



Entwicklung und Optimierung eines Herstellungsprozesses für einen Parvovirus-Impfstoff im Rührreaktor und Wave[®] Bioreaktor

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

von: Dipl.-Ing. (FH) Boris Hundt

geb. am: 22.10.1976

in: Bernburg/Saale

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
Prof. Dr. Thomas Noll

eingereicht am: 08.05.2007

Promotionskolloquium am: 20.09.2007

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 20

Boris Hundt

**Entwicklung und Optimierung eines
Herstellungsprozesses für einen Parvovirus-Impfstoff
im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor**

Shaker Verlag
Aachen 2008

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2007

Copyright Shaker Verlag 2008

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-6852-7

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Summary

For virus propagation in vaccine manufacturing processes conventional systems, e. g. embryonated eggs and animal cells grown in static cultivation systems such as cell stacks and roller bottles, are still widely used. These processes are not state-of-the art, but are still used due to their ease of handling. Recent research developments point to the transfer of these processes to modern technologies, such as microcarrier culture in connection with disposable bioreactors, mainly due to production capacity limitations of conventional systems in case of pandemics (SARS, Influenza).

The aim of this PhD thesis was to optimize a production process for a commercial mink enteritis virus (MEV) vaccine with embryonic feline lung fibroblasts (E-FL) by transferring an existing process from roller bottles to microcarrier culture (Cytodex™ 1) in 10 L scale. Furthermore, virus yield and process technology should be improved. First, the existing process was characterized in terms of cell growth, metabolism and virus propagation to obtain a benchmark for process optimizations. In a next step, the process was transferred to microcarrier batch and repeated-batch culture resulting in optimal distribution of the cells on microcarriers and cell numbers of $1.2 \cdot 10^6$ cells \cdot mL⁻¹ in a stirred-tank and a Wave® bioreactor. MEV propagation in these microcarrier systems led to technological improvements and to a 10-fold enhanced virus yield ($10^{6.5} - 10^{7.5}$ TCID₅₀ \cdot mL⁻¹) compared to roller bottles (one 10 L Wave® bioreactor replaces 450 roller bottles with 850 cm²). This so-called "Microcarrier-Process I" was successfully used at Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH (IDT) for the production of three validation batches of a MEV vaccine in Wave® bioreactors (50 L scale).

Further experiments for process optimization using perfusion strategies with a self-developed perfusion module led to high cell densities of up to $6.5 \cdot 10^6$ cells \cdot mL⁻¹ and indicated process modifications for the establishment of a continuous virus harvest. Although the virus titres were lower ($\approx 10^{5.0}$ TCID₅₀ \cdot mL⁻¹) compared to the multiple harvest scheme used so far, the technological potential of such a closed system became clearly visible. Options for further industrial use of this so-called "Microcarrier-Process II" should be evaluated by conducting more experiments and use of a mathematical process description in combination with flow cytometry analysis.

Zusammenfassung

Bei der Impfstoffherstellung werden zur Virusvermehrung häufig noch herkömmliche Verfahren, d. h. Prozesse unter Verwendung von Hühnereiern oder tierischen Zellen in statischer Kultur (Wannenstapel, Rollerflaschen), eingesetzt. Diese Verfahren werden auf Grund ihrer Einfachheit genutzt, stellen jedoch nicht den aktuellen Stand der Forschung dar. Auch unter dem Aspekt der bei plötzlich steigendem Bedarf an Impfstoffen im Falle von Epidemien (SARS, Influenza) kurzfristig limitierten Produktionskapazitäten steht die Umstellung der Prozesse auf modernere Systeme, wie z. B. die Microcarrierkultur, besonders in Verbindung mit "disposable bioreactors", derzeit im Fokus der Forschung.

In diesem Zusammenhang ist auch die vorliegende Arbeit zu sehen: ein Produktionsverfahren für einen Mink Enteritis Virus (MEV)-Impfstoff auf embryonalen feline Lungenfibroblasten (E-FL) sollte durch den Transfer des Verfahrens in Microcarriersysteme (Cytodex[™] 1) bis zum 10 L-Maßstab sowohl hinsichtlich der Virusausbeuten als auch des technologischen Designs optimiert werden. Dazu wurde zunächst der statische Prozess bezüglich Zellwachstum, Stoffwechsel und Virusausbeute untersucht, um Ansatzpunkte für einen Verfahrenstransfer zu finden. In einem nächsten Schritt wurde dann das Verfahren in Microcarriersysteme übertragen. Dabei wurden im Batch- bzw. Repeated-Batch Betrieb eine optimale Belegung der Carrier und Zellzahlen von $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Rührreaktor und Wave[®] Bioreaktor erreicht. Die Virusvermehrung in Microcarriersystemen erbrachte - neben einer erheblichen technologischen Verbesserung - etwa um den Faktor 10 höhere Ausbeuten ($10^{6,5} - 10^{7,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Vergleich zum bisherigen Verfahren in Rollerflaschen (ein 10 L Wave[®] Bioreaktor ersetzt 450 Rollerflaschen mit 850 cm²). Dieses als "Microcarrier-Prozess I" bezeichnete Verfahren wurde am Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH (IDT) erfolgreich zur Produktion von drei Validierungschargen im Wave[®] Bioreaktor (50 L - Maßstab) eingesetzt.

