

Entwicklung eines Produktions- prozesses zur Herstellung rekombinan- ten humanen Wachstumshormons

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Biotech. Tobias Nottorf
geb. in Lüneburg

2006

1. Gutachter:
Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann
Lehrstuhl für Zellkulturtechnik
Technische Fakultät, Universität Bielefeld

2. Gutachter:
Prof. Dr. E. Flaschel
Lehrstuhl für Fermentationstechnik
Technische Fakultät, Universität Bielefeld

Tag der Disputation: 15.12.2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2004 bis Oktober 2006 im Rahmen einer Kooperation mit der BiBiTec GmbH, Bielefeld, und der Cell Culture Service GmbH, Hamburg, am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Ing. J. Lehmann möchte ich für die Möglichkeit der Dissertation, die sehr interessante Themenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. E. Flaschel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. T. Noll möchte ich für die Möglichkeit danken, auch nach dem Wechsel weiter unter hervorragenden Bedingungen arbeiten zu können.

Herrn Dr. H. Büntemeyer danke ich für die Unterstützung im Umgang mit dem Prozessleitsystem und den analytischen Methoden.

Besonders bei Herrn Dr. D. Lütkemeyer und bei Frau Dr. S. Siwiora-Brenke möchte ich mich für die vielen Anregungen bezüglich der Entwicklung der Aufreinigungsstrategie danken.

Herrn A. Loa, Cell Culture Service GmbH, Hamburg, möchte ich für die Informationsbereitschaft im Umgang mit einer zunächst schwierigen Zelle und für die Überlassung der Daten zur *in-vitro*-Wirksamkeit danken. Herrn N. Hunt, Altona Biotec, Hamburg, danke ich für die Überlassung der Daten zum Tierversuch.

Den Herren Dipl. Biotech. S. Northoff und Dipl. Biotech. W. Höra möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den dieser Arbeit assoziierten Diplomarbeiten danken.

Dank an Herrn Dr. R. Hoffrogge und Frau N. Küpper, Institute for Genome Research, Universität Bielefeld, für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Bei den Frauen A. Ehrlich, A. Ehrlich und J. Schäfer möchte ich mich für die vielen Aminosäure- und Produktkonzentrationsbestimmungen bedanken. Bei Frau K. Koslowski bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei der Pufferherstellung und dem HCP-ELISA. Frau E.

Reuter danke ich für die Reproduktionen der Primäraufreinigung und Frau A.M. Wagner danke ich für Unterstützung bei der DNA-Bestimmung. Herrn I. Vormbrock und Frau A. Schemel danke ich für die Hilfe bei der Produktanalytik.

Den Herren H. Brinkmann und L. Fallak danke ich für die Arbeiten am und für das Perfusionssystem.

Dank an Herrn Dipl. Biotechn. M. Schomberg für das Durchsehen dieser Arbeit.

Bei allen Angehörigen des Lehrstuhls für Zellkulturtechnik, der AG Zelluläre Genetik und der BiBiTec GmbH möchte ich mich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Eltern, Großeltern und Freuden danke ich für die vielfältige Unterstützung. Ganz besonders möchte ich mich bei Katja bedanken, ohne die meine Zeit in Bielefeld nicht halb so schön gewesen wäre.

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Posterpräsentationen

Nottorf, T., Höra, W., Büntemeyer, H., Siwiora-Brenke, S., Loa, A., Lehmann, J. (2005)
Production of human growth hormone in a mammalian high cell density perfusion process.
19. ESACT Meeting, Harrogate, UK.

Nottorf, T., Büntemeyer, H., Loa, A., Noll, T., Lehmann, J. (2006)
An oxystat controlled high cell density perfusion process for the production of human growth hormone.
Cell Culture Engineering X, Whistler, Canada.

Nottorf, T., Büntemeyer, H., Loa, A., Noll, T., Lehmann, J. (2006)
Oxystat-geregelter Perfusionsprozess zur Produktion des humanen Wachstumshormones.
24. Dechema-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden.

Nottorf, T., Büntemeyer, H., Siwiora-Brenke, S., Lütkemeyer, D., Loa, A., Noll, T., und Lehmann, J. (2007)

An integrated production process for human growth hormone.

20. ESACT Meeting, Dresden.

Publikationen

Nottorf, T., Höra, W., Büntemeyer, H., Siwiora-Brenke, S., Loa, A., Lehmann, J. (2005)

Production of human growth hormone in a mammalian high cell density perfusion process.

Tagungsband des 19. ESACT Meetings, Harrogate, UK.

Nottorf, T., Büntemeyer, H., Loa, A., Noll, T., Lehmann, J. (2006)

Oxystat-geregelter Perfusionsprozess zur Produktion des humanen Wachstumshormones.

Chemie Ingenieur Technik, Vol. 78, No. 9, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Nottorf, T., Büntemeyer, H., Siwiora-Brenke, S., Lütkemeyer, D., Loa, A., Noll, T., und Lehmann, J. (2007)

An integrated production process for human growth hormone.

Tagungsband des 20. ESACT Meetings, Dresden, eingereicht zur Publikation.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Einführung	1
1.2.	Zielsetzung.....	3
1.3.	Charakteristika des humanen Wachstumshormons.....	4
1.4.	Physiologie des humanen Wachstumshormons	6
1.4.1.	Pharmakodynamik	7
1.4.2.	Pharmakokinetik und Metabolisierung.....	11
1.5.	Anwendung des humanen Wachstumshormons in der Klinik.....	12
1.6.	Wachstumshormonpräparate.....	14
1.6.1.	Hypophysäres Wachstumshormon.....	14
1.6.2.	Produktion in bakteriellen Expressionssystemen.....	15
1.6.3.	Produktion in Eukaryoten	16
1.6.4.	Neuartige Wachstumshormonpräparate.....	16
1.7.	Prozessführungsstrategien.....	17
1.8.	Zellrückhaltesysteme	18
2	Materialien und Methoden.....	21
2.1	Produktion in Zellkulturen	21
2.1.1	Medium und Zelltyp	21
2.1.2	<i>Off-line</i> -Analytik.....	23
2.1.2.1	Zelldichtebestimmung.....	23
2.1.2.2	Ammoniumkonzentrationsbestimmung.....	23
2.1.2.3	Aminosäurekonzentrationsbestimmung.....	24
2.1.2.4	Glucose-/ Lactatkonzentrationsbestimmung.....	25
2.1.2.5	Osmolalität.....	26
2.1.3	Vorkultursystem: SuperSpinner.....	26
2.1.4	Bioreaktor.....	27
2.1.5	CS20.1-Plattensedimenter.....	30
2.1.6	Berechnungen zum Plattensedimenter	32
2.1.7	<i>On-line</i> -Analytik und Prozessregelung des Bioreaktors.....	35
2.1.7.1	Pt-100 Temperatursensor	35
2.1.7.2	pH- und pO ₂ -Elektrode	36
2.1.7.3	PID-Regler	36
2.1.8	Oxystat zur Steuerung der Zellentnahme.....	37
2.1.9	Ermittlung des Leistungseintrags durch Rühren.....	38
2.1.10	Berechnungen zur diskontinuierlichen Kulturführung	39

2.1.11	Berechnungen zur kontinuierlichen Kulturführung.....	41
2.2	Produktaufreinigung.....	45
2.2.1	Primäraufreinigung in der Fließbettchromatographie.....	45
2.2.1.1	Bestimmung der Partikelkonzentration mit dem CASY®.....	47
2.2.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	47
2.2.3	Anionenaustauschchromatographie.....	48
2.2.4	Semipräparative Größenausschlusschromatographie.....	48
2.2.5	Berechnungen zur Aufreinigung.....	48
2.3	Bestimmung der Produktquantität und -qualität.....	50
2.3.1	ELISA.....	50
2.3.2	Umkehrphasenchromatographie zur Produktquantifizierung.....	50
2.3.3	RP-HPLC zur Desamidierungsanalytik.....	51
2.3.4	Analytische Größenausschlusschromatographie.....	52
2.3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	55
2.3.6	Nb2-Zellproliferationstest.....	55
2.3.7	Tierversuch.....	56
2.3.8	Bestimmung der Quantität an Wirtszellprotein.....	56
2.3.9	Bestimmung der Quantität doppelsträngiger DNA.....	57
2.3.10	Massenspektrometrie.....	59
3	Ergebnisse und Diskussion.....	61
3.1	Perfusionsprozess zur Herstellung des humanen Wachstumshormons.....	61
3.1.1	Prozess T: Einsatz von Taumelrührern.....	62
3.2	Etablierung eines langzeitstabilen Hochzelllichtprozesses.....	67
3.2.1	Prozess M1: Optimierung von Temperatur und Leistungseintrag.....	68
3.2.2	Bestimmung des Leistungseintrags durch Rühren.....	79
3.2.3	Prozess M2: Optimierung des pH-Werts.....	82
3.2.4	Prozess M3: Untersuchung der Effekte reduzierter Verdünnungsraten.....	92
3.2.5	Prozess R: Untersuchung submerser Begasung.....	103
3.2.6	Fed-Batch-Prozess mit submerser Begasung.....	112
3.2.7	Zusammenfassende Diskussion der Kultivierung.....	118
3.3	Aufreinigung des humanen Wachstumshormons.....	122
3.3.1	Primäraufreinigung mit multimodalem Ligand.....	122
3.3.2	Variante 1: Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	122
3.3.2.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie im Festbett.....	123
3.3.2.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie im Fließbett.....	124

3.3.3	Variante 2: Kationenaustauschchromatographie	127
3.3.3.1	Kationenaustauschchromatographie im Festbett	127
3.3.3.2	Kationenaustauschchromatographie im Fließbett.....	128
3.3.3.2.1	Probenauftrag unterhalb des Isoelektrischen Punkts	128
3.3.3.2.2	Probenauftrag oberhalb des Isoelektrischen Punkts.....	129
3.3.3.3	Bestimmung der dynamischen Kapazität.....	131
3.3.3.4	SDS-PAGE zur Bestimmung des Aufreinigungserfolgs	132
3.3.3.5	Reinigung des Gelmaterials	133
3.3.3.6	Partikelanreicherung während der Fließbettchromatographie	134
3.3.4	Reinigung I: Hydrophobe Interaktionschromatographie	138
3.3.5	Reinigung II: Anionenaustauschchromatographie.....	141
3.3.5.1.1	Anionenaustauscher als alternativer Reinigungsschritt I.....	143
3.3.6	Reinigung III: Größenausschlusschromatographie.....	145
3.3.7	Bilanzierung der Aufreinigungssequenz.....	148
3.3.8	Zusammenfassende Diskussion der Aufarbeitung.....	150
3.4	Spezielle Produktanalytik	154
3.4.1	Massenspektrometrie	154
3.4.2	Bestimmung des Anteils der rhGH-Varianten	159
3.4.3	<i>In-vitro</i> -Aktivität: Nb2-Zellproliferationstest.....	159
3.4.4	<i>In-vivo</i> -Aktivität: Tierversuch.....	161
3.4.5	Zusammenfassende Diskussion der speziellen Analytik	164
4	Fazit und Ausblick	166
5	Literaturverzeichnis	169
6	Abkürzungsverzeichnis.....	187

1. Einleitung

1.1. Einführung

In tierischen Zellkulturen hergestellte Biopharmazeutika werden seit etwa zwei Jahrzehnten in der Klinik eingesetzt. Dennoch haben sie allein von 1996, mit einem damaligen Umsatzanteil der verschreibungspflichtigen Medikamente von 2 % (Lubiniecki, 1998), bis 2002 ihren Umsatzanteil auf 8 % (Verband Forschender Arzneimittelhersteller) vervierfachen können. Viele Patente, wie die für Erythropoietin, Granulocyten/Makrophagen-stimulierendem Faktor und beta-Interferon sind ausgelaufen oder werden bald auslaufen. Für eine Reihe von Produkten wurden generische Herstellungsprozesse entwickelt und einige Produkte werden bereits auf weniger restriktiven Märkten vertrieben (Ainsworth, 2005). In der Richtlinie zur Zulassung von biologisch hergestellten Generika (CHMP/437/04) der Europäischen Arzneimittelagentur wurden die regulatorischen Fragen bezüglich der Zulassungsbedingungen für Biogenerika in Europa geklärt. Im April 2006 wurden mit Valtropin[®] (Biopartners, Schweiz) und Omnitrope[®] (Sandoz GmbH, Schweiz) die ersten generischen, in *E. coli* hergestellten Wachstumshormonpräparate in Europa zugelassen. Zur erfolgreichen Markterschließung müssen Biogenerika niedrigere Abgabepreise als die etablierten Produkte bei identischer Qualität erreichen. Damit kommt unter anderem der Verringerung der relativ hohen Herstellungskosten durch Prozessoptimierung eine besondere Bedeutung zu. Die etablierten Hersteller werden letztlich versuchen müssen, durch modifizierte, verbesserte Produkte und neue biologische Entitäten – wie therapeutische Antikörper – ihre Marktposition zu behaupten (Walsh, 2000).

Den Ausgangspunkt zur Entdeckung des humanen Wachstumshormons (Synonyme: Somatotropin, somatotropes Hormon, STH; aber rekombinantes hGH: Somatotropin) machte ein Krankheitsbild, bei dem es überproduziert wird: die Akromegalie. Durch den Erfolg der Behandlung der Akromegalie durch eine Hypophysektomie ist seit einem Jahrhundert die Bedeutung der Hypophyse für das Wachstum bekannt. Schon 1932 wurde erfolglos versucht, mit bovinen Hypophysenextrakten wachstumsretardierte Kinder zu behandeln (Lindholm, 2006). Erst 1956 wurde das Wachstumshormon aus Hypophysenextrakten menschlicher Leichen isoliert und erfolgreich zur Behandlung des Minderwuchses benutzt (Raben *et al.*, 1958). Aufgrund des Auftretens der prionenvermittelten, neurodegenerativen Creutzfeld-Jakob-Krankheit in Folge dieser Behandlung und der hohen Kosten werden heute nur noch die seit 1985 zugelassenen, rekombinant hergestellten Produkte eingesetzt (Walsh, 2000).

Das humane Wachstumshormon ist ein in der Adenohypophyse gebildetes, speziesspezifisches Proteohormon. Im Blutserum wird zu 85 % ein 22125 Da großes Monomer gefunden, welches im Folgenden als 22 kDa-Variante bezeichnet wird. Es treten diverse Varianten des humanen Wachstumshormons auf, die spezialisierte Wirkungen zeigen (Lewis *et al.*, 2000). Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums gibt es neben der Behandlung von Wachstumsstörungen viele weitere Indikationen.

Im Vergleich zu den häufig zur Produktion von Biopharmazeutika eingesetzten Fed-Batch-Prozessen erreichen Perfusionen Prozesse eine höhere Produktivität. Ein Ziel in der Entwicklung von Perfusionenprozessen ist die Steigerung der Zelldichte und Reduktion der Verdünnungsrate zur Erhöhung der im Vergleich zum Fed-Batch geringen Produktkonzentration. Zu diesem Zweck kann unter anderem in einer „push to low“-Strategie eine Mediumsoptimierung während eines Prozesses vorgenommen werden (Konstantinov *et al.*, 2006). Die Absenkung der zellspezifischen Verdünnungs- oder Perfuionsrate kann auch durch verringerte Kultivierungstemperaturen bewirkt werden (Angepat *et al.*, 2005). Dabei sind neben der Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten die spezifische Produktbildungsrate und die Produktqualität zentrale Parameter, die eine Reduktion der Verdünnungsrate begrenzen können (Chuppa *et al.*, 1997). In Perfusionenprozessen müssen die Zellen durch ein internes oder externes Zellrückhaltesystem am Verlassen des Kultursystems gehindert werden. Zu diesem Zweck wurden auf verschiedenen Mechanismen beruhende Systeme wie Spinfilter und Hydrozyklone entwickelt. Plattensedimenter sind besonders langzeitstabile und gut skalierbare Zellrückhaltesysteme (Voisard *et al.*, 2003). Durch die Durchmesser- und Dichtedifferenz toter und lebender Zellen kann zudem eine selektive Anreicherung lebender Zellen erreicht werden (Searles *et al.*, 1994). Die Regelung der Zellentnahme ist für Perfusionenprozesse, die im Gegensatz zu einem Chemostat nicht-limitierend betrieben werden, ein zentraler Aspekt. Es kann unterschieden werden zwischen direkten Parametern, wie der Regelung der Zelldichte oder Trübung (Wu *et al.*, 1995, Ulber *et al.*, 2003), und indirekten Parametern, wie der Regelung von Substratkonzentrationen (Dowd *et al.*, 2001). Zudem kann zwischen Verfahren unterschieden werden, die Probenahmen aus dem Bioreaktor erfordern und solchen, die nicht-invasiv sind (Konstantinov *et al.*, 1994).

Die Produktaufreinigung trägt mit bis zu 80 % zum größten Teil der Prozesskosten in der Herstellung von Biopharmazeutika bei (Datar *et al.*, 1993). Neben der Anzahl der notwendigen Aufreinigungsschritte und deren Ausbeuten (Werner, 1998) ist insbesondere die Primär-

aufreinigung ein kritischer Verfahrensschritt (Hubbuch *et al.*, 2005). Vor der Primäraufreinigung in der Festbettchromatographie muss eine Zellabtrennung durch Zentrifugation oder Tiefenfiltration, häufig gefolgt von einer Membranfiltration zur Eliminierung von Partikeln, durchgeführt werden. Zur Aufkonzentrierung der Probe vor den chromatographischen Schritten und zur Absenkung der Leitfähigkeit wird im Anschluss häufig eine Ultra-/ Diafiltration vorgenommen. Durch den Einsatz der Fließbettchromatographie kann auf eine Zellabtrennung verzichtet werden (Chase, 1994) und ein salztolerantes Chromatographiematerial ermöglicht eine Primäraufreinigung unter physiologischen Salzkonzentrationen (Li *et al.*, 2006). Damit kann die Anzahl der Prozessschritte und somit der Kosten- und Zeitaufwand reduziert werden.

1.2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines ökonomisch wettbewerbsfähigen Herstellungsverfahrens für rekombinantes humanes Wachstumshormon mit einer CHO-Zelllinie.

Zur Senkung der Investitionskosten und der Maximierung der Produktivität sollte die Produktion in einer kontinuierlichen Perfusionskultur erfolgen. Als Zellrückhaltesystem wurde ein als langzeitstabil und robust geltender externer Plattensedimenter eingesetzt, dessen Betriebsparameter optimiert werden mussten. Auch der zur Regelung der Zellentnahme eingesetzte Oxystat musste auf seine Eignung zum Betrieb eines reproduzierbaren und robusten Prozesses hin untersucht werden. Dabei sollte eine Charakterisierung des Expressionssystems bezüglich den Mediumsanforderungen und Produktbildungsraten erfolgen. In einem Teilprojekt wurde außerdem ein Fed-Batch-Prozess entwickelt.

Zusätzlich zum Perfusionsprozess war eine effiziente Aufreinigungsstrategie zu entwickeln. Für die Primäraufreinigung des Perfundats aus dem Perfusionsprozess sollte unter Vermeidung einer Zellabtrennung eine Fließbettchromatographie eingesetzt werden. Dabei stand ein salztoleranter, multimodaler Ligand zur Primäraufreinigung zur Verfügung, der verschiedene, zu charakterisierende Bindemodi erlaubte. Zur Erreichung der vorgeschriebene Produktreinheit und -qualität musste eine Sequenz weiterer chromatographischer Aufreinigungsschritte entwickelt werden.

Zur Beurteilung der Produktqualität bezüglich der Desamidierung und Dimerisierung des Produkts und Verunreinigungen durch DNA und Wirtszellprotein musste eine an die Pharmakopö angelehnte Analytik etabliert werden.

1.3. Charakteristika des humanen Wachstumshormons

Der 48 kB große Wachstumshormon-Gencluster ist ein Modellbeispiel für Evolution durch Genduplikation (Jones *et al.*, 1995). Er codiert für fünf hoch konservierte Gene und liegt auf dem Chromosom 17q22-24, wobei jedes Gen über eine stromaufwärts gelegene, gewebsspezifisch hyperacetylierte, *locus control region* (LCR) reguliert wird (Elefant *et al.*, 2000); zusammen mit der LCR ist der Gencluster 65 kB groß (Mullis, 2005). Nachfolgend werden das hGH-N (Normal, Synonym: GH1)-Gen und seine Produkte diskutiert, die aufgrund der hGH-N-LCR in somatotrophen und somatolactotrophen Zellen der Adenohypophyse exprimiert werden.

Das hGH-N-Gen wurde 1979 in *E. coli* kloniert (Goeddel *et al.*, 1979), 1981 sequenziert und hat 5 Exons sowie 4 Introns (DeNoto *et al.*, 1981). Das Primärtranskript codiert für 217 Aminosäuren, wobei die 26 N-terminalen Aminosäuren ein bei der Sekretion deletiertes Signalpeptid sind. Die 22 kDa-hGH-N-Variante besteht aus 191 Aminosäuren und ist einkettig. Sie weist zwei Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 53 und 165, sowie zwischen 182 und 189 auf, durch welche der große und kleine *Loop* ausgebildet werden (Brems *et al.*, 1990). Das Peptid ist in der Kernstruktur in vier antiparallelen Alpha-Helices in *up-up-down-down*-Konfiguration angeordnet. Der Carboxyterminus ist über die Disulfidbrücke des kleinen *Loops* an Helix 4 gebunden und die acht Aminosäuren des Aminoterminus sind variabel (Abbildung 1). Drei weitere kurze Helices stabilisieren die Kernstruktur (de Vos *et al.*, 1992). Der isoelektrische Punkt der 22 kDa-Variante liegt bei pH 5,27. Im Blutserum werden im täglichen Mittel 2,4 ng/mL der 22 kDa-Variante gemessen (Ishikawa *et al.*, 1999); dies entspricht zwischen 75 und 90 % des Gesamtwachstumshormons.

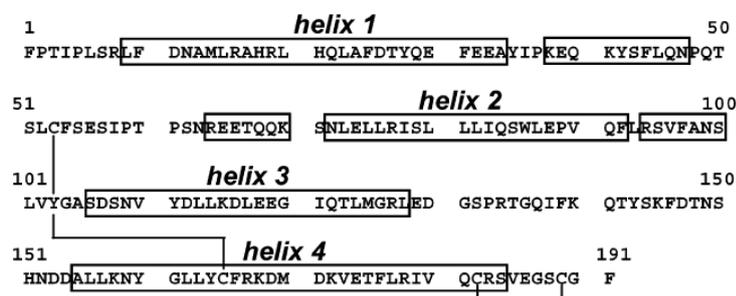


Abbildung 1: Aminosäuresequenz der 22 kDa-Variante des humanen Wachstumshormons, sowie Positionen der Helices und Disulfidbrücken (Spolaore *et al.*, 2004).

Neben der 22 kDa-Variante wird *in-vivo*, und auch von der in dieser Arbeit eingesetzten CHO-Zelllinie, eine kleinere Wachstumshormonvariante exprimiert. Bei der 20 kDa-Variante werden 45 Nukleotide der prä-mRNA der 22 kDa-Variante durch alternatives Spleißen des

Exon 3 entfernt (Wallis, 1980). Dieser Variante fehlen daher 15 Aminosäuren von Position 32 bis 46 der 22 kDa-Variante und damit auch die erste Minihelix (Spolaore *et al.*, 2004, Uchida *et al.*, 1997). Durch den Verlust saurer Aminosäuren liegt der isoelektrische Punkt dieser Variante bei pH 5,39. Im Blutserum von Kindern werden im täglichen Mittel männlicher und weiblicher Probanden ca. 0,141 ng/mL der 20 kDa-Variante, entsprechend 6 %, gefunden (Ishikawa *et al.*, 1999). In Adenohypophysenextrakten ist dieser Anteil mit 9 % etwas höher (Estes *et al.*, 1990). Durch Messung unphysiologisch hoher relativer Konzentrationen der 22 kDa-Variante im Vergleich zur 20 kDa-Variante kann die unerlaubte Einnahme rekombinanten Wachstumshormons zur Leistungssteigerung bis zu 36 Stunden später nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 1999).

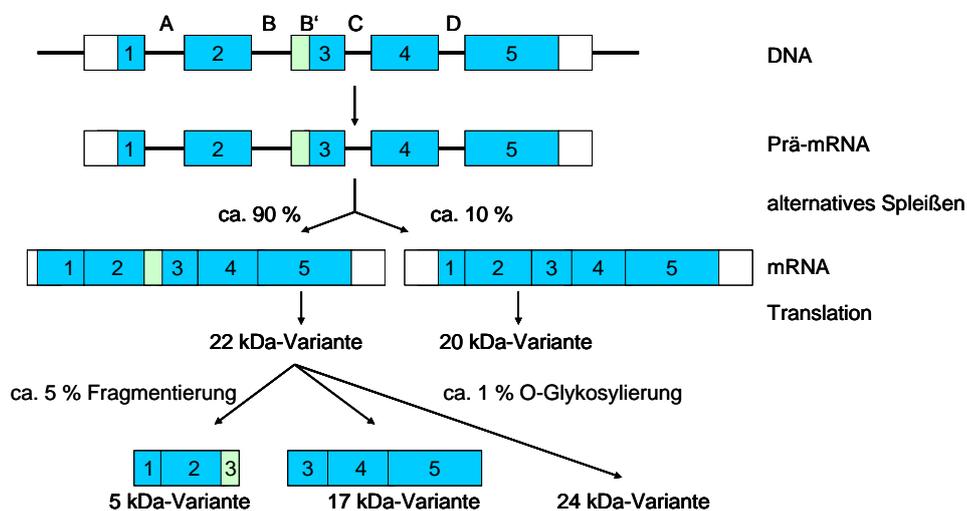


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Intron-/ Extronstruktur des hGH-N-Gens mit Syntheseweg der zwei Hauptgenprodukte, sowie dreier in geringen Konzentrationen auftretender Modifikationsformen.

Zu etwa 5 % treten Fragmente der 22 kDa-Variante auf (Abbildung 2). Ein 17 kDa großes, carboxyterminales Fragment der 22 kDa-Variante entsteht unter Abspaltung des Aminoterminus bis zur Aminosäure 43 (theoretischer pI 5,01). Das kleinere 5 kDa große Fragment entspricht dem Aminoterminus der 22 kDa-Variante (Aminosäuren 1-43, theoretischer pI 6,02) und entsteht vermutlich simultan mit dem 17 kDa-Fragment (Rowlinson *et al.*, 1996). *In-vitro* lassen sich bei pH 4,0 mit Pepsin ähnliche Fragmente herstellen, die die Aminosäuren 1-44 und 45-191 umfassen. Im Unterschied zu bovinem und porcinem Wachstumshormon bleibt die Tertiärstruktur bei niedrigem pH-Wert erhalten.

Zu weniger als 1 % tritt in Hypophysenextrakten eine O-glycosylierte 22 kDa-Variante auf, deren Molmasse 24 kDa beträgt (Haro *et al.*, 1996) und deren Bedeutung nicht bekannt ist. N-

glykosylierte Varianten treten aufgrund des Fehlens der Asn-X-Ser/Thr-Konsensussequenz nicht auf.

Bis zu 30 % des Wachstumshormons im Serum liegt als Dimer oder Multimer vor (Bidlemaier *et al.*, 2000); am häufigsten ist ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer der 22 kDa-Variante. Dieses hat eine geringere biologische Aktivität (Becker *et al.*, 1987). Außerdem wurden über Disulfidbrücken verbundene Homodimere der 22 kDa-Variante beschrieben (Lewis *et al.*, 1977). Es treten auch Heteromultimere der verschiedenen Varianten bis hin zu Pentameren auf. Größere Aggregate weisen eine verminderte Aktivität auf und sind immunogen (Zamiri und Groves, 2005). Die desamidierten und oxydierten Varianten (Pearlman und Bewely, 1993) werden im Methodenteil behandelt.

1.4. Physiologie des humanen Wachstumshormons

Die Bildung des humanen Wachstumshormons erfolgt in der Hypophyse, die über das Infundibulum mit dem Hypothalamus verbunden ist (Abbildung 3) und mit diesem eine morphologische und funktionelle Einheit darstellt (Hildebrandt, 1998). Die Hypophyse kann als das hormonale Ausführungsorgan des Hypothalamus angesehen werden und besteht aus zwei Teilen: der ventralen Adenohypophyse und der dorsalen Neurohypophyse. Neben dem hGH werden in der Adenohypophyse weitere Proteohormone gebildet. Davon weist Prolactin eine Sequenzhomologie von 85 % zum hGH auf (Kossiokoff *et al.*, 1994), wird auch von den azidophilen Zellen der Adenohypophyse sekretiert und hat ebenfalls direkte Effektorfunktionen (Mutschler, 2001). Geringe Mengen des Wachstumshormons werden nach T-Zell-Stimulation von mononukleären Zellen des Immunsystems produziert (Varma *et al.*, 1993).

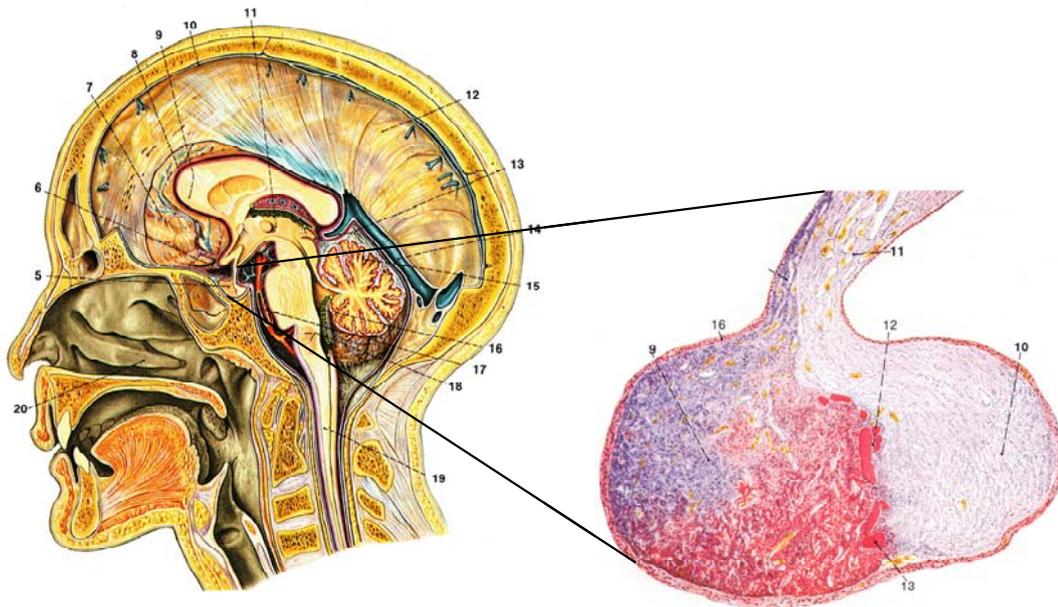


Abbildung 3: Der linke Bildanteil zeigt die anatomische Lokalisation der Hypophyse über dem Rachen-
dach und unter dem Hypothalamus (in der Abbildung: 5). Rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung der
Hirnanhangsdrüse gezeigt, wobei die ventral lokalisierte Adenohypophyse mit der Nr. 9 bezeichnet ist
(Lippert, 1995).

1.4.1. Pharmakodynamik

Das von den somatotrophen Zellen gebildete Wachstumshormon wird mit Zink komplexiert (Crommelin und Sindelar, 2002) unter sauren Bedingungen in Granulae gespeichert (Weisz, 2003). Die Sekretion wird durch das im Hypothalamus gebildete Neuropeptid Somatoliberin (engl. *growth hormone releasing hormone*, GRH) initiiert (Silbernagel und Despopoulos, 1991). Bekannte Sekretionsstimuli für die Freisetzung sind eine Hypoglykämie, eine hohe Plasmaamino­säurekonzentration und eine Catecholaminausschüttung in Folge von Stress (Mutschler, 2001). Antagonistisch wirkt das ebenfalls im Hypothalamus gebildete Neuropeptid Somatostatin (Synonym, engl.: *growth hormone releasing hormone inhibiting hormone*, GIH), das parakrin die Insulinfreisetzung hemmt (Silbernagel und Despopoulos, 1991). Zusätzlich zu diesen Regulatoren wirkt hGH selbst auf die somatotrophen Zellen sekretionshemmend: durch Gabe von exogenem hGH kann die endogene Freisetzung inhibiert werden (Hashimoto *et al.*, 2000). Weitere Antagonisten sind IGF-1 (engl. *insulin like growth factor*, Synonym: Somatomedin C) und die nach der hGH-Sekretion erhöhte Plasmaglukosekonzentration (Abbildung 5). Auf akuten Stress in Folge körperlicher Belastung wird das hGH freigesetzt und dann die hGH-Varianten verschieden schnell eliminiert. Eine Regulation der Freisetzung der relativen Anteile der Varianten liegt nicht vor (Wallace *et al.*, 2001). Die Abbildung 4 zeigt die drei bis vier Stunden nach Mahlzeiten ansteigenden Serumwachstums-

hormonkonzentrationen bei gesunden Erwachsenen. Bei Kindern und Heranwachsenden erfolgt die hGH-Ausschüttung primär nachts (Giustina und Veldhuis, 1998). Nach Abschluss des Längenwachstums nimmt die hGH-Ausschüttung um 10 bis 15 % je Lebensjahrzehnt ab (Crommelin und Sindelar, 2002).

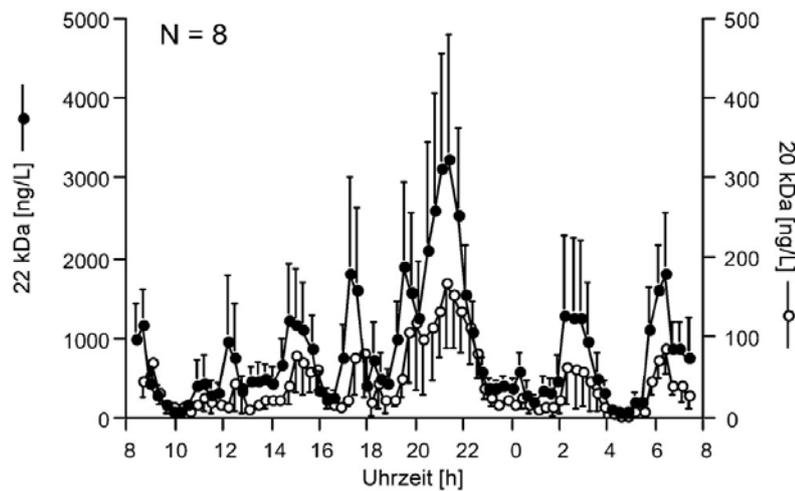


Abbildung 4: Der mittlere Serumkonzentrationsverlauf von hGH mit Standardabweichungen acht gesunder Erwachsener zeigt die pulsatile Ausschüttung der beiden Hauptvarianten des humanen Wachstumshormons (Leung *et al.*, 2002).

Neben Insulin gilt das humane Wachstumshormon als das wichtigste anabol wirkende Hormon. Bemerkenswert ist die partielle Redundanz im Wirkungsprofil beider Peptidhormone. Über die verschiedenen hGH-Varianten und den glandotropen Mediator IGF-1 werden aber auch zum Insulin antagonistische Wirkungen vermittelt.

Die 22 kDa-Variante hat ein großes Wirkungsspektrum: Die Muskel-, Knorpel- und Knochenbildung wird durch hGH-Rezeptoren in diesen Geweben angeregt. Eine anti-insulinerge Wirkung wird durch die Hemmung der Signaltransduktion des Insulinrezeptors vermittelt. Da gleichzeitig die Plasmaglukosekonzentration steigt und eine Insulinsekretion induziert wird, liegt eine diabetogene Wirkung vor (Dingermann, 1999). Weiterhin wird die Konzentration freier Fettsäuren im Serum durch Steigerung der Lipolyse in Fettgewebe erhöht. Die glandotropen Wirkungen werden durch IGF-1 vermittelt (s.u.).

Die 20 kDa-Variante führt mit einer etwas geringeren Potenz als die 22 kDa-Variante zur Ausschüttung von IGF-1, zur Zunahme der Schlankkörpermasse, zu einem Längenwachstum in hypophysectomierten Ratten, zur Glucosefreisetzung (diabetogener Effekt) und zu einem gesteigerten Anabolismus in Knochen- und Knorpelgewebe. In Abweichung zur 22 kDa-

Variante ist die Glucoseoxidation auf ein Fünftel reduziert, die insulinerge Wirkung ist also stark abgeschwächt (Kostyo *et al.*, 1987).

Die 17 kDa-Variante zeigte in Zellkultur- und Tierversuchen eine anti-insulinerge Wirkung: durch Insulingabe konnte die Plasmaglukosekonzentration nicht mehr abgesenkt werden (Lewis *et al.*, 2000). Das 5 kDa-Fragment verstärkt die durch Insulin vermittelte Glucoseoxidation und verursacht somit einen Teil der insulinergen Funktion des hGH (López-Guajardo *et al.*, 1998). Aufgrund des abweichenden Wirkungsspektrums der 5 und 17 kDa großen Fragmente der 22 kDa-Variante kann es als Prohormon angesehen werden.

Als Erfolgsorgan der glandotropen Wirkung des hGH ist die Leber hervorzuheben, in der autokrin und parakrin die Synthese von Somatomedinen induziert wird. Eines der wichtigsten Somatomedine ist der eine Reihe weiterer Wirkungen vermittelnde IGF-1: Steigerung der glomerulären Filtration, Regelung der Insulinbildung und -ausschüttung, Steigerung des Längenwachstums der Knochen, Regelung der Glucagon- und Thyroidhormonausschüttung, Modulation der Reproduktion und Regulation der Lymphozyten. Diese Beziehung wird als hGH/IGF-1-Achse bezeichnet.

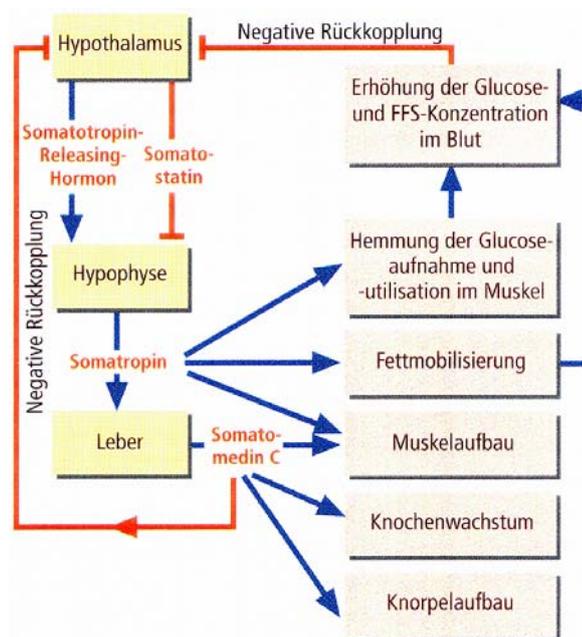


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen, sowie einiger Wirkungen des humanen Wachstumshormons (Mutschler, 2001).

Die 22 kDa-Variante ist im Serum zu 20 bis 40 % an das hochaffine/geringkapazitative Wachstumshormon-bindende-Protein (engl. *growth hormone binding protein*, GHBP) gebunden (Abbildung 6). Dies kann die Konzentrationsbestimmung im Serum stark beeinträchtigen (Laursen, 2004). Das GHBP entsteht durch Proteolyse der extrazellulären Domäne des hepati-

schen Wachstumshormonrezeptors (engl. *growth hormone receptor*, GHR; Harvey und Hull, 1995). Die 20 kDa-Variante wird vom niederaffinen/hochkapazitiven GHBP transportiert (Baumann *et al.*, 1986) und neigt stärker als die 22 kDa-Variante zur Heterodimerisierung (Chapman *et al.*, 1981).

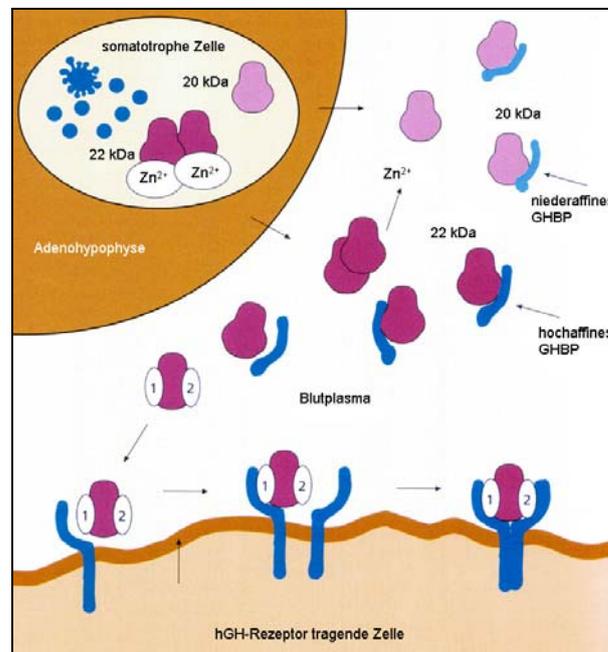


Abbildung 6: Pharmakodynamik von hGH (modifiziert aus Crommelin und Sindelar, 2002).

Das 22 kDa-hGH führt über seine in Helix 4 und Helix 1 lokalisierten Bindedomänen 1 beziehungsweise 2 zu einer Homodimerisierung des 100 kDa großen hGH-Rezeptors (Wells *et al.*, 1993). Die Bindung an das erste Rezeptormolekül erfolgt über die hochaffine Bindedomäne 1; erst dann kann der zweite GHR gebunden werden. Dieser sequentielle Mechanismus konnte auch für die 20 kDa-Variante gefunden werden, wenngleich die Bindedomäne 1 hier niederaffin zum GHR ist (Tsunekawa *et al.*, 2000). Intrazellulär sind mehrere Signaltransduktionskaskaden bekannt: Zum einen werden durch die Rezeptordimerisierung rezeptorassoziierte JAK2-Tyrosinkinasen dimerisiert und autophosphoryliert (Alberts *et al.*, 2002). Dadurch können wiederum STAT1, -3 und -5 phosphoryliert werden, woraufhin diese dimerisieren und in den Nukleus transloziert werden, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren (Rojas-Gil *et al.*, 2006). Eine weitere Signaltransduktionskaskade aktiviert über Ras/Raf/ERK/MAP die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und c-myc.

Die Speziesspezifität des Wachstumshormons resultiert aus einer differentiellen Evolution des GHR. So ist das humane Wachstumshormon in den meisten anderen Spezies physiolo-

gisch effektiv, aber nur Wachstumshormon höherer Primaten beim Menschen aktiv (Yi *et al.*, 2002).

Neben dem GHR werden auch zwei Prolactin-Rezeptoren (PRLR) von einem hGH-Molekül sequentiell dimerisiert. Somit vermittelt das hGH, wie das Prolactin, eine lactogene Wirkung; umgekehrt bindet Prolactin nicht an den GHR (Kossiakoff *et al.*, 1994). Die Vermittlung eines wachstumsfördernden Effekts über den Prolaktin-Rezeptor von Nb2-Zellen kann für *in-vitro*-Tests zur Wirksamkeitsbestimmung von rhGH eingesetzt werden (Tanaka *et al.*, 1980, Horseman, 1995). Die Potenz der 20 kDa-Variante zur Dimerisierung des PRLR ist bei vergleichbarer agonistischer GHR-vermittelter Wirkung geringer als bei der 22 kDa-Variante. Dies macht die 20 kDa-Variante als Medikament interessant, da die Gefahr der Bildung von Mammacarcinomen geringer ist (Tsunekawa *et al.*, 1999). Ein weiterer Vorteil der 20 kDa-Variante ist die fehlende diabetogene Wirkung.

1.4.2. Pharmakokinetik und Metabolisierung

Pit-hGH (Kapitel 1.6.1) wurde in der Regel drei Mal wöchentlich, mit einer Gesamtwirkstoffmenge von 0,1 mg/kg Körpergewicht, intramuskulär injiziert. Dies ist schmerzhaft und führte häufig zu Hämatomen und damit zu einer geringen *Compliance* der Patienten. Daher wird seit Mitte der 80er Jahre eine Applikation in die Subkutis des Abdomens, den Bereich über dem *Musculus deltoideus* oder des Oberschenkels bevorzugt, wobei aufgrund der besseren Wirkung tägliche Injektionen vorteilhaft sind (Albertsson-Wikiland *et al.*, 1986). Da die Elimination während des Schlafs verlangsamt ist, wird nach abendlicher Gabe eine höhere Halbwertszeit erreicht (Laursen, 2004). Abbildung 7 verdeutlicht die schnelle Elimination von Humatrope[®] bei intravenöser Gabe im Vergleich zu den anderen Applikationswegen. Die Plasmahalbwertszeit beträgt bei intravasaler Applikation lediglich 8 Minuten für das freie Protein und 31 Minuten für den hGH·hGHBP-Komplex (Crommelin und Sindelar, 2002, Laursen, 2004). Die Elimination erfolgt primär renal durch glomeruläre Filtration (Haffner *et al.*, 1994), wodurch die längere Plasmahalbwertszeit für hGH·hGHBP erklärt ist. Die metabolische Plasmaclearance ist bei Niereninsuffizienz um bis zu 75 % und bei Leberinsuffizienz um bis zu 30 % verringert, woraus auf eine zusätzliche hepatische Elimination geschlossen werden kann (Crommelin und Sindelar, 2002). Bei intramuskulärer und subkutaner bolusartiger Applikation wird die maximale Plasmakonzentration erst nach vier bis sechs Stunden erreicht (Jørgensen *et al.*, 1991), wobei aufgrund der Absorptionslimitation die Eliminationshalbwertszeit auf zwei bis sechs Stunden ansteigt. Die Bioverfügbarkeit der intramuskulären

Applikation ist mit bis zu 80 % deutlich höher als bei subkutaner Applikation mit etwa 60 % (Laursen, 2004).

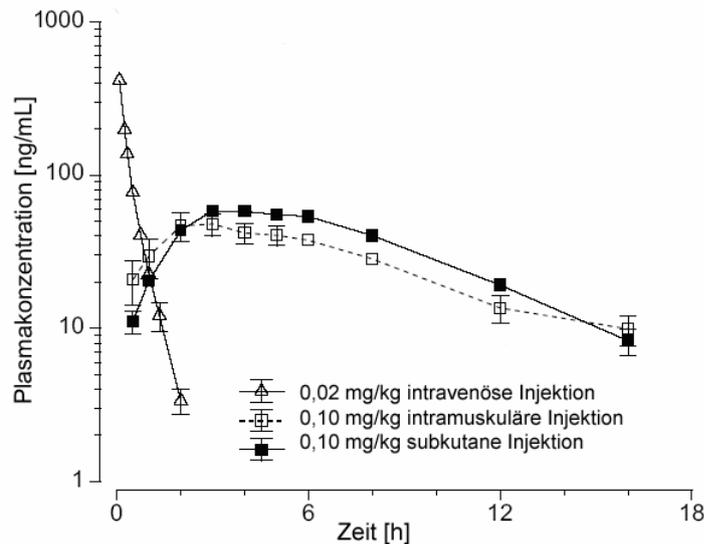


Abbildung 7: Pharmakokinetik von Humatrope® bei verschiedenen Applikationswegen in jeweils acht Erwachsenen ohne Wachstumshormondefizienz (Eli Lilly, 2003, modifiziert).

1.5. Anwendung des humanen Wachstumshormons in der Klinik

Die klassische Indikation für das humane Wachstumshormon ist die Therapie des Minderwuchses. Ein Minderwuchs ist gegeben, wenn die Größe des Kindes unter der 3. Perzentile der Wachstumskurve liegt. Da die hGH-Konzentrationen für einen direkten Nachweis aufgrund der pulsatilen Ausschüttung meistens zu niedrig sind, kann zur Diagnostik über Insulingabe eine Hypoglykämie induziert werden oder direkt über GHR-Gabe die hGH-Ausschüttung stimuliert werden. Dabei treten beim gesunden Kind Konzentrationen von bis zu 10 ng/mL auf. Außerdem kann die relativ konstante IGF-1-Konzentration bestimmt werden oder ein hGH-Nachtprofil erstellt werden (Flasnoecker *et al.*, 1999).

Eine Therapie erfolgt aufgrund der hohen Kosten nur, wenn das Kind die 25er Perzentile der Wachstumskurve unterschreitet. Ohne Therapie werden Endgrößen bei Frauen von unter 140 cm und bei Männern von unter 150 cm erreicht. Bei der Therapie der im Anschluss erläuterten verschiedenen Formen des Minderwuchses kann je Behandlungsjahr ein mittlerer Körperlängenzuwachs von 1,0 bis 1,5 cm erreicht werden. Die Verzögerung des Epiphysenschlusses mit Medikamenten wie Tamoxifen und Aromatase-Inhibitoren kann in der Zukunft eine Alternative zu rekombinanten Wachstumshormonpräparaten werden (Allen, 2006).

Für den Minderwuchs gibt es verschiedene Ursachen, zu denen der familiäre Minderwuchs und die häufig auftretende konstitutionelle Entwicklungsverzögerung zählen. Der sekundäre Minderwuchs kann ernährungsbedingt sein, durch Grunderkrankungen wie Mukoviszidose oder chronische Niereninsuffizienz ausgelöst werden und aufgrund von psychosozialen Stress induziert werden (Emminger *et al.*, 2004, Vimalachandra *et al.*, 2006).

Eine chromosomale Aberration ist die Ursache für das Ulrich-Turner-Syndrom. Dieses hat eine hohe Inzidenz von 1:2500 bis 1:5000 Lebendgeburten pro Jahr, ist nicht erblich und betrifft ausschließlich Mädchen (Böcker *et al.*, 2000). Zur symptomatischen Therapie des Minderwuchses wird das humane Wachstumshormon eingesetzt. Es wird abends in einer Dosierung von 1,3 mg rhGH/m² Körperoberfläche subkutan verabreicht.

Eine bei 7 von 100000 Geburten auftretende erbliche Deletion im Chromosom 15 ist die Hauptursache für das Prader-Willi-Syndrom, zu dessen Behandlung rekombinantes humanes Wachstumshormon ebenfalls zugelassen ist. Im Vordergrund steht dabei die symptomatische Therapie des Minderwuchses, der Adipositas und der Muskelhypotonie mit Somatropin (Harnak und Koletzko, 1997). Es wird in einer Dosierung von 1,0 mg rhGH/m² Körperoberfläche eingesetzt.

Der endokrine Minderwuchs wird von Wachstumshormonmangel verursacht und kann verschiedene Ursachen haben. Der häufige idiopathische Minderwuchs kann nicht anatomisch oder heride korreliert werden. Der seltene hypophysäre Minderwuchs tritt als Folge des Panhypopituitarismus mit einer Häufigkeit von 2-20:100000 auf. Die Erkrankung geht mit einem vollständigen Ausfall der Adenohypophyse einher und kann vielfältige Ursachen haben: Hypophysentumoren, anatomische Fehlbildungen, Entzündungen und Durchblutungsstörungen. Zur Therapie des Minderwuchses werden bis zum Erreichen der Endgröße abendlich 0,7 bis 1 mg rhGH/m² Körperoberfläche subkutan gespritzt (Flasnoecker *et al.*, 1999).

Das humane Wachstumshormon wird nicht nur zur Behandlung des Minderwuchses, sondern aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums für viele weitere Indikationen eingesetzt. Das HIV-wasting-Syndrom tritt in Folge von Hypophysenadenomen als Begleitsymptomatik von AIDS auf. Es ähnelt einer Kachexie in Folge chronischer Erkrankungen oder Mangelernährung (Flasnoecker *et al.*, 1999). Serostim[®] (Merck Serono) ist zum Aufbau der Schlankkörpermasse indiziert und wird in einer Dosierung von 0,1 mg rhGH/kg Körpergewicht täglich gegeben. Der Wirkstoff wird in tierischen Zellkulturen hergestellt.

Für die vorstehenden Erkrankungen ist rhGH als Wirkstoff in vielen Ländern bereits zugelassen. In der klinischen Forschung wird rhGH außerdem bei der Behandlung von Verbrennun-

gen, im Tiermodell bei Knochenfrakturen (Raschke *et al.*, 2001), Osteoporose (Longobardi *et al.*, 2000), kardiovaskulären Erkrankungen (Volterrani *et al.*, 2000), intrauterinem Minderwuchs und beim Kurzdarmsyndrom in Folge einer Dünndarmresektion eingesetzt (Flasnoecker *et al.*, 1999). Der klinischen Applikation setzen vor allem die hohen Kosten Grenzen. Neben den klinisch indizierten Applikationen ist das rhGH als Substanz zur Leistungssteigerung und als „*anti-aging*“-Substanz beliebt (Striegel *et al.*, 2006, Hintz, 2004, Jung *et al.*, 2002).

1.6. Wachstumshormonpräparate

1.6.1. Hypophysäres Wachstumshormon

Von 1958 bis 1985 wurde hGH aus Hypophysenextrakten (engl. *pituitary*-hGH) menschlicher Leichen als Wirkstoff eingesetzt (Swedloff *et al.*, 2003). 60 Hypophysen enthalten etwa ein Gramm hGH (Haro *et al.*, 1996), wobei ein Batch einige Tausend Hypophysen umfassen konnte. Aufgrund der Begrenztheit des Ausgangsmaterials wurde nur 0,1 mg hGH/kg Körpergewicht eingesetzt – ein Drittel der heute üblichen Menge (MacGillivray *et al.*, 1998). Histologische Hirnschnitte zur Absicherung der Qualität der Gehirne wurden nur selten durchgeführt. Außerdem war die Ätiologie der prionenvermittelten, neurodegenerativen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) unbekannt. Zur Aufreinigung des pit-hGH wurden diverse Methoden, wie die heiße Eisessigextraktion (Raben, 1958) und die milde alkalische Extraktion (Mills *et al.*, 1969), eingesetzt, wobei letztere sich als besonders ineffektiv erwies und die Behandelten ein normiertes Risiko von bis zu 5 % hatten, an CJD zu erkranken (Swerdlow *et al.*, 2003). Erst ab den späten 70er Jahren wurden die Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie (Eshkol, 2002) zur Reinigung benutzt und 8 M Harnstoff zur Inaktivierung von Prionen eingesetzt. Trotz verbesserter Aufreinigungsstrategien wurden 1985 wieder Neuerkrankungen jugendlicher Patienten an CJD nachgewiesen, woraufhin die Zulassung für pit-hGH von der FDA zurückgezogen wurde. Die minimale Inkubationszeit von CJD beträgt drei Jahre (Hildebrandt, 1998).

Der enorme Aufwand zur Gewinnung ausreichender Mengen an Wachstumshormon aus menschlichen Leichen – 400000 allein in Großbritannien – verursachte enorme Kosten und ermöglichte nur unzureichende individuelle Dosierungen. Das Risiko der Transmission von Humanpathogenen konnte nicht ausgeschlossen werden; von 1983 bis zum Jahr 2006 erkrankten mindestens 194 Menschen an pit-hGH-vermittelter CJD, wobei die Inzidenz sich

inzwischen abschwächt (Brown *et al.*, 2006). Die Transition der Gewinnung von Biopharmazeutika aus Mensch und Tier hin zur Produktion *in-vitro* mit rekombinanter Technologie wurde neben dem oben genannten Risiko der prionenvermittelten Erkrankungen auch durch das Auftreten von HIV und Hepatitis C bei bis zu 40 % der mit Gerinnungsfaktoren behandelten Patienten beschleunigt (Garber, 2000). Heute ist das humane Wachstumshormon eines der Produkte, die ökonomisch erfolgreich und für den Patienten sicher in mikrobiellen Expressionssystemen und in tierischen Zellkulturen hergestellt werden. Ein zusätzlicher großer Fortschritt für die Produktsicherheit war die Entwicklung serumfreier Kulturmedien und albuminfreier Produktformulierungen (Lubiniecki, 1998, Garber, 2000).

1.6.2. Produktion in bakteriellen Expressionssystemen

Die 22 kDa-Variante des rhGH wurde erstmals 1979 von Genentech in *E. coli* rekombinant hergestellt und ab 1982 in klinischen Studien untersucht. Die Marktzulassung unter dem Handelsnamen Protropin[®] erfolgte 1985. Das in *E. coli* produzierte rhGH der ersten Generation trug ein zusätzliches N-terminales Methionin (met-rhGH). Dies wirkte in einigen Fällen immunogen und verhinderte dann die Langzeittherapie des Minderwuchses mit diesem Präparat (Massa *et al.*, 1993).

Die Produkte der zweiten Generation, wie Humatrop[®] (Eli Lilly and Company, USA), werden mit N-terminalem Methionin exprimiert und liegen als *inclusion bodies* im Cytoplasma vor. Das Methionin wird mit Hilfe eines Fusionspeptids enzymatisch abgespalten. Die beiden Disulfidbrücken des reifen Wachstumshormons werden während der Renaturierung eingebracht (Dingermann, 1999).

Die Herstellung von Produkten der dritten Generation erfolgt als Fusionsprotein mit einem Signalpeptid zur Sekretion in das Periplasma in *E. coli*-K12 (z.B. Genotropin[®], Pfizer, USA). Im Periplasma wird das Fusionspeptid abgespalten, sowie die Disulfidbrücken und die Tertiärstruktur korrekt ausgebildet. Aus dem Periplasma wird das native Protein über osmotische Lyse oder Einfrieren bei -20 °C und anschließendes Auftauen isoliert. Für Genotropin ist folgende Aufreinigungssequenz beschrieben: 1. Konzentrierung der Kulturbrühe mit Tangentialflussfiltration, 2. Lyse der Zellen durch Einfrieren/Auftauen bei -20 °C, 3. Anionenaustauschchromatographie I, 4. Ammoniumsulfatpräzipitation, 5. Hydrophobe Interaktionschromatographie, 6. Anionenaustauschchromatographie II, 6. Anionenaustauschchromatographie III, 7. Gelfiltration (Dingermann, 1999).

Produkte der vierten Generation werden ebenfalls in *E. coli* hergestellt (z.B. Norditropin[®], Novo Nordisk A/S, Dänemark). In diesem Fall wird das so genannte AE-rhGH als Fusions-

protein hergestellt. Ein gentechnisch eingebrachtes N-terminales Tripeptid, bestehend aus Methionin, Alanin und Glutamat ($M^3A^2E^1$), hat zwei Effekte: Zum einen ist die Löslichkeit des MAE-rhGH im Cytoplasma erhöht und die Bildung von *inclusion bodies* wird vermieden. Zum anderen können E. coli-eigene Enzyme das Methionin an Position -3 abspalten, wodurch schon im Cytoplasma das Intermediat AE-rhGH entsteht. Dieses wird während der nachfolgend vorgestellten Aufreinigungssequenz durch Dipeptidylaminopeptidase I (DAP I) abgespalten: 1. Zellaufschluss, 2. Ionenaustauschchromatographie I, 3. Hydrophobe Interaktionschromatographie, 4. Ionenaustauschchromatographie II, 5. enzymatische Entfernung des Dipeptids AE mit DAP I, 6. Fällung am isoelektrischen Punkt, 7. Gelfiltration, 8. Ionenaustauschchromatographie III (Dingermann, 1999).

1.6.3. Produktion in Eukaryoten

Das humane Wachstumshormon der fünften Generation wird von Merck Serono, Schweiz, in Eukaryoten hergestellt. Es wurden seit 1989 mehrere Präparate für verschiedene Indikationen zugelassen: Saizen[®] (hGH-Defizienz), Serostim[®] (HIV-wasting-Syndrom, Lipodystrophie) und Zorbitive[®] (Kurzdarmsyndrom, in den USA). Die Produktion erfolgt mit der adhärennten murinen Zelllinie c127 in Rollerflaschen (Crommelin und Sindelar, 2002, Castilho und Medronho, 2002). Da das Produkt von den tierischen Zellen in der nativen Form in das Kulturmedium sekretiert wird, entfallen der Zellaufschluss und aufwändige Produktrenaturierungsschritte. Die Zellen wurden mit einem viralen Vektor mit einem hGH-Minigen transfiziert, das aus den 70 Bp des ersten Exons, den 250 Bp des ersten Introns und den 750 Bp der restlichen Exons besteht. Das Intron wurde vermutlich zur Steigerung der Genexpression in den Zellen belassen (Le Hir *et al.*, 2003). Durch alternatives Spleißen im Bereich des Exon 3 produzieren die c127-Zellen im Unterschied zu den prokaryotischen Expressionssystemen zu etwa 6 bis 9 % die 20 kDa-Variante des hGH. Die spezifische Produktbildungsrate erreicht Werte bis zu 22 pg/Zelle·d (Dingermann, 1999).

1.6.4. Neuartige Wachstumshormonpräparate

In den Kapiteln 1.4.1 und 1.5 wurde gezeigt, dass das humane Wachstumshormon ein großes Wirkungsspektrum aufweist. Durch geringere Abgabepreise könnten zusätzliche Indikationsfelder erschlossen werden. Eine Reduktion der biotechnologischen Herstellungskosten ist jedoch nicht das einzige Erfordernis.

So führte die hohe notwendige Applikationsfrequenz zur Entwicklung modifizierter Wachstumshormone. Durch Kopplung von Polyethylenglycol₅₀₀₀ an primäre Amine des rhGH konnte seine Plasmahalbwertszeit in Ratten erhöht werden. Ursächlich war hierfür eine verzögerte Adsorption nach subkutaner Gabe und eine verringerte renale *Clearance* (Clark *et al.*, 1996). Eine weitere Gruppe entwickelte eine nanoenkapsulierte Formulierung des Wachstumshormons mit Natriumhyaluronat, die durch einen Depoteffekt eine nur wöchentliche Applikation erfordert (Hahn *et al.*, 2004). Schon 1999 wurde das von Genentech entwickelte Retardpräparat Nutropin Depot[®] zugelassen, das aus rhGH/Polylactid-Coglycid-Mikropartikeln besteht und eine zweiwöchige Applikationsfrequenz erlaubt (Crommelin und Sindelar, 2002). Durch die Aufnahme des rhGH über die Nasenschleimhaut versuchte wiederum eine andere Gruppe die häufigen Injektionen vermeiden zu helfen. Zur Steigerung der Bioverfügbarkeit auf ca. 8 % wurde das rhGH als Mikropartikel mit Polycarbophil-Cystein und Glutathion formuliert. Durch die verlangsamte Absorption werden über einen längeren Zeitraum erhöhte Wachstumshormonkonzentrationen gehalten (Leitner *et al.*, 2004). Die Aggregationsneigung bei hohen rhGH-Konzentrationen wurde durch N- oder C-terminale Addition eines 22 Aminosäuren großen sauren ATS-Peptids (engl. *c-terminal acidic tail of synuclein*) minimiert. Dadurch wurde zudem die Renaturierung des in *E. coli* als *inclusion body* exprimierten Produkts erleichtert und die Plasmahalbwertszeit in der Ratte verdoppelt (Lee *et al.*, 2005).

1.7. Prozessführungsstrategien

Therapeutische Proteine werden aufgrund der einfachen Prozessführung häufig satzweise (engl. *Batch*) oder unter Zufütterung einiger oder aller Mediumskomponenten (engl. *Fed-Batch*) hergestellt (Chmiel *et al.*, 2006). Der Fed-Batch-Prozess ist die industriell am häufigsten eingesetzte Prozessführungsstrategie. Er vereint eine im Vergleich zum Batch deutlich höhere Produktivität mit einem nur moderat höheren apparativen Aufwand. Moderne Prozesse zur Produktion von Antikörpern erreichen Produktkonzentrationen von bis zu 5 g/L (Wurm, 2004). Eine Entwicklungsgruppe von Merck Serono konnte zeigen, dass die frühe vergleichende Untersuchung von Fed-Batch- und Perfusionsprozessen zur Auswahl der optimalen Prozessführungsstrategie essentiell ist (Meuwly *et al.*, 2005). Entsprechend wurde im Rahmen dieses Projekts die Entwicklung eines Fed-Batch-Prozesses durchgeführt (Northoff, 2006). In diesem konnte eine Mediumsoptimierung unter Verwendung von im Perfusionsprozess ermittelten Kulturoptima durchgeführt werden (Kapitel 3.2.6).

Perfusionsprozesse erreichen aufgrund der relativ geringen Rüstzeiten und der konstant hohen Zelldichten prinzipiell die höchste Produktivität (Voisard *et al.*, 2003). Daher kann unter ökonomischen Gesichtspunkten eine kontinuierliche Prozessführung vorteilhaft sein. Dem gegenüber steht der hohe apparative Aufwand, die Gefahr eines technischen Fehlers und von bakteriellen Kontaminationen. Außerdem werden geringere Produktkonzentrationen als im Fed-Batch erreicht, wodurch die Produktaufreinigung aufwändig und teuer wird. Perfusionsprozesse erlauben zudem einen konstanten Austrag eines labilen Produkts aus dem Prozess, wie es beim Herstellungsprozess für den rekombinanten Gerinnungsfaktor VIII von Bayer Healthcare der Fall ist (Chuppa *et al.*, 1997). Weitere Argumente für eine kontinuierliche Prozessführung sind die im Vergleich zum Fed-Batch konstanten, homöostatischen Kulturbedingungen und die geringe Verweilzeit des Produkts im Prozess, die eine bessere und homogenere Produktqualität erwarten lassen. Außerdem wird in Fed-Batch-Prozessen in der stationären Phase am Prozessende verstärkt Wirtszellprotein lysierender Zellen in das Medium abgegeben und die spätere Produktisolierung erschwert und gegebenenfalls die Produktqualität negativ beeinflusst. Im Jahr 2003 wurden Perfusionsprozesse tierischer Zelllinien zur Herstellung von acht verschiedenen Produkten eingesetzt, unter anderem für den immunmodulatorischen, therapeutischen Antikörper Infliximab (Remicade[®], Centocor/GBSC) und das modifizierte Protein C Drotrecogin Alpha (Xigris[®], Eli Lilly and Co.) zur Behandlung der Sepsis (Kompala und Ozturk, 2006).

1.8. Zellrückhaltesysteme

Wenn eine größere Verdünnungsrate als die spezifische Wachstumsrate der Zellen angestrebt wird, müssen die Zellen im Bioreaktor zurückgehalten werden, da ein Chemostat schon bei geringen Verdünnungsraten zu einem Auswaschen der Zellen führen würde. Zu diesem Zweck wurden auf verschiedenen Mechanismen beruhende Zellrückhaltesysteme entwickelt, von denen einige im Folgenden vorgestellt werden.

Das älteste interne Zellrückhaltesystem in der Zellkulturtechnik ist der koaxial zur Rührerwelle montierte Spinfilter (Himmelfarb *et al.*, 1969). Die zellabgereicherte Kulturbrühe wird bei diesem System durch ein Tauchrohr aus dem Spinfilterlumen abgepumpt. Die Zellen verlassen den Bioreaktor nicht und unterliegen daher keinen Änderungen der Kulturbedingungen. Obwohl die Porengröße des Filters in der Regel größer als der Zelldurchmesser ist, neigen Spinfilter zum Verblocken mit Zellen und Proteinen, wodurch die Prozessdauer in Abhängig-

keit von der Zellaggregationsneigung auf etwa vier Wochen beschränkt ist (Voisard *et al.*, 2003). Ein Spinfilter stört zudem die Durchmischung im Bioreaktor und bei Konstanthalten der spezifischen Filterfläche nimmt beim *scale-up* das nutzbare Reaktorvolumen ab. Dennoch wurden erfolgreich 500 L-Bioreaktoren mit einem internen Spinfilter betrieben (Woodside *et al.*, 1998). Spinfilter können auch extern betrieben werden, wodurch das Bioreaktorvolumen besser genutzt werden kann. Externe Spinfilter werden von Centocor/GBSC für den Remicade[®]-Herstellungsprozess eingesetzt, wobei der Spinfilter während eines Prozesses ausgetauscht werden kann (Myers, 2006). Andere auf Filtration beruhende Zellrückhaltesysteme sind Tangentialflussfilter, Hohlfasermodule und neuere Entwicklungen wie der *Rotating Disk Filter* (Castilho *et al.*, 2002).

Der Plattensedimenter (auch: Schrägrohrsedimenter) ist ein externes Zellrückhaltesystem, das auf dem Prinzip der Sedimentation beruht. Das Funktionsprinzip wird seit langem in der Abwasserklärung eingesetzt und wurde von Bayer Healthcare für den Herstellungsprozess des Gerinnungsfaktors VIII adaptiert (Henzler *et al.*, 2003). Die Durchmesserdiffferenz lebender und toter Zellen kann bei geeigneten Verweilzeiten im Sedimenter zur Separation führen (Batt *et al.*, 1990). Vorteilhaft an diesem System ist die gute Skalierbarkeit, das Fehlen von *Fouling*-Effekten und die mechanische und steriltechnische Simplizität (Woodside *et al.*, 1998). Allerdings verlassen die Zellen in einem externen Zellrückhaltesystem die geregelte Kulturumgebung des Bioreaktors, wobei je nach Auslegung mittlere Verweilzeiten außerhalb des Biorektors von über einer Stunde auftreten können (Searles *et al.*, 1994). Da die Parameter Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert nicht geregelt werden, wird zur Vermeidung einer Hypoxie die Zellsuspension beim Verlassen des Bioreaktors mindestens auf Raumtemperatur gekühlt. Eine Variante des Plattensedimenters mit Naturumlauf der Zellsuspension in Folge von Abkühlung wurde von Stevens 1994 beschrieben. Es gibt auch Untersuchungen zu vertikalen externen Sedimentern und internen Sedimentern (Castilho und Medronho, 2002), sowie zu externen Sedimentern mit horizontaler Durchströmung und verkürzten Zellverweilzeiten. Zur Reduktion der im Schrägrohrsedimenter auftretenden Zellkonzentrationen kann ein akustischer Abscheider oder ein Hydrozyklon vorgeschaltet werden (Henzler *et al.*, 2003).

Ein weiteres Zellrückhaltesystem stellen akustische Zellabscheider dar, die ebenfalls auf der Gravitation beruhen (Kilburn *et al.*, 1989). Zur verbesserten Separation wird hierbei durch stehende Schallwellen im Separator und gleichzeitig niedrige Temperaturen die Bildung von Zellaggregaten angeregt. Während periodischem Abschaltens des Feldes sedimentieren die

Zellaggregate aufgrund ihres großen Durchmessers schnell ab und können von der Kulturbrühe separiert werden (Dürschmidt *et al.*, 2003). Bei hohen Zelldichten und Perfusionsraten wird der notwendige hohe Leistungseintrag mit der resultierenden Erwärmung der Kulturbrühe problematisch. Für das *scale-up* wurde der parallele Einsatz mehrerer Abscheider erfolgreich untersucht (Gorenflo *et al.*, 2002). Ein Vorteil gegenüber den oben vorgestellten Plattensedimentern ist die geringe Verweilzeit der Zellen in akustischen Abscheidern (Woodside *et al.*, 1998).

Zur beschleunigten Sedimentation der Zellen werden auch kontinuierliche Zentrifugen und Tellerseparatoren zur Zellrückhaltung eingesetzt. Diese sind mechanisch und steriltechnisch anspruchsvoll und können zu einer Viabilitätsreduktion führen (Kompala und Ozturk, 2006).

2 Materialien und Methoden

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Zellkultur betreffende Materialien und Methoden vorgestellt. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Produktreinigung und der Dritte mit der Produktanalytik.

2.1 Produktion in Zellkulturen

2.1.1 Medium und Zelltyp

In den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturprozessen wurden, soweit nicht gesondert angegeben, die Medien MAM-PF[®]2 (Mammalian Artificial Media – Protein Free[®] 2; Bio-Concept, Allschwil, Schweiz) und ProCHO[®]5 (Cambrex Bio-Whittaker, Verviers, Belgien) in einer Mischung von 20:1 (v/v) eingesetzt. Die Medien waren protein- und phenolrotfrei, enthielten Pluronic-F68, sowie 25,4 mM Glucose und wurden vor Benutzung auf 4 mM Glutamin supplementiert. Das Medium von Cambrex war insulinhaltig und enthielt ein Sojabohnenhydrolysat. Nach dem Öffnen wurden die Mediumsflaschen kühl und dunkel gelagert und maximal vier Wochen benutzt. Die Zusammensetzung der Medien ist geheim.

Die CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie wurde von der Firma Cell Culture Service GmbH, Hamburg, als Kryokultur bezogen (Clone B3-A7-C8, Lot CS041025CG01, Passagenzahl 5, $5 \cdot 10^6$ Zellen). Die Kryokultur wurde aufgetaut und zur Entfernung des 10 %ig (v/v) eingesetzten Dimethylsulfoxids (Lindl, 2002) in warmem ProCHO[®]4 aufgenommen und nach Zentrifugation bei $110 \cdot g$ in eine T25-Flasche (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) mit 20 mL Kulturvolumen eingesät. Zur Bereitstellung einer *Working Cell Bank* (WCB) wurde die Kultur über T175-Flaschen bis zum 500 mL-Super-Spinner in ProCHO[®]4 als Vollmedium expandiert. Die Zellen wurden dann in Kryoröhrchen (Cryo S., Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) zu $1 \cdot 10^7$ Zellen in ProCHO[®]4 mit 10 % DMSO aliquotiert. Der Einfriervorgang erfolgte schrittweise bei -20 °C und -80 °C ; anschließend wurden die Kryokulturen in der Gasphase eines Stickstofftanks bei ca. -160 °C eingelagert (Biosafe 150, Messergroup GmbH, Griesheim). Die Passagenzahl der WCB betrug 10 und die Vorkulturen der Bioreaktorversuche hatten Passagenzahlen zwischen 14 und 20.

Die eingesetzte Zelllinie basierte auf einer Dihydrofolatreduktase (DHFR)-defizienten CHO-Zelllinie (ATCC, CRL-9096). Der Expressionsvektor pEF1 α -dhfr komplementierte die DHFR-Defizienz der transfizierten CHO-Zelle und erlaubte über hypoxanthin- und thymidinfreies Kulturmedium, sowie $1 \text{ }\mu\text{M}$ Methotrexat seine Stabilisierung und Amplifikation; der

Expressionsvektor wurde sequenziert. Die DHFR-Expression wurde durch den schwachen, frühen SV40-Promotor und das hGH-N-Gen über die starke Promotor-/Enhancersequenz des humanen Elongationsfaktors EF1 α reguliert. Zur Steigerung der spezifischen Produktbildungsrate wurde die fünf Exons und vier Introns enthaltende genomische DNA und nicht die cDNA der 22 kDa-Variante kloniert (LeHir *et al.*, 2003). Daher waren die Zellen in der Lage, durch alternatives Spleißen des Exons 3 die 20 kDa-Variante herzustellen. In den Vorkulturen für die in dieser Arbeit dargestellten Prozesse wurde auf den Einsatz von Methotrexat als Selektionsmarker verzichtet, da eigene Versuche und Daten der Cell Culture Service GmbH zeigten, dass die spezifischen Produktbildungsraten über mehrere Monate stabil waren.

