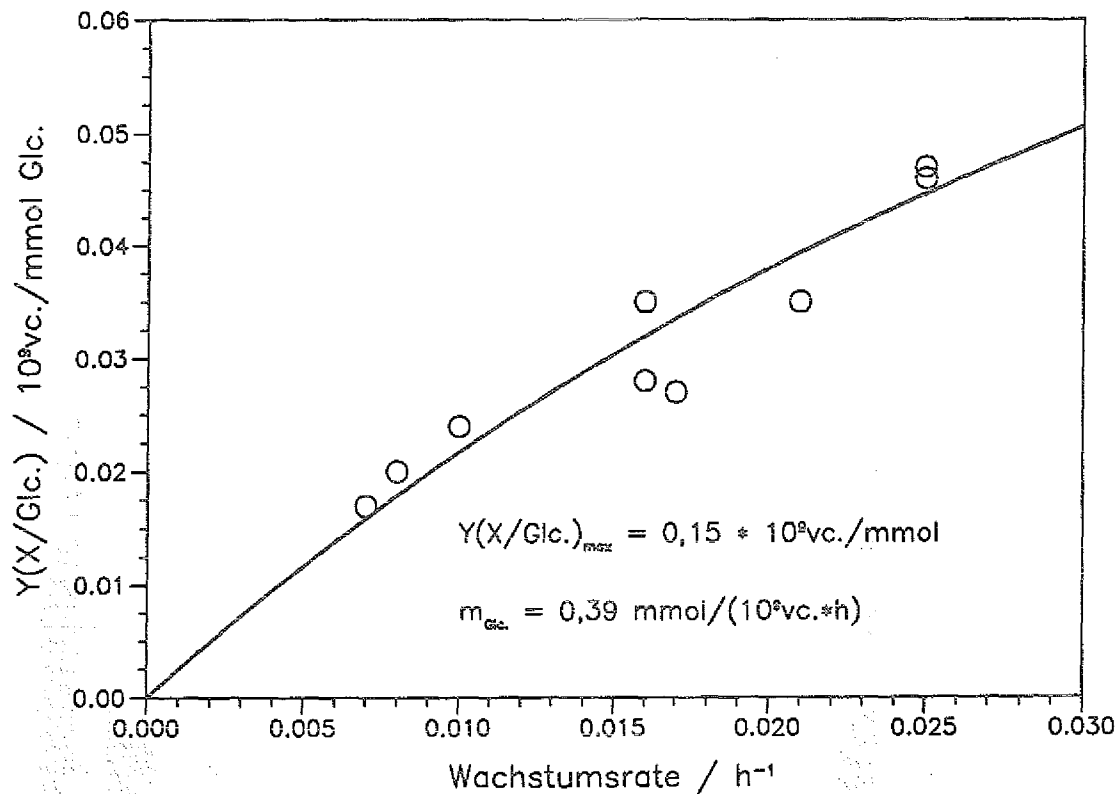


Abb. 6.3.6: Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels unter Sauerstofflimitierung (Glukose als Substrat)

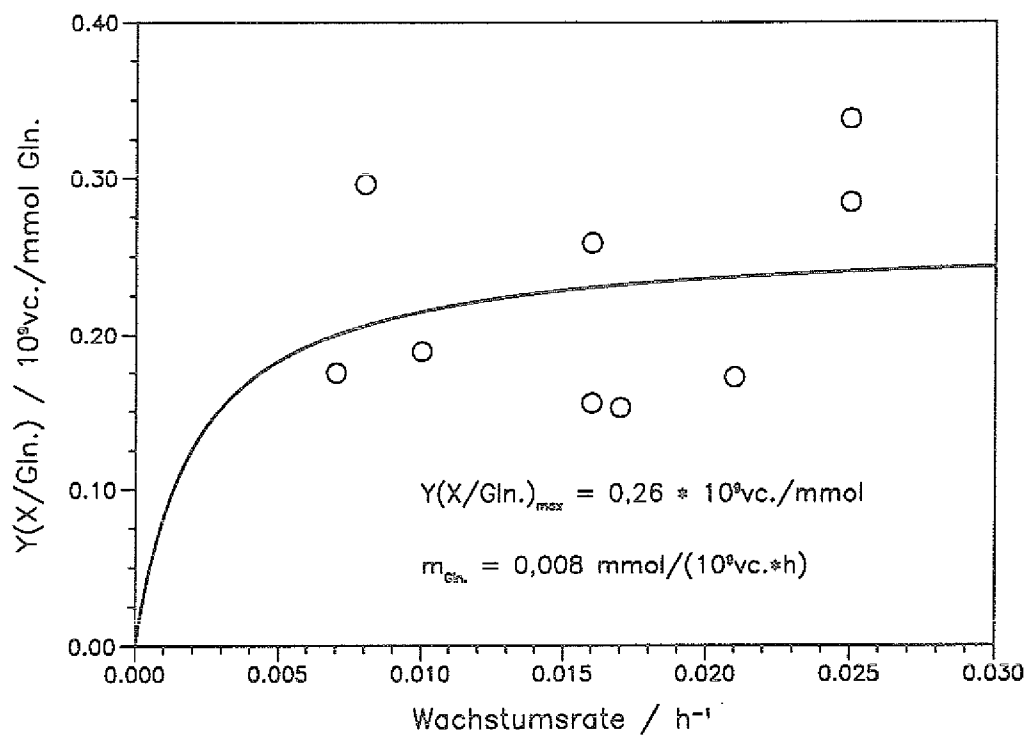


Abb. 6.3.7: Ermittlung der Parameter des Erhaltungsstoffwechsels unter Sauerstofflimitierung (Glutamin als Substrat)

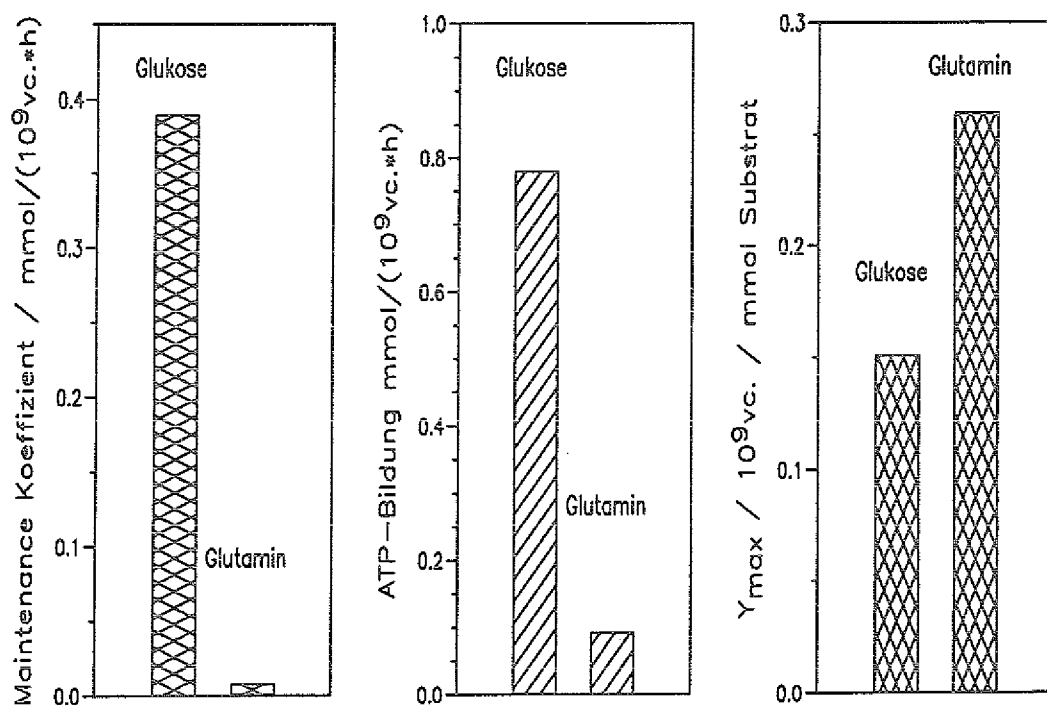


Abb. 6.3.8: Parameter des Erhaltungsstoffwechsels

Ein Vergleich der erhaltenen Werte mit den Ergebnissen der batch-Kinetiken zeigt eine vertretbare Übereinstimmung der Biomasseausbeutekoeffizienten, die Maintenance-Koeffizienten weichen allerdings deutlich voneinander ab. Vor allem der im Vergleich zur batch-Kinetik besonders niedrige Glutamin-Maintenance-Koeffizient fällt hierbei ins Auge. An dieser Stelle muß bedacht werden, daß die Koeffizienten aus Kapitel 5 unter Glukose- bzw. Glutaminlimitierung entstanden sind, wogegen bei den kontinuierlichen Messungen eine Sauerstofflimitierung vorlag. Daher sind diese Koeffizienten nicht unbedingt vergleichbar. Im allgemeinen läßt sich allerdings sagen, daß die batch-Kinetiken nur Trends anzeigen sollten, die wesentlich exakteren und verlässlicheren Messungen sollten ohnehin im kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden. Die in diesem Kapitel angegebenen Maintenance-Koeffizienten spiegeln also sehr viel eher die "Realität" wieder.

Anhand der erhaltenen Parameter kann man nun ersehen, daß Glukose mehrheitlich als Substrat für den Erhaltungsstoffwechsel zur Verwendung kommt, wohingegen die aus Glutamin gewonnenen Energieeinheiten eher zum Aufbau von Biomasse und zur Produktbildung verwendet werden. Dies bestätigt den ähnlichen Verlauf der Kinetiken für q_{Gln} , μ und q_p . Glacken (1986) formuliert die Energieausbeuten aus drei Möglichkeiten der oxidativen Glutaminverwertung:

- Vollständige Oxidation zu CO_2 liefert 21 mmol ATP/mmol Glutamin
- Partielle Oxidation zu Aspartat liefert 12 mmol ATP/mmol Glutamin
- Partielle Oxidation zu Laktat liefert 6 mmol ATP/mmol Glutamin

Die anaerobe Bildung von Laktat aus Pyruvat liefert hingegen nur 2 mmol ATP/mmol Glukose, d.h. die Energieausbeute aus dem Glutaminstoffwechsel ist in jedem Fall deutlich höher als die Ausbeute aus dem Glukosestoffwechsel.

Man kann nun den für Aufgaben des Erhaltungsstoffwechsels aufgewendeten Substratverbrauch in Energieäquivalente umrechnen (vgl. Kap. 5.2). Hierbei soll in Analogie zu Kapitel 5.2 ebenfalls davon ausgegangen werden, daß 50 % des verbrauchten Glutamins vollständig zu CO_2 oxidiert werden. Dies bedeutet einen Energiegewinn von 11,5 mmol ATP pro mmol aufgenommenes Glutamin. Für Glukose soll näherungsweise eine ATP-Bildung von 2 mmol ATP pro mmol aufgenommene Glukose angesetzt werden. Man erkennt, daß die deutlich bessere Energieausbeute aus Glutamin den drastischen Eindruck des verschwindend geringen Maintenance-Anteils der Glutaminaufnahme relativiert. Die Anteile des Maintenanceenergiegewinns aus Glukose und Glutamin unterscheiden sich um den Faktor sieben, wohingegen die auf die Substrataufnahme bezogenen Maintenance-Anteile noch um den Faktor 40 differieren. Auch an dieser Stelle zeigen sich Unterschiede zu den Auswertungen der Satzreaktor-Experimente in offener Kultur, die obige Argumentation zur Exaktheit von Daten aus Satzreaktorversuchen bleibt auch hier gültig. Abb. 6.3.8 zeigt noch einmal zusammenfassend die Ergebnisse der Betrachtungen zum Erhaltungsstoffwechsel.

Anhand der hier gewonnenen Einsichten kann nun die Formulierung von optimierten Prozeßbedingungen für die kontinuierliche Produktion von monoklonalen Antikörpern mit immobilisierten Hybridomazellen begonnen werden.

Analog zu den Überlegungen aus Kapitel 5.4 soll eine Auftragung von μ gegen q_p die eventuelle Korrelation von Wachstum und Produktbildung bestätigen. Die in den Wirbelschichtreaktorversuchen erhaltenen Daten sind in Abb. 6.3.9 dargestellt. Die Vermutungen aus Kapitel 5.4 werden hier eindrucksvoll bekräftigt, die Zelllinie VX 12 weist eine wachstumsgekoppelte Antikörperbildung auf. Auffallend zeigt sich an dieser Stelle im Vergleich der Verlauf der beiden Auftragungen μ gegen q_s . Beide Kurvenverläufe bestätigen die positive Korrelation zwischen Wachstums- und Produktbildungsrate, die erhaltenen Steigungen bei der linearen Regression unterscheiden sich deutlich.

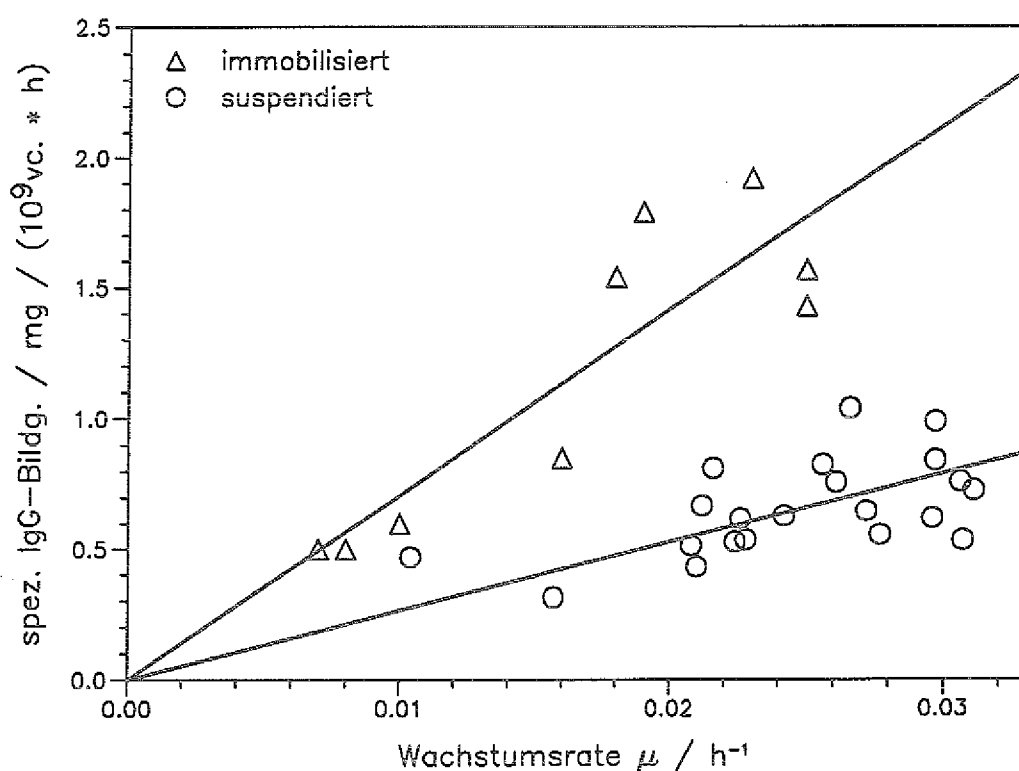


Abb. 6.3.9: Wachstumsgekoppelte IgG-Bildung

Die Produktbildungsrate in offener Kultur liegen deutlich unter den in immobilisierter Kultur erhaltenen, zusätzlich findet man bei den immobilisierten VX 12 etwas niedrigere Wachstumsraten. Die Substrataufnahmeraten befinden sich dagegen in einer ähnlichen Größenordnung wie in den Satzreaktorexperimenten. In immobilisierter Form verschiebt sich offensichtlich die Substratausnutzung zugunsten der Produktbildung bei gleichzeitig verlangsamttem Wachstum.

Dieses Ergebnis erweist sich besonders im Hinblick auf einen Produktionsprozeß mit immobilisierten Hybridomazellen als bemerkenswert, da für die wirtschaftlich interessante Antikörperproduktion weniger

wachsende, als produzierende Zellen benötigt werden. Durch die Immobilisierung könnte also eine effizientere Nutzung der ohnehin sehr teuren Zellkulturmedien erreicht werden, wenn die durch den Medienverbrauch gewonnenen Energieäquivalente verstärkt zur Produktbildung genutzt werden.

7. Versuch der Überwindung der Ammoniuminhibierung durch gezielte Dialyse

7.1 Einführung

Die in der Literatur vieldiskutierte Inhibierung des Wachstums von Säugerzellen durch Ammonium ist in Kapitel fünf auch für die Hybridomazelllinie VX 12 nachgewiesen worden. Anhand von Simulationsrechnungen war gezeigt worden, daß durch Einstellen von sehr kurzen Verweilzeiten in kontinuierlichen Fermentationen die Ammoniumkonzentration unterhalb stark inhibierender Werte abgesenkt werden konnte. Der Einsatz von Perfusionssystemen zum Erreichen besonders kurzer Verweilzeiten stellte sich hierbei als positiv heraus. Dies konnte auch anhand kontinuierlicher Experimente in einem Kleinwirbelschichtreaktor nachgewiesen werden.

Das Absenken von stationären Inhibitorkonzentrationen mit Hilfe von kurzen Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb bedeutet eine "Verdünnung" des Inhibitors auf Kosten der Ausnutzung der Medien, d.h. die eher katalytisch wirksamen Bestandteile wie z.B. Proteine und Vitamine werden in viel zu großer Menge zugefüttert. Im Falle der teuren Zellkulturmedien - das in dieser Arbeit verwendete Standardmedium hat einen Preis von ca. 5 DM/l - bedeutet dieses "Verdünnungsprinzip" eine Verschwendung wertvoller Medienbestandteile. Es liegt daher nahe, nach einer Methode zu suchen, die Inhibitoren, wie z.B. Ammonium nicht unselektiv ausverdünnt, sondern gezielt aus der Fermentationslösung entfernt.

In der Literatur sind einige Methoden zur Ammoniumabtrennung bereits beschrieben worden, die sich in drei Hauptgruppen einteilen lassen.

Die erste Methode versucht eine Reduktion der Ammoniumbildung während der Kultivierung zu erreichen. Dies gelingt zum einen durch eine gezielte Fermentationsführung im fed-batch Betrieb unter kontrollierter Glutaminzufuhr (Glacken *et al.* 1986). Auf diese Art und Weise wird die Sekretion des Ammoniums durch die Zellen beschränkt und es werden nicht inhibierende Konzentrationen im Medium eingestellt. Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Ammoniumbildung stellt die Verwendung von Glutamin-freien Medien dar. Hassell *et al.* ersetzten Glutamin durch Glutamat und erreichten bei einer schrittweisen Addition des Glutamats eine um 20 % erhöhte Zelldichte im Vergleich zum Glutamin enthaltenden Medium. Der Ersatz von Glutamin durch α -Ketoglutarat führte jedoch zu einer Verringerung der Zelldichte. Martinelle und Häggström (1992) schlagen den Ersatz von NaOH durch KOH als pH-Korrekturmittel bei geregelten Fermentationen vor. Hierdurch soll der aktive Transport von Ammoniumionen in das Cytosol verringert werden. Grundlage des Vorschlags sind die ähnlichen Ionenradien von Ammonium- und Kaliumionen, überschüssiges Kalium soll hierbei Transporterplätze in Konkurrenz zu Ammonium besetzen.