Weitere Experimente zur Prozessoptimierung unter Verwendung von Perfusionsstrategien mit einem selbst entwickelten Perfusionsmodul brachten neben sehr hohen Zellausbeuten von bis zu $6,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ auch Ansatzpunkte zur Etablierung eines kontinuierlichen Virusernteverfahrens. Trotz der hier im Vergleich zum bisher verwendeten Mehrfachernte-Schema noch geringeren Virusausbeute ($\approx 10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurde das technologische Potenzial eines solchen geschlossenen Systems deutlich. Die Möglichkeiten eines späteren industriellen Einsatzes dieses so genannten "Microcarrier-Prozess II" sollten durch weitere Untersuchungen unter Nutzung einer mathematischen Prozessbeschreibung im Zusammenhang mit durchflusssytemetrischen Analysen bewertet werden.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Steckby, 08.05.2007

Boris Hundt

Meinen Eltern, Karl und Christa Hundt, und meinen Großeltern gewidmet.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer Industriekooperation zwischen dem Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg von Februar 2002 – Mai 2005 durchgeführt.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl für die Betreuung der Arbeit, viele hilfreiche Diskussionen sowie die Bereitstellung exzellenter Arbeits- und Forschungsbedingungen. Bei Professor Dr. Thomas Noll (Lehrstuhl Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld) bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Von Seiten des IDT geht mein sehr herzlicher Dank an Herrn Horst Kaßner und Dr. Andreas Neubert für die Bereitstellung eines spannenden Themas aus der Industrie, die Versorgung mit neuen Geräten (Wave[®] Bioreaktor), Zellen und Virusmaterial sowie viele hilfreiche Tipps beim Start der Arbeiten. Mein Dank geht auch an viele weitere namentlich nicht genannte Mitarbeiter des IDT, die mir bei Fragen und Problemen zur Seite standen. Besonderer Dank geht auch an den Bereichsleiter Forschung und Entwicklung des IDT, Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Selbitz, für die freundliche Unterstützung.

Bei Ilona Behrendt und Susanne König vom MPI Magdeburg möchte ich mich für die Anleitung bei meinen ersten Schritten in der Zellkultur und die weitere Unterstützung herzlich bedanken. Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Claudia Best, Nancy Schlawin und an meine Diplomandin, Sabine Straube, die mit mir gemeinsam am Reaktor standen und ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

Für das Korrekturlesen der Arbeit sowie hilfreiche Tipps und Anmerkungen danke ich Dagmar Hundt, Sabrina Wolff und Marina Stach sehr herzlich. Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Yvonne Genzel für viele sehr hilfreiche Diskussionen und Tipps bei der praktischen Arbeit und dem Verfassen dieser Dissertation. Allen Doktoranden und Mitarbeitern am MPI besonders Andreas Bock, Julia Schmidt, Lars Möhler, Bernd Kalbfuß, Joachim Ritter, Dr. Heiner Sann und Josef Schulze-Horsel ein herzliches Dankeschön für die tolle Zeit.

Der größte Dank von allen geht aber an meine Eltern, Karl und Christa Hundt, die immer für mich da und an meiner Seite waren. Ihr seid die Besten...!!!