Die Zelllinie wurde am Ende eines Perfusionsprozesses („*at the limit of in vitro age*“ gemäß ICH Q5A(R1), 2005) auf eine Kontamination durch endogene Retroviren getestet. Dazu wurden Kulturüberstände aus Bioreaktorprozessen mit einem Transmissionselektronenmikroskop auf das Vorhandensein von virusähnlichen Partikeln untersucht. Die Nachweisgrenze des Verfahrens wurde mit Nanosphere Latex-Beads bestimmt und betrug $5 \cdot 10^6$ virusähnliche Partikel/mL. Die Proben wurden durch eine Ultrazentrifugation 120-fach konzentriert und untersucht. Es wurden keine Partikel detektiert. In Betracht der Nachweisgrenze lag die Konzentration virusähnlicher Partikel unter $4,2 \cdot 10^4$ virusähnlichen Partikeln/mL (NewLab, Erkrath, Study No. NV2-U/B14/06).

Weiterhin wurde in einem *in-vitro*-Test das Vorhandensein von Viren untersucht. Virusinfektionen der Indikatorzelllinien Vero, MRC-5, CHO-K1 und A9 hätten aufgrund des cytopathischen Effekts zu beobachtbaren morphologischen Änderungen geführt. Zwei weitere Tests dienten nach Zugabe einer Erythrozytenlösung der Detektion hämadsorbierender oder hämagglutinierender Substanzen, die eine Virusexpression indizieren würden (WHO, 1998). Der zellfreie Kulturüberstand wurde in einem weiteren Test daraufhin untersucht, ob er durch Hämagglutination von Erythrozyten deren Sedimentationsgeschwindigkeit erniedrigte. Alle *in-vitro*-Tests waren negativ (NewLab, Study No. NV1/B14/06). Dezidierte *in-vivo*-Tests zur Virusfreiheit (WHO, 1998) wurden nicht durchgeführt, jedoch zeigten sich bei dem im Ergebnis teil dargestellten Tierversuch zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit keine Auffälligkeiten.

Die Mycoplasmenfreiheit der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie wurde durch eine spezifische PCR mit dem MycoSensorTM-PCR-Assay-Kit (Kat. Nr. 302108, Stratagene, La Jolla) überprüft (Daten nicht gezeigt).

2.1.2 Off-line-Analytik

2.1.2.1 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichtebestimmung wurde durch automatisierte Zählung im Cedex (Innovatis AG, Bielefeld) durchgeführt. Das System ist durch das Fehlen subjektiver Einflüsse bei der Zählung und ihrer Automatisierung im Vergleich zum Zählen mit der Neubauerzählkammer vorteilhaft. Zur Bestimmung der Viabilität wurde mit Trypanblau gefärbt, welches nur die Zellmembranen toter Zellen durchdringt (Tennant, 1964).

Die gefärbten Zellen wurden im Cedex mittels einer Mustererkennungssoftware gezählt, welche auch – mit Einschränkungen (Schomberg, 2003) – Aggregate identifiziert. Als Zellaggregate sind alle nicht vereinzelt vorliegenden Zellen definiert. Über die Helligkeitsverteilung unterschied das System zwischen lebenden und toten Zellen. Das Befüllen der Messzelle, die Auswertung und die Reinigung des Systems erfolgten automatisch. Bei der Messung wurden 1 mL einer im Probengefäß vorgelegten, gegebenenfalls mit CMF-PBS auf unter $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL verdünnten Probe im Gerät mit 1 mL einer 0,2 %igen Trypanblaulösung vermischt. Es wurden je 20 oder 30 Bilder ausgezählt und das Gesamtergebnis über das arithmetische Mittel berechnet. In einigen Prozessen wurde die Zellzählung doppelt durchgeführt (Gudermann *et al.*, 1997).

2.1.2.2 Ammoniumkonzentrationsbestimmung

Ammonium ist ein Produkt des Aminosäure- und speziell des Glutaminstoffwechsels, entsteht aber auch durch autolytischen Zerfall. Hohe Ammoniumkonzentrationen können insbesondere bei niedrigen pH-Werten wachstumshemmend wirken, wengleich für Hybridom-Zellen eine Adaptation an hohe Ammoniumkonzentrationen beschrieben wurde. Als Ursache der Wachstumshemmung nennen Ryll *et al.* (1993) eine Überproduktion der Nukleotidprekursoren UDP-N-Acetylgalactosamin und UDP-N-Acetylglucosamin. Bei Ammoniumkonzentrationen über 8 mM können die spezifische Produktbildungsrate und die spezifische Wachstumsrate abnehmen (Schneider *et al.*, 1996).

Zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Kulturmedium kann nach Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd eine photometrische Detektion erfolgen (Büntemeyer, 2000). Die Messung der Ammoniumkonzentration muss sofort nach der Probenahme durchgeführt werden, da Ammoniak bei den während des Einfriervorgangs auftretenden alkalischen pH-Werten ausgast. Der Kulturüberstand wurde nach der Probenahme durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 110-g zellbefreit. Zur Derivatisierung wurden in einer Halbmikroküvette (PMM, Plastibrand[®], Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) 20 μ L Überstand des Zentrifugats

mit 1,3 mL Derivatisierungsreagenz (250 mg ortho-Phthaldialdehyd (OPA) + 500 mg Thioglykolat in 2 mL Methanol; ad. 102 mL 0,4 M Natriumboratpuffer; pH 10,4) vermischt und in einem Fluoreszenzspektrometer (RF-551, Shimadzu, Kyoto, Japan) vermessen. Das Absorptionsmaximum des Isoindolderivats liegt bei 415 nm und das Emissionsmaximum bei 485 nm. Nach circa 75 Sekunden Reaktionsdauer wurde ein transientes Absorptionsmaximum des instabilen Derivats erreicht. Als Standard zur Konzentrationsbestimmung per Zwei-Punkt-Kalibrierung diente eine Ammoniumchlorid-Lösung mit einer Ammoniumkonzentration von 100 mg/L.

2.1.2.3 Aminosäurekonzentrationsbestimmung

Die Aminosäuren dienen primär als Nutrient. Durch ihren zwitterionischen Charakter fungieren sie zudem als Puffer gegen pH-Schwankungen. Zum Teil haben sie zellprotektive Wirkungen, insbesondere gegenüber hohen Ammoniumkonzentrationen, und sind für die effiziente Synthese rekombinanter Proteine notwendig (Chen et al., 2005). Es war zu untersuchen, ob einzelne Aminosäuren soweit verbraucht wurden, dass eine Limitierung auftrat. Dies wurde mittels Auftrennung der Aminosäuren in einer Umkehrphasen-HPLC (engl. *reversed phase-high performance liquid chromatography*) nach einer Vorsäulenderivatisierung mit OPA für folgende Aminosäuren untersucht (Lim, 1987): Aspartat, Glutamat, Serin, Asparagin, Glutamin, Glycin, Threonin, Arginin, Alanin, Tyrosin, Valin, Methionin, Tryptophan, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Lysin.

Die stationäre Phase war ein alkyliertes Silicamaterial (Kromasil C₁₈, Partikeldurchmesser 5 µm; Säulenlänge 125 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH, Montabaur). Die mobile Phase wurde zeitdynamisch komponiert. Ihr binäres Puffersystem wechselte durch Veränderung des Mischungsverhältnisses der Puffer A und B von einem polaren zu einem unpolaren Charakter (Puffer A: 89 % 0,085 M Na-Acetat, pH 7,5, 10 % Methanol *p.a.* und 1 % Tetrahydrofuran *p.a.*; Puffer B: 15 % 0,085 M Na-Acetat, pH 5,2 und 85 % Methanol *p.a.*). Der Puffergradient wurde von der HPLC-Anlage (D 450-Mt2, Kontron Instruments, Neufahrn) gesteuert; die Säule war auf 30 °C temperiert. Die Trennung erfolgte aufgrund hydrophober Interaktionen des Analyten mit der Matrix. Die Detektion der OPA-derivatisierten Aminosäuren erfolgte nach Anregung bei 340 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm mit einem Fluoreszenzdetektor (SFM 25, Kontron). Im Chromatogramm wiesen die Aminosäuren definierte Retentionszeiten auf. Über einen externen Aminosäurestandard erfolgte die Quantifizierung. Der interne Standard δ-

Aminovaleriansäure konnte nicht eingesetzt werden, da eine Komponente der eingesetzten Kulturmedien dessen Retentionszeit aufwies.

Die Probenvorbereitung gewährleistete eine Abreicherung von Proteinen. Hierzu wurden 50 µL zellbefreite Probe mit 50 µL Proteinfällungsreagenz (10 % Perchlorsäure, 300 µM δ-Aminovaleriansäure) vermischt. Präzipitierte Proteine wurden für drei Minuten bei 15000·g abzentrifugiert (Heraeus Sepatech, Biofuge pico). 50 µL des Zentrifugats wurden mit 100 µL Natriumboratpuffer (0,6 M, pH 10,4) vermischt und die Probe für drei Minuten bei 15000·g zentrifugiert.

Die Aminosäuren wurden vor dem Probenauftrag mit einem Derivatisierungsreagenz (25 mg OPA in 0,5 mL Methanol *p.a.*, 50 µL 3-Mercaptopropionat, 4,5 mL 0,6 M Na-Boratpuffer, pH 10,4) behandelt. Unter alkalischen Bedingungen kondensiert dabei OPA mit den D-Aminogruppen der Aminosäuren, wobei instabile Schiff'sche Basen entstehen. Das 3-Mercaptopropionat wandelt die leicht hydrolysierbaren C=N-Doppelbindungen in einer Cyclisierungsreaktion unter Wassereliminierung zu instabilen, fluoreszenzfähigen Isoindolderivaten um.

Die Konzentration von Cystein wurde stichprobenartig mit einer leicht modifizierten Methode bestimmt. Dabei wurden Cystein und Cystin zunächst mit einem 30 %iges Wasserstoffperoxid enthaltenden Oxidationsreagenz unter alkalischem pH-Wert zu Cysteinsäure oxidiert. Die minimalen Konzentrationen waren mit 1,4 mM in keinem Fall limitierend.

2.1.2.4 Glucose-/ Lactatkonzentrationsbestimmung

Glucose ist, neben Glutamin, einer der wichtigsten Energieträger des zellulären Metabolismus und muss ausreichend bereitgestellt werden. Lactat ist hingegen ein aufgrund der Ansäuerung des Mediums potentiell wachstumsinhibierender Katabolit. Daher ist die Kenntnis der Konzentration dieser beiden Substanzen zur Interpretation eines Kulturverlaufs essentiell (Tsao *et al.*, 2005).

Die Bestimmung erfolgte simultan für Glucose und Lactat mit dem YSI Analyzer 2700 S (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA) aus zellfreiem Kulturüberstand. Der Aufbau der beiden Sensoren für Glucose und Lactat war ähnlich: Durch eine Polycarbonatmembran wurden hochmolekulare Verunreinigungen der Probe zurückgehalten. An zwei sekundären Polycarbonatmembranen, an denen Enzyme immobilisiert waren, erfolgte ein substratspezifischer Umsatz der Zielmoleküle. An einer der Membranen wurde durch dort immobilisierte Glucoseoxidase die im Medium enthaltene Glucose in Glucono-δ-Lacton und Wasserstoffperoxid oxidiert. An der anderen sekundären Polycarbonatmembran war Lactatoxidase immobi-

lisiert, welche Lactat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidierte. Eine Celluloseacetatmembran mit einem *cut-off* von 200 Da war für das Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid permeabel, nicht aber für Glucono- δ -Lacton und Pyruvat. An einer Platin-Anode wurde das Wasserstoffperoxid zu Wasserstoff und molekularem Sauerstoff oxidiert und der Elektronenstrom amperometrisch vermessen. Der Anodenstrom war damit den Substratkonzentrationen proportional.

2.1.2.5 Osmolalität

Die Plasmaosmolalität beim Menschen beträgt zwischen 290 und 300 mOsmol/kg (Hildebrandt, 1998). Insbesondere durch den Eintrag von Natriumcarbonat zur pH-Regelung oder Glucose kann im Bioreaktorprozess die Osmolalität unphysiologisch hohe Werte annehmen, die zu einer Erniedrigung der spezifischen Wachstumsrate tierischer Zellen führen können (Zeng und Bi, 2006).

Die Bestimmung der Osmolalität erfolgte in einem automatischen Osmometer (Knauer GmbH, Berlin). Da gelöste Stoffe in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu einer Gefrierpunktniedrigung in einem bestimmten Lösungsmittel führen, konnte nach Kalibrierung des Gerätes über Reinstwasser und eine Natriumchloridlösung definierter Konzentration (12,687 g Natriumchlorid/kg Reinstwasser, entsprechend 400 mOsmol/kg) eine Messung der Osmolalität erfolgen. Dazu wurde die Probe schnell unter ihren Gefrierpunkt gekühlt und die Ausbildung von Eiskristallen durch einen Vibrator ausgelöst. Die entstehende Kristallisationswärme führte zu einem Temperaturanstieg auf den Gefrierpunkt. Zellkulturüberstände wurden vor der Messung durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 110-g zellbefreit. Die Probenvolumina betragen je 150 μ L.

2.1.3 Vorkultursystem: SuperSpinner

Die Vorkulturen wurden nach dem Auftauen einer Kryokultur zunächst in einer T75- und dann zwei T175-Flaschen expandiert und dann für die Bioreaktorprozesse in einem SuperSpinner (Lehmann *et al.*, 1992) mit einem Kulturvolumen von 500 mL bereitgestellt. Zur Vermeidung von Lag-Phasen wurde das Überimpfen stets in einer exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Dabei wurden bei Lebendzellichten über $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL pH-Werte um 6,7 erreicht.

Der SuperSpinner wurde durch den Umbau einer 500 mL-Schott-Flasche hergestellt. Hierzu wurden zwei Seitenarme für Medienwechsel angebracht und ein Membrantaumelrührer durch die Primäröffnung eingeführt. Der Taumelrührer bestand aus einem Teflonträger, der mit 2 m

eines mikroporösen, hydrophoben Polypropylenschlauchs (Accurel[®], Membrana GmbH, Wuppertal) umwickelt war. In den Teflonträger war ein Stabmagnet eingegossen, der induktiv an einen externen Magnetrührer (Biosystem 1, Variomag Electronicrührer, H+P Labortechnik, München) koppelte. Der SuperSpinner wurde mit Luft und 5 % Kohlendioxid zur Einstellung des pH-Werts über das Bicarbonat-Puffersystem begast. Die Begasung erfolgte als druck- und blasenfreie Diffusionsbegasung. Aufgrund fehlender Elektroden war das System nicht regelbar und es herrschten im SuperSpinner keine homöostatischen Kulturbedingungen.

2.1.4 Bioreaktor

Die Perfusionsprozesse wurden in 2 L-Bioreaktoren (Sartorius BBI Systems, Melsungen) durchgeführt. Sie bestanden aus doppelwandigen Glaskörpern mit Normdurchführungen aufweisenden Edelstahldeckeln. Zur Begasung und zum Durchmischen des Mediums mit maximal 48 UPM wurde in einem der im Ergebnissteil dargestellten Versuche wie beim SuperSpinner ein magnetisch koppelnder Taumelrührer eingesetzt. In den anderen Experimenten wurden 8-Segmentschrägblattrührer (Entwurf Prof. Lehmann, Universität Bielefeld) oder 3-Segmentschrägblattrührer (Sartorius BBI Systems) mit Membranbegasung über 5,2 m einer dünnwandigen Silikonmembran benutzt. Dabei wurde eine spezifische Begasungsoberfläche von $36 \text{ m}^2/\text{m}^3$ erreicht. In einem der dargestellten Prozesse wurde eine Blasenbegasung über einen lasergebohrten Begasungsring durchgeführt. Über die Deckeldurchführungen waren eine Sauerstoff- und eine pH-Elektrode (Mettler-Toledo GmbH, Gießen) eingebaut. Das System wurde über das *Computer Integrated Control System* (CICS, Büntemeyer *et al.*, 1994) gesteuert. Über zwei Software-PID-Regler wurden der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert geregelt. Die Ist- und Stellwerte wurden vom CICS aufgezeichnet. Die Gaszugabe wurde über Massendurchflussmesser (F-201C, Bronkhorst High Tech, Reinach, Schweiz) gesteuert. Alle Gaszuleitungen und Gasableitungen waren mit $0,2 \mu\text{m}$ Sterilfiltern (Midisart 2000, Sartorius AG, Göttingen) versehen. Der Bioreaktor hatte einen Doppelmantel und wurde durch ein Wasserbad auf Temperaturen zwischen $31 \text{ }^\circ\text{C}$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Die Systeme mit Begasungskorb hatten ein Arbeitsvolumen von 2,1 L, um die Membran vollständig zu bedecken und die blasenbegasteten Prozesse wurden mit einem Arbeitsvolumen von 2,0 L betrieben. Der Bioreaktor wurde in einem Großraumautoklaven (Typ GE 6612, Getinge Medizingeräte-Service GmbH, Oer-Erkenschwick) für 45 Minuten mit gespanntem Dampf bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$, sowie einem Flüssigvolumen von 1,5 L Reinstwasser autoklaviert. Die Abbildung 8 zeigt zur Veranschaulichung eine Photographie eines Systems. Während der Prozesse waren

zur Vermeidung der Photodegradation von Mediumsbestandteilen der Bioreaktor sowie Ernte- und Zufütterungsflasche mit Aluminiumfolie abgedunkelt.

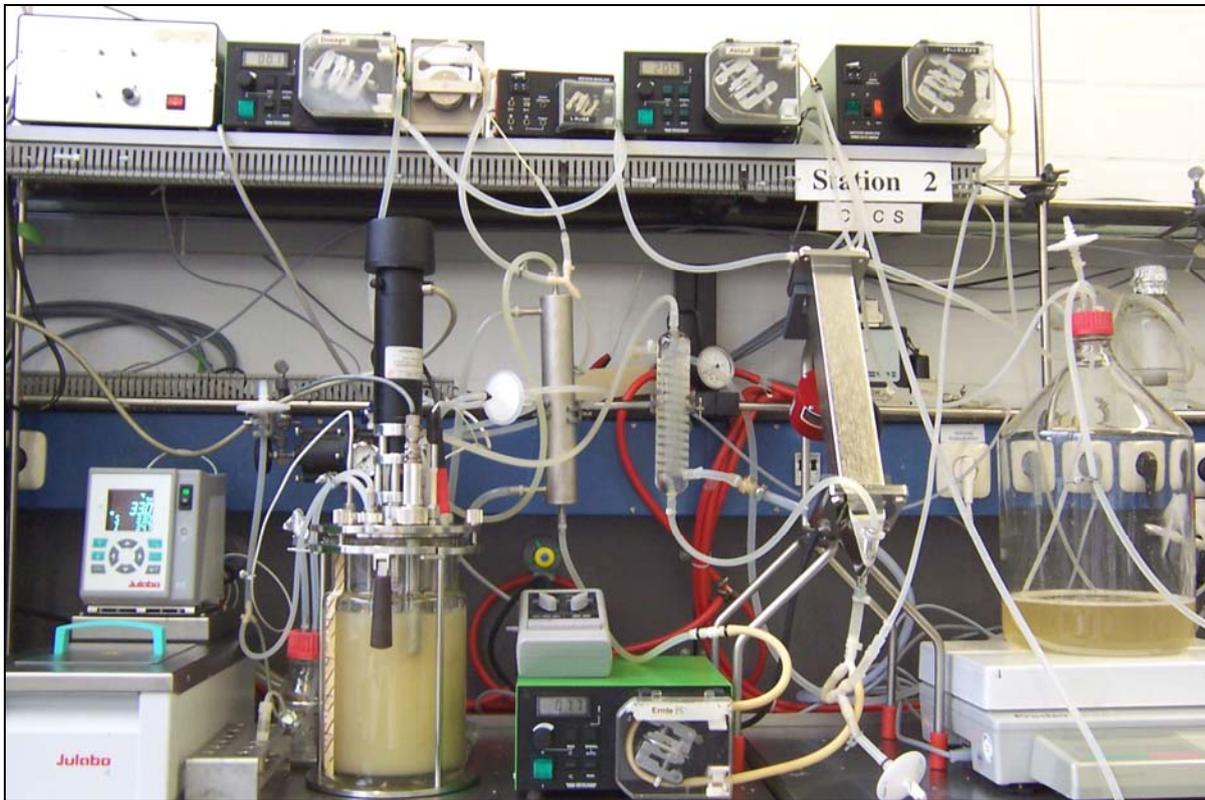


Abbildung 8: Photographie des membranbegasteten Kultursystems mit 8-Segmentschrägblattrührer. Die nicht abgebildete 20 L-Mediumsvorlagetonne wurde in einem Kühlschrank gelagert. Das Erntegefäß wurde durch Eiswasser gekühlt und wie der Bioreaktor abgedunkelt. In der Bildmitte sind die zwei Wärmetauscher vor und nach dem Plattensedimentierer im Rezirkulat zu erkennen. Die Wärmetauscher wurden mit dem Wasser des Doppelmantelausgangs beheizt beziehungsweise mit einem separaten Kryostat auf 20 °C gekühlt.

Im Perfusionsmodus wurde mit einer Peristaltikpumpe (Typ 501U oder 503 U, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen) über ein Tauchrohr kontinuierlich zellhaltiges Medium aus dem Bioreaktor in den Schrägrohrsedimentierkammer gefördert (Pumpenschlauch-Innendurchmesser 0,006 m). Dieser hatte drei Ausgänge: An den oberen Ausgängen der beiden getrennten Kammern wurde das zellabgereicherte Medium über eine Peristaltikpumpe (Typen 505 DU oder 503 U, Watson-Marlow) mit einer gewünschten Perfusionsrate abgesaugt. Die beiden angeschlossenen Pumpenschläuche wurden in dieselbe Peristaltikpumpe eingelegt (Fördervolumenabweichung ca. 1 %). Da die Parameter Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert im Sedimentierkammer nicht geregelt werden konnten, wurde zur Vermeidung einer Hypoxie, sowie von Konvektionseffekten, die Zellsuspension beim Verlassen des Bioreaktors über einen Gegenstromkühler mit einem Kryostat (F-12, Julabo) auf 20 °C gekühlt. Über den unteren Ausgang des Sedimentierkammers wurde die Zellsuspension in den Bioreaktor zurückgefördert. Vor dem Wie-

der Eintritt in den Bioreaktor erfolgte eine Retemperierung auf 37 °C über einen zweiten, an den Ausgang des Bioreaktordoppelmantels angeschlossenen Wärmetauscher. Das Füllvolumen des Bioreaktors wurde über einen Kurzschlussensor geregelt. Über eine dritte Peristaltikpumpe (Typen 505 DU oder 503 U, Watson-Marlow) wurde frisches Medium aus einer 20 oder 50 L-Vorratsstonne in den Bioreaktor gefördert. Sowohl das Zufütterungsmedium, als auch das Perfundat wurden auf 4 °C gekühlt und dunkel gelagert. Das Perfundat und die entnommenen Zellen konnten über Probenahmesysteme mit 0,004 m Schlauchdurchmesser außerhalb der Sterilwerkbank abgelassen werden. Dies erwies sich im Vergleich zur Entleerung der Flaschen unter der Sterilwerkbank als vorteilhaft für die Langzeitsterilität der Prozesse. Die Vorratsstonne und die sekundäre Ernteflasche waren über MPC-Kupplungen (Connectors Verbindungstechnik AG, Tagelswangen, Schweiz) mit dem restlichen System verbunden und konnten unter der Sterilwerkbank ausgetauscht werden. In einer die Produktaufreinigung integrierenden Prozessführung hätte ein sekundärer, sterilisierbarer Erntetank eine Einstellung des Perfundats auf die Bindebedingungen der unmittelbar anschließenden Fliessbettchromatographie ermöglicht. Die Genauigkeit der Pumpen betrug für die gewählten Schläuche und Flussraten $\pm 3\%$. Ein Funktionsschema des Bioreaktors mit Plattensedimenter ist in Abbildung 9 gezeigt.

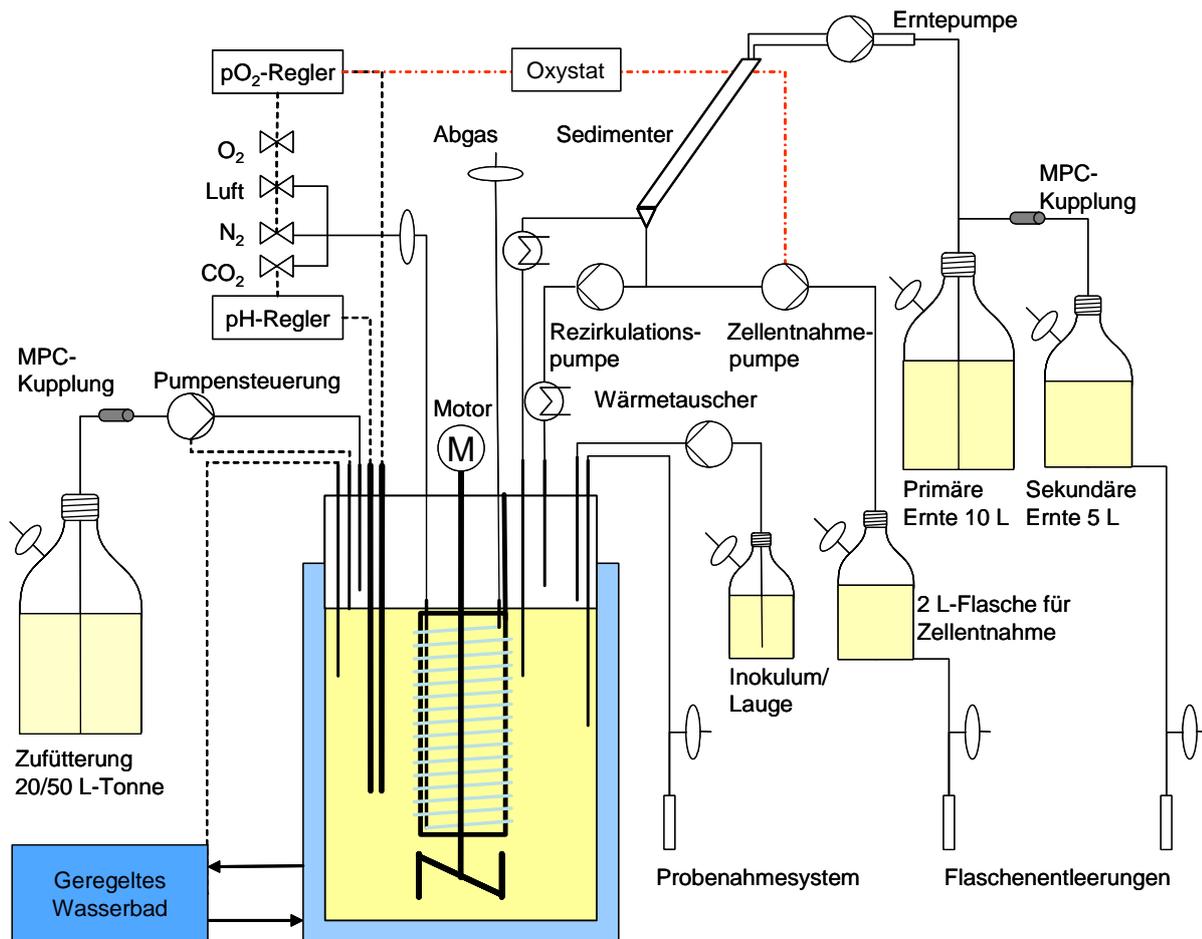


Abbildung 9: Funktionsschema des Bioreaktors mit Einrichtung zur kontinuierlichen Kultur. Die Zufütterungs-, Inokulums- und Laugeflaschen wurden unter der Sterilwerkbank gehandhabt. Die sekundäre Ernteflasche und die Zellentnahmeflasche konnten über Probenahmesysteme entleert werden. Bei einer Kultivierung war ein doppeltes Probenahmesystem am oberen Sedimenterausgang angebracht und die Begasung erfolgte über einen Taumelrührer.

2.1.5 CS20.1-Plattensedimenter

Der verwendete Plattensedimenter CS20.1 (Biotechnology Solutions, San Francisco, USA) war aus rostfreiem, elektropoliertem Edelstahl (316 L) gefertigt und hatte mit dem Bodenkonus ein Eigenvolumen von 0,555 L (ohne Bodenkonus 0,5 L). Laut Herstellerangabe war er für Bioreaktoren von 7 L bis 10 L Arbeitsvolumen ausgelegt. Der Sedimenter verfügte im unteren Bereich über einen Zugang, sowie über insgesamt drei Ausgänge, von denen einer im Bodenkonus und zwei im Deckel waren (Abbildung 10). Die Integration des Sedimenters in das Perfusionssystem ist im vorhergehenden Abschnitt und in Abbildung 9 näher beschrieben. Die zwei Ausgänge im Deckel ermöglichten eine Aufteilung des Sedimenters in zwei Kammern, in denen die spiegelpolierten und teflonbeschichteten Klärböden vergleichend untersucht werden konnten. Die Teflonbeschichtung war nur einige Stunden gegen die bei der Reinigung eingesetzte 1 M Natriumhydroxidlösung beständig. Die acht Klärböden hatten eine

Stärke von 1,25 mm und wurden in eine Halterung aus Delrin[®] eingesteckt; sie wiesen dadurch eine effektive Breite von 0,038 m auf. Sechs der Platten waren 0,304 m lang, die Bodenplatte und die Trennplatte zwischen den Kammern waren jeweils 0,328 m lang. Daraus ergibt sich eine Gesamtfläche (A_{ges}) von 0,0942 m². Die Neigung der Klärböden um 30° gegenüber der Vertikalen führte zur Reduktion der projizierten Klärfläche (A_{pr}) auf 0,0471 m² ($A_{\text{pr}} = A_{\text{ges}} \cdot \sin 30$). Damit hatte der CS20.1 in Bezug auf sein Eigenvolumen eine hohe spezifische Klärfläche (Henzler *et al.*, 2003) von 84,9 m²/m³. Bei einem Arbeitsvolumen des Bioreaktors von 0,002 m³ ergab sich eine bioreaktorspezifische Klärfläche von 23,56 m²/m³. Dabei betrug die maximal von den Zellen zurückzulegende Sedimentationsstrecke 9,5 mm. Der Schrägrohrsedimenter wurde durch einen elektrischen Vibrator (FMC Technologies, Homer City PA, USA) in Intervallen (15 Sekunden an, 50 Sekunden aus) in Vibration mit 100 Hz versetzt. Dies diente der Überwindung der Haftreibung sedimentierter Zellen und erleichterte ihr Abrutschen in Richtung des Bodenkonus (Searles *et al.*, 1994).



Abbildung 10: CS20.1-Plattensedimenter mit herausgezogenen, teflonbeschichteten Klärböden. Im Vordergrund ist der Bodenkonus abgebildet.

Der mitgelieferte Bodenkonus führte wegen der suboptimalen Durchströmung der Zellsuspension bis zu Volumenströmen von 50 mL/min zur Akkumulation von Zellen im Bodenkonus (persönliche Kommunikation, Peter Brown), die durch „Melken“ des Schlauches am unteren Ausgang in großen Aggregaten ausgetragen werden können. Nach dem Entwurf des Autors dieser Arbeit wurde von Biotechnology Solutions ein optimierter Bodenkonus gebaut (Abbildung 11). Dieser wurde in den dargestellten Experimenten mit einem Volumenstrom von 42 mL/min, entsprechend 50 Bioreaktorvolumen pro Tag, erfolgreich benutzt.

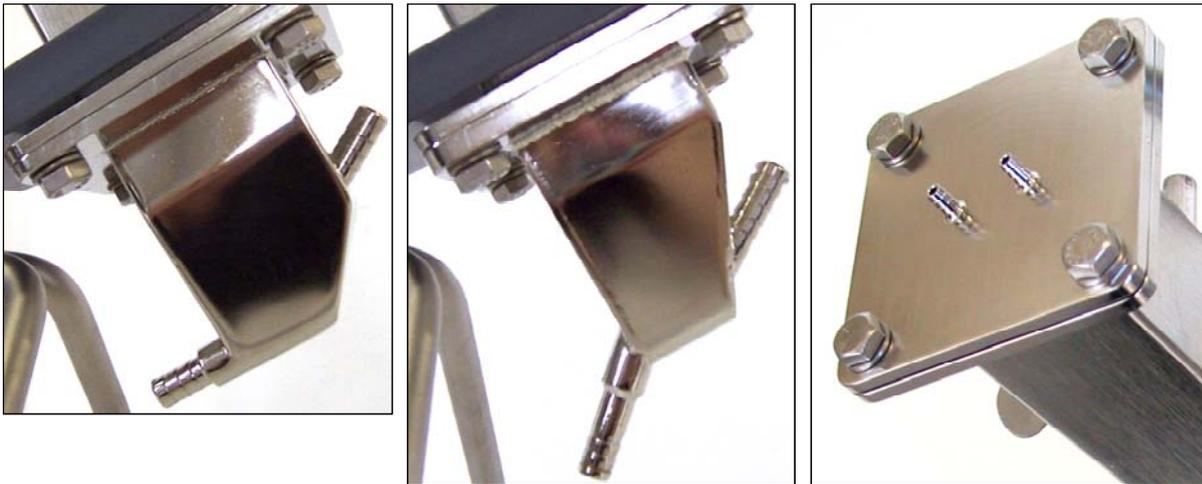


Abbildung 11: Links ist der zunächst gelieferte suboptimale Bodenkonus des CS 20.1-Plattensedimenters abgebildet. In der Mitte ist der optimierte Bodenkonus gezeigt, in dem durch Veränderung der Position des Flüssigkeitseinstroms und der Konusgeometrie die Zellakkumulation vermindert werden konnte. Rechts sind die beiden Deckelanschlüsse gezeigt.

2.1.6 Berechnungen zum Plattensedimentier

Sinkgeschwindigkeit der Zellen im Sedimentier

Die Klärleistung eines Plattensedimenters ist neben der oben berechneten projizierten Klärfläche von der Sinkgeschwindigkeit der Zellen im Sedimentier abhängig. Diese kann für die Absetzbewegung kugelförmiger, sich nicht beeinflussender Einzelpartikel bei Reynoldszahlen kleiner als 1 mit der nachfolgenden Beziehung nach Stokes ermittelt werden:

$$v_s = \frac{d_p^2 \cdot \Delta\rho \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (1)$$

Wobei v_s : Sedimentationsgeschwindigkeit [m/s], d_p : Partikeldurchmesser [m], $\Delta\rho$: Dichtedifferenz [kg/m^3], g : Erdbeschleunigung [m/s^2], η : dynamische Viskosität des Mediums [$\text{kg/m}\cdot\text{s}$].

Der mittlere Durchmesser viabler Zellen über die Prozesse M1 bis M3 betrug $13,9 \pm 1 \mu\text{m}$, der Durchmesser toter Zellen $11,4 \pm 1 \mu\text{m}$. Die dynamische Viskosität des Mediums bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde mit $0,981 \cdot 10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{m/s}$ (Stevens, 1994), die Dichte der Zellen mit 1051 kg/m^3 (Searles *et al.*, 1994) und die Dichte des Mediums mit $1007,6 \text{ kg/m}^3$ angenommen. Da der Partikeldurchmesser quadratisch in die Formel eingeht, ist die Größendifferenz zwischen toten und lebenden Zellen – und besonderes Zellaggregaten – der entscheidende Parameter. Danach

berechnet sich eine mittlere Sinkgeschwindigkeit von 17,0 mm/h für viable Zellen und von 11,4 mm/h für tote Zellen.

Volumetrische Klärrate des Sedimenters

Für einen gegebenen mittleren Partikeldurchmesser kann nach Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit, der projizierten Klärfläche und der maximalen Sedimentationsstrecke eine volumetrische Klärrate bestimmt werden, bei der mittlere Partikel vollständig zurückgehalten würden (Batt *et al.*, 1990). Tatsächlich ist aufgrund der Größenverteilung der Zellen die Rückhaltungsleistung abweichend von der mit Formel 2 berechneten, theoretischen volumetrischen Klärrate.

$$S_V = v_s \cdot B \cdot z \cdot (L \cdot \sin \theta + b \cdot \cos \theta) \quad (2)$$

Wobei S_V : volumetrische Klärrate [m^3/s], L : absolute Länge der Klärböden [m], B : effektive Klärbodenbreite [m], z : Klärbodenanzahl [-], θ : Auslenkung von der Vertikalen [$^\circ$], b : Klärbodenabstand [m].

Die volumetrische Klärrate für lebende Zellen berechnete sich mit der oben angegebenen mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit zu 822 mL/h und für tote Zellen zu 553 mL/h. Bei einem Kulturvolumen von 2,1 L sollten damit Perfusionsraten von 9,4/d ohne Austrag lebender Zellen und von 6,32/d ohne Austrag toter Zellen möglich sein (Abbildung 12).

Theoretische Verweilzeit

Die Bestimmung der realen Verweilzeit von Zellen im Plattensedimeter könnte durch Färbung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen und fluorimetrische Detektion im Rezirkulationsstrom und am oberen Ausgang des Sedimenters erfolgen. Ein empirischer Ansatz zur Bestimmung der hydrodynamischen Verweilzeit ist die Zugabe gesättigter Kochsalzlösung (Stevens, 1994). Bei geringen Volumenströmen waren in jener Arbeit die berechnete und die empirische Verweilzeit nahezu identisch. Erst bei hohen Volumenströmen traten aufgrund nicht ausreichender Temperaturreduktion in dem mit Naturumlauf betriebenen System Konvektionseffekte und damit eine ungleichmäßige Durchströmung der Platten auf. Da in der vorliegenden Arbeit vergleichsweise geringe Volumenströme eingesetzt wurden, die eine konstante Temperierung der in den Sedimeter geförderten Kulturbrühe erlaubten, wurde auf eine empirische Untersuchung verzichtet. Die theoretischen Verweilzeiten des Perfundats und des Re-

zirkulats im Plattensedimeter wurden gemäß 3 berechnet und sind für diese beiden exemplarisch in Abbildung 12 in Abhängigkeit von der Perfusionsrate gezeigt. Die hydrodynamische Verweilzeit für das Rezirkulat wurde unter der vereinfachenden Annahme berechnet, dass Eingang und Ausgang des Bodenkonus direkt verbunden sind und keine Rückvermischung auftritt (Formel 3). Daher sind die angegebenen Werte als minimale und maximale theoretische Verweilzeit zu interpretieren.

$$\tau = \frac{L \cdot A_q}{F_p} \quad (3)$$

Wobei τ : hydrodynamische Verweilzeit [s], F_p : Volumenstrom [m^3/s], A_q : Querschnittsfläche [m^2].

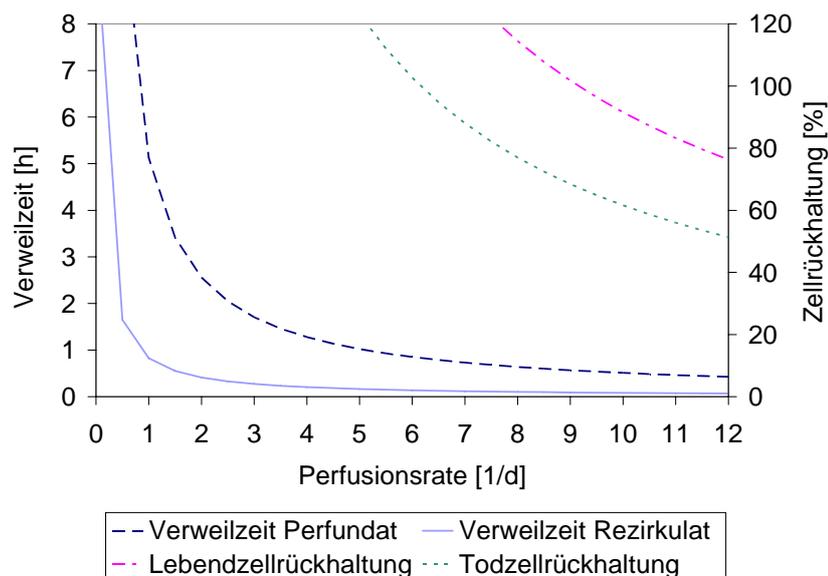


Abbildung 12: Theoretischen Verweilzeiten des Perfundats und des Rezirkulats in Abhängigkeit von der Perfusionsrate, sowie theoretische Zellrückhaltung.

Empirische Bestimmung der Zellrückhaltung

Das auf 4 °C gekühlte Perfundat wurde in der Regel täglich abgelassen und gegebenenfalls der Produktaufreinigung zugeführt. Eine Bestimmung der Zelldichte im Perfundat zur Berechnung der Zellrückhaltung konnte im Zuge dessen durchgeführt werden. In einem der dargestellten Perfusionsprozesse wurde zum Vergleich der Rückhaltung der Kammern je ein Probenahmesystem an den beiden oberen Ausgängen des Sedimenters angebracht. Zur Berechnung der Zellrückhaltung ergeben sich zwei verschiedene Formeln:

Bei der Probenahme aus der sekundären Ernteflasche erfolgt eine intrinsische Integration der Zelldichte über den Zeitraum zwischen den Ernten. Daher muss zur Berechnung der Zellrückhaltung als Divisor der Mittelwert der Zelldichte im Bioreaktor über den entsprechenden Zeitraum eingesetzt werden:

$$Z = 100 - \left(\frac{X_p \cdot 100}{\bar{X}} \right) \quad (4)$$

Wobei Z: Zellrückhaltung [%], X_p : Zelldichte im Perfundat (Ernteflasche) [Zellen/mL] und \bar{X} : mittlere Zelldichte [Zellen/mL].

Im Perfusionsprozess T erfolgte die Zellentnahme über zwei Probenahmemodule im Perfusionsstrom hinter der Erntepumpe. Daher ist zur Berechnung der Zellrückhaltung die jeweils aktuelle Zelldichte im Bioreaktor zu berücksichtigen. Bei der Zelldichtebestimmung aus dem Probenahmesystem gilt damit für die Zellrückhaltung folgende Beziehung:

$$Z = 100 - \left(\frac{X_{p,t} \cdot 100}{X_t} \right) \quad (5)$$

Wobei $X_{p,t}$: Zelldichte im Perfundat [Zellen/mL] und X_t : Zelldichte [Zellen/mL].

2.1.7 On-line-Analytik und Prozessregelung des Bioreaktors

2.1.7.1 Pt-100 Temperatursensor

Die Temperatur im Bioreaktor ist ein wesentlicher Kulturparameter und wurde mit einem Pt-100 Widerstandstemperaturfühler gemessen. Der Startwert für die Temperatur betrug in allen Kultivierungen 37 °C. Die Temperierung erfolgte über den Doppelmantel des Bioreaktors und konnte vom Prozessleitsystem nicht geregelt werden. Beim Umschalten vom initialen *Batch*-Modus zur kontinuierlichen Prozessführung musste eine manuelle Temperaturanpassung am Wasserbad durchgeführt werden. Bei einigen Versuchen wurde die Temperaturregelung von den Wasserbädern durchgeführt (ME-4, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach).

2.1.7.2 pH- und pO₂-Elektrode

Der pH-Wert im Bioreaktor wurde mit einer Einstabelektrode (Mettler-Toledo) gemessen. Eine Regelung des pH-Werts war über Variation der Kohlendioxidkonzentration im Begasungsvolumenstrom oder über Zugabe von Natriumcarbonat möglich. Zur Anpassung eines möglichen Driftens der Elektrode wurde der pH-Wert alle ein bis drei Tage extern bestimmt. Die eingesetzte pO₂-Elektrode (Mettler-Toledo) bestimmte mittels eines polarographischen Verfahrens den Sauerstoffpartialdruck im Kulturmedium. Er wurde im Bioreaktor über die Variation der Volumenanteile von Luft, Stickstoff und Sauerstoff geregelt.

2.1.7.3 PID-Regler

Einer der Vorteile der Bioreaktorsysteme lag in der *on-line*-Messung der Istwerte zentraler Kulturparameter. Die Bestimmung eines Istwerts, auch Regelgröße genannt, erlaubte über einen geschlossenen Regelkreis (oberer Teil von Abbildung 13) und einen geeigneten Regelalgorithmus die Homöostase der Parameter Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert.

Bei dem pO₂-Regler entsprach eine Reglerausgangsgröße von 0 einer Begasung mit 100 % Stickstoff, eine Reglerausgangsgröße von 100 entsprach einer Begasung mit 100 % Luft und die maximale Reglerausgangsgröße von 462 entsprach einer Begasung mit 100 % Sauerstoff. Die vom Regler berechneten Reglerausgangsgrößen wurden vom jeweiligen Stellglied in Stellgrößen umgesetzt. Beim pH-Regler führten negative Reglerausgangsgrößen bis -40 einer maximalen, impulsmodulierten oder geschwindigkeitsmodulierten Zugabe von Lauge und positive Werte bis 40 einer Kohlendioxidzugabe von jeweils 40 % des Gesamtgasvolumenstroms. Der maximale Anteil des Kohlendioxids am Gesamtgasvolumenstrom wurde im Perfusionprozess M3 von 40 auf 20 % reduziert, um ein Schwingen des pH-Reglers und indirekt des pO₂-Reglers zu vermeiden. Die Reglerausgangsgrößen der PID-Regler wurden aus folgender Reglergleichung berechnet (Czichos *et al.*, 2000):

$$u_R(t) = K_R \cdot \left(e(t) + \frac{1}{T_I} \int_0^t e(t) dt + T_D \frac{de(t)}{dt} \right) \quad (6)$$

Wobei $u_R(t)$: Reglerausgangsgröße [-], K_R : Verstärkungsfaktor [-], $e(t)$: Regelabweichung [-], T_I : Nachstellzeit (Integralteil) [s], T_D : Vorhaltezeit (Differentialteil) [s].

Die Reglerabweichung ist die Differenz des Sollwerts, $w(t)$, und des Istwerts (Regelgröße), $y(t)$:

$$e(t) = w(t) - y(t) \quad (7)$$

Der Proportionalanteil reagiert ohne Verzögerung auf Regelabweichungen, wobei der Verstärkungsfaktor auch mit dem Differential- und Integralteil multipliziert wird. Über die Variation der Nachstellzeit weist der Integralteil eine mehr oder weniger träge Charakteristik auf. Der Differentialteil reagiert auf die Änderungsgeschwindigkeit der Regelstrecke je nach Differentialbeiwert und ist zur Regelung dynamischer Systeme erforderlich. Die PID-Einstellwerte der verschiedenen Regler mussten während einiger Experimente angepasst werden. Die Wertebereiche der Parameter sind in Tabelle 1 dargestellt. Anpassungen der Einstellwerte führten zur Löschung der im CICS gespeicherten Werte zur Berechnung des Integral- und Differentialteils und zu einem Reglerneustart unter definierten Standardbedingungen. Diese waren für den pH- und den pO₂-Regler Reglerausgangsgrößen von 0 und verursachten ein Einschwingen der jeweiligen Regler.

Tabelle 1: PID-Einstellwerte für die pH- und pO₂-Regelung. In den verschiedenen Experimenten wurden die Parameter variiert, angegeben ist der genutzte Wertebereich.

	K_R [-]	T_I [s]	T_D [s]
PID-Parameter für pH-Regelung	1 - 5	1 - 500	0 - 1000
PID-Parameter für pO ₂ -Regelung	1 - 5	1 - 200	0 - 1000

2.1.8 Oxystat zur Steuerung der Zellentnahme

Wenn ein Perfusionsprozess nicht-limitierend betrieben werden soll, müssen Zellen aus dem System entnommen werden. Die Messwerte aufgrund derer die Zellentnahme geregelt wird, sollten im Idealfall durch ein nicht-invasives Verfahren mit einer hohen Datendichte bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden diverse Systeme entwickelt, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Direkt auf die Zellen abhebende Verfahren sind Trübungsmessung, *in-situ*-Mikroskopie und Leitfähigkeitsbestimmung. Indirekte Verfahren beruhen zum Beispiel auf der Messung von Nährstoffen (Dowd *et al.*, 2001), der Bestimmung der *oxygen uptake rate* oder der Kohlenstoffdioxidproduktion (Ozturk *et al.*, 1997a, Konstantinov *et al.*, 1994). So-

wohl die Zelldichte, als auch die Nutrientkonzentrationen können nicht-invasiv über Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie bestimmt werden (Ulber *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde ein Oxystat zur Regelung der Lebendzelldichte eingesetzt. Hierbei wurde die *on-line*-Reglerausgangsgröße des pO_2 -Reglers abgegriffen und als Regelgröße des Oxystats definiert (siehe Abbildung 13 und Formel 6). Nahm die berechnete Regelgröße $y'(t)$ größere Werte als der Sollwert des Oxystats $w'(t)$ an, generierte der Regler des Oxystats entsprechende Reglerausgangsgrößen zur Steuerung der Zellentnahmepumpe. Sie wurde je nach Stellgröße über eine Steuerspannung zwischen 0 und 5 V angesprochen und entnahm geschwindigkeitsmoduliert Zellen aus dem Rezirkulationsstrom. Somit sank der Sauerstoffverbrauch als Produkt von Lebendzelldichte und spezifischer Sauerstoffverbrauchsrate. Der PID-Regler zur Regelung der Lebendzelldichte über Steuerung einer Zellentnahmepumpe hatte eine geringere Priorität als der pH-Regler, aber die gleiche Priorität wie der pO_2 -Regler. Aufgrund der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Priorisierung der Regler konnte die Begasung mit Kohlendioxid zu hohen Stellgrößen für den pO_2 -Regler führen und den Oxystat zur Zellentnahme veranlassen. Daher musste er eine träge Reglercharakteristik aufweisen. Für den Verstärkungsfaktor wurden Werte von 1 s bis 5 s, für die Nachstellzeit von 1 s bis 5000 s und für die Vorhaltezeit von 0 s bis 100 s eingesetzt; außerdem wurden die Regelgrößen für den Oxystat über eine Minute gemittelt.

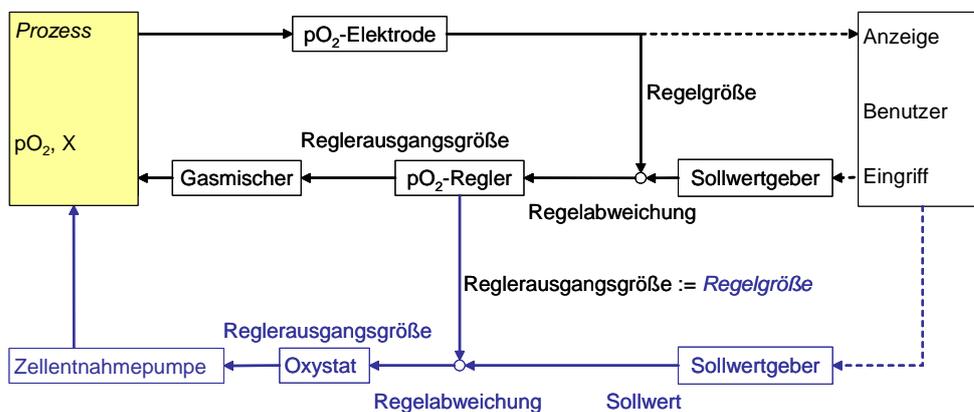


Abbildung 13: Vereinfachtes Schema des Regelkreises für den Sauerstoffpartialdruck im oberen Bildteil und den Oxystat im unteren Bildteil. Für den Oxystat wurden die Reglerausgangsgrößen des pO_2 -Reglers nach Mittelwertbildung zu Regelgrößen des Oxystats definiert. Die Stellglieder für den pO_2 -Regelkreis waren der Gasmischer bzw. vier Massendurchflussmesser und für den Oxystat die Zellentnahmepumpe.

2.1.9 Ermittlung des Leistungseintrags durch Rühren

Das Mischen des Reaktorvolumens durch Rühren hat mehrere Ziele: Herstellung homogener Kulturbedingungen im Reaktor, Optimierung des Stofftransports durch Turbulenz, Wärme-

transport, ggf. Erhöhung der Blasenverweilzeit, Verhinderung von Zellaggregation und -sedimentation (Chmiel, 2006). Im 2 L-Bioreaktor wurden keine Strömungsbrecher zur Verstärkung der Turbulenz eingebaut. Es wurde vereinfachend angenommen, dass die zwei Elektroden, die Tauchrohre und der Begasungskorb eine ausreichende Turbulenz erzeugten. Für turbulent durchmischte, nicht begaste Systeme kann der mittlere Leistungseintrag über die nachfolgende Beziehung berechnet werden (Formel 8). In der Nähe des Rührorgans kann die Energiedissipation deutlich höhere Werte erreichen (Nienow, 2006).

$$P = Ne \cdot n^3 \cdot d^5 \cdot \rho_F \quad (8)$$

P : Leistungsaufnahme des Rührers [W], Ne : Newton-Zahl (Leistungskennzahl) [-], n : Rührerdrehzahl [1/s], d : Äußerer Rührorgandurchmesser [m], ρ_F : Dichte des Rührgutes [kg/m³].

Zur Bestimmung der Leistungsaufnahme wurde der Motor mechanisch über einen kugelgelagerten Sockel vom Bioreaktordeckel entkoppelt, so dass das Haltemoment über die Rührerwelle auf den Motor wirkte. Über eine Umlenkrolle und eine Waage konnte die Haltekraft und daraus das Haltemoment bei verschiedenen Rührerdrehzahlen bestimmt werden. Dabei wurden zur Normierung Versuche ohne Flüssigkeit, sowie mit Wasser und Kulturbrühe bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Da bis auf einen in dieser Arbeit dargestellten blasenbegasten Perfusionprozess eine Membranbegasung eingesetzt wurde, wurde auf die Bestimmung des Leistungseintrags bei Blasenbegasung verzichtet. Nach Bestimmung des Leistungseintrags konnte durch Umstellen der Formel 8 die Newton-Zahl berechnet werden. Aus dem Leistungseintrag kann weiterhin der mittlere spezifische Leistungseintrag berechnet werden:

$$\bar{\varepsilon}_T = \frac{P}{V_R} \quad (9)$$

Wobei $\bar{\varepsilon}_T$: mittlerer spezifischer Leistungseintrag [W/m³], V_R : Arbeitsvolumen [m³].

2.1.10 Berechnungen zur diskontinuierlichen Kulturführung

Die initiale Kultivierung im Bioreaktor wurde im Satzbetrieb (*Batch*) bis zum Erreichen einer Lebendzelldichte von ca. $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL durchgeführt und dann auf kontinuierliche Kul-

turführung umgeschaltet. Die Bildungs- und Verbrauchsrate lassen sich im geschlossenen System wie nachstehend berechnen (Pirt, 1985):

Berechnung der spezifischen Wachstumsrate

Im Satzbetrieb bleibt das Volumen konstant und es werden keine Zellen entnommen; daher gilt folgende Gleichung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot \bar{X} \quad (10)$$

Wobei \bar{X} : mittlere Lebendzellendichte im Bioreaktor [Zellen/mL], X: Lebendzellendichte im Bioreaktor [Zellen/mL] und μ : spezifische Wachstumsrate [1/d].

Durch Umstellen und Bilden eines Differenzenquotienten ergibt sich folgende Berechnung der spezifischen Wachstumsrate für den Satzbetrieb:

$$\mu = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \cdot \frac{1}{\bar{X}} \quad (11)$$

$X_1 - X_0$ im Folgenden als ΔX und $t_1 - t_0$ im Folgenden als Δt .

Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate

Da im Satzbetrieb keine Nährstoffe hinzugegeben oder entnommen werden, ist die Substratkonzentration lediglich von der spezifischen Substratverbrauchsrate und der durchschnittlichen Lebendzellendichte abhängig:

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot \bar{X} \quad (12)$$

Wobei q_s : spezifische Substratverbrauchsrate [pmol/Zelle·d] und S: Substratkonzentration im Bioreaktor.

Durch Umstellen und Bilden eines Differenzenquotienten ergibt sich zur Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate im Satzbetrieb folgende Formel (Formel 13):

$$q_s = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\bar{X}} \quad (13)$$

Wobei ΔS : Differenz der Substratkonzentrationen [mol/L].

Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate

Die Produktbildungsrate im Satzbetrieb entspricht dem Produkt aus spezifischer Produktbildungsrate und durchschnittlicher Lebendzellichte:

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot \bar{X} \quad (14)$$

Wobei q_p : spezifische Produktbildungsrate [pg/Zelle·d] und P: Produktkonzentration [mg/L].

Aus Formel 14 ergibt sich nach Umformen folgender Differenzenquotient zur Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate im Satzbetrieb:

$$q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\bar{X}} \quad (15)$$

2.1.11 Berechnungen zur kontinuierlichen Kulturführung

Nach der initialen Satz-Phase wurden die Bioreaktorprozesse als Perfusionprozesse betrieben. Dabei wird unter Konstanthalten des Kulturvolumens das Medium kontinuierlich ausgetauscht. Da die Zellrückhaltung während der Perfusionphase unvollständig war, muss dies in der Berechnung der Wachstumsrate berücksichtigt werden. Die Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate muss außerdem die Zufütterung von frischem Medium berücksichtigen (Pirt, 1985). Die auftretenden Fermentationsgrößen sind in Abbildung 14 schematisch dargestellt. Die Zellen wurden vor Eintritt in den Sedimeter auf 20 °C gekühlt. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass sie während der Verweilzeit im Sedimeter bis zu einigen Stunden (Searles *et al.*, 1994) keine signifikante metabolische Aktivität zeigen. Als Reaktionsvolumen wird folglich der Bioreaktor betrachtet.

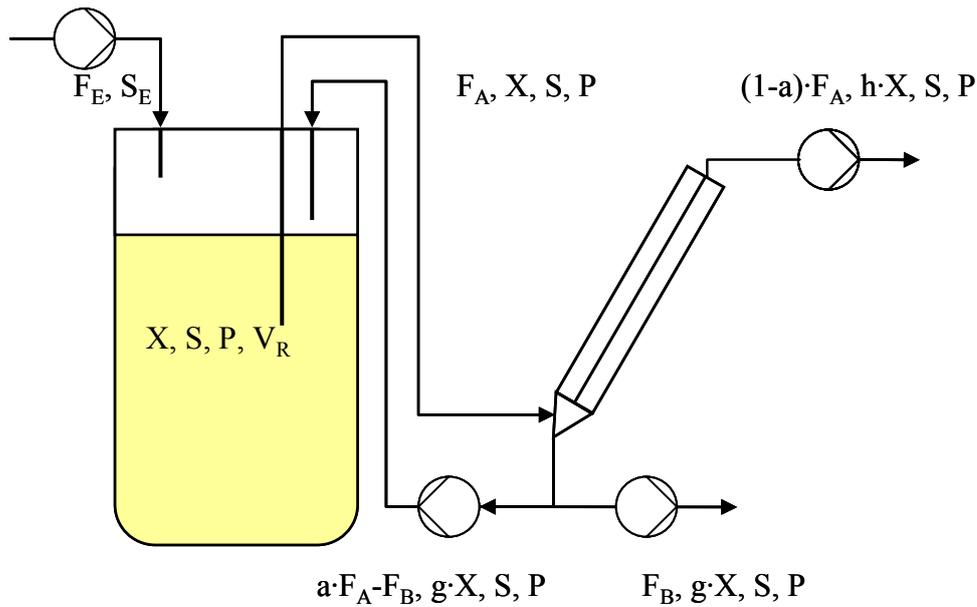


Abbildung 14: Schematische Darstellung von Schrägrohrsedimenter und Bioreaktor zur Veranschaulichung der in der kontinuierlichen Kultur mit Zellrückhaltung relevanten Fermentationsgrößen.

Wobei F_E : Flussrate Zulauf [L/d], F_B : Flussrate Zellentnahme [L/d], F_A : Abflussrate [1/d], S_E : Substratkonzentration Zulauf [mmol/L], X : Lebendzell-dichte Bioreaktor [Zellen/mL], S : Substratkonzentration Bioreaktor [mmol/L], P : Produktkonzentration Bioreaktor [mg/L], V_R : Arbeitsvolumen [L], a : Koeffizient der Abflussrate, g : Aufkonzentrationsfaktor der Zelldichte im Rezirkulat und h : Abreicherungs-faktor der Zelldichte im Perfundat; es gilt: $g \cdot h = 1$.

Die Verdünnungsrate, die Perfusionsrate und die Zellentnahmerate berechnen sich entsprechend der Abbildung 14 folgendermaßen:

$$D = \frac{F_E}{V_R}; D_P = \frac{(1-a) \cdot F_A}{V_R}; D_B = \frac{F_B}{V_R} \quad (16)$$

Wobei D : Verdünnungsrate [1/d], F_E : Flussrate Zulauf [L/d], D_P : Perfusionsrate [1/d] und D_B : Zellentnahmerate [1/d].

Die Verdünnungsrate entspricht der Summe von Perfusionsrate und Zellentnahmerate :

$$D = D_P + D_B \quad (17)$$

Berechnung der spezifischen Wachstumsrate

Gemäß den oben gemachten Annahmen ergibt sich folgende Massenbilanz für die Lebendzell-dichte im Perfusionsprozess mit unvollständiger Zellrückhaltung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot \bar{X} - D_p \cdot h \cdot \bar{X} - D_B \cdot g \cdot \bar{X} \quad (18)$$

Wobei \bar{X} : Durchschnittliche Lebendzell-dichte im Bioreaktor [Zellen/mL] und D: Verdün-nungsrate [1/d].

Durch Umstellen und Bilden eines Differenzenquotienten ergibt sich folgende Berechnung der spezifischen Wachstumsrate für die kontinuierliche Kulturführung:

$$\mu = \frac{\Delta X}{\Delta t \cdot \bar{X}} + D_p \cdot h + D_B \cdot g \quad (19)$$

Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate

Da im Perfusionsprozess kontinuierlich frisches Medium in den Bioreaktor gepumpt wird, ist die Substratkonzentration im Fließgleichgewicht von der Verdünnungsrate, der Substratkonzentration im Zulauf (S_E) und dem Verbrauch abhängig. Es wird vereinfachend angenommen, dass sich die Substratkonzentration außerhalb des Bioreaktors nicht verändert.

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_E - \bar{S}) - q_s \cdot \bar{X} \quad (20)$$

Durch Umstellen und Bilden eines Differenzenquotienten ergibt sich folgender Zusammen-hang zur Berechnung der spezifischen Substratverbrauchsrate bei kontinuierlicher Kulturfüh-rung:

$$q_s = \frac{D \cdot (S_E - \bar{S})}{\bar{X}} - \frac{\Delta S}{\Delta t \cdot \bar{X}} \quad (21)$$

Berechnung der zellspezifischen Verdünnungsrate

Die Berechnung der zellspezifischen Verdünnungsrate mit Formel 22 (engl. *cell specific dilu-tion rate*, CSDR) ermöglicht die Einstellung der zur Versorgung einer gegebenen oder erwar-

teten Zellzahl notwendigen minimalen Verdünnungsrate (D_{\min}), bei der keine Limitationen eines primär limitierenden Substrats (S) zu erwarten sind (Formel 23). Dabei ist zu beachten, dass die Verdünnungsrate die Summe von Perfusions- und Zellentnahmerate ist (Formel 17).

$$CSDR = \frac{q_s}{S} \quad (22)$$

Wobei CSDR: zellspezifische Verdünnungsrate [nL/Zelle·d].

Berechnung der minimalen Verdünnungsrate für eine primär limitierende Komponente:

$$D_{\min} = CSDR \cdot X = \frac{1}{S} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (23)$$

Wobei D_{\min} : minimale Verdünnungsrate [1/d].

Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate

Unter der vereinfachenden Annahme, dass sich im Fließgleichgewicht die Produktkonzentration außerhalb des Bioreaktors, etwa im Sediment, nicht verändert, gilt folgende Beziehung:

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot \bar{X} - D \cdot \bar{P} \quad (24)$$

Durch Umstellen und Bilden eines Differenzenquotienten ergibt sich folgende Berechnung der spezifischen Produktbildungsrate für die kontinuierliche Kulturführung:

$$q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t \cdot \bar{X}} + \frac{D \cdot \bar{P}}{\bar{X}} \quad (25)$$

Produktausstoß

Bei der nachfolgenden Berechnung des Produktausstoßes wird das Produkt in der Zellentnahme vernachlässigt, da es nicht aufgereinigt wird:

$$P_A = \bar{P} \cdot D_p \quad (26)$$

Wobei P_A : Produktausstoß [mg/d].

Berechnung der Produktivität

Zur Berechnung der volumetrischen Produktivität (P_V) wird die kumulierte Produktmenge im Perfudat durch die Gesamtprozessdauer inklusive der Satz-Phase, sowie das Arbeitsvolumen dividiert. Rüstzeiten werden nicht berücksichtigt.

2.2 Produktaufreinigung

Die Produktaufreinigung erfolgte in vier sukzessiven Chromatographieschritten, wobei durch die Primäraufreinigung mittels salztolerantem Liganden im Fließbett auf eine Zellabtrennung, sowie eine Entsalzung über eine Ultra-/Diafiltration verzichtet werden konnte.

1. Primäraufreinigung mit salztolerantem Chromatographiematerial
2. Reinigung I mit Hydrophober Interaktionschromatographie
3. Reinigung II mit Anionenaustauschchromatographie
4. Reinigung III mit semipräparativer Größenausschlusschromatographie

2.2.1 Primäraufreinigung in der Fließbettchromatographie

Das Streamline™ Direct HST 1-Gelmaterial (Kat. Nr. 17-5266-02, GE Healthcare Europe GmbH, München) für die Fließbettchromatographie bestand aus quervernetzter, 4 %iger Agarose mit einem Edelstahlkern. Der multimodale Ligand wies eine schwach kationische Carboxylfunktion, sowie eine Phenylgruppe mit hydrophobem Charakter auf (Abbildung 15). Ein entsprechendes Material für die Festbettchromatographie ist ebenfalls erhältlich (Capto™ MMC, Kat. Nr. 17-5317-10).

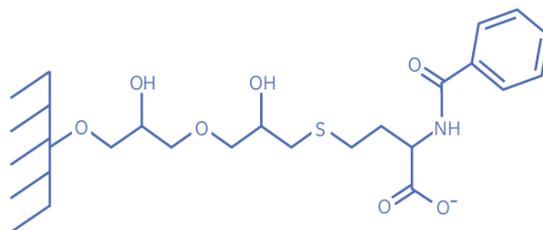


Abbildung 15: Salztoleranter Streamline™ Direct HST 1-Ligand. Der multimodale Ligand weist eine schwach kationische Carboxylfunktion, eine Phenylgruppe mit hydrophobem Charakter und polare Hydroxyfunktionen auf.

Durch den vergrößerten Abstand der Partikel in der Fließbettchromatographie und deren Beweglichkeit führen Partikel nicht zu einem Verblocken des Fließbetts. Damit eignet sich dieses Verfahren besonders für den ersten Aufarbeitungsschritt nach der Produkternte (Chase, 1994). Zur Stabilisierung des Fließbetts hatten die Partikel einen definierten Dichte- und Durchmessergradienten; in Abhängigkeit von der Größe der eingegossenen Edelstahlkerne betrug die Dichte zwischen 1300 kg/m^3 und 1800 kg/m^3 . Der mittlere Durchmesser war $140 \text{ }\mu\text{m}$ bei einer Größenverteilung von $80 \text{ }\mu\text{m}$ bis $200 \text{ }\mu\text{m}$. Dadurch konnte eine stabile Bettfluidisierung bei Flussraten bis zu 900 cm/h und einem Expansionsfaktor bis zu 3 ermöglicht werden.

Die für die Experimente im Fließbett eingesetzte Streamline™ Direct 24 1.7-Säule hatte einen Innendurchmesser von 24 mm bei einer nutzbaren Säulenlänge von $1,7 \text{ m}$. Das maximal nutzbare Säulenvolumen betrug 700 mL . Es wurden 79 mL Gel bei linearen Flussraten der P-50-Kolbenpumpe (GE Healthcare Europe GmbH) von $530,5 \text{ cm/h}$ eingesetzt. Das expandierte Bett hatte bei der Äquilibration ein Eigenvolumen von ca. 190 mL . Aufgrund der Bettexpansion beim Probenauftrag musste der Adapter so eingestellt werden, dass er vom expandierten Bett nicht erreicht werden konnte, wodurch ein Säulenvolumen 217 mL betrug. Im Gegensatz zur klassischen Verfahrensweise bei der Fließbettchromatographie (Ameskamp, 2001) wurde der Adapter vor der Elution nicht abgesenkt. Dies erhöhte das Elutionsvolumen, verhinderte aber ein Verblocken der Säule bei der Elution. Als Chromatographiesystem wurde ein GradiFrac™ (GE Healthcare Europe GmbH) eingesetzt. Über einen UV-Detektor (UV-1, GE Healthcare Europe GmbH) und eine Leitfähigkeitsmesszelle (Conductivity Monitor, GE Healthcare Europe GmbH) wurden die Absorption bei 280 nm und die Leitfähigkeit im Überlauf gemessen und die Werte von einem Datenschreiber (REC 102, GE Healthcare Europe GmbH) erfasst. Die optimierten Pufferbedingungen für die Kationenaustauschchromatographie waren:

- Äquilibration: zehn Säulenvolumen $0,025 \text{ M}$ Natriumacetat, $0,12 \text{ M}$ Natriumchlorid, $\text{pH } 5,60$, Leitfähigkeit ca. 13 mS/cm .
- Waschen: vier Säulenvolumen des Äquilibrationspuffers.
- Elution: $0,025 \text{ M}$ Di-Natriumhydrogenphosphat, $\text{pH } 7,00$, Leitfähigkeit $3,5 \text{ mS/cm}$.
- Reinigung I: ein Säulenvolumen 1 M Natriumchlorid.
- Reinigung II: 1 M Natriumhydroxid mit 20 \% (v/v) Isopropanol auftragen bis ein Peak eluiert, diesen verwerfen und dann die Reinigungslösung für 1 h rezirkulieren.
- Das Eluat wurde zur Partikelabtrennung vor dem Einfrieren sterilfiltriert.

2.2.1.1 Bestimmung der Partikelkonzentration mit dem CASY[®]

Mit dem CASY[®] (Modell TCC, Schärfe-Systems, Reutlingen) konnte die Partikelkonzentration im geernteten Perfundat und dem Eluat der Fließbettchromatographie bestimmt werden. Das Gerät funktionierte nach dem Widerstandsmessprinzip kombiniert mit einer Pulsflächenanalyse (Schärfe, 1988). Zur Messung wurde die Probensuspension durch eine Kapillare zwischen zwei Elektroden gepumpt. Je nach Partikelgröße wurde das elektromagnetische Feld zwischen den Elektroden verändert, da die Partikel einen von dem CASYton[®]-Puffer differierenden Widerstand hatten.

2.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie (engl. *hydrophobic interaction chromatography*, HIC) ist ein auf dem Prinzip des Aussalzens beruhendes Chromatographieverfahren. Dabei wird die Hydrathülle durch Salz verdrängt und die hydrophoben Aminosäuren des Proteins können mit einem hydrophoben Liganden interagieren. Die HIC wurde zur Primäraufreinigung oder als intermediärer Aufreinigungsschritt mit Ammoniumsulfat oder Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als Matrix dienten 18 mL Phenyl Sepharose[™] 6 FF (GE Healthcare Europe GmbH) mit einem Partikeldurchmesser von 90 µm (GE Healthcare Europe GmbH) in einer XK26-Säule (Durchmesser 26 mm, Betthöhe 34 mm, GE Healthcare Europe GmbH). Als Chromatographiesystem wurde bei linearen Flussraten von 113 cm/h ein FPLC[™]-System (GE Healthcare Europe GmbH) eingesetzt. Die optimierten Pufferbedingungen waren:

- Äquilibrierung: zehn Säulenvolumen 0,06 M Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,8 M Ammoniumsulfat, pH 7,00, Leitfähigkeit 120 mS/cm.
- Waschen I: zwei Säulenvolumen des Äquilibrierungspuffers.
- Waschen II: ein Säulenvolumen 0,06 M Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2 M Natriumchlorid, pH 7,00, Leitfähigkeit 29 mS/cm.
- Elution: 0,02 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, Leitfähigkeit 1,6 mS/cm, 20 % Isopropanol. Die ersten 20 mL des Elutionspeaks wurden in 20 mL des ersten Puffers der nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie aufgefangen.
- Reinigung: zehn Säulenvolumen 1 M Natriumhydroxid mit 20 % Isopropanol.

2.2.3 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie (engl. *anion exchange chromatography*, AEX) basiert auf der negativen Ladung des Proteins durch Einstellung eines pH-Werts über dem isoelektrischen Punkt des Produkts. Da der pI der 22 kDa-Variante des hGH bei 5,27 liegt, wurde zur Gewährleistung einer hohen Kapazität ein pH-Wert von 6,30 eingestellt. Als Puffer wurde 0,02 M Bis-Tris mit einer linearen Flussrate von 149,2 cm/h eingesetzt. Als Matrix dienten 18 mL Q Sepharose™ HP (GE Healthcare Europe GmbH) mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 34 µm, die in einer XK16-Säule (Durchmesser 16 mm, Betthöhe 90 mm, GE Healthcare Europe GmbH) eingesetzt wurden. Die optimierten Pufferbedingungen waren:

- Äquilibration: zehn Säulenvolumen 0,025 M Bis-Tris, pH 6,30, Leitfähigkeit 2,1 mS/cm.
- Waschen: zwei Säulenvolumen des Äquilibrationpuffers.
- Elution: 0,025 M Bis-Tris, 0,3 M Natriumchlorid, pH 6,30, Leitfähigkeit 30,4 mS/cm.
- Reinigung: zehn Säulenvolumen 1 M Natriumhydroxid mit 20 % Isopropanol.

2.2.4 Semipräparative Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde als Verfahren zur Abtrennung von Dimeren und Oligomeren eingesetzt und beruht auf dem Prinzip der Größenverteilung in einer porösen Matrix. Es wurde hierzu eine Superdex™ 75 prep grade 10/300-Säule (Durchmesser 10 mm, Betthöhe 280 mm, GE Healthcare Europe GmbH) mit 22 mL Gelmaterial benutzt. Als Chromatographiesystem wurde ein Äkta™ Purifier (GE Healthcare Europe GmbH) eingesetzt und mit linearen Flussraten zwischen 38,2 cm/h und 76,4 cm/h betrieben. Als Puffer wurde 0,05 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,30 mit 0,1 M Natriumchlorid verwendet. Laut Herstellerangabe würde eine gepackte Fertigsäule mindestens 13000 theoretische Böden erreichen. Sie musste jedoch unter Materialverlust neu gepackt werden, woraufhin eine Bodenzahl von 6424 theoretischen Böden bei einem Asymmetriefaktor von 1,29 erreicht wurde; die Trennstufenhöhe betrug 46,6 µm.