In einem zweiten Ansatz wird versucht, Ammonium auf Kationenaustauscherharzen gezielt zu binden. Iio *et al.* (1985) setzten ein Silizium-Aluminium-Absorbens in einem Dialyseschlauch in Satzreaktorversuchen mit Hybridomazellen ein und fanden eine deutliche Verringerung der finalen Ammoniumkonzentration gepaart mit

einem deutlichen Anstieg der Endzellichte in serumfreiem Medium. Carbonell *et al.* (1992) entfernten Ammonium mittels Klinoptilit, einem Kationentauscherharz, ebenfalls in Satzreaktorversuchen mit Hybridomazellen. Dawson (1974) beschreibt die Adsorption von nichtionischem Ammoniak bei pH 9-12 auf einem Ionentauschermaterial unter Bildung eines stabilen Amin-Komplexes. Dieses Verfahren wurde zur Ammoniakentfernung von Haushaltsabwässern patentiert. Polak und Hof (1987) beschreiben eine patentierte Adsorption von Ammonium auf Magnesiumphosphat, wodurch das traditionell in der renalen Perfusion eingesetzte Zirkoniumphosphat ersetzt werden soll.

Die dritte Gruppe der Methoden zur Ammoniumentfernung bilden die Membranmethoden. Sie stellen eine besonders schonende Art der Stoffabtrennung dar (Strathmann 1979), wobei Membranverfahren sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen absorptiven Methoden auch für einen kontinuierlichen Prozeß eignen. Abb. 7.1.1 stellt das Prinzip der Ammoniumabtrennung über eine Membran dar: Zwei Phasen, eine ammoniumreiche Donorphase und eine zur Aufnahme des Ammoniums geeignete Akzeptor- oder Stripphase werden durch eine Membran getrennt. Die treibende Kraft für den Übergang des Ammoniums von der Donor- zur Akzeptorphase stellt der Konzentrationsgradient quer zur Membran dar. Das Aufrechterhalten des Transports ist mit der Existenz des Gradienten verknüpft, daher muß die Ammoniumkonzentration auf der Akzeptorseite ständig klein gehalten werden.

Die bislang am häufigsten eingesetzte Membranmethode beruht auf der Diffusion gasförmigen Ammoniaks durch die Poren einer Gasdiffusionsmembran. Abb. 7.1.2 zeigt das Prinzip dieser Methode. Ammoniak diffundiert durch die Membran und wird akzeptorseitig dem Transportgleichgewicht entzogen. Dies kann entweder durch Protonierung in saurem Puffer oder durch Strippen des gasförmigen Ammoniaks mit Hilfe eines Strip-Gases oder Vakuum geschehen. Ein großes Problem der Ammoniumentfernung via Gasdiffusion stellt die Tatsache dar, daß das pH-abhängige Gleichgewicht zwischen Ammonium und Ammoniak bei zellkulturüblichen pH-Werten weit auf der Seite der protonierten Form liegt. Anhand der Henderson-Hasselbalch-Beziehung läßt sich ein Verhältnis Ammonium zu Ammoniak von 190 : 1 bei pH 7 errechnen (s. Abb. 7.1.3). Dies bedeutet einen sehr geringen Konzentrationsgradienten quer zur Membran und daher langsame Transportraten. Eine effektive Ammoniumentfernung erfordert daher große Membranflächen.

Hecht *et al.* (1990) wendeten Hohlfasermodule auf der Basis Polypropylen an, um inhibierendes Ammonium aus fed-batch Kulturen von *Myxococcus virescens* zur Produktion des Antibiotikums Myxovirecin A zu entfernen. Sie untersuchten die Effektivität verschiedener Methoden zur akzeptorseitigen Entfernung des über die Membran transportierten Ammoniaks und kamen zu dem Ergebnis, daß ein optimales Aufrechterhalten des Konzentrationsgradienten quer zur Membran durch die Protonierung des transportierten Ammoniaks in 1 M p-Toluol-Sulfonsäure erreicht wird. Durch Integration dieses Verfahrens in eine Fermentation wurde bei deutlich erniedrigten Ammoniumkonzentrationen eine 2,6 fache Erhöhung der Antibiotikakonzentration erzielt.

Brose und van Eickeren (1990) nutzten Gasdiffusionsmembranen in Hohlfaser- und Flachmembranmodulen zur Ammoniumentfernung aus Zellkulturmedien. Die Eignung ihres System wiesen sie indirekt nach. Frisches Zellkulturmedium wurde mit 14 mM Ammonium versetzt und anschließend einer Entgiftung im angeführten Prozeß unterworfen. In dem solchermaßen von Ammonium befreiten Medium zeigten Mikroträger-Kulturen von BHK-Zellen die gleichen Wachstumseigenschaften wie in Ammonium-freiem Medium. Die direkte Integration des Prozesses in eine Fermentation wurde nicht gezeigt.

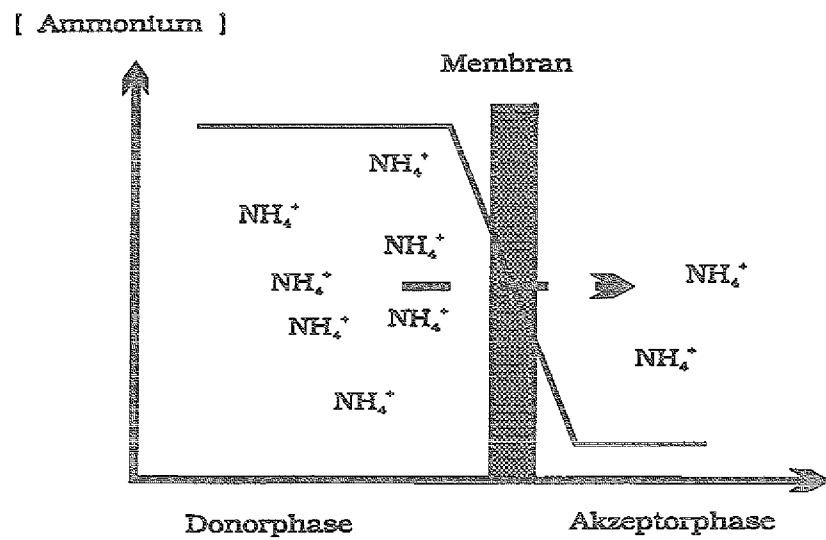


Abb. 7.1.1: Prinzip der Ammoniumabtrennung mit Membranmethoden

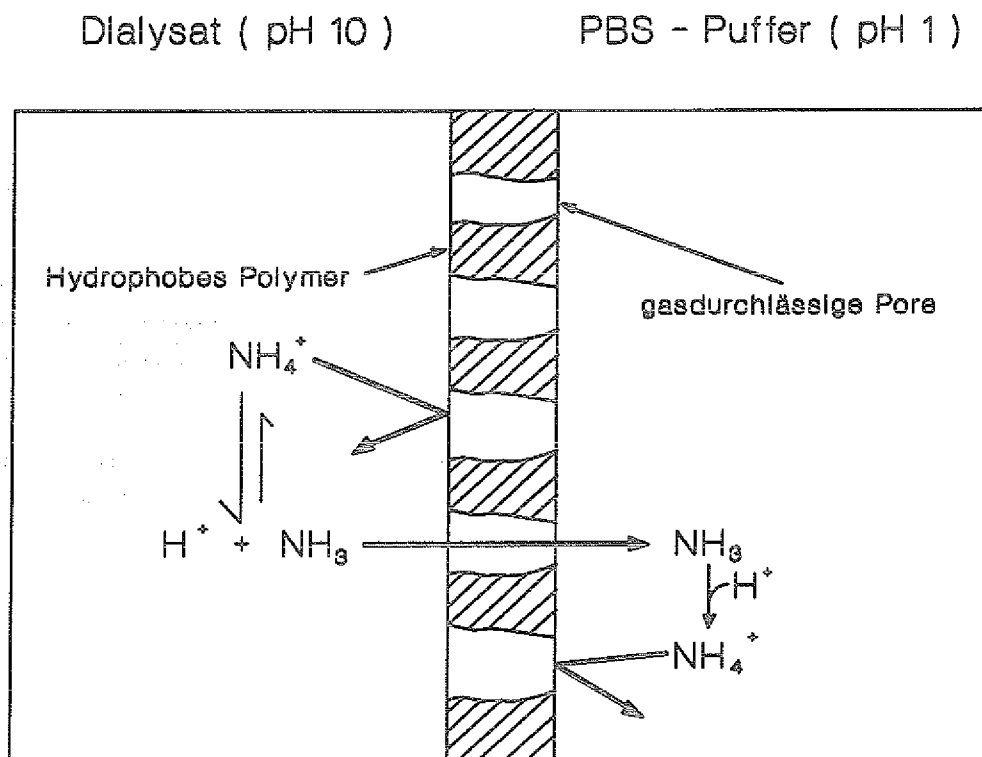


Abb. 7.1.2: Ammoniakentfernung mit einer Gasdiffusionsmembran

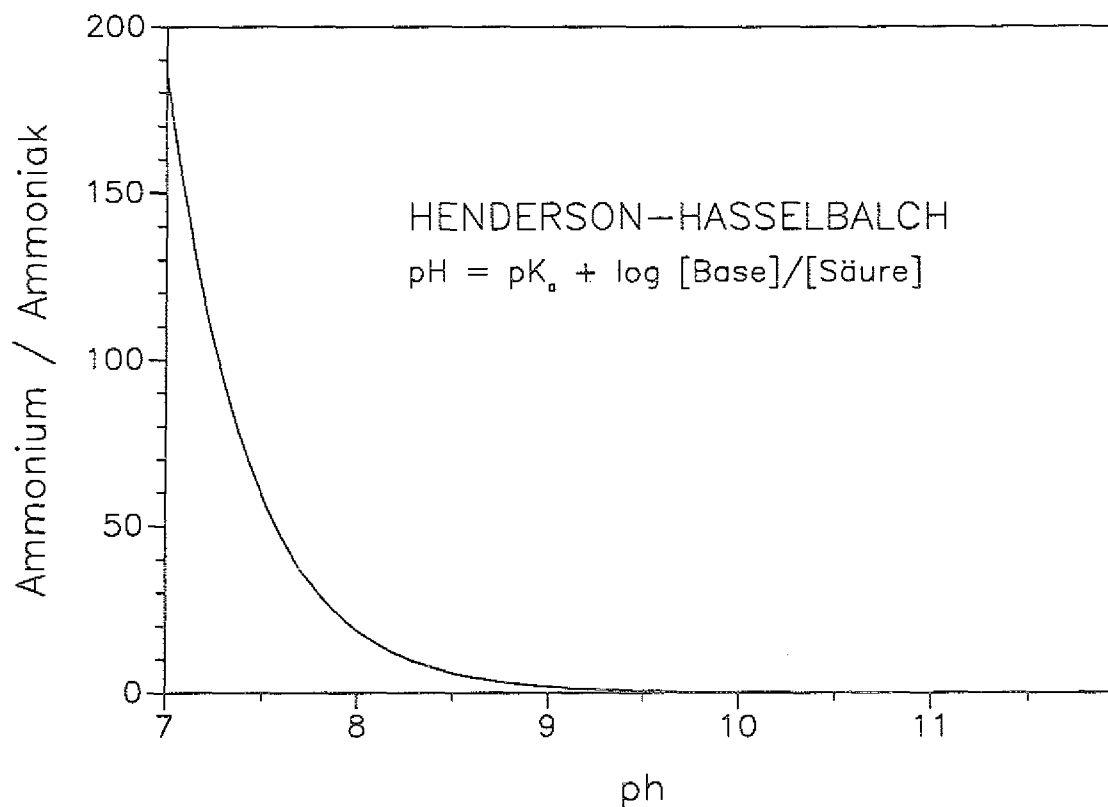


Abb. 7.1.3: Die Henderson-Hasselbalch-Beziehung

Kempken und Lehmann (1991) reduzieren im Rahmen des Konzepts der Medienrezyklierung die Ammoniumkonzentration in verbrauchten Zellkulturmedien in einem ähnlichen Verfahren. Zur Beschleunigung des Stofftransportes wird das Medium alkalisiert (pH 9) und mit Hilfe eines Hohlfasermoduls aus Polypropylen von Ammonium befreit. Anschließend wird der pH wieder auf zellkulturgeeignete Werte eingestellt und das Medium zum Wiedereinsatz in Zellkulturen aufbereitet.

Carbonell *et al.* (1992) erwähnen die Möglichkeit der Integration einer Ammoniumabtrennung auf der Basis von Gasdiffusionsmembranen in Satzreaktorkulturen von Hybridomazellen.

Im Arbeitskreis von Brunner wurde der sogenannte "Lipid Hollowfiber Membrane Reactor" konzipiert (Brunner und Tegtmeier 1984). Hierbei wird eine lipophile Flüssigmembran auf ein kommerziell erhältliches Hohlfasermodul aufgebracht, um den Transport lipophiler Substanzen zu ermöglichen. Ein konstanter Gradient quer zur Membran wird dadurch erreicht, daß akzeptorseitig enzymatische Reaktionen zur Umsetzung der transportierten Spezies eingesetzt werden. Die so geschaffene Anordnung soll in der Medizintechnik zur extrakorporalen Leberunterstützung eingesetzt werden. Als ein Fallbeispiel wird der Transport von Ammoniak durch die Membran dargestellt, wobei akzeptorseitig eine Umsetzung des Ammoniaks mit Hilfe des Enzyms Glutamatdehydrogenase und α -Ketoglutarat zu Glutamat vorgeschlagen wird (Busse und Tsikas 1987).

Prinzip der dialytischen Ammoniumentfernung mittels Kationenaustauschermembranen

Die oben dargestellten Methoden der Adsorption von Ammonium auf Austauscherharzen sowie die beschriebenen Membranmethoden weisen jede für sich spezifische Nachteile auf. Adsorptive Methoden eignen sich im Grunde nur für batch-Operationen, nach Erschöpfung der Austauscherkapazität müssen die das Ammonium aufnehmenden Materialien regeneriert werden. Grot (1986) schlägt in einem Patent hierzu die kontinuierliche Regenerierung eines Kationenaustauschers vor, indem eine Membran die kationenhaltige Phase von der Austauscherphase trennt. Die Austauscherphase wird kontinuierlich von einer Regenerierlösung durchspült, so daß ein kontinuierlicher Transport von der Donorphase auf das Harz möglich wird. Die Membranprozesse auf der Basis der Gasdiffusionsmembranen sind zwar für kontinuierliche Systeme geeignet, haben aber den Nachteil, daß die im pH-abhängigen Gleichgewicht Ammonium/Ammoniak bei pH 7 benachteiligte Spezies transportiert werden soll, d.h. der treibende Gradient ist von Anfang an sehr niedrig.

Im folgenden wird ein Verfahren vorgestellt, das die Vorteile des Kationenaustauschprozesses und die des Membranverfahrens kombinieren soll. Die praktische Realisierung der Methode wurde im Rahmen einer Fachhochschul-Diplomarbeit durchgeführt (Garske 1992). Hierzu wird eine Kationenaustauschermembran als Trenngrenze der Ammonium enthaltenden Donorphase und einer Strip-Phase eingesetzt. In der Strip-Phase liegt ein alkalischer pH vor, so daß Ammoniumionen schnell zu Ammoniak deprotoniert werden. Die Ammoniumionen binden sich an die Festionen der Membran und können somit entlang des Konzentrationsgradienten in die Akzeptorphase transportiert werden. Die Deprotonierung des Ammoniums bewirkt einen steilen Konzentrationsgradienten quer zur Membran, zusätzlich kann das nichtionische Ammoniakmolekül nicht mehr an die Festionen der Membran binden, so daß der aktive Rücktransport in die Donorphase verhindert werden kann. Die gasförmigen Eigenschaften des entstandenen Ammoniaks können dazu verwendet werden, diesen aus der Akzeptorphase zu entfernen und somit den Konzentrationsgradienten kontinuierlich auf einem hohen Niveau zu halten. Dies kann zum einen durch die oben geschilderten Gasdiffusionsmethoden geschehen, da nun bei alkalischem pH das Gleichgewicht zwischen Ammonium und Ammoniak ganz auf der Seite des Ammoniaks liegt. Zum anderen ist es auch möglich, den Ammoniak mittels Vakuum oder eines Strip-Gases wie z.B. Helium oder Stickstoff aus der Akzeptorphase zu entfernen. Abb. 7.1.4 zeigt das Prinzip der Methode.

Konstruktive Überlegungen zur Integration der Methode in einen Fermentationsprozeß

Im Falle einer Eignung des oben geschilderten Prinzips zur Abtrennung von Ammoniumionen war die Integration der Methode in eine Zellkulturfermentation geplant. Durch eine Entfernung von inhibierenden Ammoniumionen *in situ* sollte eine erhöhte Zelldichte und eine gesteigerte Antikörperproduktion in Satzreaktorverfahren mit der Hybridomazelllinie VX 12 erreicht werden.

Die einzusetzende Kationenaustauschermembran mußte also autoklavierbar sein, damit die Entgiftung steril in einem Umlauf in eine Fermentation eingegliedert werden konnte. Eine intensive Untersuchung des marktgängigen Angebots an Membranmaterialien brachte ein auf der Basis Teflon beruhendes Produkt hervor, dessen Temperaturbeständigkeit bis 160 °C angegeben wurde. Zusätzlich war seine Biokompatibilität schon an Ratten und menschlicher Haut getestet worden. Das sogenannte NAFION-Material (Du Pont, Wilmington DE, USA) wurde daher für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

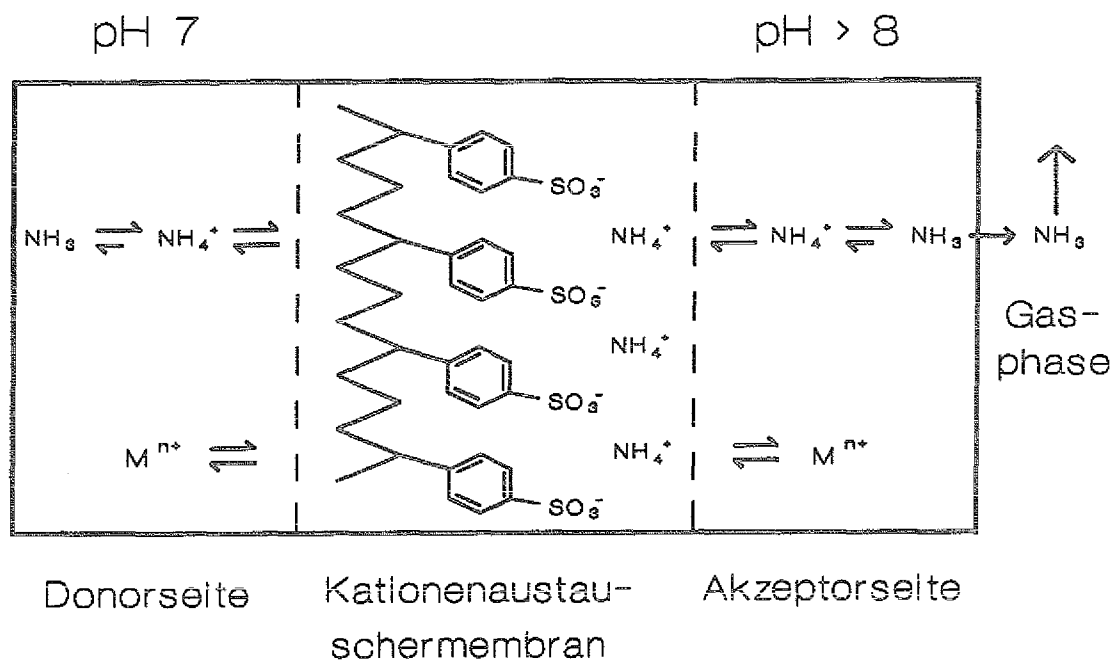


Abb. 7.1.4 Prinzip der dialytischen Ammoniumabrennung mit Kationenaustauschermembranen

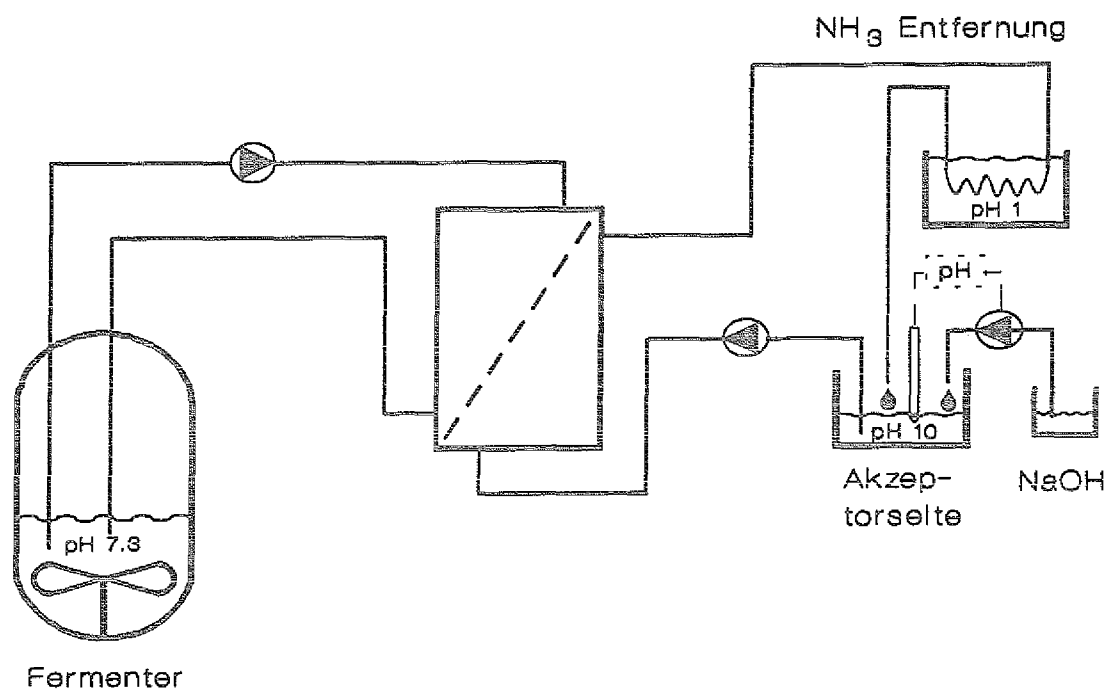


Abb. 7.1.5: Prinzip der integrierten Entgiftung

Da ein Kationenaustauschprozeß neben Ammonium auch den Transport aller übrigen im Zellkulturmedium enthaltenen Kationen erlaubt, kann dieser Abtransport von Medienkationen, die als Spurenelemente eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus spielen, zu einer Limitierung der angeschlossenen Fermentation führen. Um dieses Problem zu lösen, werden der akzeptorseitig zirkulierten Lösung alle im Zellkulturmedium

enthaltenen Kationen in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Eine einfache Vorgehensweise hierbei ist der akzeptorseitige Einsatz von Protein-, Glukose- und Glutamin-freiem Basalmedium, das auf einen entsprechenden alkalischen pH titriert wird.

