

**Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung  
und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

zur Erlangung der Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Holger Lübben  
geboren am 24.10.1967 in Aurich

1997

Referent: PD. Dr. Gerlinde Kretzmer  
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
Tag der Promotion: 18.11.1997

---

## **Abstract**

**Lübben, Holger**

### **Einsatz unterschiedlicher Prozeßführungsmodi zur Charakterisierung und Beurteilung des Stoffwechsels rekombinanter CHO-Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Prozeßführungssysteme eingesetzt um Unterschiede und Besonderheiten im Stoffwechsel rekombinanter CHO-Zellen herauszuarbeiten.

Dazu wurde mittels Metabolic-Flux-Analysis eine Flußverteilung der Hauptabbau- und Syntheseschritte während der exponentiellen Wachstumsphase im Batch-Experiment als Grundzustand festgelegt. Die Berechnung der Flüsse erfolgte quantitativ und deren Richtigkeit wurde mittels NMR-Analyse validiert.

Zur Überprüfung des tatsächlichen Nährstoffbedarfs der beiden Primärsubstrate Glukose und Glutamin wurden kontinuierliche Chemostatexperimente mit sukzessiver Reduzierung der Einlaufkonzentration der Substrate unternommen. Dabei zeigte sich, daß insbesondere der Bedarf an Glukose drastisch gesenkt werden kann, wohingegen die Verfügbarkeit von Glutamin wichtiger scheint. Die Reduzierung bewirkte eine drastische Änderung im gesamten Aminosäurestoffwechsel. Die Glukosepulzugabe während einer chemostatischen Prozeßführung beeinflusste die Aufnahme der anaplerotischen Aminosäuren des Citratcyclus in negativer Weise, wohingegen umgekehrt ein Glutaminpuls wenig Änderungen im Stoffwechsel hervorrief. Die hier auftretenden Aspekte waren sehr aufschlußreich bei der Transferrierung des Wissens auf das Fed-Batch-System.

Der Fed-Batch-Modus wurde aufgrund des Raum-Zeit-Ausbeute Kriteriums als effizientes System für die Optimierung eines Produktionsprozesses gewählt. Dabei zeigte sich wie schon während der kontinuierlichen Experimente, daß die Etablierung einer Glukosezufütterung keine entscheidende Optimierung für den Prozeß bedeutet, und sich durch eine simultane Zufütterung von Glutamin noch negativer auf das Zellwachstum auswirkt.

Dahingegen induzierte die kontinuierliche Zufütterung eines Asparagin/Glutamin-Mix nach der vollständigen Glukoseverstoffwechslung eine bislang selten beobachtete Remobilisierung des Metaboliten Laktat, die dem klassischen Diauxieverhalten anderer Mikroorganismen entspricht. Durch on-line-Detektion der Komponente Glutamin über ein Fließinjektionssystem und der so ermöglichten kontrollierten Zufütterung, gelang es die Dauer der exponentiellen Phase deutlich auszudehnen, was sich durch Maximierung von Zellzahl und Produkt bemerkbar machte.

## **Danksagung:**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1994 bis Oktober 1997 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Fr. PD. Dr. Gerlinde Kretzmer angefertigt, der ich an dieser Stelle für die mir gebotenen Arbeitsbedingungen und der fachliche Betreuung danken möchte. Insbesondere vielen Dank für die Ermöglichung diverser Auslandsaufenthalte, die viel zur fachlichen Qualität dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Herrn Prof. Dr. Francesc Godia, Universität Autonoma de Barcelona (UAB), danke ich für die Austauschmöglichkeiten wissenschaftlicher und kultureller Art, sowie für wertvolle neue Erkenntnisse in der Zellkulturtechnik und der netten persönlichen Unterstützung während der gesamten Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Jörg Hagedorn und Herrn Dipl.-Chem. Marco Rieseberg für die Unterstützung und Ausführung der on-line Analytik, sowie der kameradschaftlichen Zusammenarbeit. Vielen Dank für die lustigen Runden während unserer nächtlichen Fermentationseinheiten im TCI und an anderen Orten.