2.2.5 Berechnungen zur Aufreinigung

Bodenzahl

In der Chromatographie ist die Zahl der theoretischen Böden ein Maß für die Trennqualität einer Säule. Die Bodenzahl gibt die absolute Zahl der theoretischen Böden an und ist damit auch von der Säulenhöhe abhängig. Zu ihrer Bestimmung wird nach Äquilibration der Säule

ein Puls des Äquilibriumspuffers mit 2 % (v/v) Aceton in einem Volumen von 0,2 % des Säulenvolumens aufgetragen, wobei die Detektion über die UV-Absorption erfolgt. Dabei wurde die Bestimmung der Bodenzahl gemäß der Formel 27 entweder graphisch-manuell oder automatisch über die Unicorn™-Software (GE Healthcare Europe GmbH) durchgeführt.

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (27)$$

Wobei N: Bodenzahl [-], t_r : Retentionszeit [s], $w_{1/2}$: Peakbreite auf halbmaximaler Peakhöhe [s].

Trennstufenhöhe

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Säulenpackung ist die Trennstufenhöhe (engl. *height equivalent of theoretical plates*, HETP). Zur Berechnung wird die Säulenlänge durch die Bodenzahl dividiert:

$$HETP = \frac{L_s}{N} \quad (28)$$

Wobei L_s : Säulenlänge [m].

Asymmetriefaktor

Der Asymmetriefaktor kann aus dem zur Bestimmung der Bodenzahl herangezogenen Acetonpeak berechnet werden. Er ist ein Maß für die Güte der Packung und sollte für die in dieser Arbeit verwendete Superdex™ 75 HR 10/300-Säule Werte zwischen 0,70 und 1,30 annehmen. Zur Bestimmung wird ausgehend vom im Peakmaximum gefällten Lot bei 10 % der Peakhöhe die Asymmetrie der Retentionszeiten ermittelt und in ein Verhältnis gesetzt. Die Berechnung wurde von der Unicorn™-Software gemäß der folgenden Gleichung durchgeführt.

$$A_s = \frac{a}{b} \quad (29)$$

Wobei A_s : Asymmetriefaktor [-], a: Elutionsdauer erste Peakhälfte bei 10 % Peakhöhe [s], b: Elutionsdauer zweite Peakhälfte bei 10 % Peakhöhe [s].

2.3 Bestimmung der Produktquantität und -qualität

2.3.1 ELISA

Die Konzentrationsbestimmung des humanen Wachstumshormons aus Blutproben ist in der Klinik großen Fehlern unterworfen (Wood, 2001). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) können durch spezifische Antikörper geringe Konzentrationen der 22 kDa-Variante des hGH nachgewiesen werden. Es wurde ein kommerzielles Kit (hGH ELISA, Kat. Nr. 1 585 878, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) zur Verifikation des routinemäßig eingesetzten chromatographischen Verfahrens eingesetzt. In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die Produktkonzentrationen trotz einer Doppelbestimmung im ELISA im Vergleich zu den in der RP-HPLC gemessenen Werten starken Schwankungen unterlagen.

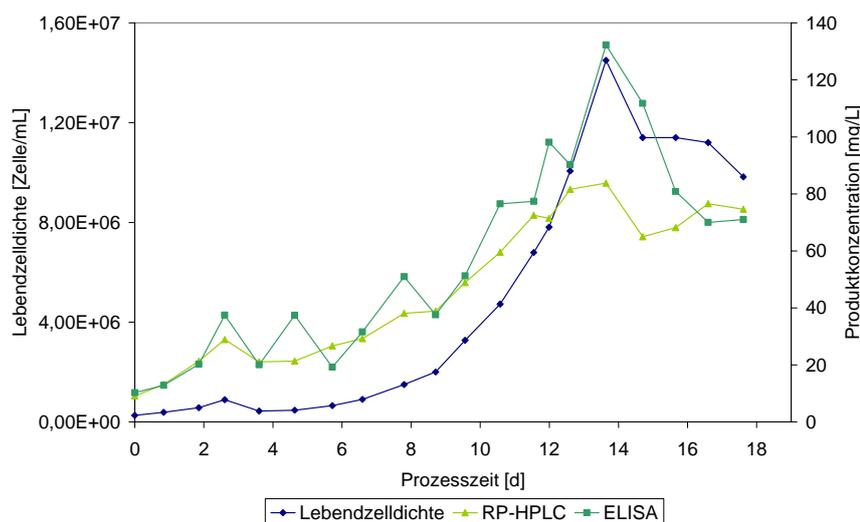


Abbildung 16: Vergleichende Auftragung der mit dem ELISA und der RP-HPLC ermittelten Produktkonzentrationen während eines Perfusionsprozesses.

2.3.2 Umkehrphasenchromatographie zur Produktquantifizierung

Aufgrund der Automatisierbarkeit wurde routinemäßig eine Umkehrphasenhochleistungschromatographie (engl. *reversed phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) zur Bestimmung der Produktkonzentration benutzt. Eine Differenzierung von 20- und 22 kDa-Variante war hiermit nicht möglich. Es wurde eine C₄-Säule (Nucleosil, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 300 Å, Länge 0,125 m, Durchmesser 4,0 mm, Macherey-Nagel, Düren) mit einer Flussrate von 1,0 mL/min eingesetzt. Der Puffer A bestand aus 99,9 % Wasser für Injektionszwecke (engl. *water for injection*, WFI) mit 0,1 % Trifluoressig-

säure (TFA); der Puffer B bestand zu 80 % aus Acetonitril, zu 20 % aus WFI und 0,1 % TFA. Der binäre Gradient verlief von 80 % Puffer A zu 95 % Puffer B. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 214 nm. Die Proben wurden vor der Messung auf eine Konzentration von 55 mg/L verdünnt. Der hGH-Standard wurde von der Europäischen Direktion für die Qualität von Medikamenten (engl. *European Directorate for the Quality of Medicines*, EDQM) bezogen (Somatotropin BRP CRS, Kat. Nr. S0947000, EDQM, Straßburg, Frankreich).

2.3.3 RP-HPLC zur Desamidierungsanalytik

Das Polypeptid der 22 kDa-Variante des humanen Wachstumshormons enthält neunmal die Aminosäure Asparagin und 13mal Glutamin. Insbesondere Asparagin-149, Asparagin-152 und in geringerem Umfang Glutamin-135 unterliegen einer Konversion zu Aspartat und Glutamat, die unter alkalischen Bedingungen verstärkt wird (Pearlman und Bewley, 1993). Desamidiertes Wachstumshormon unterliegt *in-vivo* einer schnelleren Proteolyse (Lewis *et al.*, 1981). Mit der Umkehrphasenhochleistungschromatographie wurde die Produktqualität bezüglich auftretender Desamidierungen untersucht (Pharmakopöe 5.3, 2006). Dieses Verfahren ist in Bezug auf die Bestimmung desamidierten Produkts redundant zum aufwändigeren Verfahren der Kapillarzonenelektrophorese, das gemäß Pharmakopöe zusätzlich durchzuführen ist. Eine weitere Modifikationsform des rhGH ist die Sulfoxidation, primär an Methionin-14 (Pikal *et al.*, 1991). Diese weist bei dem in dieser Arbeit eingesetzten RP-HPLC-Verfahren eine identische Retentionszeit wie die monodesamidierten Varianten auf (Riggin *et al.*, 1987). Es wurde eine RP-HPLC-Säule von Phenomenex (Jupiter C₄, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 300 Å, Länge 0,250 m, Durchmesser 4,6 mm) eingesetzt. Das isokratische Laufmittel bestand in Abweichung zur Pharmakopöe im Verhältnis 28:72 aus 1-Propanol und 0,05 M Tris, pH 7,40. Die Säule wurde auf 40 °C temperiert, die Flussrate betrug 0,5 mL/min und die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 214 nm. Die relative Retentionszeit von Desamididosomatropin zu Somatotropin beträgt 0,85. Der Anteil an desamidiertem Somatotropin soll 6 % nicht überschreiten (Pharmakopöe 5.3, 2006). Der mögliche Einfluss von Einfriervorgängen auf den Anteil desamidierten Somatotropins wurde durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen einer Probe untersucht. Zur Herstellung desamidierten Somatotropins wurde EDQM-Standard in 0,05 M Tris, pH 7,50 mit 0,1 mg/L Natriumacid solubilisiert und für drei Tage bei Raumtemperatur gelagert. Unter den genannten Pufferbedingungen wurde durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren der Probe der Prozentsatz an desamidiertem Somatotropin nicht erhöht (Abbildung 17).

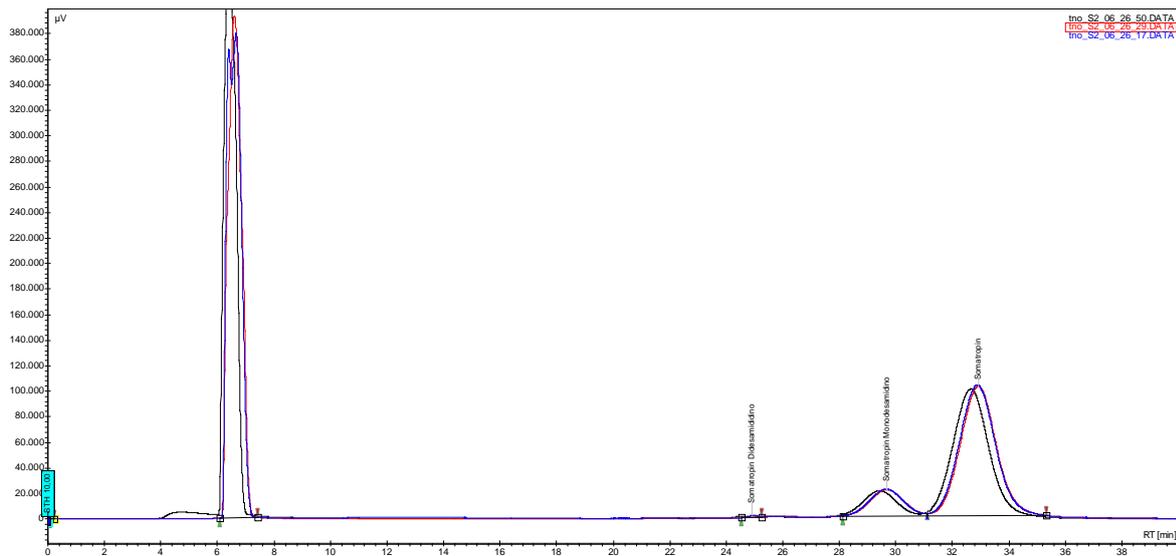


Abbildung 17: Serie von drei Chromatogrammen der RP-HPLC zur Bestimmung des Anteils desamidier-ten Somatotropins. Zunächst eluiert Didesamido-rhGH, dann Monodesamido-rhGH und zuletzt nicht desamidiertes rhGH.

Eine eventuelle Abhängigkeit der relativen Peakflächen von der Produktkonzentration konnte in einer Versuchsreihe mit verschiedenen Verdünnungen eines nicht-quantitativ desamidierten rhGH-Standards ausgeschlossen werden (Tabelle 2). Der untersuchte Konzentrationsbereich entsprach den in der Kultivierung und der Aufreinigung auftretenden Konzentrationen.

Tabelle 2: Abhängigkeit der relativen Peakflächen von den eingesetzten rhGH-Konzentrationen. Desamidiertes Somatotropin wurde in verschiedenen im Prozess auftretenden Konzentrationen chromatographiert. Nicht-desamidiertes rhGH wird im Folgenden auch als Adesamido-rhGH bezeichnet.

Konzentration [mg/L]	Adesamido-rhGH [%]	Monodesamido-rhGH [%]	Didesamido-rhGH [%]
2000	83,6	15,7	0,6
1000	83,9	15,4	0,7
500	84,0	15,4	0,6
250	83,8	15,3	0,7
125	82,8	16,1	0,4

2.3.4 Analytische Größenausschlusschromatographie

Mit dem in der Pharmakopöe beschriebenen Verfahren der Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) konnte der Anteil des rhGH-Monomers im Verhältnis zu Dimeren und Oligomeren bestimmt werden (Pharmakopöe 5.3, 2006). Hierzu wurde eine TSKgel SuperSW2000-Säule verwendet (Kieselgelmatrix, Partikeldurchmesser 4 µm, Säulenlänge 0,30 m, Säulendurchmesser 4,6 mm, Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart). Das Laufmittel bestand im Verhältnis 3:97 aus 2-Propanol und 0,063 M Phosphatpuffer, pH 7,00.

Es wurden 50 μL Probe aufgetragen, wobei die Flussrate 0,25 mL/min betrug. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 214 nm. Dimere des Wachstumshormons eluierten bei 90 % der Elutionszeit des Monomerpeaks, Oligomere und andere Proteine bei 65 % der Elutionszeit des Monomers. Der Monomeranteil sollte laut Pharmakopöe über 96 % liegen.

Zur Standardisierung der Methode wurde lyophilisiertes Somatotropin (EDQM) einer Hitzebehandlung zur nicht-quantitativen Dimerisierung unterzogen (Pharmakopöe 5.3, 2006). Nach Solubilisierung des Lyophilisats wurde eine Chromatographie zur Trennung von Monomeren und Dimeren durchgeführt (Abbildung 18). Vor der Hitzebehandlung enthielt der Standard 0,21 % Dimere und nach der Hitzebehandlung 2,57 % Dimere, wobei Oligomere nach der Probenbehandlung nicht auftraten. Der Peak bei 7,5 Minuten war der Injektionspeak und nach dem Monomerpeak eluierten niedermolekulare Substanzen.

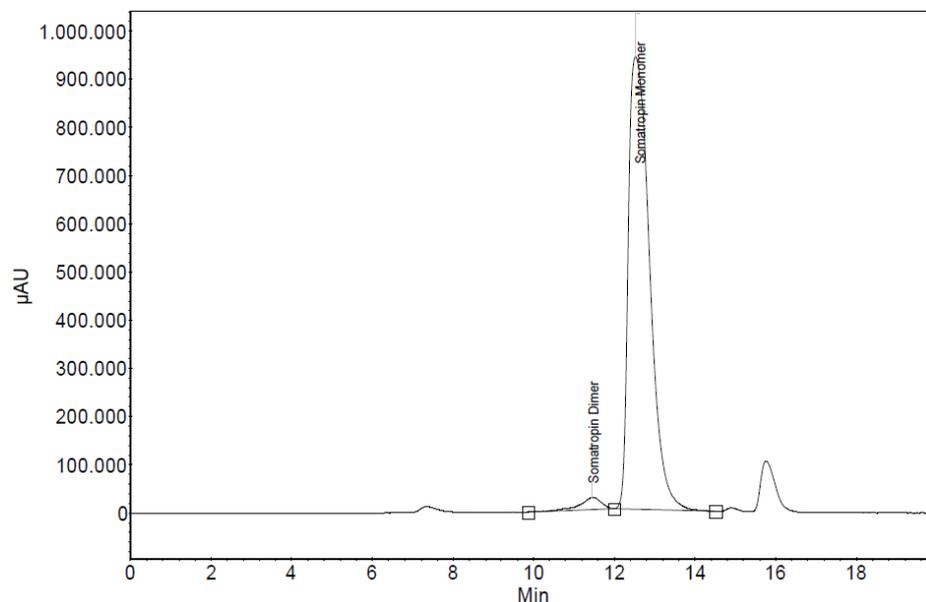


Abbildung 18: Chromatogramm der analytischen SEC zur Trennung von Monomeren und Dimeren nach Hitzebehandlung von rhGH-Standard.

Zur Herstellung einer Kalibrierkurve wurden Substanzen verschiedener Molmassen chromatographiert. Die Substanzen mit den zugehörigen Molmassen und Retentionszeiten sind in Tabelle 3 angegeben. Aus diesen Werten kann dann mit Formel 30 die Selektivität der Säule für den interessierenden Größenbereich berechnet werden.

Tabelle 3: Retentionszeiten von Substanzen verschiedener Molmassen in der analytischen SEC.

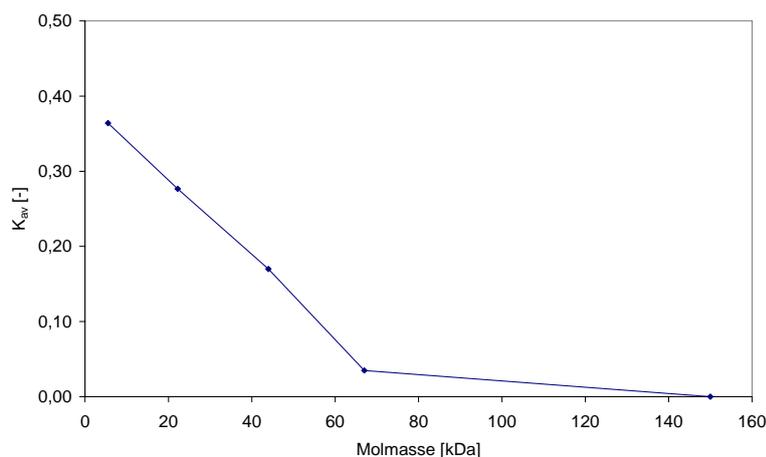
Substanz	Molmasse [kDa]	Retentionszeit [min]
IgG	150,00	9,70
Bovines Serum Albumin Fraktion V	67,00	10,06
Humanes Wachstumshormon Dimer	44,00	11,45
Humanes Wachstumshormon Monomer	22,20	12,55
Bovines Insulin	5,50	13,45

Mittels der folgenden Gleichung 30 kann die Selektivität der gepackten Säule berechnet werden. Die Werte für die Selektivität müssen zwischen 0 und 1 liegen. Größere Werte sind ein Indiz für eine unspezifische Interaktion des Analyten mit der Matrix und Werte unter 0 weisen auf eine Kanalbildung im Gelbett hin (Amersham Biosciences, 2002).

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)} \quad (30)$$

Wobei K_{av} : Selektivität [-], V_e : Elutionsvolumen [mL], V_o : Totvolumen [mL] und V_t : Säulenvolumen [mL].

Im Molmassenbereich zwischen 5,5 kDa und 67,0 kDa verhielt sich die Selektivität linear (Abbildung 19). Daher war die Säule zur Quantifizierung von rhGH-Monomeren und rhGH-Dimeren geeignet.

**Abbildung 19: Darstellung der Selektivität der analytischen SEC-Säule.**

2.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) konnte die Produktreinheit visualisiert werden. Durch SDS werden Ladungsunterschiede der Proteine egalisiert und nicht-kovalente Bindungen zerstört. Die elektrophoretische Mobilität hängt somit von der Proteingröße ab. Durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol können über Disulfidbrücken verbundene rhGH-Dimere gespalten werden. Grigorian *et al.* (2005) konnten weitgehend Mercapthoethanol-resistente rhGH-Dimere nachweisen.

Eine Quantifizierung zur Bestimmung der Produktreinheit ist über eine densitometrische Auswertung (TotalLab, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Großbritannien) bei SimplyBlue™-gefärbten NuPage®-Gelen (Novex Bis-Tris, Invitrogen) mit einer Sensitivität von etwa 100 ng Protein möglich (Lottspeich und Zorbas, 1998). Bei der sensitiveren Silberfärbung nach Heukeshoven (Sensitivität etwa 10 pg Protein), die automatisiert von einem PhastSystem™ (GE Healthcare Europe GmbH) mit Gradientengelen (PhastGradient™ 8-25 %) durchgeführt wurde, war dies nicht möglich.

2.3.6 Nb2-Zellproliferationstest

Kleine Wirkstoffmoleküle können strukturell über Verfahren wie die Kernmagnetische Resonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) aufgeklärt werden. Damit kann im Sinne des Arzneimittelbuches die Wirkstoffidentität von Generika nachgewiesen werden. Die NMR kann zur Strukturaufklärung von Proteinen größer als 15 kDa nur eingeschränkt herangezogen werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Eine Charakterisierung des humanen Wachstumshormons ist mit den bisher vorgestellten Methoden möglich, leistet aber keine strukturelle Aufklärung der Tertiärstruktur. Deshalb muss die biologische Wirksamkeit während der Prozessentwicklung in einem geeigneten *Bioassay* untersucht werden (Pharmakopöe 5.3, 2006). Der Nb2-Zellproliferationstest ist ein *in-vitro*-Modell zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit von rhGH. Die Zelllinie ist in ihrem Wachstumsverhalten stark abhängig von der Zugabe einer promitotisch wirkenden Substanz wie Insulin, IGF-1 oder rhGH (Horseman, 1995). Bei dem Test wird der über den Prolactinrezeptor vermittelte promitotische Effekt des rhGH auf die Rattenlymphomzelllinie Nb2-11 (ECACC, Nr. 97041101) untersucht (Tanaka *et al.*, 1980, Horseman, 1995).

Als Indikator der metabolischen Aktivität fungierte die Reduktion von Resazurin in das fluoreszenzfähige Resofurin von cytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen nach vierstün-

diger Inkubation (Pagé *et al.*, 1993). Die Fluoreszenz des Resofurin wurde bei 590 nm in einem Elisa-Reader (GENios Pro™, Tecan Schweiz AG, Schweiz) nach Anregung bei 560 nm gemessen.

2.3.7 Tierversuch

Das Tiermodell diente der Beurteilung der *in-vivo*-Wirksamkeit von rhGH. Hierbei wurde hypophysectomierten Ratten rhGH oder Tris-Puffer injiziert und die Gewichtszunahme im Vergleich zu nicht-hypophysectomierten Tieren ausgewertet.

Für den Tierversuch wurden 24 fünf Wochen alte, weibliche *Sprague-Dawley*-Ratten hypophysectomiert. Ab dem siebten postoperativen Tag wurde das Gewicht der Tiere für zehn Tage gemessen und nur die Tiere für den Versuch eingesetzt, die in diesem Zeitraum eine Gewichtszunahme unter 7 g aufwiesen und zwischen 90 g und 105 g wogen. Zur Minimierung der Varianz der Durchschnittsgewichte wurden die Tiere in vier Behandlungsgruppen eingeteilt. Unabhängig von den Behandlungsgruppen wurden die Tiere randomisiert auf vier Käfige verteilt. Die Umgebungsbedingungen Temperatur und Lichtstärke wurden kontrolliert und die Tiere mit pelletierter Nager-Nahrung und deionisiertem Wasser gefüttert. Innerhalb von 21 Tagen nach der Operation wurde der Versuch gestartet. Die auf ihren wachstumsfördernden Effekt zu untersuchende Substanz wurde 24 Stunden vor der Anwendung aufgetaut und bei 4 °C inkubiert. Die humanes Wachstumshormon enthaltenden Lösungen wurden in 0,01 M Tris-HCl, 0,1 M Natriumchlorid, pH 7,50, auf die Zielkonzentration eingestellt. Zwischen 8:00 Uhr und 9:00 Uhr wurde täglich das Gewicht der Tiere bestimmt und im Anschluss 0,1 mL der Probe subkutan in den Nackenansatz injiziert. Die Behandlungsdauer betrug elf Tage (persönliche Kommunikation Nick Hunt, Altonabiotec AG, Hamburg).

2.3.8 Bestimmung der Quantität an Wirtszellprotein

Proteine nicht-humaner Spezies können bei parenteraler Applikation zu Immunreaktionen führen. Als Quelle von Zellkultur-bedingten Verunreinigungen (engl. *cell culture related impurities*, ICH 6QB, 1999), zu denen neben Proteinen auch andere Substanzen wie Antibiotika zählen, kommen Zellkulturmedien in Betracht. Diese enthielten lange Zeit fötales Kälberserum, Transferrin oder Serumalbumin. Im in dieser Arbeit eingesetzten Mediengemisch waren lediglich 0,5 mg/L rekombinantes Insulin enthalten. Daher war die Hauptverunreinigungsquelle für Proteine die eingesetzte Zelllinie. Wirtszellprotein (engl. *host cell protein*, HCP) zählt zu den Prozess-bedingten Verunreinigungen (engl. *process-related impurities*, ICH Q6B,

1999). Für die Grenze der Verunreinigung mit HCP gibt es keine genauen Vorgaben. In der Regel sollen 100 ppm HCP/rhGH pro therapeutischer Dosis unterschritten werden (WHO, 1998, Wolter und Richter, 2005). Bei einer mittleren therapeutischen Dosis von 34 µg rhGH/kg Körpergewicht und Tag (MacGillivray *et al.*, 1998) würde einem 30 kg schweren Kind bei täglicher Applikation je 1 mg rhGH injiziert. Damit wäre 100 ng HCP je Dosis zulässig. Zur Detektion von Verunreinigungen durch andere Proteine als das Zielprotein kann ein SDS-PAGE eingesetzt werden, der bei einer Silberfärbung eine Detektionsgrenze von etwa 10 ng hat. In dieser Arbeit diente zusätzlich ein generischer ELISA (Kat. Nr. CM015, Cygnus Technologies Inc., Southport, North Carolina, USA) der Quantifizierung von Wirtszellprotein. Die Nachweisgrenze für HCP betrug zwischen 0,7 ng/mL und 2 ng/mL. Es ist zu beachten, dass nicht alle Wirtszellproteine in gleichem Maße immunogen sind und daher komplementäre Verfahren wie ein SDS-PAGE zur Abschätzung der Produktreinheit erforderlich sind. Außerdem werden in der Industrie konfektionierte HCP-ELISA für eventuell während der Produktaufreinigung angereicherte Wirtszellproteine eingesetzt (Wolter und Richter, 2005).

2.3.9 Bestimmung der Quantität doppelsträngiger DNA

Die Produktion von klinischem Material mit transformierten Zelllinien birgt das grundsätzliche Risiko der Transmission onkogener DNA-Fragmente des Wirtsorganismus (Walter und Werner, 1993). Doppelsträngige DNA (dsDNA) des Wirtsorganismus (engl. *host cell* DNA, HCDNA) gehört zu den Prozess-bedingten Verunreinigungen (ICH 6QB, 1999) und darf maximal eine Menge zwischen 0,10 ng (Wolter und Richter, 2005) und 10 ng (WHO, 1998) pro therapeutischer Dosis erreichen. Die Bestimmung der Quantität der dsDNA wurde mit dem Quant-iT-Kit (Kat. Nr. P7589, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) durchgeführt. Der Test beruht auf einem Fluoreszenzfarbstoff (PicoGreen[®]), der nach Interkalation in die dsDNA fluoresziert. Die Sensitivität des Tests liegt zwischen 25 pg/mL und 1 ng/mL. Das Verfahren ist sensitiv gegenüber Mediensupplementen wie Phenolrot und Albumin, die im Kulturmedium jedoch nicht enthalten waren, aber auch gegenüber Variationen der Pufferbedingungen und insbesondere des pH-Werts (Ameskamp, 2001).

Zur Standardisierung des Verfahrens wurde eine Fermenterprobe, die eine dsDNA-Konzentration von 4882 ng/mL aufwies, auf pH 4,00 eingestellt, wie dies in einer Variante der Primäraufreinigung der Fall war. Die apparente dsDNA-Konzentration sank schnell auf einen Wert von ca. 800 ng/mL, der auch nach einer für die Primäraufreinigung typischen Inkubationszeit konstant blieb. Durch Einstellen des pH-Werts auf 7,00 mit Natriumhydroxid

nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden konstant höhere dsDNA-Konzentrationen um 3600 ng/mL gemessen (Abbildung 20). Daraus konnte ein Korrekturfaktor zur Bestimmung der dsDNA-Konzentration berechnet werden.

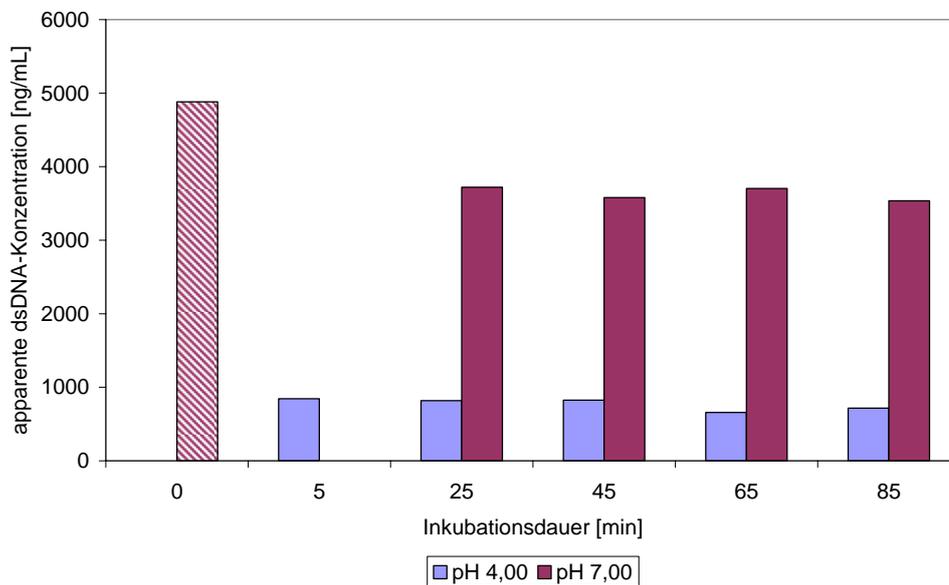


Abbildung 20: Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Quant-iT-Assays. Die Ausgangslösung (schraffiert) hatte eine dsDNA-Konzentration von 4882 ng/mL. Nach Einstellen auf pH 4,00 sank die apparente dsDNA-Konzentration schnell auf einen Wert von ca. 800 ng/mL ab. Durch Anheben des pH-Werts auf 7,00 nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden konstant höhere dsDNA-Konzentrationen um 3600 ng/mL gemessen.

Für verschiedene Ammoniumsulfatkonzentrationen (siehe Tabelle 4), sowie in den Chromatographieschritten verwendete Puffer (siehe Tabelle 5) wurden ebenfalls entsprechende Korrekturfaktoren ermittelt

Tabelle 4: Ermittelte Korrekturfaktoren zur DNA-Messung bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen. Als Basispuffer wurde 0,02 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, eingesetzt.

Ammoniumsulfatkonzentration [M]	Korrekturfaktor [-]
1,3	2,31
1,0	2,43
0,8	2,23
0,5	1,58
0,1	1,00

Tabelle 5: Ermittelte Korrekturfaktoren für Chromatographiepuffer.

Puffer	Korrekturfaktor
	[-]
0,020 M Natriumcitrat, pH 4,00, 0,11 M NaCl	1,15
0,020 M Natriumacetat, pH 5,60, 0,11 M NaCl	1,14
0,020 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,00	1,02
0,020 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,50, 0,25 M (NH ₄) ₂ SO ₄	2,07
0,020 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,50, 0,20 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,97
0,020 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,00, 5 % Isopropanol	0,95
0,020 M Na ₂ HPO ₄ , pH 7,00, 10 % Isopropanol	1,00
0,020 M Bis-Tris, pH 6,30, 0,07 M NaCl	1,13

2.3.10 Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Identifikation von Proteinen aus SimplyBlue™-gefärbten Nu-Page®-Gelen wurden die in Frage kommenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für den tryptischen Verdau (Fountoulakis und Langen, 1997) wurde je $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ der präparierten Banden verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat wurden die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 0,03 M Tris-HCl, pH 8,8 + Trypsin (10 ng/ μ L, Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine, Promega) aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Lagerung bei -20 °C oder der Verwendung im MALDI-TOF-MS wurden 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure zugegeben.

Vor der Massenspektrometrie wurden 1 μ L des tryptischen Verdau mit 1 μ L HCCA-Matrix (gesättigte α -Cyano-4-hydroxymizsäure in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) auf einem AnchorChip™ (Bruker Daltonics GmbH, Bremen) vermischt und die Probe bei Raumtemperatur getrocknet. Mit einem MALDI-TOF-MS (Ultraflex™-1, Bruker Daltonics) wurden dann Peptid-Massenspektren aufgenommen, wobei die Kalibrierung extern anhand der einfach geladenen Ionen von Angiotensin, Substance-P und ACTH-clip 1-17 erfolgte. Die Massenspektrometrie wurde bei 25 kV im Positivmodus am Institute for Genome Research der Universität Bielefeld durchgeführt.

Nach der Prozessierung und dem *Labeling* der Peptid-Massenspektren mit der Flex-Analysis™-Software wurden Datenbankabfragen mit der BioTools™-Software (Bruker Daltonics) und Mascot (Matrix Science, London) durchgeführt. Für die Suche wurden eine Massentoleranz von 50-100 ppm, 1 „missed cleavage site“ und die Oxidation von Methionin-Resten als Parameter vorgegeben. Zusätzlich zur Datenbank-Suche wurden die Massenlisten und Spektren der verschiedenen Proben manuell miteinander und einem theoretischen Verdau

verglichen und auf relevante Peptide zur Identifikation als 20 oder 22 kDa-Variante oder Fragment des rhGH untersucht.

3 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnis- und Diskussionsteil gliedert sich in drei Hauptabschnitte: Im Ersten wird die Entwicklung des Produktionsprozesses für das humane Wachstumshormon in einem kontinuierlichen Perfusionsprozess dargestellt. Im zweiten Abschnitt wird die entwickelte Aufreinigungsstrategie für das humane Wachstumshormon vorgestellt. Der dritte Abschnitt behandelt die spezielle Analytik des Produkts in der Massenspektrometrie und in biologischen Systemen.

3.1 Perfusionsprozess zur Herstellung des humanen Wachstumshormons

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines hochproduktiven und robusten Perfusionsprozesses zur Herstellung des humanen Wachstumshormons. Zur Erleichterung der anschließenden Produktaufreinigung sollten hohe Produktkonzentrationen in möglichst kleinen Erntevolumina erreicht werden. Daher wurden die zellspezifischen Verdünnungsraten reduziert, wozu Temperatur- und pH-Shifts unter Kontrolle der Produktbildung und -qualität unternommen wurden. Im Rahmen einer assoziierten Diplomarbeit wurde ein Fed-Batch-Prozess entwickelt, der einen Vergleich der beiden Prozessführungsstrategien erlaubte. Dabei wurde ein definiertes Medium entwickelt. In allen anderen Prozessen wurde ProCHO[®]5 im Verhältnis 1:20 mit MAM-PF[®]2 eingesetzt, deren Zusammensetzung nicht bekannt war. Zudem enthielt ProCHO[®]5 mit einem Sojabohnenhydrolysat eine nicht-definierte Komponente. Im Perfusionsprozess mit Taumelrührer wurde ProCHO[®]4, das etwas niedrigere Substratkonzentrationen aufweist, an Stelle von ProCHO[®]5 eingesetzt. In Tabelle 6 sind die Untersuchungsziele der Kultivierungen zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der dargestellten Prozesse mit den im Folgenden verwendeten Abkürzungen. 8-SSBR: 8-Segmentschrägblattrührer, 3-SSBR: 3-Segmentschrägblattrührer.

Bezeichnung	Strategie	Rührertyp	Begasungsart	Untersuchungsziel
T	Perfusion	Taumelr.	Membran	Zelldichtekonstanz
M1	Perfusion	8-SSBR	Membran	pH-Wert und Leistungseintrag
M2	Perfusion	8-SSBR	Membran	Temperaturabsenkung
M3	Perfusion	8-SSBR	Membran	Minimierung Mediumverbrauch
R	Perfusion	3-SSBR	Submers	Blasenbegasung
FB	Fed-Batch	8-SSBR	Submers	pH-Shift, Temp.-Shift, Boluszufütterung

3.1.1 Prozess T: Einsatz von Taumelrührern

Zu Beginn der Prozessentwicklung wurde zur Durchmischung des Bioreaktors ein Taumelrührer mit Begasung über eine 12 m lange Polypropylenmembran (Lehmann *et al.*, 1992) verwendet. Es konnten mit diesem System Lebendzellichten von maximal $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht werden. Da der Taumelrührer bei über 48 UPM die magnetische Kopplung verlor, war eine Erhöhung des Leistungseintrags nicht möglich. Dies hatte zwei Nachteile: Zum einen war die maximal erreichbare Zelldichte durch die Gasversorgung über die Membran limitiert, zum anderen führte der geringe Leistungseintrag durch den Taumelrührer zu einer hohen Zellaggregation. Zur Illustration dieser Sachverhalte wird im Folgenden der Prozess T (Taumelrührer) vorgestellt. Das Mischungsverhältnis des Mediums von 1:21 (ProCHO[®]5:MAMPF[®]2) wich geringfügig von dem in den anderen Prozessen eingesetzten Mischungsverhältnis ab (1:20).

Ein in nicht dargestellten Vorversuchen untersuchter Parameter war die Temperatur, auf die die Zellsuspension vor Eintritt in den Schrägrohrsedimenter gekühlt wurde. Dabei zeigte sich, dass die spezifische Wachstumsrate bei Kühlung auf 10 °C anstelle von 20 °C auf einen Wert von 0,20/d halbiert war (Höra, 2005). Daher wurde in der Folge die Temperatur auf 20 °C eingestellt. Dies hatte zudem den Vorteil, dass keine Temperaturgradienten im nicht temperierbaren Sedimenter auftraten.

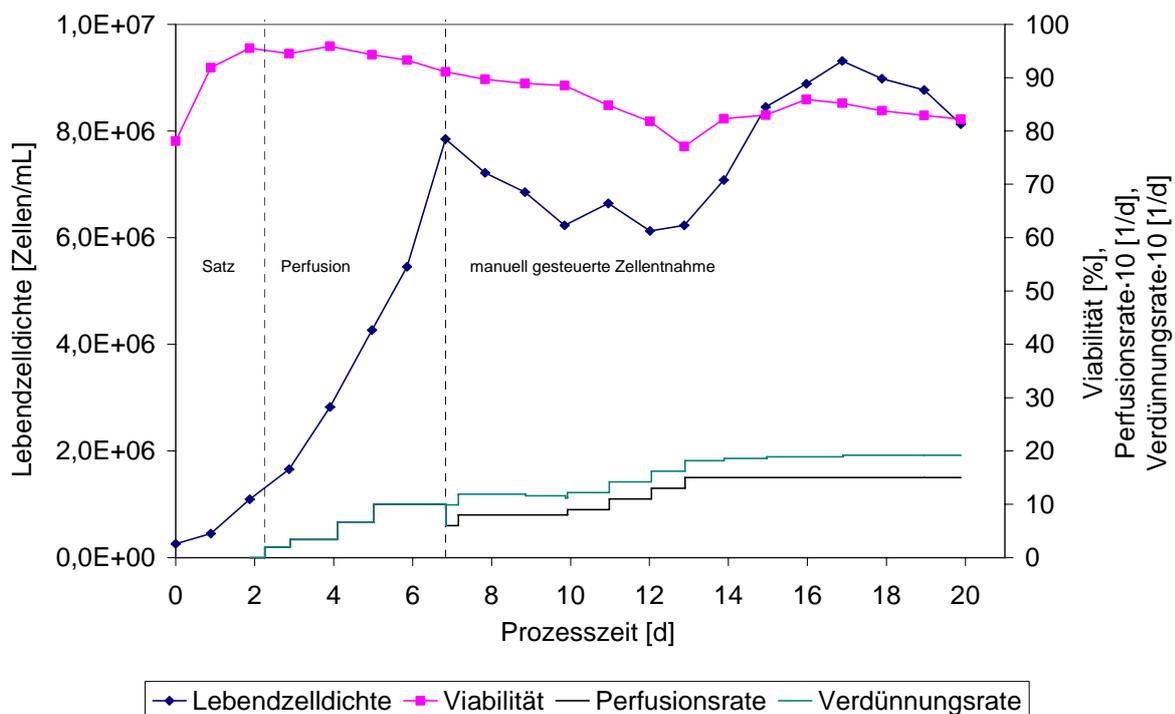


Abbildung 21: Lebendzellichten, Viabilitäten, Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses T.

Der Prozess T wurde mit einer Lebendzellkonzentration von $2,61 \cdot 10^5$ Zellen/mL angeimpft. Die Abbildung 21 zeigt die drei Phasen des Perfusionsprozesses: das initiale Anwachsen im Satz, die Perfusion ohne Zellentnahme und ab Tag 7 die Perfusion mit Zellentnahme. Während der Perfusionsphase wurden Lebendzellkonzentrationen zwischen $6,5 \cdot 10^6$ und $9,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL erreicht. Zur Vermeidung einer Sauerstoff-Limitation wurde die Zelldichte durch eine kontinuierliche Entnahme von Zellen aus dem Bioreaktor in diesem Wertebereich gehalten. Die bis zur Prozesszeit 12,88 Tage fallende Viabilität konnte durch Zugabe von 100 mL ProCHO[®]5 verbessert werden. Die Metabolite Ammonium und Lactat erreichten maximale Konzentrationen von 3,88 mM beziehungsweise von 36 mM. Limitationen der gemessenen Nutrienten (Glucose und Aminosäuren) traten nicht auf (Daten nicht gezeigt). Durch die manuelle Anpassung der Zellentnahmerate an die spezifische Wachstumsrate, die sich zwischen 0,25/d und 0,53/d bewegte, konnte die Zelldichte nicht konstant gehalten werden. Ursächlich hierfür war die fehlerbehaftete Zelldichtebestimmung und damit ungenau berechnete Wachstumsraten und eine in zu großen Intervallen einstellbare Zellentnahmepumpe (501 U, Watson-Marlow). Die Zellentnahme erfolgte abweichend zu den später dargestellten Prozessen über ein Tauchrohr aus dem Bioreaktor. Der Prozess musste aufgrund einer bakteriellen Kontamination nach 24 Tagen beendet werden. Die drei letzten Tage der Kultivierung sind deswegen nicht dargestellt.

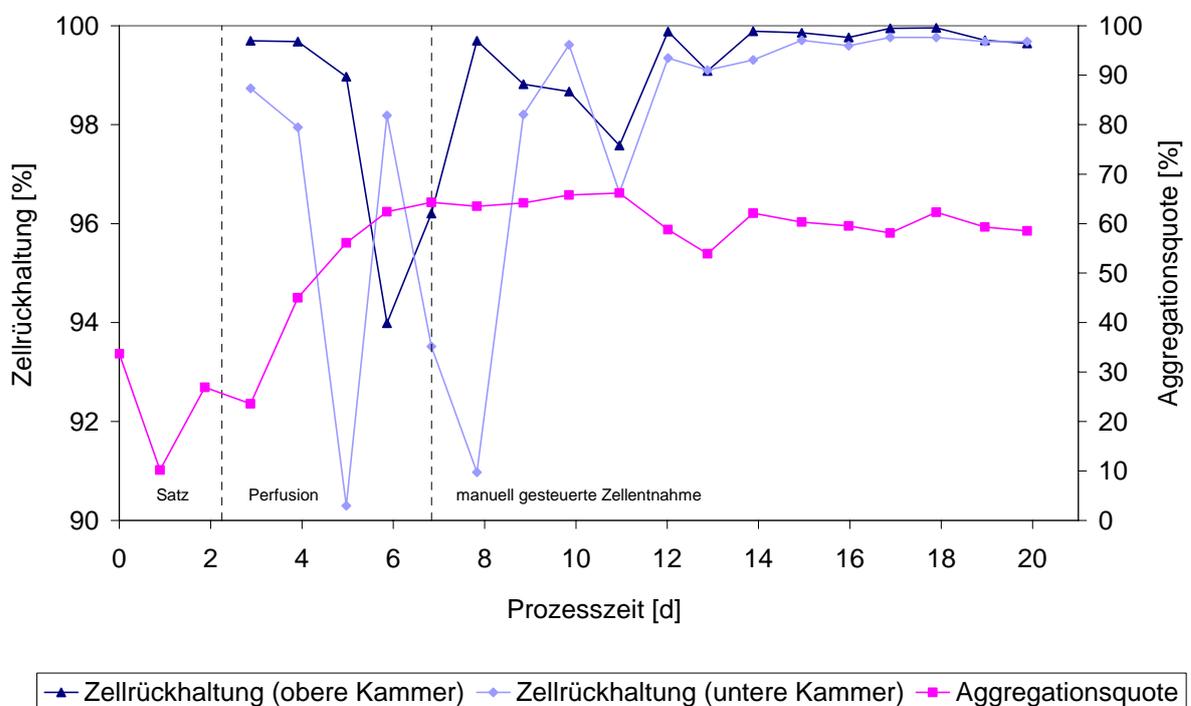


Abbildung 22: Zellrückhaltung für die obere und die untere Kammer des Plattensedimenters, sowie Aggregationsquoten während des Prozesses T. In der oberen Kammer waren teflonbeschichtete Edelstahlplatten und in der unteren Kammer spiegelpolierte Edelstahlplatten eingebaut.

Neben der Aggregationsquote zeigt die Abbildung 22 die Zellrückhaltung des Plattensedimenters. Die vier Klärböden der oberen Kammer des Plattensedimenters waren teflonbeschichtet und die der unteren Kammer waren spiegelpoliert. Zur Untersuchung einer eventuell unterschiedlichen Rückhaltecharakteristik aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit wurden Probenahmesysteme in den Perfundatstrom hinter die Peristaltikpumpe des oberen Ausgangs des Sedimenters eingebaut. Die am Prozessanfang auftretenden Schwankungen in den gemessenen Zelldichten sind auf die geringe Anzahl an Messwerten in Folge der hohen Rückhaltung und auf sedimentierte Zellen in den Schläuchen zurückzuführen. Ab Prozesstag 12 gab es kaum noch Unterschiede in der Rückhaltungsleistung der beiden Kammern. Zur Untersuchung des Einflusses der geometrischen Anordnung der Platten wurden in weiteren Kultivierungen die teflonbeschichteten Platten mit den spiegelpolierten vertauscht (Daten nicht gezeigt). Die Aggregationsquoten der Zellen im Bioreaktor erreichten hohe Werte um 60 % bei relativ geringen Lebendzellichten von $6,5 \cdot 10^6$ und $9,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die resultierenden Probleme bei der Berechnung zellspezifischer Parameter illustriert Abbildung 23.

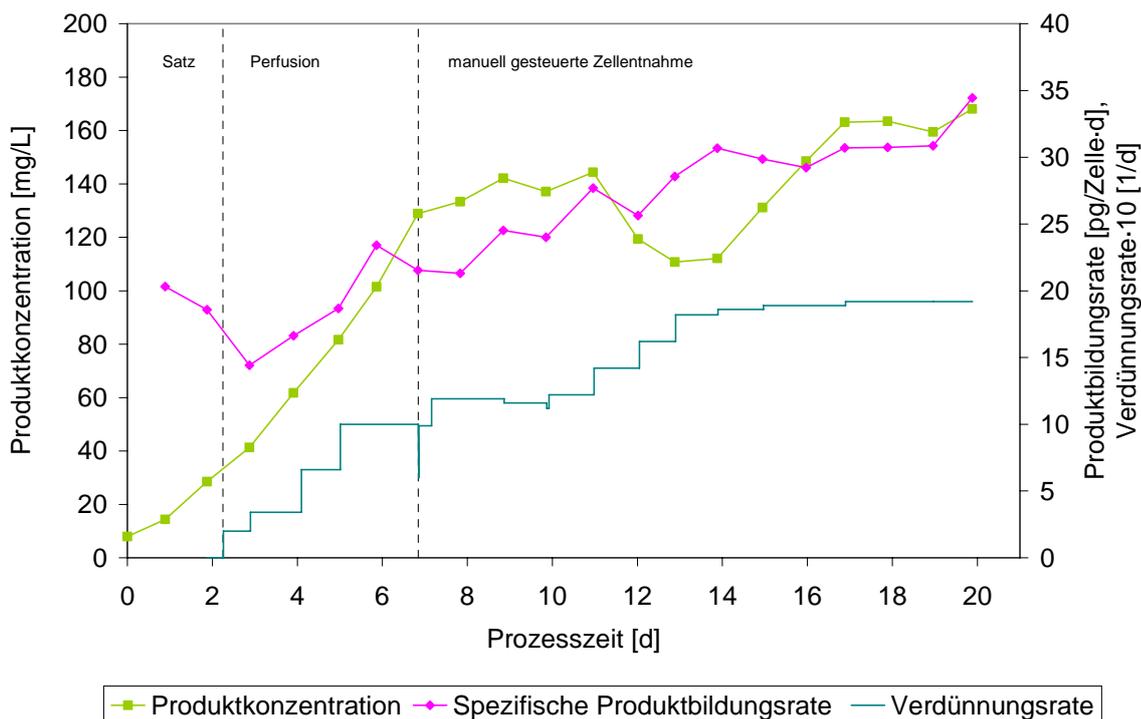


Abbildung 23: Produktkonzentrationen, spezifische Produktbildungsrate und Verdünnungsraten während des Prozesses T.

Die Produktkonzentrationen in der Produktionsphase betragen im Mittel 137 mg/L, wobei die Konzentrationen den Zelldichten folgten (Abbildung 23). Ab dem 15. Prozesstag lag die volumetrische Produktivität durchschnittlich bei 202 mg/L·d. Der geringe Leistungseintrag durch den Taumelrührer resultierte in Aggregationsquoten von durchschnittlich 53 %, wobei

Maximalwerte bis zu 66 % gemessen wurden. Nach etwa 10 Tagen traten makroskopische Zellaggregate auf, die nicht adäquat im Cedex vermessen werden konnten. Durch die fehlende Verdünnung der Zellsuspension vor der Messung wurden weniger Zellen gemessen als vorhanden waren. Zusammen mit der Aggregation führte dies zu dem in Abbildung 23 sichtbaren Effekt der scheinbar über die Prozessdauer anwachsenden spezifischen Produktbildungsrate. Letztere nahm somit in der dritten Prozessphase einen unrealistisch hohen Wert von 28,3 pg/Zelle·d an.

In Tabelle 7 sind einige berechnete spezifische Raten aufgelistet. Die spezifische Wachstumsrate war auch in der dritten Prozessphase mit 0,42/d im Vergleich zu den später dargestellten Prozessen hoch. Außerdem nahm der metabolische Quotient von Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate ungewöhnlich hohe Werte über 2 an. Die spezifische Verdünnungsrate betrug durchschnittlich 0,16 nL/Zelle·d.

Tabelle 7: Zusammenfassung spezifischer Raten des Prozesses T. Z: Zelle, ZE: Zellentnahme.

Zustand	Nr.	μ	q_{Glucose}	$q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$	q_{Lactat}	q_{NH_4}	q_{rhGH}
		[1/d]	[pmol/Z·d]	[-]	[pmol/Z·d]	[pmol/Z·d]	[pg/Z·d]
Satz	I	0,72	7,87	1,56	11,97	0,89	19,46
Perfusion	II	0,41	2,08	2,95	6,13	0,51	18,93
Perfusion+ZE	III	0,37	1,89	2,53	4,59	0,43	28,33

Diskussion des Prozesses unter Verwendung eines Taumelrührers

Der Prozess T zeigt die wesentlichen Einschränkungen der Prozessführung mit Taumelrührer. Da ab Lebendzellichten von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL der zu geringe Sauerstofftransport limitierend war, wurde im Prozess T eine Zelldichte unter $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL eingestellt. Dennoch traten durch den zu geringen Leistungseintrag schon bei diesen relativ niedrigen Zelldichten große Zellaggregate auf, die nicht korrekt im Cedex vermessen werden können (Schomberg, 2003). Die durch DNA-Freisetzung lysierender CHO-Zellen begünstigte Zellaggregation kann außerdem zu einer Minderversorgung der Zellen im Inneren mit Nutrienten und damit zu einer verringerten spezifischen Wachstumsrate führen (Renner *et al.*, 1993). Da die Zelldichtebestimmung bei hohen Aggregationsquoten ungenauer wird, müssen sie zur Abschätzung der Qualität der berechneten spezifischen Raten herangezogen werden. Die nicht durchgeführte Verdünnung der Proben vor Vermessung der Zelldichte kann ebenfalls zu unrealistisch niedrigen gemessenen Zelldichten führen. Diese beiden Effekte führten zu den scheinbar von ca. 20 auf über 30 pg/Zelle·d ansteigenden spezifischen Produktbildungsraten. In den später dargestellten Prozessen blieben die spezifischen Produktbildungsraten auch in länger

dauernden Experimenten unter variablen Selektionsdrücken unverändert, so dass biologische Instabilitäten der Zelllinie ausgeschlossen werden können.

Limitationen der gemessenen Nutrienten oder inhibitorische Konzentrationen der Metabolite Ammonium und Lactat (maximal 3,88 mM beziehungsweise 36 mM) traten nicht auf. Die Abnahme der Viabilität auf 77,1 % bis zur Prozesszeit 12,90 Tage ist vermutlich durch eine nicht ausreichende Vermischung nach Zugabe der 4,76 %igen Mediumskomponente ProCHO[®]5 zu erklären, da nach erneuter Zugabe dieser Komponente die Viabilität wieder anstieg. Möglicherweise wirken die Peptide des in ProCHO[®]5 enthaltenen Sojabohnenhydrolysats auch in niedrigen Konzentrationen anti-apoptotisch (Franěk und Fussenegger, 2005).

Die in der Literatur vorgeschlagene Beschichtung der Klärböden zur Vermeidung der Adhäsion von Zellen (Castilho und Medronho, 2002) konnte im Vergleich von teflonbeschichteten und spiegelpolierten Platten nicht nachvollzogen werden. Aufgrund der Einschränkungen des Versuchsaufbaus konnten jedoch nur die Rückhaltungseigenschaften und nicht die Verweilzeiten der Zellen in den Kammern verglichen werden. Es wurde in diesem und anderen Prozessen gezeigt, dass teflonbeschichtete und spiegelpolierte Klärböden sehr ähnliche Rückhaltungseigenschaften haben. Auf separate Probenahmen für beide Kammern wurde deswegen verzichtet. In den folgenden Prozessen wurden ausschließlich die gegenüber dem zur Reinigung einsetzten Natriumhydroxid robusteren spiegelpolierten Platten eingesetzt.

Weiterhin zeigte sich in den Prozessen mit Taumelrührer die Notwendigkeit der automatischen Regelung der Zellentnahme. Aufgrund der fehlerbehafteten Zelldichtebestimmung mit dem Cedex und der geringen Probenahmefrequenz kam es nach manueller Anpassung der Zellentnahmerate an der Zellentnahmepumpe zu Schwankungen der Zelldichte. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Datendichte zur Regelung der Zellentnahme so hoch sein musste, dass Messfehler einen geringen Einfluss haben würden. Ein automatisiertes, probenentnehmendes Verfahren war bei dem 2 L-System nicht realisierbar. Außerdem war das Arbeitsvolumen für häufige Probenahmen zu gering. Bei einer sterilen Probenahme über Membranen zur Bestimmung und anschließenden Regelung einer Nährstoff-Konzentration wären bei den langen Prozessdauern *Fouling*-Effekte zu erwarten. Beide Verfahren zur Regelung der Zelldichte erfordern zusätzliche Einbauten und gehen mit Gefahren für die Prozessstabilität einher. Die den Prozess T beendende bakterielle Kontamination führte zu dem Ergebnis, dass der Aufbau des Systems nicht durch zusätzliche Einbauten komplexer werden sollte.

3.2 Etablierung eines langzeitstabilen Hochzell-dichteprozesses

Aus den Prozessen mit Taumelrührer konnten Schlüsse in Bezug auf den Aufbau eines Kultursystems für langzeitstabile Hochzell-dichteprozesse gezogen werden. Zur Begrenzung der Zellaggregation und Verbesserung des Leistungseintrags wurden statt des Membrantaumelrührers 8- oder 3-Segmentschrägblattrührer eingesetzt. Für die blasenfreie Begasung wurde ein Membrankorb (Sartorius BBI Systems) mit einer dünnwandigen Silikonmembran und zur alternativ benutzten submersen Blasenbegasung Mikro- und Makrosparger eingesetzt. Die Zellentnahmepumpe wurde durch einen Oxystat geregelt, der die Reglerausgangsgrößen des pO_2 -Reglers nutzte (Materialien und Methoden, Kapitel 2.1.8). Hiermit lag eine Regelgröße in einer viel höheren Datendichte vor, als mit invasiven Probenahmen aus dem Bioreaktor möglich gewesen wäre. Ein weiterer Vorteil dieser Regelgröße lag darin, dass der Sauerstoffpartialdruck im Bioreaktor eine zuverlässig und einfach bestimmbare Größe ist – im Gegensatz zu der Lebendzell-dichte oder den Metabolitkonzentrationen (Konstantinov *et al.*, 1994). Die Zellentnahme erfolgte nicht wie in den Vorversuchen direkt aus dem Bioreaktor, sondern aus dem Rezirkulat. Da dieses ein Konzentrat darstellte, sollte zur Regelung der Zelldichte prinzipiell weniger Zellsuspension entnommen werden müssen.

Zur Erhöhung der Sicherheit gegenüber Kontaminationen wurde die sekundäre Ernteflasche nicht mehr unter der Sterilwerkbank entleert. Stattdessen wurde die Ernteflasche über ein spezielles Probenahmesystem abgelassen. Die Zelldichtebestimmung des Perfundats wurde nach dem Ablassen durchgeführt. Dies hatte den weiteren Vorteil, dass über das Ernteintervall eine intrinsische Mittelwertbildung der Zelldichte erfolgte und in den Schläuchen sedimentierte Zellen die Aussagekraft der Messwerte nicht so stark einschränkten. Im Prozess T waren die Proben direkt aus dem Perfusionsstrom entnommen worden. Im Vergleich dazu zeigten sich in den im Folgenden dargestellten Prozessen keine Abweichungen der Zelldichten oder Viabilitäten durch die Lagerung der Zellen für einen oder zwei Tage bei 4 °C.

Durch weitere Vorversuche konnte gezeigt werden, dass auch nach Durchführung der oben genannten Umbauten Lebendzell-dichten über $1,7 \cdot 10^7$ Zellen/mL aufgrund von Sauerstoffversorgungs-limitationen nicht möglich waren (Daten nicht gezeigt). Zur Erreichung höherer Zelldichten wurden daher verschiedene physikalische Parameter wie Temperatur, Leistungseintrag und pH-Wert variiert.

3.2.1 Prozess M1: Optimierung von Temperatur und Leistungseintrag

Nach den Vorversuchen mit dem Taumelrührer wurde das Kultursystem auf eine Begasung mit einem Membrankorb und eine Durchmischung über einen 8-Segmentschräglattrührer umgestellt. In einem ersten Prozess sollte zunächst die Kultivierungstemperatur optimiert werden. Versuche von Anton *et al.* (2005) mit der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie in Spinnerflaschen hatten gezeigt, dass eine Absenkung der Temperatur auf 34 °C zu erhöhten Zelldichten und Produktkonzentrationen bei langsamerem Wachstum führte. Daher sollte weiterführend untersucht werden, ob die zellspezifische Verdünnungsrate durch ein Herabsetzen der spezifischen Wachstumsrate reduziert werden könnte. Eine weitere Einflussgröße, die in diesem Prozess untersucht werden sollte, war der insbesondere beim *scale-up* wichtige Leistungseintrag (Nienow, 2006). Dabei sollten insbesondere die Zellaggregationsquote und die Viabilität in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl untersucht werden.

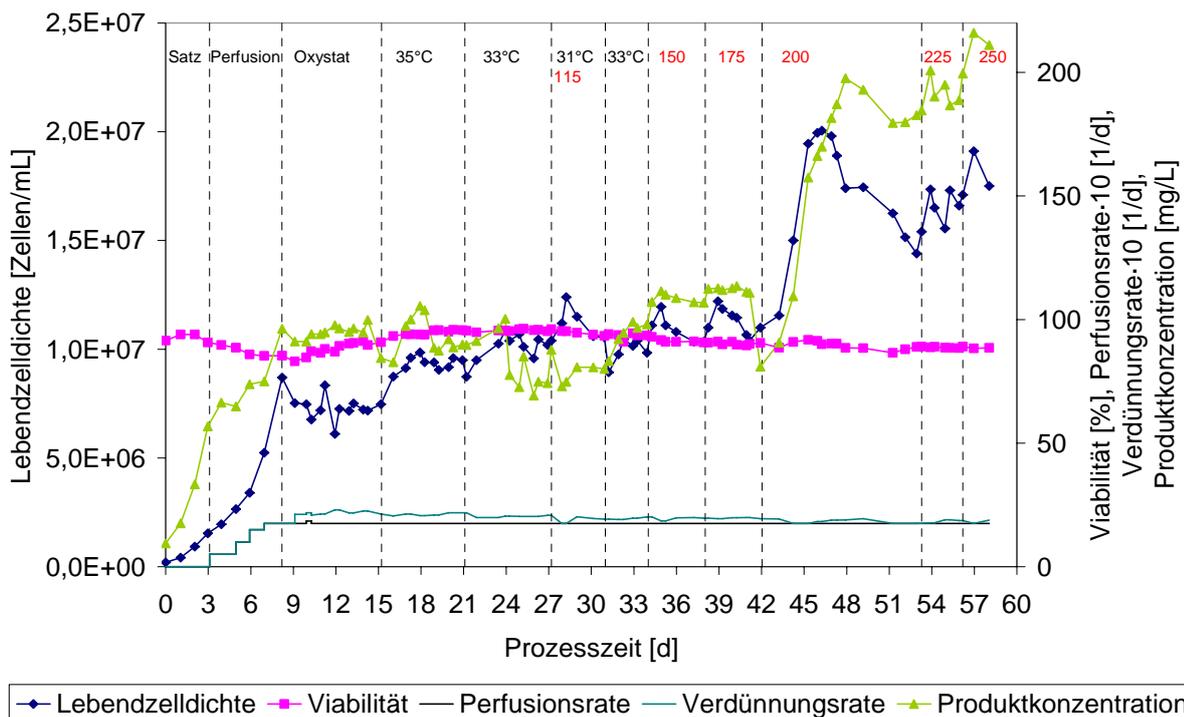


Abbildung 24: Lebendzellichten, Viabilitäten und Produktkonzentrationen, sowie Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses M1. Nach 42,03 Tagen wurde die Rührerdrehzahl von 175 auf 200 UPM erhöht und am nächsten Tag der Sollwert des Oxystats von 300 auf 450 erhöht. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Der Prozess M1 (Membranbegasung) wurde bei einer Lebendzelldichte von $2,00 \cdot 10^5$ Zellen/mL angeimpft (Abbildung 24) und hatte zwölf Prozessphasen. Nach einer Satz-Phase wurde zunächst ein Perfusionsprozess ohne Zellentnahme, ab Prozesszeit 8,20 Tage mit Zell-

entnahme unter Regelung durch den Oxystat und konstanter Perfusionsrate von 1,75/d durchgeführt. Vom achten bis zum dreißigsten Tag wurde die Kultivierungstemperatur in 2 °C-Schritten von 37 auf 31 °C abgesenkt. Die mittleren Lebendzellichten stiegen hierbei von $7,27 \cdot 10^6$ auf $1,13 \cdot 10^7$ Zellen/mL an. In Relation zum jeweils vorherigen Wert ergeben sich folgende Steigerungen: um 29 % bei 35 °C, 8 % bei 33 °C und 11 % bei 31 °C. Die Viabilität nahm dabei von 83,1 % beim Aktivierungszeitpunkt des Oxystats auf bis zu 93,4 % bei Prozesszeit 30,90 Tage und 31 °C zu. Da die spezifische Wachstumsrate bei 31 °C einen geringen Wert von 0,18/d annahm und die Aggregationsquote zunahm (Abbildung 25), wurde die Temperatur wieder auf 33 °C angehoben. Gleichzeitig wurde die Rührerdrehzahl zunächst auf 115 UPM angehoben und ab dem 34. Prozesstag auf 150 UPM erhöht. Die Erhöhung der Rührerdrehzahl von 150 zu 175 UPM am 38. Prozesstag führte zu einem verbesserten Gas-transfer an der Begasungsmembran, so dass die Lebendzellichte um 14 % zunahm. Allerdings nahm auch die Zellaggregationsquote weiter zu, weshalb die Rührerdrehzahl auf 200 UPM erhöht wurde. Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens bei höheren Zelldichten wurde an Prozesstag 43,25 der Sollwert des Oxystats von 300 auf 450 angehoben. Die Lebendzellichte stieg zunächst auf $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL an und fiel dann auf einen mittleren Wert von $1,7 \cdot 10^7$ Zellen/mL ab. Der schon bei den niedrigeren Zelldichten beobachtete Effekt des scheinbaren Absinkens der Lebendzellichte nach Variation von Kulturbedingungen trat bei hohen Zelldichten in verstärktem Maße auf. Ab Prozesszeit 49,5 wurde eine neue Mediumcharge eingesetzt, die in der Aminosäureanalytik keine Unterschiede zur vorherigen Charge aufwies. In Folge nahm die Lebendzellichte auf $1,44 \cdot 10^7$ Zellen/mL ab. Wie Abbildung 26 zeigt, ging dies jedoch nur mit einer geringen Abnahme der Produktkonzentration einher. Versuche zur tryptischen Vereinzelung der Zellen zur genaueren Zelldichtebestimmung schlugen fehl. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten gewählt, sowie mit und ohne Schütteln auf verschiedenen Schüttlern inkubiert. In allen Fällen wurden nur Lebendzellichten um $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL gemessen und ein größeres Zellaggregat entstand. Offenbar waren die Zellen zu empfindlich für eine tryptische Vereinzelung.

Zur Verringerung der Zellaggregation und zur Untersuchung des maximal möglichen Leistungseintrags wurde nach 53,30 Tagen die Rührerdrehzahl auf 225 UPM und nach 56,19 Tagen auf 250 UPM erhöht. Die Viabilität blieb auf einem mittleren Wert von 88,5 %, ohne dass sich konstante Zelldichten einstellten.

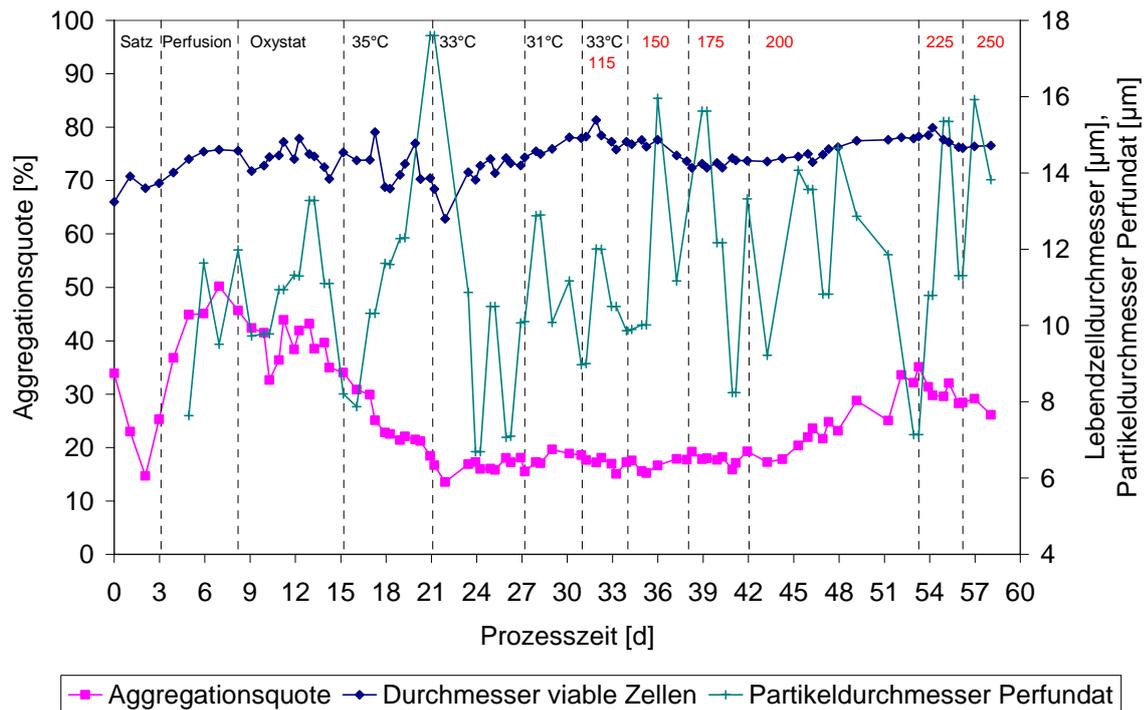


Abbildung 25: Aggregationsquoten, sowie Zell- und Partikeldurchmesser im Bioreaktor beziehungsweise im Perfundat während des Prozesses M1. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Aus der Abbildung 25 wird ersichtlich, dass die Durchmesser der viablen Zellen über die Prozessdauer weitgehend konstant bei 14,4 µm blieben. Die Veränderungen der Kultivierungstemperatur und der Rührerdrehzahl hatten keinen nachhaltigen Einfluss auf den Zelldurchmesser. Die durchschnittliche Viabilität der Zellen im Perfundat betrug 21,7 % bei einem Partikeldurchmesser von 11,3 µm. Mit Aktivierung der Zellentnahme durch den Oxystat ab dem neunten Prozesstag nahmen die Aggregationsquoten Werte unter 20 % an. Nach dem Anheben des Sollwerts des Oxystats auf 450 stiegen sie trotz Erhöhung der Rührerdrehzahl auf Werte um 30 % an. Bei hohen Aggregationsquoten werden mit dem Cedex zu geringe Zelldichten gemessen und daher zu hohe spezifischer Raten berechnet. Daher sind zur Interpretation spezifischer Raten die Aggregationsquoten zu berücksichtigen.

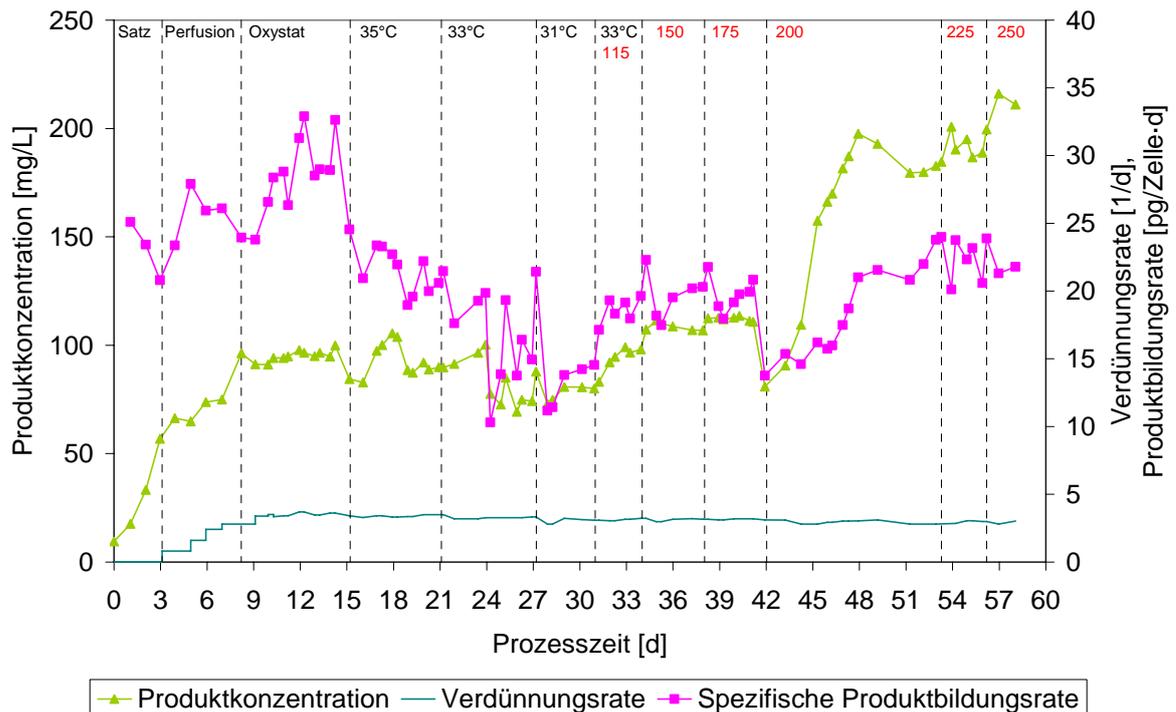


Abbildung 26: Produktkonzentrationen und spezifische Produktbildungsrate während des Prozesses M1. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Die Abbildung 26 zeigt den Verlauf der Produktkonzentration. Bis zum Prozesstag 43 wurden Werte um 90 mg/L erreicht. Der Abfall der spezifischen Produktbildungsrate zwischen Prozesstag 42 und 47 war eine Folge der Erhöhung der Rührerdrehzahl. Die spezifische Produktbildungsrate hatte ein Minimum von 13 pg/Zelle·d bei einer Kultivierungstemperatur von 31 °C (Tabelle 8). Durch Erhöhung der Temperatur um 2 °C nahm die spezifische Produktbildungsrate wieder einen Wert um 19 pg/Zelle·d an. Ihr Maximum trat zwischen Prozesstag 4 und 15 auf und war das Ergebnis der in diesem Zeitraum maximalen Zellaggregation.

Die Verbesserung des Gastransfers an der Membran durch Erhöhung der Rührerdrehzahl, zum Beispiel von 115 zu 175 UPM, war mit einer Zunahme der Produktkonzentration um 15 % bei gleichzeitiger Erhöhung der Zelldichte verbunden. Nach dem Umstellen des Oxystats auf einen Sollwert von 450 und der resultierenden höheren Lebendzellichte wurden rhGH-Konzentrationen um 190 mg/L erreicht. Nachdem der Leistungseintrag zur Prozesszeit 42,03 Tage um den Faktor 1,5 (vergleiche Abbildung 32) erhöht wurde, sank die spezifische Produktbildungsrate zunächst auf 13,8 pg/Zelle·d ab, bevor sie nach sechs Tagen Werte um 22,4 pg/Zelle·d annahm. Die spezifischen Produktbildungsrate nahmen über die Prozessdauer nicht wie in Prozess T stetig zu, sondern variierten mit den Änderungen der Prozessbedingungen (Tabelle 8).