Um eine möglichst einfache Prozeßführung zu gewährleisten, sollte die zellhaltige Fermentationslösung direkt in der Entgiftungseinheit zirkuliert werden. Als Fermentationssystem wurde ein Rührkesselfermenter im Satz-betrieb gewählt. Abb. 7.1.5 zeigt schematisch das Prinzip der integrierten Entgiftung.

Hierbei trennt die Kationenaustauschermembran zwei Dialysekreisläufe, wobei donorseitig die zellhaltige Lösung und akzeptorseitig die oben erwähnte Basallösung zirkuliert. Der akzeptorseitig durch Deprotonierung des Ammoniums bei alkalischem pH entstehende Ammoniak muß zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten aus dem Akzeptorkreislauf entfernt werden. Hierzu bedient man sich der Methode einer Gasdiffusionsmembran (Polypropylen), die von einer sauren Akzeptorlösung umgeben wird. Ammoniak passiert die Poren der Membran und wird anschließend im Sauren protoniert, wodurch der Rücktransport der nunmehr nicht mehr gasförmigen Spezies verhindert wird. Durch diese Anordnung wird ein kontinuierlicher Transport von Ammonium über das System aus zwei gekoppelten Membranmethoden aus der Fermentationslösung heraus gewährleistet.

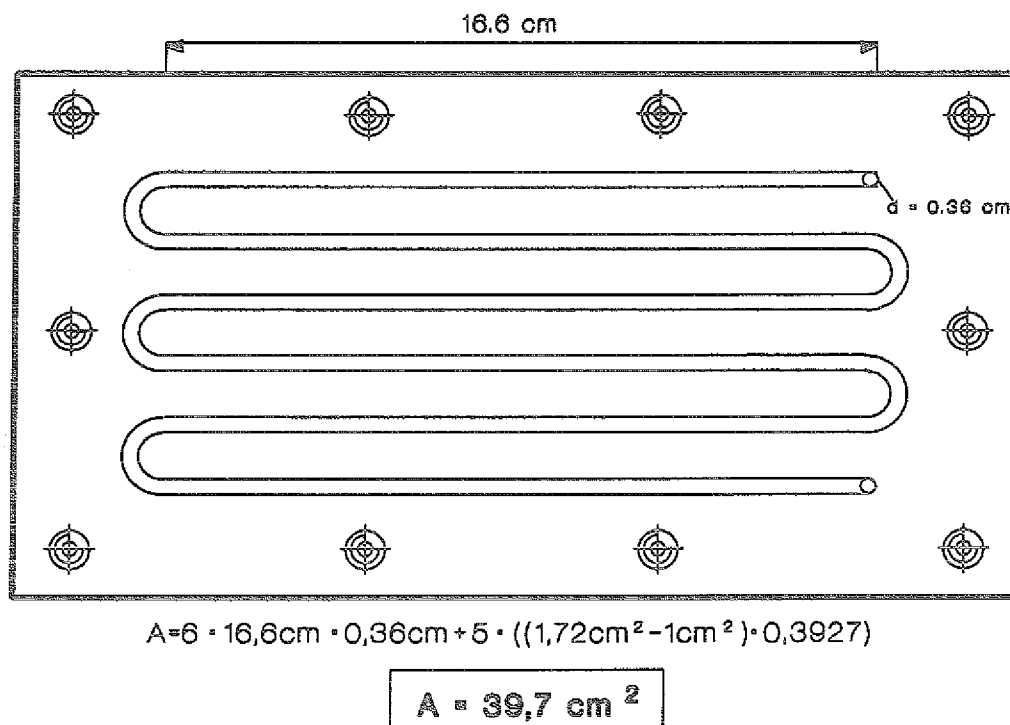


Abb. 7.1.6: Aufsicht auf die Bodenplatte der Dialyseeinheit

Um den Anforderungen der sensiblen Hybridomazellen an ein Kultursystem gerecht zu werden, mußten einige konstruktive Vorüberlegungen angestellt werden. Das Dialysem modul wurde als Flachmembranmodul konzipiert, als Werkstoff wurde Edelstahl ausgewählt. Die Dichtmaterialien wurden aus Silikon bzw. teflonummantelten Fluorpolymeren hergestellt. Um eine scherungsarme Führung von Zellmaterial durch das Modul zu erreichen, wurden die Strömungskanäle mäanderförmig mit großen Radien angelegt; die Anströmung ins Modul erfolgt unter einem sehr flachen Winkel von 15° . Die konstruktiven Details des Moduls können den Abb. 7.1.6 und 7.1.7 entnommen werden.

Infolge der mäanderförmigen Strömungsführung ergibt sich eine Gesamtmembranfläche von $39,7 \text{ cm}^2$. Das Modul besteht aus zwei Platten, in die die Strömungskanäle eingelassen sind. Beide Platten werden bei eingelegter Membran mit einem Anzugsmoment von 5 Nm verschraubt. Die Abdichtung erfolgt mit einer Silikonfolie, die die Mäanderstruktur der Kanäle nachempfindet (Dichtungsprinzip s. Abb. 7.1.8).

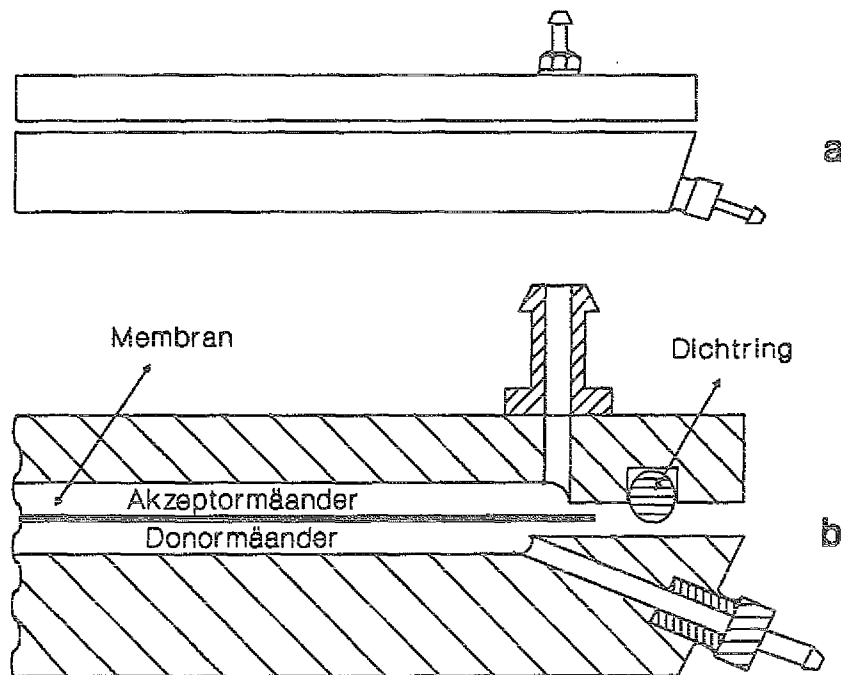


Abb. 7.1.7: Seitenansicht des Dialysemoduls

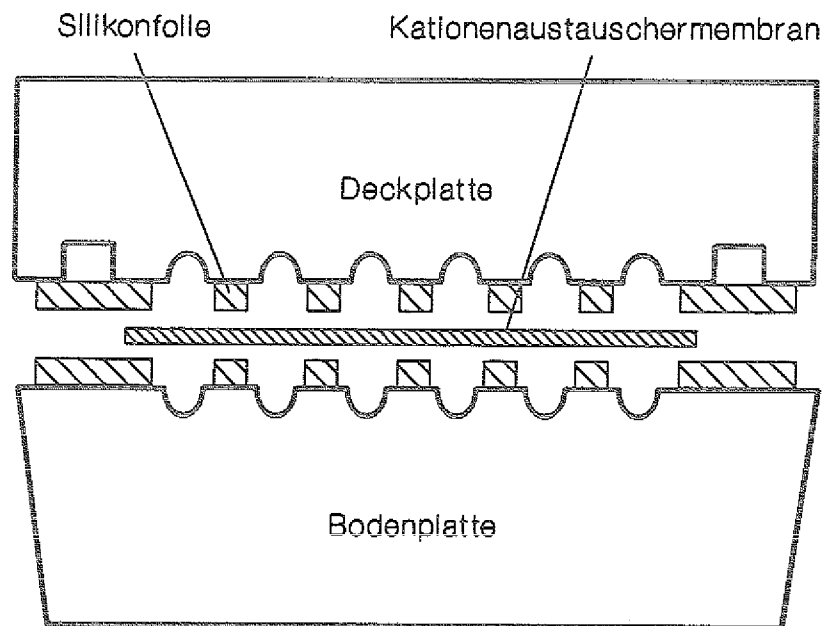


Abb. 7.1.8: Dichtungsprinzip der Dialyseeinheit

7.2 Untersuchungen zum Transport von Ammoniumionen über eine Kationenaustauschermembran

Die Eignung der Dialysemethode zur Entfernung von Ammonium aus Zellkulturfermentationen sollte zunächst an idealen Lösungen getestet werden. Hierzu wurde eine kontinuierlich arbeitende Versuchsanordnung aufgebaut, mit deren Hilfe Untersuchungen zum Stofftransport im beschriebenen Verfahren gemacht werden sollten. Abb. 7.2.1 zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Die NAFION-Kationenaustauschermembran (4) wird in das oben beschriebene Dialysemodul (3) eingelegt und dient als Trenngrenze zwischen der Ammonium enthaltenden Donorphase und der Strip-Phase. Die kontinuierliche Bildung von Ammonium in einem Fermentationsprozeß (donorseitig) wird durch die kontinuierliche Zudosierung eines Ammonium enthaltenden gepufferten Stromes aus dem Vorratsgefäß (1) in die Donorvorlage (2) nachempfunden. In der Akzeptorvorlage (5), die PBS enthält, wird der pH gemessen (7) und auf Werte größer 7 geregelt (8). Ein kontinuierlicher Helium-Strom (6) durch die Akzeptorvorlage entfernt durch Deprotonierung entstandenes Ammoniakgas. Aus beiden Vorlagen wird die Flüssigkeit im Gegenstrom durch die Dialyseeinheit gepumpt. Die donorseitige Verweilzeit im kontinuierlichen Betrieb beträgt 1,7 h.

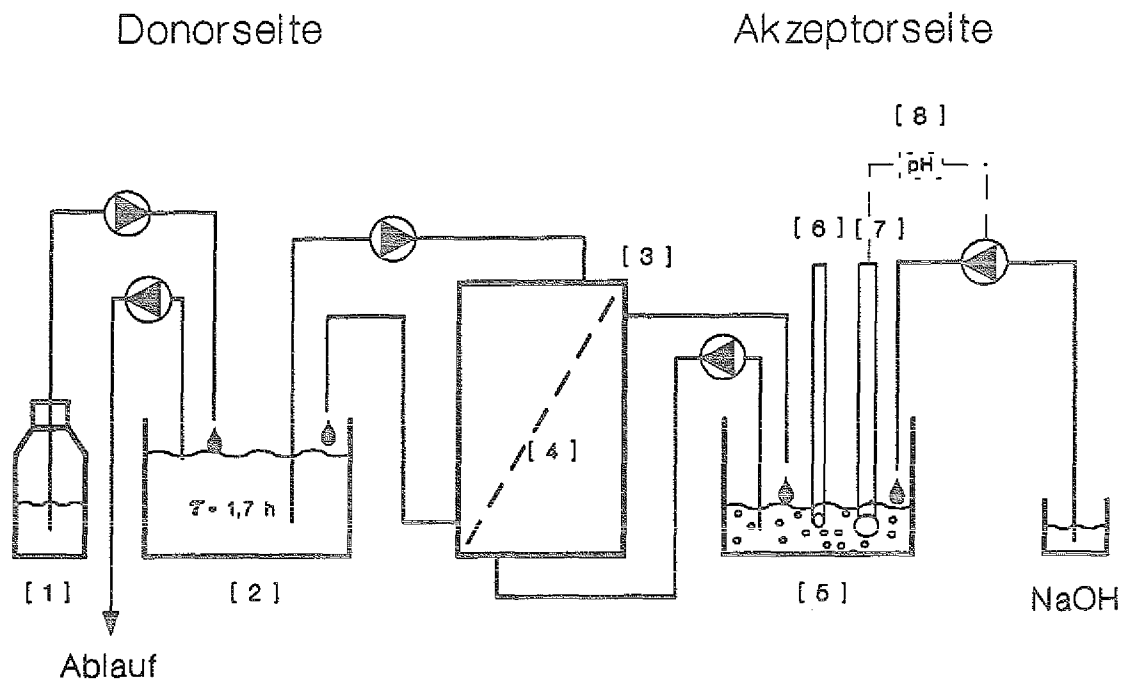


Abb. 7.2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Stofftransports

Als Meßgröße dient die Ammoniumkonzentration in beiden Vorlagen, die den Stofftransport beschreibende Größe stellt der Ammoniumflux pro Fläche über die Membran dar. Er errechnet sich aus den Stationärkonzentrationen im kontinuierlichen Betrieb wie folgt:

$$(7.2.1) \quad j(\text{Ammonium}) = \frac{([\text{Ammonium}]_{\text{ein}} - [\text{Ammonium}]_{\text{aus}}) \cdot V (\text{Vorlage})}{A (\text{Membran}) \cdot \tau}$$

Mit dem oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde nun der Einfluß verschiedener Prozeßparameter auf den Ammoniumtransport über die Kationenaustauschermembran untersucht.

Einfluß des akzeptorseitigen pH auf den Ammoniumflux

Eine Variation des akzeptorseitigen pH-Wertes bewirkt eine Beeinflussung des Ammoniumfluxes in Form einer Sättigungskinetik. Bei pH-Werten zwischen 7 und 11 steigt die Ammoniumtransportrate mit steigendem pH stark an, im Bereich von pH-Werten größer 11 dagegen läßt sich der Flux nicht mehr steigern. Dies läßt sich durch die pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts Ammonium/Ammoniak erklären. Die treibende Kraft für den Ammoniumtransport ist der Konzentrationsgradient bezüglich Ammonium quer zur Membran. Steigende akzeptorseitige pH-Werte führen zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten des Ammoniaks, d.h. der Ammoniumgradient wird steiler und somit die Transportrate höher. Die Henderson-Hasselbalch-Beziehung (s. Abb. 7.1.3) zeigt ein sehr niedriges Verhältnis Ammonium zu Ammoniak bei pH-Werten größer 11, das durch Steigerung des pH nicht mehr signifikant verringert werden kann. Somit kann im Falle der Dialyse der Gradient quer zur Membran ebenfalls nicht mehr gesteigert werden und die Transportrate tritt bei einem akzeptorseitigen pH größer 11 in ihre Sättigungsphase ein. Abb. 7.2.2 verdeutlicht die Ergebnisse graphisch.

Einfluß des Konzentrationsgradienten auf den Ammoniumtransport

Die Rolle des Ammoniumgradienten als treibende Kraft des Stofftransportes sollte mit einer Serie von Experimenten quantifiziert werden. Hierzu wurde der akzeptorseitige pH auf 10 konstant gehalten und die Einlaufkonzentration im kontinuierlichen Betrieb sukzessive erhöht. In Abb. 7.2.3 erkennt man einen linearen Bereich bis zu einem Gradienten von ca. 30 mmol/l, danach stellt sich ein Sättigungsverhalten ein. Es muß vermutet werden, daß oberhalb eines Gradienten von 30 mmol/l der Stofftransport nicht mehr membrankontrolliert abläuft. Aus Gründen der Elektroneutralität muß für jedes transportierte Ammoniumion ein anderes Kation von der Akzeptorphase in die Donorphase transportiert werden. Bei hohen Ammoniumgradienten kann der Transport des Gegenions limitierend werden. Hohe Ammoniumkonzentrationen können auch zur Sättigung der Kapazität des Ionentauschers führen, in diesem Fall sind Adsorptions- und Desorptionsschritte geschwindigkeitsbestimmend. Eine weitere Möglichkeit stellt der Übergang zum strömungskontrollierten Verhalten dar, d.h. nicht der Transport durch, sondern der Abtransport von der Membran wird geschwindigkeitsbestimmend. Die weiteren Experimente in diesem Kapitel werden zeigen, das dies hier nicht der Fall ist.

Der lineare Bereich des Ammoniumtransportes kann entsprechend dem ersten Fick'schen Gesetz beschrieben werden. Hierbei stellt β einen globalen Stofftransportkoeffizienten dar, der alle Einzelschritte wie z.B. Transport aus dem Zentrum der Flüssigphase zur Membran, Grenzschichtphänomene, Bindung des Ammoniums an die Festionen usw. in einer Rechengröße zusammenfaßt.

$$(7.2.2) \quad j = \beta * ([\text{Ammonium}]_{\text{Donor}} - [\text{Ammonium}]_{\text{Akzeptor}})$$

Der hier erhaltene Stoffübergangskoeffizient β von 0,735 cm/h kann mit dem Stoffdurchgangskoeffizienten für den Durchtritt von gasförmigem Ammoniak durch Gasdiffusionsmembranen verglichen werden. Brose und van Eickeren (1990) finden für Flachmembranen unterschiedlichen Materials Werte zwischen 0,1 und 7 cm/h, während für Hohlfasermodule bis zu 16 cm/h angegeben werden. Die im Vergleich zu Gasdiffusionsmembranen schlechteren Stoffdurchgangskoeffizienten der Ionenaustauschermethode werden

durch den bei pH 7 erheblich größeren Konzentrationsgradienten quer zur Membran mehr als wettgemacht, sodaß die erreichbaren Flüsse pro Membranfläche deutlich höher sind als bei Verwendung von Gasdiffusionsmembranen.