Herrn MSc Carles Paredes und Herrn Dr. Jordi Cairo (UAB) danke ich für die Hilfestellungen und Einführung in die metabolische Flußanalyse, sowie für die intensive Diskussionsbereitschaft betreffend allen Fragen biochemischer Natur, sowie allen am UAB (Toni, Xavier, Pau, Albert, Nuria) für die freundliche Aufnahme in der „Secta“.

Herrn Dipl.-Chem. Marcus Hesse, Herrn Dipl.-Chem. Oliver Christel und Herrn Dipl.-Chem. Torsten Buch danke ich für die wertvollen Anregungen und der Diskussionsbereitschaft sowie der konstruktiven Zusammenarbeit während all der Jahre.

Herrn Dr. Ralf Weidemann danke ich für seine hilfreichen Ratschläge während der Neugruppierung des TZL. Dir Ralf, habe ich es zu verdanken, daß ich trotz herber Rückschläge die Lust am „Tierzählen“ nicht verloren habe.

Herrn Dipl.-Chem. Georg Renemann gebührt Dank für seine nette und selbstlose Unterstützung während der Fermentationszeit und allen beantworteten Fragen im Bereich des Sports. Vielleicht konnte auch ich Dir helfen, die hektische Zeit einer halbjährlichen Diplomarbeit etwas gelassener zu sehen.

---

In meiner Dissertationszeit fielen die Diplomarbeiten von Maren Hüners, Georg Renemann, Werner Ramm und Marco Rieseberg, sowie die Schwerpunktarbeiten von Georg Renemann, Jan Werner und Daniela Böhl. Alle Arbeiten haben zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Daher meinen Dank für die nette Unterstützung und viel Erfolg für Eure Zukunft.

Herrn PD Dr. Bernd Hitzmann und seinem Arbeitskreis für die ständige Bereitschaft CAFCA auch für meine Zellkulturanwendungen, insbesondere für Monitoring und Control weiterzuentwickeln. Besonderen Dank an Dich Bernd, so habe ich mir das interdisziplinäre Arbeiten immer vorgestellt.

Herrn PD Dr. Müller danke ich für die Diskussionsbereitschaft und das Einordnen meiner Ergebnisse in die biochemische Fachliteratur.

Herrn Dr. Edgar Hofer (OCI) und seinen Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der NMR spektroskopischen Messungen.

Fr. Martina Weiß für die äußerst zuverlässige Durchführung der Aminosäuremessung und der Hilfestellungen bei Software Problemen aller Art. Danke für Deine Geduld bei meinen Posterproblemen, Martina.

Herrn Wilhelm Behnsen und seinen Mitarbeitern der Mechanik Werkstatt für die Realisierung und Durchführung diverser außergewöhnlicher Arbeiten bezüglich des Fermentations- und FIA-Zubehör und besonders Herrn Burkhard Probst für seine Hilfe bei elektronischen Problemen aller Art.

Allen weiteren Mitarbeitern der Biotechnologiegruppe danke ich für die schöne Zeit am TCI. Durch den Eindruck einer „großen Familie“ haben alle viel zur mentalen Stärke beigetragen und gezeigt, daß man nie mit seinen Problemen alleine ist.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Austauschprojekt „Acciones Integradas“ und der European Society of Animal Cell Technology (ESACT) für die Teilnahme am 14. und 15. ECACT Meeting.

Fr. Dipl.-Finw. Heike Schicker danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Korrekturarbeit und Formulierungshilfe.

Dir, Heike und meiner gesamten Familie gebührt der höchste Respekt von allen, habt Ihr doch am meisten Entbehrungen während der gesamten Zeit auf Euch nehmen müssen. Ohne Eure Anteilnahme und finanzielle Unterstützung (speziell aber Deinem moralischen Beistand, Heike), hätte ich diese Sache nie in dieser Konsequenz durchführen können.