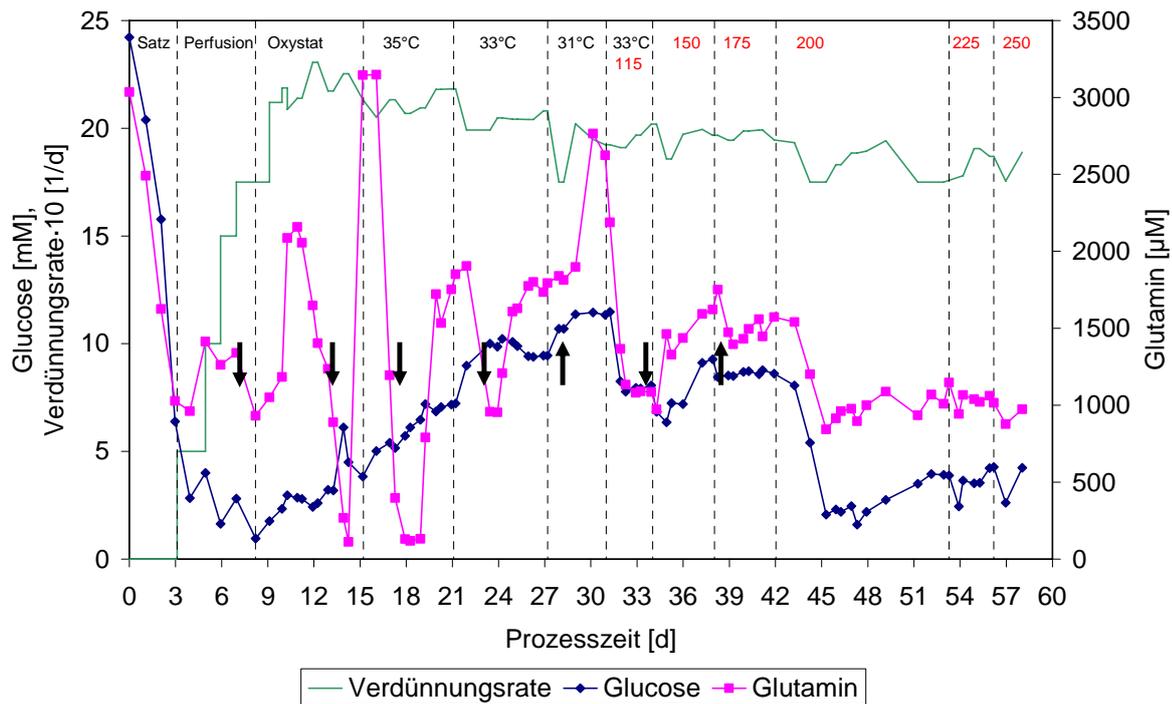


Abbildung 27: Glucose- und Glutaminkonzentrationen während des Prozesses M1. Die Pfeile indizieren die Zugabe neuen Mediums. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, wurden an Tag 14 und 18 geringe Glutaminkonzentrationen erreicht. An Prozesstag 18 führte dies bei einer mittleren Glutaminkonzentration von 126 mM zu einer Halbierung der spezifischen Wachstumsrate von 0,45/d auf 0,22/d, wohingegen die erniedrigte Konzentration an Prozesstag 14 keinen Effekt hatte. Die Glutaminlimitierung korrelierte mit einer Abnahme der spezifischen Produktbildungsrate (Abbildung 26) und einem verstärkten Verbrauch der Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Alanin (Daten nicht gezeigt). Somit war eine homogene Durchmischung des Mediums nach Zugabe von Glutamin und ProCHO[®]5 zum MAM-PF[®]2 durch Schwenken der Vorlagetonne nicht zu bewerkstelligen. Ab Prozesstag 34 war dieses Problem aufgrund der dann durchgeführten Aminosäurekonzentrationsbestimmung bekannt und das Medium wurde in einer zusätzlichen Tonne vor der Filtration gemischt. Die anderen gemessenen Aminosäuren sowie Glucose erreichten keine limitierenden Konzentrationen. Der Abfall der Glucose- und Glutaminkonzentrationen nach Tag 43 resultierte aus dem Umstellen des Oxystats und den in der Folge höheren Lebendzellichten.

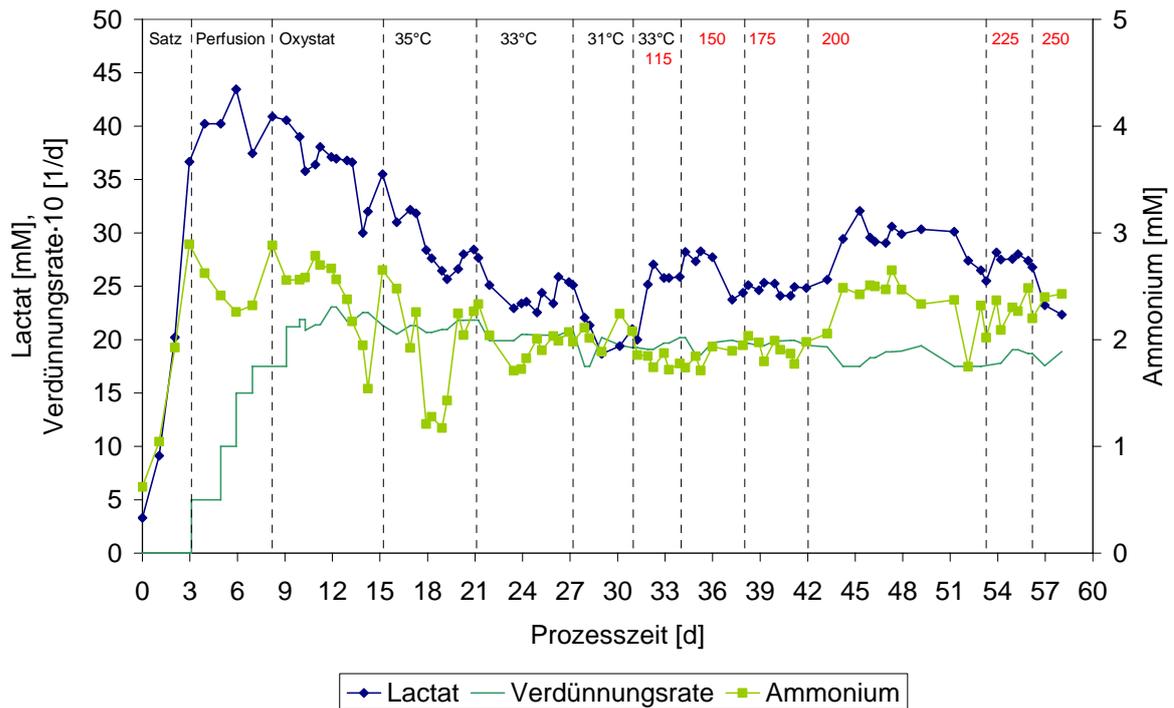


Abbildung 28: Lactat- und Ammoniumkonzentrationen, sowie Verdünnungsraten während des Prozesses M1. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Die Ammoniumkonzentration hatte im Mittel über die Prozessdauer einen Wert von 2,1 mM und war zu keinem Zeitpunkt, auch nicht bei den höheren Zelldichten ab Prozesstag 42, inhibierend. Auffällig war der Abfall der Ammoniumkonzentration durch die geringen Glutaminkonzentrationen am Prozesstag 14 und 18. Die Lactatkonzentration betrug im Mittel 27,9 mM und erreichte zu Beginn der Kultivierung mit bis zu 43,4 mM hohe Konzentrationen.

Durch die Absenkung der Temperatur nahmen die Lactatkonzentrationen ab, mit einem Minimum von 20,9 mM bei 31 °C. Die spezifische Lactatbildungsrate betrug zu diesem Zeitpunkt 3,3 pmol/Zelle·d (Tabelle 8). Nach Erreichen höherer Zelldichten ab dem 45. Prozesstag traten noch niedrigere Werte für q_{Lactat} auf, die in Bezug auf die höheren Aggregationsquoten zu relativieren sind.

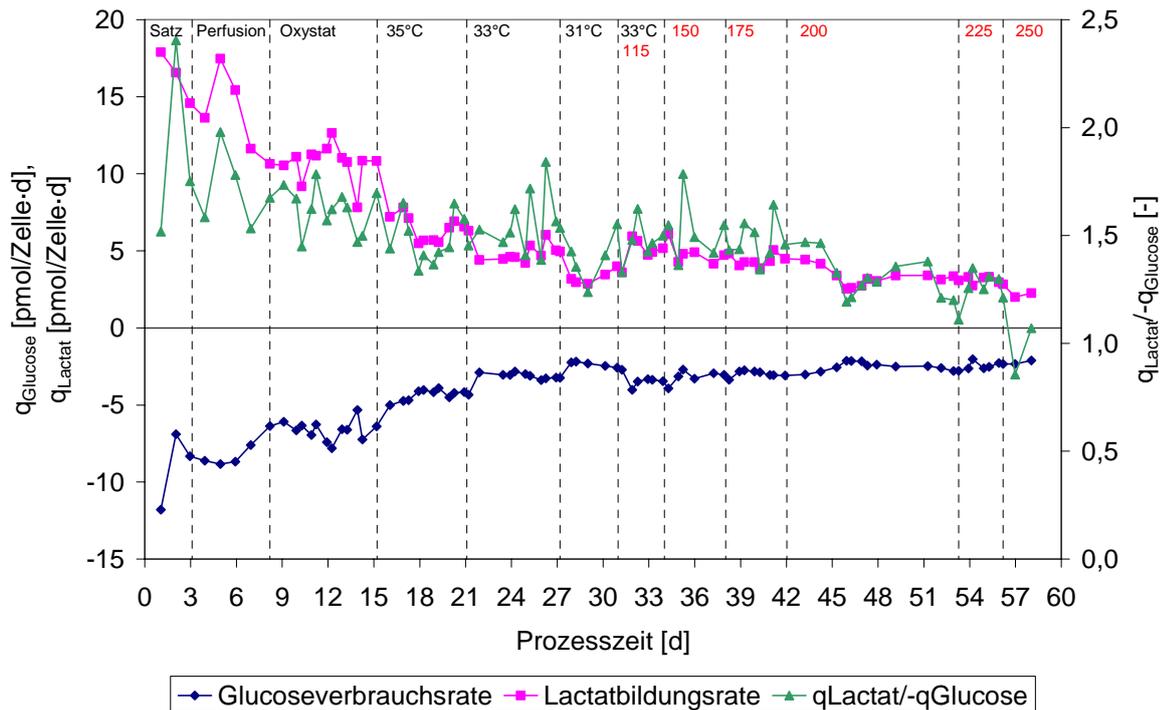


Abbildung 29: Spezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate, sowie Quotient beider während des Prozesses M1. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Die in Abbildung 29 dargestellten spezifischen Raten für Glucose und Lactat zeigen, dass die schrittweise Absenkung der Temperatur auf bis zu 31 °C Veränderungen im Metabolismus der Zellen bewirkt. Im Vergleich zur Prozessphase III bei 37 °C wurde die spezifische Lactatbildungsrate bei 33 °C auf 46 % des Ausgangswerts reduziert. Der Quotient aus Lactatbildungsrate und Glucoseverbrauchsrate blieb über die Prozessdauer nahezu konstant. Im Durchschnitt entsprechen die Werte mit $1,48 \pm 0,6$ den in der Literatur veröffentlichten Angaben (Büntemeyer *et al.*, 1995, Kyung *et al.*, 1994). Wie später gezeigt wird, haben Variationen des pH-Werts einen stärkeren Einfluss auf den Glucoseverbrauch und die Lactatbildung als Änderungen der Kultivierungstemperatur. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die spezifischen Raten innerhalb eines Tages einen neuen stabilen Zustand einnahmen. Eine Übersicht der Veränderung einiger Parameter in den zwölf Prozessphasen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zusammenfassung spezifischer Raten des Prozesses M1. In der Spalte „Zustand“ ist die jeweilige Änderung von Prozessparametern angegeben.

Zustand	Nr.	μ [1/d]	q_{Glucose} [pmol/Z-d]	$q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$ [-]	q_{Lactat} [pmol/Z-d]	q_{NH_4} [pmol/Z-d]	q_{rhGH} [pg/Z-d]
Satz	I	0,68	-9,00	1,89	16,34	1,16	23,11
Perfusion	II	0,33	-8,01	1,71	13,77	0,60	25,45
Oxystat	III	0,46	-6,64	1,62	10,74	0,55	28,48
35 °C, 115 UPM	IV	0,40	-4,35	1,48	6,46	0,31	21,36
33 °C	V	0,28	-3,22	1,55	4,97	0,29	17,11
31 °C	VI	0,18	-2,35	1,40	3,30	0,26	13,03
33 °C	VII	0,16	-3,39	1,47	5,00	0,23	18,59
150 UPM	VIII	0,22	-3,17	1,53	4,83	0,24	19,67
175 UPM	IX	0,22	-2,98	1,48	4,40	0,24	19,01
200 UPM	X	0,15	-2,52	1,29	3,27	0,20	19,02
225 UPM	XI	0,15	-2,41	1,28	3,07	0,19	22,31
250 UPM	XII	0,10	-2,22	0,96	2,13	0,20	21,55

Im Unterschied zum Prozess T wurde in Prozess M1 ein Oxystat zur Steuerung der Zellentnahmepumpe und damit zur Regelung der Zelldichte im Bioreaktor genutzt. Wie die Abbildung 30 zeigt, gelang es somit die Lebendzellendichte automatisch zu regeln. Durch die Temperaturabsenkung von 37 °C auf 33 °C stieg die Sauerstofflöslichkeit im Medium gemäß Arrhenius um ca. 6 %. Damit allein war der Zuwachs der Zelldichte um 39 % nicht zu erklären. Zusätzlich nahm die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate offenbar in Folge der verringerten Wachstumsraten ab. Die spezifische Produktbildungsrate nahm erst nach Absenkung der Temperatur auf 31 °C deutlich ab. In der zweiten Phase des Prozesses ab dem 42. Tag traten Störungen in der Regelung des Sauerstoffpartialdrucks auf. Diese waren darauf zurückzuführen, dass der pO_2 -Regler und der Oxystat aufgrund jeweils großer Integralanteile, die für die Prozessstabilität normalerweise notwendig waren, zu träge geworden waren. Dadurch veranlasste der Oxystat keine Zellentnahme, obwohl der Sauerstoffpartialdruck um bis zu 15 % unter den Sollwert von 40 % abfiel.

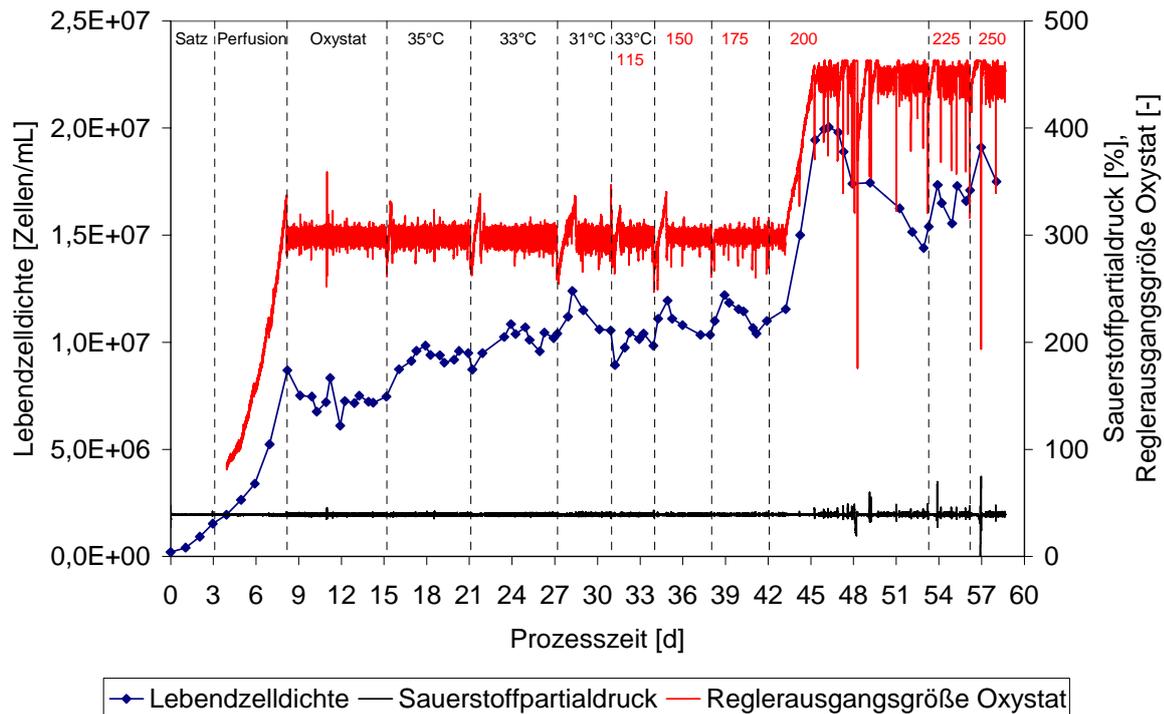


Abbildung 30: Sauerstoffpartialdruck, Lebendzellichte und Reglerausgangsgrößen des Oxystats während des Prozesses M1. An Prozesstag 42,03 wurde die Rührerdrehzahl auf 200 UPM gestellt, der Oxystat wurde an Prozesstag 43,25 auf 450 umgestellt. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Diskussion der Optimierung von Temperatur und Leistungseintrag

Der Prozess konnte mit einer Regelung der Lebendzellichte durch einen Oxystat über eine Zeit von 58 Tagen betrieben werden. Rund 222 L Medium wurden verbraucht und 24,4 g rhGH wurden produziert.

Der Prozess M1 diente im ersten Abschnitt der Untersuchung des Einflusses erniedrigter Kultivierungstemperaturen auf das Wachstum und die Produktbildung. Dabei wurden in den ersten 42 Tagen Lebendzellichten über $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL bei hohen Viabilitäten erreicht. Als positive Effekte der Temperaturniedrigung von 37 auf 33 °C wurden die erhöhte Sauerstofflöslichkeit und die erniedrigten spezifischen Sauerstoffverbrauchsraten evident. Bereinigt um den Effekt der um 6 % höheren Sauerstofflöslichkeit verblieb eine um 33 % höhere Lebendzellichte, die auf eine verringerte spezifische Sauerstoffverbrauchsrate zurückzuführen war. Dieser Wert stimmt mit der beschriebenen Reduktion der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate von 10 % je 1 °C überein (Jorjani und Ozturk, 1999). Es ist zu beachten, dass die gemessenen Sauerstoffpartialdrücke von der temperaturabhängigen Gaslöslichkeit in der Silikonmembran der Elektrode abhängig sind. Diese Temperaturabhängigkeit wurde durch einen in die Elektrode eingebauten Thermistor unvollständig kompensiert. Die Abweichung der ver-

wendeten Mettler-Toledo-Elektrode betrug $0,208 \text{ } \%/^{\circ}\text{C}$ (Iding, 2001). Der bei einer Temperaturabsenkung von 37 auf $33 \text{ } ^{\circ}\text{C}$ entstehende Fehler von $1,0 \text{ } \%$ führte daher zur Messung von entsprechend geringeren Sauerstoffpartialdrücken als tatsächlich vorhanden waren und über den Oxystat zu minimal höheren Lebendzellichten.

Die notwendige zellspezifische Verdünnungsrate für den primär limitierenden Nutrienten Glucose nahm von $0,26 \text{ nL/Zelle}\cdot\text{d}$ (Phase III) auf $0,13 \text{ nL/Zelle}\cdot\text{d}$ (Phase V) ab. Damit konnte mit dem Medium die doppelte Lebendzellichte versorgt werden. Dieser Effekt wurde in biphasischen Satzkultivierungen in Spinnern für CHO-Zellen mit getrennter Anwachs- und Produktionsphase auch für Glutamin beschrieben (Bollati-Fogolín *et al.*, 2005). Dessen spezifische Verbrauchsrate wurde durch die Variation der Kultivierungstemperatur jedoch kaum beeinflusst. Da die Zellen innerhalb eines Tages auf veränderte Bedingungen reagierten, waren Selektionseffekte auszuschließen. Die schnelle Reaktion der Zellen auf Änderungen der Kultivierungstemperaturen würde daher auch ohne Einstellung eines Fließgleichgewichts die Optimierung von Perfusionprozessen erlauben (Angepat *et al.*, 2005). Der Quotient aus Lactatbildung und Glucoseverbrauch blieb mit $1,48 \pm 0,5$ über die Prozessdauer trotz Absenkung der Temperatur relativ konstant. Wie später gezeigt werden wird, führen Variationen des pH-Werts zu einer deutlichen Reduktion dieses Quotienten (Kapitel 3.2.3). Ab dem Prozesstag 18 führte eine Glutaminlimitation für zwei Tage zu einer Halbierung der spezifischen Wachstumsrate. Ein kürzerer Abfall der Glutaminkonzentration an Prozesstag 14 hatte weder Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate, noch auf die Produktbildungsrate. Damit lag die Monod-Konstante für Glutamin mit $126 \text{ } \mu\text{M}$ etwas höher als in einer Chemostat-Kultur von CHO-Zellen, aus der Werte zwischen 30 und $70 \text{ } \mu\text{M}$ ermittelt wurden (Heidemann *et al.*, 1998). Nach Zugabe neuen Mediums nahm die spezifische Wachstumsrate wieder typische Werte an, so dass durch die Limitation keine permanenten Schäden auftraten.

Die Lactatkonzentration betrug im Mittel $27,9 \text{ mM}$ und erreichte zu Beginn der Kultivierung mit bis zu $43,4 \text{ mM}$ möglicherweise inhibitorische Konzentrationen (Gódia und Cairó, 2006). Ohne Bestimmung des pCO_2 kann keine Aussage getroffen werden, ob der durch Natriumcarbonateintrag und Wachstum erhöhte pCO_2 im Medium oder die Osmolalität wachstumshemmend waren (deZengotita *et al.*, 1998). Es ist jedoch bekannt, dass Kohlendioxid in Silikonmembran-begasteten Bioreaktoren oft nicht ausreichend ausgetragen wird (Ozturk, 1996).

In Bezug auf die spezifische Produktbildungsrate der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie zeigte sich, dass diese nicht wachstumsassoziiert, aber temperaturabhängig war. Bei $31 \text{ } ^{\circ}\text{C}$ fielen die spezifischen Produktbildungsraten auf $46 \text{ } \%$ des Werts bei $37 \text{ } ^{\circ}\text{C}$ ab. Das Minimum korrelierte nicht mit einer Reduktion der spezifischen Wachstumsrate ($\mu_{31 \text{ } ^{\circ}\text{C}, 115 \text{ UPM}} = 0,18/\text{d}$), da im Prozess-

verlauf niedrigere Wachstumsraten ($\mu_{33\text{ °C}, 200\text{ UPM}} = 0,15/\text{d}$) mit höheren spezifischen Produktbildungsrate (19,0 pg/Zelle·d) auftraten. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit Experimenten, die mit der gleichen Zelllinie in Spinnerflaschen im Satzbetrieb durchgeführten wurden, überein (Anton *et al.*, 2005). Dort war es zu einer Erhöhung der spezifischen Produktbildungsrate bei 31 °C gekommen; allerdings wurden diese Versuche nicht unter geregelten Bedingungen durchgeführt. Andere Gruppen berichten von erhöhten spezifischen Produktbildungsrate und Mikroheterogenitäten von Glykoproteinen bei hypothermer Satz-Kultivierung von CHO-Zellen (Kaufmann *et al.*, 1999). Dabei spielen kälteinduzierte Schockproteine eine Rolle (Al-Fageeh *et al.*, 2005). Möglicherweise konnte dies aufgrund einer anderen Insertion des produktcodierenden Gens in das Wirtschromosom oder einer anderen Expressionsregulation nicht reproduziert werden.

Insgesamt waren die Produktkonzentrationen im Kulturverlauf konstanter als die Lebendzell-dichten. An dieser Stelle wird ersichtlich, wie ungünstig eine Regelung basierend auf der gemessenen Lebendzell-dichte wäre. Bis zur Anhebung des Sollwerts des Oxystats waren die Aggregationsquoten so gering, dass die ermittelten spezifischen Raten realistisch sind.

In der zweiten Phase des Experiments wurde der Effekt der Erhöhung der Rührerdrehzahl bei hohen Zelldichten untersucht. Durch die bei 33 °C reduzierten spezifischen Verbrauchsrate konnte unter Konstanthaltung der Perfusionsrate die Lebendzell-dichte nach dem Umschalten des Oxystats auf einen Sollwert von 450 zeitweise Werte über $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL annehmen. Im Mittel wurden in den letzten beiden Wochen Lebendzell-dichten über $1,6 \cdot 10^7$ Zellen/mL bei Viabilitäten über 88 % erzielt. Die höheren Rührerdrehzahlen verbesserten den Gastransport an der Silikonmembran und resultierten in bis zu 12 % höheren Lebendzell-dichten. Die Anhebung der Rührerdrehzahl von 175 auf 200 UPM führte zunächst zu einer Absenkung der spezifischen Produktbildungsrate, die innerhalb von fünf Tagen wieder ihren Ausgangswert annahm. Dies könnte durch eine Umstellung des Stoffwechsels oder eine Selektion erklärt werden. Keane *et al.* konnten in Experimenten mit einer Flusskammer bei ebenfalls das humane Wachstumshormon produzierenden CHO-Zellen unter definierten Bedingungen eine Halbierung der spezifischen Produktbildungsrate beobachteten. Dazu wurde der Scherstress von 0,05 auf 0,80 N/m² um das Sechzehnfache erhöht (Keane *et al.*, 2003). In jenen Experimenten hatten die Zellen jedoch im Unterschied zum Prozess M1 nicht mehrere Tage Zeit zur Umstellung ihres Stoffwechsels. Eine Erhöhung der spezifischen Glucose- und Glutaminverbrauchsrate, die als Reaktion gegenüber Scherstress postuliert wurde (Senger und Karim, 2002), konnte nicht gefunden werden.

Im Prozess M1 konnten die Aggregationsquoten erst ab 225 UPM bei einem volumetrischen Leistungseintrag von $18,5 \text{ W/m}^3$ gesenkt werden. Der Aggregatdurchmesser korreliert gemäß Moreira *et al.* (1995) mit dem vom Leistungseintrag abhängigen Eddy-Durchmesser. Schon durch eine Erhöhung der Drehzahl eines Paddelrührers von 30 auf 100 UPM gelang es ihnen die Aggregationsquote in kontinuierlichen Kultivierungen tierischer Zellen deutlich zu senken. Mit Aktivierung des Oxystats ab Prozesstag 9 und damit der Zellentnahme nahmen die Aggregationsquoten ab. Aufgrund seines Funktionsprinzips hält ein Schrägrohrsedimenter Aggregate selektiv zurück; zudem können die Zellen im Sedimenter aggregieren. Die im Mittel um $3 \mu\text{m}$ kleineren toten Zellen wurden schlechter zurückgehalten, so dass die mittlere Viabilität der Zellen im Perfundat nur 21,7 % betrug. Letztlich kann festgehalten werden, dass die Aggregationsquote vorrangig über eine ausreichend hohe Wachstumsrate geregelt werden muss und die Viabilität über eine hohe Perfusionsrate angehoben werden kann.

Abschließend ist zum Oxystat anzumerken, dass bei einem Sollwert von 450 infolge des Integralteils wiederholt eine notwendige Zellentnahme nicht veranlasst wurde, wodurch der Sauerstoffpartialdruck unter den Sollwert von 40 % fiel. Ein großer Integralteil für den Oxystat war jedoch erforderlich, damit die pH-Regelung durch Kohlendioxidzugabe nicht zur Zellentnahme führt. In den folgenden Prozessen wurde daher der Sollwert des Oxystats auf einen niedrigeren Wert gesetzt.

Der Prozess wurde durch den Ausfall eines Relais zur Steuerung der Laugedosage und den resultierenden Eintrag von 0,9 L einer 1 M Natriumcarbonatlösung beendet.

3.2.2 Bestimmung des Leistungseintrags durch Rühren

Für die Homogenisierung der Zellsuspension in den gezeigten Hochzelldichteprozessen mussten aufgrund der starken Aggregationsneigung der Zellen hohe Rührerdrehzahlen eingesetzt werden. Die Ursache der Aggregatbildung war neben der durch den Membrankorb gestörten Durchmischung im Bioreaktor und den hohen Zelldichten die Passage durch den Plattensedimenter unter hypothermen Bedingungen. Bei den Perfusionsprozessen wurden mit einem 8-Segmentschrägblattrührer Rührerdrehzahlen bis 250 UPM eingesetzt. Dabei wurde eine Umfangsgeschwindigkeit des Rührers von 1,57 m/s erreicht, die deutlich unterhalb des unabhängig vom Rührertyp als kritisch für die Viabilität erachteten Werts von 2 m/s liegt (Fenge und Lüllau, 2006). Um die Skalierung des Prozesses zu erleichtern, wurden die von der Rührergeometrie abhängige Leistungskennzahl (Newton-Zahl) und der von der Rührerdrehzahl abhängige spezifische Leistungseintrag experimentell ermittelt.

Dazu wurde in einem separaten Versuch der Leistungseintrag eines aufwärts fördernden 8-Segmentschrägblattrührers in ein membranbegastes System bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL nach mechanischer Entkopplung von Motor und Reaktordeckel bestimmt. Dabei konnte das am Motor anliegende Drehmoment mit einer Waage als Haltekraft quantifiziert werden. Letztlich konnte so der spezifische Leistungseintrag berechnet werden (Kapitel 2.1.9, Formel 9). Aus den Experimenten konnte außerdem die Newton-Zahl berechnet werden, die abhängig von der Reynoldszahl, dem Rührerdurchmesser, der Dichte und der Rührerdrehzahl ist. Der Durchschnittswert der Newton-Zahl betrug 27. Dies ist ein relativ hoher Wert, der es fraglich erscheinen lässt, dass der Bioreaktor turbulent durchmischt war.

Die nachfolgende Abbildung 31 zeigt den theoretischen und den experimentell ermittelten volumetrischen Leistungseintrag. Für die Newton-Zahl wurde der empirisch ermittelte Wert von 27 angenommen. Im niedrigen Drehzahlbereich stimmten die Kurvenverläufe gut überein. Allerdings stieg der empirische volumetrische Leistungseintrag etwas langsamer an als der theoretische. Für das reale System wurde dementsprechend nach einer Anpassung mit Excel™ als Exponent nicht der theoretische Wert von 3, sondern ein Wert von 2,8 berechnet. Ursächlich für den Abfall des volumetrischen Leistungseintrags ab 350 UPM war die Ausbildung einer Trombe bis zum Rührer.

Bei der zu Beginn des Prozesses M1 eingesetzten Rührerdrehzahl von 100 UPM betrug der volumetrische Leistungseintrag nur $1,6 \text{ W/m}^3$. Dies lag unter dem für Bioreaktorprozesse tierischer Zellen typischen Wert von 10 W/m^3 (Varley und Birch, 1999). Das Auftreten makroskopischer Zellaggregate konnte durch den zu geringen Leistungseintrag nicht verhindert werden. Nach Anhebung der Rührerdrehzahl auf 250 UPM erhöhte sich der Leistungseintrag um nahezu das 16fache auf $25,3 \text{ W/m}^3$. Dies hatte, wie der Prozess M1 zeigte, keinen Einfluss auf die Viabilität. Al-Rubei *et al.* konnten 1995 sogar zeigen, dass in einem mit einer Rushton-Turbine gerührten 2 L-Bioreaktor erst ein volumetrischer Leistungseintrag über 320 W/m^3 einen negativen Effekt auf die kultivierten Hybridoma-Zellen hatte.

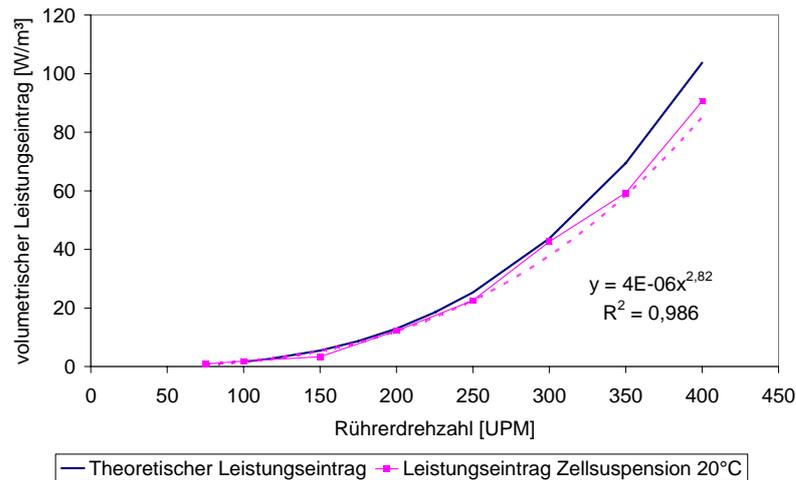


Abbildung 31: Vergleich des theoretischen und des empirischen Leistungseintrags. Über die Messwerte wurde eine potenzielle Regression durchgeführt (gestrichelte Linie).

In einer weiteren Versuchsreihe mit dem selben Versuchsaufbau wurde der Leistungseintrag bei 37 °C für Reinstwasser und Zellsuspension bestimmt. Dabei zeigte sich im Vergleich zum ersten Versuch bei 20 °C, dass der volumetrische Leistungseintrag bei 37 °C um ca. 7 % abnahm. Dass der volumetrische Leistungseintrag für Zellsuspension sogar minimal geringer als für Reinstwasser war (Abbildung 32), wies darauf hin, dass sich bei der untersuchten Zelldichte die Kulturbrühe wie Wasser verhält und der Versuchsaufbau einen geringen systematischen Fehler aufwies.

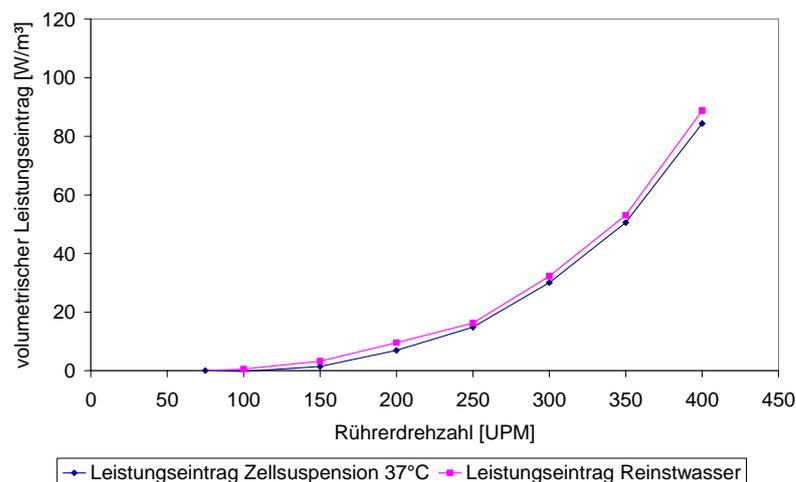


Abbildung 32: Spezifischer Leistungseintrag in Zellsuspension und Reinstwasser als Funktion der Rührerdrehzahl.

3.2.3 Prozess M2: Optimierung des pH-Werts

Nach den Untersuchungen zum Einfluss der Kultivierungstemperatur und des Leistungseintrags in Prozess M1 war der dritte Parameter mit einem möglicherweise starken Einfluss auf den Metabolismus der CHO-Zelllinie der pH-Wert (Trummer *et al.*, 2006a, Yoon *et al.*, 2004). Dabei blieb der Aufbau des Kultursystems unverändert und die Erkenntnisse aus dem Versuch M1 bezüglich der Temperaturreduktion wurden umgesetzt. Der pH-Wert wurde ausgehend vom Startwert pH 7,10 zunächst auf pH 6,95 und dann auf pH 6,80 abgesenkt. Zur Untersuchung der für die Prozessrobustheit als kritisch eingestuften Zellaggregation bei hohen Zelldichten wurde der Sollwert des Oxystats von Beginn an auf 440 eingestellt und die Rührerdrehzahl auf 150 UPM.

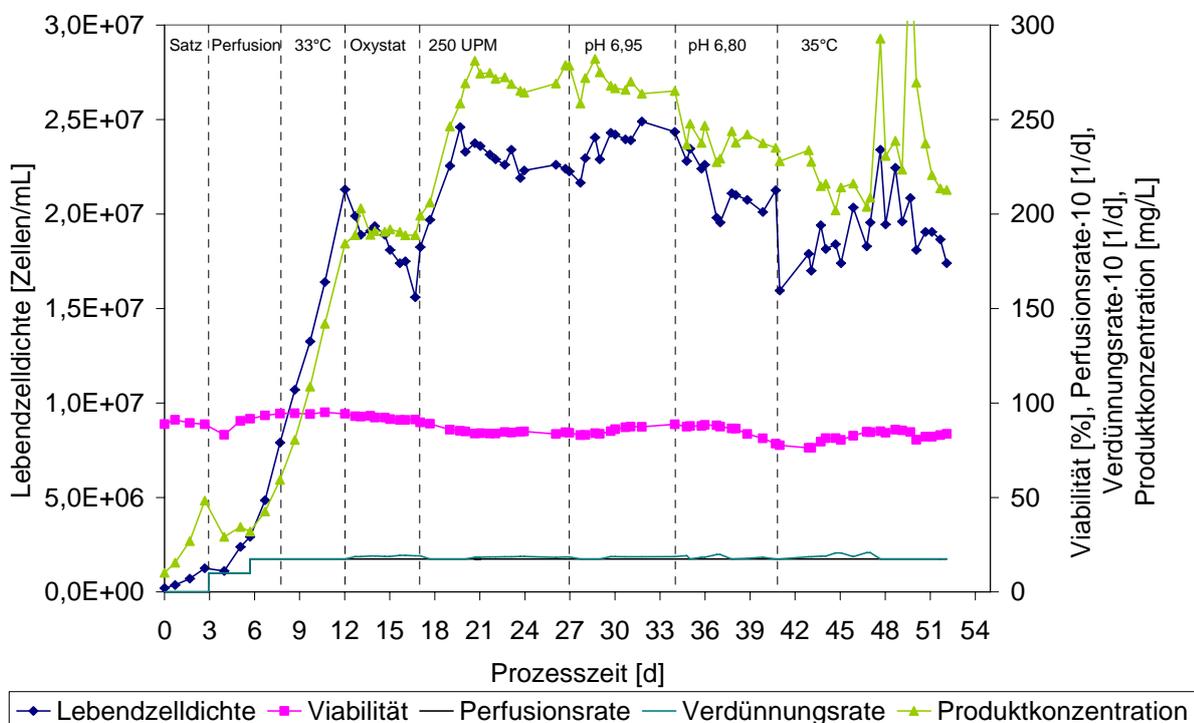


Abbildung 33: Lebendzellichten, Viabilitäten und Produktkonzentrationen, sowie Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses M2. Nach 40,82 Tagen wurde die Temperatur auf 35 °C angehoben.

Der Prozess M2 (Membranbegasung) wurde bei einer Lebendzelldichte von $2,05 \cdot 10^5$ Zellen/mL inokuliert und hatte acht Prozessphasen (Abbildung 33). Zur Verringerung der spezifischen Verbrauchsdaten wurde die Temperatur in der Anwuchsphase im Perfusionsmodus ohne Zellentnahme an Prozesstag 7,76 Tage auf 33 °C reduziert. Die Perfusionsrate betrug wie im Prozess M1 für die gesamte Prozessdauer nach der Anwuchsphase 1,75/d. Nach der Aktivierung des Oxystats nahm die Lebendzelldichte scheinbar kontinuierlich ab.

Dies korrelierte mit einer stetig ansteigenden Zellaggregation (Abbildung 34). Daher wurde in der fünften Prozessphase die Rührerdrehzahl von 150 auf 250 UPM erhöht. Tatsächlich wurde im Folgenden die Lebendzelldichte relativ konstant gehalten; zudem wurde der Stofftransport an der Begasungsmembran verbessert, wodurch um 23 % höhere Lebendzellichten erreicht wurden. Gleichzeitig nahm die Viabilität von 92 auf 85 % ab. Ab Prozesszeit 26,96 Tage wurde der pH-Wert von 7,10 auf 6,95 herabgesetzt. Infolgedessen nahm der Verbrauch der zum Einstellen des pH-Werts zugegebenen 1 M Natriumcarbonatlösung von 65 auf 40 mL/d ab. Zur Prozesszeit 34,01 Tage wurde der pH-Wert weiter auf 6,80 abgesenkt, woraufhin kaum mehr Natriumcarbonatlösung zugegeben wurde. Die Osmolalität nahm dadurch von 386 mOsmol/kg bei pH 7,10 (Phase IV) auf 322 mOsmol/kg bei pH 6,80 (Phase VII) ab. Da in dieser Phase der pH-Wert über einen konstanten Kohlendioxidgasvolumenstrom geregelt wurde, sank die Sauerstoffkonzentration im Begasungsschlauch ab. Hieraus resultierte eine Reduktion der mittleren Lebendzellichten um 11 %. Vom 38. Prozesstag an wurde eine andere Mediumcharge (MAM-PF[®]2, Lot. Z04439B, Supplementierung auf 0,1 % Pluronic F68) verwendet, die zu einem Absinken der Viabilität führte. Daher wurde zur Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate, und damit indirekt der Viabilität, nach 40,82 Tagen die Temperatur auf 35 °C angehoben. Die Viabilität nahm daraufhin wieder von 76 % auf bis zu 85 % zu. Dieselbe Charge wurde im später dargestellten Prozess R verwendet und korrelierte dort ebenfalls mit einem Abfall der Viabilität.

Zur Prozesszeit 45 Tage wurden, bedingt durch ein defektes Relais, Natriumcarbonat und Kohlendioxid simultan zugegeben; dies führte zu einer Erhöhung der Osmolalität auf 357 mOsmol/kg. In der Nacht zum 48. Prozesstag wurde die Zellentnahme nicht vom Oxystat aktiviert, so dass der Sauerstoffpartialdruck auf 3 % absank und die Lebendzelldichte auf $2,34 \cdot 10^7$ Zellen/mL anwuchs. In den letzten Tagen des Prozesses wurde die Zellentnahme zum Teil manuell gesteuert, da der Oxystat sporadisch nicht funktionierte. Die Ursache hierfür war unklar, da die Einstellungen unverändert waren. Ein Neustart des Reglers aufgrund des Ausfalls der pH-Regelung könnte ursächlich zu sein. Der Prozess wurde durch das abermals nicht ansprechende Relais in der Steuerung der Laugepumpe und die resultierende Zugabe von 0,5 L der Natriumcarbonatlösung beendet.

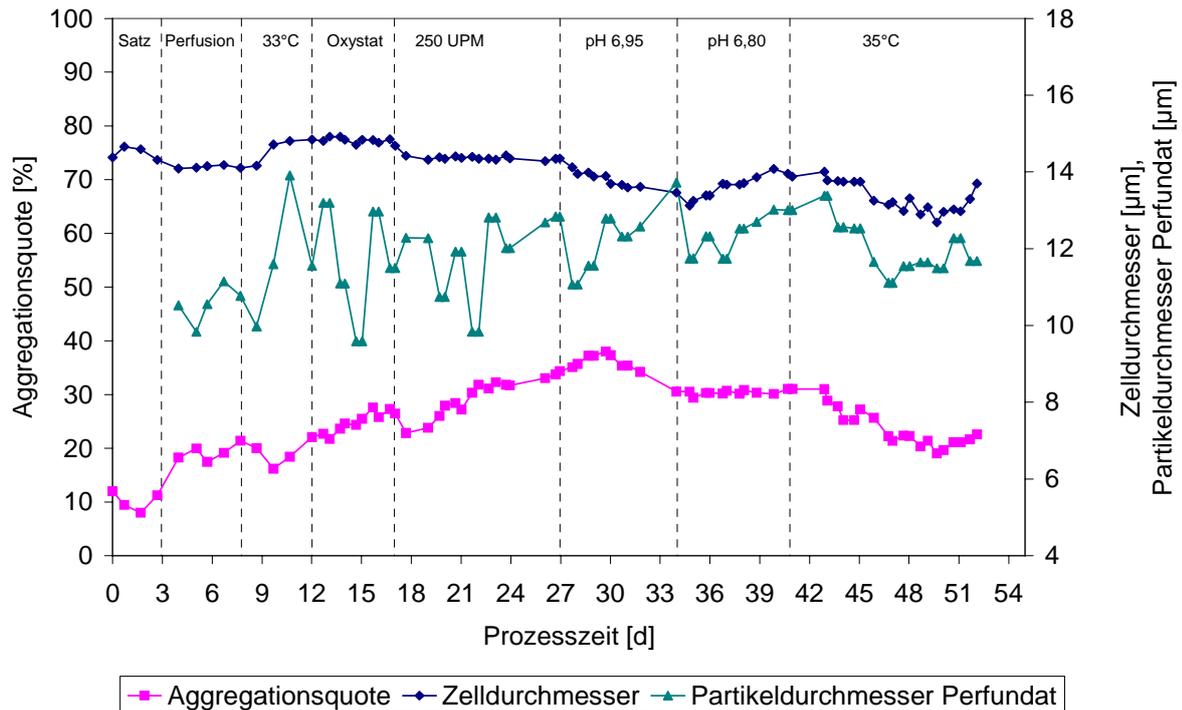


Abbildung 34: Aggregationsquoten, sowie Zell- und Partikeldurchmesser im Bioreaktor beziehungsweise im Perfundat während des Prozesses M2.

Die Zellentnahmeraten waren im Prozess M2 aufgrund der geringen Wachstumsraten zu niedrig, um einen kontinuierlichen Anstieg der Aggregationsquoten zu verhindern. In der Prozessmitte traten Aggregationsquoten über 30 % auf. Diese hatten keinen deutlichen Einfluss auf die Berechnung spezifischer metabolischer Raten. Die Abbildung 37 und die Abbildung 38 zeigen innerhalb einzelner Prozessphasen trotz variabler Aggregationsquoten konstante spezifische Raten. Bei einem pH-Wert von 6,80 stagnierte die Aggregationsquote bei 30 %, ohne dass Zellen aufgrund von Wachstum durch den Oxystat entnommen wurden. In diesem Prozess nahmen die Zelldurchmesser nach Absenken des pH-Werts tendenziell ab. Die sinkenden Aggregationsquoten in der letzten Prozessphase waren eine Folge der großen Entnahmeholumina nach Ausfällen des Oxystats.

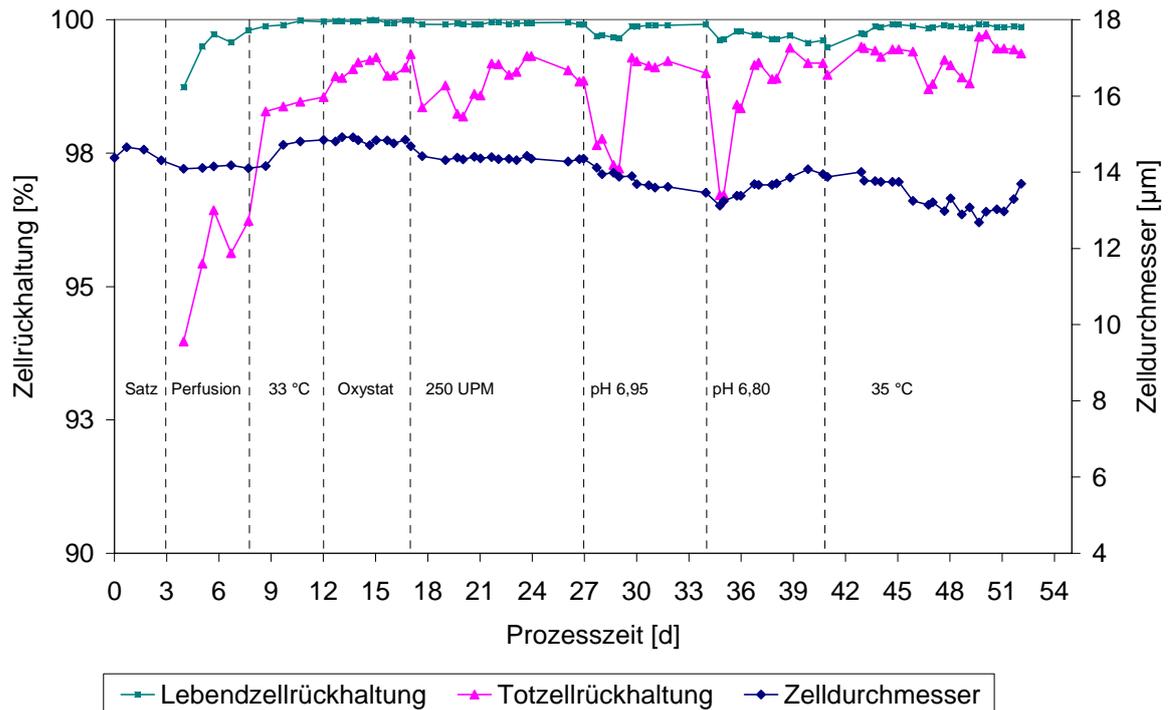


Abbildung 35: Zellrückhaltung des Plattensedimenters, sowie Zelldurchmesser im Bioreaktor während des Prozesses M2.

Die Zellrückhaltung durch einen Plattensedimentier hängt maßgeblich von den Partikeldurchmessern ab. In diesem Prozess traten in Folge der Absenkung des pH-Werts deutliche Veränderungen der Zell- und Partikeldurchmesser auf. Zur Illustration des Effekts auf die Zellrückhaltung ist der Durchmesser der Zellen im Bioreaktor in Abbildung 35 zusätzlich aufgeführt. Die mittlere Durchmesserdiffferenz lebender und toter Zellen betrug $2,4 \mu\text{m}$, wobei die Totzellerückhaltung mit $98,7 \%$ nur um $1,1 \%$ unter der Lebendzellerückhaltung lag. Die Partikelkonzentrationen im Perfundat schwankten aufgrund der geringen Partikelanzahlen zu stark für eine vergleichende Betrachtung. Auffällig war die Abnahme der Totzellerückhaltung nach den beiden pH-Absenkungen für jeweils ca. 2 Tage, die mit verringerten Partikeldurchmessern im Perfundat korrelierte (vergleiche hierzu Abbildung 34).

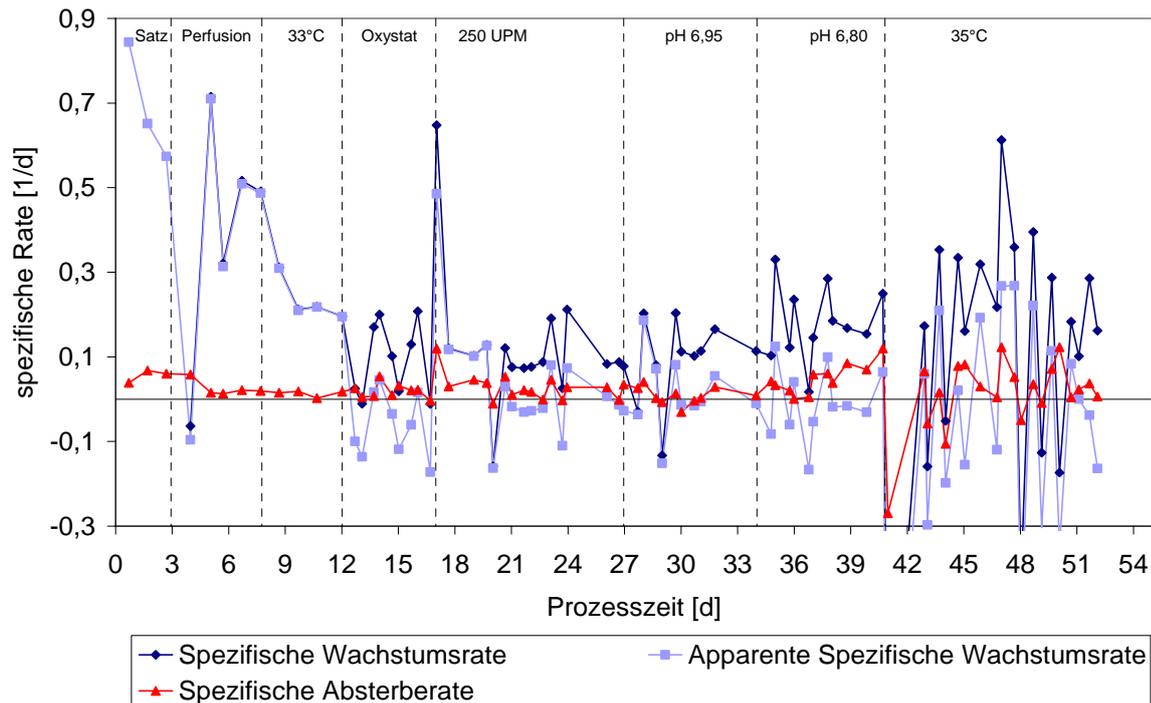


Abbildung 36: Spezifische Wachstumsraten während des Prozesses M2. Die apparente spezifische Wachstumsrate bezieht sich auf die Zellen im Bioreaktor, die spezifische Wachstumsrate bezieht die Zellen im Perfundat und der Zellentnahme mit ein.

Die Abbildung 36 zeigt die spezifischen Wachstumsraten und die spezifischen Absterberaten während des Prozesses M2. Nach der Absenkung der Temperatur zur Prozesszeit 6,74 Tage nahmen beide Raten ab. Durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 250 UPM nach 16,70 Tagen stieg die spezifische Absterberate von dem über die gesamte Prozessdauer gemittelten Wert von 0,06/d auf 0,12/d an. Dies resultierte aus den auf größere Aggregate stärker einwirkenden Scherkräften (Renner *et al.*, 1993). Ab dem 38. Prozesstag führte eine neue Mediumcharge (MAM-PF[®]2, Lot. Z04439B, Supplementierung auf 0,1 % Pluronic F68) zu einem Absinken der Viabilität.

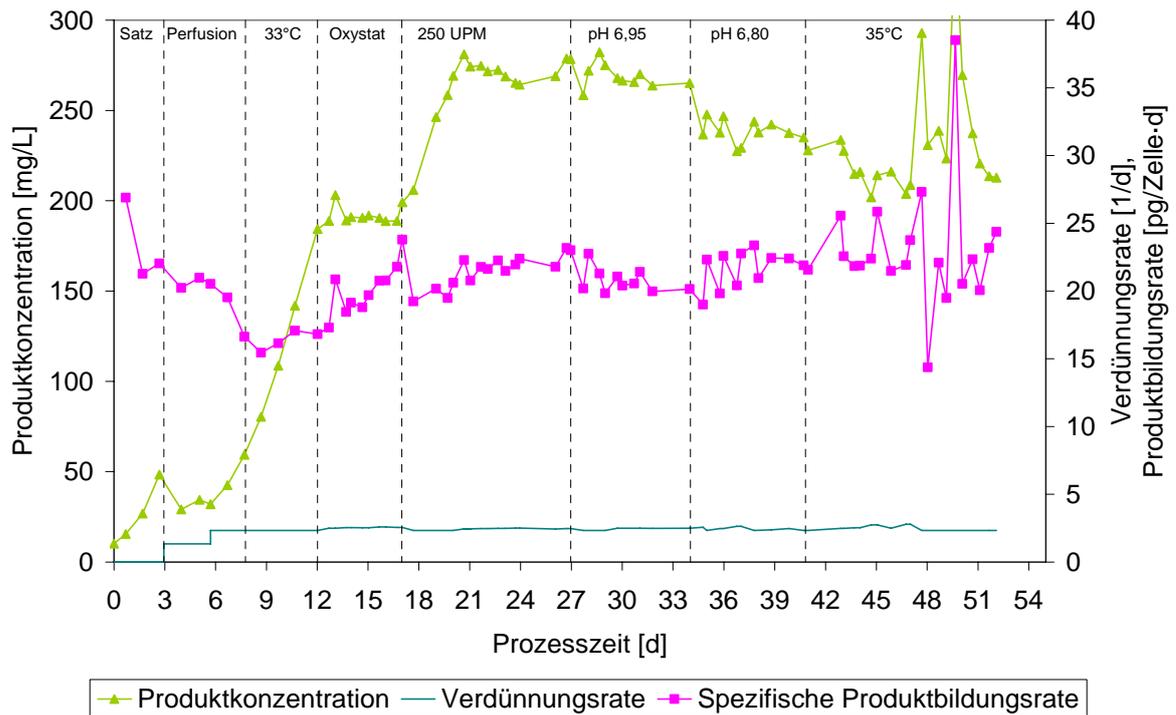


Abbildung 37: Produktkonzentrationen, spezifische Produktbildungsraten und Verdünnungsraten während des Prozesses M2.

Die in Abbildung 37 dargestellten spezifischen Produktbildungsraten waren, mit Ausnahme der Phase III, bei einem Mittelwert von 21,3 pg/Zelle·d weitgehend konstant. Der durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl von 150 auf 250 UPM an Tag 16,70 verbesserte Sauerstoffeintrag und die dadurch höhere Zelldichte sind deutlich am Anstieg der Produktkonzentrationen zu erkennen. Die Abnahme der Lebendzellichte von Tag 12 bis 17 spiegelte sich nicht in einem Absinken der Produktkonzentration wieder. Tatsächlich blieb diese konstant, während die spezifischen Produktbildungsraten scheinbar stetig zunahmen. Offensichtlich waren die Algorithmen des Cedex zur Bestimmung von Zelldichten in aggregathaltigen Zellsuspensionen suboptimal. Am Prozessende fiel die Oxystat-gesteuerte Zellentnahme einige Male aus, so dass die Produktkonzentrationen und damit die spezifischen Produktbildungsraten starken Schwankungen unterlagen.

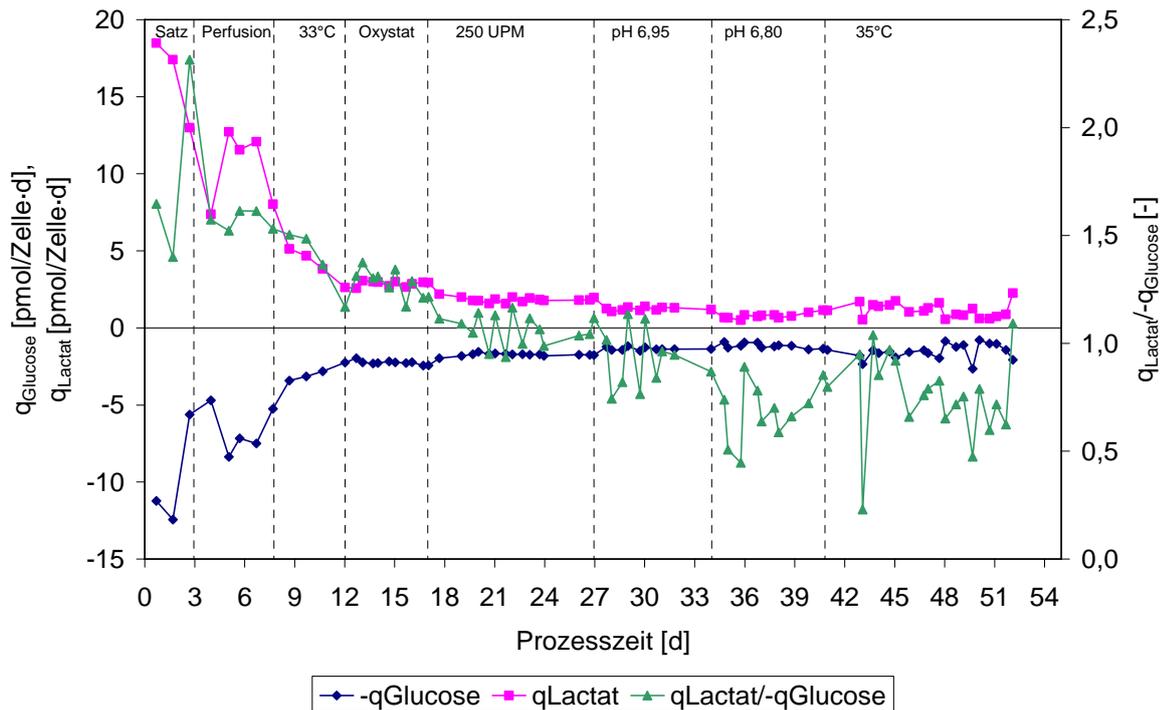


Abbildung 38: Spezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten, sowie Quotient beider während des Prozesses M2.

Die Abbildung 38 zeigt die Reaktion der Zellen auf Änderungen der Kultivierungsbedingungen innerhalb eines Tages. Durch Absenken des pH-Werts von 7,10 auf 6,80 wurde zum Beispiel die spezifische Glucoseverbrauchsrate von 1,78 $\text{pmol/Zelle}\cdot\text{d}$ auf 1,16 $\text{pmol/Zelle}\cdot\text{d}$ reduziert. Da die spezifische Lactatbildungsrate gleichzeitig sogar von 1,91 $\text{pmol/Zelle}\cdot\text{d}$ auf 0,79 $\text{pmol/Zelle}\cdot\text{d}$ abnahm, erreichte der metabolische Quotient aus Lactatbildungsrate und Glucoseverbrauchsrate Werte von bis zu 0,68. Die spezifischen Raten stiegen nicht, wie von Gódiá und Cairó 2006 beobachtet, mit den steigenden absoluten Konzentrationen der Substrate an, sondern waren von den physikalischen Kulturbedingungen abhängig. Bemerkenswert ist außerdem die Prozessphase IV, in der die berechnete spezifische Produktbildungsrate aufgrund der steigenden Zellaggregation stetig zunahm (Abbildung 37). Dieser Effekt trat in der gleichen Prozessphase nicht für die spezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate auf, die nahezu konstant blieben.

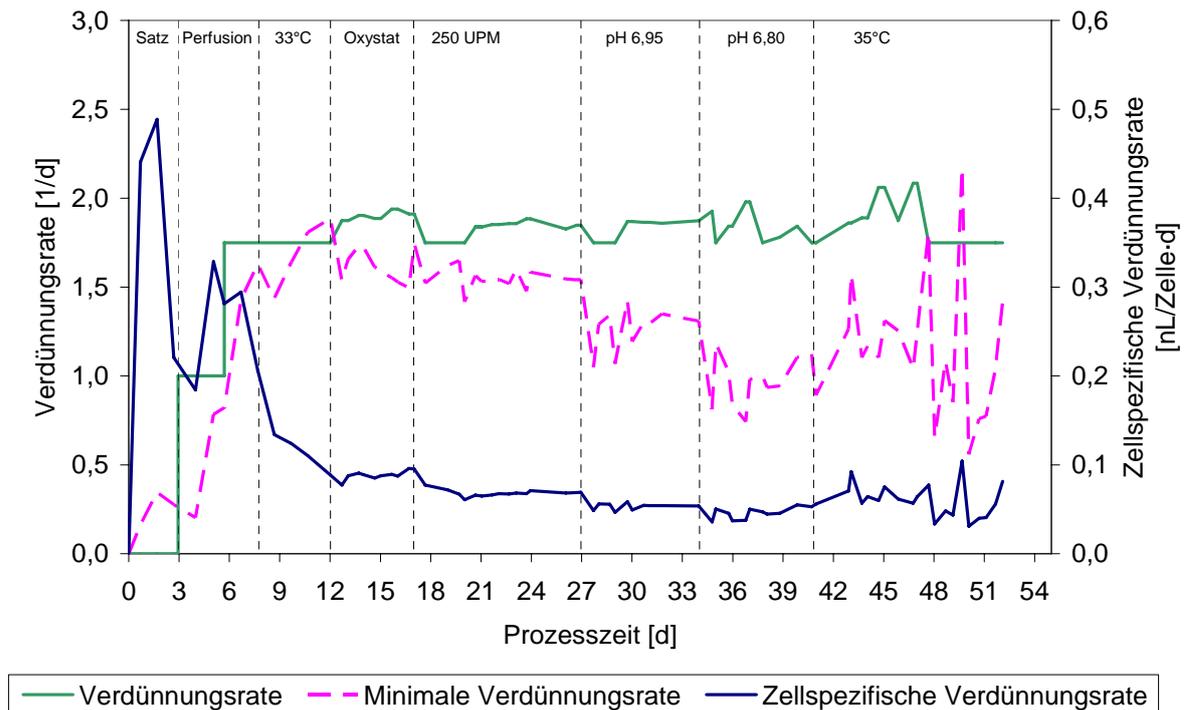


Abbildung 39: Verdünnungsraten, notwendige minimale Verdünnungsraten und zellspezifische Verdünnungsraten während des Prozesses M2.

Die Verdünnungsrate war durch die variierende Zellentnahmerate Schwankungen unterworfen. Die mittlere Zellentnahmerate entsprach aufgrund der hohen Zellrückhaltung des Plattensedimenters etwa der mittleren spezifischen Wachstumsrate von 0,12/d. Durch die Absenkung der Temperatur und des pH-Werts wurde die spezifische Glucoseverbrauchsrate während des Prozesses erniedrigt (Abbildung 38). Da angenommen wurde, dass Glucose aufgrund seiner Konzentration im Zufüttermedium von 25,44 mM unter allen Prozessbedingungen der primär limitierende Nutrient sein würde, wurden die minimale Verdünnungsrate und die zellspezifische Verdünnungsrate (engl. *cell specific dilution rate*, CSDR) auf dieser Basis berechnet (Abbildung 39). Diese Annahme war nicht zutreffend, wie in der Tabelle 9 zu sehen ist. Dort sind die größten aufgetretenen zellspezifischen Verdünnungsraten für einige Aminosäuren und Glucose zusammengestellt. In den grau unterlegten Feldern war die CSDR für Aspartat und Glutamat höher als die von Glucose und die von Phenylalanin identisch. Für die Aminosäuren Aspartat und Glutamat wurden in den Prozessphasen VI und VII mit mittleren Konzentrationen von 52 respektive 32 μM geringe Werte erreicht. Dies hatte keinen Einfluss auf die spezifische Wachstums- oder Produktbildungsrate und wirkte nicht limitierend.

Tabelle 9: Zellspezifische Verdünnungsraten für ausgewählte Mediumkomponenten während des Prozesses M2. In den grau unterlegten Feldern waren die spezifischen Verdünnungsraten höher oder gleich wie für Glucose. Bis auf Phenylalanin (Phe) sind die aufgeführten Aminosäuren nicht-essentiell. Negative zellspezifische Verdünnungsraten entsprechen einer Aminosäurebildung.

	Glucose	Aspartat	Glutamat	Serin	Glutamin	Tyrosin	Phe
Zustand	[nL/Zelle-d]						
Satz	0,38	-0,01	-0,37	0,13	0,26	0,00	0,06
Perfusion	0,27	0,06	-0,01	0,15	0,12	0,15	0,14
33°C	0,11	0,05	0,02	0,06	0,06	0,05	0,06
Oxystat	0,09	0,06	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06
250 UPM	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05
pH 6,95	0,05	0,06	0,06	0,04	0,03	0,04	0,05
pH 6,80	0,05	0,07	0,07	0,04	0,04	0,04	0,05
35°C	0,06	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06

Aus der nachstehenden Tabelle 10 kann aus einer Zusammenstellung spezifischer Raten unter anderem die Abhängigkeit des Quotienten von Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate vom pH-Wert abgelesen werden. Dabei führte eine Absenkung von pH 7,10 (Phase II) auf 6,80 (Phase VII) zu einer Halbierung des Werts dieses Quotienten, ohne dass die spezifische Wachstumsrate erniedrigt war.

Tabelle 10: Zusammenfassung spezifischer Raten des Prozesses M2.

Zustand	Nr.	μ	q_{Glucose}	$q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$	q_{Lactat}	q_{NH_4}	q_{rhGH}
		[1/d]	[pmol/Zelle-d]	[-]	[pmol/Zelle-d]	[pmol/Zelle-d]	[pg/Zelle-d]
Satz	I	0,69	-9,76	1,79	16,30	1,58	23,40
Perfusion	II	0,37	-6,93	1,58	10,94	0,44	20,32
33 °C	III	0,23	-2,91	1,38	4,07	0,23	16,38
Oxystat	IV	0,09	-2,23	1,29	2,87	0,21	19,73
250 UPM	V	0,12	-1,78	1,07	1,91	0,19	21,62
pH 6,95	VI	0,09	-1,35	0,92	1,24	0,20	20,76
pH 6,80	VII	0,18	-1,16	0,68	0,79	0,30	21,63
35 °C	VIII	0,04	-1,48	0,76	1,12	0,32	22,01

Diskussion der Optimierung des pH-Werts

Dieser Prozess diente der Untersuchung des Effekts reduzierter pH-Werte auf die zellspezifischen Verdünnungsraten und die spezifischen Produktbildungsraten. Innerhalb von knapp zwei Monaten wurden dabei 186 L Medium eingesetzt und damit 39,4 g rhGH produziert. Durch die im Vergleich zum Prozess M1 höheren Lebendzellichten von durchschnittlich $1,85 \cdot 10^7$ Zellen/mL konnte bei identischer Perfusionsrate das Medium besser ausgenutzt werden. Es wurden maximale Lebendzellichten um $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/mL und Produktkonzentrationen um 270 mg/L erzielt.

Ein Effekt der pH-Wert-Absenkung von pH 7,10 auf 6,80 war die Reduktion der spezifischen Bildungsrate für Lactat von 1,91 pmol/Zelle·d (Phase II) auf 0,79 pmol/Zelle·d (Phase VII). Dies entspricht einer Verringerung um 59 %. Insbesondere der metabolische Quotient von Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate nahm sehr geringe Werte an. Die in den Phasen I bis VI aufgetretenen metabolischen Quotienten ($q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$) entsprachen dem von Büntemeyer *et al.* 1995 bestimmten Wert von 1,4. In den folgenden Phasen nahm nach Absenkung des pH-Werts die zellspezifische Verdünnungsrate für Glucose von 0,09 nL/Zelle·d (Phase IV) auf 0,05 nL/Zelle·d (Phase VI) ab. Simultan stieg die CSDR für Aspartat und Glutamat an, welche alternativ zur Energiegewinnung eingesetzt wurden. In Abhängigkeit vom pH-Wert fand somit keine generelle Verringerung der Stoffwechselaktivität statt, sondern eine Umstellung des Metabolismus. Unter Berücksichtigung dessen ist das beschriebene Verfahren der Reduktion von Temperatur und pH-Wert eine robuste und einfache Methode zur Manipulation der zellspezifischen Verdünnungsrate bei gleichzeitiger Reduktion des Wachstums. Auf die Zugabe von chemischen Proliferationsinhibitoren oder genetische Manipulation der Zellen zur Verminderung der spezifischen Wachstumsrate und der damit korrelierenden spezifischen Substratverbrauchsrate (Mercille *et al.*, 2000) kann somit verzichtet werden. Durch Herstellung eines konzentrierten Mediums unter Berücksichtigung der CSDR aller Komponenten könnte die Verdünnungsrate weiter reduziert werden. In einer so genannten „push to low“-Strategie gelang es beispielsweise Konstantinov *et al.* (2006) durch eine Mediumoptimierung während eines Prozesses die CSDR von 0,3 auf 0,05 nL/Zelle·d zu reduzieren.

Neben der Reduktion der Verbrauchsrate wurde bei einem pH-Wert von 6,95 der Laugeverbrauch halbiert. Dies führte zu einer abgesenkten Osmolalität ohne Einfluss auf die Produktqualität oder Viabilität der Kultur (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde der pH-Wert bei pH 6,80 über die Zugabe von Kohlendioxid geregelt. Dies hatte um 11 % niedrigere Lebendzellichten zur Folge, da ein konstanter Anteil des Gesamtgasvolumenstromes nunmehr Kohlendioxid war. Außerdem trat ein aus der Wechselwirkung der verschiedenen PID-Regler resultierendes Problem auf: Wenn zur Sauerstoffversorgung der pO_2 -Regler 85 % Sauerstoff dosieren musste und der pH-Regler – der Priorität gegenüber der pO_2 -Regelung hatte – den Anteil an Kohlendioxid erhöhte, sank der Sauerstoffpartialdruck entsprechend ab. Dieses Problem könnte durch Verwendung eines Mediums mit geringerer Natriumcarbonatkonzentration gelöst werden (Zeng und Bi, 2006).

In Bezug auf die hohen Aggregationsquoten kann der Schluss gezogen werden, dass sich eine frühzeitigere Anhebung der Rührerdrehzahl als erforderlich erwies. Dabei war die Stagnation der Aggregationsquote bei einem pH-Wert von 6,80 ein unerwarteter, positiver Effekt. Die

Natriumcarbonatkonzentration hätte jedoch abgesenkt werden müssen, um diesen Vorteil nicht aufgrund der hohen notwendigen Kohlendioxidkonzentration einzubüßen.

Die konstanten spezifischen Produktbildungsraten, besonders in der vierten Prozessphase, belegen, wie zuverlässig die Lebendzellichten durch den Oxystat geregelt werden können. Im Mittel betrug die spezifische Produktbildungsrate 21,3 pg/Zelle·d. Dies war ein für die CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie typischer Wert.

Die Ursache für die ab Prozesstag 38 fallende Viabilität konnte mithilfe der Analytik nicht aufgeklärt werden (vergleiche hierzu die Diskussion zum Prozess R). Jedoch konnten durch eine Temperaturerhöhung von 33 auf 35 °C die spezifische Wachstumsrate und somit die Zellentnahmerate, sowie die Viabilität der Kultur positiv beeinflusst werden.

Die berechnete volumetrische Klärrate (Batt *et al.*, 1990) für durchschnittlich große lebende Zellen betrug 822 mL/h. Dies hätte Perfuionsraten von 9,40/d ohne Austrag lebender Zellen ermöglicht (Kapitel 2.1.6). Tatsächlich war schon bei deutlich geringeren Perfuionsraten die Zellrückhaltung unvollständig. Selbst unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers im Perfundat von 11,9 µm berechnete sich eine volumetrische Klärrate von 603 mL/h. Ursächlich für die im Vergleich zu den berechneten Werten geringe Zellrückhaltung waren möglicherweise das Strömungsprofil im Sedimeter, die relativ hohe Frequenz von 100 Hz des elektronischen Vibrators (Henzler, 2003) oder eine suboptimale Intensität der Vibration. Wärmekonvektion kommt als Ursache nicht in Betracht, da der Plattensedimeter auf Raumtemperatur gekühlt wurde und die Umgebungstemperatur durch eine Klimatisierung auf 19 °C (±2 °C) geregelt wurde. Aufgrund der Durchmesser- und Dichtedifferenz toter und lebender Zellen erfolgte die erwartete selektierende Rückhaltung lebender Zellen (Searles *et al.*, 1994).

3.2.4 Prozess M3: Untersuchung der Effekte reduzierter Verdünnungsraten

In den Prozessen M1 und M2 wurden höhere Perfuionsraten eingestellt als zur Versorgung der gemessenen Nutrienten erforderlich waren. Für einen unter ökonomischen Gesichtspunkten zu entwickelnden Prozess ist ein geringer Mediumsverbrauch wünschenswert. Hohe Produktkonzentrationen in entsprechend geringeren Volumina erleichtern zudem die Primäraufreinigung. CHO-Zellen unterhalten bei einer Überversorgung mit Nährstoffen einen Überflusstoffwechsel (Gódiá und Cairó, 2006); durch die Temperatur- und pH-Wert-Absenkung konnte die zellspezifische Verdünnungsrate reduziert werden. In den vorangegangenen Expe-

perimenten wurde die Verdünnungsrate nicht dem geringeren Bedarf angepasst. Daher sollte nun untersucht werden, ob durch eine Reduktion der Substratkonzentrationen der Stoffwechsel noch effizienter werden würde. Die Kulturbedingungen sollten dabei über einen längeren Zeitraum nicht verändert werden. In Bezug auf die Produktqualität war zu prüfen, ob bei hohen Produktkonzentrationen und höheren Verweilzeiten des Produkts eine Dimerisierung, Fragmentierung oder Desamidierung des rhGH auftraten.