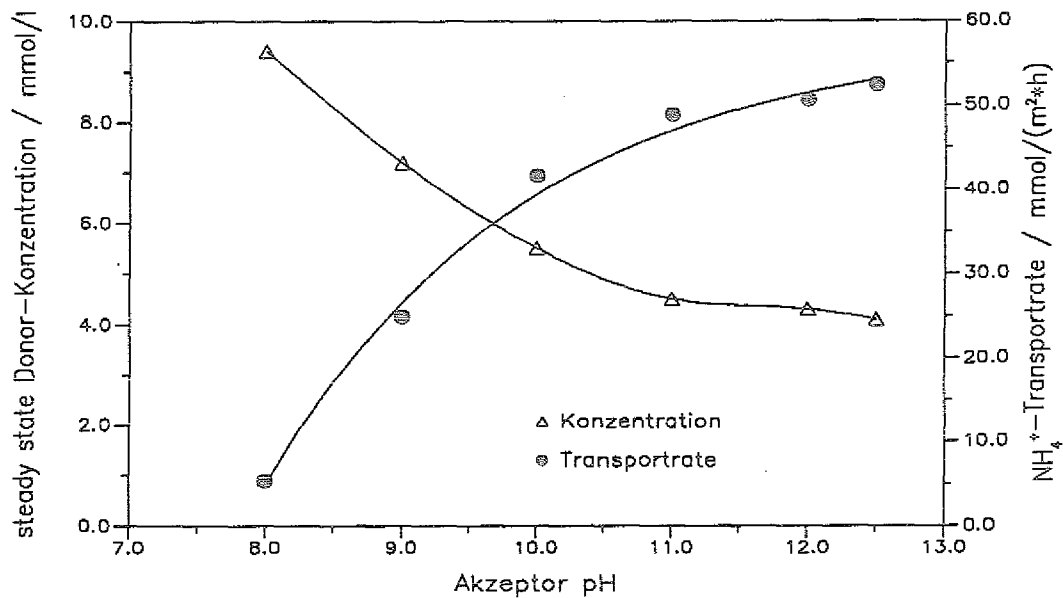


Abb. 7.2.2: Abhängigkeit des Ammoniumfluxes vom Akzeptor-pH

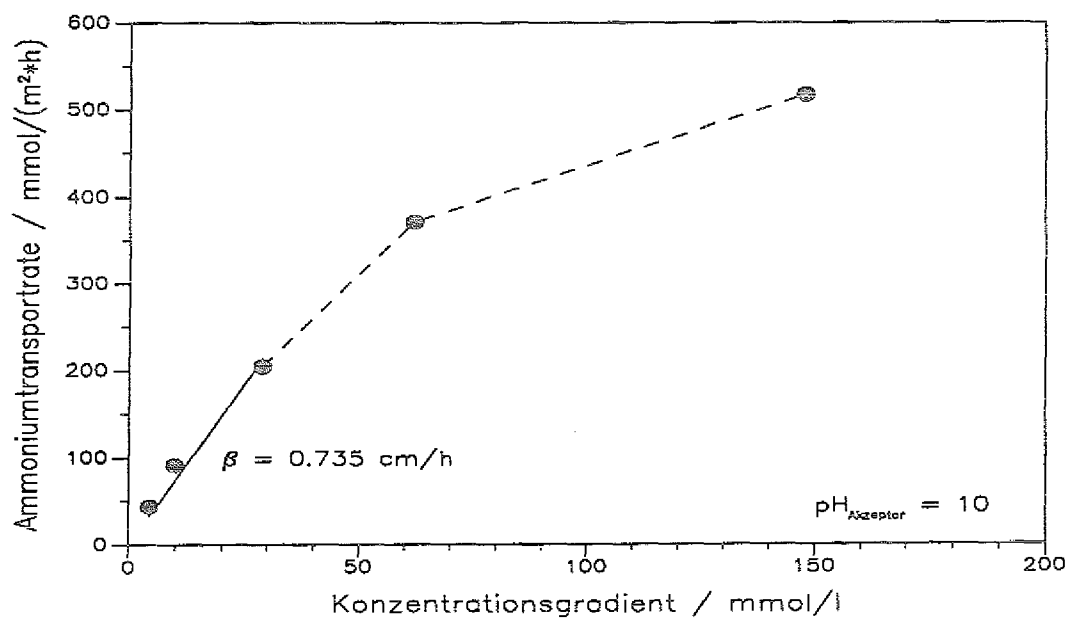


Abb. 7.2.3: Einfluß des Ammoniumgradienten quer zur Membran auf die Transportrate

Einfluß der hydrodynamischen Verhältnisse auf den Ammoniumtransport

Die direkte Integration der Dialyseeinheit in den Fermentationsprozeß bedeutet die Zirkulation von zellhaltiger Lösung durch das Dialysemodul. Hierbei darf die Vitalität der Kultur nicht leiden, d.h. der positive Effekt der Abtrennung eines Inhibitors darf nicht durch einen erhöhten Scherstreß für die Population überlagert werden. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf den Transport der Ammoniumionen untersucht. Als Maß zur Beschreibung der hydrodynamischen Verhältnisse in den donorseitigen, d.h. zellhaltigen Strömungskanälen soll die Reynoldszahl dienen. Die Reynoldszahl stellt eine dimensionslose Kennzahl dar, die die Strömung in einem Rohr beschreibt.

$$(7.2.3) \quad Re = \frac{(d \cdot v)}{\nu}$$

Hierbei indiziert d den Rohrdurchmesser, v die Strömungsgeschwindigkeit und ν die kinematische Viskosität. Da d und ν als konstant zu betrachten sind, kann die Variation der Strömungsgeschwindigkeit in Form der Reynoldszahl dargestellt werden. Aus Abb. 7.2.4 kann ein nur geringer Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit im Bereich der Reynoldszahlen der Größenordnung 10 bis 300 entnommen werden. Dieser Bereich von Reynoldszahlen darf aufgrund der Scherempfindlichkeit der im Modul zirkulierenden Hybridomazellen nicht überschritten werden.

Das hier erzielte Ergebnis ist günstig, da im integrierten Betrieb des Moduls die zellhaltige Donorlösung sehr langsam durch das Modul geführt werden kann, womit eine hohe Kulturvitalität aufrechterhalten werden kann.

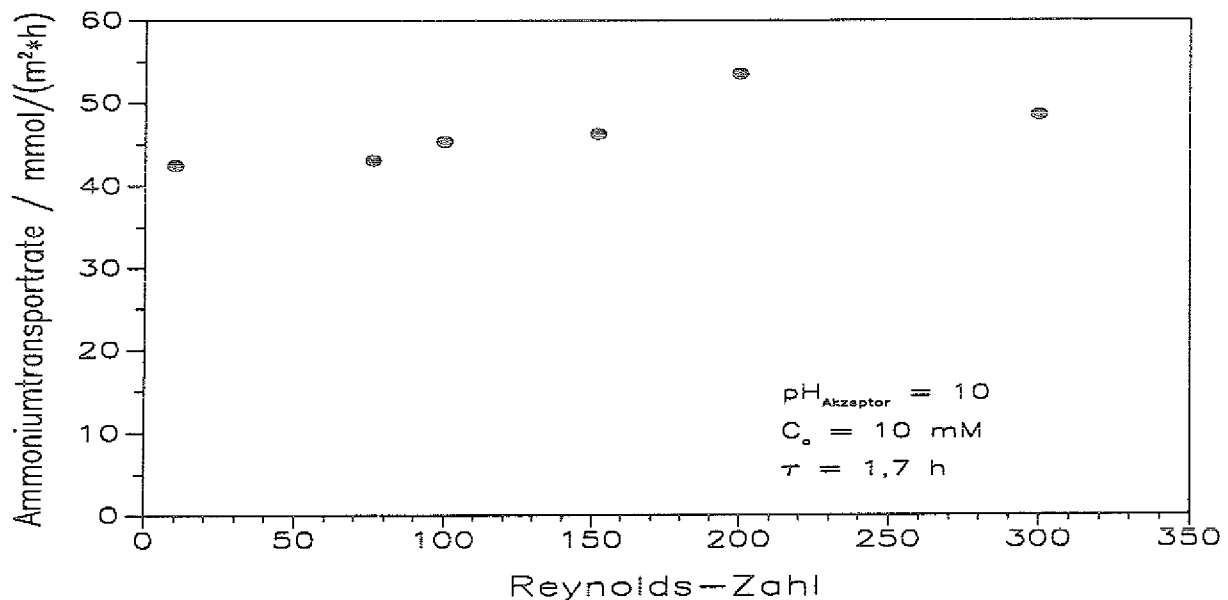


Abb. 7.2.4: Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf den Ammoniumtransport

7.3 Biokompatibilität des Dialysesystems

Der Einsatz des beschriebenen Dialysesystems in einer Fermentation erfordert den Nachweis der Biokompatibilität. Dies beinhaltet zum einen den Beweis der Kompatibilität des Membranmaterials mit den verwendeten Hybridomazellen, zum anderen den Nachweis der Zellkompatibilität der Anordnung, um den Erhalt der Kulturvitalität trotz Zirkulation der Zellen durch die Dialyseeinheit zu zeigen.

Obwohl die Biokompatibilität des Membranmaterials vom Hersteller bereits an Ratten und menschlicher Haut erfolgreich getestet worden war, wurde die Zellkompatibilität in einem einfachen Experiment untersucht. Hierzu wurde ein Membranstück von 40 cm² in Stücke geschnitten, eine Stunde in 0,5 M NaOH ausgekocht, in PBS neutralisiert und einer Satzreaktorkultur der VX 12 in serumfreiem Standardmedium in einer Spinner-Flasche zugesetzt. Die erhaltene Wachstumskurve wurde mit einer Parallelkultur ohne Zusatz von Kationenauschermembran verglichen.

Abb. 7.3.1 zeigt den Verlauf der beiden Kulturen: Man erkennt keine signifikante Abweichung des Zellwachstums und des Metabolismus in beiden Fällen. Die erreichte Wachstumsrate im exponentiellen Bereich betrug für die Kultur mit zugesetzten Membranstücken 0,03 h⁻¹ und für die Kontrollkultur 0,034 h⁻¹. Der parallele Verlauf von Glukoseaufnahme und Laktatproduktion beweist zusätzlich die Zellkompatibilität des Membranmaterials.

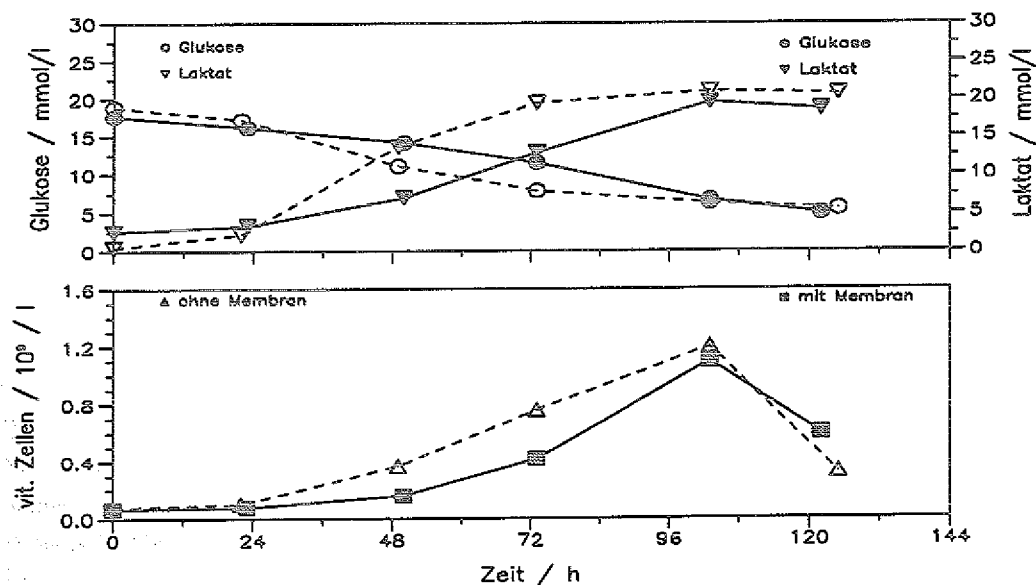


Abb. 7.3.1: Nachweis der Zellkompatibilität des NAFION-Materials

Der Nachweis der Zellkompatibilität des Membranmaterials allein genügt nicht für eine Beurteilung der Einsatzfähigkeit des Dialysemoduls in einer integrierten Entgiftung. Hierzu mußte gezeigt werden, daß die Zirkulation der Zellen durch die Dialyseeinheit zu zeigen.

lation von Hybridomazellen durch die Strömungskanäle des Moduls keinen Verlust der Kulturvitalität mit sich brachten. Um diesen Nachweis zu führen wurde eine wie oben beschrieben vorbehandelte Membran in das Dialysamodul eingespannt und die gesamte Anordnung in eine Satzreaktorfermentation im BRAUN Biostat MC (s. Kapitel 4) integriert. Um nun ausschließlich den Effekt der Zirkulation von Zellen durch das Modul testen zu können, wurde die Akzeptorseite des Moduls kurzgeschlossen. Abb. 7.3.2 zeigt eine schematische Zeichnung der Versuchsanordnung.

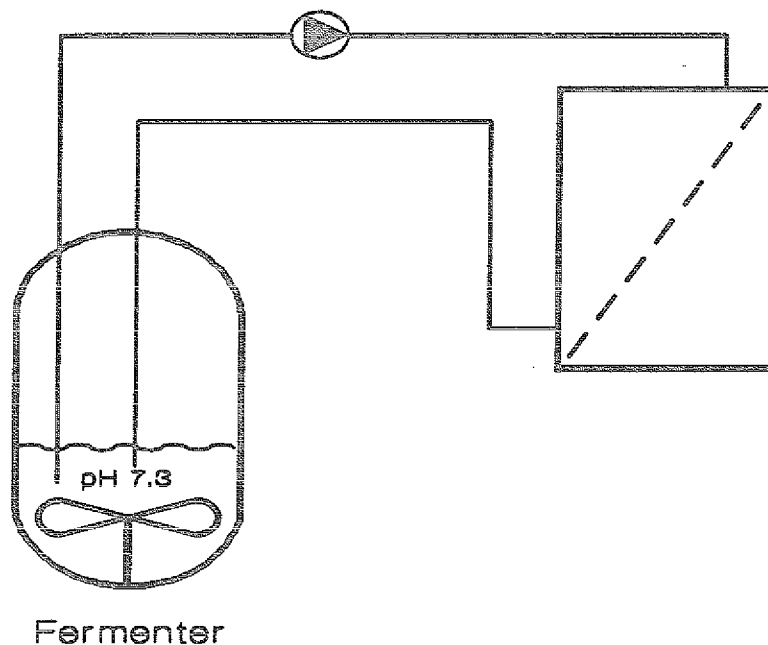


Abb. 7.3.2: Versuchsanordnung des Zellkompatibilitätstests

Die Versuchsanordnung wurde mit einer Kultur der VX 12 unter Standardkulturbedingungen (serumfrei) beimpft und mit einer Parallelkultur im gleichen Fermenter ohne Dialyse verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.3.3 und 7.3.4 zu sehen.

Der Verlauf des Zellwachstums kann in beiden Versuchen als parallel bezeichnet werden; es wird die gleiche Endzellichte erreicht, die Schwankungen im Aufwuchsverhalten liegen im Bereich des Meßfehlers. Die gleichen Feststellungen treffen für die Glukoseaufnahme der Vergleichskulturen zu. Bemerkenswert ist allerdings die Entwicklung der Ammoniumkonzentration im Fermentationsverlauf. Man erkennt, daß im Versuch mit angeschlossener Dialyse die Ammoniumkonzentration konsequent niedriger ist als im Kontrollversuch. Dies läßt sich durch die Aufnahme von Ammoniumionen durch das Kationentauschermaterial erklären. Die Membran selbst weist eine gewisse Kapazität für die Aufnahme von Kationen auf, die durch die Anzahl der aufgebrachten Fest(an-)ionen pro Flächeneinheit begrenzt wird. Somit wird eine Reduktion der Ammoniumkonzentration

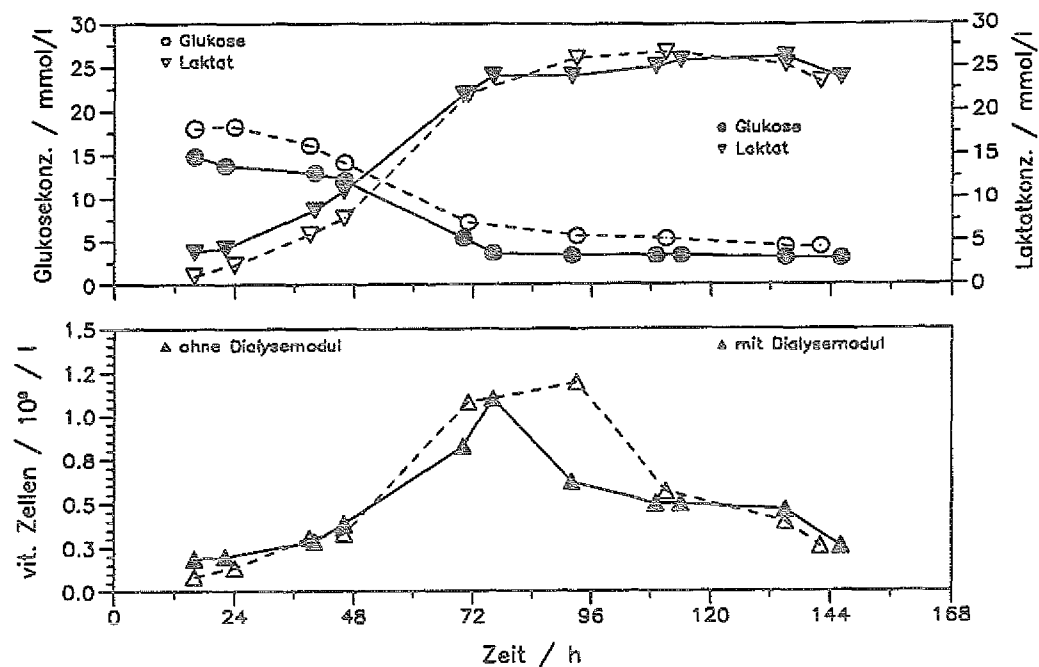


Abb. 7.3.3: Zellkompatibilitätstest der Versuchsanordnung

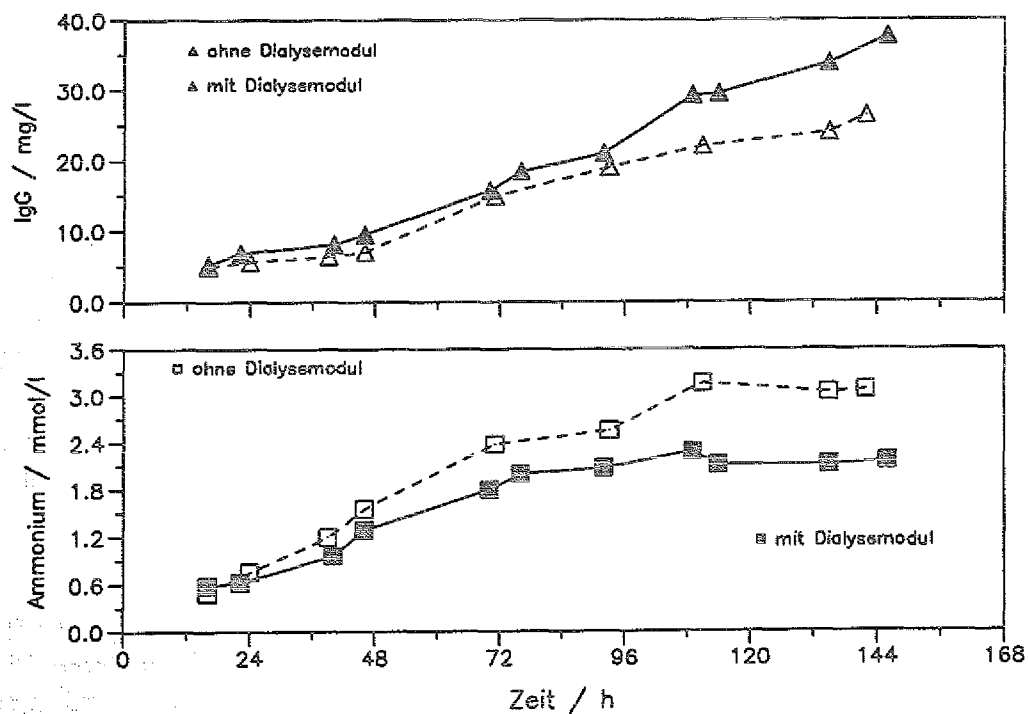


Abb. 7.3.3: Zellkompatibilitätstest der Versuchsanordnung

im Fermentationsverlauf trotz kurzgeschlossener Akzeptorseite festgestellt. Die konsequent niedrigere Ammoniumkonzentration wirkt sich nun auch auf die Antikörperkonzentration am Ende der Fermentation aus: Sie liegt mit 37 mg/l deutlich über dem in der Kontrolle erreichten Wert von 25 mg/l. Man erkennt an dieser Stelle wiederum sehr deutlich den negativen Effekt der Ammoniumionen auf den Metabolismus der Hybridomalinie VX 12. Eine Erniedrigung der Konzentration dieses Inhibitors bedeutet eine Verbesserung des energetischen Zustands der Zelle, die sich in diesem Falle positiv auf die Bildungsrate der monoklonalen Antikörper auswirkt. Biblia und Flickinger (1990) beschreiben einen ähnlichen Effekt bei Hybridomazellen in der stationären Phase: Eine Zugabe von Glutamin zu diesen Kulturen, d.h. das Verfügbarmachen einer zusätzlichen Energiequelle wirkt sich in einer gesteigerten Antikörpersynthese durch die nicht mehr wachsenden Zellen aus. Man erkennt im obigen Beispiel einen deutlichen Anstieg der Antikörperkonzentration ab ca. 96 h Fermentationsdauer, einem Zeitpunkt, an dem die Fermentation bereits in der stationären Phase ist. Hier wirkt sich die Reduktion der Ammoniumkonzentration ähnlich wie eine Glutaminzugabe aus: Es werden zusätzliche Energieäquivalente frei, indem der Zelle Aufgaben des Erhaltungsstoffwechsels infolge erhöhter Ammoniumkonzentration erspart werden. Dies wird zur Synthese von zusätzlichen Antikörpern genutzt.