Holger Lübben, Oktober 1997

## Inhalt

<b>1.EINFÜHRUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>5</b>
2.1 DAS PRODUKT ANTITHROMBIN III.....	5
2.2 ZELLULÄRE TRANSPORTSYSTEME.....	6
2.2.1 MALAT-ASPARTAT-TRANSPORTSYSTEM.....	7
2.3 WEITERE TRANSPORTSYSTEME .....	10
2.3.1 AMINOSÄURE- UND PEPTIDTRANSPORT.....	11
2.4 METABOLIC-ENGINEERING.....	12
2.5 PRODUKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUS.....	13
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
3.1 DIE CHO-ZELLINIE.....	16
3.2 MEDIUM.....	16
3.3 KULTIVIERUNGSSYSTEME .....	16
3.4 OFF-LINE-ANALYTIK.....	17
3.4.1 ORGANISCHE SÄUREN .....	18
3.5 ON-LINE-ANALYTIK .....	19
3.6 BERECHNUNG VON METABOLISCHEN FLÜSSEN DER CHO SS0/A2 ZELLINIE UNTER ANWENDUNG STÖCHIOMETRISCHER STOFFBILANZEN .....	22
3.7 NMR SPEKTROSKOPISCHE METHODEN .....	26
3.8 WACHSTUMSKINETIK.....	27
3.9 SPEZIFISCHE VERBRAUCHS- UND BILDUNGSRATEN.....	28
3.10 DER PROZEßMODUS DER KONTINUIERLICHEN KULTIVIERUNG OHNE ZELLRÜCKHALTUNG (CHEMOSTAT).....	29
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>32</b>
4.1 BERECHNUNG VON METABOLISCHEN FLÜSSEN EINER CHO-ZELLINIE UNTER ZU HILFENAHME VON STOFFBILANZEN.....	32
4.1.1 METHODISCHES VORGEHEN .....	33
4.1.1.1 Bestimmung des für die Berechnung relevanten Wachstumsintervalls.....	33
4.1.1.2 Berechnung der Wachstumsrate, sowie der spezifischen Verbrauchs- bzw. Bildungsraten der extrazellulär gemessenen Komponenten. ....	36
4.1.1.2.1 Wachstumsrate.....	36
4.1.1.2.2 Berechnung der spezifischen Raten .....	36
4.2 MASSENBILANZEN .....	37
4.3 ERSTELLUNG DES REAKTIONSNETZWERKES.....	39
4.4 STOFFWECHSELLAGE UND INTERPRETATION .....	39
4.4.1 KATABOLER UND ANABOLER STOFFWECHSEL.....	40
4.4.2 LIPIDSYNTHESE .....	43
4.4.3 DNA SYNTHESE.....	43
4.4.4 RNA SYNTHESE.....	43