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung und Aufgabenstellung</i>	1
1.1	Der etablierte industrielle Prozess zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Mink Enteritis _____	1
1.2	Aufgabenstellung _____	4
2	<i>Theoretische Grundlagen</i>	5
2.1	Allgemeine Aspekte der Impfstoffentwicklung _____	5
2.1.1	<i>Kurze Einführung in die Geschichte der Impfstoffe</i>	5
2.1.2	<i>Aktuelle Tendenzen auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung und –herstellung</i>	7
2.2	Biologische Aspekte bei der Impfstoffherstellung _____	8
2.2.1	<i>Kultivierung tierischer Zellen</i>	8
2.2.2	<i>Der Stoffwechsel tierischer Zellen unter in-vitro Bedingungen</i>	14
2.2.2.1	<i>Allgemeines zum Stoffwechsel tierischer Zellen</i>	14
2.2.2.2	<i>Inhibierungen des Stoffwechsels durch Laktat und Ammonium</i>	17
2.2.2.3	<i>Nährmedien in der tierischen Zellkultur</i>	18
2.2.2.4	<i>Sauerstoff als Substrat für tierische Zellen</i>	19
2.2.3	<i>Der Zellzyklus tierischer Zellen</i>	22
2.2.4	<i>Das Mink Enteritis Virus (MEV) – Ein Parvovirus</i>	24
2.3	Technologische Aspekte bei der Impfstoffherstellung _____	29
2.3.1	<i>Prozessführungsstrategien</i>	29
2.3.2	<i>Bioreaktoren für die tierische Zellkultur</i>	33
2.3.3	<i>Microcarrier als Kultivierungssubstrate für adhärente tierische Zellen</i>	37
2.3.4	<i>Zusammenfassung der verwendeten Gleichungen zur Prozessbeschreibung</i>	38
3	<i>Material und Methoden</i>	43
3.1	Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien _____	43
3.2	Liste der Chemikalien und Einsatzstoffe _____	44
3.3	Verbrauchslösungen und verwendete Zellkulturmedien _____	45
3.3.1	<i>Verbrauchslösungen</i>	45
3.3.2	<i>Zellkulturmedium</i>	48
3.4	Das biologische System _____	49
3.4.1	<i>Embryonale feline Lungenfibroblasten (E-FL)</i>	49
3.4.2	<i>Mink Enteritis Virus (MEV)</i>	52

3.5	Verwendete Kultivierungssysteme und -bedingungen	53
3.5.1	<i>Kultivierung der E-FL in statischen und semistatischen Systemen (Arbeitsvolumen 20 – 250 mL)</i>	53
3.5.2	<i>Kultivierung der E-FL in der Multifermentieranlage „Sixfors“ (Arbeitsvolumen 0,15 – 0,50 L)</i>	53
3.5.3	<i>Kultivierung der E-FL im Labor-Rührreaktor (Arbeitsvolumen 3,5 – 5,0 L)</i>	54
3.5.4	<i>Kultivierung der E-FL im Wave® Bioreaktor (Arbeitsvolumen 1 - 10 L)</i>	55
3.6	Analytische Methoden	56
3.6.1	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Trypan-Blau Methode</i>	57
3.6.2	<i>Virustitration zur Bestimmung des Gehaltes an infektiösem Virus</i>	58
3.6.3	<i>Messung der extrazellulären Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium</i>	60
3.6.4	<i>Durchflusszytometrie</i>	61
3.7	Mikroskopische Analysemethoden	62
3.7.1	<i>Lichtmikroskopische Analysen</i>	62
3.7.2	<i>Laser-Scanning-Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie</i>	63
3.8	Versuchsaufbau und Betriebsparameter für die Kultivierung der E-FL in Perfusion	63
3.8.1	<i>Aufbau der Perfusion im Wave® Bioreaktor</i>	64
3.8.2	<i>Aufbau der Perfusion im Rührreaktor</i>	65
3.9	Vorversuche zu grundlegenden Fragestellungen	66
3.9.1	<i>Einführung eines Korrekturfaktors für die Zellzahlbestimmung</i>	66
3.9.2	<i>Bestimmung morphologischer Parameter von E-FL Zellen im statischen System</i>	68
3.9.3	<i>Temperaturstabilität des Mink Enteritis Virus bei 4 °C und 37 °C</i>	70
3.9.4	<i>Bestimmung der Glutaminstabilität im Zellkulturmedium bei 37 °C</i>	71
3.9.5	<i>Charakterisierung des Sauerstoffübergangs (k_{1a}-Wert) im Rührreaktor und im Wave® Bioreaktor</i>	73
4	Ergebnisse	75
4.1	Wachstum und Stoffwechsel der E-FL und Vermehrung von MEV im statischen System	75
4.1.1	<i>Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Gewebekulturflaschen</i>	75
4.1.2	<i>Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Rollerflaschen</i>	78
4.1.3	<i>Vermehrung von MEV im statischen System</i>	80
4.1.3.1	<i>Vermehrung von MEV in Gewebekulturflaschen (75 cm²) im Einfachernte-Schema</i>	81
4.1.3.2	<i>Vermehrung von MEV in Rollerflaschen (850 cm²) im Mehrfachernte-Schema</i>	85
4.1.3.3	<i>Vermehrung von MEV in Rollerflaschen (850 cm²) im Einfachernte-Schema</i>	89
4.1.4	<i>Zusammenfassung ermittelter Parameter für Wachstum und Stoffwechsel der E-FL sowie die Vermehrung von MEV in statischen Systemen</i>	93