7.4 Vollständige Integration der Entgiftungseinheit in eine Fermentation

Fermentation mit Standardmedium

Im Anschluß an den erfolgreichen Nachweis der Zellkompatibilität von Material und Versuchsanordnung sollte nun die integrierte Entgiftung entsprechend Abb. 7.1.5 vorgenommen werden. Eine photographische Aufnahme des Versuchsaufbaus findet sich in Abb. 7.4.1.

Die Inbetriebnahme des Fermentationssystems erfolgte parallel zu den vorhergehenden Versuchen, die Standardkulturbedingungen wurden nicht verändert. Die Kultur wurde 48 h ohne Dialyse geführt, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, danach wurden sowohl der Donor- als auch der Akzeptorkreislauf zugeschaltet. Die Ergebnisse der Kultivierung wurden wieder in Vergleich zu einer Standardfermentation ohne Dialyse gesetzt. Nach Zuschalten der Dialyse verlangsamte sich das Zellwachstum stark, um nach 72 h in die stationäre Phase überzugehen, wobei nur 50 % der Zelldichte der Vergleichsfermentation erreicht wurden (s. Abb. 7.4.2). Dieses Ergebnis wurde in mehreren Fermentationen reproduziert, wobei eine Beendigung des Zellwachstums jeweils mit dem Zuschalten des Akzeptorkreislaufs zusammenfiel. Zusätzlich trat im auf pH 10 eingeregelter Akzeptorstrom ein Niederschlag auf.

Eine Untersuchung des Niederschlags mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie (Institut für Chemie des Forschungszentrums Jülich) ergab eine Zusammensetzung aus Kalzium- und Magnesiumcarbonat. Diese Ausfällungen kommen wie folgt zustande: Kalzium und Magnesiumionen sind essentielle Bestandteile des Zellkulturmediums, das zusätzlich als Puffersubstanz Natriumhydrogencarbonat enthält. Das Hydrogencarbonatanion unterliegt einem pH-abhängigen Gleichgewicht, das bei pH 7 mehrheitlich auf der Seite des Hydrogencarbonats, bei höheren Werten eher auf der Seite des Carbonats liegt. Zusätzlich existiert die ungeladene, gasförmige Form des CO_2 .

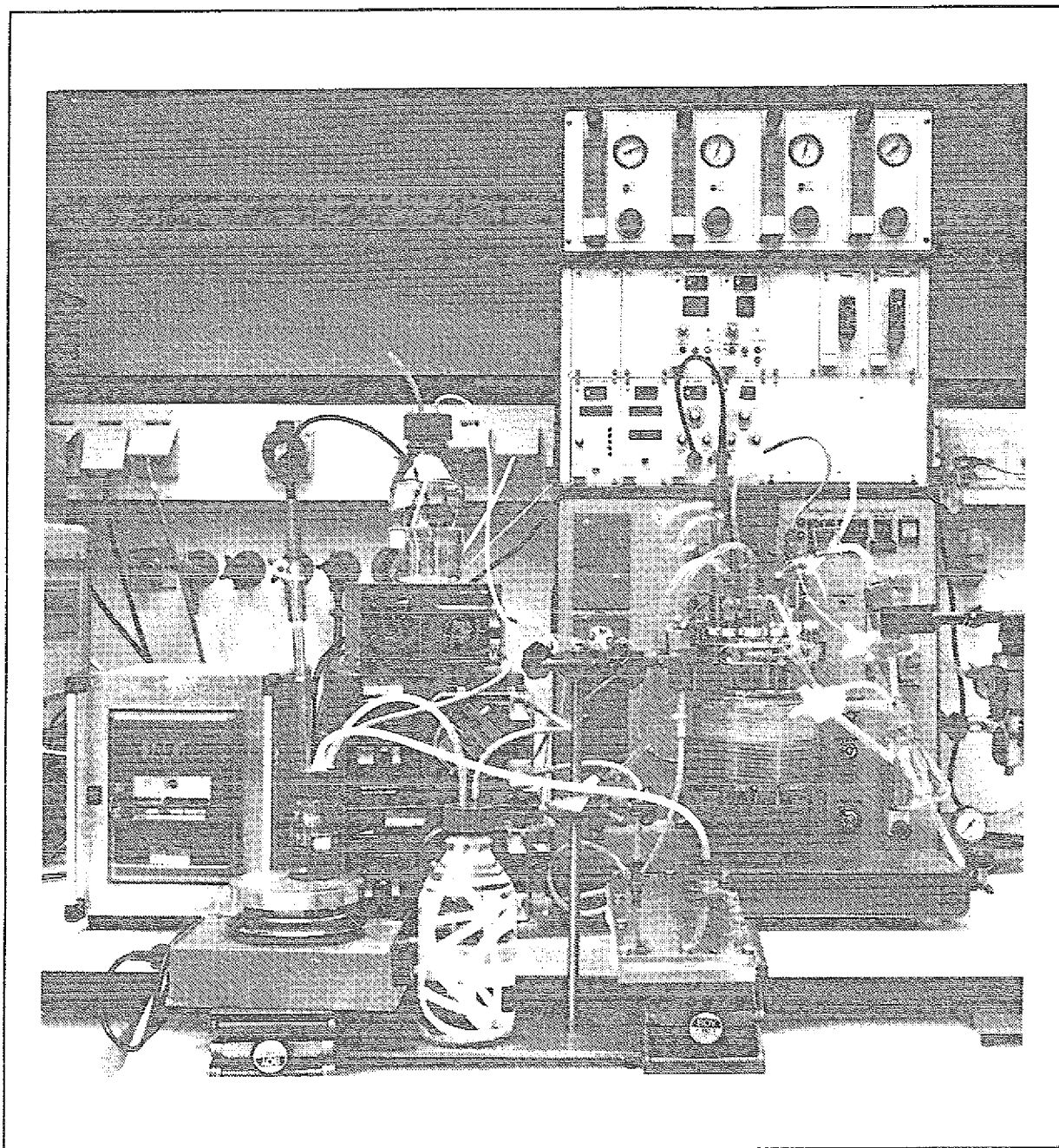


Abb. 7.4.1: Photographische Aufnahme der Fermentationseinheit mit integrierter Entgiftung



Das gasförmige CO_2 kann nun während der Fermentation durch die Kationentauschermembran leicht hindurchdiffundieren und wird in der alkalischen Akzeptorlösung zum Carbonat umgesetzt. Die zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} wandern ebenfalls durch die Membran und fallen dort als schwerlösliche Carbonate aus. Somit werden sie konsequent dem Transportgleichgewicht entzogen und kontinuierlich aus der do-

norseitigen Zellkulturflüssigkeit entfernt. Die Akzeptorseite stellt also eine "Senke" für diese essentiellen Kationen dar, wodurch sich das Ende des Zellwachstums bei Zuschalten der Dialyse erklärt. Eine analytische Untersuchung der Fermentationslösung zeigt in der Tat eine 28 % ige Abnahme der Kalzium- und Magnesiumkonzentration bereits innerhalb von 64 Stunden (s. Abb. 7.4.3). Zum Vergleich sei die konstant bleibende Konzentration von Kalium im Medium angeführt, das keine schwerlöslichen Carbonate bildet.

Bemerkenswert erscheint wiederum die nach Zuschalten der Dialyse deutlich erniedrigte Ammoniumkonzentration (s. Abb. 7.4.4), was für die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Verfahrens auch unter Realbedingungen spricht. Zusätzlich erkennt man die trotz der um die Hälfte niedrigeren Zellzahl deutlich erhöhte Antikörperkonzentration am Ende der Fermentation. Hierdurch wird die in Kapitel 7.3 geführte Argumentation in Anlehnung an die Erfahrungen von Biblia und Flickinger (1991) bekräftigt.

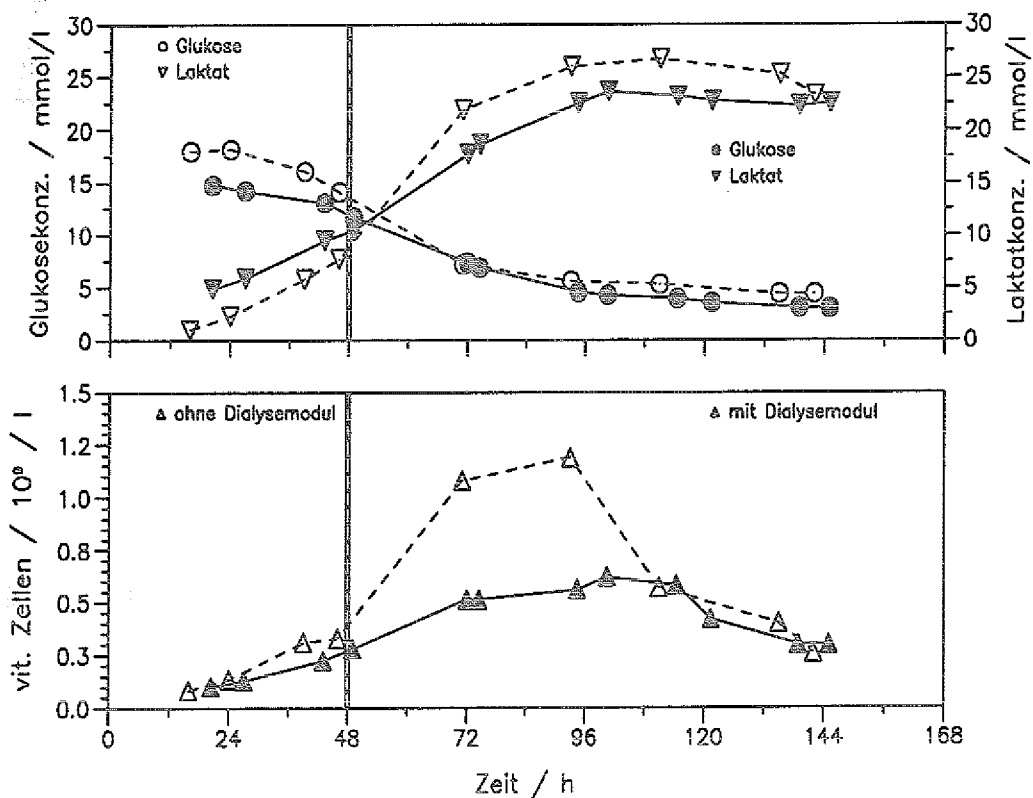


Abb. 7.4.2: Kulturverlauf der Fermentation mit vollständig integrierter Entgiftung im Vergleich zu einer Kontrollfermentation (Die senkrechte Linie markiert das Zuschalten der Dialyse)

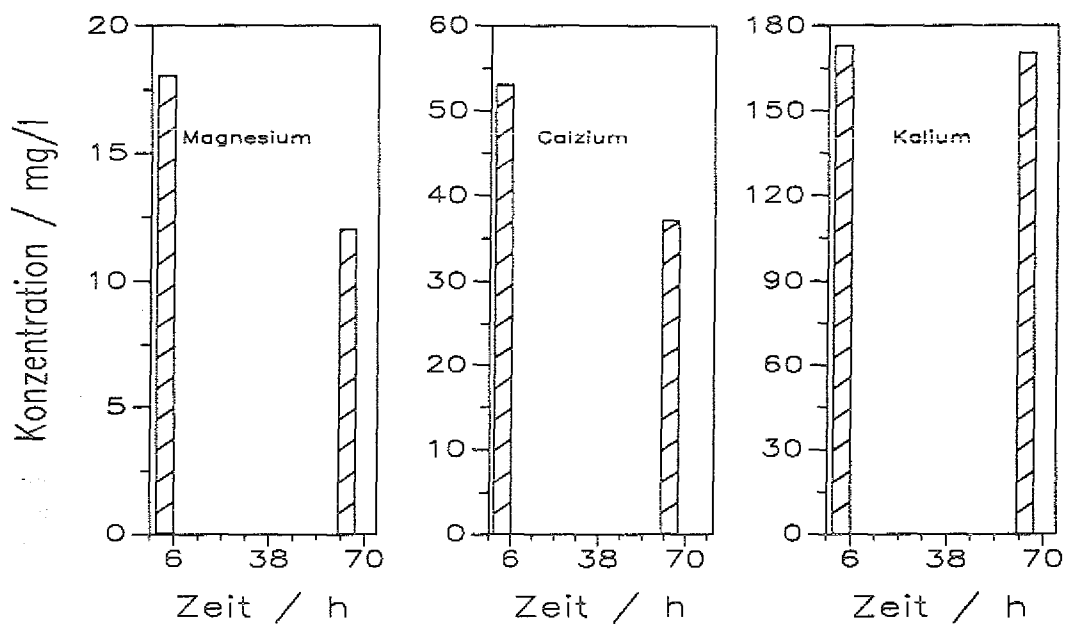


Abb. 7.4.3: Verlauf der Konzentration von Medienkationen während der integrierten Entgiftung

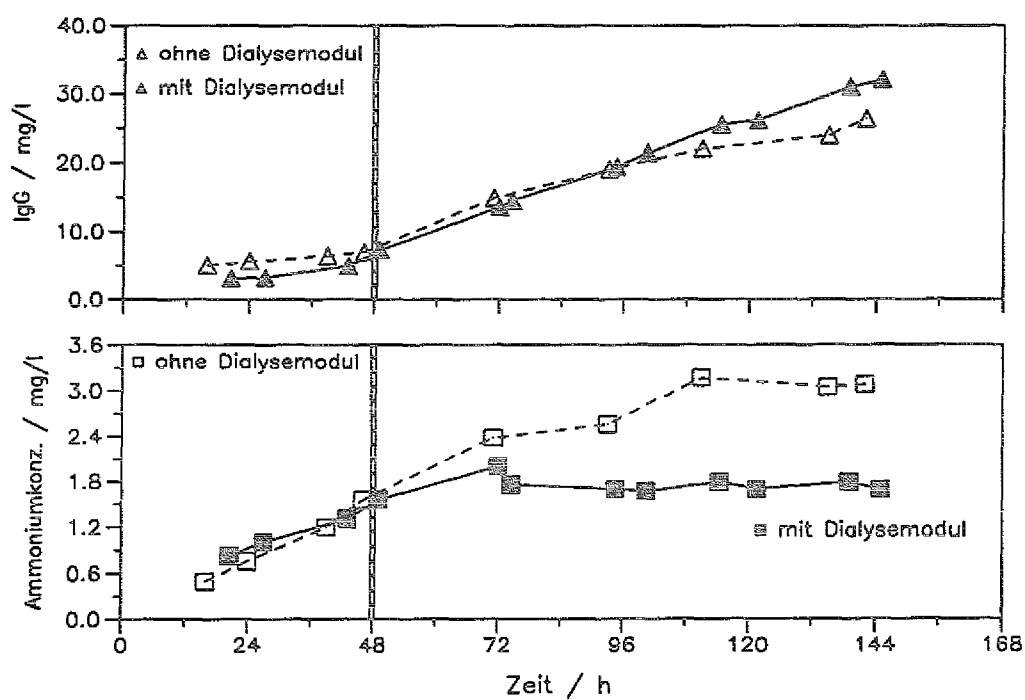


Abb. 7.4.4: Verlauf von Ammoniumkonzentration und Antikörpertiter während der Fermentation mit vollständig integrierter Entgiftung (Die senkrechte Linie markiert das Zuschalten der Dialyse)

Die schwerlöslichen Niederschläge aus Kalzium- und Magnesiumcarbonat legten nahe, auf das im Medium enthaltene Natriumhydrogencarbonat, das letztlich den Ausgangspunkt des abrupten Zellsterbens bei Einschalten der Dialyse darstellt, zu verzichten. Es wurde daher versucht, die Pufferwirkung des Hydrogencarbonats durch Erhöhung des HEPES-Anteils im Medium zu ersetzen. Alle Versuche, die Zelllinie VX 12 in Carbonat-freiem Medium zu kultivieren scheiterten im Ansatz. Es war in keinem Fall ein Anwachsen der inokulierten Kulturen festzustellen.

Offensichtlich hat das Hydrogencarbonat-Ion eine über die reine Pufferwirkung hinausgehende Funktion. Dies wird durch die Ergebnisse von Olsnes *et al.* (1986) bestätigt. Sie fanden eine pH-abhängige Aktivität eines Anionen-Antiports bei Vero-, Ratten-Hepatozyten- und HeLa-Zellen. Dieser Antiport schleust Chlorid-Ionen im Austausch gegen Hydrogencarbonat-Ionen in das Cytosol. Olsnes *et al.* schreiben dem Antiport eine Funktion bei der Regulation des cytosolischen pH zu. Während der Na^+/H^+ -Antiport durch den Abtransport von Protonen gegen Na^+ zur Regulation eines zu sauer gewordenen zytosolischen pH genutzt wird, soll der Abtransport von Hydrogencarbonat im Austausch gegen Cl^- einen zu stark alkalischen pH nach unten korrigieren. Die Übertragung der Existenz eines physiologischen Effekts des Hydrogencarbonat-Ions auf alle Säugerzellen, wie sie von Olsnes *et al.* vermutet wird, erklärt das Versagen des Carbonat-freien Mediums zur Förderung des Hybridoma-Wachstums.