4.4.5	PROTEINBIOSYNTHESE.....	43
4.4.6	TRANSPORTSYSTEME.....	44
4.5	VALIDIERUNG MITTELS <sup>13</sup> C MARKIERTER GLUKOSE.....	45
4.5.1	SCHLUßFOLGERUNGEN.....	49
4.6	CHEMOSTATISCHE PROZEßFÜHRUNG .....	50
4.6.1	Kontinuierliche Prozeßführung mit Pulszugabe von Glutamin und Glukose.....	50
4.6.1.1	Bestimmung der Zellzahlen .....	51
4.6.1.2	Bestimmung der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten.....	52
4.6.1.3	Beeinflussung des Aminosäurestoffwechsels .....	53
4.6.2	KONTINUIERLICHE PROZEßFÜHRUNG ZUR BEURTEILUNG DER TATSÄCHLICH BENÖTIGTEN SUBSTRATMENGE .....	55
4.6.2.1	Glukosereduzierung .....	56
4.6.2.1.1	Verlauf der Biomasse bei Variation der Glukosekonzentration.....	56
4.6.2.1.2	Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glukose und Biomasse/Glutamin.....	58
4.6.2.1.2a	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glukose ( $\theta_{X/Glc}$ ) .....	58
4.6.2.1.2b	Ausbeutekoeffizient Biomasse/Glutamin.....	59
4.6.2.1.3	Glukoseverstoffwechslung und Laktatproduktion.....	61
4.6.2.1.4	Aminosäureverläufe.....	64
4.6.2.2	Glutaminreduzierung .....	67
4.6.2.2.1	Zellkonzentration und Ausbeutekoeffizienten Biomasse/Glutamin ( $\theta_{X/Gln}$ ), sowie Biomasse/Glukose ( $\theta_{X/Glc}$ ).....	67
4.6.2.2.2	Glukose- und Laktatstoffwechsel.....	70
4.6.2.2.3	Aminosäureverstoffwechslung unter glutaminreduzierten Bedingungen.....	71
4.7	OPTIMIERUNG VON WACHSTUMS- UND PRODUKTIONSEIGENSCHAFTEN DURCH FED BATCH KULTIVIERUNGEN. ....	73
4.7.1	FERMENTATION MIT PULSWEISER GLUKOSEFÜTTERUNG (FGLUC).....	73
4.7.1.1	Wachstumskurve.....	74
4.7.1.2	Stoffwechsel.....	75
4.7.1.3	Produktivität.....	80
4.7.1.4	Zusammenfassung.....	81
4.7.2	FÜTTERUNG VON GLUKOSE UND GLUTAMIN (FGLN).....	81
4.7.2.1	Zellwachstum und Vitalität.....	82
4.7.2.2	Produktion.....	88
4.7.3	Induktion eines Diauxieverhalten durch spezielle Fütterungstechniken (FnGln) ...	89
4.7.3.1	Zellwachstum und Stoffwechsel .....	90
4.7.3.2	Makroskopische Äußerung der zellinternen Vorgänge.....	95
4.7.3.3	Produktion.....	96
4.7.3.4	Zusammenfassung.....	97
4.7.4	OPTIMIERUNG DURCH KONTINUIERLICHE ZUFÜTTERUNG VON GLUTAMIN/ASPARAGIN .	98
4.7.4.1	Glutaminkonzentrationsprofil .....	98
4.7.4.2	Primärstoffwechsel und Biomasse .....	99
4.7.4.3	Gesamt-Aminosäurestoffwechsel .....	101
4.7.4.4	Alaninstoffwechsel .....	103
4.7.4.5	Limitierung des Wachstum durch aromatische Aminosäuren .....	104
4.7.5	EINFLUß DER GLUKOSEINGANGSKONZENTRATION (FREDGLC).....	105
4.7.5.1	Wachstumskurve.....	106
4.7.5.2	Glukose und Laktatmetabolismus.....	107
4.7.5.3	Aminosäurestoffwechsel.....	112
4.7.5.4	Organische Säuren .....	115
4.7.5.5	Produktexprimierung .....	116
4.7.5.6	Zusammenfassung.....	117

---

4.7.6 ZUFÜTTERUNG WEITERER ESSENTIELLER AMINOSÄUREN ( <i>FAROMAS</i> ) .....	117
4.7.6.1 Zellwachstum .....	118
4.7.6.2 Primärstoffwechselverhalten.....	119
4.7.6.3 Aminosäurestoffwechsel.....	122
4.7.6.4 Konzentrationsverläufe der gefütterten essentiellen Aminosäuren.....	124
4.7.6.5 Produktion.....	125
4.7.6.6 Zusammenfassung.....	127
4.8 VERGLEICH DER PROZEßPARAMETER .....	128
4.8.1 ZUSAMMENFASSUNG .....	132
4.9 WACHSTUM UND STOFFWECHSEL WÄHREND DER KULTIVIERUNG MIT GLUTAMAT ALS GLUTAMINERSATZ.....	135
4.9.1 SCHLUßFOLGERUNGEN.....	138
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>139</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>144</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>152</b>
7.1 SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN .....	152
7.2 REAKTIONEN DES STÖCHIOMETRISCHEN NETZWERK.....	153
7.3 PHOTOGRAPHIEN.....	156