4.2 Zellkultivierung in Microcarriersystemen im Batch-Betrieb	96
4.2.1 <i>Microcarrierkultivierungen der E-FL im 5 L-Rührreaktor (Batch-Betrieb) unter Variation der Microcarrierkonzentration und Einsaat-Zellzahl</i>	96
4.2.1.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im 5 L-Rührreaktor</i>	96
4.2.1.2 <i>Sauerstoffaufnahme der E-FL im 5 L-Rührreaktor</i>	99
4.2.1.3 <i>Stoffwechsel der E-FL im 5 L-Rührreaktor</i>	101
4.2.1.4 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse für Wachstum und Stoffwechsel der E-FL im 5 L-Rührreaktor</i>	104
4.2.2 <i>Transfer des Kultivierungsverfahrens vom 5 L-Rührreaktor in den Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) im Batch-Betrieb</i>	105
4.2.2.1 <i>Zellwachstum und –morphologie von E-FL im 1 L-Wave® Bioreaktor</i>	105
4.2.2.2 <i>Stoffwechsel von E-FL im 1 L-Wave® Bioreaktor</i>	106
4.2.3 <i>Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme für E-FL im Batch-Betrieb</i>	107
4.3 Optimierung des Prozesses durch Einsatz von Perfusionsverfahren	109
4.3.1 <i>Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch I (0,5 L-Rührreaktor)</i>	109
4.3.1.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch I</i>	110
4.3.1.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch I</i>	112
4.3.2 <i>Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch II (0,5 L-Rührreaktor)</i>	114
4.3.2.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch II</i>	115
4.3.2.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch II</i>	116
4.3.3 <i>Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch III (0,5 L-Rührreaktor)</i>	118
4.3.3.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch III</i>	119
4.3.3.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch III</i>	120
4.3.4 <i>Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch IV im 1 L-Wave® Bioreaktor</i>	122
4.3.4.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch IV</i>	122
4.3.4.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch IV</i>	124
4.3.5 <i>Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme für E-FL im Perfusions-Betrieb</i>	125
4.4 MEV-Infektion in Rührreaktoren und Wave® Bioreaktoren	127
4.4.1 <i>MEV-Vermehrung im Versuch MEV 1 (0,5 L-Rührreaktor)</i>	127
4.4.1.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Versuch MEV 1</i>	128
4.4.1.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 1</i>	129
4.4.1.3 <i>Vermehrung von MEV im Versuch MEV 1</i>	131
4.4.2 <i>MEV-Vermehrung im Versuch MEV 2 (0,5 L-Rührreaktor)</i>	132
4.4.2.1 <i>Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Versuch MEV 2</i>	133
4.4.2.2 <i>Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 2</i>	134
4.4.2.3 <i>Vermehrung von MEV im Versuch MEV 2</i>	137
4.4.3 <i>MEV-Vermehrung im Versuch MEV 3 (1 L-Wave® Bioreaktor)</i>	138
4.4.3.1 <i>Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 3</i>	139
4.4.3.2 <i>Charakterisierung der MEV-Vermehrung im Versuch MEV 3</i>	140
4.4.4 <i>MEV-Vermehrung im Versuch MEV 4 (1 L-Wave® Bioreaktor)</i>	140

4.4.4.1	Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 4	141
4.4.4.2	MEV-Vermehrung im Versuch MEV 4	142
4.4.5	MEV-Vermehrung im Versuch MEV 5 (10 L-Wave® Bioreaktor)	143
4.4.5.1	Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 5	143
4.5.5.2	MEV-Vermehrung im Versuch MEV 5	144
4.4.6	Vergleich der MEV-Vermehrung im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor	145
4.5	Transfer des MEV-Produktionsprozesses in ein kontinuierliches Ernteverfahren unter Perfusionsbedingungen	147
4.5.1	Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 1 (0,5 L-Rührreaktor)	147
4.5.1.1	Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 1	148
4.5.1.2	Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 1	149
4.5.2	Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 2 (1 L-Wave® Bioreaktor)	150
4.5.2.1	Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 2	151
4.5.2.2	Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 2	152
4.5.3	Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 3 (1 L-Wave® Bioreaktor)	153
4.5.3.1	Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 3	153
4.5.3.2	Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 3	154
4.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen zum E-FL Wachstums und zur MEV-Vermehrung im Rührreaktor	155
4.6.1	Durchflusszytometrische Untersuchung einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	156
4.6.1.1	Zellwachstum und –morphologie einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	156
4.6.1.2	Zellzyklus und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	157
4.6.2	Durchflusszytometrische Untersuchung einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	158
4.6.2.1	Zellwachstum und –morphologie einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	159
4.6.2.2	Zellzyklus und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)	160
5	Diskussion	162
5.1	Wachstum und Stoffwechsel der E-FL sowie Vermehrung von MEV in statischen Systemen	162
5.1.1	Zellwachstum der E-FL in statischen Systemen	162
5.1.2	Stoffwechselraten der E-FL in statischen Systemen	163
5.1.3	MEV-Vermehrung in statischen Systemen	165