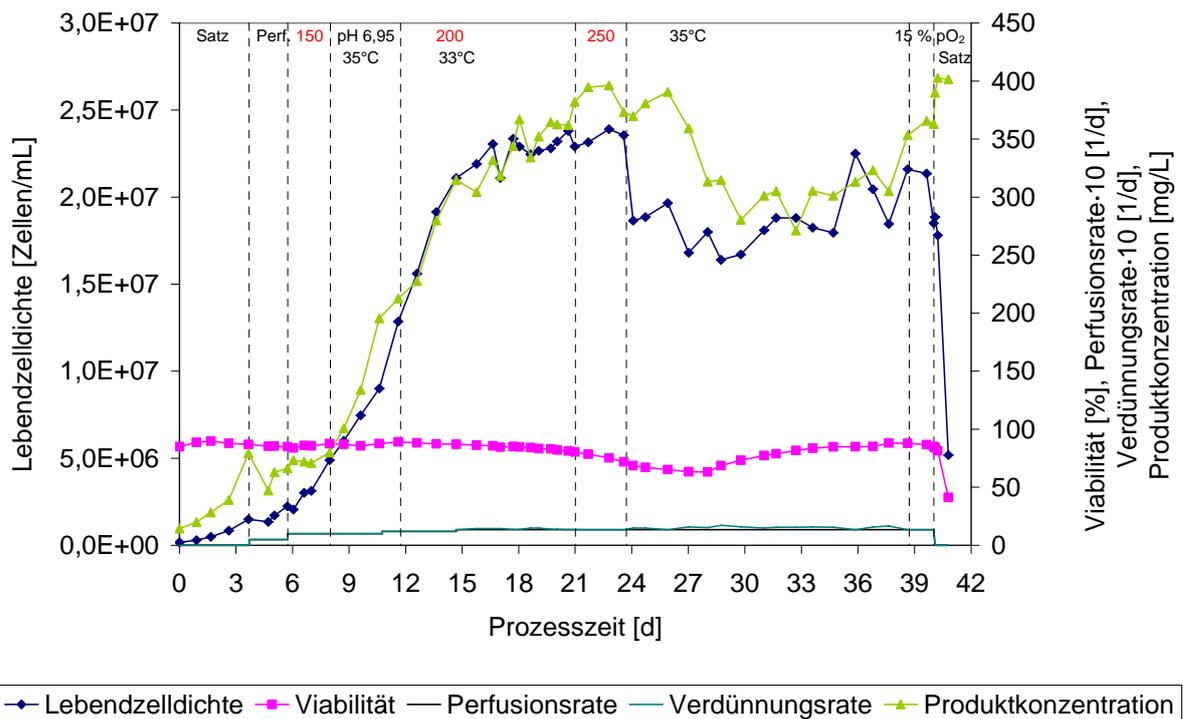


Abbildung 40: Lebzellendichten, Viabilitäten und Produktkonzentrationen, sowie Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses M3. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Der Prozess M3 (Membranbegasung) wurde mit einer Lebzellendichte von $1,75 \cdot 10^5$ Zellen/mL angeimpft (Abbildung 40) und hatte neun Prozessphasen. Nach der initialen Satz-Phase wurde der Perfusionsprozess zunächst ohne Zellentnahme und einer Perfusionsrate von 0,50/d gestartet. Die Perfusionsrate wurde zur Prozesszeit 5,75 Tage auf 1,00 und die Rührerdrehzahl auf 150 UPM erhöht. Ab der Prozesszeit 11,73 Tage wurde die Kultur mit Zellentnahme unter Regelung des Oxystats und konstanter Perfusionsrate von 1,20/d geführt. Zur Vermeidung einer Glucoselimitierung musste die Temperatur auf 33 °C reduziert werden. Dies verursachte eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate von 0,28/d auf 0,09/d. Dadurch wurde die Anwachsphase im Vergleich zum Prozess M2, bei dem die spezifische Wachstumsrate durch die Temperaturabsenkung nur auf 0,23/d absank, bis zum Erreichen

einer Lebendzellendichte von $2,11 \cdot 10^7$ Zellen/mL um 2,60 Tage ausgedehnt. Obwohl die Perfusionsrate auf 1,35/d erhöht wurde, nahm zwischen der Prozesszeit 11,61 Tage und 20,97 Tage die Viabilität von 89,1 auf 80,4 % ab. Zur Anhebung der Viabilität über eine erhöhte Wachstums- und Zellentnahmerate wurde die Temperatur auf 35 °C eingestellt. Jedoch führte erst die Verwendung einer neuen Mediumcharge zu einer verbesserten Viabilität. Die spätere Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen (Abbildung 45) zeigte die für den Abfall der Viabilität ursächlichen Limitationen.

Ab dem 38. Prozesstag war die pH-Elektrode nicht mehr kalibrierbar. Zur Untersuchung der Auswirkungen auf die Regelung wurde in der vorletzten Prozessphase der Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks von 40 auf 15 % reduziert. In der letzten Phase wurde der Prozess im Satz betrieben, wobei Glucose, Glutamin und Phenylalanin innerhalb von zwei Stunden vollständig verbraucht wurden. Daraufhin begannen die Zellen Lactat zu metabolisieren. Durch die Glutamin- und Phenylalaninlimitierung fiel die Viabilität der Kultur innerhalb von 19 Stunden von 85 auf 41 % ab und der Prozess wurde terminiert.

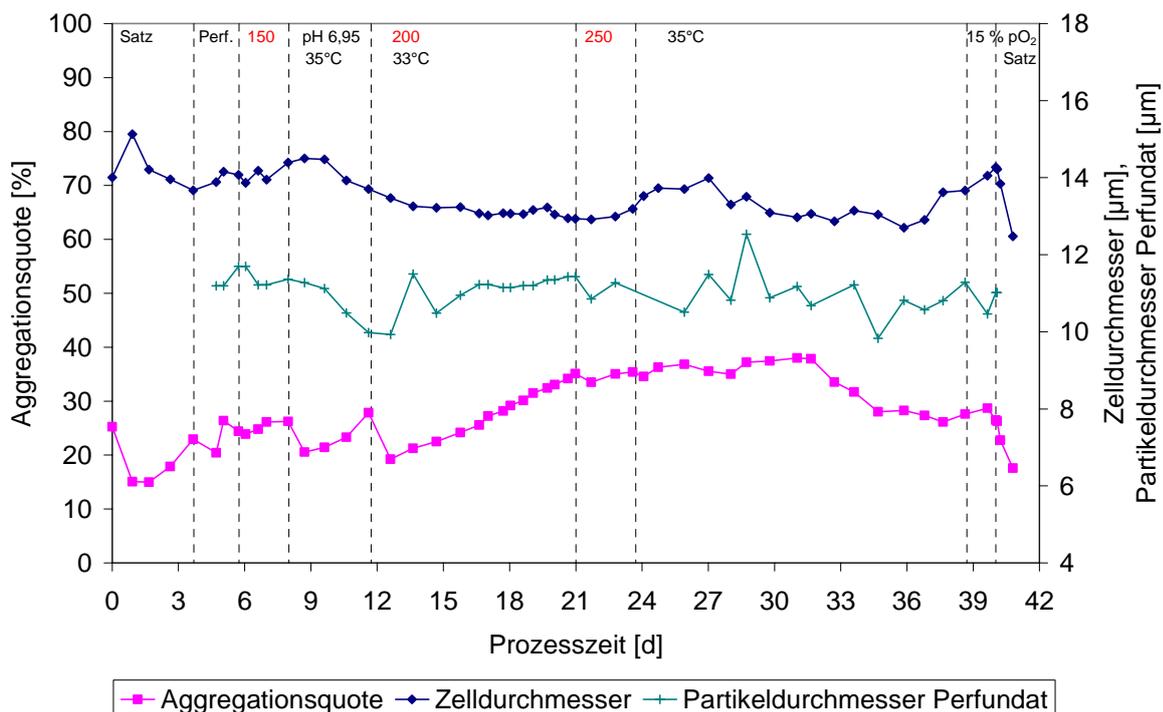


Abbildung 41: Aggregationsquoten, sowie Zell- und Partikeldurchmesser im Bioreaktor beziehungsweise im Perfundat während des Prozesses M3. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Der Zelldurchmesser nahm in der Prozesszeit zwischen Tag 8,71 und Tag 20,97 von 14,2 auf 12,9 µm ab (Abbildung 41). Dies korrelierte mit einer Erniedrigung der spezifischen Wachs-

tumsrate von 0,28/d bei 35 °C auf 0,09/d bei 33 °C. In der Folge stiegen die Aggregationsquoten wegen zu geringer Zellentnahmeraten kontinuierlich an. Der Anstieg der Aggregationsquote konnte in Phase VI durch Rühren mit 250 UPM begrenzt werden. Ab der Prozesszeit 31,65 Tage nahm sie stetig bis auf unter 30 % ab. Ursächlich waren eine in Folge der nicht mehr vorhandenen Phenylalaninlimitation erhöhte spezifische Wachstumsrate (Abbildung 45) und eine sehr geringe spezifische Absterberate (Daten nicht gezeigt), sowie die relativ niedrigen Zelldichten. Zudem wurden durch Ausfälle des Oxystats in der Prozessphase VII große Mengen Zellsuspension entnommen.

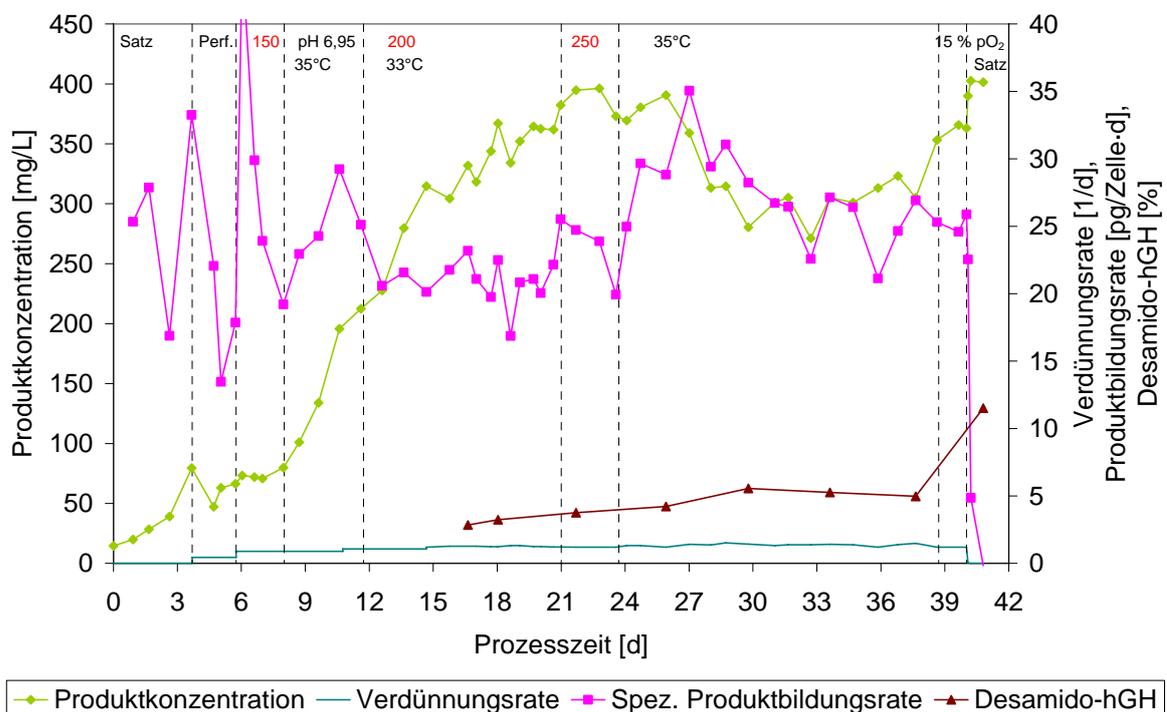


Abbildung 42: Produktkonzentrationen, spezifische Produktbildungsrate und Verdünnungsraten, sowie Anteil an desamidiertem rhGH während des Prozesses M3. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Durch die im Vergleich zum Prozess M2 reduzierte Verdünnungsrate wurden Produktkonzentrationen bis zu 400 mg/L erreicht. Die durchschnittliche spezifische Produktbildungsrate, ohne die Absterbephase am Ende, betrug im Prozess M3 24,6 pg/Zelle·d. Unter Vernachlässigung der Schwankungen bei Prozessbeginn lassen sich in Abhängigkeit von der Temperatur zwei Phasen erkennen: Bei 33 °C ab Prozesstag 11,73 betrug die mittlere spezifische Produktbildungsrate 21,3 pg/Zelle·d und nahm bei 35 °C ab Prozesszeit 23,71 Tage mittlere Werte von 27,2 pg/Zelle·d an. Somit war in diesem Prozess im Unterschied zum Prozess M1 eine Verringerung der spezifischen Produktbildung schon bei 33 °C gegeben. Allerdings war der pH-Wert in der Phase VII mit 6,95 niedriger als in Prozess M1, in dem der pH-Wert konstant

7,10 betrug und die relativ hohen Zellaggregationsquoten erschweren die Interpretation der Daten. Der Anteil an desamidiertem Wachstumshormon stieg während der Perfusion von 2,85 % bei der Prozesszeit 16,63 Tage auf 4,97 % nach 37,63 Tagen an. Am Ende der Absterbephase im Satz wurde mit 11,51 % desamidiertem rhGH eine schlechte Produktqualität festgestellt.

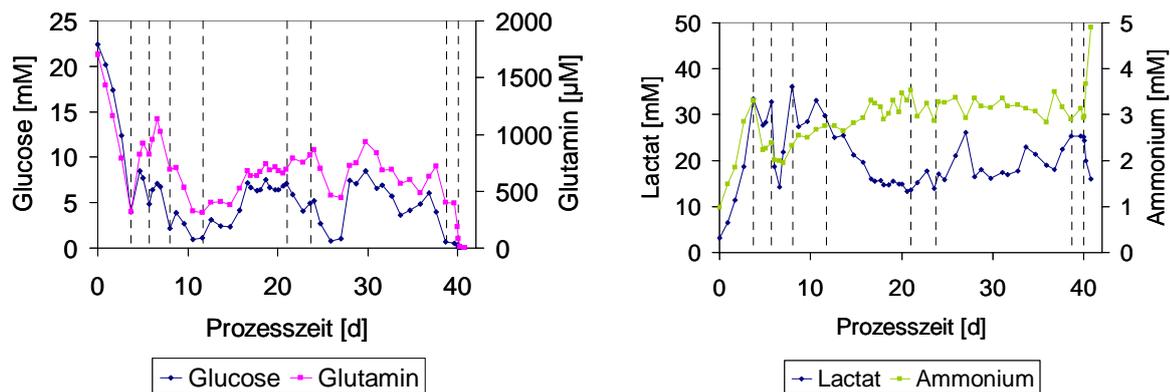


Abbildung 43: Glucose-, Glutamin-, Lactat- und Ammoniumkonzentrationen während des Prozesses M3.

Während des Perfusionsbetriebs traten in zwei Phasen besonders geringe Glucosekonzentrationen auf (Abbildung 43). Zur Prozesszeit 10,60 Tage wurden 0,97 mM Glucose und zur Prozesszeit 25,91 Tage nur 0,76 mM Glucose gemessen. Dabei wurde das zweite Minimum durch das Driften der pH-Elektrode in den alkalischen Bereich verursacht (vergleiche Abbildung 46). Die Lactat- und Ammoniumkonzentrationen erreichten, abgesehen von der terminalen Satz-Phase, mit maximal 36,1 mM beziehungsweise 3,53 mM keine inhibitorischen Konzentrationen.

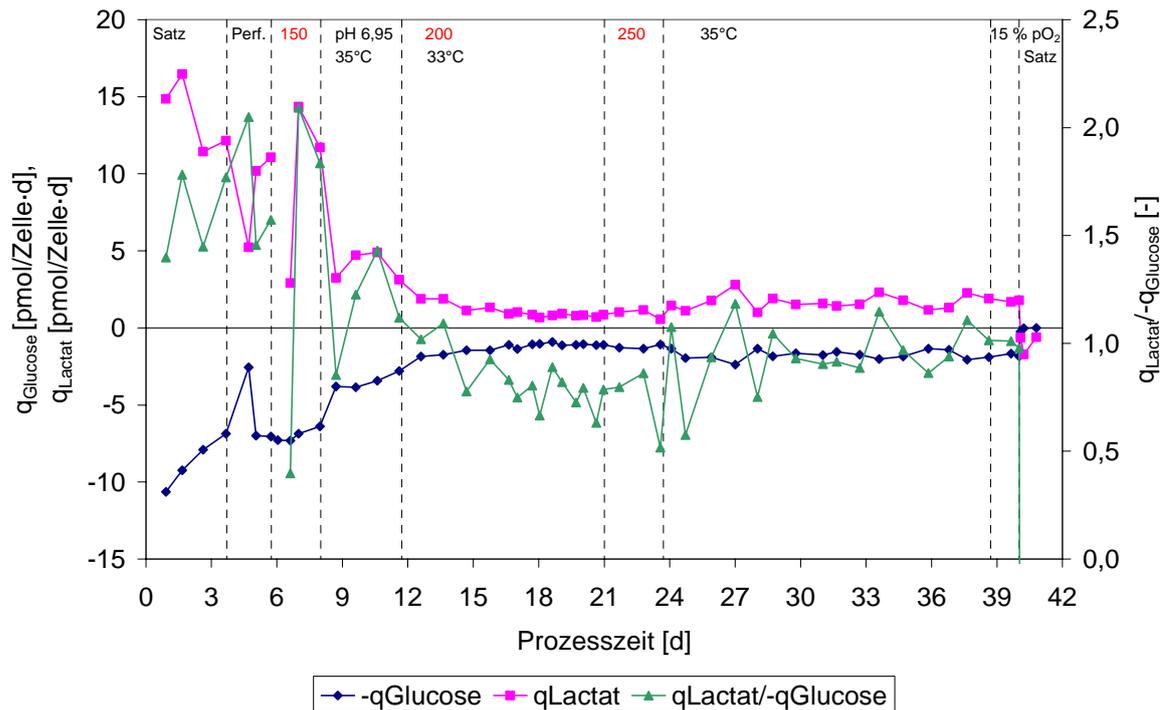


Abbildung 44: Spezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten, sowie Quotient beider während des Prozesses M3. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Aus der Abbildung 44 wird ersichtlich, wie sich durch die Absenkung der Temperatur von 37 auf 33 °C und des pH-Werts von 7,10 auf 6,95 die spezifischen Raten verändern. Ab dem 12. Prozesstag betrug die spezifische Glucoseverbrauchsrate im Mittel 1,24 pmol/Zelle·d und die spezifische Lactatbildungsrate 1,05 pmol/Zelle·d. Diese Werte liegen um 0,11 beziehungsweise um 0,19 pmol/Zelle·d unter denen des Prozesses M2, bei dem bis auf die Rührerdrehzahl von 200 UPM die gleichen Bedingungen eingestellt waren. Besonders auffällig sind die Abweichungen des Quotienten aus $q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$ zu den Prozesszeiten 27,01 und 33,60 Tage, an denen der Wert sprunghaft anstieg. Die Ursache lag im Driften der pH-Elektrode (Abbildung 46), die zu einer gesteigerten spezifischen Lactatbildungsrate führte – am 27. Prozesstag zum Beispiel um +64 %.

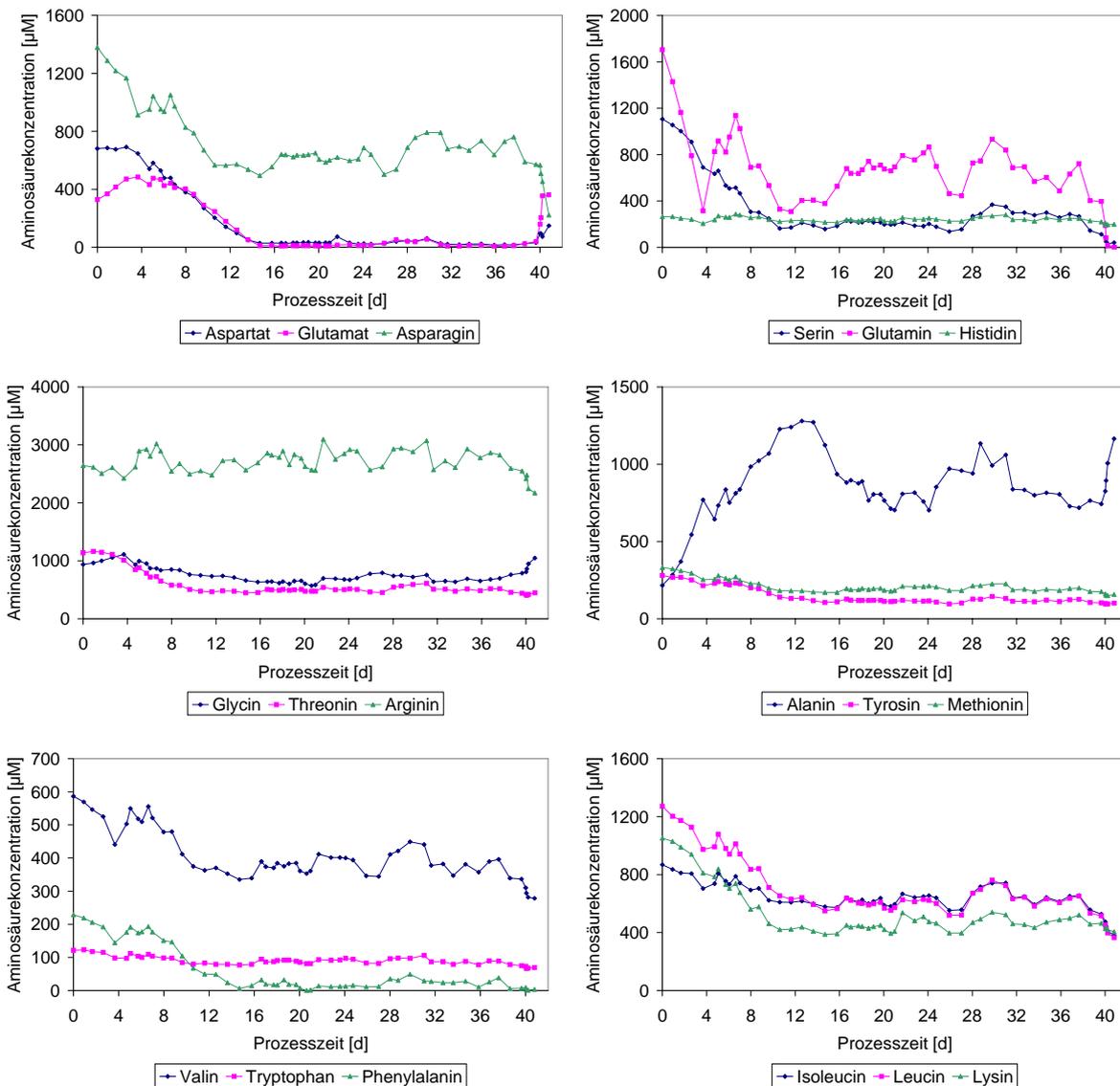


Abbildung 45: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während des Prozesses M3. Die Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Phenylalanin wurden zeitweilig vollständig verbraucht.

Wie Abbildung 45 illustriert, waren im Prozess M3 infolge der reduzierten Perfusionen die Konzentrationen einiger Aminosäuren zeitweilig sehr niedrig. Im Zeitraum von Tag acht bis Tag 15 war zusätzlich die Glucosekonzentration mit durchschnittlich 2,3 mM gering (Abbildung 43). Um den Glucoseverbrauch zu senken, wurde die Temperatur zur Prozesszeit 11,61 Tage auf 33 °C reduziert. Da die Lebendzellichte weiter anstieg, wurde zur Vermeidung einer Glucoselimitierung die Perfusionsrate an Prozesstag 15,77 auf 1,35/d erhöht. Diese geringfügige Erhöhung erklärt nicht das Absinken der Alaninkonzentration um ein Drittel in der Folgewoche. In den Prozessphasen V bis VII erreichten die durchschnittlichen Konzentrationen von Glutamat und Aspartat mit 35 µM beziehungsweise 19 µM sehr geringe Werte. Die essentielle Aminosäure Phenylalanin war zwischen dem 15. und dem 27. Prozesstag limitierend und korreliert mit der in diesem Zeitraum geringen spezifischen Wachstumsrate von

0,03/d. Zudem fiel die Viabilität bei steigender Aggregationsquote auf bis zu 63 % ab. Am Prozesstag 26 wurde der Sollwert des Oxystats von 430 auf 400 eingestellt und zwei Tage später eine andere Mediumcharge verwendet, woraufhin die Lebendzell-dichte sank und die Phenylalaninkonzentration auf nicht-limitierende Werte zunahm. Die weiterhin geringen Konzentrationen von Aspartat und Glutamat hatten keinen negativen Einfluss auf die Viabilität, das Wachstum und die Produktbildung.

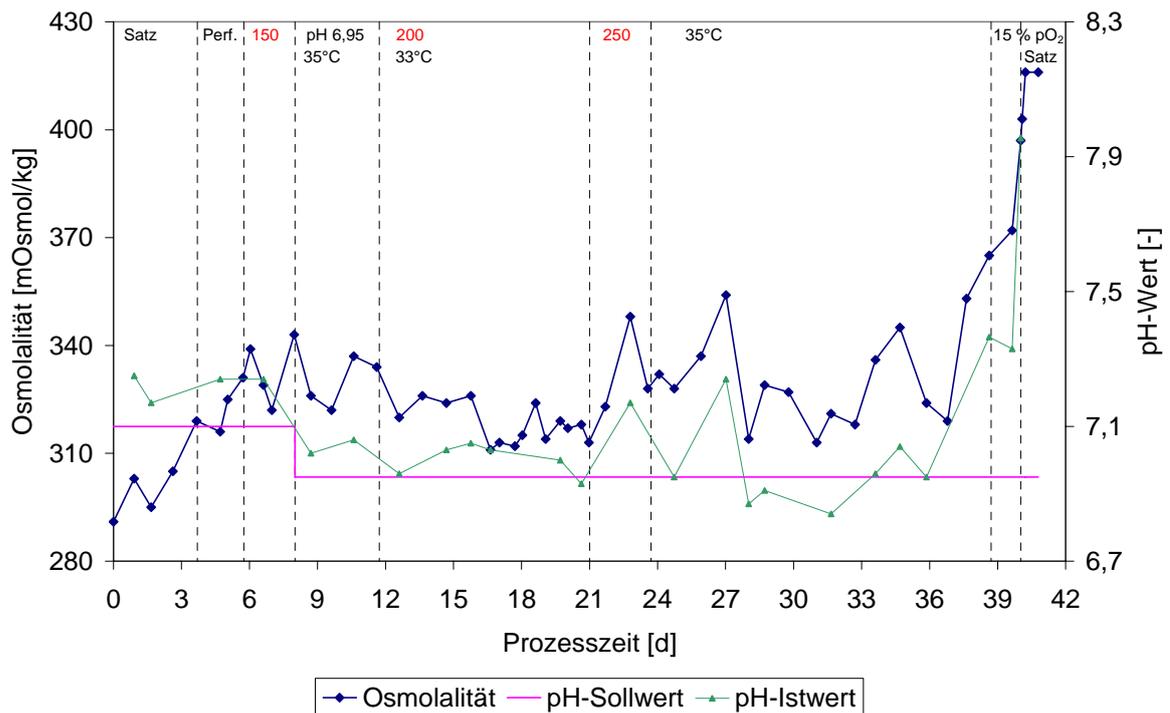


Abbildung 46: pH-Soll- und pH-Ist-Werte (externe Messung), sowie Osmolalitäten während des Prozesses M3. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Zu den Prozesszeiten 22,79 Tage und 27,01 Tage wurden sprunghaft erhöhte Osmolalitäten um 350 mOsmol/kg gemessen (Abbildung 46), die nicht durch Veränderungen in den Aminosäure- oder Glucosekonzentrationen zu erklären sind. Die externe Messung des pH-Werts zeigte ein Driften der pH-Elektrode im Bioreaktor vorwiegend in den alkalischen Bereich. Durch den erhöhten pH-Wert nahm die spezifische Lactatbildungsrate zu. Folglich wurde zur Regelung des pH-Werts eine größere Menge Natriumcarbonat zugegeben und die Osmolalitäten stiegen an. Im Prozess M1 wurden mit 370 mOsmol/kg noch höhere Werte erreicht, ohne dass negative Auswirkungen beobachtet wurden. Ein Effekt des pH-Werts von 7,24 zur Prozesszeit 27,01 Tage war die Steigerung der spezifischen Glutaminverbrauchsrate von einem durchschnittlichen Wert von 0,15 pmol/Zelle·d in der Prozessphase VII auf 0,19 pmol/Zelle·d (Daten nicht gezeigt) bei simultan verringerten Ammoniumkonzentrationen (Abbildung 43).

Die Abweichungen des pH-Werts wurden stets durch Anpassung der Asymmetrie am Messverstärker ausgeglichen. Erst ab Prozesszeit 38,60 Tage konnte die Abweichung nicht mehr nachgeregelt werden und führte zur Terminierung des Prozesses.

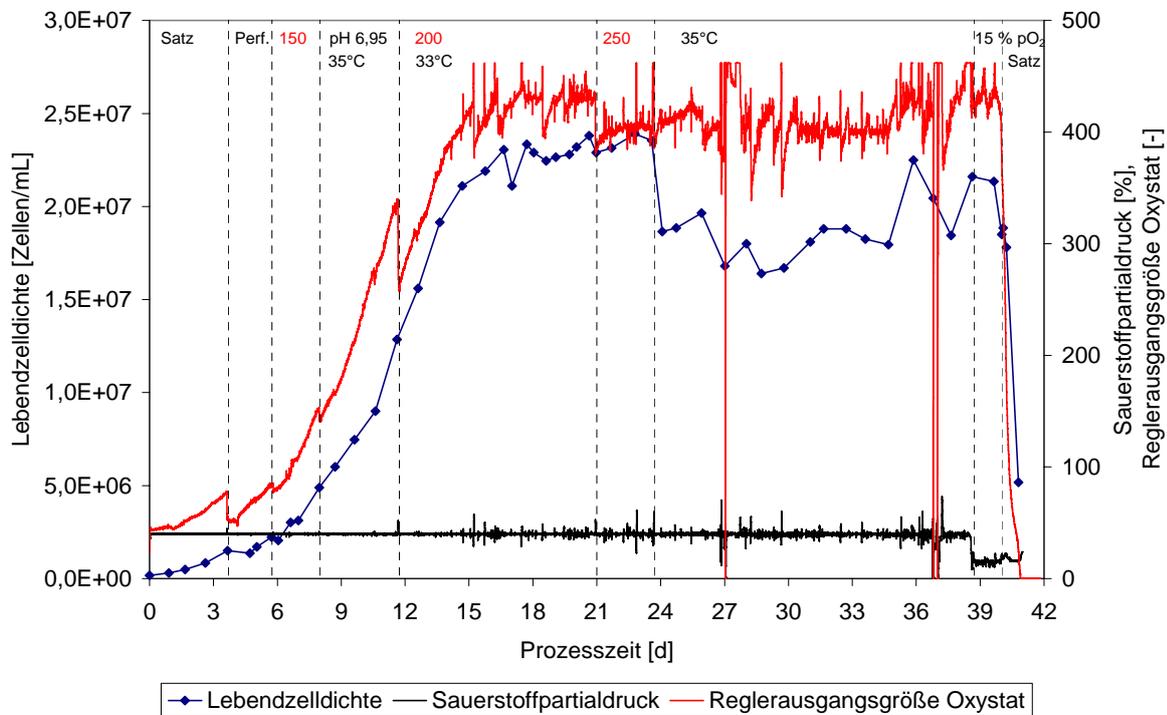


Abbildung 47: Sauerstoffpartialdrücke, Lebendzellichten und Reglerausgangsgrößen des Oxystats während des Prozesses M3. Zur Prozesszeit 38,71 Tage wurde der Sollwert des Sauerstoffpartialdruckes von 40 auf 15 % abgesenkt. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Nach dem Einschalten der Perfusion war eine deutliche Abnahme der Reglerausgangsgröße des pO_2 -Reglers zu erkennen (Abbildung 47). Dies wurde zum einen durch die Hypothermie im Plattensediment und die resultierende Reduktion der Aktivität des Metabolismus und zum anderen durch den Sauerstoffeintrag durch die Silikonschläuche im externen Kreislauf verursacht. Da zur Prozesszeit 11,73 Tage gleichzeitig die Temperatur reduziert und die Rührerdrehzahl erhöht wurden, kann keine Aussage über die Reduktion der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate durch die verringerte Temperatur gemacht werden. In der Prozessphase VI nahm die Lebendzelldichte nicht mehr zu, da die spezifische Absterberate größer als die spezifische Wachstumsrate war; dies korreliert mit einer stagnierenden Reglerausgangsgröße des pO_2 -Reglers. Um dem pO_2 -Regler und dem Oxystat ein Schwingen zu ermöglichen, wurde der Sollwert des Oxystats zur Prozesszeit 45,91 Tage von 430 auf 400 herabgesetzt. Dies war zusammen mit der um 2 °C höheren Kultivierungstemperatur für die in der Folge geringeren Lebendzellichten verantwortlich.

Die in der Tabelle 11 gezeigten spezifischen Raten zeigen insbesondere beim Quotienten aus Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate eine Korrelation mit dem Absinken des pH-Werts. Die überproportional starke Abnahme der Lactatbildungsrate in der sechsten Prozessphase führte zu dem geringen Wert des Quotienten von 0,72. Gleichzeitig nahmen auch die spezifische Ammoniumbildungsrate und die spezifische Wachstumsrate einen minimalen Wert an. Bemerkenswert ist die Satz-Phase am Ende des Versuchs, in der die Zellen abstarben und aufgrund der Glucoselimitation Lactat metabolisierten. Dies macht sich in einer Lactatverbrauchsrate von 0,99 pmol/Zelle·d in dieser Phase bemerkbar. Zudem nahm die spezifische Produktbildungsrate in der letzten Prozessphase unter Mehrfachlimitation sehr niedrige Werte an.

Tabelle 11: Zusammenfassung spezifischer Raten des Prozesses M3.

Zustand	Nr.	μ [1/d]	q_{Glucose} [pmol/Zelle·d]	$q_{\text{Lact.}}/q_{\text{Gluc.}}$ [-]	q_{Lactat} [pmol/Zelle·d]	q_{NH_4} [pmol/Zelle·d]	q_{rhGH} [pg/Zelle·d]
Satz	I	0,59	-8,66	1,60	13,73	1,37	25,84
Perfusion	II	0,62	-7,02	1,51	10,63	0,57	17,79
150 UPM	III	0,28	-6,96	1,44	9,66	0,44	29,48
35 °C, pH 6,95	IV	0,28	-3,47	1,16	4,00	0,34	25,39
33 °C	V	0,09	-1,24	0,82	1,05	0,17	21,33
250 UPM	VI	0,01	-1,24	0,73	0,92	0,13	22,85
35 °C	VII	0,15	-1,75	0,95	1,68	0,22	27,16
15 % pO ₂	VIII	-0,19	-1,75	0,99	1,74	0,17	25,24
Absterbephase	IX	-0,76	-0,08	-541,75	-0,99	0,16	8,84

Diskussion der Effekte reduzierter Verdünnungsraten

Aus den Daten der vorangegangenen Prozesse M1 und M2 wurde berechnet, dass eine Verdünnungsrate von ca. 1,20/d zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ausreichen sollte. Das Ziel dieses Experiments war daher die Untersuchung der Effekte erniedrigter Perfusionsraten bei einer Kombination der in den Prozessen M1 und M2 gefundenen Kulturoptima. Der Prozess M3 wurde über eine Zeit von 41 Tagen betrieben, wobei 99 L Medium verbraucht und 29,4 g rhGH produziert wurden.

In der sechsten Prozessphase nahm die zellspezifische Verdünnungsrate für Glucose mit 0,05 nL/Zelle·d reproduzierbar den Wert aus der Phase VI des Prozesses M2 an, in dem bis auf die niedrigere Perfusionsrate identische Bedingungen vorlagen. Jedoch waren die Konzentrationen einiger Aminosäuren im Prozess M3 in Folge der relativ geringen Perfusionsraten zeitweilig niedriger als erwartet. Die Tatsache, dass im Zeitraum von Tag acht bis 15 zusätzlich die Glucosekonzentration mit durchschnittlich 2,3 mM sehr gering war, führte ab der

Prozesszeit 13,63 Tage dazu, dass die Alaninbiosynthese über Pyruvat zum Erliegen kam: Die spezifische Alaninbildungsrate fiel von 0,18 auf 0,06 pmol/Zelle·d ab. Der Stoffwechsel wurde zunehmend umgestellt und Aminosäuren zur oxidativen Energiegewinnung über den Citronensäurezyklus eingesetzt (Voet und Voet, 1994). In den Prozessphasen V bis VII erreichten daher die durchschnittlichen Konzentrationen von Glutamat und Aspartat mit 35 μM beziehungsweise 19 μM sehr geringe Werte. Die essentielle Aminosäure Phenylalanin war zwischen dem 15. und dem 27. Prozesstag limitierend und die Ursache der in diesem Zeitraum geringen spezifische Wachstumsrate von 0,03/d. Zugleich nahm die Viabilität auf bis zu 63 % ab und die Aggregationsquote stieg aufgrund der geringen Zellentnahme an. Diese Auswirkungen einer Phenylalaninlimitierung wurden auch von Höra (2005) für die gleiche Zelllinie in Perfusionsprozessen beschrieben. Am Prozesstag 26 wurde der Sollwert des Oxystats von 430 auf 400 gestellt, wodurch die Lebendzellichte abnahm. Ab der Prozesszeit 28 Tage wurde eine neue Mediumcharge mit etwas höheren Aminosäurekonzentrationen eingesetzt und die Phenylalaninkonzentrationen stiegen auf nicht-limitierende Werte an.

Durch das Driften der pH-Elektrode wurde ungewollt der Einfluss von pH-Werten über 7,10 ermittelt. Es zeigte sich, dass die spezifischen Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate, sowie die Osmolalität zunahm. Da zudem die spezifische Glutaminverbrauchsrate bei pH 7,24 anstieg, ist die Kultivierung bei niedrigen pH-Werten in Bezug auf die Medienausnutzung vorteilhaft. Bei Kultivierungstemperaturen von 32,5 °C wurde in Übereinstimmung mit diesen Daten für eine Erythropoietin-produzierende CHO-Zelllinie eine verringerte spezifische Glutaminverbrauchsrate ermittelt (Yoon *et al.*, 2005).

Durch die verlängerte Anwachsphase bis zum Erreichen der Produktionszellichte von ca. $2,3 \cdot 10^7$ Zellen/mL wurde die Produktivität des Prozesses M3 negativ beeinflusst. Wenngleich die erreichten Lebendzellichten etwas geringer waren als im Prozess M2, waren die Produktkonzentrationen von bis zu 400 mg/L aufgrund der niedrigeren Verdünnungsrate um bis 100 mg/L höher. Die resultierende Reduktion des Perfundatvolumens um 25 % führt zu entsprechend geringeren Medienkosten. Auch Vorrats- und Erntegefäße können kleiner dimensioniert werden und die Produktaufreinigung wird vereinfacht. Ein Einfluss der höheren Verweilzeiten auf die Produktqualität in Bezug auf Dimere oder Desamidierung konnte im Vergleich zum Prozess M2 nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die spezifischen Produktbildungsrate waren in diesem Prozess, ohne Berücksichtigung der terminalen Satz-Phase, mit durchschnittlich 24,5 pg/Zelle·d die höchsten aller Perfusionsprozesse mit Membranbegasung. Im Gegensatz zum Prozess M1 nahm die spezifische Produktbildungsrate schon bei 33 °C anstatt erst bei 31 °C deutlich ab. Da der pH-Wert im Prozess

M3 mit 6,95 niedriger als in Prozess M1 war, in dem der pH-Wert konstant 7,10 betrug, ist die Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von der Temperatur und dem pH-Wert möglicherweise komplex. Ein solcher komplexer Zusammenhang wurde für Erythropoietin-produzierende CHO-Zelllinien beschrieben (Yoon *et al.*, 2005). Die bis in die Prozessphase VII anhaltende Phenylalaninlimitierung hatte keinen Einfluss auf die, in dieser Phase sogar auf einen Wert 27,2 pg/Zelle·d ansteigende, spezifische Produktbildungsrate. Die geringen Konzentrationen von Aspartat und Glutamat hatten ebenfalls keinen negativen Einfluss auf die Produktbildung.

Die geringe mittlere spezifische Produktbildungsrate von 8,4 pg/Zelle·d in der terminalen Satz-Phase des Prozesses stimmt mit Ergebnissen aus Fed-Batch-Versuchen überein. Für die Prozesse M3 und FB (Kapitel 3.2.6) lagen die spezifische Produktbildungsrate negativ beeinflussende Limitationsbedingungen vor. Unter diesen Bedingungen wurde nach Erschöpfung der Glucose im Prozess M3 Lactat metabolisiert. Dies ist ein für CHO-Zellen typisches Verhalten (Ozturk *et al.* 1997b).

Durch die Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks sollte der Sauerstofftransfer gesteigert werden, um höhere Lebendzellichten erreichen zu können. Durch die fehlerhafte pH-Elektrode kann diese kurze Prozessphase aber nicht beurteilt werden. In der letzten Prozessphase wurde ein pH-Wert von 8,00 erreicht, der zu dem hohen Anteil an desamidiertem rhGH von 11,51 % führte (Pearlman und Bewley, 1993).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass dieser Prozess aufgrund der aufgetretenen Limitationen nicht das Ziel der Durchführung einer Langzeitstudie bei konstanten Kulturbedingungen erreichen konnte. Es zeigte sich, dass bei Annäherung der Perfusionsrate an die theoretisch minimale Verdünnungsrate geringe Abweichungen in der Analytik, dem Medium oder dem zellulären Verhalten zu einer Instabilität des Prozesses führen können. Das Erreichen von Limitationen muss durch eine bessere Prozesscharakterisierung oder durch Überfütterung vermieden werden. Zudem sollten die Konzentrationen von Aspartat, Glutamat und Phenylalanin erhöht werden, damit die im Routinebetrieb einfacher zu messende Glucose primär limitiert.

3.2.5 Prozess R: Untersuchung submerser Begasung

Die Versuche M1 bis M3 hatten gezeigt, dass nach Absenkung der Temperatur eine größere Lebendzellzahl mit Sauerstoff versorgt werden kann. Es sollte untersucht werden, ob in einem Perfusionsprozess im 2 L-Bioreaktor aufgrund des prinzipiell höheren möglichen Sauerstoffeintrags bei Begasung mit einem Ringsparger noch höhere Zelldichten als im membranbegas-

ten Prozess erreicht werden können. Dabei wurden die Erfahrungen mit der Absenkung der Temperatur und des pH-Werts zur Reduktion der spezifischen Verbrauchsrate angewandt. Für einen Teil der Prozessdauer stand ein Abgasanalysator zur Bestimmung der Kohlendioxidkonzentration zur Verfügung, dessen Beitrag zur Prozesscharakterisierung im blasenbegassten Prozess untersucht werden konnte.

Zur Minimierung der Schaumbildung infolge der Blasenbegasung wurde eine 2 %ige Lösung des Silikonöls Antifoam C (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Das Antifoam C musste separat zugeführt werden, da es im Vorlagetank segregiert wäre und eine homogene Durchmischung nicht möglich war. Die Dosage geschah durch eine Zeitschaltuhr-gesteuerte Peristaltikpumpe (Watson-Marlow). Empirisch wurde ermittelt, dass alle sechs Stunden etwa 2 mL des Antischaummittels zugegeben werden mussten. Ein weiterer Unterschied zu den membranbegassten Prozessen lag in dem eingesetzten Rührer. Im Prozess R wurden zwei abwärts fördernde 3-Segmentschräglatrührer mit axialem Förderprofil eingesetzt. Einer befand sich drei Zentimeter unter der Oberfläche und ein zweiter direkt oberhalb des Ringspargers.

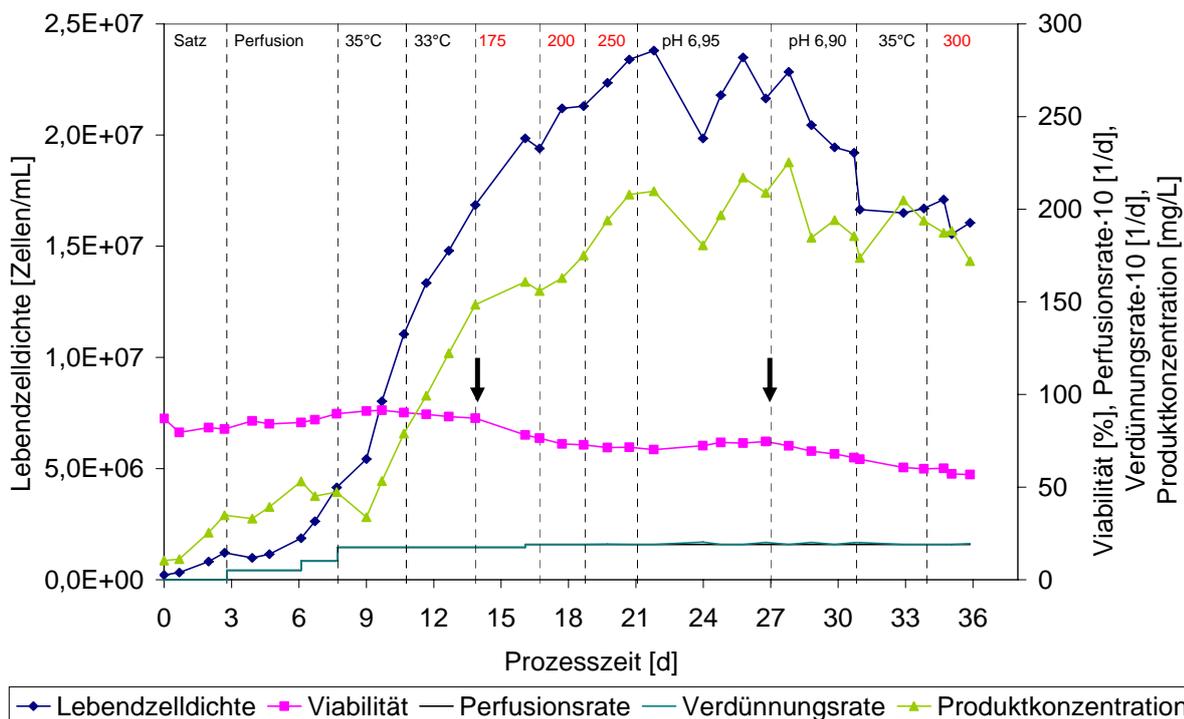


Abbildung 48: Lebzeldichten, Viabilitäten und Produktkonzentrationen, sowie Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses R. Der linke Pfeil indiziert die Erhöhung des Gasvolumenstroms und der rechte den Einsatz einer neuen Mediumcharge. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Der Prozess R (Ringsparger) wurde bei einer Lebzeldichte von $2,11 \cdot 10^5$ Zellen/mL angeimpft und hatte elf Prozessphasen. Nach der initialen Satz-Phase wurde zunächst ein Perfusi-

onsprozess ohne Zellentnahme durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur in zwei Schritten auf 33 °C abgesenkt und die Perfusionsrate von 0,50/d über 1,00/d und 1,75/d auf 1,90/d erhöht (Abbildung 48). In der Nacht des neunten Prozesstags bedingte der Ausfall des Vibrators eine Akkumulation von Zellen im Plattensediment. Dies war auch die Ursache für die zu diesem Zeitpunkt reduzierte Produktkonzentration. Die gleichzeitige Temperaturreduktion um 2 °C verursachte diese Effekte nicht, da in der Folge die Wachstums- und Produktbildungsrate wieder zunahm. Zur Prozesszeit 13,98 Tage musste zur Sauerstoffversorgung der Gesamtgasvolumenstrom von 3,0 auf 4,0 NL/h erhöht werden. Simultan wurde zur Begrenzung der zunehmenden Zellaggregation (Abbildung 49) die Rührerdrehzahl schrittweise von 150 auf 175 UPM angehoben. In Folge der gesteigerten Blasenbegasung sank die Viabilität bis zum Ende der Prozessphase V um 12 Prozentpunkte auf 76 % ab. Die anschließenden Erhöhungen der Rührerdrehzahl auf 200 und später 250 UPM hatten kaum einen negativen Einfluss auf die Viabilität, wie deren Zunahme in der Prozessphase VIII zeigt. Die spätere Anhebung des Gasvolumenstroms auf 4,25 NL/h zur Prozesszeit 23,98 Tage hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Viabilität. Die Abnahme der Zelldichte zu dieser Prozesszeit resultierte aus einer Zellentnahme direkt vor der Probenahme.

Ab dem 19. Prozesstag wurden nach der, im Vergleich zu den membranbegasteten Prozessen verlängerten Anwachsphase, bei Erreichen einer Lebendzellendichte von $2,38 \cdot 10^7$ Zellen/mL Zellen entnommen. Dabei kam es zu einer zu starken Zellentnahme infolge des großen Werts des Integralanteils des Oxystats. Nach dem pH-Shift von 7,10 auf 6,95 zur Prozesszeit 21,07 Tage nahm die Viabilität leicht auf 74,6 % zu. Unter Einsatz einer neuen Mediumcharge (MAM-PF[®]2, Lot. Z04439B, Supplementierung auf 0,1 % Pluronic F68) ab der Prozesszeit 26,78 Tage fiel die Viabilität jedoch auf bis zu 60 % ab. Dieses Phänomen wurde analog im Prozess M2 bei Verwendung der gleichen Mediumcharge beobachtet, wobei in beiden Prozessen keine Limitation gemessener Mediumbestandteile auftrat.

Bei konstanten Perfusionsraten kann die Viabilität durch Zellwachstum und die resultierende Entnahme von Zellen gesteigert werden. Bedingt durch die geringen mittleren spezifischen Wachstumsraten von 0,06/d während der Kultivierungsphase bei 33 °C waren die Viabilitäten in diesem Prozess niedriger als in den membranbegasteten Prozessen. Daher wurde in der vorletzten Prozessphase die Temperatur auf 35 °C angehoben. Die gestiegene spezifische Sauerstoffverbrauchsrate und die geringere Sauerstofflöslichkeit führten zu einer Zellentnahme durch den Oxystat und einer Reduktion der Lebendzellendichte um ca. 20 %. Die spezifische Wachstumsrate nahm trotz der höheren Temperatur nicht zu – tatsächlich nahm die Viabilität bei steigenden Aggregationsquoten weiter ab. Zur Untersuchung der Frage, ob der Leistungs-

eintrag durch den Rührer für das Absinken der Viabilität verantwortlich war, wurde die Rührerdrehzahl in der letzten Prozessphase auf 300 UPM angehoben.

Durch einen Fehler in der Füllstandskontrolle sank das Reaktorvolumen am Tag 37 auf 0,8 L ab. Dadurch verringerte sich die Viabilität auf unter 50 % und der Prozess wurde beendet (Daten nicht dargestellt).

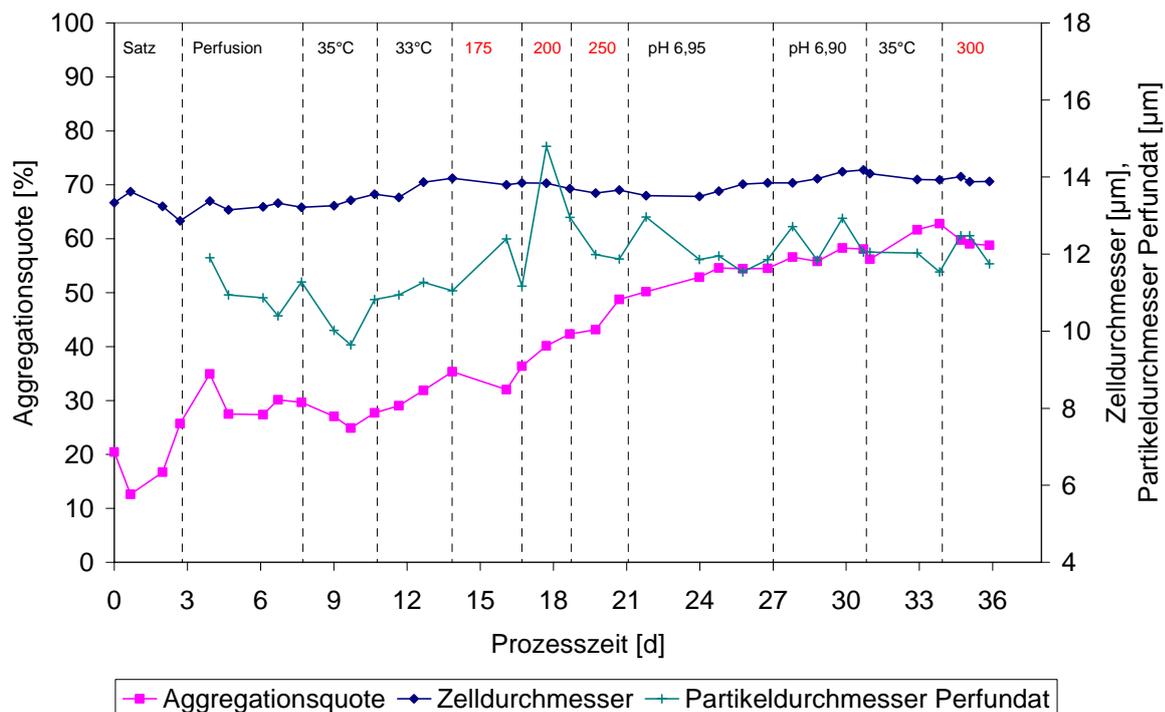


Abbildung 49: Aggregationsquoten, sowie Zell- und Partikeldurchmesser im Bioreaktor beziehungsweise im Perfundat während des Prozesses R. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Die Aggregationsquote erreichte in diesem Prozess Werte bis zu 62 % und konnte durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl kaum vermindert werden. Eine Ursache hierfür könnte in der intervallgeregelten Zugabe des Antifoam C liegen, das in zu hohen Konzentrationen ausflockte. Daraus resultierte, dass die mit dem Cedex bestimmten Lebendzellichten vermutlich unter den realen Werten lagen. Der mittlere Durchmesser der Zellen im Bioreaktor von 13,7 µm blieb über die gesamte Prozessdauer relativ konstant ($\pm 0,4$ µm), ebenso wie der Durchmesser der Partikel im Perfundat von 11,8 µm. Damit betrug die Durchmesserdifferenz lebender und toter Zellen in diesem Prozess lediglich 1,9 µm und war damit um ca. 1 µm geringer als in den membranbegasteten Prozessen. Nach 33,94 Tagen wurde die Rührerdrehzahl auf 300 UPM erhöht, wodurch die Aggregationsquote leicht abnahm.

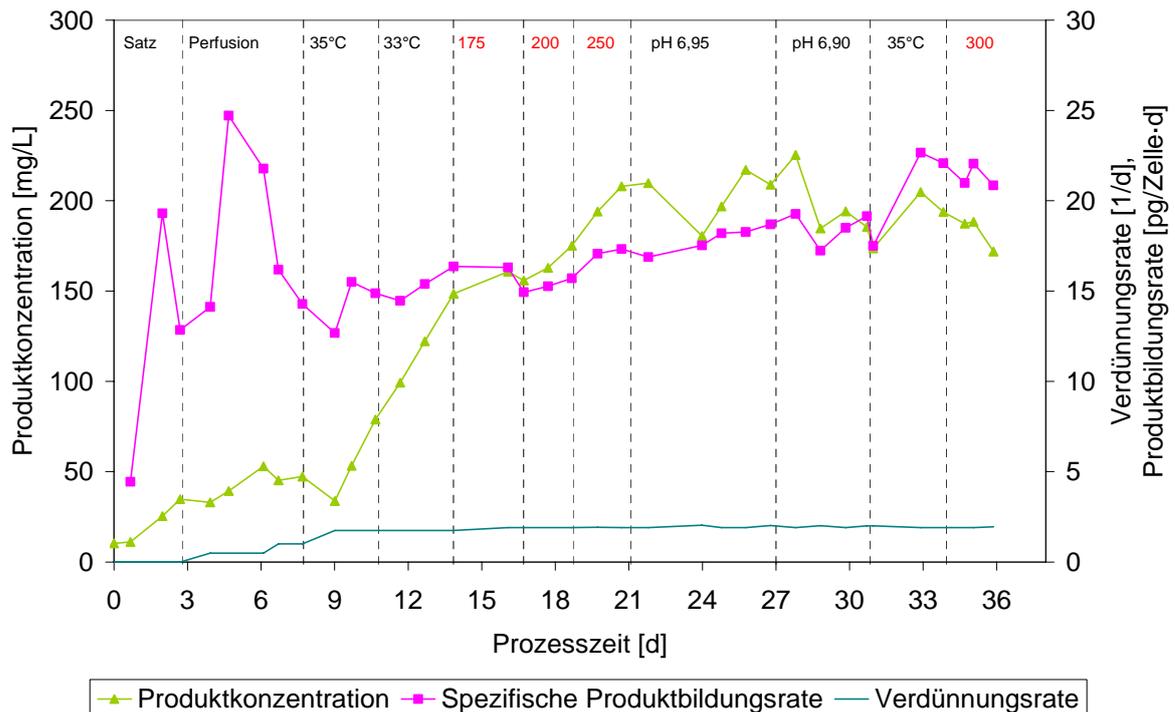


Abbildung 50: Produktkonzentrationen und spezifische Produktbildungsrate während des Prozesses R. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Im Prozess R wurden Produktkonzentrationen um 200 mg/L erreicht. Da die Lebendzellkonzentrationen Werte über $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL annahmen, berechnet sich eine im Vergleich zu den membranbegasteten Prozessen verringerte spezifische Produktbildungsrate von 17,2 pg/Zelle·d über die Prozessdauer. Dieser geringe Wert ist bemerkenswert, da aufgrund der hohen Aggregationsquoten vermutlich sogar zu hohe spezifische Produktbildungsrate bestimmt wurden. Tatsächlich korreliert die Zunahme der spezifischen Produktbildungsrate über die Prozessdauer mit einer zunehmenden Zellaggregation. Die erhöhten spezifischen Produktbildungsrate in der Phase II korrelieren mit hohen spezifischen Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsraten (Abbildung 52). Der Abfall der Produktkonzentration und der spezifischen Bildungsrate bei 9,01 Tagen war eine Folge des Ausfalls des Vibrators am Sedimeter. Nach der Temperaturerhöhung auf 35 °C am Prozessende nahm die spezifische Produktbildungsrate von 18,5 auf 20,8 pg/Zelle·d zu.

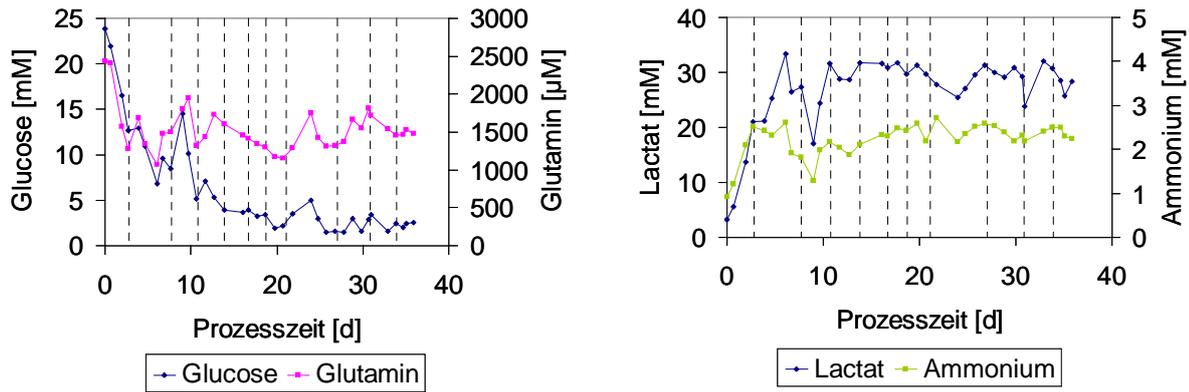


Abbildung 51: Glucose-, Glutamin-, Lactat- und Ammoniumkonzentrationen während des Prozesses R.

In diesem Prozess wurden über die gesamte Prozessdauer relativ hohe, aber nicht-inhibitorische Lactatkonzentrationen um 30 mM gehalten (Abbildung 51). Dies war auch beim Prozess M1 ohne pH-Shift der Fall (Abbildung 28) und ist ein Indiz für die nicht erfolgte metabolische Umstellung der Zellen im blasenbegasteten Kultursystem (Abbildung 51). Entsprechend gering waren die Glucosekonzentrationen, die jedoch keine Werte unter 2 mM annahmen. Die Ammoniumkonzentrationen erreichten mit durchschnittlich 2,2 mM keine inhibitorischen Werte.

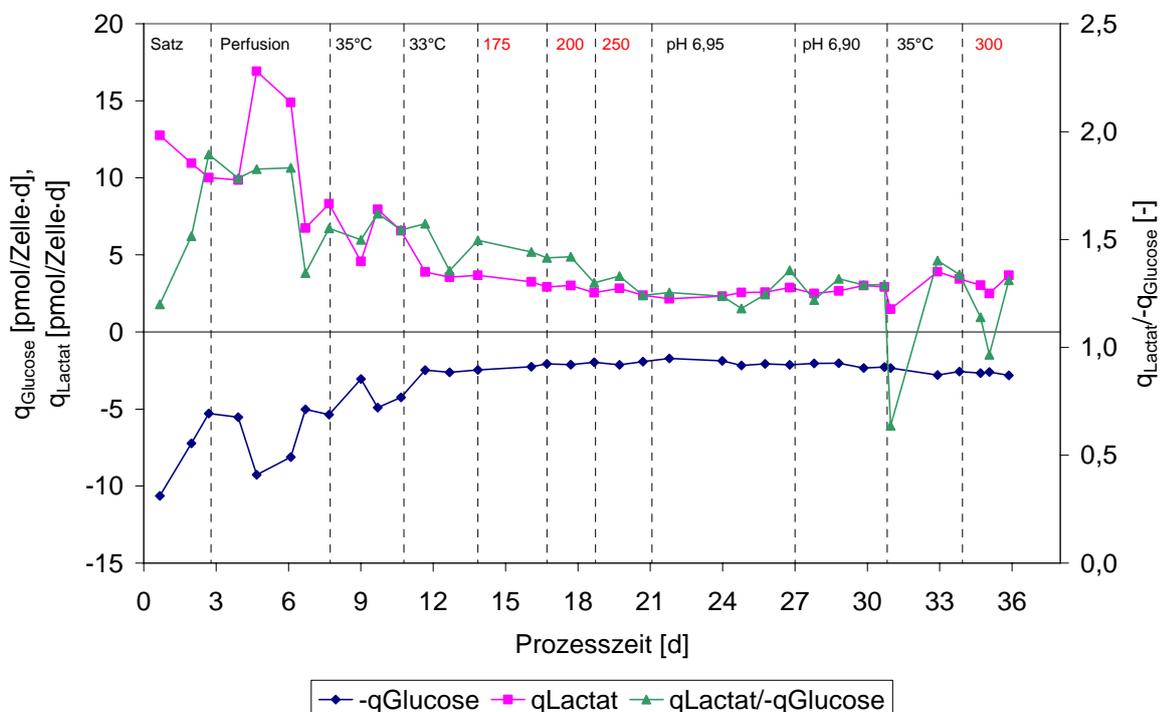


Abbildung 52: Spezifische Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten, sowie Quotient beider während des Prozesses R. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Zur Senkung der spezifischen Lactatbildungsrate wurde der pH-Wert von 7,10 auf 6,95 (22,07 Tage) und dann auf 6,90 (27,00 Tage) abgesenkt. Aufgrund der Probenahmefrequenz von einer Messung pro Tag ist die Kinetik der Reaktion der Zellen auf Variation der Kulturbedingungen nicht zu erkennen. Die Absenkung des pH-Werts führte nur zu einer minimalen Reduktion des Quotienten aus spezifischer Lactatbildungsrate und spezifischer Glucoseverbrauchsrate (Tabelle 12). Daher konnte die zellspezifische Verdünnungsrate in der Phase VIII nur auf einen Wert von 0,08 nL/Zelle·d reduziert werden. Da die spezifischen Wachstumsraten bei Kultivierung mit 33 °C sehr gering waren ($\mu=0,02/d$), mussten im Vergleich zu den anderen Prozessen höhere Perfusionsraten eingestellt werden, um ähnliche Verdünnungsraten zu erzielen. Es traten in diesem Prozess keine Limitationen von Aminosäuren auf (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 12: Zusammenfassung einiger spezifischer Raten des Prozesses R.

Zustand	Nr.	μ	q_{Glucose}	$q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$	q_{Lactat}	q_{NH_4}	q_{rhGH}
		[1/d]	[pmol/Zelle·d]	[-]	[pmol/Zelle·d]	[pmol/Zelle·d]	[pg/Zelle·d]
Satz	I	0,63	-7,72	1,54	11,25	1,12	12,20
Perfusion	II	0,28	-6,66	1,67	11,35	0,57	18,22
35°C	III	0,37	-4,07	1,55	6,36	0,35	14,35
33°C	IV	0,13	-2,52	1,48	3,71	0,18	15,41
175 UPM	V	0,02	-2,16	1,43	3,09	0,18	15,62
200 UPM	VI	0,05	-2,04	1,36	2,78	0,18	15,48
250 UPM	VII	0,06	-2,03	1,29	2,61	0,16	17,19
pH 6,95	VIII	0,06	-1,99	1,25	2,50	0,18	17,92
pH 6,90	IX	0,02	-2,17	1,28	2,78	0,17	18,53
35°C	X	-0,15	-2,57	1,13	2,95	0,21	20,75
300 UPM	XI	-0,05	-2,69	1,14	3,08	0,20	21,29

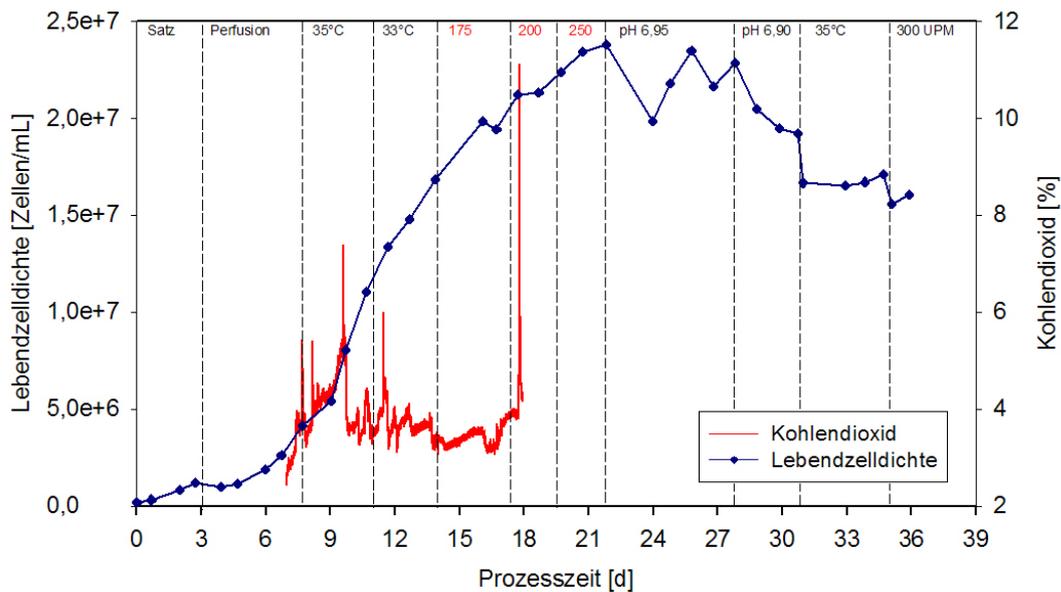


Abbildung 53: Lebendzelldichte und Kohlendioxidkonzentration im Abgas des Bioreaktors während des Prozesses R. Die Extremwerte der Kohlendioxidkonzentrationen wurden durch die Kohlendioxidzugabe im Rahmen der pH-Regelung hervorgerufen. Die Rührerdrehzahlen sind in roter/ heller Schrift angegeben.

Mit einem Abgasanalysator (BCP-CO₂, Blue Sens gas sensor GmbH, Herten) konnten vom Tag 7 bis zum Tag 18 die Kohlendioxidkonzentrationen der Abluft gemessen werden. Eine *in-situ*-pCO₂-Elektrode zur Messung des Kohlendioxidpartialdrucks stand nicht zur Verfügung. Die Kohlendioxidkonzentration von Luft ist mit ca. 0,03 % vernachlässigbar gering, so dass die Kohlendioxidkonzentrationen von bis zu 3,5 % auf den Metabolismus der Zellen zurückzuführen waren. Die Peaks in Abbildung 53 wurden durch die Zugabe von Kohlendioxid zur pH-Regelung hervorgerufen. Der Ausfall des Vibrators und die resultierenden hohen Verweilzeiten der Zellen im Sediment führten zu einer stark verringerten Kohlendioxidproduktion durch die Zellen. Außerdem zeigte sich, dass durch die Absenkung der Temperatur die Kohlendioxidkonzentration in der Abluft stark erniedrigt wurde. Dies könnte mehrere Ursachen haben: eine erhöhte Kohlendioxidlöslichkeit bei erniedrigter Temperatur, die geringere Natriumcarbonatdosage und damit ein geringeres Ausgasen von Kohlendioxid, sowie eine geringere metabolische Aktivität der Zellen. Letztere kann mit einer Erniedrigung der spezifischen Wachstumsraten und der spezifischen Verbrauchsrate korreliert werden (Tabelle 12). Es zeigte sich im untersuchten Zeitraum, dass die Kohlendioxidkonzentration auf einem konstanten Niveau gehalten werden konnte.

Diskussion der Untersuchung submerser Begasung

Das Ziel dieses Experiments war die Übertragung der Prozessführungsstrategie von membranbegasteten auf blasenbegastete Bioreaktoren unter Erreichung höherer Lebendzellichten. Der Prozess R wurde über eine Zeit von 36 Tagen betrieben, wobei 109 L Medium verbraucht und 14,6 g rhGH produziert wurden.

Die initiale Anwuchsphase bis zum Erreichen der Produktionszellichte von $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/mL war aufgrund der geringen spezifischen Wachstumsraten um eine Woche verlängert. Dabei wurden hohe Aggregationsquoten bis zu 60 % erreicht, die zum einen durch Zugabe zu großer Mengen des Antischaummittels und zum anderen vermutlich durch einen zu geringen Leistungseintrag des 3-Segmentschrägblattrührers verursacht wurden. Eine bedarfsgerechte Zugabe des Antischaummittels unter Steuerung durch einen separaten Schaumensor und die Verwendung eines anderen Rührers hätten diesen Effekt minimiert. Ein weiteres Problem war, dass die Zugabe des Antifoam C zu einem Abfallen des Sauerstofftransfers über den Kopfraum und zum Schwingen des pO_2 -Reglers führte. Dies ist für ein System in dem die Lebendzellichte über die Reglerausgangsgrößen des pO_2 -Reglers gesteuert wird ungünstig.

Die Zellen reagierten im Gegensatz zu ihrem Verhalten in allen anderen Perfusionprozessen auf die Absenkung des pH-Werts nicht mit einem reduzierten Glucoseverbrauch und einer verminderten Lactatbildung. Eine Erhöhung des Glucoseverbrauchs wurde in submers begasteten Perfusionprozessen im Celligen-Bioreaktor beobachtet und mit dem erhöhten Scherstress durch die Blasenbegasung korreliert (Mercille *et al.*, 2000). Auch die spezifischen Produktbildungsrate waren mit durchschnittlich 17,2 pg/Zelle·d deutlich geringer als in den anderen Perfusionprozessen. Als Ursache für die verminderte spezifische Produktbildung in blasenbegasteten Systemen kann Stress aufgrund von Scherung durch zerplatzende Blasen, an deren hydrophoben Phasengrenze sich die Zellen anlagern, angenommen werden (Mercille *et al.*, 2000, Chisti, 2000, Nienow, 2006). Durch Optimierung der Pluronic F68-Konzentration könnte der Scherstress eventuell reduziert werden (Ma *et al.*, 2006). Die ab 26,78 Tagen eingesetzte Mediumcharge (MAM-PF[®]2, Lot. Z04439B) enthielt kein Pluronic F68 und musste damit supplementiert werden. Bei der Sterilfiltration wurde die Konzentration möglicherweise so stark reduziert, dass die Schutzwirkung gegen Scherkräfte minimiert war. Auch eine diskontinuierliche Begasung (engl. *Sparge on Demand*) würde den Scherstress reduzieren, war aber mit dem System nicht möglich.

Bemerkenswert waren die Auswirkungen des Ausfalls des Vibrators während des Prozesses. Er verursachte eine apparente Halbierung der spezifischen Wachstumsrate und eine Verringe-

rung der Produktkonzentrationen. An dieser Stelle wird ersichtlich, wie wichtig bei diesem Zellrückhaltesystem der Vibrator ist. Außerdem könnten die Frequenz und die Intensität der Vibration noch optimierbar sein.

Der Ausfall des Vibrators führte zu verringerten Kohlendioxidkonzentrationen im Abgas, da Zellen im Plattensediment akkumulierten. Außerdem könnte durch hohe Verweilzeiten der Zellen im Sediment deren metabolische Aktivität reduziert worden sein. Die Abgasanalytik hat sich an dieser Stelle als sinnvolle zusätzliche Datenquelle zur Interpretation komplexer Sachverhalte erwiesen. Hohe Kohlendioxidpartialdrücke über 14 kPa im Medium können zu verringerten spezifischen Wachstum- und Produktbildungsraten bei tierischen Zelllinien führen (Gray *et al.*, 1996, de Zengiotta *et al.*, 1998). Die Kohlendioxidkonzentration wurde im Prozess R bei steigenden Lebendzellichten auf einem konstanten Niveau gehalten, wofür neben den Temperaturshifts und Rührerdrehzahlerhöhungen vermutlich auch der zum *Strippen* des Kohlendioxids gut geeignete Ringsparger verantwortlich war (Gray *et al.*, 1996). Letztlich ist der interessierende Parameter jedoch der Kohlendioxidpartialdruck in der Lösung. Daher ist eine *in-line*-Elektrode der Abgasanalytik vorzuziehen, zumal bei Systemen mit Silikonmembranbegasung die Korrelation zwischen Kohlendioxidpartialdruck und -konzentration im Abgas problematisch ist (Ozturk, 1996).

Mikrosparger erzeugen kleinere Blasen als der im Prozess R verwendete Ringsparger. Der bei konstantem Gasvolumenstrom höhere volumetrische Sauerstofftransportkoeffizient würde die Sauerstoffversorgung höherer Zellzahlen ermöglichen. Mehrere Versuche, einen Prozess mit Begasung durch einen Mikrosparger durchzuführen, scheiterten am rapiden Absterben der Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen des Absterbens waren die stärkere Schaumbildung, sowie der größere Scherstress beim Zerplatzen kleiner Blasen (Ma *et al.*, 2006). Die verfügbaren *Massflowcontroller* erlaubten keine ausreichende Reduktion des kontinuierlichen Gasvolumenstroms zur Minimierung dieser Effekte.