## 1. Einführung und Zielsetzung

Bereits seit Beginn der 60er Jahre sind Impfstoffe und Antikörper mit tierischen Zellen „in vitro“ herstellbar. Durch die Einführung der rekombinanten DNA-Technologie 1982 wurde die Produktion rekombinanter Proteine mit Zellkulturen ermöglicht. Seitdem entwickelte sich die Zellkulturtechnik mehr und mehr zur Schlüsseltechnologie vor allem für Produktion hochwertiger therapeutischer Pharmazeutika. Heutzutage werden diverse humane Proteine wie Faktor VIII, Faktor VII, AT-III, t-PA, monoklonale Antikörper, Erythropoetin, Interferon- $\gamma$ , Interferon-2 über die Massenkultivierung tierischer Zellen hergestellt<sup>[1][2]</sup>.

Obwohl mittlerweile eine Vielzahl kleinerer Proteine (Insulin, Wachstumsfaktoren) über die Expressionssysteme diverser Hefen und Bakterienkulturen herstellbar sind<sup>[3]</sup>, ist die Produktion des Großteil der komplexeren Proteine nur mittels der hoch spezialisierten Syntheseapparate (Golgi Apparat, ER) tierischer Zellen möglich. Die Enzyme dieser Kompartimente führen Syntheseschritte durch, die primär nicht die Aminosäuresequenz oder nur die Faltung des Proteins betreffen, sondern auf posttranslationale Modifikationen abzielen. Die Vielzahl der komplexeren Produkte sind sogenannte Glykoproteine, deren Gewicht z.T. bis zu 50 % auf die Kohlenhydratseitenketten zurückzuführen ist, über die die biologische Aktivität des Therapeutikums streng definiert ist. So bewirkt die N-Glykosylierung an bestimmten Asparagin-Stellen im Protein einerseits eine bessere Löslichkeit des nativen Proteins (vorwiegend im wässrigen Milieu), andererseits wird durch die Glykosylierung eine sterische Konformation erzeugt, die das aktive Zentrum je nach Anzahl der Seitenketten stimulieren oder inaktivieren kann. Bei Proteinen, deren Glykosylierung die biologischen Aktivität determiniert, ist in einem Zulassungsverfahren die Übereinstimmung der Glykosylierung mit dem humanen Protein das Kriterium für die Qualitätssicherung. Die Bemühung, die Produktheterogenität zu minimieren scheint von oberster Priorität. So weisen viele humane Glykoproteine biantenäre Strukturen auf, dahingegen werden bei der Produktion über Zellkulturen häufig komplexere tri-, und tetraantenäre Strukturelemente nachgewiesen, die je nach Kultivierungsbedingungen und Zelltyp variieren<sup>[4][5]</sup>.

In neuerer Zeit erweitert sich das Anwendungsspektrum tierischer Zellen durch effizientere Immortalisierungs- und Transformierungstechniken diverser primärer Zelllinien (Hepatozyten, Kardiomyozyten, Keratinozyten, Endothelzellen etc.) für klinische Zwecke (Kolokoltsowa et al., Bader et al., Al-Rubeai et al.)<sup>[5]</sup>. Neben der bislang vorwiegenden Kultivierung zur