5.2	Etablierung eines Herstellungsprozesses für MEV mit Mehrfachernte-Schema (Microcarrier-Prozess I)	166
5.2.1	<i>Zelladhäsion und Wachstum der E-FL in Microcarriersystem im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor</i>	166
5.2.2	<i>Stoffwechsel der E-FL in Microcarriersystemen im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor</i>	168
5.2.3	<i>MEV-Ausbeuten in Microcarriersystemen im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor</i>	169
5.2.4	<i>Scale-Up des Verfahrens "Microcarrier-Prozess I" und Transfer zum IDT – Produktion von drei Validierungschargen im 50 L-Maßstab im Wave® Bioreaktor</i>	171
5.2.5	<i>Weiterführende Prozessanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie</i>	174
5.3	Ansätze zur Etablierung eines Herstellungsprozesses für MEV in kontinuierlicher Ernte ("Microcarrier-Prozess II")	176
5.3.1	<i>Zellwachstum unter Perfusionsbedingungen</i>	176
5.3.2	<i>Stoffwechselraten unter Perfusionsbedingungen</i>	178
5.3.3	<i>MEV-Vermehrung unter Perfusionsbedingungen</i>	181
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	183
6	<i>Verzeichnisse</i>	185
6.1	Abbildungsverzeichnis	185
6.2	Tabellenverzeichnis	194
6.3	Literaturverzeichnis	196
7	<i>Anhang</i>	210
7.1	Lebenslauf	210

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
c_{Amm}	Ammoniumkonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
c_{Gln}	Glutaminkonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
c_{Gluk}	Glukosekonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
c_{Lak}	Laktatkonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
$c_{L_{O_2}}^*$	Sättigungs-Gelöstsauerstoffkonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
$c_{L_{O_2}}$	Gelöstsauerstoffkonzentration	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$
D	Verdünnungs- oder Perfusionsrate	$[\text{RV} \cdot \text{d}^{-1}, \text{h}^{-1}]$
F	Volumenstrom (Zulauf oder Ablauf)	$[\text{L} \cdot \text{h}^{-1}]$
I_{VP}	Gesamtzahl infektiöser Viruspartikel	[Partikel]
K_F	Korrekturfaktor Zellzahl Wave [®] Bioreaktor	[-]
k_{La}	flächenbezogener Stofftransportkoeffizient	$[\text{h}^{-1}]$
M_W	Molekulargewicht	[Dalton]
OTR	oxygen transfer rate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
OUR	oxygen uptake rate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck	[% oder bar]
P_V	Produktivität I_{VP} je eingesäter Zelle	$[\text{Partikel} \cdot \text{Z}^{-1}]$
q_{Amm}	spezifische Ammoniumbildungsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
q_{Gln}	spezifische Glutaminverbrauchsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
q_{Gluk}	spezifische Glukoseverbrauchsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
q_{Lak}	spezifische Laktatbildungsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
q_{O_2}	spezifische Sauerstoffaufnahme	$[\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
r_{Amm}	Ammoniumbildungsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
r_{Gln}	Glutaminverbrauchsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
r_{Gluk}	Glukoseverbrauchsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
r_{Lak}	Laktatbildungsrate	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
t	Reaktionszeit	[h]
T	Temperatur	[° C]
t_d	Verdopplungszeit	[h] oder [d]
T_{O_2}	kumulativer Sauerstoffverbrauch	$[\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}]$

V bzw. V_R	Volumen bzw. Reaktorvolumen	[L]
x_L	Lebendzellzahl	[Z · mL ⁻¹]
y	beliebige extensive Zustandsgröße	[mmol · L ⁻¹]
$Y_{\text{Amm/Gln}}$	Ausbeutekoeffizient Glutamin/Ammonium	[-]
$Y_{\text{Lak/Gluk}}$	Ausbeutekoeffizient Glukose/Laktat	[-]
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient Substrat/Zellzahl	[Z · mmol ⁻¹]
μ und μ_{max}	(maximale) spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Baby Hamster Kidney Zellen
CDK	Cycline dependent kinases
CH	Ländercode der Schweiz
CHO	Chinese Hamster Ovary Zellen
CPE	cytopathischer Effekt
CPV	canines Parvovirus
DEAE	Diethylaminoethyl-Gruppen
DMEM	Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-FL	embryonale feline Lungenfibroblasten
EGF	epidermal growth factor
EM	Erhaltungsmedium
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EWM	Erweitertes Wachstumsmedium
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	fibroblastic growth factor
FH	Fachhochschule
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPV	feline panleukopenia virus
GE	General Electric
GDH-Weg	Glutamatdehydrogenase-Weg