Die Kultivierung der VX 12 in Carbonat-freiem Medium gelingt bei Begasung des Kulturmediums vor der Inokulation mit CO_2 . Hierbei stellt sich infolge des pH-abhängigen Gleichgewichts eine ausreichend hohe HCO_3^- -Konzentration ein. Es wurde nun versucht, durch eine minimale Begasung des Medium eine Mindestkonzentration an HCO_3^- einzustellen, um die akzeptorseitige Carbonat-Ausfällung beim Zuschalten der Entgiftung zu minimieren. Eine solcherart durchgeführte Fermentation wurde zu einer Kontrollfermentation ohne Dialyse in Vergleich gesetzt, deren carbonatfreies Medium ebenfalls vor Inokulieren mit CO_2 begast worden war. Abb. 7.4.5 und 7.4.6 zeigen, daß trotz minimierter CO_2 -Begasung das Zellsterben bei zugeschalteter Dialyse nicht verhindert werden konnte.

Die Verringerung der Ammoniumbelastung auf 0,4 mmol/l gelingt zwar problemlos, es wird allerdings nur eine Zelldichte von $4 \cdot 10^5$ vitalen Zellen/ml erreicht. Trotzdem liegt die erreichte Endkonzentration an IgG deutlich über der der Vergleichsfermentation, was wiederum die Argumentation aus Kapitel 7.3 unterstützt.

7.5 Bewertung des Verfahrens

Das hier beschriebene Verfahren zur dialytischen Abtrennung von Ammonium aus Zellkultursuspensionen mit Hilfe einer Kationenaustauschermembran hat sich als sehr leistungsfähig erwiesen. In Vorversuchen mit wäßrigen, Ammonium enthaltenden Lösungen wurden sehr hohe Abtrennraten in der Größenordnung von 60 mmol/(m²*h) erreicht. Die Zellkompatibilität des Membranmaterials sowie der gesamten Anordnung konnte uneingeschränkt nachgewiesen werden.

Trotz dieser sehr erfreulichen Voraussetzungen konnte die Integration des Verfahrens in eine Zellkulturfermentation die Erwartungen in Bezug auf eine Steigerung der Leistungsfähigkeit von Verfahren zur Produktion von monoklonalen Antikörpern nicht voll erfüllen. Das geringe Löslichkeitsprodukt der Carbonate von Kalzium und Magnesium führte zum Entstehen einer akzeptorseitigen "Ionensenke", die daraus resultierende Verringerung der Kationenkonzentration in der Fermentationslösung bewirkte ein Absterben der Zellkultur infolge einer Limitierung durch essentielle Kationen. Versuche, die Ausfällungen durch Verwendung Carbonat-freien Mediums zu verhindern scheiterten an der Rolle des Hydrogencarbonat-Ions in der Regulation des zytosolischen pH. Die angeführten Fakten führen zu der Erkenntnis, daß die geschilderte Methode in der hier vorliegenden Konfiguration zur Ammoniumabtrennung aus Fermentationsprozessen im allgemeinen ungeeignet ist. Biologische Prozesse beruhen auf der Umsetzung von Kohlenstoff unter Freisetzung von CO_2 . Desweiteren sind Spurenelemente kationischer Natur unerlässlich für Wachstum und Produktion biologischer Systeme. Die fermentations- (donor-) seitige Entstehung von CO_2 wird durch Diffusion des CO_2 zur Akzeptorseite und dem dann entstehenden CO_3^{2-} immer zu der Bildung einer "Kationensenke" und somit zur Limitierung der donorseitigen Kultur führen.

Nichtsdestoweniger kann eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität bei Zuschalten der Dialyse zu einer Satzreaktorkultur der VX 12 festgestellt werden. Trotz einer Zelldichte, die nur 50 % der einer Vergleichsfermentation ohne Dialyse beträgt, werden erhöhte IgG-Konzentrationen erreicht, was nur durch eine drastische Erhöhung der zellspezifischen Produktbildungsrate zu erklären ist. Die Ursache hierfür kann zum einen in der stark reduzierten Ammoniumkonzentration im Medium liegen, zum anderen kann auch eine Verschiebung in der Ausnutzung der zellulären Energie erfolgt sein. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits in Kapitel 6 als Folge der Immobilisierung diskutiert. Es liegt durchaus im Bereich des Möglichen, daß eine Spurenelementlimitierung die bevorzugte Nutzung der zellulären Energie zur Produktsynthese zur Folge hat. Man erreicht auf diese Art und Weise eine Form der Entkopplung von Wachstum und Produktbildung, die zwar in der hier vorliegenden Form unerwünscht ist, aber dennoch einen interessanten Aspekt innerhalb der Problematik der wachstumsgekoppelten Antikörpersynthese beleuchtet.

Eine alternative Konfiguration des Prozesses könnte in der Lage sein, den Einsatz im biologischen System ohne einen solch drastischen Einschnitt in das Zellwachstum möglich zu machen: Anstatt die akzeptorseitige Flüssigkeit im Kreis zu führen und selektiv nur das durch Deprotonierung bei alkalischem pH entstehende Ammoniakgas zu entfernen, kann die gesamte Akzeptorlösung verworfen werden. Dies bedeutet eine Dialyse der Fermentationsbrühe gegen die alle Medienkationen enthaltende Akzeptorlösung bei physiologischem pH, die kontinuierlich ausgetauscht wird. Somit bleibt bei entsprechend kurzen akzeptorseitigen Verweilzeiten der Ammoniumgradient quer zur Membran erhalten, das Entstehen der "Kationensenke" wird jedoch bei pH 7 verhindert, da die Carbonatkonzentration bei diesem pH gering ist. Der Selektivitätsvorteil des ausschließlichen Kationentransport bleibt erhalten, der Ammoniumgradient stellt hierbei die einzig relevante treibende Kraft zum Stofftransport über die Membran dar. Zusätzlich wird das Verfahren durch die Einsparung der NH_3 -Entfernung sowie der pH-Regelung vereinfacht.

Die außergewöhnliche Effizienz dieses Verfahrens zur Entfernung von Ammonium aus wässrigen Lösungen macht diesen Ansatz sehr gut geeignet zur Anwendung in nicht wachsenden Systemen. Es sei hierbei zum Beispiel an einen enzymatischen Prozeß gedacht, der eine Inhibierung durch Ammoniumionen aufweist. Die hohe Temperaturstabilität der Membran schließt ein solches Verfahren auch für chemische Prozesse nicht aus. Die Vorbehandlung stark ammoniumbelasteter Abwässer vor einem Eintrag in kommunale Kläranlagen stellt sich ebenfalls als eine sinnvolle Anwendung des hier gezeigten Ansatzes dar. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß ungeachtet der Nichteignung der hier getesteten Konfiguration für diesen speziellen Anwendungsfall eine Methode entwickelt wurde, deren Leistungsfähigkeit bei der Entfernung von Ammonium

aus wässrigen Lösungen beeindruckt und die sich dennoch durch eine recht einfache Handhabung für eine Anwendung auf vielen Gebieten empfiehlt.

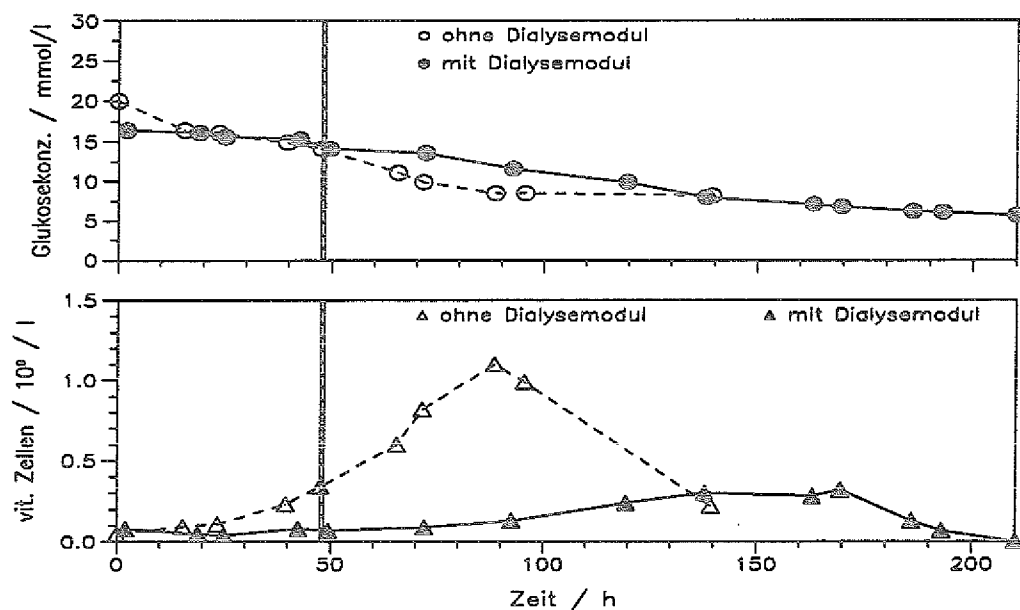


Abb. 7.4.5: Fermentation im Carbonat-freien Medium

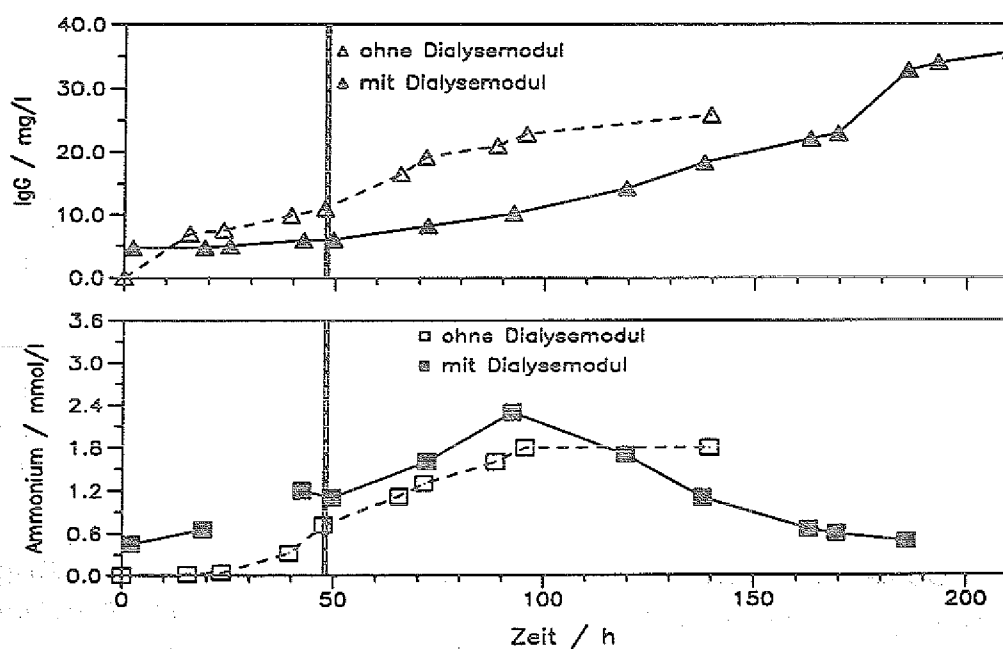


Abb. 7.4.6: Fermentation im Carbonat-freien Medium (Die senkrechte Linie markiert das Zuschalten der Dialyse)

8. Diskussion und Ausblick

Da die Einzelergebnisse schon im Rahmen ihrer Darstellung diskutiert worden sind, sollen an dieser Stelle die erhaltenen Resultate noch einmal im Zusammenhang besprochen und im Hinblick auf eine optimierte Fermentationsstrategie bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridomazelllinie VX 12 ausgewertet werden.

Die Ermittlung der kinetischen Daten von Wachstum und Produktivität der VX 12 in ruhender Kultur zeigte die Abhängigkeit der Wachstumsrate von den beiden Hauptsubstraten Glukose und Glutamin in einer Sättigungskinetik. Desweiteren wurde eine gesteigerte Sensitivität der Zelllinie gegenüber Ammonium, einem Produkt des Glutaminstoffwechsels festgestellt. Die Tatsache, daß Glutamin neben einem metabolischen Umsatz durch das biologische System auch chemisch unter Ammoniumbildung zerfällt, führte zu einer "scheinbaren" Überschußinhibierung durch hohe Glutaminkonzentrationen. Hierbei bedingen hohe Glutaminkonzentrationen im Medium eine hohen Rate des chemischen Zerfalls und eine damit einhergehende Inhibierung durch das entstehende Ammonium. Eine detailliertere Betrachtung des Erhaltungsstoffwechsels zeigte eine differenzierte Verwertung der beiden Substrate im Hybridomametabolismus: Glukose wird dabei unkontrolliert aufgenommen und relativ ineffizient umgesetzt, sodaß die Biomasseausbeute aus Glukose recht niedrig ausfällt. Glutamin wird deutlich effektiver in Energieäquivalente umgewandelt, liefert daher bessere Biomasseausbeuten und kann insgesamt als das wichtigere Energiesubstrat betrachtet werden. Die Produktbildung erwies sich als positiv mit dem Zellwachstum korreliert.

Die Einbeziehung dieser Erkenntnisse in ein Modell zur Beschreibung von Wachstum und IgG-Bildung ermöglichte die Simulation des VX 12-Stoffwechsels in verschiedenen Reaktionssystemen. Dabei ergab sich am Beispiel von Satzreaktorkulturen mit unterschiedlichen Startbedingungen eine sehr zufriedenstellende Übereinstimmung von Meßdaten und simulierten Kurvenverläufen. Dies wurde zum Anlaß genommen, einen Leistungsvergleich zwischen dem offenen Chemostatbetrieb und einer immobilisierten Population in einem Wirbelschichtreaktor vorzunehmen. Die im Fließbettssystem erzielbare Raum-Zeit-Ausbeute übertraf den offenen Chemostaten deutlich.

Die Leistungssteigerung durch Immobilisierung der VX 12 in offenporigen Trägermaterialien wurde an Fermentationen in einem eigens konstruierten Kleinwirbelschichtreaktor nachgewiesen. Intensive fermentationskinetische Arbeiten brachten zwei besonders wichtige Ergebnisse zu Tage: Beim Anfahren solcher Fließbettssysteme machte sich der Wechsel von Glukose zu Glutamin als Leitsubstrat in einer deutlichen Verkürzung der Aufwuchsdauer der Zellen auf die Mikroträger bemerkbar. Der Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf den Hybridomametabolismus war erheblich, wobei die immobilisierte Zellzahl sich dagegen als unabhängig vom pO_2 zeigte. Eine Limitierung der immobilisierten Population durch Sauerstoff wirkte sich in einem Rückgang der biologischen Aktivität der Kultur aus: Es erfolgte ein Rückgang des Glutaminverbrauchs der Population und eine damit einhergehende Verringerung der Wachstumsrate und der zellspezifischen Produktivität. Dies war in einem Umschalten auf Erhaltungsstoffwechsel begründet, dessen Energiebedürfnisse von der unabhängig vom pO_2 aufgenommenen Glukose befriedigt werden. Das Umschalten im Metabolismus erwies sich dabei als reversibel.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten nur einige der wichtigen Bestandteile des Zellkulturmediums auf ihre Rolle im Zellmetabolismus hin quantitativ untersucht werden. So blieb zum Beispiel die Rolle der essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren bei den Betrachtungen

unberücksichtigt. Eine konsequente Optimierung des Fermentationsmediums muß die Konzentrationen der Aminosäuren einzeln oder zumindest in Gruppen zusammengefaßt einer Variation unterziehen. Hier bieten sich Optimierungsalgorithmen zur gezielten Versuchsplanung und -auswertung an. Ein sehr interessanter Punkt für die Optimierung von Zellkulturmedien ist der Ersatz des chemisch labilen Glutamins durch Glutamat. Es muß untersucht werden, inwieweit die Aufnahme von Glutamin im Vergleich zu Glutamat bevorzugt stattfindet. Desweiteren sollte die verminderte Ammoniumfreisetzung und somit das Wegfallen der "scheinbaren" Substratüberschußinhibierung betrachtet werden, da dadurch erhöhte Substratkonzentrationen im Satzbetrieb ermöglicht würden. Weiterhin muß untersucht werden, ob die Rolle der Vitamine und Fettsäuren des Mediums eher katalytische oder stöchiometrische Funktionen aufweisen. Schmid *et al.* (1992) stellen eine stöchiometrische Funktion von freien Fettsäuren im Hybridomametabolismus unter Beeinflussung von Zellwachstum und Produktbildung fest. Vertiefte Arbeiten auf diesem Gebiet sind unbedingt angezeigt.

Ein Ansatz zur Verlängerung von Satzreaktorkulturen sowie zur Reduktion des Medienverbrauchs im kontinuierlichen Betrieb ist die spezifische Entfernung von wachstumsinhibierenden Metaboliten aus dem Kulturmedium. Im Rahmen dieser Arbeit sollte Ammonium in einer gezielten Dialyse mit Hilfe von Kationentauschermembranen aus Säugerzellfermentationen entfernt werden. Die vorgeschlagene Methode erwies sich an idealen Lösungen als außerordentlich erfolgreich, konnte allerdings am speziellen Beispiel des Fermentationsprozesses den Anforderungen nicht genügen. Der unspezifische Transport aller Kationen führte zum Entstehen einer "Kationensenke" bedingt durch die Bildung schwerlöslicher Carbonate. Es konnte allerdings sehr gut gezeigt werden, wie sich eine Entfernung von Ammonium positiv auf die Produktbildung auswirkt. Hybridomafermentationsprozesse im stationären Zustand reagieren auf ein Verfügbarmachen zusätzlicher Energieeinheiten - sei es durch Zugabe frischen Substrates (Glutamin) oder durch Entfernung eines Inhibitors, der zelluläre Energie für Erhaltungsaufgaben bindet - eher mit verstärkter Produktsynthese als mit zusätzlichem Wachstum. Diese in der Literatur für eine Glutaminzugabe beschriebene Tatsache konnte für die Ammoniumentfernung ebenfalls gezeigt werden. Eine spezifische Entfernung von Ammonium aus Fermentationsprozessen zur Antikörperproduktion ist daher sicher angezeigt, die bisher in der Literatur beschriebenen Prozesse mit Gasdiffusionsmembranen sind allerdings für das spezielle Beispiel der Säugerzellfermentationen prozeßtauglicher als die hier vorgeschlagene Methode.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in Verbindung mit Erkenntnissen aus den Literaturstudien sollen nun zur Entwicklung einer optimierten Fermentationsstrategie herangezogen werden.

Als Reaktorsystem empfiehlt sich die Auswahl eines Perfusionssystems auf der Basis poröser Mikroträger. Die positiven Erfahrungen aus Kapitel 6 sowie der simulierte Leistungsvergleich machen eine diesbezügliche Entscheidung leicht. Das Anfahren eines solchen Systems sollte nutristatisch mit Glutamin als Leitsubstrat erfolgen, wobei eine möglichst häufige Probenahme und damit eine schnelle Anpassung der Verweilzeit an die Bedürfnisse der wachsenden Population angeraten ist. Neuere Entwicklungen am Institut für Biotechnologie auf dem Gebiet der Adaption von FIA-Systemen an die Säugerzellkultur (van der Pol 1992) weisen den Weg hin zu einem computergestützten Anfahren. Arbeiten mit der Hefe *candida boidinii* im fed-batch Betrieb (Wedy 1992) zeigen den Erfolg der computergesteuerten Fermentation. Die Verfügbarkeit eines ständigen Glutamin-Signals in Verbindung mit einem Regelungskonzept zur Anpassung der Verdünnungsrate sollte zu einer weiteren Verkürzung der Aufwuchszeit auf die Mikroträger führen. Eine eventuelle Verbesserung des Mediums durch den Ersatz von Glutamin durch Glutamat kann an dieser Stelle auch völlig andere Regelungsstrategien erforderlich machen. Hierbei sollte eine genauere Betrachtung der bisher nicht berücksichtigten Einflüsse von Aminosäuren, Vitaminen und Fettsäuren ebenfalls mit einbezogen werden.