Produktion rekombinanter Proteine werden unterschiedliche Zelltypen wegen ihrer vielfältigen Biotransformationsmöglichkeiten für „in vitro“ toxikologische Untersuchungen neuer Medikamente oder deren Transformationsmetabolite (insbesondere Hepatozyten) verwendet. Weiterhin sind primäre Zellkulturtestsysteme für die Erforschung der Ersatzmöglichkeiten humaner durch „bioartifizierender“ Organe sehr nützlich (Pörtner et al., Hinton et al.)<sup>[5]</sup>. So werden bei Erkrankungen in der Hematopoese (Meißner et al., Möbest et al.)<sup>[5]</sup> dem Patienten Knochenmarkstammzellen entnommen, und „in vitro“ vermehrt, um sie dem Patienten dann in größerer Menge zurückzugeben, wo sie „in vivo“ ihre Aufgabe als differenzierende Zelle wieder wahr nehmen. Studien bezüglich der Differenzierungskontrolle von Stammzellen werden zurzeit simuliert. Auch auf dem Gebiet der Hauttransplantation, der Organverpflanzung (Leber, Niere, Pankreas) werden adäquate Zelltypen für „in vitro“ Studien benötigt<sup>[5]</sup>. Letztendlich sollen auch Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Gentherapie, sowie die Vakzinproduktion genannt werden (Faure et al., Boesen et al., Kessler et al.)<sup>[5]</sup>. Auch dort zeigen sich die definierten Bedingungen der Produktion über Zellkulturen von Vorteil.

Andererseits entwickelt sich die Produktion rekombinanter Proteine mittels *transgener* Tiere zur konkurrenzfähigen Alternative im Hinblick auf die Zellkultur. Mittlerweile werden mehr als 50 Proteine wie z.B. Antithrombin,  $\alpha_1$ -antiTrypsin, Lactoferrin oder Protein C, über die Milch transgener Mäuse, Ziegen und Schafe hergestellt (Houdebine et al., Meade et al., Werner et al.)<sup>[5]</sup>. Alle Produktionsbeispiele befinden sich momentan in der Zulassung für den kommerziellen Vertrieb. Im Bereich der Produktivität und der Ökonomie scheint der Vorteil dieser Technologie offensichtlich. (Produkttitel im Bereich g/L, Herstellungspreis pro Gramm 500-700 DM)<sup>[5]</sup>. Lediglich die geforderte Human-Identität einiger Proteine weist deutliche Mängel auf (unterglykosyliert, Spaltprodukte in der Milch). Des Weiteren kann die Produktion einiger Proteine nicht mit der Tierphysiologie in Einklang gebracht werden (human Erythropoietin). Aber auch die Aufreinigung der Produkte (heterogenes Ausgangsmaterial) und das Risiko viraler Kontaminationen oder pathogener Prionen (Scrapies, Bovine Spongiform Encephalitis, BSE) stellen weitere noch zu lösende Probleme dar.

Die Produktion humaner Biopharmazeutika über tierische Zellkulturen wird durch die einfache Handhabung im Produktionsverfahren erleichtert. Wird das Produkt bei *E.coli*-Zellen noch als „Inclusion Bodies“ gespeichert und erst durch Aufschluß der Zelle gewonnen, so sekretieren animalische Zellen das Produkt nativ und das Protein kann abgeerntet werden, ohne die Zelle zu zerstören. Aus diesem Grund zielen viele der großtechnischen