3.2.6 Fed-Batch-Prozess mit submerser Begasung

Vergleichend zu den Perfusionsprozessen wurde im Rahmen einer assoziierten Diplomarbeit ein Fed-Batch-Prozess mit diskontinuierlicher Zufütterung etabliert. In diesem Prozess wurden die in den kontinuierlichen Prozessen durchgeführten Optimierungen bezüglich der Reduktion der spezifischen Verbrauchsraten durch Absenkung von Temperatur und pH-Wert genutzt.

Der nachfolgend dargestellte Prozess wurde abweichend von den anderen Perfusionsprozessen an einem Biostat[®]B-System (Sartorius BBI Systems) mit einem 8-

Segmentschrägblattrührer (Sartorius BBI Systems) und Begasung über einen Ringsparger (Sartorius BBI Systems) durchgeführt. Aufgrund der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Blasenbegasung wurde in der ersten Prozessphase ausschließlich über den Kopfraum begast. In der zweiten Phase, ab der Temperaturabsenkung auf 34 °C, wurden Volumenstrommoduliert Sauerstoff und ein geringer Grundstrom von Luft über einen Ringsparger dosiert (Totalregler).

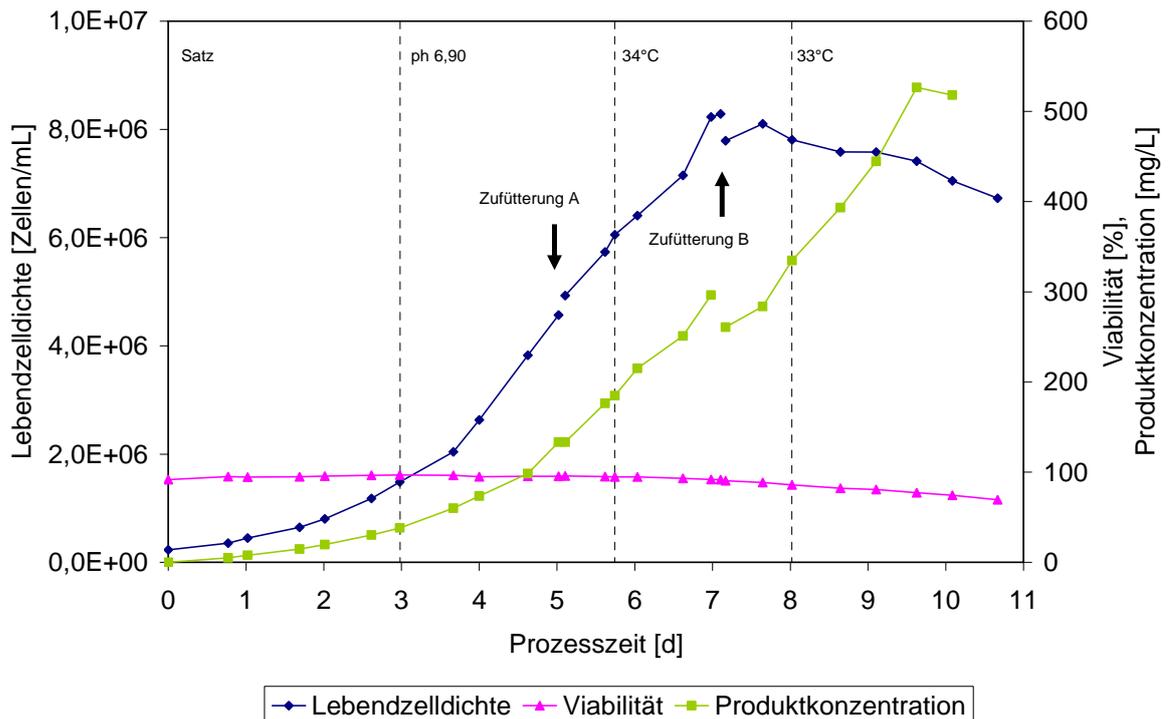


Abbildung 54: Lebendzellichten, Viabilitäten und Produktkonzentrationen, sowie Perfusions- und Verdünnungsraten während des Prozesses FB. Die Pfeile indizieren die bolusartige Zugabe von Nährstoffen. Am letzten Prozesstag wurde keine Produktkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

Der Prozess FB (Fed-Batch) wurde mit einer Lebendzelldichte von $2,30 \cdot 10^5$ Zellen/mL bei einer Viabilität von 91,6 % inokuliert und erreichte nach 7,10 Tagen eine maximale Lebendzelldichte von $8,29 \cdot 10^6$ Zellen/mL (Abbildung 54). Auf die Angabe der Gesamtzellzahlen wird verzichtet, da das Startvolumen 2 L betrug und durch die Zufütterung lediglich der Volumenverlust durch Probenahmen ausgeglichen wurde. Nach drei Tagen wurde der pH-Wert zur Reduktion der spezifischen Lactatbildungsrate von 7,05 auf 6,90 gesenkt. Am sechsten Prozesstag wurden zur Vermeidung einer Glucoselimitation 70 mL eines Substratgemisches, bestehend aus 8 g D-Glucose, 2 mM L-Glutamin und 2 mM GlutamaxTM1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Temperatur zur Reduktion der spezifischen Verbrauchsraten auf 34 °C gesenkt. Zur Prozesszeit 7,10 Tage wurde abermals ein

Nährstoffkonzentrat zugegeben (2,25 g D-Glucose, 60 mL MEM-Aminosäurelösung und 4 mM L-Glutamin). Daraufhin wurde durch ein weiteres Absenken der Temperatur die Apoptose der Zellen verlangsamt (Moore *et al.*, 1997) und eine annähernd stationäre Phase erreicht. Der Prozess wurde bei einer Viabilität von 69,6 % nach 10,67 Tagen beendet. Am letzten Prozesstag wurde die Produktkonzentration nicht bestimmt.

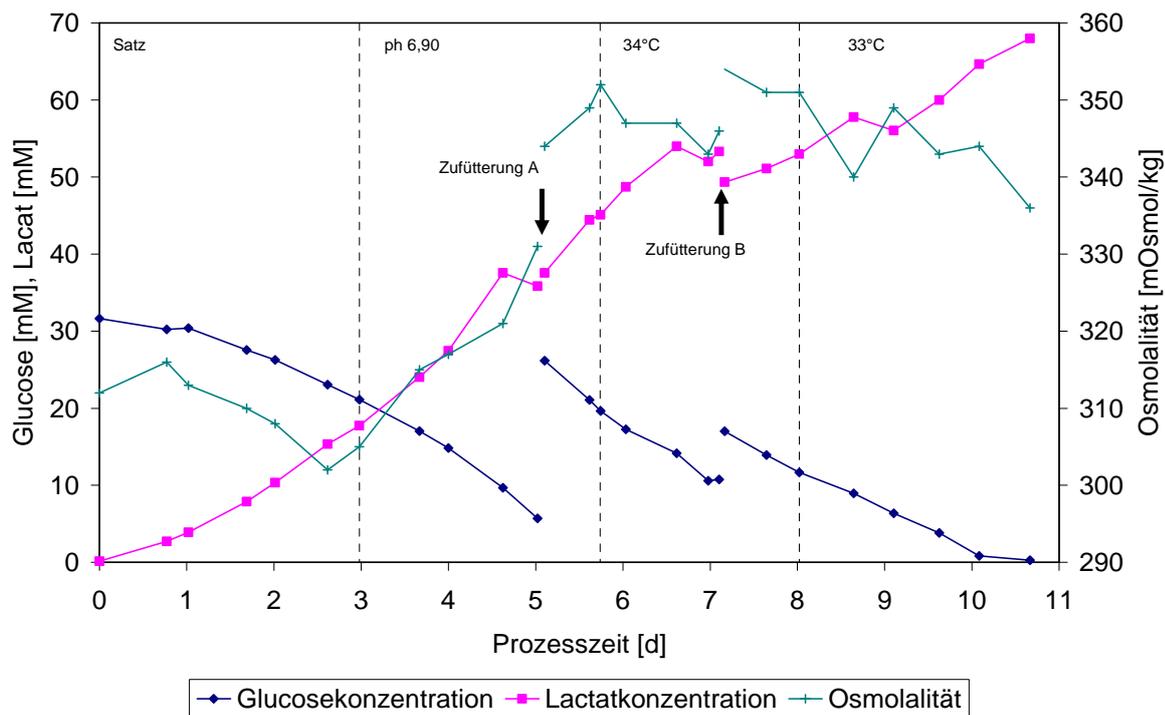


Abbildung 55: Glucose- und Lactatkonzentrationen, sowie Osmolalität während des Prozesses FB.

Die maximale Lactatkonzentration von 64,7 mM wurde am Prozessende erreicht. Auch die ab Prozesszeit 5 Tage mit im Mittel 345 mOsmol/kg weitgehend konstante Osmolalität war für die Wachstumsinhibition vermutlich nicht ursächlich. Die Abbildung 55 zeigt weiterhin, dass trotz der hohen Glucoseanfängerkonzentration von 32 mM ohne die beiden Substratzugaben Glucoselimitierungen aufgetreten wären.

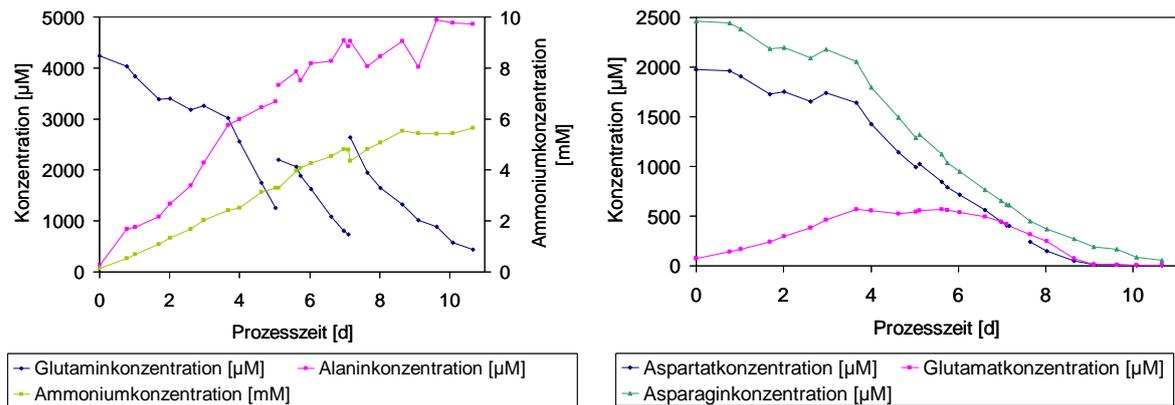


Abbildung 56: Konzentrationen einiger Aminosäuren, sowie von Ammonium während des Prozesses FB.

Die beiden Diagramme in Abbildung 56 zeigen den Konzentrationsverlauf einiger Aminosäuren und von Ammonium. Die Konzentration von Ammonium stagnierte ab dem achten Prozessstag bei 5 mM. Glutamin wäre ohne die beiden Zugaben limitierend geworden. Die Aminosäuren Aspartat und Glutamat waren am Prozessende vollständig verbraucht. Wie in den Prozessen M2 und M3 war es zu einer Veränderung im Glutamin- und Glutamatstoffwechsel gekommen. Dies konnte in keinem anderen der durchgeführten Fed-Batch-Prozesse reproduziert werden (Northoff, 2006).

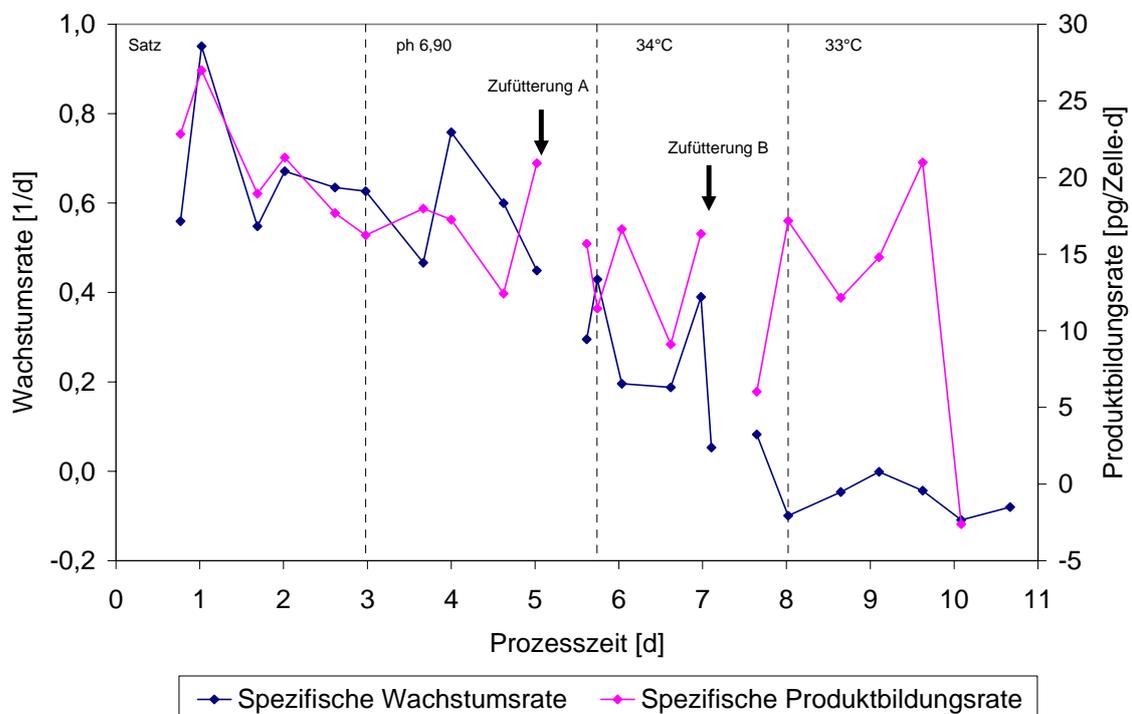


Abbildung 57: Spezifische Wachstums- und Produktbildungsraten während des Prozesses FB.

Die Abbildung 57 zeigt die spezifischen Wachstumsraten und Produktbildungsrate im Prozess FB. Die spezifische Wachstumsrate nahm ab dem vierten Prozesstag kontinuierlich ab. Die Konzentrationen der nicht-essentiellen Aminosäuren Aspartat und Glutamat könnten ab diesem Zeitpunkt limitierend gewesen sein. Nachdem am vorletzten Prozesstag Glucose limitierend wurde, produzierten die Zellen kein rhGH mehr.

Tabelle 13: Produktqualitätsbestimmung am Prozessende.

Komponente	[%]	Komponente	[%]
Monomer	96,90	Adesamido-rhGH	88,36
Dimer	1,98	Desamido-rhGH	7,84
Oligomer	1,11	Didesamido-rhGH	3,80

Mit der analytischen SEC und der RP-HPLC wurde die Produktqualität in Bezug auf Dimerisierung und Desamidierung untersucht. Dabei war insbesondere der Anteil an nicht-desamidiertem rhGH mit 88,36 % zu gering (Tabelle 13), da in der Pharmakopöe festgelegt ist, dass dieser Anteil mindestens bei 94 % liegen muss. Der relative Anteil des Monomers lag dahingegen über 96 % und war damit Pharmakopöe-konform.

Aufgrund der geringen Messwertanzahl je Prozessphase variieren die in Tabelle 14 zusammengefassten mittleren spezifischen Umsatzraten und sind nicht mit den Werten aus den Perfusionprozessen vergleichbar. Da in diskontinuierlichen Prozessen die spezifischen Raten häufig mit der Prozesszeit abfallen, müssen andere Fed-Batch-Prozesse, in denen die entsprechenden Veränderungen nicht durchgeführt werden, zur Interpretation herangezogen werden. Im Vergleich zeigte sich, dass insbesondere der pH-Shift zu niedrigeren Lactatkonzentrationen und Osmolalitäten führte (Northoff, 2006).

Die Berechnung zellspezifischer Verdünnungsraten (CSDR) ist zur Steuerung der Zufütterungspumpe auch für Fed-Batch-Prozesse interessant. Die in der Tabelle 14 angegebenen Werte entsprechen den Zufütterungsraten, die in einem kontinuierlich zugefütterten Fed-Batch-Prozess notwendig gewesen wären. Ein Vergleich der absoluten Werte mit denen aus den Perfusionprozessen ist nicht möglich, da verschiedene Medien benutzt wurden.

Tabelle 14: Zusammenfassung einiger spezifischer Raten des Prozesses FB. Z: Zelle.

Zustand	Nr.	μ	q_{Glucose}	$q_{\text{Lactat}}/q_{\text{Glucose}}$	q_{Lactat}	q_{NH_4}	q_{rhGH}	CSDR
		[1/d]	[pmol/Z·d]	[-]	[pmol/Z·d]	[pmol/Z·d]	[pg/Z·d]	[nL/Z·d]
Satz	I	0,67	-5,79	1,58	9,64	1,12	20,67	0,18
pH 6,90	II	0,57	-2,60	1,19	3,21	0,22	16,85	0,08
34°C	III	0,25	-0,99	2,16	0,88	0,09	11,91	0,03
33°C	IV	-0,06	-0,63	1,79	0,73	0,04	12,50	0,02

Diskussion des Fed-Batch-Prozesses mit submerser Begasung

Dieses Experiment zeigt, dass durch die Absenkung von Temperatur und pH-Wert auch in einem Fed-Batch-Prozess eine Reduktion der spezifischen Verbrauchsrate möglich ist. Durch die Absenkung des pH-Werts wurde die spezifische Lactatbildungsrate gesenkt, so dass die Osmolalität auf unkritischen Werten um 350 mOsmol/kg gehalten werden konnte. Dies war ein Grund dafür, dass der Prozess FB über eine Zeit von 10,67 Tagen betrieben werden konnte und eine Produktkonzentration von 517,94 mg/L bei einer Produktmenge von 1017 mg erreichte. Im Vergleich zu den von Höra 2005 mit der gleichen Zelllinie durchgeführten Batch-Prozessen entspricht dies einer Verfünffachung der Produktkonzentration. Sie war ebenfalls deutlich höher als im Perfusionsprozess M3, wobei die Produktqualität in Bezug auf den Anteil des desamidierten und dimerisierten Wachstumshormons schlechter war. Dabei betrug die Produktivität des Prozesses bis zur Prozesszeit 10,08 Tage 101 mg rhGH/d. Aufgrund der schon ab dem vierten Prozesstag stetig fallenden spezifischen Wachstumsraten konnte eine Lebendzellendichte über $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL nicht erreicht werden. Die Aminosäuren Glutamat und Aspartat waren erst ab dem neunten Prozesstag vollständig verbraucht und hatten in den Prozessen M2 und M3 bei geringen Konzentrationen keinen Einfluss auf die spezifische Wachstumsrate. Auffällig war die ab dem achten Prozesstag bei 5 mM stagnierende Ammoniumkonzentration. Jedoch ist eine Verringerung der spezifischen Wachstumsrate um 50 % erst ab Konzentrationen von 8 mM zu erwarten (Schneider *et al.*, 1996). Daher bewirkte vermutlich eine Kombination verschiedener Faktoren, wie der Ammoniumkonzentration und den Temperaturabsenkungen, die beobachtete Reduktion der spezifischen Wachstumsrate. Zur Reduktion der spezifischen Verbrauchsrate ist ein durch geringe Glucosekonzentrationen induzierter metabolischer *Shift* beschrieben worden (Seow *et al.*, 2001). Dabei können bei nicht-optimaler Regelung der Glucosekonzentration, oder anderer Nutrienten, Limitierungen auftreten. Das Absinken der spezifischen Produktbildungsrate bei einer Glucoselimitation am letzten Prozesstag (Abbildung 57) zeigte, wie in den Perfusionsprozessen, die Reaktion der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie gegenüber einem Mangel dieses Nährstoffs. Die Variation von Temperatur und pH-Wert ist eine robustere Methode zur Reduktion der Verbrauchsrate. Durch die Temperaturerniedrigung konnten die spezifischen Verbrauchsrate reduziert und die Apoptoseinduktion verlangsamt werden, so dass eine annähernd stationäre Phase erreicht wurde. Dieser Effekt wird einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zugeschrieben (Moore *et al.*, 1997). Zugleich nahm die spezifische Produktbildungsrate stärker ab, als dies in den Perfusionsprozessen beobachtet wurde.

Experimente mit kontinuierlicher Zufütterung erreichten vergleichbare Lebendzellichten, hatten aber aufgrund der längeren Prozessdauern eine geringere volumetrische Produktivität (Northoff, 2006). Im Prozess FB mit bolusartiger Zugabe geringer Volumina an Substratkonzentrat war der Verdünnungseffekt in Bezug auf die Lebendzellichte geringer und es wurden schneller maximale Zelldichten erreicht, wodurch die Prozessdauer kürzer und die volumetrische Produktivität höher waren.

3.2.7 Zusammenfassende Diskussion der Kultivierung

Die Grundlage der Entwicklung eines Perfusionsprozesses zur Herstellung des humanen Wachstumshormons war eine Bioreaktorkultivierung mit Taumelrührer. Damit konnten maximale Lebendzellichten von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht werden (Höra, 2005). Durch den geringen Leistungseintrag wurden hohe Aggregationsquoten begünstigt, die die Interpretation der berechneten spezifischen Raten erschwerten (Kapitel 3.1.1). Damit wäre ein Vergleich der Effekte verschiedener Kulturbedingungen, wie er in den folgenden Perfusionsprozessen erfolgte, nicht möglich gewesen.

Auch in Prozessen, die mit einer Membranbegasung und einem Schrägblattrührer durchgeführt wurden, konnten die oben genannten Lebendzellichten aufgrund des begrenzten Sauerstoffeintrags zunächst nicht überschritten werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden im Prozess M1 die Temperaturen schrittweise abgesenkt, um die Sauerstofflöslichkeit zu erhöhen und die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate zu reduzieren (Kapitel 3.2.1). Bei 31 °C nahm die spezifische Produktbildungsrate stark ab. Daher wurden 33 °C als minimale Kultivierungstemperatur eingesetzt, bei der im Vergleich zu 37 °C die Lebendzellichte um 33 % gesteigert werden konnte. Ein positiver Nebeneffekt waren die verringerten spezifischen Wachstumsraten, die zu entsprechend herabgesetzten Zellentnahmen durch den Oxystat führten. Da nur das Perfudat der Produktaufreinigung zugeführt wurde, erhöhte sich somit die Produktivität. Eine Anhebung der Rührerdrehzahl führte aufgrund des verbesserten Gasübergangs an der Membran ebenfalls zu deutlich höheren Lebendzellichten. Da die zellspezifische Verdünnungsrate mit einem Wert von 0,09 nL/Zelle·d auf ein Drittel des Anfangswerts abgesunken war, konnten die Zellen in der zweiten Prozessphase ohne Erhöhung der Verdünnungsrate mit Nährstoffen versorgt werden. Die Aggregationsquote konnte durch den relativ hohen Leistungseintrag von 18 bis 25 W/m³ am Ende des Prozesses verringert werden, ohne dass die Viabilität zurückging.

Die Bestimmung des möglichen Leistungseintrags (Kapitel 3.2.2) ist insbesondere bei der Maßstabsübertragung in größere Bioreaktoren ein wichtiger Parameter (Nienow, 2006). Die

Zellaggregation wird vor allem durch Calcium-abhängige Adherine, die Cadherine, vermittelt (Alberts *et al.*, 2002). Daher könnte zusätzlich ein Medium mit reduzierter Calciumkonzentration zur Verminderung der Aggregationsquoten eingesetzt werden. Zur Verringerung der Aggregationsneigung kann außerdem das polyanionische Dextransulfat zugesetzt werden.

Mit dem pH-Wert wurde ein dritter Kulturparameter variiert (Kapitel 3.2.3). Dabei blieb bei pH 6,95 die spezifische Produktbildungsrate im Prozess M2 konstant. Da neben den spezifischen Raten auch der Quotient aus Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate einen niedrigen Wert unter 1 annahm, konnte die zellspezifische Verdünnungsrate auf ein Minimum von 0,05 nL/Zelle·d gesenkt werden. Dieser Wert gilt als Optimierungsziel in der Entwicklung von Perfusionsprozessen, da dann ähnlich hohe Produktkonzentrationen wie in Batch-Prozessen erreicht werden können (Konstantinov *et al.*, 2006). Ein pH-Wert von 6,80 führte zwar zu weiter verminderten spezifischen Verbrauchsdaten, war aber in Bezug auf die Gasversorgung problematisch: Aufgrund der geringeren Lactatbildung und des unveränderten Natriumbicarbonatgehalts im Medium musste kontinuierlich Kohlendioxid dem Gasvolumenstrom zugegeben werden, so dass die Lebendzellendichte wieder abnahm. Die Ursache für die bei geringen pH-Werten reduzierten spezifischen Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsdaten sind nicht vollständig verstanden. Zur Erklärung wird angeführt, dass der Glucosetransport bei hohen pH-Werten erleichtert sei und die Zellen den intrazellulären pH-Wert durch die Lactatbildung regeln (Osman *et al.*, 2000).

Im Prozess M3 wurde die Perfusionsrate so eingestellt, dass zusammen mit der Zellentnahmerate eine Annäherung an die berechnete, minimale Verdünnungsrate erreicht werden sollte (Kapitel 3.2.4). Dann sollte die Langzeitstabilität des Prozesses ohne weitere Variation der Kulturparameter untersucht werden. Die aufgrund einer Limitation der essentiellen Aminosäure Phenylalanin fallende Viabilität und die stetig zunehmenden Aggregationsquoten erforderten jedoch eine Erhöhung der Perfusionsrate und eine Herabsetzung des Sollwerts des Oxystats. Zusätzlich wurden die Rührerdrehzahl und die Temperatur angehoben. In der Folge nahm die spezifische Wachstumsrate und dementsprechend auch die Zellentnahmerate zu. Dadurch wurde die Viabilität erhöht und die Aggregationsquote gesenkt. Daraus resultiert, dass weder die spezifische Wachstumsrate zu stark reduziert werden, noch die Perfusionsrate zu gering sein sollte. Zeng und Deckwer postulierten 1999 eine Abhängigkeit der spezifischen Wachstums- und Absterberate, sowie der Viabilität von der Zellentnahmerate. Bei der Regelung der Lebendzellendichte über den Oxystat entspricht die Zellentnahmerate genau der Wachstumsrate – die Viabilität ist jedoch eine Funktion der Zellentnahme- und der Perfusionsrate.

Letztere sollte so eingestellt werden, dass Schwankungen der Mediumszusammensetzung und des Verhaltens der Zellen nicht zu Limitationen führen. Außerdem zeigte das Versagen der pH-Elektrode, dass in einer Langzeitkultivierung auswechselbare oder redundante Elektroden erforderlich sein können.

Aus der Tabelle 15 wird ersichtlich, dass der maximale Produktausstoß in den Perfusionsprozessen von 477,7 auf 1126,6 mg/d gesteigert werden konnte und vorrangig von der Lebendzellendichte abhängig war. Der in Kapitel 3.2.6 gezeigte Fed-Batch-Prozess hatte im Vergleich dazu einen geringen Produktausstoß von 100,8 mg/d. In beiden Fällen wurden Rüstzeiten zur Berechnung vernachlässigt.

Tabelle 15: Zusammenfassung von Prozesscharakteristika der dargestellten Prozesse in den jeweils produktivsten Phasen.

Prozess		T	M1	M2	M3	R
Phase		III	XI	VI	VI	VIII
P_V	[mg/L·d]	202,4	358,1	488,8	536,6	375,8
P_A	[mg/d]	404,7	752,0	1026,4	1126,8	789,2
Lebendzellendichte	[Zellen/mL]	$0,9 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^7$	$2,37 \cdot 10^7$	$2,35 \cdot 10^7$	$2,21 \cdot 10^7$
q_{rhGH}	[pg/Zelle·d]	28,33	22,21	20,76	22,85	17,92
Temperatur	[°C]	37	33	33	33	33
pH-Wert	[-]	7,10	7,10	6,95	6,95	6,95
Rührerdrehzahl	[1/min]	48	225	250	250	250

Unter Berücksichtigung der spezifischen Verbrauchsdaten der Prozesse M2 und M3 für Glucose als primär limitierenden Nutrient würde ein optimaler Perfusionsprozess die folgenden vier Prozessphasen mit den genannten Eigenschaften aufweisen. Allerdings müssen die Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Phenylalanin im Medium um jeweils 15 % erhöht werden, damit sie nicht primär limitieren.

1. Animpfzellendichte $2,0 \cdot 10^5$ Zellen/mL bei 37 °C, 150 UPM und pH 7,10.
2. Bei Erreichen von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL eine Perfusionsrate von 2,00/d einstellen und die Rührerdrehzahl auf 200 UPM anheben (CSDR: 0,27 nL/Zelle·d, $D_{\min}=2,70/d$).
3. Bei $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/mL die Temperatur auf 33 °C und den pH-Wert auf 6,95 absenken (CSDR: 0,05 nL/Zelle·d, $D_{\min}=1,15/d$).
4. Beim Erreichen einer stabilen Produktionszellendichte von $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/mL kann die Perfusionsrate gegebenenfalls leicht reduziert werden.

Die Dauer der Anwuchsphase beeinflusst je nach der Gesamtdauer eines Perfusionsprozesses die Produktivität. In Abweichung zu der in dieser Arbeit verfolgten Strategie der frühen Absenkung von Temperatur und pH-Wert zur Ermöglichung geringer Perfusionsraten, könnte

während der Anwachsphase eine hohe spezifische Wachstumsrate bevorzugt werden. Dazu wäre aufgrund der höheren zellspezifischen Verdünnungsrate zunächst eine höhere Perfusionsrate erforderlich. Die Absenkung der Temperatur und des pH-Werts nach der Anwachsphase ermöglichte in einer anschließenden Produktionsphase die Reduktion der Perfusionsrate auf einen ausreichenden Wert. Eine zweiphasige Prozessführungsstrategie wurde auch zur Optimierung von Satz-Prozessen erfolgreich eingesetzt (Trummer *et al.*, 2006b). In der Produktionsphase könnte außerdem eine höhere spezifische Wachstumsrate eingestellt werden, um die Viabilität zu erhöhen und die Aggregationsquote zu minimieren. Beim Einsatz eines Mediums mit geringerer Calciumkonzentration oder einem zusätzlichen Abscheider für Zellaggregate könnte darauf verzichtet werden.

Zwei weitere Experimente zeigten die Übertragbarkeit der kombinierten pH-Wert- und Temperaturabsenkung: Im blasengegasteten Perfusionsprozess sollten aufgrund des höheren möglichen Gaseintrags Lebendzellichten über $3 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht werden (Kapitel 3.2.5). Die Temperaturerniedrigung führte zu einer deutlich stärkeren Reduktion der spezifischen Wachstumsrate als im membranbegasteten System und die Absenkung des pH-Werts nicht zu einer Verringerung der spezifischen Verbrauchsrate oder des Quotienten aus Lactatbildungs- und Glucoseverbrauchsrate. Die stärkste Änderung betraf die spezifische Produktbildungsrate, die mit einem mittleren Wert von 17,2 pg/Zelle·d geringer als in den Perfusionsprozessen mit Membranbegasung war. Auch die bei der Blasenbegasung nicht erfolgte metabolische Umstellung könnte mit einer verbesserten Begasungsstrategie untersucht werden. Im Fed-Batch-Prozess konnte reproduziert werden, dass die pH-Wert-Absenkung zu einer Verminderung der spezifischen Lactatbildungsrate führte (Kapitel 3.2.6). Dadurch konnten die Osmolalitäten auf unkritischen Werten unter 350 mOsmol/kg gehalten werden. Die Produktivität war aufgrund der geringen mittleren Lebendzellichten deutlich niedriger als in den Perfusionsprozessen. Der Anteil an desamidiertem rhGH aus dem Fed-Batch war so hoch, dass der Zellkulturprozess oder die Aufreinigungssequenz optimiert werden müssten.

3.3 Aufreinigung des humanen Wachstumshormons

Dieser Abschnitt des Ergebnisteils behandelt die Aufreinigung des im Perfusionsprozess mit CHO-Zellen hergestellten Produkts. Der Perfusionsprozess M3 erzeugte täglich ca. 2,8 L zellhaltiges Perfundat, das schnell und effizient aufgereinigt werden musste. Das für die Primäraufreinigung eingesetzte salztolerante Chromatographiematerial (Li *et al.*, 2006) wurde zunächst in Vorversuchen im Festbett charakterisiert und dann unter verschiedenen Bedingungen im Fließbett eingesetzt. An die Primäraufreinigung schlossen sich drei weitere chromatographische Aufreinigungsschritte in einer optimierten Reihenfolge an:

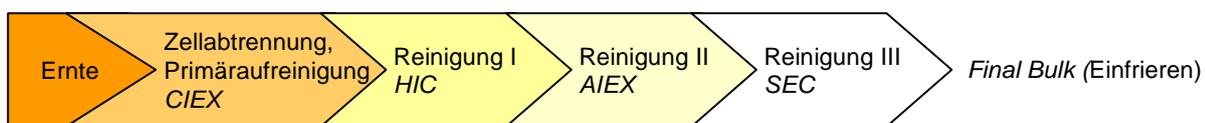


Abbildung 58: Übersicht der Aufreinigungssequenz.

Eine mögliche Desamidierung und Dimerisierung des Produkts wurde untersucht und der Abreicherungsgrad der biogenen Verunreinigungen Wirtszell-DNS (engl. *host cell DNA*, HCDNA) und Wirtszellprotein (engl. *host cell protein*, HCP) bestimmt. Die Daten sind in der diesen Ergebnissteil abschließenden Gesamtbilanzierung der Aufreinigungssequenz zusammengefasst.

3.3.1 Primäraufreinigung mit multimodalem Ligand

Das Streamline™ Direct HST-Material kann als salztoleranter Kationenaustauscher eingesetzt werden, aber aufgrund der Phenylgruppe auch in der Hydrophoben Interaktionschromatographie verwendet werden. Zur Charakterisierung des Materials wurden beide Modi untersucht.

3.3.2 Variante 1: Hydrophobe Interaktionschromatographie

Zunächst wurde über Zugabe von Salz eine hydrophobe Interaktion des Proteins mit der Phenylgruppe induziert. Lefort und Ferrara beschrieben schon 1986 eine Primäraufreinigung des humanen Wachstumshormons aus einem Zellkultur-Überstand mit Phenyl Sepharose bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1 M. Sie erreichten im Satz und mit einer Gradientenelution eine Ausbeute von 62 %.

3.3.2.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie im Festbett

Zur Optimierung der Ammoniumsulfatkonzentration im Festbett wurden 20 mL Gelmaterial in einer XK16-Säule mit einem FPLC™-System eingesetzt. Die lineare Flussrate betrug beim Probenauftrag und Waschen 298 cm/h. Als Basispuffer zur Pufferung des pH-Werts wurde in allen Versuchen Di-Natriumhydrogenphosphat (0,025 M, pH 7,00, 3,5 mS/cm) verwendet. Der Basispuffer wurde auch zur Elution bei einer halbierten Flussrate von 149 cm/h eingesetzt.

Die Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden zwischen 0,5 M und 1,5 M (entsprechend den Leitfähigkeiten von 88 mS/cm bis 180 mS/cm) variiert. Dieses führte in Abhängigkeit von der Salzkonzentration über hydrophobe Interaktion zu einer Bindung des Produkts an die Phenylgruppe (Chmiel, 2006). Zur Anpassung der Leitfähigkeit des Auftragspuffers an das mit Ammoniumsulfat eingestellte Perfundat wurde Natriumchlorid zugesetzt. Es wurden geringe Produktmengen von ca. 0,2 mg/mL Gelmaterial eingesetzt, um Überladungseffekte auszuschließen.

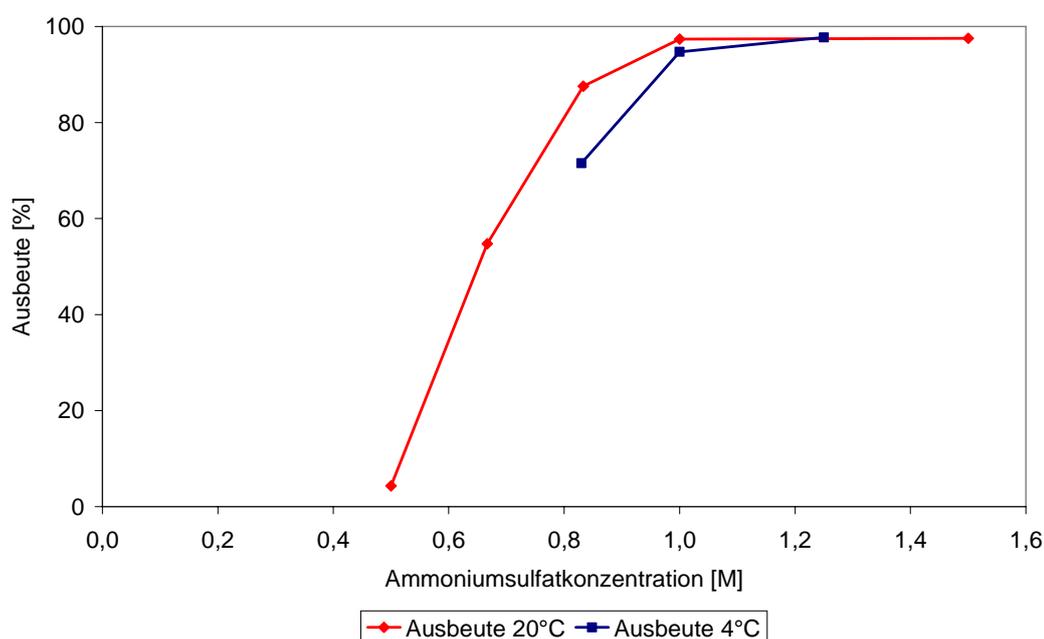


Abbildung 59: Ausbeute in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration und der Temperatur.

Die Abbildung 59 zeigt die Abhängigkeit der Ausbeute von der Ammoniumsulfatkonzentration und der Temperatur. Unterhalb einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1,0 M (131 mS/cm) nahmen die Ausbeute und die Wiederfindung ab. Erst bei 0,5 M erfolgte die Bindung während der Beladung nicht mehr quantitativ. Daher wurde bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der HIC auf niedrigere Ammoniumsulfatkonzentrationen als

0,83 M verzichtet. Die Abhängigkeit von der Temperatur musste untersucht werden, weil das Perfundat im Perfusionsprozess gekühlt wurde. Es zeigte sich, dass die Ausbeuten bei geringeren Temperaturen schlechter waren. Da die Proteinadsorption während der Beladung in allen Experimenten mit Ammoniumsulfat – außer bei 0,5 M – quantitativ erfolgte, musste die Ursache in der nicht ausreichenden Elutionsstärke des Phosphatpuffers liegen. Oberhalb einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 M und bei zu schneller Zugabe trübte die Lösung ein und musste erneut filtriert werden, wobei es zu etwa 10 % Produktverlust kam.

Neben Ammoniumsulfat wurde Natriumchlorid als alternatives Salz für die HIC getestet. Die Ausbeute erreichte aufgrund unzureichender Adsorption beim Beladen selbst bei einer Konzentration von 3,5 M (201 mS/cm) nur 58,9 %.

3.3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie im Fließbett

Die im Festbett optimierten Bedingungen wurden in die Fließbettchromatographie übertragen. Nur die linearen Flussraten aus den Festbettversuchen mussten angehoben werden, da der Expansionsfaktor des Fließbetts bei 298 cm/h zu gering gewesen wäre. Es wurden vier Versuche mit 79 mL HST-Material, gesteuert vom GradiFrac™-System, durchgeführt. Als Basispuffer zur Pufferung des pH-Werts wurde wiederum Di-Natriumhydrogenphosphat (0,025 M, pH 7,00, 3,5 mS/cm, 1008,8 kg/m³) eingesetzt und auch als Elutionspuffer verwendet. Die Ammoniumsulfatkonzentrationen wurden von 0,83 M bis 1,5 M variiert (Tabelle 16). Zur Anpassung der Leitfähigkeit des Äquilibrierungspuffers an das mit Ammoniumsulfat versetzte Perfundat wurde Natriumchlorid benutzt. Die Probe wurde weder vor, noch nach der Zugabe des Ammoniumsulfats filtriert, obwohl sich die Lösung oberhalb einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 M eintrübte. Daher konnten die in den Vorversuchen beobachteten Produktverluste vermieden werden.

Tabelle 16: Ammoniumsulfatkonzentrationen, Leitfähigkeiten, spezifische Pufferdichten, lineare Flussraten, Säulenvolumina und Expansionsfaktoren bei der Fließbettchromatographie mit dem HST-Material.

(NH₄)₂SO₄	Leitfähigkeit	Pufferdichte	Flussrate	Säulenvolumen	Expansionsfaktor
[M]	[mS/cm]	[kg/m³]	[cm/h]	[mL]	[-]
0,83	108,0	1068,8	663,1	452	2,4
1,00	134,0	1082,8	530,5	305	2,4
1,25	150,0	1093,4	530,5	305	2,9
1,50	172,5	1109,3	464,2	326	3,9

Bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,83 M erwies sich das Säulenvolumen mit 452 mL als zu groß, da der Expansionsfaktor des Gelmaterials nur einen Wert von 2,4 an-

nahm. Zur Verringerung des Pufferverbrauchs wurden in den folgenden zwei Versuchen der Adapter abgesenkt und das Säulenvolumen auf 305 mL reduziert. Zudem wurde die Flussrate vermindert, da angenommen wurde, dass diese neben der zu niedrigen Ammoniumsulfatkonzentration zur geringen Ausbeute bei gleichzeitig hoher Wiederfindung geführt hatte (Tabelle 17). Tatsächlich konnte die Ausbeute durch Reduktion der Flussrate und Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 1,0 M auf 40,5 % nahezu verdoppelt werden – bei dann vollständiger Wiederfindung. Beim Versuch mit 1,25 M Ammoniumsulfat konnte die Ausbeute weiter verbessert werden. Da der Expansionsfaktor schon bei diesem Versuch einen Wert von 2,9 annahm, musste der Adapter für den Versuch mit 1,50 M Ammoniumsulfat wieder angehoben werden. Tatsächlich wurde ein großer Expansionsfaktor von 3,9 erreicht. Außerdem trat ein in der gepackten Chromatographie aufgrund der dort eingesetzten umgekehrten Flussrichtung und dem gepackten Bett nicht beobachtetes Phänomen auf: Die geringere Dichte und Viskosität des Elutionspuffers führten zu einer Bettverwirbelung, woraus die geringe Ausbeute von 44,7 % resultierte. Bei steigenden Salzkonzentrationen konnte der in den vier Experimenten vom Anfang der Beladung bis zum Waschen konstante Produktverlust bei simultan sinkender Wiederfindung reduziert werden.

Tabelle 17: Probenvolumina, spezifische Beladung, prozentuale Bindung, Ausbeute und prozentuale Wiederfindung bei der Fließbettchromatographie mit dem HST-Material.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Probenvolumen	Beladung	Bindung	Ausbeute	Wiederfindung
[M]	[mL]	[mg rhGH/mL HST]	[%]	[%]	[%]
0,83	3450,0	2,12	18,2	21,9	103,6
1,00	985,0	0,98	32,4	40,5	108,1
1,25	1490,0	2,22	71,9	58,5	86,6
1,50	990,0	1,65	80,4	44,7	64,3

Laut Hersteller sind für die Fließbettchromatographie bei 15 cm sedimentierter Betthöhe Bodenzahlen von mindestens 25 zu erwarten (Amersham Biosciences, 1997). Für einen Puffer mit 1,0 M Ammoniumsulfat konnte die Bodenzahl nach Acetonzugabe in Puffer A bestimmt werden. Der Wert von 12 lag bei einer sedimentierten Betthöhe von 17,3 cm deutlich unter der Herstellerangabe und weist auf eine nicht-optimale Bettfluidisierung während der Elution hin. Als Ursache ist die Kanalbildung aufgrund von Dichte- und Viskositätsgradienten anzunehmen, die bei höheren Salzkonzentrationen aufgrund der zunehmenden Dichtedifferenz noch ausgeprägter war.

Diskussion: Multimodaler Ligand zur Hydrophoben Interaktionschromatographie

Im Festbett konnte die Eignung des Streamline™ Direct HST-Materials zur Aufreinigung des humanen Wachstumshormons in der Hydrophoben Interaktionschromatographie gezeigt werden (Kapitel 3.3.2.1). Ammoniumsulfatkonzentrationen von mindestens 1,0 M führten zu Ausbeuten über 97 %, wobei die Elution mit einem Phosphatpuffer bei neutralem pH-Wert und mit niedriger Leitfähigkeit durchgeführt werden konnte. Die Abhängigkeit der Proteindesorption von den Ammoniumsulfatkonzentrationen während der Beladung zeigte, dass das Verhalten des multimodalen Liganden nicht einem reinen HIC-Material entsprach. Der Einsatz von Natriumchlorid anstelle von Ammoniumsulfat führte selbst bei Konzentrationen von 3,5 M zu relativ geringen Ausbeuten (Kapitel 3.3.2.2).

Beim Einsatz des HST-Materials zur Hydrophoben Interaktionschromatographie im Fließbett traten verschiedene Probleme auf. Der Durchbruch von rhGH während der Probenapplikation und des Waschens konnte durch Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration minimiert werden – gleichzeitig fiel jedoch die Wiederfindung ab. Es liegt der Schluss nahe, dass die Elutionsbedingungen nicht ausreichten, um eine quantitative Desorption des gebundenen Produkts herbeizuführen. Diese Annahme wird durch die großen Eluatvolumina von ca. zwei Säulenvolumen bestätigt. Eine Zugabe von Isopropanol in den Elutionspuffer hätte die Desorption vermutlich verbessert. Die spezifischen Beladungen waren mit bis zu 2,22 mg rhGH/mL Gel-Material zehnfach höher als in den Vorversuchen im Festbett. Eine Überschreitung der dynamischen Kapazität trat nicht auf, da schon von Beginn der Beladung an die Adsorption unvollständig erfolgte (Daten nicht gezeigt).

Die Experimente in der Fließbettchromatographie wurden bei 21 °C durchgeführt. Selbst für eine nicht annähernd quantitative Adsorption an den Phenyl-Liganden mussten deutlich höhere Ammoniumsulfatkonzentrationen als im Festbett eingesetzt werden. Die Vorversuche im gepackten Bett legten den Schluss nahe, dass bei 4 °C noch höhere Salzkonzentrationen zur Adsorption notwendig wären. Da das Perfundat der Perfusionsprozesse auf 4 °C gekühlt wurde und ein Erwärmen vor der Primäraufreinigung nicht zweckmäßig erscheint, schränkt dies die Nutzbarkeit des multimodalen Liganden ein. Das Ammoniumsulfat musste langsam zugegeben werden, da hohe lokale Konzentrationen zum Ausfallen von Protein führten. Da Ammoniumsulfat selbst bei Raumtemperatur nur bis zu 4 M löslich ist (Scopes, 1994), würde die Zugabe eines verfahrenstechnisch besser handhabbaren Flüssigkonzentrats zu einer unerwünschten Verdünnung und damit zu einem größeren Zeitaufwand führen.

Das hydrodynamische Problem der Bettverwirbelung bei Dichte- oder Viskositätsgradienten während der Elution könnte durch Anpassung der spezifischen Dichte oder Viskosität des Elutionspuffers minimiert werden. Zu diesem Zweck könnten Glucose oder Glycin zugesetzt werden (Lütkemeyer *et al.*, 2001).

Eine Zell-Matrix-Interaktion unter Ausbildung größerer Aggregate wurde nicht beobachtet und war bei den hohen Salzkonzentrationen aufgrund der Abschirmung elektrostatischer Ladungen auch nicht zu erwarten (Hubbuch *et al.*, 2005).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Primäraufreinigung des humanen Wachstumshormons mit dem HST-Material in der HIC viele Nachteile aufweist.

3.3.3 Variante 2: Kationenaustauschchromatographie

Neben der die Salztoleranz vermittelnden Phenylgruppe trug der multimodale Ligand einen Carboxylrest und sollte daher als Kationenaustauscher ohne vorherige Reduktion der Leitfähigkeit eingesetzt werden können. Da Ionenaustauscher keine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit aufweisen, war dies eine untersuchenswerte Alternative.

3.3.3.1 Kationenaustauschchromatographie im Festbett

Für die Pufferoptimierung für das HST-Material als Kationenaustauscher im Festbett wurde dieselbe Chromatographiesäule und dasselbe Chromatographiematerial wie bei den Vorversuchen zur Hydrophoben Interaktionschromatographie benutzt.

Die lineare Flussrate betrug in allen Versuchen 298 cm/h. Die Leitfähigkeit der Äquilibriumspuffer wurde mit Natriumchlorid auf die physiologischen Werte der zu applizierenden Proben eingestellt. Beim Einstellen des pH-Werts der Probe trübte diese beim Durchgang durch den pI ein. Dies wurde vermutlich durch Aggregation und Ausfallen des humanen Wachstumshormons am pI verursacht und führte nach einer Filtration der Probe zu einer Reduktion der Produktkonzentration um bis zu 10 %.

Beim Probenauftrag bei pH 4,00 (0,020 M Natriumcitratpuffer) wurden Ausbeuten um 100 % erreicht (Tabelle 18). Bei pH 5,40 und 5,60 (0,020 M Natriumacetatpuffer) konnten nur Ausbeuten von 71,4 beziehungsweise 73,1 % erzielt werden. Die Elution erfolgte in allen Fällen über einen pH-Shift auf 7,00 mit 0,025 M Di-Natriumhydrogenphosphat. Bei pH 5,40 und 5,60 erfolgte die Adsorption quantitativ, die Elution dahingegen nicht-quantitativ.

Tabelle 18: Puffer, pH-Werte, spezifische Beladung, Eluatvolumen, Ausbeute und prozentuale Wiederfindung bei der Festbettchromatographie mit dem HST-Material als Kationenaustauscher.

Äquilibriumspuffer	pH	Leitfähigkeit	Beladung	Ausbeute	Wiederfindung
	[-]	[mS/cm]	[mg rhGH/mL HST]	[%]	[%]
0,020 M Natriumcitrat	4,00	15,0	0,19	104,9	104,9
0,020 M Natriumacetat	5,40	13,5	0,41	71,4	71,4
0,020 M Natriumacetat	5,60	15,6	0,28	73,1	73,1

Zur Bestimmung der dynamischen Kapazität bei pH 4,00 wurde versucht, die Säule zu überladen. Es wurden hierzu 4300 mL eines, mit 36,37 mg/L allerdings gering konzentrierten, Fermentationsüberstands aufgetragen. Das Produkt wurde quantitativ gebunden, so dass die dynamische Kapazität größer als 6,8 mg rhGH/mL HST-Material war. Der Elutionspeak hatte aufgrund eines ausgeprägten *Tailings* ein Gesamtvolumen von 250 mL.

3.3.3.2 Kationenaustauschchromatographie im Fließbett

Die im Festbett gefundenen Binde- und Elutionsbedingungen wurden in der Fließbettchromatographie untersucht. Hierbei wurde wiederum das GradiFrac™-System mit der Streamline™ Direct 24-Säule eingesetzt. Die Flussrate von 298,4 cm/h aus den Vorversuchen musste auf 530,5 cm/h erhöht werden, um eine ausreichende Bettexpansion zu erreichen. Das Bett zeigte eine stabile Expansion mit einer scharfen Abgrenzung des Gelmaterials. Trotz senkrechter Aufstellung der Streamline™ Direct 24-Säule bildeten sich, neben kleinen Strömungswirbeln innerhalb des stabilen Bettes, Strömungskanäle von einigen Zentimetern Länge aus.

Es wurden 15 Experimente mit dem HST-Material als Kationenaustauscher bei verschiedenen pH-Werten und Puffern durchgeführt. Dabei wurden zwei Methoden gewählt:

1. Kationenaustauscher nach Absenkung des pH-Werts unter den pI.
2. Kationenaustauscher oberhalb des pI unter Ausnutzung positiver Partiaalladungen.

3.3.3.2.1 Probenauftrag unterhalb des Isoelektrischen Punkts

Beim Probenauftrag bei pH 4,00 adsorbierte das Produkt in den drei durchgeführten Experimenten zu 100 % an den Liganden, so dass in den Durchlauf- und Waschfraktionen kein rhGH nachgewiesen werden konnte. Auch die Desorption war mit einem Mittelwert von 96,7 % im Rahmen des Fehlers der Analyseverfahren quantitativ (Abbildung 61). Der Standard-Elutionspuffer war 0,025 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, mit einer Leitfähigkeit von 3,5 mS/cm. Die Elution wurde somit durch einen pH-Shift und nicht durch eine Verdrängung durch Gegenionen ausgelöst. Tatsächlich führte der Puffer zu einer schnellen pH-Veränderung und damit kleineren Eluatvolumen. Im Versuch CIEX II wurden 1177,8 mg

rhGH aufgetragen und im Elutionspeak mit einer Konzentration von 5437,1 mg/L in weniger als einem Säulenvolumen eluiert; mit 187 mL entsprach das Eluatvolumen dem Volumen des expandierten Betts während der Elution. Dabei betrug die Ausbeute 86,3 % bei nahezu vollständiger Wiederfindung. Damit wurde im Versuch CIEX II für die Primäraufreinigung die höchste Produktkonzentration der vorliegenden Arbeit erzielt. In den Versuchen CIEX I und II wurde eine zusätzliche Elution mit 1 M Natriumchlorid durchgeführt. Dabei wurden mit 3,1 beziehungsweise 6,7 mg nur geringe Mengen rhGH detektiert. In diesen Versuchen kam es zu einer Fragmentierung des Produkts (Abbildung 63 und Abbildung 68), die im Fall des Versuchs CIEX II aufgrund der hohen Produktkonzentration sogar in der RP-HPLC zur Konzentrationsbestimmung sichtbar wurde.

Da bei einem Natriumcitratpuffer mit pH 4,00 eine Produktschädigung beobachtet worden war, wurde alternativ ein Natriumacetatpuffer (0,025 M, pH 5,00) benutzt. Beim Versuch CIEX III wurden 1500 mL Perfundat aus dem Prozess M3 mit einer Konzentration von 296,75 mg/L eingesetzt. In den Durchlauf- und Waschfraktionen konnte kein rhGH nachgewiesen werden. Als Elutionspuffer wurde wiederum 0,025 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, eingesetzt. In der Elution, die mit 291 mL größer als ein Säulenvolumen war, wurde eine Produktkonzentration von 1223,5 mg/L gemessen. Damit betrug die Ausbeute 80,0 %, wobei die prozentuale Wiederfindung mit nur 81,9 % auf eine unvollständige Desorption bei der Elution hinwies (Abbildung 61). Es kam jedoch wie bei pH 4,00 zu einer Produktfragmentierung (Abbildung 63).

3.3.3.2 Probenauftrag oberhalb des Isoelektrischen Punkts

Die Produktschädigung beim Durchgang durch den Isoelektrischen Punkt führte zu Experimenten mit einem Probenauftrag bei pH 5,60. Da dieser Wert oberhalb des pI von rhGH liegt, der für die 22 kDa-Variante 5,27 und für die 20 kDa-Variante 5,39 beträgt, hatte das Produkt keine positive Nettoladung. Daraus resultierte eine suboptimale Adsorption des Produkts während der Beladung: Die prozentuale Bindung betrug im Mittel 74,8 % bei einer hohen Standardabweichung von 23,4 % (Abbildung 61).

Die Wiederfindung war im Mittel von vier Versuchen mit 86,9 % wiederum geringer als beim Probenauftrag bei pH 4,00. Eine Fragmentierung des Produkts konnte für das Eluat des Versuchs CIEX IV in einem SDS-Gel jedoch nicht detektiert werden (Abbildung 63).

Das Chromatogramm des Versuchs CIEX IV zeigt die für pH 5,60 typische unzureichende Adsorption während des Probenauftrags (Abbildung 60). Der Elutionspeak ist nahezu sym-

metrisch. Bei der Reinigung mit 1 M Natriumchlorid erschien ein kleinerer Peak, der kaum rhGH enthielt. Der während der Reinigungsprozedur eluierende Peak konnte nicht in der RP-HPLC auf Anwesenheit von Produkt untersucht werden, da er 1 M Natriumhydroxid und 20 % Isopropanol enthielt. Aufgrund der hohen Produktwiederfindung von 94,4 % im Versuch CIEX IV kann davon ausgegangen werden, dass er kaum rhGH enthielt. Die prozentuale HCP-Wiederfindung betrug nur 17,0 %, so dass dieses vermutlich zu dem großen Reinigungspeak führte.

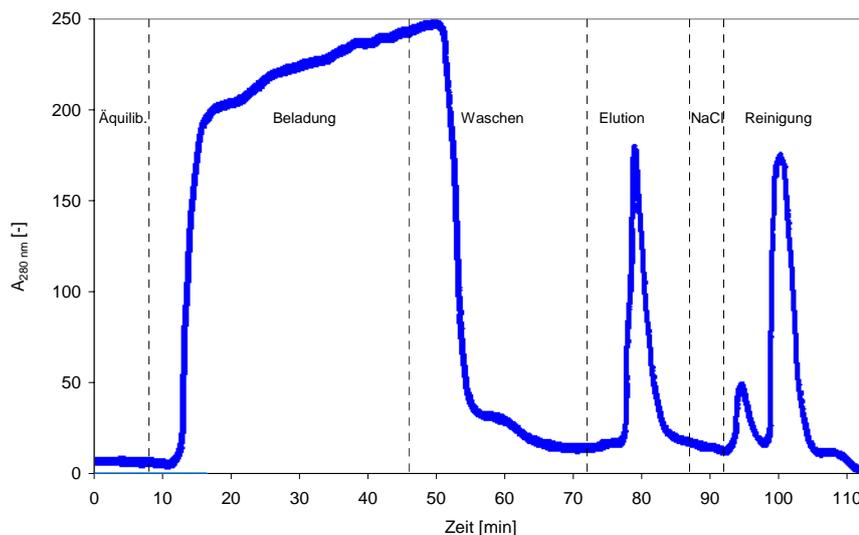


Abbildung 60: Chromatogramm von Versuch CIEX IV bei pH 5,60 mit Durchbruch während des Probenauftrags. Die Daten wurden von einem Schreiber auf Papier aufgezeichnet und mussten mit einer Bildbearbeitungssoftware digitalisiert werden.

Die maximale Ausbeute von 71,1 % hatte der Versuch CIEX VIII mit einer Produktkonzentration im Eluat von 887,8 mg/L. Die Differenz der Leitfähigkeiten der Äquilibrationpuffer zu den Proben und deren absolute Werte, die aufgrund verschiedener pH-Werte im Perfusionsprozess variierten, korrelierten nicht mit den Ausbeuten (Daten nicht gezeigt).

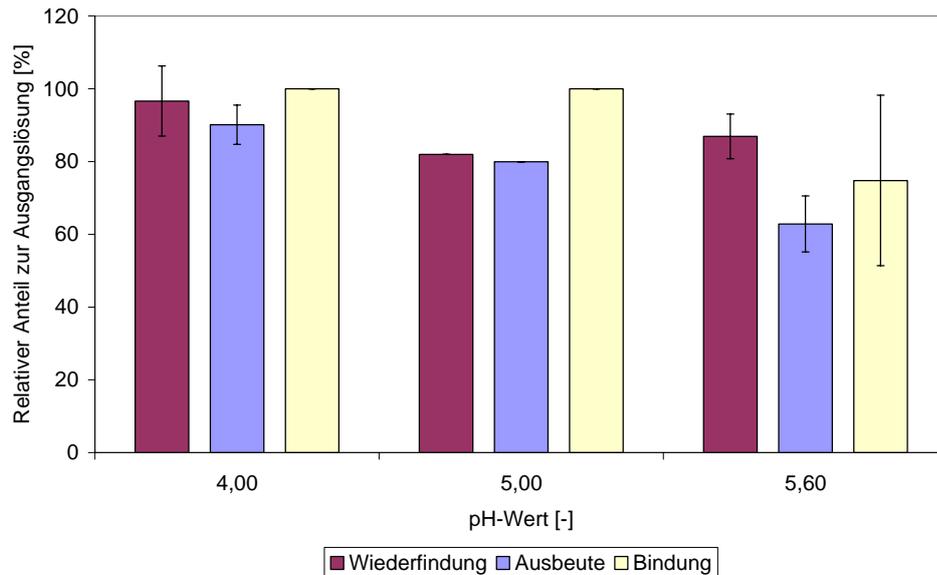


Abbildung 61: Mittlere Bindung und Wiederfindung, sowie Ausbeuten mit den jeweiligen Standardabweichungen. pH 4,00 n=3, pH 5,00 n=1, pH 5,60 (n=4).

3.3.3.3 Bestimmung der dynamischen Kapazität

Für die Dimensionierung der in der Aufreinigungssequenz einzusetzenden Säulen ist das Wissen über die dynamischen Kapazitäten entscheidend. Da die Primäraufreinigung mit dem HST-Material als Kationenaustauscher Erfolg versprechend war, wurden die dynamischen Kapazitäten bestimmt. Die dynamische Kapazität ist als spezifische Produktbeladungsmenge zum Zeitpunkt des Erreichens einer Produktkonzentration im Durchlauf von 10 % der Ausgangslösung während einer Chromatographie definiert.

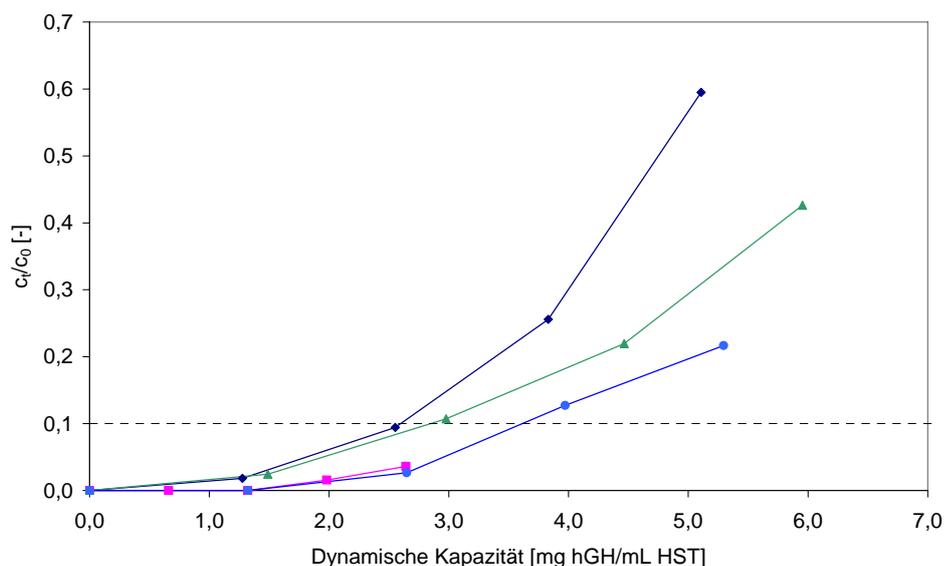


Abbildung 62: Bestimmung der dynamischen Kapazität bei pH 5,60 (n=4).

Beim Versuch die dynamischen Kapazität bei pH 4,00 zu bestimmen, konnte kein Durchbruch erreicht werden. Da bei pH 4,00 eine Fragmentierung des Wachstumshormons auftrat (Abbildung 63), wurde auf weitere Versuche bei diesem pH-Wert verzichtet. Die dynamische Kapazität bei pH 4,00 betrug mindestens 15,5 mg rhGH/ mL Gelmaterial. Für einen pH-Wert von 5,00 konnte im Versuch CIEX III die dynamische Kapazität mit ca. 9 mg rhGH/mL Gelmaterial bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Abbildung 62 wurden Daten von vier Experimenten zur Bestimmung der dynamischen Kapazität bei pH 5,60 aufgenommen. Der ermittelte Durchschnittswert betrug ca. 3 mg rhGH/mL Gelmaterial.

3.3.3.4 SDS-PAGE zur Bestimmung des Aufreinigungserfolgs

Zur visuellen Bestimmung der Reinheit wurde routinemäßig ein SDS-PAGE durchgeführt. Auf das in Abbildung 63 gezeigte Gel wurden Eluate aus Primäraufreinigungen mit der Fließbettchromatographie bei den verschiedenen pH-Werten und zum Vergleich aus einer Primäraufreinigung mit dem HST-Material zur HIC aufgetragen.

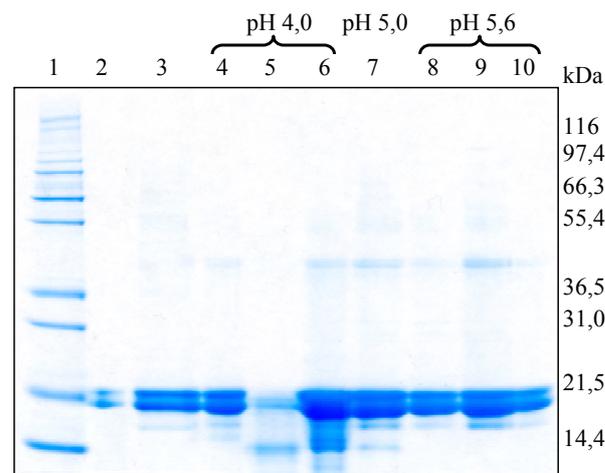


Abbildung 63: Eluate aus acht Primäraufreinigungen im Fließbett. SimplyBlue™-gefärbtes NuPAGE®-Gel (12% Polyacrylamid, nicht reduzierend). Spur 1: Molmassenstandard (Mark 12), Spur 2: rhGH-Standard, Spur 3: HIC, 1,25 M Ammoniumsulfat, Spur 4: CIEX, pH 4,00, Spur 5: CIEX I, Spur 6: CIEX II, Spur 7: CIEX III, Spur 8: CIEX, pH 5,60, Spur 9: CIEX IV, Spur 10: CIEX, pH 5,60. Das rhGH trat als Doppelbande bei 22 kDa auf und bei 44 kDa lag die Dimer-Bande.

In Spur 2 des Gels wurde ein rhGH-Standard (EDQM, Straßburg) aufgetragen und in den anderen Spuren Eluate aus Primäraufreinigungen bei verschiedenen Bedingungen: In Spur 3 wurde zum Vergleich ein Eluat bei Verwendung des HST-Materials als HIC (Ammoniumsulfatkonzentration 1,25 M) appliziert. In den Spuren 4 bis 6 wurden die Eluate aus den Experimenten mit dem HST-Material als Kationenaustauscher bei pH 4,00 aufgetragen und in Spur 7 das Eluat aus dem Versuch CIEX III bei pH 5,00. Bemerkenswert ist das Auftreten von

Banden im Bereich von 14 kDa in den Spuren 5 und 6. Durch eine Analyse mit einem MALDI-TOF konnte in diesen Banden ein N-terminales Fragment des Wachstumshormons bis zur Aminosäure 127 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für ein solches rhGH-Fragment wurde eine Größe von 14,8 kDa und ein theoretischer pI von 4,96 berechnet (ExpASy, *Peptide Cutter*). Sein theoretischer pI liegt mit 6,74 stärker im neutralen Bereich als der des Aminoterminus. In der Literatur wird von Fragmentierungen im N-terminalen Bereich berichtet (Lewis *et al.*, 2000, Rowlinson *et al.*, 1996).

In den Spuren 8 bis 10 wurden Eluate der Primäraufreinigung bei pH 5,60 – unter anderem aus dem Versuch CIEX IV – aufgetragen, bei denen außer der Bande der 20 kDa-Variante und des rhGH-Dimers keine dominanten Verunreinigungen mehr auftraten. Eine Selektivität der Primäraufreinigung für eine der beiden rhGH-Varianten aufgrund der verschiedenen pI-Werte lässt sich mit dem SDS-Gel nicht belegen.

Die Ursache der in dem gezeigten SDS-Gel generell aufgetretenen Doppelbanden der 22 kDa-Variante des rhGH ist unklar. Da auch der rhGH-Standard dieses Phänomen zeigte, wurde es offenbar durch die nicht-reduzierenden Bedingungen generiert.

3.3.3.5 Reinigung des Gelmaterials

Um einen ökonomischen Aufreinigungsprozess zu gewährleisten, werden für das Gelmaterial möglichst hohe Zykluszahlen angestrebt. Eine effiziente Reinigungsprozedur (engl. *cleaning in place*, CIP) ist für die Fließbettchromatographie besonders wichtig, da das Gelmaterial direkt mit Zellen und Zellfragmenten in Kontakt kommt, die zum Teil mit der Matrix interagierten (Chase, 1994). Während des Probenauftrags nahm die expandierte Betthöhe im Durchschnitt um vier Zentimeter zu. Verursacht wurde diese Bettexpansion vermutlich durch Dichte- und Viskositätsunterschiede der Probe und eine Bindung von Zellen und Zellfragmenten. Während des Waschens und der Elution sank die expandierte Betthöhe auf die Höhe wie vor dem Probenauftrag ab.

Lipid-, DNA- und Proteinanlagerungen mussten durch eine zusätzliche Reinigung entfernt werden. Diese Reinigung erfolgte in mehreren Schritten: Zunächst wurde zur Abreinigung ionisch gebundener Substanzen 1 M Natriumchlorid bei einer Flussrate von 332 cm/h bis zur Elution eines Peaks aufgetragen. Dieser konnte in der RP-HPLC auf eventuell persistierendes rhGH untersucht werden. Im Anschluss wurde gemäß Herstellerangabe zur Elution von hydrophob gebundenen Substanzen und von Lipiden auf einen Reinigungspuffer (1 M Natriumhydroxid, 20 % Isopropanol) umgestellt (GE Healthcare, 2005) und dieser durch die Säule gepumpt, bis ein zu verwerfender Peak eluierte. Dann wurde dieser Puffer für eine Stunde bei

einer Flussrate von 332 cm/h rezirkuliert und die Säule anschließend in 20 % Ethanol bei Raumtemperatur gelagert. Die bei der Äquilibration der folgenden Chromatographie gemessenen expandierten Betthöhen sind in Abbildung 64 dargestellt. Der Mittelwert für 15 Fließbettchromatographien betrug 36,1 cm bei einer linearen Flussrate von 531 cm/h und war weitgehend konstant; dies gilt als Indikator für eine erfolgreiche CIP-Prozedur (Asplund und Ramberg, 1998).

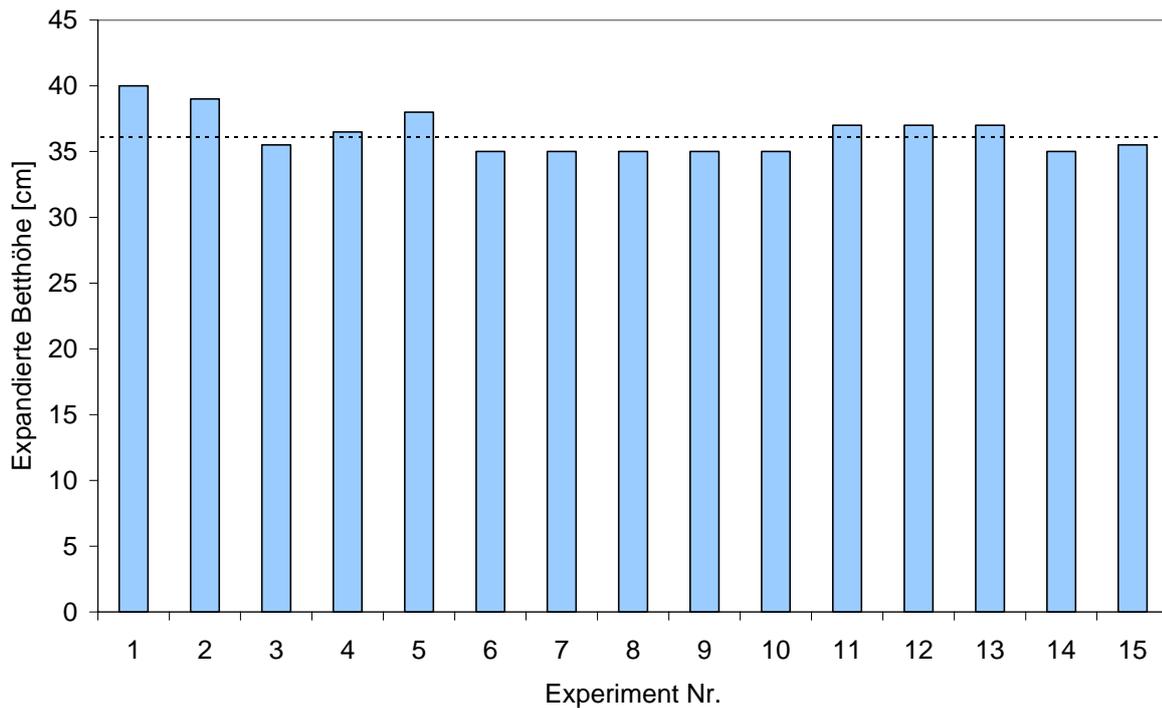


Abbildung 64: Expandierte Betthöhen während der Äquilibrationen von 15 Experimenten (gestrichelt: Mittelwert). Die sedimentierte Betthöhe betrug 17,3 cm.

3.3.3.6 Partikelanreicherung während der Fließbettchromatographie

Die Partikelabtrennung ist neben der Produktbindung eine zentrale Aufgabe der Fließbettchromatographie. Aufgrund auftretender Biomasse-Matrix-Interaktionen kann sich das Gelmaterial mit Zellen und Debris beladen. In dieser Arbeit wurden Zell-Matrix-Interaktionen unter Ausbildung von Aggregaten aus einem speziellen Grund nicht beobachtet: Bei den Perfusionsprozessen waren die Zelldichten im Perfundat sehr gering. Aus den Messwerten des Cedex wurde für den Prozess M3 eine durchschnittliche Gesamtzelldichte im Perfundat von $1,29 \cdot 10^5$ Zellen/mL bei einer Viabilität von 34,8 % und einem mittleren Durchmesser von 11,1 μm bestimmt. Mit dem CASY[®], Modell TCC konnten die Partikelkonzentrationen im Perfundat und den Chromatographiefraktionen bestimmt werden.