Ein wichtiger Punkt bei der Planung der Fermentationsstrategie ist der Zusammenhang zwischen der ausreichenden Versorgung der Hochzelldichtekultur mit Substraten und den Abtransport von toxischen Metaboliten. Die Versorgung mit dem Substrat Sauerstoff sollte anhand der ermittelten Kinetiken eine Stationärkonzentra-

tion nicht unter 75 % Luftsättigung ergeben. Im kleinen Maßstab (Reaktorhöhe bis ca. 1 m) kann die Begasung, wie in dieser Arbeit geschehen, blasenfrei in einem externen Begasungsgefäß erfolgen. Größere Reaktoren müssen integriert blasenfrei in der Wirbelschicht begast werden. Hambach (1992) hat diese Anordnung realisiert und somit das Problem der Begasung größerer Wirbelschichtreaktoren in der Säugerzellkultur gelöst. Die ausreichende Versorgung einer immobilisierten Population mit Energiesubstraten, wie z.B. Glukose und Glutamin erweist sich bei einer großen Zahl von Verbrauchern, d.h. bei hoher Zelldichte im Träger, als Problem. Hier existieren zwei Möglichkeiten zur Lösung: Zum einen kann im kontinuierlichen Betrieb mit sehr kurzen Verweilzeiten gearbeitet werden; dies bedeutet eine ausreichende "Fütterung" der Kultur bei Stationärkonzentrationen der Substrate im Bereich der Sättigung ($\mu_{\max}$) bei gleichzeitigem Ausspülen von Inhibitoren. Da Zellkulturmedien neben Glukose und Glutamin eine Vielzahl von Substraten mit eher katalytischer Funktion enthalten und zusätzlich sehr teuer sind, bedeutet diese "Verdünnungsprinzip" eine Verschwendung von Medienbestandteilen. Die Alternative hierzu stellt den Einsatz von höher konzentrierten Medien bei verlängerten Verweilzeiten dar. Die Bestandteile mit eher katalytischer Wirkung können dabei in Standardkonzentrationen belassen werden, die Energiesubstrate werden stärker konzentriert eingesetzt. Das Entstehen von Osmolaritätsproblemen beim Einsatz höherer Substratkonzentrationen kann durch eine gleichzeitige Reduktion des Anteils an NaCl (s. Tab. 4.1.1) vermieden werden. Der Zerfall von Glutamin in einer Reaktion erster Ordnung unter Ammoniumbildung stellt einen gravierenden Nachteil dieses Ansatzes dar. Hohe Glutaminkonzentrationen bedeuten eine hohe Rate des chemischen Zerfalls und wirken daher als "scheinbare" Überschußinhibierung. Lange Verweilzeiten führen daher bei hohem Glutaminumsatz zum Entstehen einer signifikanten Ammoniuminhibierung und somit zu einem entscheidenden Produktivitätsverlust. Abb. 8.1 faßt die Problematik noch einmal zusammen. Die in Kapitel 5 durchgeführten Simulationen von Prozeßzuständen mit immobilisierten Hybridomazellen können an dieser Stelle als "reales" Beispiel dienen. In Abb. 8.2 findet sich eine Auftragung der Raum-Zeit-Ausbeute und der jeweiligen Medienausnutzung über der Verweilzeit eines Wirbelschichtprozesses. Als Grundlage dieser Simulation dienten die kinetischen Daten der Hybridomazelllinie VX 12 (s. Kap. 5 und 6). Man erkennt deutlich, daß die Prozeßzustände mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten bei sehr kurzen Verweilzeiten zu finden sind, was wiederum mit schlechter Medienausnutzung (hohe Stationärkonzentrationen der Substrate) "erkauft" werden muß. Ein hoher Substratnutzungsgrad führt zur Entstehung einer signifikanten Ammoniuminhibierung und damit zu verringerten Raum-Zeit-Ausbeuten.

Eine optimierte Fermentationsstrategie muß beiden Umständen Rechnung tragen. Zum einen darf kein unsinniges Ausverdünnen von Inhibitoren auf Kosten der Medienausnutzung stattfinden, wenn ein wirtschaftlicher Prozeß entstehen soll. Andererseits sollte ein dicht bewachsenes Fließbett mit hohem Produktionspotential nicht durch die Akkumulation von toxischen Ammoniumkonzentrationen gefährdet werden. Es bietet sich daher an, höhere Glutaminkonzentrationen bei verlängerten Verweilzeiten einzusetzen und das entstehende Ammonium anhand beschriebener Methoden selektiv zu entfernen. Die erfolgreiche Integration von Gasdiffusionsmembranen in Fermentationsprozesse (Gerth *et al.* 1990) verspricht auch im Bereich der Säugerzellfermentation Erfolg (Carbonell 1992), wobei der Selektivitätsvorteil bei Verwendung von Kationenaustauschermembranen mit der modifizierten Konfiguration (vgl. Kap. 7.5) nicht vernachlässigt

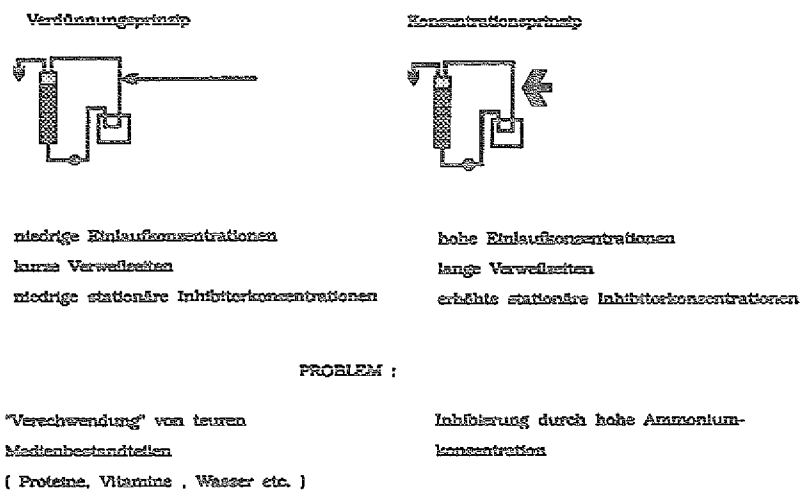


Abb. 8.1: Alternativkonzepte zur Versorgung von Hochzelldichtekulturen

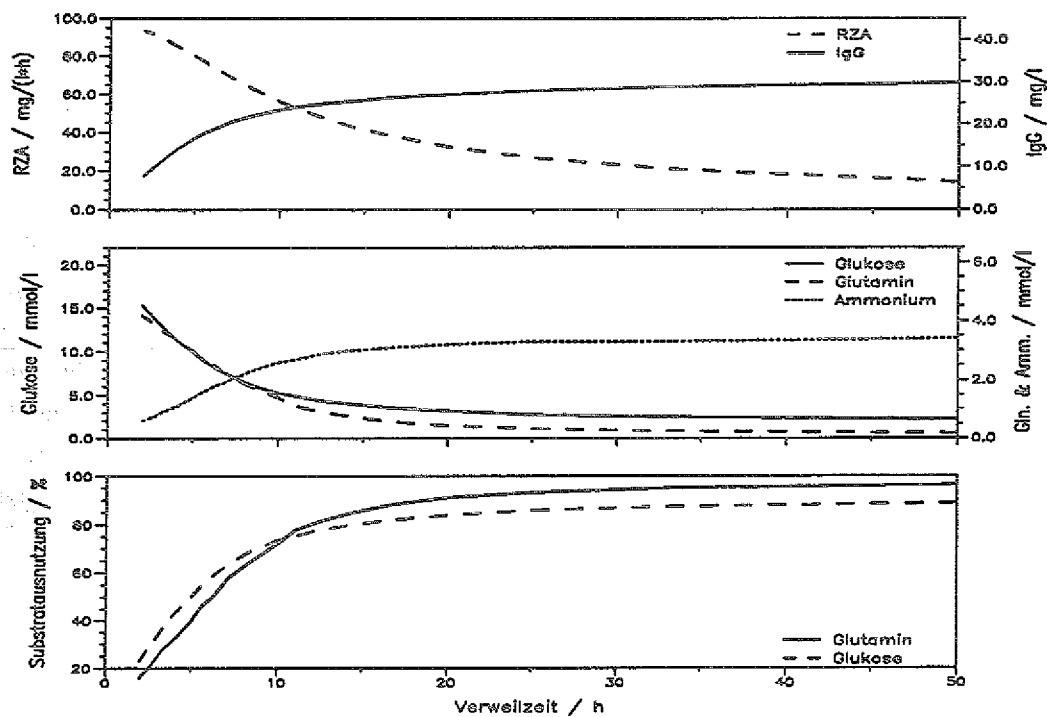


Abb. 8.2: Hohe Raum-Zeit-Ausbeuten bei schlechter Substratausnutzung

werden sollte. Als Alternative hierzu könnte der Ersatz von Glutamin durch Glutamat dienen. Hierbei ist abzuwägen, ob eine möglicherweise verlangsamte Glutamataufnahme nicht durch eine erhöhte Medienkonzentration wettgemacht werden kann. Das Fehlen des chemischen Zerfalls unter Freisetzung von toxischen Ammoniumkonzentrationen macht Glutamat zu einer echten Alternative im Vergleich zum traditionell eingesetzten Glutamin.

Zusammengefaßt findet sich die optimierte Fermentationsstrategie in Abb. 8.3: Ein Wirbelschichtprozeß mit integrierter blasenfreier Begasung wird mit einer on-line Analytik für die wichtigsten Substrate (vor allem Glutamin) versehen. Das Anfahren des Reaktors erfolgt glutaminostatisch, ein Regelungsalgorithmus steuert die Anpassung der Verweilzeit an das Aufwachsen der Kultur auf die Mikroträger in Zusammenarbeit mit der on-line Analytik. Das Medium enthält die Basalbestandteile in Standardkonzentrationen, Glukose und Glutamin werden in erhöhter Konzentration zugesetzt. Die infolge verlängerter Verweilzeit und höheren Mediensatzes entstehenden inhibierenden Ammoniumkonzentrationen werden mit Hilfe eines integrierten Dialysesystems abgesenkt. Ein solcherart konfigurierter Prozeß sollte eine ernstzunehmende Alternative zu den einfachen aber wenig produktiven Rührkesselverfahren im Satzbetrieb darstellen.

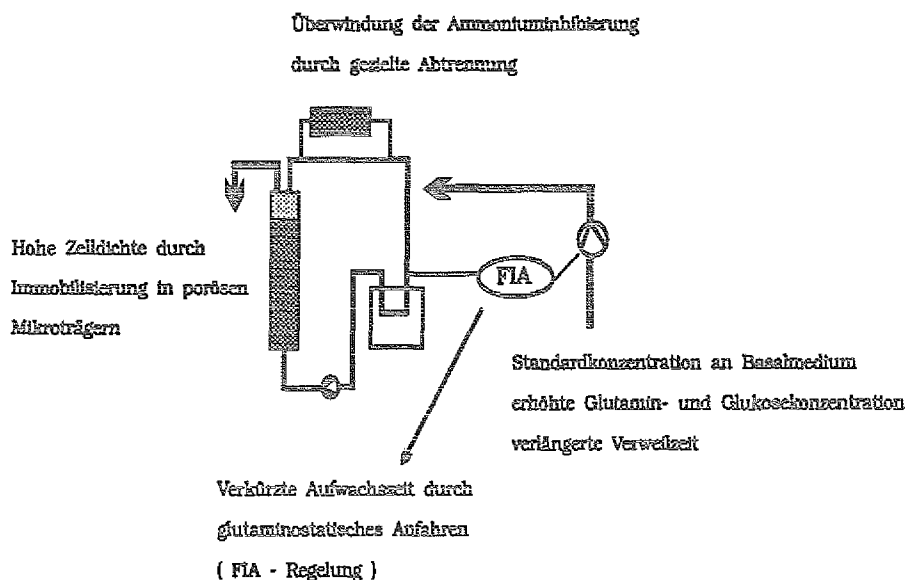


Abb. 8.3: Optimierte Prozeßstrategie zur MAK-Produktion mit Hybridomazellen

9. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit läßt sich in drei Aufgabengebiete einteilen, die separat angegangen wurden, um sie am Ende zu einer verbesserten Fermentationsstrategie zusammenzuführen. Hiermit sollte ein Beitrag zur Optimierung der Gewinnung von Wertstoffen mit Hilfe von Säugerzellkulturen geleistet werden. Als Beispielsystem diente die Produktion eines monoklonalen Antikörpers der Subklasse IgG_{2A} durch Kultivierung einer Maus-Maus-Hybridomazelle.

Im ersten der drei Teilschritte sollte zunächst ein Satz von kinetischen Daten gewonnen werden, mit dessen Hilfe ein kinetisches Modell des Wachstums und der Produktbildung der Zelllinie aufgestellt werden konnte. Das Modell war dann auf seine Eignung hin durch Vergleich mit Meßdaten überprüft worden.

- Die Bestimmung von kinetischen Daten wurde in Satzreaktorversuchen vorgenommen. Diese Methode bot die Möglichkeit, eine größere Anzahl von Parallelversuchen durchzuführen. Hierdurch konnte der Datensatz in einer vertretbaren Versuchszeit aufgenommen werden. Aufgrund der Tatsache, daß Meßwerte aus Satzreaktorfermentationen keine steady-state-Daten darstellen, sollten die hier gewonnenen Einsichten Trends anzeigen und die Experimente in kontinuierlicher Kultur, die mit Sicherheit exaktere Daten liefern, vorbereiten.
- Die ermittelten Zusammenhänge zwischen Wachstumsrate, Produktivität und den Substrat- bzw. Metabolitkonzentrationen wurden in ein unstrukturiertes Modell eingearbeitet. Mit Hilfe dieses Modells wurde es möglich, mit einem vertretbaren Rechenaufwand Wachstum und Produktbildung von Hybridomazellen in Satzreaktorkulturen zu beschreiben. Hierbei wurden sehr gute Übereinstimmungen der Prozeßsimulationen mit Meßdaten erzielt.
- Die Anwendung des kinetischen Modells zur Simulation von kontinuierlich betriebenen Reaktorsystemen zeigte die Möglichkeit, durch den Einsatz immobilisierter Hybridomazellen in einem Wirbelschichtreaktor die Raum-Zeit-Ausbeute des Prozesses im Vergleich zum offenen Chemostatbetrieb um den Faktor 9 zu steigern.

Im zweiten Teilschritt sollte dann die Eignung von porösen Mikroträgern zur Kultivierung von Hybridomazellen in hoher Dichte unter Beweis gestellt werden. Hierbei war eine Optimierung der Fermentationsbedingungen mit immobilisierten Systemen angestrebt.

- In einem eigens konstruierten Kleinwirbelschichtreaktor wurden die positiven Effekte der Immobilisierung von Hybridomazellen am Beispiel offenporiger Collagen-Mikroträger überprüft. Es wurden in Serum-freiem Medium Dichten von $3 \cdot 10^7$ vitalen Zellen pro ml Schüttvolumen an Carriern erreicht. Dies bedeutet in einem Reaktor von einem Liter Gesamtvolumen bei einem Verhältnis von Wirbelschichtvolumen zu Gesamtvolumen von 1:5 eine Gesamtzellzahl von $6 \cdot 10^9$ vitalen Zellen. Dies stellt im Vergleich mit einer offenen Kulturform, die mit der hier verwendeten Zelllinie $1 \cdot 10^9$ vitale Zellen/l liefert, eine deutliche Steigerung dar. Durch die Verkürzung der Verweilzeit in Reaktoren mit immobilisierten Zellen unterhalb des wash-outs wurden stark erniedrigte stationäre Inhibitorkonzentrationen erreicht. Dies wirkte sich positiv auf die zellspezifische Produktbildung der

immobilisierten Population aus. Somit konnten Raum-Zeit-Ausbeuten von 190 mg/(l*d) bezogen auf das Produkt IgG erreicht werden.

- Ein Vergleich der wachstumsgekoppelten IgG-Bildung in der offenen Kultur mit den Verhältnissen im immobilisierten System zeigt, daß immobilisierte Hybridomazellen eine höhere spezifische Produktivität bei gleicher Wachstumsrate aufweisen als suspendierte Zellen. Somit bietet die Immobilisierung einen Ansatz zur Wachstumsentkopplung der Produktion monoklonaler Antikörper.
- Durch den Wechsel des Leitsubstrates beim nutristatischen Anfahren von Wirbelschichtprozessen konnte die erforderliche Zeit bis zur vollständigen Besiedlung der Mikroträger auf weniger als die Hälfte reduziert werden. Ein Wirbelschichtreaktor kann nun durch das Einhalten einer ausreichend hohen Glutaminkonzentration während des Anfahrvorgangs im weniger als zehn Tagen vollständig kolonisiert werden.
- Die Untersuchungen zur Sauerstoffabhängigkeit der Produktivität einer immobilisierten Population zeigten deutlich die Wichtigkeit einer ausreichenden Sauerstoffversorgung von Hochzelldichtekulturen. Eine Limitierung einer immobilisierten Population der Hybridomazelllinie VX 12 führte zu einem Umschalten des Zellmetabolismus auf Erhaltungsstoffwechsel bei gleichzeitig drastisch reduzierter Produktbildung. Die im Rahmen dieser Experimente gewonnenen Daten bestätigten die in den Satzreaktorexperimenten gewonnenen Einsichten und validierten zusätzlich das aufgestellte kinetische Modell.

Der dritte Teil der Arbeiten beschäftigte sich mit dem Versuch, Ammonium, das eine stark inhibierende Wirkung auf Wachstum und Produktivität von Säugerzellen hat, aus Zellkulturfermentationen integriert abzutrennen.

- Die Abtrennung von Ammonium aus wäßrigen Lösungen mit Hilfe eines Verfahrens auf der Basis von Kationenaustauschermembranen erwies sich als eine außerordentlich leistungsfähige Methode. Es wurden Stoffübergangswerte von bis zu 50 mmol NH_4^+ /(m²*h) erreicht. Das Verfahren wurde auf eine direkte Integration in eine Zellkulturfermentation hin ausgearbeitet. Hierbei konnten wichtige Kriterien wie z.B. Einhaltung von sterilen Prozeßbedingungen, geringe Scherbelastung u.s.w. zur Zufriedenheit erfüllt werden. Im Einsatz am realen Prozeß einer Zellkulturfermentation erwies sich allerdings die hier entwickelte Konfiguration als in dieser Form nicht geeignet. Die Anwesenheit von HCO_3^- im Zellkulturmedium führte zum Transport von CO_2 durch die Membran zum Akzeptorkreislauf des Dialyseprozesses. Im dort herrschenden alkalischen Milieu entstehendes CO_3^{2-} ergab schwerlösliche Calcium- und Magnesiumsalze. Die so entstandene "Senke" für die beiden essentiellen Kationen führte zu einer Limitierung der angeschlossenen Fermentation. Weitere Arbeiten zur Verbesserung der hier vorgestellten Konfiguration sollen hier zum Einsatz dieser sehr effizienten Methode zur Reduktion der (inhibierenden) Ammoniumkonzentration bei Säugerzellkulturfermentationen beitragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurden in eine optimierte Fermentationsstrategie zur Kultivierung von Säugerzellen eingearbeitet. Diese optimierte Kulturstrategie soll helfen, die Akzeptanz von Säugerzellkulturen als Produzenten von komplexen und daher hochpreisigen Wertstoffen zu steigern.