Produktionsanlagen auf kontinuierliche Systeme im Perfusionsverfahren ab, da hier das Produkt ständig abgeerntet werden kann, die Zellen jedoch im Reaktor verbleiben und dort bei ständiger Versorgung durch Nährstoffe potentiell in der Lage sind dauerhaft zu produzieren. Kontinuierliche Systeme garantieren ein Produkt gleichbleibender Qualität, da sich durch die Art der Prozeßführung kaum Gradienten in der Nährstoffzusammensetzung, und der aus deren Metabolisierung resultierenden Metabolitakkumulation ergeben. Der Einfluß diverser Metabolite auf die Glykosilierung der Produkte wurde berichtet<sup>[5]</sup>. Im Vergleich mit Prokaryonten sind tierische Zellkulturen durch die niedrige Biomasse wenig produktiv, des weiteren ist eine Kontaminationsanfälligkeit über Mikroorganismen durch die geringe Wachstumsgeschwindigkeit gegeben. Das Risiko einer Infektion wirkt sich durch die enorm hohen Mediumskosten und dem höheren apparativen sowie zeitlichen Aufwand nachteilig auf den Produktionsprozeß aus. Dennoch wird dies durch die qualitativ hohe Wertschöpfung der Produkte kompensiert.

Ist die Homogenität der Produktglykosilierung nicht entscheidend, kommen heutzutage andere Prozeßmodi wie Batch- oder Fed-Batch-Kultivierung zum Einsatz. Diese Systeme erzielen in kürzerer Zeit und unter ökonomischen Gesichtspunkten ähnlich gewünschte Produktmengen. Die Ausnutzung der Medien stellt grundsätzlich ein Problem dar, sind doch die Nährstoffanforderungen einer jeden Zelle durchaus verschieden<sup>[6][7]</sup>. Der kommerzielle Vertrieb dieser Medien zielt auf ein breites Anwendungsgebiet ab, so daß es diverser Optimierungsschritte bedarf, um für eine spezielle Zelllinie optimale Bedingungen hinsichtlich der Biomasse- und Produktmaximierung zu erreichen.

Die Erforschung und das Verständnis des Metabolismus der Zelle ist der Schlüssel für die erfolgreiche Realisierung einer ökonomischen Prozeßführung. Transformierte Zelllinien „in vitro“ zeigen einen deregulierten Stoffwechsel im Vergleich zu Zellen „in vivo“. Insbesondere die Glykolyse scheint überdimensional, die Verschwendung der wertvollen Substrate unnötig. Gerade aus diesem Grund bedarf es der Kenntnis, welche Anforderungen die Zelle an das Medium stellt.

Welche Menge und welche Komponenten werden tatsächlich für Wachstum oder Erhaltung der Zellfunktionen benötigt und wie kann man diesen Prozeß entsprechend leiten, so daß eine Minimierung der Verschwendung der Substrate erreicht wird ?

Im folgenden soll eine Charakterisierung des Stoffwechsels einer rekombinanten CHO Suspensionszelllinie vorgenommen werden. Dabei muß insbesondere der Einfluß unterschiedlicher Prozeßführungen (Batch, Fed-Batch und Chemostat mit und ohne

Nährstoffpuls) auf den Stoffwechsel getestet werden. Des Weiteren soll in Zusammenarbeit mit dem Hersteller die Mediumsbeschaffung variiert werden, d.h. der Einfluß der Substratkonzentration und Substratzusammensetzung untersucht werden. Dabei ist die Charakterisierung der Hauptstoffwechselwege nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ durchzuführen. Ermöglicht wird dies durch die Etablierung neuer Analyse- und Modellierungsmethoden („Metabolic-Flux-Analysis“). Es werden Vergleiche durchgeführt und Unterschiede zur einschlägigen Literatur herausgearbeitet.

Anhand der Beurteilung des Metabolismus unter verschiedenen Bedingungen soll das für die Produktion des Antithrombin-III am besten geeignete Verfahren ermittelt werden. Damit der Prozeß kontrolliert verlaufen kann, d.h. Substrat- und Metabolitkonzentrationen im Rahmen der tollerierbaren Grenzen konstant gehalten werden können, sind die dafür notwendigen und den Ansprüchen genügenden Analyseverfahren zu entwickeln. Deren Anwendbarkeit ist am Prozeß zu validieren.

Anschließend werden Schritte implementiert, die auf eine verfahrenstechnische Optimierung der Zellkonzentration, des Produkttiters und der Substratausnutzung hinzielen.