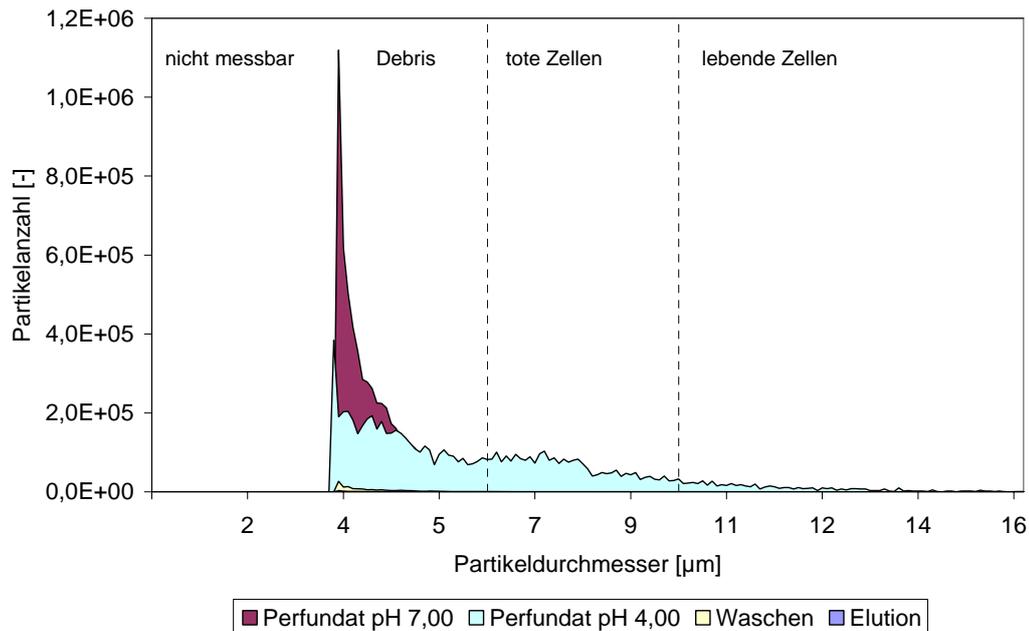


Abbildung 65: Partikelgrößenverteilung von Fraktionen einer Fließbettchromatographie (Versuch CIEX II). Die Partikelzahl im Eluat war sehr gering.

Für das im Versuch CIEX II eingesetzte Perfundat aus dem Perfusionsprozess M3 betrug die mit dem Cedex gemessene Gesamtzelldichte nur $1,1 \cdot 10^4$ Zellen/mL. Wie in Tabelle 19 zu erkennen ist, entsprach diese Konzentration weniger als 0,1 % der mit dem CASY® bestimmten Partikelkonzentration. Aus diesen Grund ist in Abbildung 65 im Bereich über 10 µm weder ein distinkter Lebendzellpeak zu erkennen, noch zwischen 6 und 10 µm Partikeldurchmesser ein Totzellpeak (Glauner, 1991). Mit der eingesetzten Messkapillare konnten nur Partikel ab etwa 3,4 µm Durchmesser vermessen werden, die vermutlich den Hauptanteil der Partikelfracht ausmachten. Bemerkenswert war das Abflachen der Partikelgrößenverteilung durch Aggregation der kleineren Partikel und die Zunahme der Partikelkonzentration nach Einstellen des pH-Werts auf 4,00. Ursächlich war neben dem pH-Wert vermutlich das Rühren der Probe mit einem Magnetrührer. Am Ende des Waschens waren kaum mehr Partikel vorhanden und im Eluat war die Partikelkonzentration kaum noch messbar, wie Abbildung 65 zeigt. Nach Berechnung der Partikelanzahlen in den einzelnen Fraktionen konnte eine Bilanzierung der Partikelanreicherung durchgeführt werden, wonach 99,986 % der Partikel des Perfundats bei pH 4,00 im Eluat abgetrennt wurden (Tabelle 19). Vor der Weiterverarbeitung oder Lagerung musste es dennoch filtriert werden.

Tabelle 19: Partikelanreicherung während der Fließbettchromatographie (Versuch CIEX II). Zur Berechnung der Anreicherung wurde die auf den pH-Wert von 4,00 eingestellte Ausgangslösung zu Grunde gelegt.

	Partikelkonzentration	Volumen	Partikelanzahl
	[Partikel/mL]	[mL]	[Partikel]
Perfundat pH 7,00	1,70E+07	3326	5,66E+10
Perfundat pH 4,00	1,90E+07	3326	6,31E+10
Ende des Waschens	4,13E+05	1000	4,13E+08
Eluat	4,60E+04	187	8,61E+06
Partikelanreicherung [%]			99,986

Diskussion: Multimodaler Ligand zur Kationenaustauschchromatographie

Der zweite Ansatz zur Primäraufreinigung mit dem multimodalen HST-Material war dessen vom Hersteller empfohlene Nutzung als salztoleranter Kationenaustauscher. Als zu optimierende Parameter für die Kationenaustauschchromatographie erwiesen sich bei den Vorversuchen im Festbett das Puffersystem und der pH-Wert bei der Bindung (Kapitel 3.3.3.1). Eine Erniedrigung der Salzkonzentration des Perfundats war nicht erforderlich – es musste lediglich der pH-Wert eingestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Ausbeute bei pH 4,00 am höchsten war. Dennoch erlaubten die bei pH 5,40 und pH 5,60 vorliegenden positiven Partialladungen eine Bindung des humanen Wachstumshormons oberhalb des Isoelektrischen Punkts.

Beim Versuch die dynamische Kapazität bei pH 4,00 zu bestimmen, trat kein Durchbruch auf, aber der Elutionspeak zeigte ein starkes *Tailing* über mehrere Säulenvolumen. Dies zeigte die Grenzen der Übertragbarkeit vom Festbett auf das Fließbett auf. Die Größenverteilung des Streamline™ Direct HST-Materials, mit Durchmessern von 80 bis 200 µm, führte durch die resultierende inhomogene Packung über die Eddy-Diffusion zu dem beobachteten *Tailing* (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Auch in der Fließbettchromatographie konnte das Perfundat nach Einstellung des pH-Werts bei physiologischen Salzkonzentrationen direkt auf die Streamline-Säule appliziert werden. Die Adsorption erfolgte quantitativ und bei der Elution konnten Ausbeuten über 80 % erzielt werden. Dabei zeigte sich, dass die dynamische Kapazität bei pH 4,00 mit mindestens 15,5 mg rhGH/mL Gelmaterial am höchsten war. Bei pH 5,00 lag die dynamische Kapazität noch bei 8 mg rhGH/mL Gelmaterial. Ungünstigerweise kam es bei diesen pH-Werten zu Produktveränderungen im Sinne einer Erzeugung von rhGH-Fragmenten, die zunächst für Restverunreinigungen durch kleinere Proteine gehalten wurden. Erst durch eine massenspektrometrische Analyse konnten sie als N-terminale rhGH-Fragmente identifiziert werden.

Abildgaard *et al.* konnten 1992 mittels Kernmagnetischer Resonanz zeigen, dass bei sauren pH-Werten die globuläre Tertiärstruktur von Proteinen nur minimalen Änderungen unterliegt. Das Wachstumshormon ist bei pH 4,00 jedoch gegenüber einem proteolytischen Angriff unter Bildung eines 17 kDa-Fragments unter Abspaltung des Aminoterminus empfindlich (Spolaore, 2004). Eine nicht-biologische Ursache der Fragmentierung könnte in einer Auffaltung der hydrophoben Kernstruktur des Proteins durch die Phenylreste des HST-Liganden in Kombination mit dem geringen pH-Wert von 4,00 bei der Bindung liegen (Wicar *et al.* 1994). Konventionelle Kationenaustauscher vermitteln keine hydrophoben Interaktionen, so dass die carboxyterminale Fragmentierung bei niedrigen pH-Werten während der Aufreinigung von rhGH nicht beschrieben ist.

Aufgrund der Produktfragmentierung wurde untersucht, ob bei pH-Werten oberhalb des Isoelektrischen Punkts ebenfalls eine Bindung möglich war. Tatsächlich konnte das humane Wachstumshormon auch bei pH 5,60 gebunden werden, wobei die Produktbindung nicht quantitativ erfolgte und Ausbeuten bis zu 71,1 % erreicht werden konnten. Die dynamische Kapazität war mit einem mittleren Wert von 3 mg rhGH/mL Gelmaterial relativ gering. Dennoch wurde dieser pH-Wert in der Folge bei der Primäraufreinigung eingesetzt. Eine Selektivität der Primäraufreinigung für eine der rhGH-Varianten bei diesem pH-Wert aufgrund der unterschiedlichen Isoelektrischen Punkte der 22 kDa-Variante gegenüber der 20 kDa-Variante wurde nicht detektiert.

Für ein Zwei-Komponentensystem aus bovinem Serumalbumin und Myoglobin wurden bei pH 5,00 dynamische Kapazitäten von 28,5 beziehungsweise 5,65 mg/ mL HST-Material gefunden (Li *et al.*, 2006). Die Elution erfolgte im Gegensatz zu den oben gezeigten Experimenten unter Hochsalzbedingungen. Dabei lag der pI von Myoglobin mit 7,4 noch deutlicher über dem pH-Wert bei der Bindung, so dass Partzialladungen keine Rolle für die Bindung gespielt haben dürften. Dies zeigt, dass das Adsorptions- und Desorptionsverhalten eines multimodalen Liganden deutlich schlechter zu interpretieren ist, als bei konventionellen Liganden.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Primäraufreinigung wurden eine Reihe von Fließbettchromatographien bei pH 5,60 unter identischen Bedingungen durchgeführt. Wie die Abbildung 61 zeigt, war selbst bei diesen reproduktiven Läufen die Standardabweichung der Bindung mit 23,6 % sehr hoch, wohingegen die Standardabweichung der prozentualen Wiederfindung nur 6,2 und der Ausbeute 7,7 % betrug. Dies ist ein Hinweis auf zu optimierende Adsorptionsbedingungen, könnte aber auch auf ungünstige hydrodynamische Bedingungen während der Beladung hinweisen. Die Differenz der Leitfähigkeit der Äquilibrierungspuffer

zu den Proben und deren absolute Werte korrelierten nicht mit der prozentualen Bindung (Daten nicht gezeigt).

Das Ziel der Primäraufreinigung war eine Abtrennung von Debris und Zellen, eine Volumenreduktion für die nachfolgenden Chromatographieschritte und die Eliminierung von Verunreinigungen bei hohen Ausbeuten. Die Partikelanzahl des Eluats konnte ausgehend vom Perfundat um 99,986 % reduziert werden (Kapitel 3.3.3.6). Die Wirkung der Zellrückhaltung durch Sedimentation ist an der Partikelgrößenverteilung gut zu erkennen: Im Perfundat waren kaum lebende Zellen enthalten und die Debriskonzentration war hoch. Der Reinigungserfolg wurde außerdem in Form eines SDS-Gels und der vollständigen Abreicherung von Aminosäuren gezeigt. In der Gesamtbilanzierung der Aufreinigungssequenz wird die Abreicherung von DNA und Wirtszellprotein diskutiert (Kapitel 3.3.7).

Da die Fließbettchromatographie ein die Zellabtrennung integrierendes Verfahren ist, unterliegt sie besonderen Anforderungen an die Reinigung, zumal die physiologischen Salzkonzentrationen eine Zell-Matrix-Interaktion durch Abschirmung der elektrostatischen Ladung nicht vollständig unterbinden konnten (Hubbuch *et al.*, 2005). Zur Ausbildung von makroskopischen Zell-Matrix-Aggregaten kam es jedoch nicht. In den 15 Experimenten waren die Produktbindeigenschaften des Materials unverändert und die expandierten Betthöhen während der Äquilibrationen konstant. Daraus kann ein erster Rückschluss auf die Robustheit des Materials gezogen werden.

Ein bemerkenswerter Aspekt war die Elution, die, wie bei den anderen Versuchen mit dem HST-Material, über eine pH-Verschiebung in den neutralen Bereich mit einem Phosphatpuffer (0,025 M, pH 7,00) erfolgen konnte. Somit hätte aufgrund der geringen Leitfähigkeit im Anschluss eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt werden können.

3.3.4 Reinigung I: Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das multimodale Streamline™ Direct HST-Material konnte, wie die oben dargestellten Versuche zeigten, sowohl in der Kationenaustauschchromatographie als auch in der Hydrophoben Interaktionschromatographie eingesetzt werden. Dabei zeigte es sich, dass eine HIC zwar möglich war, aber nicht im Fließbett zur Primäraufreinigung eingesetzt werden sollte.

Somit wurde zur Primäraufreinigung die Kationenaustauschchromatographie im Fließbett eingesetzt. Deren Eluate erlaubten aufgrund ihrer geringen Leitfähigkeit den anschließenden Einsatz eines Anionenaustauschers. Dies wurde mit Q Separose HP und einer Anionenaustauschermembran durchgeführt (Kapitel 3.3.5.1.1), resultierte jedoch in einer Produktaufkonzentrierung anstatt einer weiteren Reinigung (Spezielle Analytik, Abbildung 72). Daher wur-

de als erster Reinigungsschritt eine HIC durchgeführt, um die durch sie eingebrachten Verunreinigungen, Ammoniumsulfat und Isopropanol, in einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie entfernen zu können.

Für diesen Reinigungsschritt wurde ein HIC-Material für hohe Flussraten, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, eingesetzt, das den gleichen hydrophoben Liganden wie das HST-Material aufwies. Daher konnten die Erfahrungen mit dem HST-Material in Bezug auf die notwendigen Ammoniumsulfatkonzentrationen berücksichtigt werden. Die Versuche zeigten, dass eine quantitative Adsorption des rhGH durch eine Ammoniumsulfatkonzentration von 0,8 M erreicht werden konnte.

Die Chromatographie wurde mit 18 mL Phenyl Sepharose 6 FF in einer XK26-Säule mit einem FPLCTM-System bei einer linearen Flussrate von 113 cm/h durchgeführt. Als Äquilibriumspuffer wurde 0,060 M Di-Natriumhydrogenphosphat mit 0,8 M Ammoniumsulfat (pH 7,00, Leitfähigkeit 120 mS/cm) eingesetzt. Nach Einstellen der Ammoniumsulfatkonzentration auf 0,8 M wurde eine Filtration bei 0,45 µm ohne Produktverlust durchgeführt. Höhere Ammoniumsulfatkonzentrationen führten, vermutlich durch Aggregation und Ausfällen des rhGH, zu einer Eintrübung der Lösung, wodurch die Filter unter Abnahme der Produktkonzentration verblockten. Nach dem Probenauftrag und dem ersten Waschen mit dem Äquilibriumspuffer wurde, in den ersten Versuchen bei Produktmengen bis 8 mg, in einem zweiten Waschschrift mit einem Puffer geringer Leitfähigkeit gewaschen (0,060 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, Leitfähigkeit 7,7 mS/cm). Dieser Waschschrift diente der Abreicherung von Kontaminanten und der Reduktion der Leitfähigkeit vor der Elution des rhGH (Abbildung 66). Danach erfolgte die Elution über eine weitere Schwächung der hydrophoben Interaktion durch eine verringerte Salzkonzentration und 20 % Isopropanol im Elutionspuffer (0,060 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,00, Leitfähigkeit 1,6 mS/cm).

Beim Auftrag größerer Produktmengen führte der zweite Waschschrift zu einer Elution des Produkts. Dies konnte durch die Erhöhung der Leitfähigkeit des Waschpuffers auf 29,6 mS/cm durch Zugabe von 0,2 M Natriumchlorid verhindert werden. Gleichzeitig war die Reduktion der Leitfähigkeit ausreichend, um keine weitere Verdünnung vor Durchführung der anschließenden Anionenaustauschchromatographie vornehmen zu müssen. Zur Absenkung der Isopropanolkonzentration und Optimierung der Adsorption in der nachfolgenden AIEX wurden die ersten 20 mL des Elutionspeaks in 20 mL des ersten Puffers der folgenden Anionenaustauschchromatographie aufgefangen.

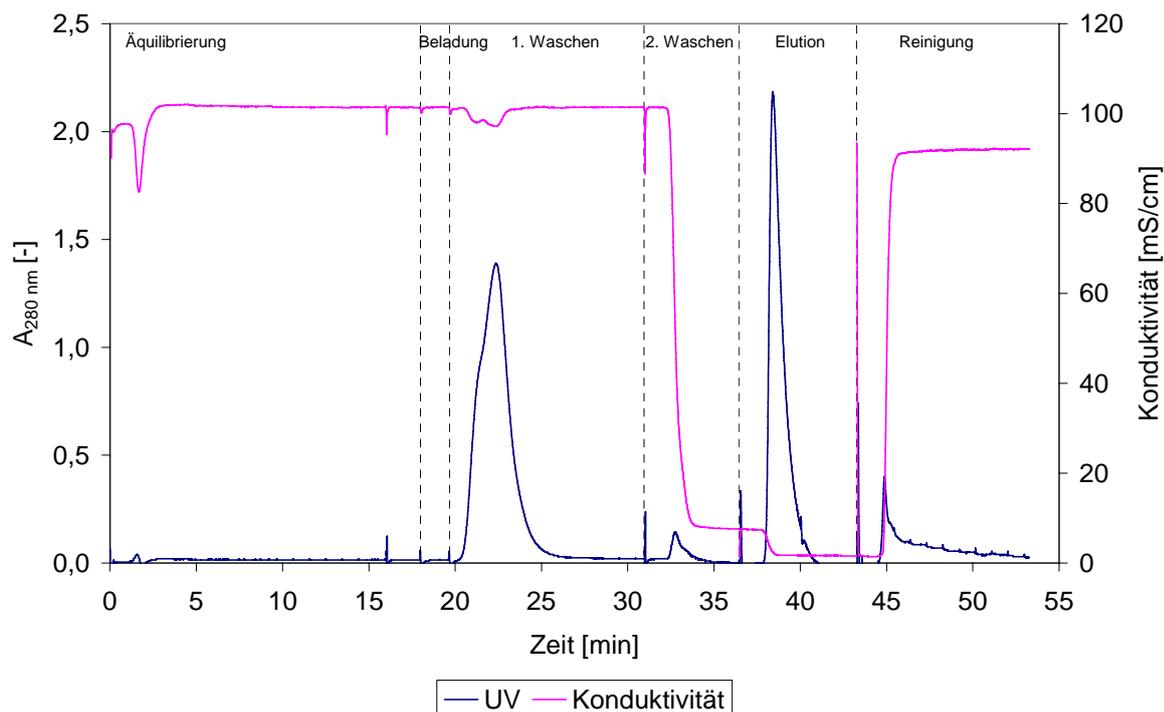


Abbildung 66: Chromatogramm der Reinigung I mit der Hydrophoben Interaktionschromatographie.

Die Ausgangsprobe entstammte der Primäraufreinigung mit der Kationenaustauschchromatographie. Das Eluat wurde sofort im Reinigungsschritt II (Anionenaustauschchromatographie) weiter prozessiert. Beim Probenauftrag wurde das rhGH quantitativ gebunden – die Peaks während des Probenauftrags und des Waschens enthielten kein rhGH. Die oben diskutierte Erhöhung der Leitfähigkeit während des Waschschriffs II zur Vermeidung einer vorzeitigen Elution bei Beladung mit großen Produktmengen wurde in dem dargestellten Experiment noch nicht durchgeführt. Der Elutionspeak wies ein leichtes *Tailing* auf, was auf eine nicht-optimale Packung des Betts hindeutet (Abbildung 66). Die dynamische Kapazität betrug unter diesen Bedingungen mindestens 0,85 mg rhGH/ mL Gelmaterial, wurde aber nicht bestimmt. Die Desorption während der Elution erfolgte während drei Chromatographien mit einer mittleren Ausbeute von 81,7 % nicht-quantitativ. Durch eine sekundäre Elution mit einem 40 % Isopropanol enthaltenden Elutionspuffer konnte die Ausbeute auf einen Durchschnittswert von 90,2 % verbessert werden (Daten nicht gezeigt).

Diskussion: Reinigung I mit Hydrophober Interaktionschromatographie

Die Primäraufreinigung mit dem Kationenaustauscher lieferte ein Eluat von gut 200 mL Volumen, das in einem zweiten Schritt weiter aufgereinigt werden musste. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie ist eine zur Ionenaustauschchromatographie diametrale Aufreini-

gungsmethode und war aus aufreinigungsstrategischen Erwägungen nach der Primäraufreinigung anzusiedeln. In der HIC mussten 0,8 M Ammoniumsulfat und 20 % Isopropanol eingesetzt werden, die als prozessverursachte Verunreinigungen im *Final Bulk* abgereinigt sein mussten (Chmiel, 2006). Durch die folgenden zwei Chromatographieschritte (AIEX und SEC) konnte eine Abreicherung dieser kritischen Verunreinigungen gewährleistet werden.

Phenyl Sepharose 6 FF war aufgrund der hohen möglichen Flussraten von bis zu 300 cm/h zur Verarbeitung der relativ großen Volumina aus der Primäraufreinigung geeignet. Die Produktbindung konnte und musste bei niedrigen Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0,8 M erfolgen, da es sonst zu einem Ausfällen von Produkt und Schwierigkeiten mit der Filtration vor dem Probenauftrag kam. Der Probenauftragspeak enthielt kein rhGH, aber Wirtszellprotein (Kapitel 3.3.7, Tabelle 20); die Adsorption war also quantitativ.

Die Elution mit 20 % Isopropanol lieferte im Mittel von drei Chromatographien eine Ausbeute von 81,7 %. Durch einen 40 % Isopropanol enthaltenden Puffer konnte sie auf einen Durchschnittswert von 90,2 % verbessert werden. Da für den folgenden, bei niedrigen Flussraten betriebenen Aufreinigungsschritt die Isopropanolkonzentration auf 10 % verdünnt werden musste, wäre dies unpraktikabel. Außerdem gab es Anzeichen, dass durch Zugabe von 40 %igem Isopropanol eine Dimerbildung des rhGH gefördert wird (Daten nicht gezeigt). Zumindest führt 30 %iges 1-Propanol zu reversiblen Veränderungen in der Tertiärstruktur von rhGH, dem so genannten „*molten globule state*“ (Wicar *et al.*, 1994). Daher ist nicht auszuschließen, dass auch 40 %iges Isopropanol zu strukturellen Veränderungen führen könnte. Daher wurden die Ausbeuteverluste hingenommen und 20 % Isopropanol verwendet. Vorteilhaft war am Einsatz von Isopropanol neben der verbesserten Produktdesorption, dass es ab einer Konzentration von 10 % als robuster chemischer Schritt zur Virusinaktivierung gilt (Chmiel, 2006).

3.3.5 Reinigung II: Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde nach der Kationenaustauschchromatographie und der Hydrophoben Interaktionschromatographie als diametrale Methode an dritter Stelle der Aufreinigungssequenz eingesetzt. In diesem Schritt sollten die Verunreinigungen durch Reste von Ammoniumsulfat und Isopropanol aus der HIC entfernt werden. Außerdem musste die Aufreinigungssequenz einen selektiven Schritt zur Abreicherung des rhGH-Dimers enthalten. Hierfür sollte abschließend eine Größenausschlusschromatographie eingesetzt werden, bei der nur geringe Volumina appliziert werden können. Mit dem Anionenaustauscher sollte

das Produkt so stark aufkonzentriert werden, dass es für den letzten Chromatographieschritt eingesetzt werden konnte.

Zu diesem Zweck wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit 18 mL Q Sepharose™ High Performance eingesetzt. Der Ligand, quaternäres Ammonium, wies als starker Anionenaustauscher über ein großes pH-Intervall positive Nettoladungen auf. Das Gelmaterial wurde in eine XK16-Säule gepackt und die Versuche mit einem FPLC™-System bei einer konstanten linearen Flussrate von 149,2 cm/h durchgeführt. Da das Eluat der Hydrophoben Interaktionschromatographie in Äquilibrationpuffer der Anionenaustauschchromatographie aufgenommen wurde, konnten Leitfähigkeiten unter 3 mS/cm ohne eine weitere Verdünnung erreicht werden. Ein direkter Auftrag des unverdünnten Eluats der HIC mit einer Isopropanolkonzentration von 20 % hatte zu einer nicht quantitativen Bindung geführt (Ausbeute 51,0 %, Wiederfindung 80,7 %). Der pH-Wert wurde zum Probenauftrag auf 6,3 eingestellt, um eine negative Nettoladung des rhGH zu erreichen und gleichzeitig möglichst viel Wirtszellprotein nicht negativ zu laden. Die Äquilibration und das Waschen nach dem Probenauftrag erfolgte mit 0,025 M Bis-Tris (pK_s 6,46, pH 6,30, Leitfähigkeit 2,1 mS/cm), wobei das Produkt vollständig an den Ligand adsorbierte. Die Elution erfolgte durch eine erhöhte Salzkonzentration im Elutionspuffer bei pH 6,30 (0,025 M Bis-Tris, 0,3 M Natriumchlorid, Leitfähigkeit 30,4 mS/cm) quantitativ.

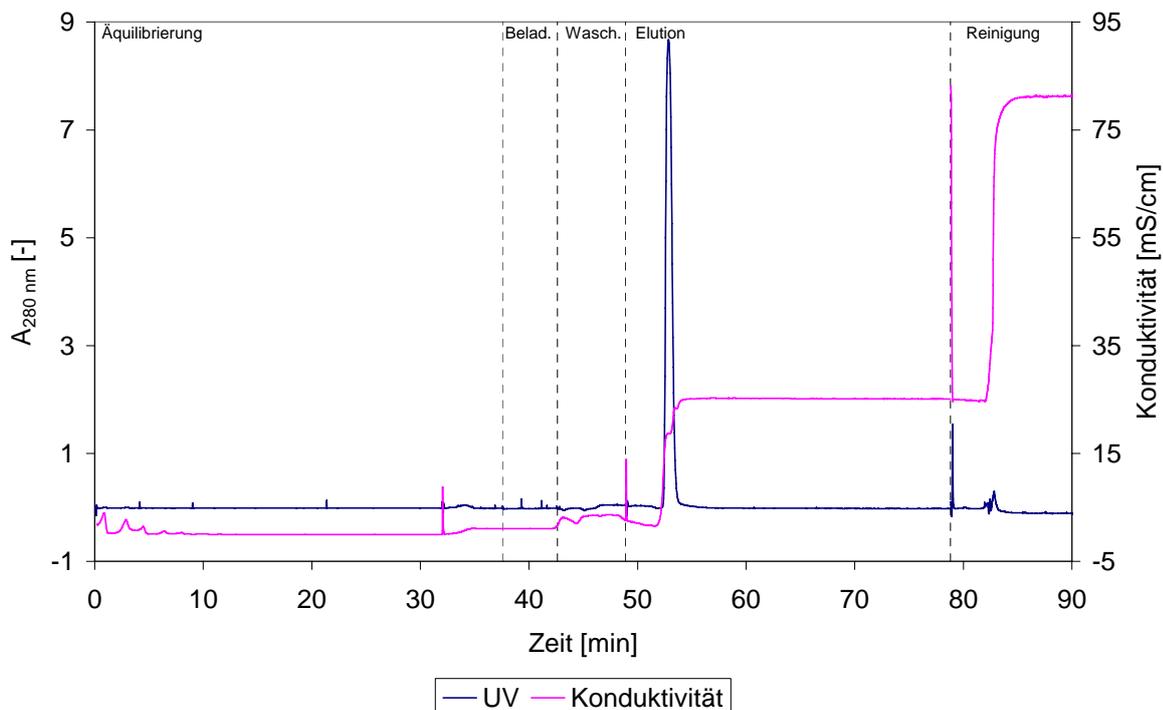


Abbildung 67: Chromatogramm der Reinigung II mit einer Anionenaustauschchromatographie.

Wie das Chromatogramm in Abbildung 67 zeigt, kam es während des Probenauftrags und des Waschens nicht zu einem deutlichen Anstieg der UV-Absorption bei 280 nm. Dies ging mit einer quantitativen Bindung des humanen Wachstumshormons einher. Der Elutionspeak war aufgrund der guten Packung des Gelbetts sehr symmetrisch und das Elutionsvolumen betrug mit durchschnittlich 6,4 mL nur ein Drittel eines Säulenvolumens. In einem der Experimente konnte die Konzentration von 283,8 mg/L in der Ausgangslösung auf 1497,9 mg/L im Eluat erhöht werden. Während der Reinigung mit 1 M Natriumhydroxid/ 20 % Isopropanol war kaum ein Anstieg der UV-Absorption zu erkennen. Die rhGH-Ausbeute betrug im Mittel von drei Chromatographien 98,4 % bei einer Wiederfindung von 99,2 %. Die spezifische Produktbeladung betrug mindestens 0,43 mg rhGH/mL Gelmaterial; es wurde jedoch kein Durchbruch festgestellt.

3.3.5.1.1 Anionenaustauscher als alternativer Reinigungsschritt I

Vor dem Etablieren der gezeigten Reinigungssequenz wurde anstatt der HIC eine Anionenaustauschchromatographie als Reinigungsschritt I untersucht und das gewonnene Produkt im Tierversuch und Nb2-Zellproliferationstest eingesetzt. Bis auf den Bindungs-pH-Wert und den Puffer (pH 8,00, 0,025 M Tris) entsprach die Methode der später eingesetzten.

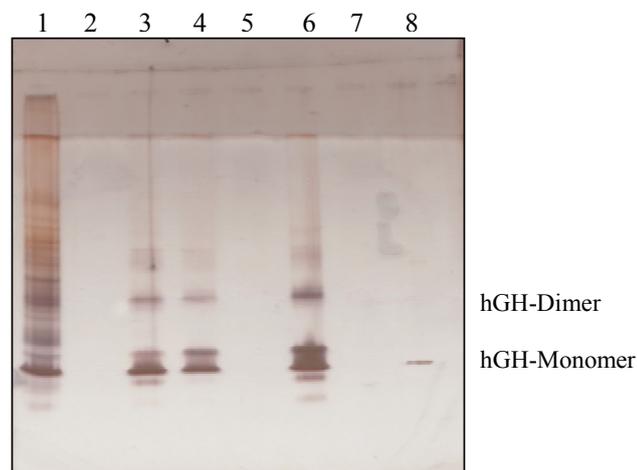


Abbildung 68: Proben aus der Primäraufreinigung und einer Anionenaustauschchromatographie. Silbergefärbtes PhastGel™ (8-25 % Polyacrylamid, nicht-reduzierend). Spur 1: CIEX, pH 4,00, Ausgangslösung, Spur 2: CIEX, pH 4,00, Durchlauf/Waschen, Spur 3: CIEX, Eluat 1, Spur 4: AIEX, pH 8,00, Ausgangslösung, Spur 5: AIEX Durchlauf/Waschen, Spur 6: AIEX Eluat 1, Spur 7: AIEX Eluat 2, Spur 8: rhGH-Standard.

Die Abbildung 68 zeigt ein SDS-Gel, in dem in den ersten drei Spuren die Ausgangslösung, die Durchlauf- / Waschlösung und das Eluat der bei pH 4,00 durchgeführten Fließbettchro-

matographie CIEX I aufgetragen sind. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass in Spur 2 kaum Proteine zu erkennen sind. In dem in Spur 3 aufgetragenen Eluat entsprach die dominante Bande der 22 kDa-Variante des rhGH, darunter lag die 20 kDa-Variante und etwas darüber ein aufgrund der nicht-reduzierenden Bedingungen des SDS-Gels entstandenes Konformer des rhGH. Noch weiter oberhalb ist das rhGH-Dimer zu erkennen.

Das Eluat aus dem Versuch CIEX I wurde entgegen der späteren Aufreinigungssequenz in einer Anionenaustauschchromatographie weiter prozessiert. In der Spur 4 ist die Ausgangslösung dieses Versuchs, das auf pH 8,00 eingestellte Eluat aus dem Versuch CIEX I, aufgetragen. Die Durchlauf-/ Waschfraktion in Spur 5 war wiederum nahezu proteinfrei, da bei pH 8,00 auch das Wirtszellprotein gebunden wurde. Die erste Elution erfolgte mit 0,3 M Natriumchlorid, wobei das Eluat 1 (Spur 6) im Vergleich zur Ausgangslösung um das Vierfache aufkonzentriert wurde. Im Eluat 1 der AIEX wurde die in Spur 3 nur schwach erkennbare Bande bei 14 kDa ebenfalls aufkonzentriert (vergleiche hierzu Abbildung 63). Sie enthält ein bei pH 4,00 entstehendes rhGH-Fragment. In einer zweiten Elution wurde 1,0 M Natriumchlorid eingesetzt, um die Elutionskraft zu verstärken. Dies erwies sich aber als nicht notwendig, da die Desorption aller gebundenen Proteine schon bei der ersten Elution quantitativ erfolgte.

Diskussion: Reinigung II mit Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde als diametrale Methode nach der Kationenaustauschchromatographie und der HIC an dritter Stelle der Aufreinigungssequenz eingesetzt. Dieser Aufreinigungsschritt hatte zwei Ziele: Erstens mussten die Verunreinigungen durch Reste von Ammoniumsulfat und durch Isopropanol aus der HIC entfernt werden. Zweitens sollte die Aufreinigungssequenz einen selektiven Schritt zur Dimeranreicherung enthalten, da zumindest in den Ernten der Perfusionsprozesses der durchschnittliche Monomeranteil nur bei 95,5 % lag. Zur Anreicherung der Dimere sollte abschließend eine Größenausschlusschromatographie eingesetzt werden, bei der nur geringe Volumina aufgetragen werden können.

Erste Versuche hatten gezeigt, dass die Isopropanolkonzentration des Eluats aus der HIC durch Verdünnung mit dem Äquilibrierungspuffer von 20 auf 10 % reduziert werden musste, da sonst die Adsorption des rhGH an den Liganden behindert wurde. Die eingesetzte Q Sepharose™ HP erlaubte danach eine quantitative Adsorption des Produkts. Da das Elutionsvolumen nur ein Drittel des Säulenvolumens betrug, konnte eine Aufkonzentrierung des Produkts erreicht werden. Auch die Ausbeuten dieses Schritts betrugen nahezu 100 %. Dass die

UV-Absorption weder beim Probenauftrag, noch bei der abschließenden Reinigung anstieg, war ein Indiz für die hohe Reinheit des Produkts zu diesem Zeitpunkt. Insgesamt gelang mit dem Anionenaustauscher eine Produktkonzentrierung und Abreicherung der Prozessverursachten Verunreinigungen.

In Kapitel 3.3.5.1.1 wurde die Anionenaustauschchromatographie bei pH 8,00 als erster Reinigungsschritt vorgestellt. Aufgrund des nicht-selektiven Bindungs-pH-Werts konnte eine Reinigungswirkung im SDS-PAGE nicht festgestellt werden, sondern lediglich eine starke Produktkonzentrierung. Um weniger Wirtszellprotein negativ zu laden, wurde der pH-Wert in der Folge auf 6,3 eingestellt. Es kann nur vermutet werden, dass dies vorteilhaft war, da in der Folge nur noch Eluate aus der HIC in der AIEX weiterverarbeitet wurden und diese in SDS-Gelen eine zu hohe Reinheit hatten.

3.3.6 Reinigung III: Größenausschlusschromatographie

Die Reinigung II hatte unter anderem eine Produktkonzentrierung bewirkt, die für den letzten Chromatographieschritt, die Größenausschlusschromatographie, aufgrund ihrer geringen relativen Beladungsvolumina vorteilhaft war. Es wurde eine Superdex™ 75 prep grade 10/300-Säule mit einem Volumen von 22 mL an einem Äkta™ Purifier mit Flussraten zwischen 38 und 76 cm/h eingesetzt. Laut Hersteller lag der Trennbereich des Materials zwischen 3 und 70 kDa bei einem Partikeldurchmesser von 34 µm. Das zulässige Beladungsvolumen betrug 0,5 bis 4 % des Säulenvolumens und war damit nur für eine semipräparative Untersuchung dieses Schritts zur Abreicherung von rhGH-Dimeren geeignet. Für die Größenausschlusschromatographie, deren Trennprinzip im Gegensatz zu den anderen Verfahren nicht auf spezifischer Adsorption und Desorption, sondern auf einem differentiellen Verweilzeitverhalten des Proteingemisches beruht, ist eine hohe Packungsgüte essentiell. Die Fertigsäule musste in Folge einer Verblockung neu gepackt werden. Anschließend wurde aufgrund von Materialverlust nur eine relativ geringe Bodenzahl von 6424 Böden bestimmt.

Als Puffer wurde 0,05 M Di-Natriumhydrogenphosphat, pH 7,30, mit 0,1 M Natriumchlorid benutzt. Das Natriumchlorid diente der Minimierung einer unspezifischen Interaktion der Probe mit der Agarose/Dextran-Matrix.

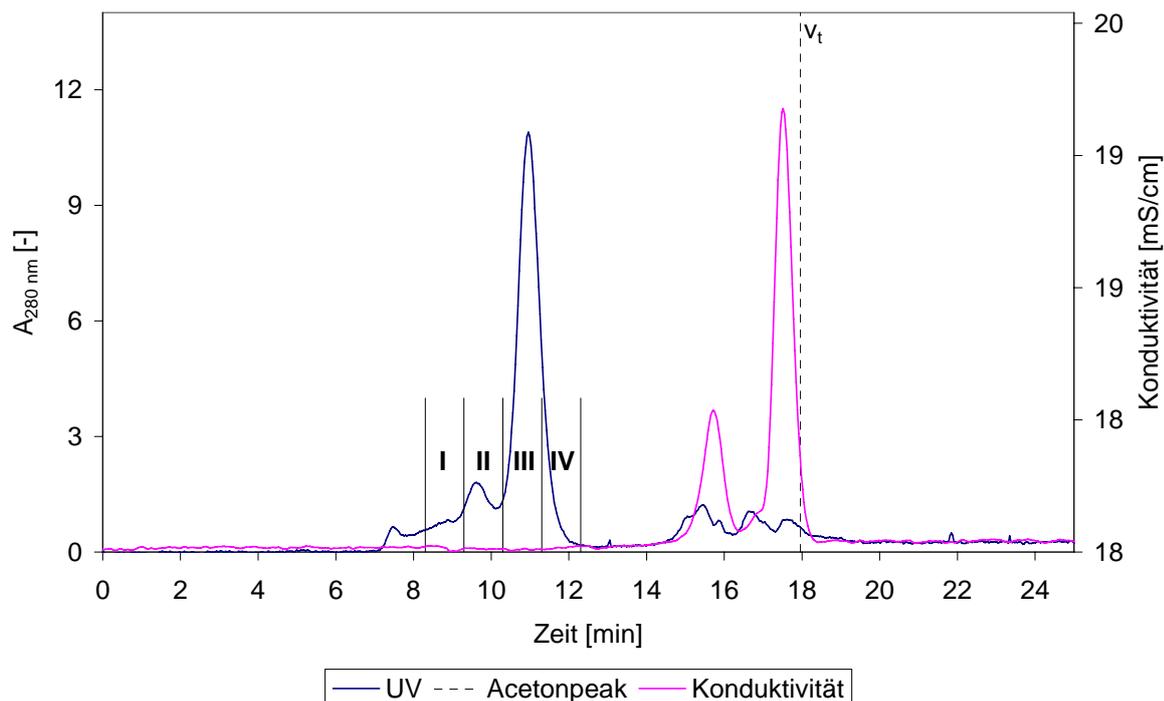


Abbildung 69: Chromatogramm der Reinigung III mittels semipräparativer Größenausschlusschromatographie. Die Elutionspeaks wurden in vier Fraktionen aufgefangen. Die Konduktivitätspeaks zwischen 15 und 19 Minuten entsprachen der Salzfraktion. Der vertikale Strich bei 17,96 Minuten indiziert die Retentionszeit von Aceton.

Die Abbildung 69 zeigt ein Chromatogramm der Reinigung III eines Eluats der Anionenaustauschchromatographie mit der semipräparativen Größenausschlusschromatographie. Die Proteine wurden in den vier eingezeichneten Fraktionen aufgefangen. Die rhGH-Oligomere eluierten nach 7,6 Minuten, die rhGH-Dimere nach 9,7 Minuten und die rhGH-Monomere nach 10,8 Minuten (Fraktion III, Monomerenanteil gemäß der analytischen SEC 99,97 %). In den Fraktionen I und IV waren die Produktkonzentrationen zu gering für die Analytik in der analytischen SEC. Der vertikale Strich bei 17,96 Minuten indiziert die in einem separaten Versuch bestimmte Retentionszeit von Aceton. Daher entsprachen die Konduktivitätspeaks zwischen 15 und 19 Minuten der Salzfraktion. Die Trennleistung der Säule war zu gering, um Monomere und Dimere vollständig zu separieren. Dennoch gelang es aus einer Ausgangslösung mit 98,74 % Monomeren die rhGH-Dimere so weit abzureichern, dass nunmehr 99,97 % Monomer vorlagen. Das Auftragsvolumen betrug 200 μL und das Eluat wurde in vier 1000 μL -Fraktionen aufgefangen. Dabei betrug die Ausbeute in der antizipierten Hauptfraktion III nur 56,7 % bei einer Wiederfindung von 72,6 %, zu der besonders die Fraktion II beitrug. Diese Abweichungen resultierten aus den vergleichsweise hohen Fehlern beim Umgang mit den geringen Flüssigkeitsvolumina.

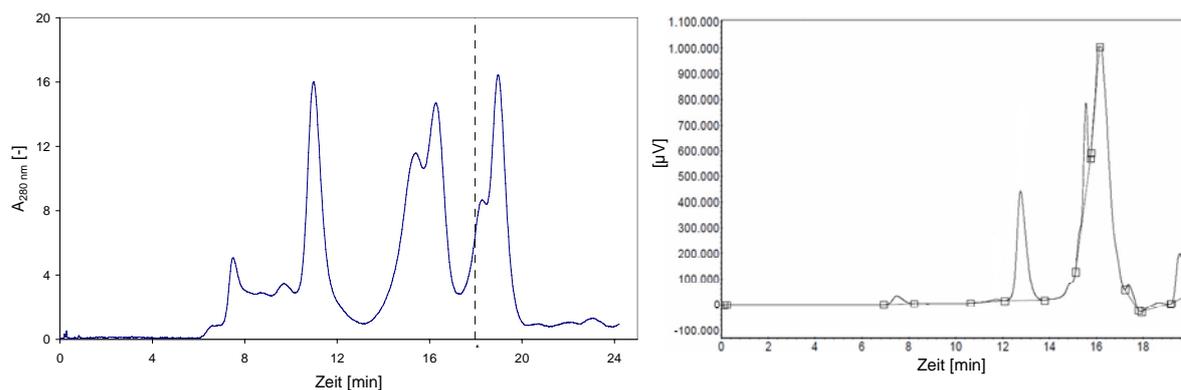


Abbildung 70: Chromatogramme der SEC. Im linken Teil der Abbildung ist ein Chromatogramm der semipräparativen SEC eines Perfundats gezeigt und im Chromatogramm wurde die Probe in der analytischen SEC aufgetragen. Die dominanten Peaks bei 11,7 beziehungsweise 12,77 Minuten entsprechen dem rhGH-Monomer.

Die beiden Chromatogramme in der Abbildung 70 zeigen die verschiedenen Selektivitäten der semipräparativen und der analytischen Größenausschlusschromatographie. Aus beiden Chromatogrammen wird ersichtlich, dass die Verunreinigungen durch rhGH-Dimere und -Oligomere bei dem Produkt aus dem Perfusionsprozess sehr gering waren.

Diskussion: Reinigung III mit der Größenausschlusschromatographie

Die Aufreinigungssequenz wurde durch eine Größenausschlusschromatographie zur Abreicherung von rhGH-Dimeren abgeschlossen. Gemäß der Pharmakopöe 5.3 (2006) muss der Monomeranteil mindestens 96,0 % betragen. Es gelang aus einer Ausgangslösung, die schon einen Monomerenanteil von 98,74 % aufwies, die rhGH-Dimere so weit abzureichern, dass nunmehr 99,97 % Monomer vorlagen. Damit sollte auch eine Ausgangslösung mit einem geringeren Monomeranteil auf Pharmakopöe-konforme Monomeranteile gebracht werden können. Die niedrige Ausbeute resultierte aus den geringen Arbeitsvolumina, die zu relativ großen Fehlern in der Bilanzierung führen, und der suboptimalen Säulenpackung.

Neben der Größenausschlusschromatographie stand mit der analytischen SEC ein automatisiertes und mit kleinen Probenvolumina arbeitendes System zur Abschätzung des Monomeranteils zur Verfügung. Allerdings war die Auflösung der analytischen SEC aufgrund des großen Trennbereichs von 5 bis 150 kDa im interessierenden Bereich nicht so hoch wie bei der präparativen Größenausschlusschromatographie. Daher konnte die Komplexität des Perfundats mit der semipräparativen Größenausschlusschromatographie besser aufgelöst werden.

3.3.7 Bilanzierung der Aufreinigungssequenz

In der bisherigen Darstellung der Ergebnisse wurde auf die Angabe der Werte aus der Produktqualitätsbestimmung und der Produktreinheitsbestimmung weitgehend verzichtet. In Tabelle 20 ist zunächst eine Bilanzierung der Aufreinigung bezüglich des Produkts und der Verunreinigungen durch dsDNA und HCP dargestellt.

Tabelle 20: Bilanzierung für das Produkt und die Verunreinigungen durch dsDNA und HCP über die Aufreinigungssequenz. Für die Größenausschlusschromatographie liegen keine Werte vor. *: Primäraufreinigung bei pH 5,60.

			Primäraufreinigung	Reinigung I	Reinigung II	Gesamt
rhGH	Ausbeute	[%]	62,9*	81,7	97,3	50,0
	Wiederfindung	[%]	93,6	90,2	99,2	83,8
HCP	Abreicherung	[%]	96,6	80,5	47,1	99,7
	Wiederfindung	[%]	9,9	25,0	52,9	
dsDNA	Abreicherung	[%]	83,1	97,5	83,0	99,6
	Wiederfindung	[%]	45,0	51,8	25,9	

Für die Primäraufreinigung wurde die bei pH 5,60 erreichte geringe mittlere rhGH-Ausbeute von 62,9 % angenommen. Die Primäraufreinigung bei pH 4,00 lieferte deutlich höhere Ausbeuten. Unter Annahme einer Ausbeute von 90,1 % in der Fließbettchromatographie hätte die Gesamtausbeute statt 62,9 % sogar 71,6 % betragen. Die Reinigungsschritte I und II erreichten mit 81,7 beziehungsweise 97,3 % sehr hohe Ausbeuten. Die Größenausschlusschromatographie hatte mit 56,7 % eine geringe Ausbeute, wurde aber weder in einem präparativen Maßstab, noch unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Daher ist die geringe Ausbeute dieses Aufreinigungsschritts zu relativieren und wurde in Tabelle 20 nicht aufgeführt.

Die HCP-Menge konnte in den drei Aufreinigungsschritten um 99,7 % reduziert werden. Dabei ist auffällig, dass die prozentuale HCP-Wiederfindung in der Primäraufreinigung mit 9,9 % sehr gering war. Dies korrelierte mit SDS-Gelen, in denen in der Durchlauf-/Waschfraktion kaum Protein zu sehen war. Offenbar war bei der CIEX die Desorption spezifisch und das HCP eluierte während der Reinigung. In geringerem Maße gilt dies auch für die Reinigung I mit der HIC, für die 25,0 % der HCP-Menge wieder gefunden wurden. Auch hier konnte die Reinigungsfraktion nicht im HCP-ELISA untersucht werden. Die Anionenaustauschchromatographie führte zu einer zusätzlichen Abreicherung des HCP um 47,1 %. Dies korreliert mit den keine Verunreinigungen mehr zeigenden SDS-Gelen und Chromatogrammen nach diesem Schritt. Die HCP-Verunreinigung war nach dieser Stufe nur noch gering und betrug 142,94 pg HCP/mg rhGH. Für typische Dosierungen (siehe Kapitel 2.3.8)

läge die Verunreinigung deutlich unter dem von der WHO geforderten Richtwert von 100 ppm (WHO, 1998).

Die dsDNA-Menge wurde um 99,6 % reduziert. Dabei unterlag die Konzentrationsbestimmung der dsDNA besonderen Schwierigkeiten. Bei sauren pH-Werten lieferte das zur Quantifizierung benutzte dsDNA-interkalierende Fluorochrom PicoGreen® zu niedrige Werte. Auch nach Anheben des pH-Werts wurde die Ausgangskonzentration nicht mehr erreicht. Es konnte in Vorversuchen ein Korrekturfaktor berechnet werden, der zu plausiblen Messwerten führte (Kapitel 2.3.9). Analog mussten für die verschiedenen Chromatographiepuffer Korrekturfaktoren berechnet werden, die ebenfalls im Methodenteil angegeben sind. Demgemäß betrug nach der Reinigung II die Verunreinigung durch dsDNA 27,4 pg/mg rhGH und genügte den regulatorischen Ansprüchen.

Für die Eluate der explorativ genutzten semipräparativen Größenausschlusschromatographie wurden die dsDNA- und die HCP-Konzentrationen nicht bestimmt. Es ist davon auszugehen, dass dieser Chromatographieschritt eine weitere Produktaufreinigung bewirkte. Ob im Rahmen der Primäraufreinigung infolge von Zelllyse die dsDNA- oder HCP-Konzentrationen zunahmen, wurde nicht untersucht.

Neben der Abreicherung von Verunreinigungen war die Produktqualität ein entscheidender Parameter. Routinemäßig wurde eine Analytik bezüglich des Monomeranteils und des Adesamidoanteils durchgeführt. Der Monomeranteil im *Final Bulk* muss gemäß der Pharmakopöe 5.3 (2006) größer als 96,0 % sein und das Adesamido-rhGH muss einen Anteil größer als 94,0 % aufweisen.

Tabelle 21: Mittlere relative Anteile des rhGH-Monomers und des Adesamido-rhGH während der Aufreinigungssequenz.

	rhGH-Monomere	Adesamido-rhGH
	[%]	[%]
Perfundat	95,6	96,1
Primäraufreinigung	96,7	95,7
Reinigung I	98,7	97,5
Reinigung II	96,8	95,6
Reinigung III	100,0	

Aus dem in Tabelle 21 gezeigten Verlauf der relativen Anteile des Dimers wird ersichtlich, dass die ersten beiden Aufreinigungsschritte selektiv die rhGH-Monomere anreicherten. Dies war auch erforderlich, da das Produkt im Perfundat der Perfusionsprozesse mit einem Mittelwert von 95,6 % Monomeranteil nicht Pharmakopöe-konform war. Durch die Größenausschlusschromatographie am Ende der Aufreinigungssequenz könnten auch hohe Dime-

ranteile abgereichert werden. Bezüglich der Desamidierung schien nur die Reinigung I mit der Hydrophoben Interaktionschromatographie einen positiven Effekt zu haben. Das Eluat aus der Anionenaustauschchromatographie hatte wieder den Adesamidoanteil des Perfundats erreicht.

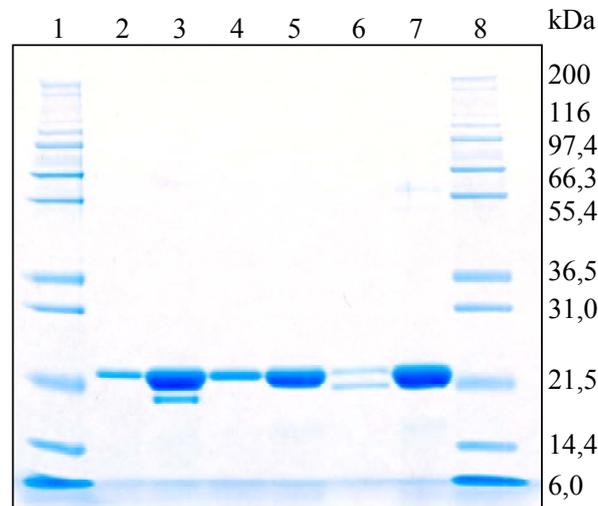


Abbildung 71: Eluate der vier Aufreinigungsschritte. SimplyBlue™-gefärbtes NuPAGE®-Gel (12 % Polyacrylamid, reduzierend). Spur 1: Molmassenstandard (Mark 12), Spur 2: rhGH-Standard, Spur 3: Versuch CIEX IV Eluat 1, Spur 4: HIC Eluat 1, Spur 5: AIEX Eluat 1, Spur 6: SEC Eluat 3, Spur 7: SEC Eluat 3, 30fach Konz., Spur 8: Mark 12.

Das SDS-Gel in Abbildung 71 zeigt die Eluate aus vier Chromatographien einer Aufreinigungssequenz. Im Eluat der Primäraufreinigung ist neben der dominanten Bande der 22 kDa-Variante die 20 kDa-Variante zu erkennen. Das Eluat der Reinigung I mit der HIC enthielt die 20 kDa-Variante nicht mehr. Die in Spur 6 auftretende Doppelbande enthielt gemäß einer massenspektrometrischen Analyse ebenfalls nur die 22 kDa-Variante (Daten nicht gezeigt). Warum das rhGH in dieser Spur eine Doppelbande ausbildete, ist nicht bekannt.

Im 30fach aufkonzentrierten Eluat der semipräparativen SEC konnte massenspektrometrisch neben dem in allen Banden auftretenden Aminoterminus auch der Carboxyterminus der 22 kDa-Variante nachgewiesen werden. Im untersuchten Masse-/ Ladungsbereich konnte nur ein c-terminales Fragment detektiert werden, das einen unvollständigen tryptischen Verdau erfahren hatte. In den anderen Vorbereitungen für die Massenspektrometrie war der tryptische Verdau vollständiger (vergleiche Kapitel 3.4.1).

3.3.8 Zusammenfassende Diskussion der Aufarbeitung

Neben der Entwicklung und Optimierung eines Perfusionsprozesses mit einem Plattensedimentier zur Zellrückhaltung unter Regelung der Zellentnahme durch einen Oxystat war der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit die Aufreinigung des hergestellten humanen Wachstums-

hormons. Zu dessen Aufreinigung aus dem zellhaltigen Perfundat wurde eine Strategie entwickelt, die vier zueinander diametrale Chromatographietypen umfasste.

Auf eine Zellseparation durch eine Filtration zur Klärung des Perfundats wurde verzichtet, obwohl die Zelldichten gering waren. Der Grund war, dass ein neues salztolerantes Kationenaustauschermaterial für das Fließbett eine Reduktion der Verfahrensschritte erlaubte. Der zur Primäraufreinigung in der Fließbettchromatographie eingesetzte multimodale Ligand konnte in der Hydrophoben Interaktionschromatographie und der Kationenaustauschchromatographie eingesetzt werden. Dabei zeigte sich in den Vorversuchen im Festbett, dass die Benutzung als salztoleranter Kationenaustauscher praktische Vorteile hatte, da die Probenvorbereitung nur aus dem Einstellen des zur Bindung erforderlichen pH-Werts bestand (Kapitel 3.3.3.1). Allerdings stellte sich heraus, dass die Versuche im Festbett nur eingeschränkt auf das Fließbett übertragbar waren. Eine miniaturisierte Fließbettsäule wäre für Vorversuche geeigneter gewesen. Der zunächst zur Bindung eingesetzte pH-Wert unterhalb des pI erwies sich erst in einer späteren Phase der Arbeit als schädlich für das Produkt. Die zunächst als Verunreinigungen durch kleinere Proteine interpretierten Banden konnten massenspektrometrisch als aminoterminale rhGH-Fragmente identifiziert werden. Die Ursache der Fragmentierung könnte in einer Auffaltung der hydrophoben Kernstruktur des Proteins durch die Phenylreste des HST-Liganden in Kombination mit dem geringen pH-Wert von 4,00 bei der Bindung liegen (Wicar *et al.*, 1994). Der schädigende Effekt des niedrigen pH-Werts hätte möglicherweise auch durch Variation des Äquilibrierungspuffers oder eine Temperaturniedrigung verringert werden können.

In der Folge wurde die Primäraufreinigung bei einem pH-Wert oberhalb des pI durchgeführt (Kapitel 3.3.3.2.2). Dadurch konnte eine Produktschädigung vermieden werden, wenngleich die Ausbeuten aufgrund nicht-quantitativer Adsorption von 90 % auf 50 bis 70 % sanken. Die großen Standardabweichungen der Ausbeuten bei pH 5,60 resultierten aus einer geringen Reproduzierbarkeit beim Beladen und könnten optimiert werden. Es gelang in der Primäraufreinigung, die Partikelanzahl stark zu reduzieren (Kapitel 3.3.3.6) und auch die Aminosäurekonzentration wurde in den Bereich der Nachweisgrenze gebracht (Daten nicht gezeigt). Das HST-Material zeigte in den Versuchen keine Veränderung der Bettfluidisierung oder Produktbindekapazität, so dass es hohe Zykluszahlen erreichen dürfte. Für einen ökonomischen Prozess müsste die Primäraufreinigung optimiert werden, da die dynamische Kapazität des HST-Materials bei pH 5,60 gering ist. Außerdem bietet sich alternativ zu der in dieser Arbeit untersuchten Fließbettchromatographie aufgrund der geringen Partikelkonzentration im Perfundat eine filtrative Zellseparation mit anschließender Festbettchromatographie an.

Als zweiter Aufreinigungsschritt erwies sich die Hydrophobe Interaktionschromatographie gegenüber der Anionenaustauschchromatographie in Bezug auf die Abreicherung von HCP als überlegen. Zudem wurden in der HIC prozessbedingt die Verunreinigungen Ammoniumsulfat und Isopropanol eingetragen, welche nachfolgend abgereichert werden mussten. Daher wurde die HIC als Reinigungsschritt I eingesetzt. Dabei musste bei hoher Beladung zur Vermeidung einer partiellen Elution des rhGH ein sekundärer Waschschrift mit leicht erhöhter Leitfähigkeit durchgeführt werden. Nach dem Weglassen des virusinaktivierenden, aber produktschädigenden pH-Werts von 4,00 in der Primäraufreinigung verblieb die Isopropanolzugabe als robuster Schritt zur Inaktivierung umhüllter Viren. Die Adsorption des rhGH erfolgte bei 0,8 M Ammoniumsulfat quantitativ. Bei der Elution mussten Verluste hingenommen werden, da die Desorption erst bei 40 % Isopropanol vollständig erfolgte, hierbei aber Produktschädigungen auftreten konnten. Eine Verbesserung der HIC könnte analog zu Shukla *et al.* (2002) durchgeführt werden, die rhGH mit Phenyl Sepharose™ FF aufreinigten. Sie konnten die Abreicherung von Verunreinigungen durch einen zusätzlichen Waschschrift mit chaotropen Additiven wie Harnstoff, Glycerin und Natriumthiocyanat maximieren. Die 20 kDa-Variante des humanen Wachstumshormons wurde durch die Hydrophobe Interaktionschromatographie selektiv abgereichert. Eine hohe Selektivität zur Abtrennung verkürzter und verlängerter rhGH-Varianten konnte von Pavlu und Gellerfors 1993 für eine analytische HIC mit einem Phenyl-Liganden gezeigt werden. Im vorliegenden Fall könnte die Selektivität durch die Kombination aus einem Phenyl-Liganden, der zur Interaktion mit der hydrophoben Kernstruktur des Proteins neigt, und die durch Isopropanol möglicherweise ausgelösten reversiblen Änderungen der Tertiärstruktur entstehen (Wicar *et al.*, 1994).

Nach der HIC wurde die Anionenaustauschchromatographie als Reinigungsschritt II eingesetzt (Kapitel 3.3.5). Da Isopropanolkonzentrationen von über 20 % durch Störung der Adsorption zu einer verringerten Ausbeute führten, wurde das Eluat aus der HIC in dem Äquilibrierungspuffer der AIEX aufgenommen. Nach dem Einstellen des pH-Werts war dann keine Absenkung der Leitfähigkeit mehr notwendig. Die Ausbeute dieses Chromatographieschritts betrug nahezu 100 %. Außerdem konnte eine starke Produktkonzentrierung bewirkt werden. Aufgrund des geringen Reinigungseffekts sollte gegebenenfalls zu Lasten der hohen Ausbeute der Elutionspeak „geschnitten“ werden. Aus Gründen der Robustheit und Skalierbarkeit wurden in dieser Arbeit keine Chromatographiemethoden mit Gradienten entwickelt.

Die Abbildung 71 zeigt, dass die Reinheit schon nach der Primäraufreinigung so hoch war, dass sie nur nach einer starken Aufkonzentrierung visualisiert werden konnte (Kapitel 3.4.1,

Abbildung 72) oder Verfahren wie der HCP-ELISA zur Bestimmung der Reinheit eingesetzt werden mussten. Die Überprüfung der Reinigung erfolgte neben dem Einsatz von SDS-Gelen mit einem HCP-ELISA und dem Quant-iT-Test™. Die mit diesen analytischen Verfahren ermittelten Abreicherungsgrade (Kapitel 3.3.7) der entsprechenden Verunreinigungen sind eingeschränkt aussagekräftig. Eine genauere HCP-Detektion könnte über einen konfektionierten ELISA, sowie 2D-Western Blots erfolgen und die dsDNA-Bestimmung könnte alternativ über eine Hybridisierung durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Einschränkungen kann davon ausgegangen werden, dass beide Verunreinigungen auf einen für die klinische Applikation ausreichenden Wert reduziert werden konnten.

Der letzte Aufreinigungsschritt, die semipräparative Größenausschlusschromatographie, wurde zur Anhebung der Produktqualität durchgeführt. Letztere wurde durch eine SEC und eine RP-HPLC auf den Anteil an rhGH-Monomer beziehungsweise Adesamido-rhGH untersucht. Dabei zeigte sich, dass die relativen Anteile schon in der Ernte aus dem Perfusionprozess Pharmakopöe-konform waren, wohingegen das Produkt in der Ernte aus Fed-Batch-Prozessen den regulatorischen Bestimmungen nicht genügte (Kapitel 3.3.7, Tabelle 13). Zumindest der Anteil an rhGH-Monomer konnte mit der semipräparativen SEC stark erhöht werden. Die geringe Ausbeute der semipräparativen SEC kann durch eine nicht optimale Packung der Säule und die überdimensionierte Chromatographieranlage relativiert werden und wurde nicht in die Gesamtbilanzierung einbezogen. Es sollte untersucht werden, ob dieser letzte Chromatographieschritt für eine robuste Aufreinigungssequenz tatsächlich erforderlich ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es in der vorliegenden Arbeit gelang, in einer Chromatographiesequenz das humane Wachstumshormon gemäß den Anforderungen der Pharmakopöe aufzureinigen.

3.4 Spezielle Produktanalytik

Die Routineanalytik in dieser Arbeit umfasste je eine RP-HPLC zur Produktkonzentrationsbestimmung und zur Desamidoanalytik, eine analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung des Monomeranteils und SDS-Gele zur visuellen Abschätzung der Produktreinheit. In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse von Methoden dargestellt, die nicht routinemäßig eingesetzt wurden. Dazu gehörten die massenspektrometrische Analyse zur Identifikation verschiedener rhGH-Varianten, eine densitometrische Bestimmung der Anteile der rhGH-Varianten, sowie ein Nb2-Zellproliferationstest und ein Tierversuch, in dem die biologische Wirksamkeit des produzierten Wachstumshormons untersucht wurde.

3.4.1 Massenspektrometrie

Zur Reinheitsbestimmung wurde routinemäßig eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Dabei zeigte sich in vielen Gelen unterhalb der dominanten Bande bei 22 kDa eine weitere Bande, die der 20 kDa-Variante des rhGH entsprechen konnte (siehe Abbildung 72).

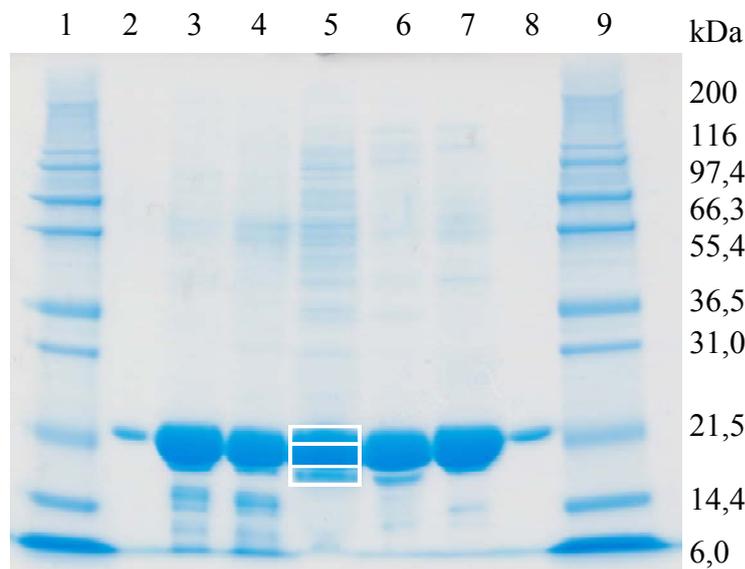


Abbildung 72: Eluate von Primäraufreinigungen. Coomassie-gefärbtes NuPAGE[®]-Gel (12% Polyacrylamid, reduzierend). Die Proben wurden auf 3 g rhGH/L eingestellt. Spur 1: Molmassenstandard (Mark 12), Spur 2: rhGH-Standard, Spur 3: CIEX, pH 4,00, Spur 4: Intermediäre Reinigung, AIEX, pH 8,00, Spur 5: HIC, 1,25 M Ammoniumsulfat, Spur 6: HIC, 1,8 M Natriumchlorid, Spur 7: CIEX, pH 5,60, Spur 8: rhGH-Standard, Spur 9: Mark 12. Die markierten Banden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch untersucht.

Zur Untersuchung der Frage, ob die Zellen durch differentielles Spleißen des Exon 3 die 20 kDa-Variante des rhGH produzieren, wurden aus dem in Abbildung 72 gezeigten SDS-Gel

verschiedene Banden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau einer Untersuchung mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer unterzogen.

In dem SDS-Gel wurden Eluate aus Primäraufreinigungen in der Fließbettchromatographie unter verschiedenen Bedingungen, sowie einer sekundären Chromatographie aufgetragen. In Spur 2 und 8 ist jeweils nur eine Bande zu sehen, da der rhGH-Standard ausschließlich die 22 kDa-Variante des Wachstumshormons enthält. In Spur 3 wurde ein Eluat aus der Fließbettchromatographie bei pH 4,00 aufgetragen. Dieses wurde in einem Anionenaustauscher bei pH 8,00 weiter aufgereinigt (Spur 4), wobei kein weiterer Reinigungserfolg erzielt wurde. In den Spuren 5 und 6 wurden Eluate aus einer HIC mit Ammoniumsulfat beziehungsweise Natriumchlorid aufgetragen. Darin waren die Banden der hypothetischen 20 kDa-Variante besonders gut abgesetzt, wenngleich sie in allen Eluaten vorhanden waren. In Spur 7 wurde ein Eluat aus einer Kationenaustauschchromatographie bei pH 5,60 aufgetragen.

Zur Untersuchung der Frage, ob die Zellen tatsächlich die 20 kDa-Variante des rhGH produzierten, wurden aus dem in Abbildung 72 gezeigten SDS-Gel zwei Banden ausgeschnitten. Dabei wurde die 22-kDa-Bande in zwei Abschnitte aufgeteilt, um die Heterogenität der Verunreinigung untersuchen zu können. Nach einem tryptischen Verdau der Proteine wurde die Analytik in einem MALDI-TOF-MS bei 25 kV im Positivmodus durchgeführt (Kapitel 2.3.10). Die aus den Massen-/ Ladungsspektren ermittelten Fragmente wurden einer Datenbankabfrage unterzogen.

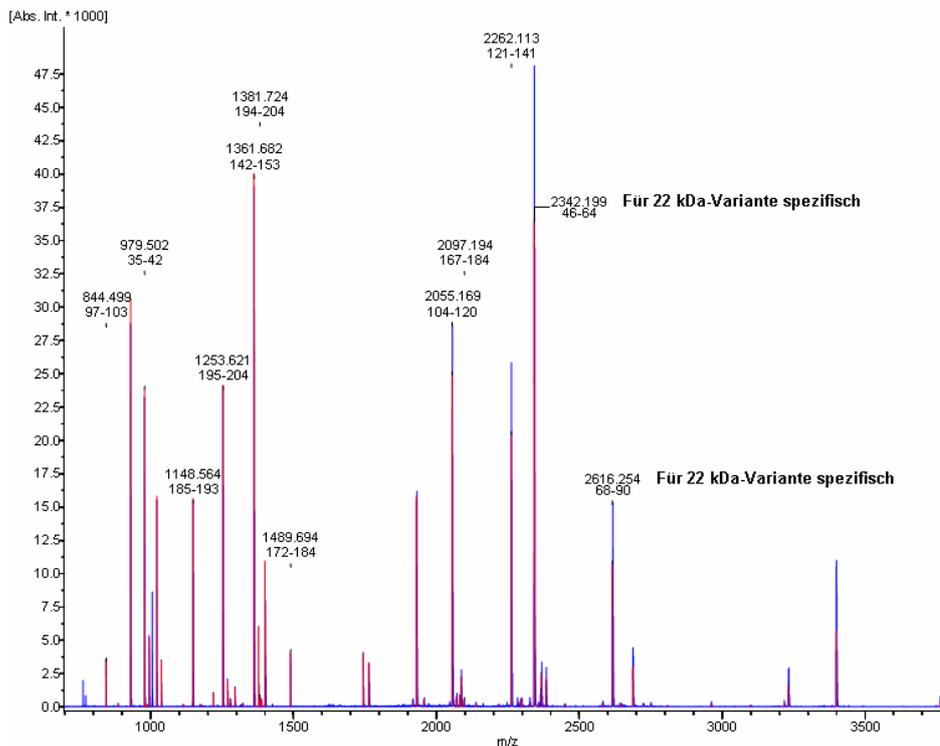


Abbildung 73: Massenspektrum des unteren Ausschnitts der 22 kDa-Bande. Die Angaben zu den Aminosäurepositionen gelten für das 217 Aminosäuren große Präprotein, von dem N-terminal das 26 Aminosäuren große Signalpeptid abgespalten wird.

Es wurden Masse-/ Ladungsspektren im Bereich von 800 bis 3800 m/z aufgenommen. Die Abbildung 73 zeigt ein Spektrum des unteren Ausschnitts der 22 kDa-Bande des in Abbildung 72 gezeigten SDS-Gels. Bei einem quantitativem tryptischen Verdau der 22 kDa-Variante sind im untersuchten m/z-Bereich zehn Fragmente zu erwarten, die auch alle vorhanden waren. Zusätzlich können bei unvollständigem tryptischen Verdau Fragmente entstehen. So kann eine ausgelassene Spaltstelle in bis zu 19 zusätzlichen Fragmenten resultieren. Hiervon konnten in obigem Spektrum zehn identifiziert werden. Auf diese Weise ließen sich alle Fragmente mit einer hohen Signalstärke dem humanen Wachstumshormon zuordnen. Die Fragmente mit 2342,199 und 2616,254 m/z treten nur bei einem tryptischen Verdau der 22 kDa-Variante auf. Das für die 20 kDa-Variante spezifische Fragment bei 3470,685 m/z fehlte hier. Auf eine Darstellung des Spektrums des oberen Ausschnitts der Gelbande der 22 kDa-Variante wurde verzichtet, da es ebenfalls dieser zugeordnet werden konnte und keine Verunreinigungen festgestellt wurden.

Im Massenspektrum der hypothetischen 20 kDa-Bande fehlten im Vergleich zum Massenspektrum der 22 kDa-Bande zwei Fragmente mit m/z-Verhältnissen von 2342,199 und 2616,254 (Abbildung 74). Das im untersuchten m/z-Bereich von 800 bis 3800 kDa für die

20 kDa-Variante zusätzlich zu erwartende Fragment bei 3470,685 m/z war im Spektrum vorhanden.

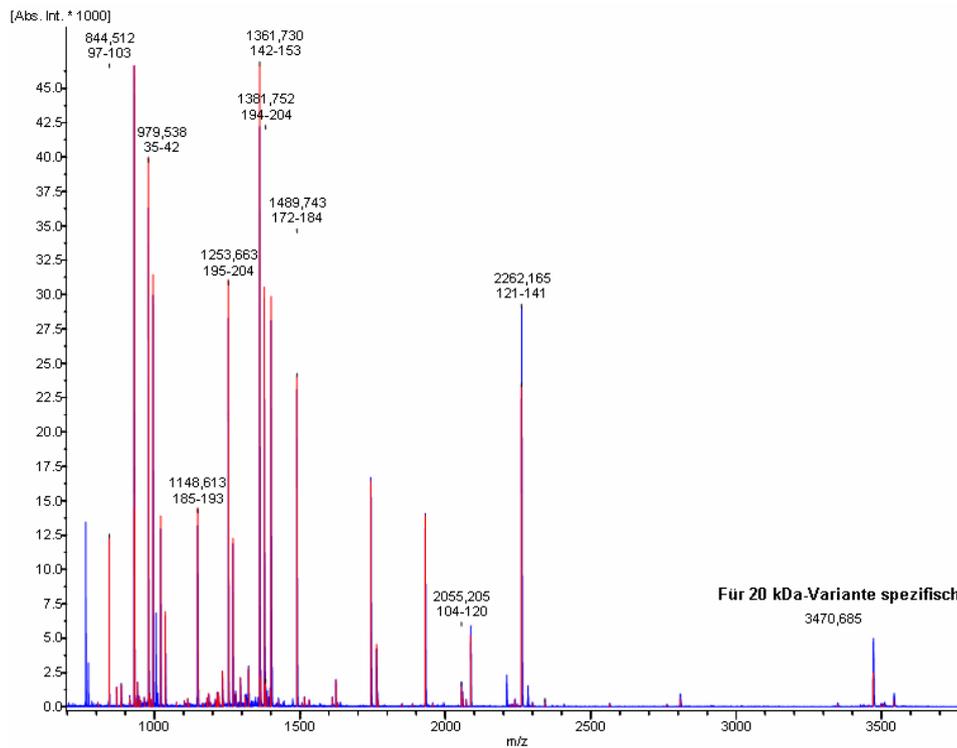


Abbildung 74: Massenspektrum der 20 kDa-Bande. Die Angaben zu den Aminosäurepositionen gelten für das 217 Aminosäuren große Präprotein, von dem N-terminal das 26 Aminosäuren große Signalpeptid abgespalten wird.

Weiterhin warfen nicht-reduzierende SDS-Gele (zum Beispiel das in Abbildung 63, Kapitel 3.3.3.4) die Frage auf, ob die hypothetischen Dimer-Banden tatsächlich einem rhGH-Dimer entsprachen und ob es sich um Homo- oder Heterodimere einer der beiden rhGH-Spezies handelte. Wiederum wurde aus einem SDS-Gel (nicht gezeigt) eine entsprechende Bande ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine tryptisch verdaut. Die Abbildung 75 zeigt das entsprechende Massenspektrum, in dem nur für die 22 kDa-Variante spezifische Fragmente auftraten, jedoch keine für die 20 kDa-Variante spezifischen.