GDP	Guanosindiphosphat
GMEM	Glasgow's Modified Minimal Essential Medium
GMP	Good Manufacturing Practice
GTP	Guanosintriphosphat
h/d	Höhe zu Durchmesser-Verhältnis
HeLa	Henrietta Lacks-Cervixkarzinom-Zellen
HPAIV	highly pathogenic avian influenza
h p. i.	Stunden post infectionem
HPV	humanes Papillomavirus
ICTVdb	International Committee on Taxonomy of Viruses Database
IGF	insulin-like growth factor
IMDM	Iscoves's Modified Dulbecco's Modified MEM
IDT	Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH
ISCOM	Immunostimulating Complexes
IVP	Arbeitsgruppe Veterinäre Impfstoffproduktion am IDT
KCl	Kaliumchlorid
kV	kilo-Volt
LDPE	low density Polyethylen
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
MA-104	embryonale African Green Monkey Zellen
mAK	monoklonale Antikörper
MC	Microcarrier
MCS	Master Cell Seed
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney Zellen
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Zellen
MEM	Minimal Essential Medium
MEV	Mink Enteritis Virus
MHS	multivalentes Heparansulfat
moi	multiplicity of infection
MRC-5	humane embryonale Lungen-Zellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSV	Master Seed Virus
MVA	Modified Vaccinia Ankara

MW	Medienwechsel
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	newborn calf serum
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PEP	Postexpositionsprophylaxe
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RPV	Raccoon Parvovirus
RSV	Research Seed Virus
RV	Reaktorvolumen
SARS	Schweres Akutes Atemwegssyndrom
Sf-9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zellen
SGOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
SGPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
SOP	Standardarbeitsanweisung, Standard Operating Procedure
SVA	Schwedisches Veterinär-Institut
TA-Weg	Transaminase-Weg
TCC	Tricarbonsäure-Zyklus
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50 %
toi	time of infection
Uni MD	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
VERO	African Green Monkey Kidney Zellen
VP	Viruspartikel
WCS	Working Cell Seed
WHO	World Health Organization
WM	Wachstumsmedium
WSV	Working Seed Virus
wv	working volume
YSI	Yellow Springs Instrument

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Der etablierte industrielle Prozess zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Mink Enteritis

Das Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH (IDT) produziert unter den Markennamen „FEBRIVAC 3-PLUS“ und „FEBRIVAC ENT“ Totimpfstoffe gegen verschiedene Krankheiten bei Nerzen. Das in dieser Arbeit untersuchte Mink Enteritis Virus (MEV) ist der Erreger einer durchfallartigen Erkrankung der Nerze mit hohen Verlustraten besonders unter jungen Tieren und einer damit verbundenen hohen wirtschaftlichen Bedeutung (Pelztierzucht). In „FEBRIVAC ENT“ ist MEV als einzige Komponente und in „FEBRIVAC 3-PLUS“ als eine von drei Komponenten neben *Clostridium botulinum* (Botulismus-Erreger) und *Pseudomonas aeruginosa* (Erreger der hämorrhagischen Pneumonie der Nerze) enthalten. Die Herstellung der MEV-Komponente erfolgt in Rollerflaschen (850 cm²) unter Verwendung eines mit fötalem Kälberserum (FCS) supplementierten Minimalmediums. Der Ablauf der Herstellung ist schematisch in Abbildung 1.-1 dargestellt. Im Folgenden soll kurz auf die einzelnen Herstellungsschritte des etablierten industriellen Prozesses eingegangen werden.

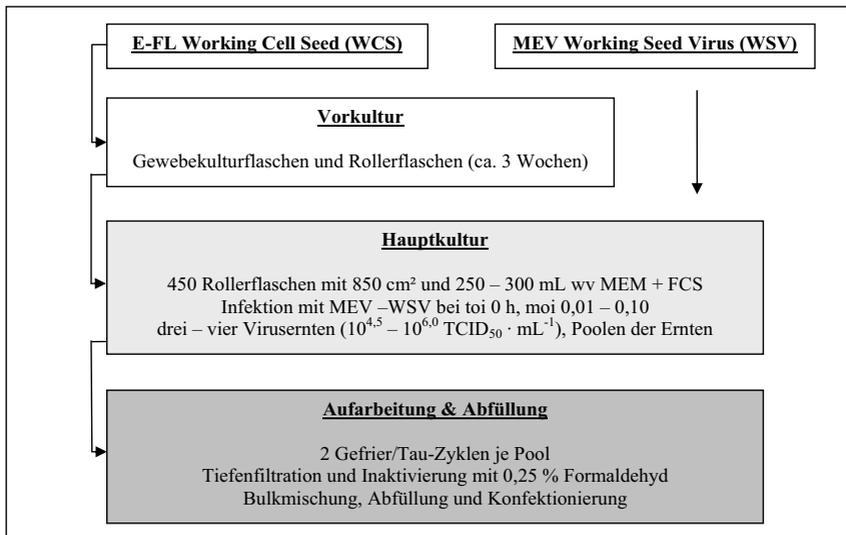


Abbildung 1.-1: Schematische Darstellung der Herstellung von MEV (IDT, Standardarbeitsanweisung)

Die Herstellung erfolgt unter den Bedingungen der „Guten Herstellungspraxis“ (Good Manufacturing Practice, GMP) entsprechend der Zulassungsunterlagen und der Herstellerlaubnis. Zu beachtende Verordnungen und Richtlinien sind u. a. die Tierimpfstoffverordnung und die GMP-Richtlinie zur Herstellung immunologischer Tierarzneimittel.