10. Literaturverzeichnis

- Altshuler, Dziewulski, Soweik, Belfort: Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollowfiber reactor-separators; *Bio.Bio.* 28, 646-658. (1986)
- Arathoon, Birch: Large-scale cell culture in Biotechnology; *Science* 232, 1390-1395. (1986)
- Batt, Kompala: A structured kinetic modeling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures; *Bio.Bio.* 34, 515-531. (1988)
- Bell, Bushell, Scott, Wardell, Spier, Sanders: Genetic modification of hybridoma glutamate metabolism: Physiological consequences; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): "Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 180-182
- Berg: An integrated system for large scale cell culture; *Dev. Biol. Stand.* 60; 297-307 (1985)
- Biblia, Flickinger: A model of interorganelle monoclonal antibody transport and secretion in mouse hybridoma cells; *Bio.Bio.* 38, 767-780. (1991)
- Biblia, Flickinger: A structured model for monoclonal antibody synthesis in exponentially growing and stationary phase hybridoma cells; *Bio.Bio.* 37, 210-226. (1991)
- Biblia, Flickinger: A model of interorganelle monoclonal antibody transport and secretion in mouse hybridoma cells; *Bio.Bio.* 38 767-780. (1991)
- Biblia, Flickinger: A structured model for monoclonal antibody synthesis in exponentially growing and stationary phase hybridoma cells; *Bio.Bio.* 37, 210-226. (1991)
- Biblia, Flickinger: use of a structured kinetic model of antibody synthesis for optimization of antibody production systems; *Bio.Bio.* 39, 251-272. (1992)
- Birch, Boraston, Wood: Bulk production of monoclonal antibodies in fermentors; *Trends in Biotechnol.* 3 No. 7, 162-166. (1985)
- Blüml, Reiter, Zach, Gaida, Schmalz, Strutzenberger, Mohr, Rauscher, Kättinger: Development of a new type of macroporous carrier; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): "Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 501-504
- Boraston, Thompson, Garland, Birch: Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture; *Dev. Biol. Stand.* 55, 103-111 (1984)
- Borth, Steindl, Weigang, Reiter, Kättinger: A continuous multistage roller reactor for animal cell culture: 1. pattern of growth, antibody production and catabolism of a murine hybridoma; *Cytotechnol.* 3; 253-258. (1990)
- Bree, Dhurjati, Geoghean, Robnett: Kinetic modelling of hybridoma growth and immunoglobulin production in a large-scale suspension culture; *Bio.Bio.* 32, 1067-1072. (1988)
- Brose, van Eickeren: A membrane based method for removal of toxic ammonium from mammalian cell culture; *Appl. Biochem. Bioeng.*, 24/25, 457-468. (1990)
- Brunner, Tegtmeier: Enzymatic detoxification using lipophilic hollowfiber membranes 1: Glucoronidation reactions; *Artificial organs* 8(2), 161-166. (1984)
- Busse, Tsikas, Brunner: Detoxification of Ammonia using a lipophilic Hollowfiber Reactor, *J. Hepatology*, 1-4, 10. (1987)
- Butler: A comparative review of microcarriers available for the growth of anchorage dependent cells; in Spier, Griffiths (eds): "Animal Cell Biotechnology" 3, 283-303 (1988)
- Carbonell, Besnainhou, Capiaumont, Legrand, Lessart, Nabet: Development of strategies for the removal of ammonia from animal cell cultures; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): "Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 166-170
- Cooper, Burt, Wilson: Critical Effect of Oxygen Tension on Rate of Growth of Anomal Cells in Continuous Suspension Culture; *Nature* 182, 1508-1509. (1958)

- Dalili, Sayles, Ollis:** Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: Experiment and model; *Bio.Bio.* 36, 74-82. (1990)
- Dasgupta:** Annular dual membrane permselective device and method; US Patent 4,647,380. (1987)
- Dawson, Wash:** Process for removal of ammonia from aqueous streams; US Patent 3,842,000. (1974)
- de Tremblay, Perrier, Chavarie, Archambault:** Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases; *Bioproc.Eng.* 7, 229-234. (1992)
- Donnelly, Scheffler:** Energy metabolism in respiration-deficient and wild type chinese hamster fibroblasts in culture; *J.Cell.Physiol.* 89, 39-52. (1976)
- Doyle, Butler:** The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. , *J. of Biotechnol.*, 15, 91-100 (1990)
- Eagle:** Amino acid metabolism in mammalian cell cultures; *Science* 130, 432-437 (1957)
- Feder, Tolbert:** Säugerzellen in Massenkultur; in: *Industrielle Mikrobiologie*, Verlag Spektrum der Wissenschaft; 134-143 (1987)
- Fiechter, Gmünder:** Metabolic control of glucose degradation in yeast and tumor cells; *Adv.Biochem.Engin.* 39, 1-28. (1989)
- Fleischaker, Sinskey:** Oxygen demand and supply in cell culture; *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 193-197. (1981)
- Flickinger, Goehel, Biblia, Boyce-J.**: Evidence for posttranslational stimulation of monoclonal antibody secretion by l-glutamine during slow hybridoma growth; *J. Biotechnol.* 22, 201-226. (1992)
- Frame, Hu:** Oxygen uptake of mammalian cells in microcarrier culture-response to changes in glucose concentration; *Biotechnol.Lett.* 7(3), 147-152. (1985)
- Frame, Hu:** Kinetic study of hybridoma cell growth in continuous culture: 1. A model for non-producing cells; *Bio.Bio.* 37, 55-64. (1991)
- Freyer, Wedy:** Optimieralgorithmus "Rosineu", Institut für Biotechnologie der KfA Jülich (1990)
- Garske:** Selektive Ammoniumabtrennung aus Säugerzellfermentationen durch Dialyse über eine Kationenaustauschermembran; Diplomarbeit FH Aachen (1992)
- Glacken, Fleischaker, Sinskey:** Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximising product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells; *Bio.Bio.* 28, 1376-1389. (1986)
- Glacken, Adema, Sinskey:** Mathematical description of hybridoma culture kinetics: 1. Initial metabolic rates; *Bio.Bio.* 32, 491-506. (1988)
- Graff, Mc. Carty:** Sustained cell culture; *Exp.Cell.Res.* 13, 348-357 (1957)
- Griffiths:** Overview of cell culture systems and their scale up; in Spier, Griffiths (eds.): "Animal cell biotechnology" 3, 179-220 (1988)
- Griffiths:** Animal cell culture processes - batch or continuous; *J.Biotechnol.* 22, 21-30 (1992)
- Grot, Du Pont de Nemours, Wilmington D.E.:** Ion exchange process and apparatus; US patent 4,591,439. (1986)
- Hambach:** Institut für Biotechnologie der KfA Jülich; pers. Mitteilung
- Hambach, Biselli, Runstadler, Wandrey:** Development of a reactor integrated aeration system for the cultivation of animal cells in fluidized beds; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): "Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 381-384
- Hassell, Allen, Rowley, Butler:** The use of glutamine free media for the growth of three cell lines in microcarrier culture. In Spier, Griffiths (eds.): "Modern Approaches to Animal Cell Technology", Butterworths, London 245-263 (1987)
- Hecht, Bischoff, Gerth:** Hollow Fiber supported gas membrane for in situ removal of ammonium during an antibiotic fermentation, *Bio.Bio.* 35, 1042-1050. (1990)

- Hiller, Aeschlimann, Clark, Blanch: A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium; *Bio.Bio.* 38, 733-741. (1991)
- Iio, Moriyama, Murakami: Effects on cell proliferation of metabolites produced by cultured cells and their removal from culture in defined media; Murakami (ed.) in: *Growth and differentiation of cells in defined environment*, Springer Verlag, (1985)
- Jäger: A novel perfusion system for the large-scale cultivation of animal cells based on a continuous centrifuge; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): *"Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"*; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 397-401
- Jenkins, Butler, Dickson: Characterization of glutamine metabolism of two related murine hybridomas; *J.Biotechnol.* 22, 167-182. (1992)
- Joksch: Programmpaket "Simuplus"; Institut für Biotechnologie der KfA Jülich (1990)
- Kattinger: Animal cell culture: Biological and technological aspects; *Proc. 4th European Congress on Biotechnology Vol 4*, Elsevier Science Publishers Amsterdam, 21-41 (1987)
- Kempken, Lehmann: Institut für Zellkulturtechnologie der Universität Bielefeld; Posterbeitrag zum "4th Tutzing Symposium on Chemical Engineering in Medicine and Biotechnology"; 1991
- Kilburn, Webb: The cultivation of mammalian cells at controlled dissolved oxygen partial pressure; *Bio.Bio.* 10; 801-814. (1968)
- Kilburn, Lilly, Self, Webb: The effect of dissolved oxygen partial pressure on the growth and carbohydrate metabolism of mouse LS cells; *J.Cell.Sci.* 4, 25-37. (1969)
- Kochler, Milstein: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity; *Nature* 256, 495-497 (1975)
- Knazek, Guillino, Kohler, Dedrick: Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth; *Science* 178, 65-67 (1972)
- Lee, Gregory, Haddow, Piret, Kilburn: High density BHK culture using porous microcarriers; in Spier, Griffiths, Mc. Donald (eds.): *"Animal cell technology: developments, processes and products"* Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 480-487
- Lehmann, Vorlop, Büntemeyer: Bubble free reactors and their development for continuous cell recycle; in Spier, Griffiths (eds.): *"Animal cell biotechnology"* 3, 221-237 (1988)
- Leno, Merten, Vuillier, Hache: IgG production in hybridoma batch culture: Kinetics of IgG mRNA, cytoplasmic-, secreted- and membrane-bound antibody levels; *J. Biotechnology* 20, 301-311. (1991)
- Looby, Griffiths: Fixed bed porous glass sphere (porosphere) bioreactors for animal cells; *Cytotechnol.* 1; 339-346. (1988)
- Looby, Griffiths, Racher: Productivity of a hybridoma cell line in a range of suspension and immobilized culture systems; 11th ESACT meeting 1991 Brighton. (1992)
- Lüllau, Dreisbach, Grogg, Biselli, Wandrey: Immobilisation of animal cells on chemically modified silicon carrier; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): *"Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"*; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 469-475
- Lydersen, Pugh, Paris, Scharma, Noll: Ceramic matrix for large scale mammalian cell culture; *BIO/TECHNOLOGY* (Jan. 1985) 63
- Martinelle, Häggström: Potassium ions affect the ammonium/ammonia toxicity in animal cell cultivations; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): *"Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"*; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 163-165

- McLimans, Blumenson, Reparsky, Ito:** Ammonia loading in cell culture systems; *Cell Biolog.Int.Rep.* 5(7), 653-660. (1981)
- McQueen, Bailey:** Mathematical modelling of the effect of Amoniumion on the intracellular pH of hybridoma cells, *Bio.Bio.*, 35, 897-906. (1990)
- McQueen, Bailey:** Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH; *Bioprocess engineering*, 6, 49-61. (1991)
- Meilhoc, Wittrup, Bailey:** Influence of dissolved oxygen concentration on growth, mitochondrial function and antibody production of hybridoma cells in batch culture; *Bioproc. Eng.* 5, 263-274. (1990)
- Merten:** Batch production and growth kinetics of hybridomas; *Cytotechnol.* 1, 113-121. (1988)
- Merten:** Production and use of non-therapeutic monoclonal antibodies; in Spier, Griffiths (eds.): "Animal cell biotechnology" 4; 258-300 (1990)
- Miller, Wilke, Blanch:** Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture; *Bioproc. Eng.* 3, 113-122. (1988)
- Miller, Wilke, Blanch:** The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: 2. Glutamine pulse and step changes; *Bio.Bio.* 33, 487-499. (1989)
- Miller, Wilke, Blanch:** Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: 1. Glucose pulse and step changes; *Bio.Bio.* 33, 477-486. (1989)
- Miller, Wilke, Blanch:** Transient responses of hybridoma metabolism to changes in the oxygen supply rate in continuous culture; *Bioproc.Eng.* 3, 103-111 (1988)
- Mizrahi, Voessler, Yagi, Moore:** The effect of dissolved oxygen partial pressure on growth, metabolism and immunoglobulin production in a permanent human lymphocyte cell line culture; *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* 139, 118-122. (1972)
- Montagnon, Vinent-Falquet, Fanget:** A 1000 l scale microcarrier culture of VERO cells for killed polio virus vaccine production; *Dev. Biol. Stand.* 55, 37 - 42 (1984)
- Nagle, Brown:** An improved heat-stable glutamine-free chemically defined medium for growth of mammalian cells; *J.Cell.Physiol.* 77, 259-264 (1971)
- Newland, Greenfield, Reid:** hybridoma growth limitations: The roles of energy metabolism and ammonia production; *Cytotechnol.* 3, 215-229. (1990)
- Nilsson:** Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules; *Nature* 66, 183-193 (1983)
- Olsnes, Tonnessen, Sandvig:** pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells; *J.Cell Biol.* 102; 967-971. (1986)
- Omasa, Higashiyama, Shioya, Suga:** Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate controlled fed-batch operation; *Bio.Bio.* 39; 556-564. (1992)
- Ozturk, Palsson:** Effects of dissolved oxygen on hybridoma cellgrowth, metabolism and antibody production kinetics in continuous culture; *Biotechnol.Progr.* 6, 437-446. (1990)

- Ozturk, Palsson: Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism and monoclonal antibody production; *J.Biotechnol.* 16, 259-278. (1990)
- Ozturk, Palsson: Growth, metabolic and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. effect of serum concentration, dissolved oxygen concentration and medium pH in a batch reactor; *Biotechnol.Progr.* 7; 481-494. (1991)
- Ozturk, Palsson: Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production; *Bio.Bio.* 37, 989-993. (1991)
- Ozturk, Palsson: growth, metabolic and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors; *Biotechnol.Progr.* 7; 471-480. (1991)
- Ozturk, Riley, Palsson: Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production; *Bio.Bio.* 39; 418-421. (1992)
- Phillips, Scharer, Bols, Moo-Y.: Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture; *Biotechnol.Lett.* 9(11), 745-750. (1987)
- Polak, Hof, Akzona Inc., New Y.: Ammonia Scavenger; US patent 4,650,587. (1987)
- Racher, Looby, Griffiths: Studies on monoclonal antibody production by a hybridoma cell line immobilised in a fixed bed, porousphere culture system; *HJ.Biotechnol.* 15, 129-146. (1990)
- Radlett, Pay, Garland: The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot and mouth disease vaccines over twenty year period; *Develop.Biol.Standard.* 60; 163-170. (1985)
- Ramirez, Mutharasan: Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures; *Bio.Bio.* 36, 839-848. (1990)
- Ray, Karkare, Runstadler: Cultivation of hybridoma cells in continuous culture: Kinetics of growth and product formation; *Bio.Bio.* 33, 724-730. (1989)
- Reiter, Blüml, Gaida, Unterluggauer, Doblhoff-Dier, Noe, Plail, Huss, Katinger: Modular integrated fluidized bed bioreactor technology; *BIO/TECHNOLOGY* 9, 1100-1102 (1991)
- Reitzer, Wice, Kennell: Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultures HeLa cells; *J.Biol.Chem.* 275(8), 2669-2676. (1979)
- Renner, Plagemann, Bernlohr: Permeation of glucose by simple and facilitated diffusion by novikoff rat hepatoma cells in suspension culture and its relationship to glucose metabolism; *J.Biol.Chem.* 247(18), 5765-5776. (1972)
- Reuveny, Velez, Macmillan, Miller: Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors; *J.Imm.Meth.* 86, 53-59. (1986)
- Reuveny, Velez, Miller, Macmillan: Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors; *J.Imm.Meth.* 86, 61-69. (1986)
- Runstadler, Ozturk, Ray: An evaluation of hybridoma cell specific productivity: perfused immobilized, continuous suspension and batch suspension cultures; *Proceedings of the 4th annual meeting of the JAACT, Fukuoka, Japan.* (1991)
- Rupp: Use of cellular microencapsulation in large scale production of monoclonal antibodies; in Feder, Tolbert (eds.): "Large Scale Mammalian Cell Culture", Academic Press Orlando, 19-38

Schmid, Huber, Oesterheld: Free fatty acid utilization of different hybridoma cell lines and its effect on cell growth, metabolism and antibody production; in Spier, Griffiths, Macdonald (eds.): "Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products"; Butterworth & Heinemann, Oxford 1992, 114-116

Self, Kilburn, Lilly: The influence of dissolved oxygen partial pressure on the level of various enzymes in mouse LS cells; Bio.Bio. 10; 815-828. (1968)

Siano, Mutharasan: NADH fluorescence and oxygen uptake responses of hybridoma cultures to substrate pulse and step changes; Bio.Bio. 37, 141-159. (1991)

Strathmann: Trennungen von molekularen Mischungen mit Hilfe synthetischer Membranen; Verlag Dr. Dietrich Steinkopf (1979)

Sumbilla, C.Zielke, Reed, Ozand, R.Zielke.: Comparison of the oxidations of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts; Biochim.Biophys.Acta 675; 301-304. (1981)

Suzuki, Ollis: Cell cycle model for antibody production kinetics; Bio.Bio. 34, 1398-1402. (1989)

Tharakan, Chau: A radial flow hollow fiber reactor for the large scale culture of mammalian cells; Bio.Bio. 28, 329-324 (1986)

Tonegawa: Die Moleküle des Immunsystems; in: Immunsystem, Verlag Spektrum der Wissenschaft 87-97 (1987)

Van den Tweel: Immunologie Kapitel 3; Verlag Spektrum der Wissenschaft (1988)

Van der Pol: Laufende Dissertation am Institut für Biotechnologie der KfA Jülich (1992)

Van Wezel: Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogenous culture; Nature 251, 64-65 (1967)

Von Eysmond: Einsatz der Elektrodialyse bei der anaeroben Essigsäureproduktion; Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Willhelms-Universität Bonn (1990)

Wedy: Reaktionskinetische und regelungstechnische Untersuchungen zur Produktion von Formiatdehydrogenase mit *Candida boidinii*; Dissertation RWTH Aachen (1992)

Weuster: Ethanolproduktion mit immobilisierten *Zymomonas mobilis* im Wirbelschichtreaktor; Berichte des Forschungszentrums Jülich 2518 (1991)

Wilson, Owen, Erecinska: Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration: A mathematical model; Arch.Biochem.Biophys. 195 No. 2; 494-504. (1979)

Wilson, Erecinska, Drown, Silver: The oxygen dependence of cellular energy metabolism; Arch.Biochem.Biophys. 195 No. 2; 485-493. (1979)

Zielke R, Ozand, Tildon, Sevdalian, Cornblath: Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts; J.Cell.Physiol. 95, 41-48. (1978)

Zielke R., Sumbilla, Sevdalian, Hawkins, Ozand: Lactate: A major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts; J.Cell.Physiol. 104, 433-441. (1980)

Zielke R., Zielke C., Ozand: Glutamine: A major energy source for cultured mammalian cells; Fed. Proc. 43, 121-125. (1984)

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey in der Zeit von Oktober 1989 bis September 1992 angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die Übernahme des Hauptreferates, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die fruchtbare Diskussion der Versuchsergebnisse

Herrn Prof. Dr. M. Peter für die Übernahme des Korreferates

Herrn Dr. M. Biselli für die kritische Durchsicht der Arbeit und die engagierte Diskussion der Ergebnisse

Herrn Dipl.-Ing. U. Garske für die tatkräftige Mitarbeit bei der praktischen Realisierung der gezielten Dialyse und die Anfertigung der dazugehörigen Grafiken

Herrn J. Gätgens für die kompetente und freundschaftliche Hilfe bei den fermentativen und analytischen Arbeiten

allen Angehörigen der "Zellkulturgruppe" für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die Möglichkeit, bei allen möglichen und unmöglichen Problemen Hilfe in Rat und Tat zu finden.

den Mitgliedern der Werkstätten der KfA Jülich für die stete Hilfsbereitschaft und die bereitwillige Unterstützung

Herrn S. Peters und seinen Mitarbeitern im Fotolabor des IBT für die Gestaltung der Fotografien sowie die vielen Tips und Ratschläge zur Präsentation von Ergebnissen

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

JULI-2688
November 1992
ISSN 0366-0885