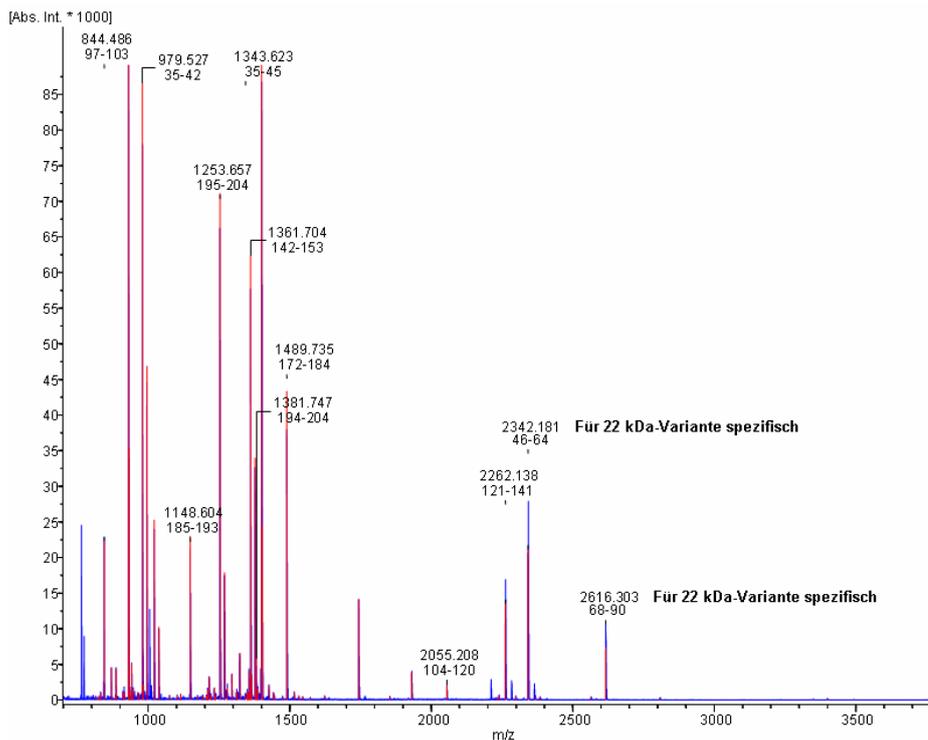


Abbildung 75: Massenspektrum einer Dimer-Bande. Die Angaben zu den Aminosäurepositionen gelten für das 217 Aminosäuren große Präprotein, von dem N-terminal das 26 Aminosäuren große Signalpeptid abgespalten wird.

Diskussion

Durch eine Analyse mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer konnte nach tryptischem Verdau des Proteins und anschließender Datenbankabfrage belegt werden, dass die verwendete Zelllinie CHO^{SFS}-hGH sowohl die 22 kDa-Variante des humanen Wachstumshormons, als auch die durch alternatives Spleißen des Exon 3 entstehende 20 kDa-Variante exprimierte. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass alle dominanten Fragmente dem rhGH zugeordnet werden konnten. Daraus lässt sich die schon nach der Primäraufreinigung hohe Reinheit des Produkts ableiten. Die Massenspektren der Dimer-Bande zeigten nur Fragmente der 22-kDa-Variante und nicht das für die 20 kDa-Variante spezifische Fragment bei einem m/z von 3470,685. Daher handelte es sich vermutlich um Homodimere der 22 kDa-Variante, wenngleich nicht auszuschließen ist, dass zu einem geringen Teil auch die 20 kDa-Variante als Homo- oder Heterodimer vorlag.

In allen Massenspektren konnte ein N-terminales Fragment mit dem m/z-Wert 930,551 identifiziert werden. Das den Carboxyterminus enthaltende Fragment war mit einem m/z-Wert von 785,313 zu klein für den untersuchten Bereich. Ein bei nicht-quantitativem Verdau entstehendes Fragment mit einem m/z-Wert von 1384,835 wurde nur in einem Massenspektrum gefunden, bei dem in der Probenvorbereitung im Vergleich zu den anderen Präparationen der trypt-

tische Verdau unvollständig war (vergleiche Kapitel 3.3.7). Da somit alle möglichen Fragmente gefunden wurden, konnte ohne eine Totalmassenbestimmung gezeigt werden, dass das Peptid vollständig exprimiert wurde.

3.4.2 Bestimmung des Anteils der rhGH-Varianten

Das in Abbildung 72 gezeigte SDS-Gel wurde zur Bestimmung des Anteils der 20 kDa-Variante einer densitometrischen Auswertung mit der Software TotalLab unterzogen (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK). In der Abbildung 76 ist die Auswertung der Spur 5 gezeigt. Durch die Densitometrie und eine anschließende Flächenanalyse konnte die Reinheit mit einem Wert von 92,3 % berechnet werden. Der Anteil der 20 kDa-Variante am Gesamt-rhGH betrug 12 %. Die Auswertung der deutlicher abgesetzten 20 kDa-Bande in Spur 6 desselben SDS-Gels ergab einen Anteil von 9 % (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Überladung wurde für die 22 kDa-Variante eine Molmasse von 19,4 kDa bestimmt.

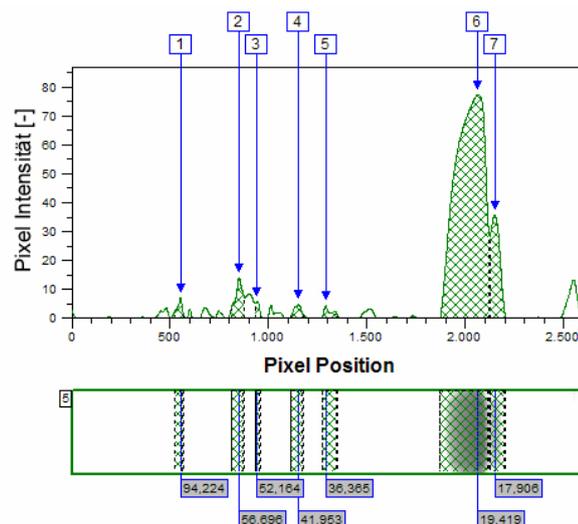


Abbildung 76: Densitometrische Auswertung der Spur 5 des in Abbildung 72 gezeigten Gels. Die 22 kDa-Variante ist als Bande Nr. 6 bezeichnet und die 20 kDa-Variante als Bande Nr. 7.

3.4.3 *In-vitro*-Aktivität: Nb2-Zellproliferationstest

Die bisher vorgestellten Analysemethoden charakterisieren das humane Wachstumshormon hinsichtlich bestimmter biochemischer Eigenschaften. Die wichtigste Eigenschaft eines therapeutischen Proteins ist jedoch seine biologische Wirksamkeit. Diese kann *in-vitro* im Zellkulturmodell oder in einem *in-vivo*-Tierversuch bestimmt werden. Aufgrund des hohen Aufwands wurden diese Methoden nicht als Routineverfahren zur Qualitätsbestimmung eingesetzt.

Beim Nb2-Zellproliferationstest wird der über den Prolactin-Rezeptor vermittelte promitotische Effekt des rhGH untersucht (Tanaka *et al.*, 1980). Als Indikator der metabolischen Aktivität fungierte die Reduktion von Resazurin in das fluoreszenzfähige Resofurin von cytoplasmatischen und mitochondrialen Enzymen (Pagé *et al.*, 1993).

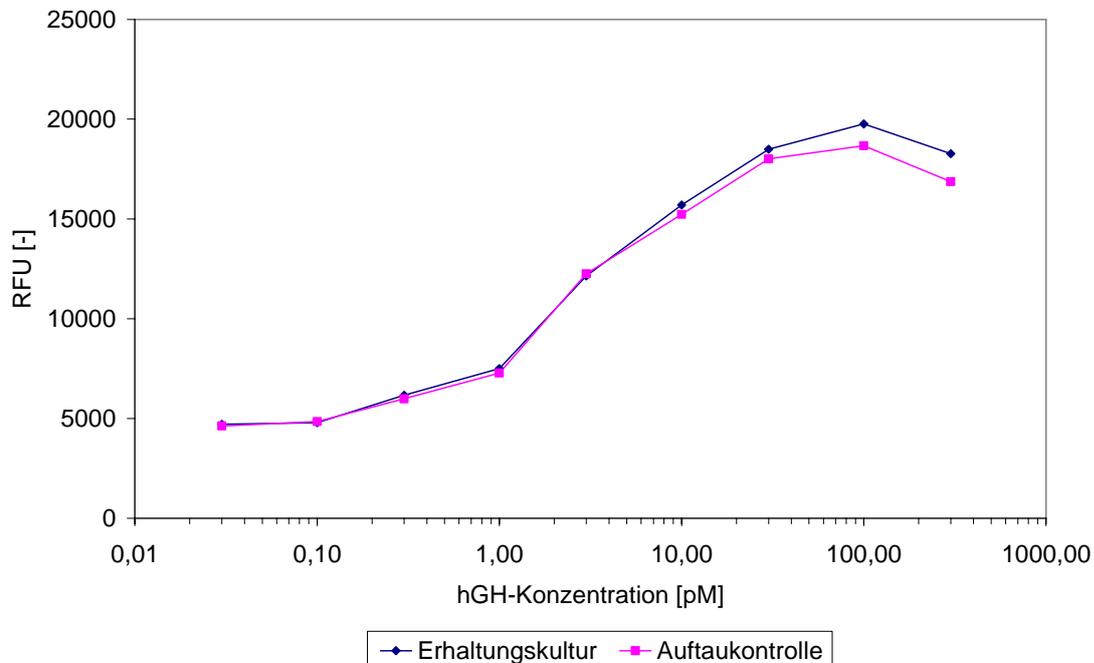


Abbildung 77: Nb2-Zellproliferationstest. Dargestellt ist die Fluoreszenz als Indikator für die Stoffwechsellaktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten rhGH-Konzentration.

Das Experiment wurde mit einer Erhaltungskultur der Nb2-Zelllinie und mit frisch aufgetauten Zellen durchgeführt. Für den Test wurden in Nb2-Kulturen rhGH-Konzentrationen von 0,03 pM bis 300 pM eingesetzt. Das im Versuch eingesetzte rhGH war in einer Hydrophoben Interaktionschromatographie und einer nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt worden (Kapitel 3.3.5.1.1). Die Negativkontrolle ohne Wachstumshormonzugabe zeigte relative Fluoreszenzen von 4066 für die Erhaltungskultur und von 4151 für die Auftaukontrolle. Die in Abbildung 77 gezeigten Kurven verliefen für die Erhaltungskultur und die Auftaukontrolle nahezu parallel. Beide Versuchsreihen zeigten außerdem eine Dosis-Wirkungsbeziehung in Form einer Maximumsfunktion. Bei der höchsten rhGH-Konzentration war die metabolische Aktivität reduziert.

Diskussion

Im *in-vitro*-Test konnte eine dosisabhängige Steigerung der metabolischen Aktivität der eingesetzten Nb2-Rattenlymphomzelllinie nachgewiesen werden. Die Kurve entsprach einer Maximumsfunktion und zeigte für die höchsten untersuchten rhGH-Konzentrationen von 300 pM eine Reduktion der metabolischen Aktivität. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer länger in Kultur befindlichen und einer frisch aufgetauten Zellkultur. Dies zeigt, dass die Nb2-Zelllinie ihre Abhängigkeit von mitogenen Substanzen nicht mit der Passagenzahl einbüßt.

3.4.4 *In-vivo*-Aktivität: Tierversuch

Beim Nb2-Zellproliferationstest wurde die Wirksamkeit des humanen Wachstumshormons über die Stimulation des Prolactin-Rezeptors verifiziert. Im Tiermodell sollte zusätzlich die biologische Wirksamkeit des rhGH untersucht werden. Hierfür wurde gereinigtes rhGH hypophysectomierten Ratten injiziert und die Gewichtszunahme im Vergleich zu nicht hypophysectomierten und unbehandelten Tieren ausgewertet. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 2.3.7 dargestellt. Nur jene Tiere wurden für den Versuch eingesetzt, die 21 Tage postoperativ eine Gewichtszunahme unter 7 g aufwiesen und zwischen 90 g und 105 g wogen. Alle in Abbildung 78 gezeigten Tiere erfüllten dieses Kriterium. Zur Kontrolle wurden sechs Tiere nicht operiert, um deren Gewichtszunahme beobachten zu können. Sie wurden im späteren Versuch nicht eingesetzt.

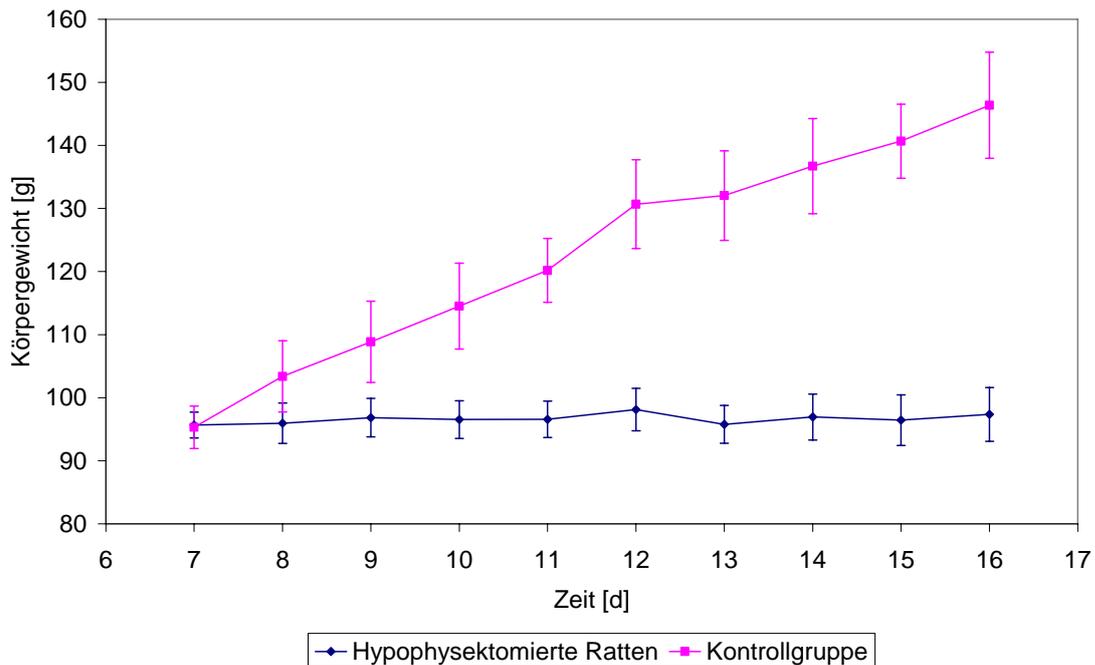


Abbildung 78: Mittleres Körpergewicht der 24 Ratten nach der Hypophysectomie und vor Behandlungsbeginn. Die Zeitangabe bezieht sich auf die Anzahl der Tage seit der Operation. Die sechs Ratten mit Körpergewichten über 130 g wurden nicht operiert und stellten eine Kontrollgruppe dar. Angegeben sind die jeweiligen Standardabweichungen.

In der ersten Behandlungsgruppe wurde den Tieren rhGH-Standard injiziert, in der zweiten und dritten Gruppe wurde in einem Perfusionsprozess hergestelltes und in zwei Chromatographieschritten (HIC, AIEX) gereinigtes rhGH in Konzentrationen von 0,1 mg rhGH/kg Körpergewicht beziehungsweise 0,03 mg rhGH/kg Körpergewicht eingesetzt. Die vierte Behandlungsgruppe diente der Negativkontrolle und erhielt Injektionen des Tris-Puffers ohne rhGH.

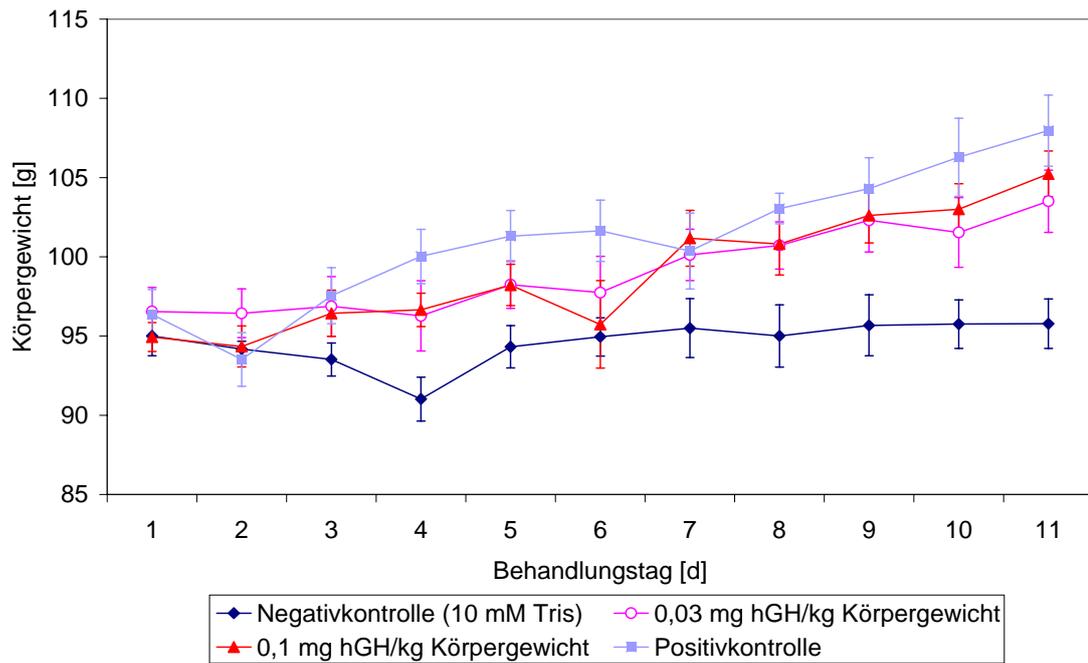


Abbildung 79: Durchschnittliche Körpergewichte von jeweils fünf oder sechs hypophysectomierten Ratten in Abhängigkeit von der rhGH-Dosis und der Behandlungsdauer.

Die Abbildung 79 zeigt den Verlauf der Körpergewichte der hypophysectomierten Ratten in Abhängigkeit von der rhGH-Dosis und der Behandlungsdauer. Dabei wurde jeweils fünf oder sechs Ratten Wachstumshormon oder Tris-Puffer injiziert. Das mittlere Gewicht der Ratten am ersten Versuchstag betrug 95,7 g. Die mit dem Tris-Puffer behandelten Ratten hatten nach Abschluss des Versuchs ihr mittleres Gewicht um lediglich 0,7 g auf 95,8 g erhöht. Dahingegen betrug das Endgewicht der mit rhGH-Standard behandelten Ratten 108,0 g. Es konnte eine Dosisabhängigkeit der Gewichtszunahme festgestellt werden: Bei einer injizierten Dosis von 0,1 mg rhGH/kg Körpergewicht betrug das Endgewicht 105,2 g und bei einer um zwei Drittel reduzierten Dosis nur 103,5 g.

Diskussion

In diesem Versuch konnte die biologische Wirksamkeit des aufgereinigten Produkts anhand der Gewichtszunahme hypophysectomierter Ratten ohne endogene rhGH-Produktion nachgewiesen werden. Die mit Tris-Puffer behandelten Ratten hatten nach Abschluss des Versuchs ihr mittleres Gewicht lediglich um 0,1 g auf 95,8 g erhöht. Dahingegen hatten die mit kommerziellem Somatotropin behandelten Ratten 12,4 g zugenommen und ein Endgewicht von 108,0 g erreicht. Die eingesetzten Proben mit Dosen von 0,03 und 0,1 mg rhGH/kg Körpergewicht bewirkten geringere Gewichtszunahmen, die in Abhängigkeit von der Dosis zwi-

schen 7,8 und 9,5 g betragen. Diese im Vergleich zum rhGH-Standard geringeren Werte waren vermutlich auf eine zu geringe biologisch aktive Produktmenge zurückzuführen. Ob die Ursache hierfür in einer fehlerhaften Produktkonzentrationsbestimmung, einem Verlust der Aktivität durch das Einfrieren oder einer ungenauen Verdünnung lag, konnte nicht festgestellt werden. Die Dosisabhängigkeit war außerdem ein Indiz dafür, dass das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Wachstumshormon biologisch aktiv war und keine Artefakte gemessen wurden. Bemerkenswert war die im Vergleich zu der Kontrollgruppe in Abbildung 78 geringe Gewichtszunahme. Diese resultierte aus der gegenseitigen Verstärkung der Wirkung der verschiedenen Hypophysenhormone (Mutschler, 2001), von denen nur das Wachstumshormon substituiert wurde. Bei zukünftigen Experimenten sollten Daten zum Vergleich der Gewichtszunahme der behandelten Tiere mit den nicht operierten Tieren gleichen Lebensalters ermittelt werden.

3.4.5 Zusammenfassende Diskussion der speziellen Analytik

Durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten aus SDS-Gelen ausgeschnittene Banden auf die Identität der in ihnen enthaltenen Proteine hin untersucht werden. Somit konnten die 20 kDa- und die 22 kDa-Variante, sowie ein Homodimer der 22 kDa-Variante des humanen Wachstumshormons identifiziert werden und eine weitere Produktidentifikation neben dem ELISA geleistet werden. Die gefundenen Fragmente deckten die Sequenz des rhGH vollständig ab. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Deletionsmutante des rhGH produziert wurde.

Zur Untersuchung der Frage, ob einzelne Aminosäuren in dem Peptid ausgetauscht sind, könnte weiterführend eine MS/MS durchgeführt werden. Für die in *E. coli* hergestellten Wirkstoffe von Genotropin[®] und Norditropin[®] konnte durch Elektrospray-LC-MS/MS festgestellt werden, dass bis zu drei Aminosäuren gegenüber der humanen Sequenz verändert waren. Außerdem konnte neben Desamidierungen an verschiedenen Positionen auch eine Methionin-Oxidation detektiert werden, so dass nur 84,4 % des Genotropins[®] einem unmodifizierten Produkt entsprachen (Hepner *et al.*, 2005, Hepner *et al.*, 2006).

In einigen SDS-Gelen wurden nach der Primäraufreinigung Banden sichtbar, die auf eine Fragmentierung des Produkts hinwiesen. Tatsächlich konnte massenspektrometrisch in den Banden Wachstumshormon detektiert werden, jedoch fehlten carboxyterminale Fragmente (siehe hierzu Abbildung 63). Dies zeigt, wie die Massenspektrometrie zur Interpretation von Versuchsergebnissen beitragen kann.

In der Pharmakopöe 5.3 (2006) ist ein *Peptide-Mapping* zur Identifikation des humanen

Wachstumshormons vorgeschrieben. Das Kriterium dieses Verfahrens ist die Ähnlichkeit der *Peptide-maps* des Standards und der Probe. Da der EDQM-Standard nur die 22-kDa-Variante des humanen Wachstumshormons enthielt und das in der vorliegenden Arbeit hergestellte Wachstumshormon ein physiologisches Mischungsverhältnis von ca. 90 % 22 kDa-Variante und 10 % der 20 kDa-Variante enthielt, konnte nicht erwartet werden, dass das Kriterium erfüllt werden kann. Durch die Massenspektrometrie stand zudem ein Verfahren zur Verfügung, bei dem über Datenbankabfragen sogar eine Peakzuordnung möglich war. Daher wurde auf die Darstellung der durchgeführten *Peptide-Mappings* verzichtet.

Die densitometrische Auswertung von SDS-Gelen in Kapitel 3.4.2 erlaubte eine Einschätzung des Anteils der 20 kDa-Variante am Gesamtwachstumshormon in Eluaten der Primäraufreinigung. Der ermittelte Anteil betrug 10,5 % und lag damit im Bereich der physiologisch auftretenden Werte von 5 bis 10 % (Crommelin und Sindelar, 2002).

Im *in-vitro*-Proliferationstest konnte eine dosisabhängige Steigerung der metabolischen Aktivität der Nb2-Rattenlymphomzellen durch das in der Zellkultur hergestellte Wachstumshormon ermittelt werden (Kapitel 3.4.3). Dies war auf die Bindung des Wachstumshormons an den Prolaktin-Rezeptor zurückzuführen.

Auch im Tierversuch mit hypophysektomierten Ratten konnte die biologische Wirksamkeit des rekombinanten Wachstumshormons in Form einer Gewichtszunahme der Tiere unter Hormonsubstitution bestätigt werden. Dabei war die Gewichtszunahme abhängig von der eingesetzten Wachstumshormonkonzentration (Kapitel 3.4.4).

4 Fazit und Ausblick

Das humane Wachstumshormon hat ein großes Anwendungsspektrum, wobei vor allem die aktuell hohen Kosten der Therapie seinen breiteren Einsatz und wirksamere, höhere Dosierungen verhindern. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines kostengünstigen Produktionsprozesses für rekombinantes humanes Wachstumshormon mit einer CHO-Zelllinie. Hierzu wurde neben einem Perfusionsprozess auch eine Produktaufreinigungssequenz entwickelt, sowie eine Produktanalytik etabliert. Die Ergebnisse sind in drei Teile gegliedert, die jeweils zusammenfassend diskutiert wurden. Im Fazit werden die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst.

Der Perfusionsprozess erreichte in einem Bioreaktor mit 2,1 L Kulturvolumen bei einer Lebendzell-dichte von $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/mL einen Produktausstoß von über 1000 mg rhGH pro Tag. Dies war möglich, weil durch eine gezielte Variation der Kulturbedingungen die zellspezifischen Verdünnungsraten auf ein Sechstel des Ausgangswerts reduziert werden konnten. Die Kultivierungstemperatur konnte nicht unter 33 °C eingestellt werden, da die spezifischen Produktbildungs- und Wachstumsraten darunter stark abnahmen (Kapitel 3.2.1). Zur Minimierung der Lactatbildung wurde der pH-Wert auf 6,95 reduziert; bei geringeren pH-Werten musste kontinuierlich Kohlendioxid zugegeben werden und das Regelungssystem wurde instabil (Kapitel 3.2.3). Durch die effizientere Mediumsnutzung wurden höhere Produktkonzentrationen bei geringeren Perfusionsraten ermöglicht. Auch die Produktqualität war bei eingeschalteter Perfusion stets hoch.

Der Plattensedimenter erlaubte eine selektive Abtrennung der kleineren, toten Zellen. Bei hohen Zelldichten wurden verstärkt Zellaggregate gebildet, die vom Plattensedimenter ebenfalls zurückgehalten wurden. Da die Lebendzell-dichte über den Sauerstoffverbrauch geregelt wurde, konnten die Produktkonzentrationen trotzdem relativ konstant gehalten werden. Die Aggregationsquote konnte zum Teil durch eine Erhöhung des Leistungseintrags gesenkt werden. Für einen Austrag von Zellaggregaten über die Oxystat-geregelte Zellentnahme musste die spezifische Wachstumsrate ausreichend hoch sein.

Die Anpassung der Zellen auf Veränderungen der Kulturbedingungen innerhalb eines Tages kann nicht durch selektive Mechanismen erklärt werden. Eine bemerkenswerte Ausnahme war die Anpassung an Scherstress im membranbegasteten System, wodurch erst nach einigen Tagen die typischen spezifischen Produktbildungsraten wieder erreicht wurden.

Im blasenbegasteten Perfusionsprozess konnten ebenfalls hohe Lebendzellichten erreicht werden. Eine Reduktion der spezifischen Verbrauchsdaten konnte aber nicht reproduziert werden. Zudem waren die spezifischen Produktbildungsdaten geringer (Kapitel 3.2.5, Abbildung 50). Die vergleichend durchgeföhrteten Fed-Batch-Prozesse waren aufgrund der geringeren Zellichten und der über die Prozessdauer absinkenden spezifischen Produktbildungsdaten deutlich ineffizienter als der Perfusionsprozess; die volumetrische Produktivität der Perfusionsprozesse war mindestens 12 mal so hoch.

Ein multimodaler Ligand wurde zur Primäraufreinigung des Perfundats im Fließbett benutzt. In der Hydrophoben Interaktionschromatographie eingesetzt erlaubte er eine produktschonende Aufreinigung. Dies war aufgrund der großen Ammoniumsulfatmengen und der komplexen Hydrodynamik im Fließbett aber unpraktikabel. Die Kationenaustauschchromatographie mit dem gleichen Material bei pH 4,00 zeigte ein hervorragendes Adsorptions- und Desorptionsverhalten und hohe dynamische Kapazitäten. Wie durch MALDI-TOF-MS gezeigt werden konnte, trat dabei aber eine Produktschädigung auf. Bei pH-Werten oberhalb des pI konnte natives Produkt mit Ausbeuten bis zu 70 % gewonnen werden. Das humane Wachstumshormon wurde nach der Primäraufreinigung in einer Sequenz von drei weiteren Chromatographieschritten aufgereinigt. Während der Reinigung I mit der Hydrophoben Interaktionschromatographie wurde die 20 kDa-Variante selektiv abgereichert und eine chemische Virusinaktivierung durchgeföhrt. In der folgenden Reinigung II, einer Anionenaustauschchromatographie, wurde das Produkt weiter aufgereinigt und konzentriert. Die Reinigung III mit der Größenausschlusschromatographie diente der Abreicherung von Dimeren und der Umpufferung des Produkts. In Bezug auf den Anteil nicht-desamidierten Produkts, den Dimeranteil, die dsDNA-Konzentration und die Menge an Wirtszellprotein genügte das Produkt den regulatorischen Bestimmungen schon nach der Reinigung II.

Die biologische Wirksamkeit des hergestellten Produkts wurde im Tierversuch mit Ratten und im *in-vitro*-Experiment mit Nb2-Zellen belegt. Zudem war der entwickelte Produktionsprozess hochproduktiv und kostengünstig (persönliche Kommunikation, Dr. D. Lütkemeyer, BiBiTec GmbH). Aufgrund der im Fed-Batch-Prozess früh absinkenden spezifischen Produktbildungsdaten ist bei Nutzung der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie ein Perfusionsprozess zur Produktion von klinischem Material vorzuziehen. Die Zelllinie wurde negativ auf die Kontamination mit Viren und Mycoplasmen getestet. Sie hatte eine hohe spezifische Produktbildungsrate, die im Perfusionsprozess ohne Selektionsdruck langzeitstabil war. Da die Herstellung der CHO^{SFS}-hGH-Zelllinie GMP-gerecht erfolgte, könnte sie zur Produktion von klinischem Material eingesetzt werden.

Der Oxystat erwies sich als robustes System zur Regelung der Lebendzellichte im Perfusionsprozess. Um den Ausfall des Oxystats bei Kultivierungen mit niedrigen pH-Werten zu vermeiden, sollte ein Medium mit angepasster Natriumcarbonatkonzentration verwendet oder ein separater Kohlendioxidgrundstrom angelegt werden. Zur weiterführenden Untersuchung blasenbegaster Prozesse im 2 L-Bioreaktor sollte die Begasungsstrategie geändert werden. Dazu könnte anstelle eines konstanten ein bedarfsgesteuerter Gasvolumenstrom eingesetzt werden. Um die Zellaggregation zu reduzieren, könnte die Calciumkonzentration im Medium reduziert werden; aufwändiger wäre eine zusätzliche Abtrennung von Zellaggregaten in einem Hydrozyklon.

Alternativ zur Fließbettchromatographie könnte die Primäraufreinigung nach einer filtrativen Zellabtrennung mit einer Festbettchromatographie unter Nutzung eines multimodalen Liganden erfolgen. Von den weiteren Aufreinigungsschritten könnte insbesondere die Reinigung II mit dem Anionenaustauscher durch eine Gradienten- oder Stufenelution optimiert werden. Die ausreichende Produktqualität nach der Reinigung II ermöglicht den Wegfall der abschließenden präparative Größenausschlusschromatographie.

Der Mechanismus der Produktfragmentierung bei Einsatz eines multimodalen Liganden sollte aufgeklärt werden. Möglicherweise kann durch Zugabe protektiver Substanzen oder andere Chromatographiebedingungen die Fragmentierung des humanen Wachstumshormons verhindert werden. Dabei könnte die Massenspektrometrie zu einer weiteren Charakterisierung herangezogen werden.

Die etablierte Prozessführungsstrategie, als Kombination eines Plattensedimenters mit einem Oxystat zur Regelung der Zellentnahme und der Reduktion der zellspezifischen Verdünnungsrate durch Variation der Kulturbedingungen, könnte zur Herstellung anderer Produkte und zur Untersuchung des Verhaltens von tierischen Zellen eingesetzt werden. So könnte die Produktqualität von Glykoproteinen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen optimiert werden. Außerdem könnten die physiologischen Mechanismen der Stoffwechsellumstellung der Zellen untersucht werden. Wenn die hohe Geschwindigkeit der Anpassung an neue Kulturbedingungen auch bei anderen Zelllinien reproduziert werden kann, erlaubte dies ein schnelles *Parameter-Screening* für Perfusions- und Fed-Batch-Prozesse unter transienten Zuständen. Damit ließe sich die Entwicklungszeit von Produktionsprozessen für Biopharmazeutika reduzieren.

5 Literaturverzeichnis

Abildgaard, F., Jørgensen, A.M.M., Led, J.J., Christensen, T., Jensen, E.B., Junker, F., Dalbøge, H. (1992)

Characterization of Tertiary Interactions in a Folded Protein by NMR Methods: Studies of pH-Induced Structural Changes in Human Growth Hormone?
Biochemistry, 31: 8587-8596.

Ainsworth, S.J. (2005)

BIOPHARMACEUTICALS: Patent expirations are beckoning generic drug companies, but numerous hurdles remain to a profitable business.
Chem. Eng. News, Vol. 83, No. 23: 21-29.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002)

Molecular Biology of The Cell.
Garland Sciences, New York, 5. Auflage.

Albertsson-Wikiland, K., Westphal, O., Westgren, U. (1986)

Daily subcutaneous administration of human growth hormone in growth hormone deficient children.
Acta Paediatr Scand, 75: 89-97.

Al-Fageeh, M.B., Marchant, R.J., Carden, M.J., Smales, C.M. (2005)

The Cold-Shock Response in Cultured Mammalian Cells: Harnessing the Response for the Improvement of Recombinant Protein Production.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 93, No. 5.

Al-Rubeai, M., Singh, R.P., Goldman, M.H., Emery, A.N. (1995)

Death Mechanisms of Animal Cells in Conditions of Intensive Agitation.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 45: 463-472.

Allen, D.B. (2006)

Growth Hormone Therapy for Short Stature: Is the Benefit Worth the Burden?
Pediatrics, 118: 343-348.

Amersham Biosciences (1997)

Expanded Bed Adsorption: Principles and Methods.
Amersham Biosciences, Schweden.

Amersham Biosciences (2002)

Gel Filtration: Principles and Methods.
Amersham Biosciences, Schweden.

Ameskamp, N. (2001)

Entwicklung und Einsatz eines spezifischen Peptid-Affinitätsliganden für die fließbettchromatographische Aufreinigung eines Proteins aus Säugetierzellkulturen.
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Dissertationsschrift.

- Angepat, S., Gorenflo, V.M., Piret, J.M. (2005)
Accelerating Perfusion Process Optimization by Scanning Non-Steady-State Responses.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 92, No. 4.
- Anton, F., Tappe, A., Kasper, C., Loa, A., Wilhelm, B.U., Scheper, T. (2005)
Production of recombinant human growth hormone.
19th ESACT-Meeting, Harrogate, UK, Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Poster.
- Asplund, M., Ramberg, M. (1998)
Development of Cleaning in Place Protocol and Repetitive Use of Streamline A XL.
2nd Conference on Expanded Bed Adsorption, Napa Valley, USA, Posterbeitrag.
- Batt, C., Davis, R.H., Kompala, D.S. (1990)
Inclined Sedimentation for Selective Retention of Viable Hybridomas in a Continuous Suspension Bioreactor.
Biotechnol. Prog., 6: 458-464.
- Baumann, G., Dtolar, M.W., Amburn, K., Barsano, C.P., DeVries, B.C. (1986)
A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 134–141.
- Becker, G.W., Bowsher, R.R., MacKellar, W.C., Poor, M.L., Tackitt, P.M., Riggin, R.M. (1987)
Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone.
Biotechnol. Appl. Biochem., 9: 478-87.
- Bidlingmaier, M., Strasburger, J.W.C. (2000)
Test method: GH.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 14: 99–109.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, U. (2000)
Pathologie.
Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2. Auflage.
- Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H.S., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. (2005)
Temperature Reduction in Cultures of hGM-CSF-expressing CHO Cells: Effect on Productivity and Product Quality.
Biotechnol. Prog., 21: 17-21.
- Brems, D.N., Brown, P.L., Becker, G.W. (1990)
Equilibrium Denaturation of Human Growth Hormone and Its Cystein-modified Forms.
J. Biol. Chem., Vol. 265: 5504-5511.
- Brown, P., Brandel, J.-P., Preese, M., Sato, T. (2006)
Iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease: The waning of an era.
Neurology, 67: 389-393.

- Büntemeyer, H., Marzahl, R., Lehmann, J. (1994)
A direct computer control concept for mammalian cell fermentation processes.
Cytotechnology, 15: 271-279.
- Büntemeyer, H., Stenner, A., Seewöster, T., Heidemann, R., Tebbe H., Wallerius, C., Lehmann, J. (1995)
Comparison of nutrient requirements of mammalian cell lines.
In: Beuvery, E.C., Griffiths, J.B., Zeijlemaker, W.P. (Herausgeber.), *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 117–121.
- Büntemeyer, H. (2000)
Off-line analysis in animal cell culture, methods.
In: Spier, R.E., *Encyclopedia of Cell Technology*, Wiley, New York, USA: 945-959.
- Castilho, L., Medronho, R. (2002)
Cell Retention Devices for Suspended-Cell Perfusion Cultures (Review).
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 74: 129-69.
- Castilho, L.R., Anspach, F.R., Deckwer W.-D. (2002)
An Integrated Process for Mammalian Cell Perfusion Cultivation and Product Purification Using a Dynamic Filter.
Biotechnol. Prog., Vol. 18: 776-781.
- Chapman, G.E., Rogers, K.M., Brittain, T., Bradshaw, R.A., Bates, Q.J., Turner, C., Cary, P.D., CRC. (1981)
The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone: preparation and some physical and chemical properties.
J. Biol. Chem., 256: 2395–2401.
- Chen, P., Harcum, S.W. (2005)
Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells.
J. Biotechnol., 117: 277–286.
- Chisti, Y. (2000)
Animal-cell damage in sparged bioreactors.
Trends Biotechnol., Vol. 18.
- Chmiel, H. (Herausgeber, 2006)
Bioprozesstechnik. Einführung in die Bioverfahrenstechnik.
Elsevier GmbH, München, 2. Auflage.
- Chuppa, S., Tsai, Y.-S., Yoon, S., Shackelford, S., Rozales, C., Bhat, R., Tsay, G., Matanguihan, C., Konstantinov, K., Naveh, D. (1997)
Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells.
Biotechnol. Bioeng., 55: 328–338.
- Clark, R., Olson, K., Fuh, G., Mariani, M., Mortensen, D., Teshima, G., Chang, S., Chu, H., Mukku, V., Canova-Davis, E., Somers, T., Cronin, M., Winkler, M., Wells, J.A. (1996)
Long-acting Growth Hormones Produced by Conjugation with Polyethylene Glycol.
J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 36: 21969–21977.

- Crommelin, J.A., Sindelar, R. (2002)
Pharmaceutical Biotechnology. An Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists.
Taylor and Francis, London, 2. Auflage.
- Czichos, H. (Herausgeber, 2000)
Hütte: Die Grundlagen der Ingenieurwissenschaften.
Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 31. Auflage.
- Datar, R.V., Cartwright, T., Rosen, C.G. (1993)
Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator.
Biotechnology (N.Y.), 11(3): 349-357.
- DeNoto, F.M., Moore, D.D., Goodman, H.M. (1981)
Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing.
Nucleic Acids Res., Vol. 9, No. 15.
- de Vos, A.M, Ultsch, M., Kossiakoff, A.A. (1992)
Human growth hormone and Extracellular Domain of its Receptor: Crystal Structure of the Complex.
Science, Vol. 255: 307-312.
- deZengotita, V.W., Kimura, R., Miller, W.M. (1998)
Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production.
Cytotechnology, 28: 213–227.
- Dingermann, T. (1999)
Gentechnik. Biotechnik. Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Dowd, J.E., Kwok, K.E., Piret, J.M. (2001)
Glucose-Based Optimization of CHO-Cell Perfusion Cultures.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 75, No. 2.
- Dürschmid, M.P., Landauer, K., Simic, G., Klug, H., Keijzer, T., Trampler, F., Oudshoorn, A., Gröschl, M., Müller, D., Doblhoff-Dier, O. (2003)
Comparison of Fluidized Bed and Ultrasonic Cell-Retention Systems for High Cell Density Mammalian Cell Culture.
Biotechnol. Prog., Vol. 19: 1045-1048.
- Elefant, F., Cooke, N.E., Liebhaber, S.A. (2000)
Targeted Recruitment of Histone Acetyltransferase Activity to a Locus Control Region.
J. Biol. Chem., Vol. 275, No. 18: 13827–13834.
- Eli Lilly and Company (2003)
Humatrope® Somatropin (rDNA Origin) for Injection.
Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA, Produktbegleitschreiben: PA 1642 AMP.

EMEA (1997)

CPMP Position Statement on DNA and Host Cell Proteins (HCP).
European Medicines Agency.

EMEA (2006)

European Pharmacopoeia 5.3: Somatropin bulk solution.
EMEA, European Pharmacopoeia 5.3: 3616-3618.

Eshkol, T. (2002)

Implications of Batch Processing for Manufacture of Human Cells, Tissues and Cellular and Tissue-Based Products. Experience of a Commercial Manufacturer of Pituitary-derived Growth Hormone.
Vortrag, Transmissible Spongiform Encephalopathy advisory committee, Meeting 2002, Gaithersburg, USA.

Estes, P.A., Cooke, N.E., Liebhaber S.A. (1990)

A Difference in the Splicing Patterns of the Closely Related Normal and Variant Human Growth Hormone Gene Transcripts Is Determined by a Minimal Sequence Divergence between Two Potential Splice-acceptor Sites.
J. Biol. Chem., Vol. 265, No. 32: 19863-19870.

Flasnoecker, M. (Herausgeberin, 1999)

Thiemes Innere Medizin.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Fountoulakis, M., Langen, H. (1997)

Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery.
Anal. Biochem., 250(2): 153-156.

Franěk, F., Fussenegger, M. (2005)

Survival Factor-Like Activity of Small Peptides in Hybridoma and CHO Cells Cultures .
Biotechnol. Prog., 21(1): 96 -98.

Garber, K. (2000)

rFactor VIII deficit questioned.
Nat. Biotechnol., Vol. 18: 1133.

GE Healthcare (2005)

Instructions 11-0035-05 AB Multimodal media.
GE Healthcare, Schweden.

Giustina, A., Veldhuis, J.D. (1998)

Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human.
Endocr. Rev., 19: 717-797.

Glauner, B. (1991)

Vitalitätskontrolle in der Zellkulturtechnik.
Bio Tec, 3(5): 58-61.

Gódia, F., Cairó, J.J. (2006)

Cell Metabolism.

In: Ozturk, S.S., Hu, W.-S. (Herausgeber, 2006), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical And Cell-Based Therapies*, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.

Goeddel, D.V., Heyreker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozarri, G., Crea, R., Seeburg, P.H. (1979)

Direct Expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature, 281: 544-548.

Gorenflo, V-M., Smith, L., Dedinsky, B., Persson, B., Piret, J.M. (2002)

Scale-Up and Optimization of an Acoustic Filter for 200 L/day Perfusion of a CHO Cell Culture.

Biotechnol. Bioeng., Vol. 80, No. 4: 438-444.

Gray, D.R., Chen, S., Howarth, W., Inlow, D., Maiorella, B.L. (1996)

CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture.

Cytotechnology, 22: 65-78.

Grigorian, A.L., Bustamante, J.J., Hernandez, P., Martinez, A.O., Haro, L.S. (2005)

Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone.

Protein Sci., 14: 902-913.

Gudermann, F., Ziemeck, P., Lehmann, J. (1997)

CeDeX: Automated cell density determination.

In: Carrondo, M.J.T., Griffith, B., Moreira, J.L.P. (Herausgeber), *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 301-307.

Haffner, D., Schaefer, F., Girard, J., Ritz, E., Mehls, O. (1994)

Metabolic Clearance of Recombinant Human Growth Hormone in Health and Chronic Renal Failure.

J. Clin. Invest., Vol, 93: 1163-1171.

Hahn, S.K., Kim, S.J., Kim, M.J., Kim, D.H. (2004)

Characterization and in vivo study of sustained-release formulation of human growth hormone using sodium hyaluronate.

Pharm. Res., 21(8): 1374-1381.

Harnak, G.H. von, Koletzko, B. (Herausgeber, 1997)

Kinderheilkunde.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Haro, L.S., Lewis, U.J., Garcia, M., Bustamate, J., Martinez, A.O., Ling, N.C., (1996)

Glycosylated human growth hormone (rhGH): A novel 24 kDa rhGH-N variant.

Biochem. Biophys. Res. Commun., No. 228: 549-556.

Harvey, S., Hull, K. (1995)

Growth hormone transport.

In: Harvey, S., Scanes, C.G., Daughaday, W.H. (Herausgeber), *Growth hormone*, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, USA: 257-284.

Hashimoto, Y., Kamioka, T., Hosaka, M., Mabuchi, K., Mizuchi, A., Shimazaki, Y., Tsunoo, M., Tanaka, T. (2000)

Exogenous 20K Growth Hormone (GH) Suppresses Endogenous 22K GH Secretion in Normal Men.

J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 85, No. 2.

Heidemann, R., Lütkemeyer, D., Büntemeyer, H., Lehmann, J. (1998)

Effects of dissolved oxygen levels and the role of extra- and intracellular amino acid concentrations upon the metabolism of mammalian cell lines during batch and continuous cultures. Cytotechnology, 26: 185–197.

Henzler, H.-J., Kauling, J., Schmitt, F., Beckers, E., Bödeker, B., von Hugo, H., Konstantinov, K., Naveh, D., Steiner, U. (2003)

A unit and a process for carrying out high cell density fermentation.

Bayer AG, Patentantrag WO 03/020919 A2.

Hepner, F., Cszaszar, E., Roitinger, E., Lubec, G. (2005)

Mass spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin®) reveals amino acid substitutions in 2% of the expressed protein.

Proteome Sci, 3(1).

Hepner, F., Cszaszar, E., Roitinger, E., Pollak, A., Lubec, G. (2006)

Massspectrometrical analysis of recombinant human growth hormone Norditropin reveals amino acid exchange at M14_V14 rhGH.

Proteomics, 6(3): 775-784.

Hildebrandt, H. (Herausgeber, 1998)

Pschyrembel: Medizinisches Wörterbuch.

Walter de Gruyter & Co., Berlin, 258. Auflage.

Himmelfarb, P., Thayer, P.S., Martin, H.E. (1969)

Spin-filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension.

Science, 164: 555-557.

Hintz, R.L. (2004)

Growth hormone: uses and abuses.

BMJ, Vol. 328: 907-908.

Höra, W. (2005)

Produktion des rekombinanten, menschlichen Wachstumshormones aus CHO-Zellen im 2 Liter Perfusionsprozess mit Plattensedimenter.

Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Diplomarbeit.

Horseman, N.D. (1995)

Editorial: Prolactin, Proliferation, and Protooncogenes.

Endocrinology, Vol. 136, No. 12.

Hubbuch, J., Thömmes, J., Kula, M.-R. (2005)

Biochemical Engineering Aspects of Expanded Bed Adsorption.

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 92: 101–123.

ICH Expert Working Group (1999)

ICH Harmonized Tripartite Guideline. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Q6B.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use.

ICH Expert Working Group (2005)

Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products derived from Cells Lines of Human or Animal Origin. Q5A(R1).

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use.

Iding, K. (2001)

Untersuchungen zur Expansion, funktionellen Charakterisierung und kontinuierlichen Bereitstellung von Hepatocyten für die Anwendung in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen. Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Dissertationsschrift.

Ishikawa, M., Yokoya, S., Tachibana, K., Hasegawa, Y., Yasuda, T., Tokuhira, E., Hashimoto, Y., Tanaka, T. (1999)

Serum levels of 20-kDa rhGH are parallel those of 22-kDa rhGH in normal and short children.

J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 84, No. 1.

Jones, B.K., Monks, B.R., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E. (1995)

The Human Growth Hormone Gene Is Regulated by a Multicomponent Locus Control Region. Mol. Cell. Biol., Vol. 15, No. 12: 7010–7021.

Jørgensen, J.O.L., Flyvbjerg, A., Dinesen, J., Lund, H., Alberti, K.G.M.M., Orskov, H., Christiansen, J.S. (1987)

Serum profiles and short-term metabolic effect of pituitary and authentic biosynthetic human growth hormone in man.

Acta Endocrinol., Vol. 116: 381-386.

Jorjani, P., Ozturk, S.S. (1999)

Effects of Cell Density and Temperature on Oxygen Consumption Rate for Different Mammalian Cell Lines.

Biotechnol. Bioeng., Vol. 64, No. 3.

Jung F., Scherges, M., Fürst, P. (2002)

Illegale und gefälschtes Wachstumshormonpräparate.

Dtsch. Apoth. Ztg., Nr. 45: 5504-5513.

Keane, J.T., Ryan, D., Gray, P.P. (2003)

Effect of Shear Stress on Expression of a Recombinant Protein by Chinese Hamster Ovary Cells.

Biotechnol. Bioeng., Vol. 81, No. 2: 211-220.

Kilburn, D.G., Clarke, D.J., Coakley, W.T., Bardsley, D.W. (1989)

Enhanced sedimentation of mammalian cells following acoustic aggregation.

Biotechnol. Bioeng., Vol. 34: 559-562.

- Kompala, D.S., Ozturk, S.S. (2006)
Optimization of High Cell Density Perfusion Bioreactors.
In: Ozturk, S.S., Hu, W.-S. (Herausgeber, 2006), Cell Culture Technology for Pharmaceutical And Cell-Based Therapies, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Konstantinov, K., Chuppa, S., Sajan, E., Tsai, Y., Yoon S., Golini, F. (1994)
Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures.
Trends Biotechnol., Vol. 12: 324-333.
- Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., Matanguihan, C., Michaels, J., Naveh, D. (2006)
The "Push-to-Low" Approach for Optimization of High-Density Perfusion Cultures of Animal Cells.
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 101: 75-98.
- Kossiakoff, A.A., Somers, W., Ultsch, M., Andow, K., Muller, Y.A., de Vos, A.M. (1994)
Comparison of the intermediate complexes of human growth receptors hormone bound to the human growth hormone and prolactin.
Protein Sci., 3: 1697-1705.
- Kostyo, J.L., Skottner, A., Brostedt, P., Roos, P., Cameron, C.M., Forsman, A., Fryklund, L., Adamafio, N.A., Skoog, B. (1987)
Biological characterization of purified native 20-kDa human growth hormone.
Biochim. Biophys. Acta, 925: 314-324.
- Kyung, Y.-S., Peshwa, M.V., Gryte, D.M., Hu, W.-S. (1994)
High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements.
Cytotechnology, 14: 183-190.
- Laursen, T. (2004)
Clinical pharmacological aspects of growth hormone administration.
Growth Horm. IGF Res., 14: 16-44.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M.J. (2003)
How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.
Trends Biochem. Sci., Vol. 28 No. 4: 215-220.
- Lee, E.N., Kim, Y.M., Lee, H.J., Park, S.W., Jung, H.Y., Lee, J.M., Ahn, Y.-H., Kim, J. (2005)
Stabilizing Peptide Fusion for Solving the Stability and Solubility Problems of Therapeutic Proteins.
Pharm. Res., Vol. 22, No. 10: 1735-1746.
- Lefort, S., Ferrara, P. (1986)
Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures.
J. Chromatogr., 361: 209-216.
- Lehmann, J., Heidemann, R., Riese, U., Lütkemeyer, D., Büntemeyer, H. (1992)
Der SuperSpinner. Ein 'Brutschrankfermenter' für die Massenkultur tierischer Zellen.
BioEngineering, 5/6: 112-117.

- Leitner, V.M., Guggi, D., Krauland, A.H., Bernkop-Schnürch, A. (2004)
Nasal delivery of human growth hormone: in vitro and in vivo evaluation of a thiomers/glutathione microparticulate delivery system.
J. Control Release, Vol. 100, Issue 1: 87-95.
- Leung, K.-C., Howe, C., Gui, L.Y.-Y., Trout, G., Veldhuis, J.D., Ho, K.K.Y (2002)
Physiological and pharmacological regulation of 20-kDa growth hormone.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 283: E836–E843.
- Lewis, U.J., Peterson, S.M., Bonewald, L.F., Seavy, B.K., VanderLaan, W.P. (1977)
An interchain disulfide dimer of human growth hormone.
J. Biol. Chem., No. 252: 3697-3702.
- Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Bonewald, L.F., Seavey, B.K (1981)
Altered Proteolytic Cleavage of Human Growth Hormone as a Result of Deamidation.
J. Biol. Chem., Vol. 256, No. 22: 11645-11650.
- Lewis, U.J., Sinha, Y.N., Lewis, G.P. (2000)
Structure and Properties of Members of the rhGH-Family: A review.
Endocr. J., No. 47.
- Li, P., Xiu, G., Mata, V.G., Grande, C.A., Rodrigues, A.E (2006)
Expanded Bed Adsorption/Desorption of Proteins With Streamline Direct CST I Adsorbent.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 94, No. 6.
- Lim, C.K. (1987)
HPLC of small molecules – a practical approach.
IRL Press, Oxford.
- Lindholm, J. (2006)
Growth hormone: Historical notes.
Pituitary, 9: 5–10.
- Lindl, T. (2002)
Zell- und Gewebekultur.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 5. Auflage.
- Lippert H. (1995)
Anatomie. Text und Atlas.
Urban und Fischer, München, Jena, 6. Auflage.
- Longobardi, S., Keay, N., Ehrenbord, C., Cittadini, A., Rosén T., Dall, R., Boroujerdri, M.A., Bassett, E.E., Healy, M.L., Pentecost, C., Wallace, J.D., Powrie, J., Jørgensen, J.O., Saccà, L. (2000)
Growth Hormone (GH) Effects on Bone and Collagen Turnover in Healthy Adults and Its Potential as a Marker of GH Abuse in Sports: A Double Blind, Placebo-Controlled Study.
J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 85, No. 4.

- López-Guajardo, C.C., Armstrong, L.S., Jordan, L., Staten, N.R., Krivi, G.G., Martinez, A.O., Haro, L.S. (1998)
Generation, characterization and utilization of anti-human growth hormone 1-43, (rhGH₁₋₄₃), monoclonal antibodies in an ELISA.
J. Immunol. Methods, No. 215: 179-186.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998)
Bioanalytik.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1. Auflage.
- Lubinieccki, A. S. (1998)
Historical reflections on cell culture engineering.
Cytotechnology, 28: 139–145.
- Lütkemeyer, D., Ameskamp, N., Priesner, C., Bartsch, E.-M., Lehmann, J. (2001)
Capture of proteins from mammalian cells in pilot scale using different STREAMLINE adsorbents.
Bioseparation, 10: 57–63.
- Ma, N., Mollet, M., Chalmers, J.J (2006)
Aeration, Mixing and Hydrodynamics in Bioreactors.
In: Ozturk, S.S., Hu, W.-S. (Herausgeber, 2006), Cell Culture Technology for Pharmaceutical And Cell-Based Therapies, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- MacGillivray, M.H., Blethen, S.L., Buchlis, J.G., Clopper, R.R., Sandberg D.E., Conboy, T.A. (1998)
Deficiency: How Physiologic? Current Dosing of Growth Hormone in Children With Growth Hormone.
Pediatrics, 102: 527-530.
- Massa, G., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Bouillon, R. (1993)
Five-year follow-up of growth hormone antibodies in growth hormone deficient children treated with recombinant human growth hormone.
Clin. Endocrinol. (Oxf), 38(2): 137-142.
- Mercille, S., Johnson, M., Lanthier, S., Kamen, A.A., Massie, B. (2000)
Understanding Factors that Limit the Productivity of Suspension-Based Perfusion Cultures Operated at High Medium Renewal Rates.
Biotechnol. Bioeng., 67: 435-450.
- Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., Rossi, M., Bernard, A., Stockar, U. von, Kadouri, A. (2005)
Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality.
J. Biotechnol., Vol. 123(1): 106-116.
- Mills, J.B., Ashworth, R.B., Wilhelmi, A.E., Hartree, A.S. (1969)
Improved method for the extraction and purification of human growth hormone.
J. Clin. Endocrinol., 29: 1456–1459.

- Moreira, J.L., Cruz, P.E., Santana, P.C., Aunins, J.G., Carrondo, J.T (1995)
Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: Mechanisms and kinetic studies.
Chem. Eng. Sci., Vol. 50: 2747-2764.
- Mullis, P.E. (2005)
Genetic control of growth.
Eur. J. Endocrinol., Vol. 152: 11–31.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001)
Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 8. Auflage.
- Myers, M. (2006)
Scale-Up and Technology Transfer of an Established Monoclonal Antibody Production Process.
AAPS Workshop, 22. Juni 2006.
- Nienow, A.W. (2006)
Reactor engineering in large scale animal cell culture.
Cytotechnology, 50: 9–33.
- Northoff, S. (2006)
Produktion von rekombinantem Somatotropin mit der CHO^{SFS}-hGH-Zelle im Fedbatch-Prozess.
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Diplomarbeit.
- Osman, J.J., Birch, J., Varley, J. (2000)
The Response of GS-NS0 Myeloma Cells to pH Shifts and pH Perturbations.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 75, No. 1.
- Ozturk, S.S. (1996)
Engineering challenges in high density cell culture systems.
Cytotechnology, 22: 3-16.
- Ozturk, S.S., Blackie, P., Wu, P., Taticek, R., Konstantinov, K., Matanguihan, C., Tsai, Y., Yoon, S., Thrift, J., Naveh, D. (1997a)
On-line monitoring for consistent and optimal production of biologicals from mammalian cell culture.
In: Carrondo, M.J.T., Griffith, B., Moreira, J.L.P. (Herausgeber), *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 205-214.
- Ozturk, S.S., Jorjani, P., Taticek, R., Lowe, B., Shackelford, S., Ladehoff-Guiles, D., Thrift, J., Blackie, J., Naveh, D. (1997b)
Kinetics of glucose metabolism and utilization of lactate in mammalian cell cultures.
In: Carrondo, M.J.T., Griffith, B., Moreira, J.L.P. (Herausgeber), *Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine*, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 355-360.
- Ozturk, S.S., Hu, W.-S. (Herausgeber, 2006)
Cell Culture Technology for Pharmaceutical And Cell-Based Therapies.
CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.

- Pagé, B., Pagé, M., Noel, C. (1993)
A new Fluorometric Assay for Cytotoxicity Measurements in-vitro.
Int. J. Oncol., 3(3): 473-476.
- Pavlu, B., Gellerfors, P. (1992)
Hydrophobic interaction chromatography of recombinant human growth hormone, Genotropin.
Bioseparation, 3(5): 257-265.
- Pearlman, R., Bewley, T.A. (1993)
Stability and Characterization of Human Growth Hormone: Case Histories.
In: Wang, Y.J., Pearlman, R., Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs, Plenum Press, New York: 1-58.
- Pikal, M.J., Dellerman, K.M., Roy, M.L., Riggin, R.M. (1991)
The Effects of Formulation Variables on the Stability of Freeze-Dried Human Growth Hormone.
Pharm. Res., Vol. 8, No. 4: 427-436.
- Pirt, J.S. (1985)
Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Scientific Publications, London.
- Raben, M.S. (1958)
Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 18: 901-903.
- Raschke, M., Kolbeck, S., Bail, H., Schmidmaier, G., Flyvbjerg, A., Lindner, T., Dahne, M., Roenne, I.-A., Haas, N. (2001)
Homologous Growth Hormone Accelerates Healing of Segmental Bone Defects.
Bone, Vol. 29, No. 4: 368–373.
- RCBS Protein Data Bank
<http://www.rcsb.org/pdb/>.
World Wide Web, 2006.
- Renner, W.A., Jordan, M., Eppenberger, H.M., Leist, C. (1993)
Cell-cell adhesion and aggregation: influence on the growth behavior of CHO cells.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 41: 188-193.
- Riggin, R., M., Dorulla, G.K., Miner, D.J. (1987)
A Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Method for Characterization of Biosynthetic Human Growth Hormone.
Anal. Biochem., 167: 199-209.
- Rojas-Gil, A.P., Ziros, P.G., Diaz, L., Kletsas, D., Basdra, E.K., Alexandrides, T.K., Zadik, Z., Frank, S.J., Papathanassopoulou, V., Beratis, N.G., Papavassiliou, A.G., Spiliotis, B.E. (2006)
Growth hormone/JAK-STAT axis signal-transduction defect. A novel treatable cause of growth failure.
FEBS J., 273: 3454–3466.

- Rowlinson, S.W., Waters, M.J., Lewis, U.J., Barnard, R. (1996)
Human growth hormone fragments 1-43 and 44-191: in vitro somatogenic activity and receptor binding characteristics in human and nonprimate systems.
Endocrinology, No. 137: 90-95.
- Schärfe, J. (1988)
Impulsflächenanalyse.
LaborPraxis, Nr. 10: 1096-1103.
- Schneider, M., Marison, I.W., Stockar, U. von (1996)
The importance of ammonia in mammalian cell culture.
J. Biotechnol., 46: 161-185.
- Schomberg., M. (2003)
Untersuchung des Wachstums, der Produktbildung und des Aggregationsverhaltens von CHO-Zellen in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl.
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, Projektarbeit.
- Scopes, R.K. (1994)
Protein Purification, Principles and Practice.
Springer Verlag., 3. Auflage.
- Searles, J.A., Todd, P., Kompala, D.S. (1994)
Viable Cell Recycle with an Inclined Settler in the Perfusion Culture of Suspended Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells.
Biotechnol. Prog., 10: 198-206.
- Senger, R.S., Karim, M.N. (2003)
Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activatorprotein.
Biotechnol. Prog., Vol. 19: 1199-1209.
- Shukla, A.A., Peterson, J., Sorge, L., Lewis, P., Thomas, S., Waugh, S. (2002)
Preparative purification of a recombinant protein by hydrophobic interaction chromatography: modulation of selectivity by the use of chaotropic additives.
Biotechnol. Prog., 18(3): 556-564.
- Silbernagel, S., Despopoulos, A. (1991)
Taschenatlas der Physiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
- Spolaore, B., Polverino de Laureto, P., Zambonin, M., Fontana, A. (2004)
Limited Proteolysis of Human Growth Hormone at Low pH: Isolation, Characterisation, and Complementation of the Two Biologically Relevant Fragments 1-44 and 45-191.
Biochemistry, 43: 6576-6586.
- Stevens, J. (1994)
Entwicklung eines neuen Verfahrens zur kontinuierlichen Fermentation von Tierzellen.
Universität Dortmund, Dissertationsschrift.

- Striegel, H., Simon, P., Frisch, S., Roecker, K., Dietz, K., Dickhuth, H.-H., Ulrich, R. (2006) *Anabolic ergogenic substance users in fitness-sports: A distinct group supported by the health care system.* Drug Alcohol Depend., 81: 11–19.
- Swerdlow, A.J., Higgins, C.D., Adlard, P., Jones, M.E., Preece, M.A. (2003) *Creutzfeldt-Jakob disease in United Kingdom patients treated with human pituitary growth hormone.* Neurology, 61: 783-791.
- Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L., Friesen, H.G. (1980) *A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum.* J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 51: 1058-1063.
- Tennant, J.R. (1964) *Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability.* Transplantation, 2: 685-694.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, L., Weik, R., Borth, N., Katinger, H., Müller, D. (2006a) *Process Parameter Shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and Temperature on the Performance of Epo-Fc Expressing CHO Cells Cultivated in Controlled Batch Bioreactors.* Biotechnol. Bioeng., Vol. 94, No. 6.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, L., Weik, R., Borth, N., Katinger, H., Müller, D. (2006b) *Process Parameter Shifting: Part II. Biphasic Cultivation - A Tool for Enhancing the Volumetric Productivity of Batch Processes Using Epo-Fc Expressing CHO Cells.* Biotechnol. Bioeng., Vol. 94, No. 6.
- Tsao, Y.-S., Cardoso, A.G., Condon, R.G.G., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J.C., Kearns, B.G., Liu, Z. (2005) *Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism.* J. Biotechnol., 118: 316–327.
- Tsunekawa, B., Wada, M., Ikeda, M., Uchida, H., Naito, N., Honjo, M. (1999) *The 20-Kilodalton (kDa) Human Growth Hormone (rhGH) Differs from the 22-kDa rhGH in the Effect on the Human Prolactin Receptor.* Endocrinology, Vol. 140, No. 9.
- Tsunekawa, B., Wada, M., Ikeda, M., Banba, S., Kamachi, H., Tanaka, E., Honjo, M. (2000) *The Binding between the Stem Regions of Human Growth Hormone (GH) Receptor Compensates for the Weaker Site 1 Binding of 20-kDa Human GH (rhGH) than That of 22-kDa rhGH.* J. Biol. Chem., Vol. 275, No. 21: 15652–15656.
- Uchida, H., Naito, N., Asada, N., Wada, M., Ikeda, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita, Y., Konda, K., Kusuhara, N., Kamioka, T., Nakashima, K., Honjo, M. (1997) *Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K rhGH) in Escherichia coli and properties of the purified product.*

J. Biotechnol., No. 55: 101–112.

Ulber, R., Frerichs, J.G., Beutel, S. (2003)
Optical sensor systems for bioprocess monitoring.
Anal. Bioanal. Chem., 376: 342–348.

Varley, J., Birch, J. (1999)
Reactor design for large scale suspension animal cell culture.
Cytotechnology 29: 177–205.

Varma, S., Sabharwal, P., Sheridan, J.F., Malarkey, W.B. (1993)
Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 76: 49–53.

Vimalachandra, D., Hodson, E.M., Willis, N.S., Craig, J.C., Cowell, C., Knight, J.F. (2006)
Growth hormone for children with chronic kidney disease (Review).
John Wiley & Sons, Ltd, The Cochrane Library, Issue 3.

Voet, D., Voet, J.G. (1994)
Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1. Auflage.

Voisard, D., Meuwly, F., Rufieux, P.-A., Baer, G., Kadouri, A. (2003)
Potential of Cell Retention Techniques for Large-Scale High-Density Perfusion Culture of Suspended Mammalian Cells.
Biotechnol. Bioeng., Vol. 82, No. 7: 751-765.

Volterrani, M., Giustina, A., Manelli, F., Cicoira, M.A., Lorusso, R., Giordano, A. (2000)
Role of growth hormone in chronic heart failure: therapeutic implications.
Ital. Heart J., Vol. 1: 732-738.

Wallace, J.D., Cuneo, R.C., Bidlingmaier, M., Lundberg, P.A., Carlsson, L., Boguszewski, C.L., Hay, J., Healy, M.-L., Napoli, R., Dall, R., Rosén, T., Strasburger, C.J. (2001)
The Response of Molecular Isoforms of Growth Hormone to Acute Exercise in Trained Adult Males.
J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 86, No. 1.

Wallis, M. (1980)
Growth hormone: deletions in the protein and introns in the gene.
Nature, No. 284: 511-516.

Walsh, G. (2000)
Pharmaceutical Benchmarks.
Nat. Biotechnol., No. 18: 831-833.

Walter, J., Werner, R.G. (1993)
Regulatory requirements and economic aspects in downstream processing of biotechnically engineered proteins for parenteral application as pharmaceuticals.

In: Kroner, K.H., Papamichael, N., Schütte, H. (Herausgeber), *Downstream Processing, Recovery and Purification of Proteins, A Handbook of Principles and Practice*, John Wiley Publishers Inc, New York.

Weisz, O. A. (2003)
Acidification and protein traffic.
Int. Rev. Cytol., 226: 259-319.

Wells, J.A., Cunningham, B.C., Fuh, G., Lowman, H.B., Bass, S.H., Mulkerrin, M.G., Ultsch, M., DeVos, A.M. (1993)
The molecular basis for growth hormone-receptor interactions.
Recent Prog. Horm. Res., 48: 253-275.

WHO Expert Committee on Biological Standardization (1998)
Technical Report Series No. 878. 47th Report.
World Health Organ., Genf.

WHO Expert Committee on Biological Standardization (2004)
Technical Report Series No. 926. 53th Report.
World Health Organ., Genf.

Wicar, S., Mulkerrin, M.G., Bathory, G., Khundkar, L.H., Karger, B.L. (1994)
Conformational Changes in the Reversed Phase Liquid Chromatography of Recombinant Human Growth Hormone as a Function of Organic Solvent: The Molten Globule State.
Anal. Chem., 66: 3908-3915.

Wolter, T., Richter, A. (2005)
Assay for controlling Host-Cell Impurities in Biopharmaceuticals.
BioProcess International, Februar 2005: 2-6.

Wood, P. (2001)
Growth Hormone: its measurement and the need for assay harmonisation.
Ann. Clin. Biochem., Vol. 38: 471-482.

Woodside, S.M., Bowen, B.D., Piret, J.M. (1998)
Mamalian cell retention devices for stirred perfusion bioreactors.
Cytotechnology, Vol. 28: 163-175.

Wu, P., Ozturk, S.S., Blackie, J.D., Thrift, J.C., Figueroa, C., Naveh, D. (1995)
Evaluation and Applications of Optical Cell Density Probes in Mammalian Cell Bioreactors
Biotechnol. Bioeng., Vol. 45: 495-502.

Wu, Z., Bidlingmaier, M., Dall, R., Strasburger, C.J. (1999)
Detection of doping with human growth hormone.
Lancet, Vol. 353: 895.

Yi, S., Bernat, B., Pál, G., Kossiakoff, A., Li, W.-H. (2002)
Functional Promiscuity of Squirrel Monkey Growth Hormone Receptor Toward both Primate and Nonprimate Growth Hormones.
Mol. Biol. Evol., 19(7): 1083–1092.

Yoon, S.K., Choi, S.L., Song, J.Y., Lee, G.M. (2005)

Effect of Culture pH on Erythropoietin Production by Chinese Hamster Ovary Cells Grown in Suspension at 32.5 and 37.0 °C.

Biotechnol. Bioeng., Vol. 89, No. 3.

Zeng, A.-P., Bi, J.-X. (2006)

Cell Culture Kinetics and Modeling.

In: Ozturk, S.S., Hu, W.-S. (Herausgeber, 2006), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical And Cell-Based Therapies*, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.

Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D. (1999)

Model Simulation and Analysis of Perfusion Culture of Mammalian Cells at High Cell Density.

Biotechnol. Prog., Vol. 15: 373-382.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AG	Aktiengesellschaft
AIEX	<i>anion exchange chromatography</i> (engl.)
cDNA	<i>copy DNA</i> (engl.)
CIEX	<i>cation exchange chromatography</i> (engl.)
CHMP	<i>committee for medicinal products for human use</i> (engl.)
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> (engl.)
CMF-PBS	<i>calcium and magnesium free-phosphate buffered saline</i> (engl.)
CO ₂	Kohlendioxid
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> (engl.)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (engl.)
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> (engl.)
EDQM	<i>European Directorate for the Quality of Medicines</i> (engl.)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (engl.)
EMA	<i>European medicines agency</i> (engl.)
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i> (lat.)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (engl.)
GHR	<i>growth hormone receptor</i> (engl.)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCDNA	<i>host cell DNA</i> (engl.)
HCP	<i>host cell protein</i> (engl.)
HETP	<i>Height Equivalent of Theoretical Plates</i> (engl.)
HIC	<i>hydrophobic interaction chromatography</i> (engl.)
HIV	<i>human immunodeficiency-virus</i> (engl.)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use</i> (engl.)
IGF-1	<i>insulin-like growth factor I</i> (engl.)
lat.	lateinisch
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i> (engl.)

MS	Massenspektrometrie
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
p.a.	<i>pro analysis</i> (lat.)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.)
pI	Isoelektrischer Punkt
PID	Proportional Intergral Differential
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRLR	Prolactin-Rezeptor
ppm	<i>parts per million</i> (engl.)
rhGH	<i>human growth hormone</i> (engl.)
RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i> (engl.)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (engl.)
TFA	Trifluoressigsäure
UF	Ultrafiltration
UK	<i>United Kingdom</i> (engl.)
USA	<i>United States of America</i> (engl.)
HST	<i>high salt tolerant</i> (engl.)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (engl.)
WFI	<i>Water for injection</i> (engl.)

Symbole, Einheits- und Formelzeichen

a	Koeffizient der Abflussrate
A	Fläche
A _{ges}	Gesamtfläche der Sedimenterplatten
A _{pr}	projizierte Fläche der Sedimenterplatten
A _q	Querschnittsfläche des Plattensedimenters

A_S	Asymmetriefaktor
b	Klärbodenabstand
B	effektive Klärbodenbreite
B_p	Basenpaare
CSDR	<i>cell specific dilution rate</i> (engl.)
d	Rührorgandurchmesser
D	Verdünnungsrate
D_E	Zellentnahmerate
D_{\min}	minimale Verdünnungsrate
d_p	Partikeldurchmesser
D_P	Perfusionsrate
$e(t)$	Regelabweichung
F_A	Abflussrate
F_B	Flussrate Zellentnahme
F_E	Flussrate Zulauf
F_P	Flussrate des Perfundats im Sedimeter
g	Erdbeschleunigung
g	Aufkonzentrierungsfaktor Rezirkulat
h	Abreicherungsfaktor Perfundat
K_{av}	Selektivität
K_R	Verstärkungsfaktor
L	Klärbodenlänge
L_S	Säulenlänge
M	mol/L
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
n	Rührerdrehzahl
n	Stichprobenumfang
N	Bodenzahl
Ne	Newton-Zahl
NL	Normliter
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
P	Leistungsaufnahme des Rührers
P	Produktkonzentration
P_A	Produktausstoß

P_V	volumetrische Produktivität
q_{Glucose}	spezifische Glucoseverbrauchsrate
q_{Lactat}	spezifische Lactatbildungsrate
q_p	spezifische Produktbildungsrate
q_{rhGH}	spezifische rhGH-Bildungsrate
q_s	spezifische Substratverbrauchsrate
r	Umsatzgeschwindigkeit
R	Rezirkulationsrate
S	Substratkonzentration
S_E	Substratkonzentration im Zulauf
S_V	volumetrische Klärrate
T_D	Vorhaltezeit
T_I	Nachstellzeit
t_r	Retentionszeit
$u_R(t)$	Reglerausgangsgröße
V	Flüssigkeitsvolumen
V_0	Totvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_R	Arbeitsvolumen
v_s	Sedimentationsgeschwindigkeit
V_t	Säulenvolumen
$w(t)$	Sollwert
$w_{1/2}$	Peakbreite auf halbmaximaler Peakhöhe
UPM	Umdrehungen pro Minute
\bar{X}	mittlere Zelldichte
X_p	Zelldichte im Perfundat, bzw. der Ernteflasche
$X_{p,t}$	Zelldichte im Perfundat
X_t	Zelldichte
X_{ze}	Lebendzelldichte in der Zellentnahme
$y(t)$	Istwert
Z	Zellrückhaltung
$\bar{\varepsilon}_T$	mittlerer spezifischer Leistungseintrag
μ	spezifische Wachstumsrate

η	dynamische Viskosität des Mediums
ρ_F	spezifische Dichte
τ	hydrodynamische Verweilzeit
θ	Winkel, Auslenkung von der Vertikalen