Upstream Processing

Ausgehend vom Working Cell Seed (WCS) der embryonalen feline Lungenfibroblasten (E-FL), das entsprechend der regulatorischen Vorgaben auf Sterilität, Mykoplasmenfreiheit und Freiheit von Fremdviolen geprüft wurde, wird eine Vorkultur zunächst in Gewebekulturflaschen, später in Rollerflaschen angesetzt. Mit Umsatzraten von 1:3 – 1:6 dauert es ca. drei Wochen, bis die für den Hauptansatz benötigten 150 Rollerflaschen konfluent mit Zellen bewachsen sind. Die Zellen werden dann mit einer Umsatzrate von 1:3 in 450 Rollerflaschen mit 250 mL Medium, welches fötales Kälberserum enthält, umgesetzt. Gleichzeitig mit der Zelleinsaat erfolgt die Infektion der Zellkulturen mit Material aus dem Mink Enteritis Virus Working Seed (MEV-WSV) unter Verwendung von Infektionsmultiplizitäten (moi) von 0,01 – 0,10. Die Zellen werden bei 37 °C kultiviert; nach 72 – 96 h bzw. je nach Auftreten des cytopathischen Effekts (CPE) erfolgt die erste Virusernie durch vollständiges Absaugen des Mediums und Zugabe der entsprechenden Menge frischen Mediums ohne FCS. Im Allgemeinen können drei bis maximal vier Virusernien erwartet werden, danach sind nicht mehr ausreichend Zellen für eine effektive Virusvermehrung vorhanden. Die Zeitdauer des Upstream Processing beträgt 6 – 11 Tage.

Downstream Processing

Die Virusernien (Bulks) werden gepoolt und bis zum Ende der Kultivierung bei 4 °C gekühlt. Dann werden alle Virusbulks zweimal einem Gefrier/Tau-Zyklus (-20 °C Einfrieren, 20 °C Auftauen) unterzogen, um ggf. an den Zellen bzw. Zelltrümmern befindliches Virus von dort zu entfernen und in den Überstand zu bringen. Danach erfolgt die Bestimmung des Virustiters; dieser muss mindestens $10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ betragen. Die virushaltige Suspension wird dann steril durch eine Tiefenfilterkerze filtriert. Anschließend erfolgt die Inaktivierung mit 0,25 % Formaldehyd-Lösung (Rühren bei 60 min⁻¹ für mindestens 8 h) und nachfolgender Inaktivierungskontrolle. Das im Bulk enthaltene Formaldehyd wird mit Natriumdisulfit neutralisiert. Das Virus wird dann an Aluminiumhydroxid adsorbiert und mit NaCl gemischt. Als letzte Schritte erfolgen die Abfüllung und die Konfektionierung des fertigen Impfstoffes.

Der im IDT etablierte Produktionsprozess für MEV in Rollerflaschen-Kultur hat u. a. folgende Vor- und Nachteile:

- + etabliertes, funktionierendes und bei der Zulassungsbehörde (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) angemeldetes Herstellungsverfahren
- + preiswerte Ausrüstung, kommerziell einfach verfügbar bzw. im IDT vorhanden

- Ausbeuten nach Literatur nicht auf dem höchst möglichen Niveau [Zhang, D.-L. 1991 und 1997] und Verfahren insgesamt nicht mehr Stand der Technik für die Herstellung von Tierimpfstoffen in adhärenter Zellkultur
- aufwändiges Herstellungsverfahren durch hohen Anteil manueller Arbeitsschritte bei der Infektion und Ernte der Rollerflaschen
- relativ hohes Kontaminationsrisiko durch die Vielzahl der Rollerflaschen und das Zusammenführen (Poolen) der Ernten

Besonders die relativ geringen Ausbeuten und das gegebene Kontaminationsrisiko waren Gründe, die für die Suche nach alternativen Verfahren ausschlaggebend waren. Als Alternative für die großtechnische Kultivierung tierischer Zellen wurde in der Vergangenheit die Microcarrier-Technologie für eine Vielzahl von Prozessen zur Impfstoffherstellung etabliert [Hirtenstein, M. et al. 1980, Clark, J. et al. 1991, Hu, W.-S. und Aunins, J. G. 1997]. Daher lag es nahe, den bisherigen Prozess in ein Microcarriersystem zu übertragen. Die Wahl für das Kultivierungssystem fiel aus Kostengründen und wegen der verschiedenen Vorteile von „Einweg-Reaktoren“ (disposable bioreactors), u. a. den Verzicht auf aufwändige Reinigungsvalidierungen und Minimierung des Kreuzkontaminationsrisikos auf den Wave® Bioreaktor der Firma Wave Biotech (CH), ein relativ neuartiges System für die Zellkultivierung [Singh, V. 1998, Eibl, R. et al. 2005]. Um Probleme bei der späteren behördlichen Zulassung des Verfahrens (Änderungsantrag bei der Zulassungsbehörde, Paul-Ehrlich-Institut, PEI) zu vermeiden, wurde das bisher verwendete Minimalmedium (MEM) weiter genutzt und keine Medienoptimierung begonnen. Als Microcarrier wurden aus eben diesen Überlegungen heraus Cytodex™ 1 Carrier der Firma Pharmacia Biotech (GE Healthcare, USA) gewählt; diese werden in einer Vielzahl etablierter Prozesse bereits verwendet und sind behördlich (z. B. PEI, FDA) akzeptiert [Hirtenstein, M. et al. 1980, Clark, J. et al. 1981]. Diese Anforderungen und Überlegungen spiegeln sich in den im Folgenden formulierten Zielen dieser Arbeit wider.

1.2 Aufgabenstellung

Diese Arbeit entstand aus einer Industriekooperation zwischen dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau (IDT GmbH) und dem Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (Uni MD) zum Thema „Entwicklung eines Herstellungsprozesses für einen Impfstoff gegen Mink Enteritis“. Hintergrund der Arbeit war die geplante Umstellung eines Produktionsprozesses für einen Impfstoff gegen Mink Enteritis von Rollerflaschen auf einen Wave[®] Bioreaktor im 100 L-Maßstab. Diese Entwicklung sollte gleichzeitig als Modell für weitere Prozessentwicklungen zur Optimierung von Herstellungsprozessen für Veterinär- und Humanimpfstoffe dienen. Diese Prozessentwicklungen betreffen ausschließlich das Upstream Processing der Herstellungsverfahren.

Die Arbeit hatte die folgenden Ziele:

1. Charakterisierung von Wachstum und Stoffwechsel der E-FL Zellen in statischen Systemen (Gewebekulturflasche, Rollerflasche) und der Vermehrung des MEV unter Variation der Infektionsparameter (multiplicity of infection (moi), time of infection (toi), Ernteschema), Vertiefung der Prozesskenntnis zum etablierten Herstellungsprozess (Upstream Processing)
2. Entwicklung und Charakterisierung eines Kultivierungsverfahrens für die E-FL Zellen auf Cytodex[™] 1 Microcarriern im Rührreaktor und im Wave[®] Bioreaktor im kleinen Labormaßstab (0,5 – 1 L vv) mit dem Ziel eines stabilen Kultivierungsprozesses mit hohen Zellausbeuten
3. Entwicklung und Etablierung eines Infektionsverfahrens für MEV in Microcarriersystemen (Entwicklung im 0,5 L vv Rührreaktor und Transfer in einen 1 - 10 L vv Wave[®] Bioreaktor als Zwischenschritt zur geplanten großtechnischen Kultivierung im 100 L-Maßstab) unter Variation von toi, moi und des Ernteschemas mit dem Ziel hoher Virusausbeuten und mehrfacher Ernte (> 3 Ernten)
4. Optimierung von Zellvermehrung und Viruspropagation mit dem Ziel höherer Ausbeuten durch den Einsatz von Perfusionssystemen im Rührreaktor als auch im Wave[®] Bioreaktor und Evaluierung eines eventuellen industriellen Einsatzes

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Allgemeine Aspekte der Impfstoffentwicklung

2.1.1 Kurze Einführung in die Geschichte der Impfstoffe

Bereits für das Jahr 430 v. Chr. wird dem griechischen General und Historiker Thukydides das Zitat "Niemand bekommt zweimal die Pocken" zugeschrieben. Damit hatte er, ausgehend von Beobachtungen verschiedener Seuchenzüge im Alten Griechenland, bereits eine für die weitere Entwicklung und Geschichte der Impfstoffe sehr wichtige Schlussfolgerung gezogen. In dieser Zeit und bis ins 18./19. Jahrhundert hinein standen die Ärzte den großen Seuchen und Epidemien, wie z. B. den Pocken oder der Pest, machtlos gegenüber. Ein Meilenstein der Impfstoffentwicklung war dann das Experiment von Edward Jenner im Jahr 1796 [Schmidt, D. 2001]. Grundlagen für das Jenner'sche Experiment waren die Beobachtungen des Thukydides und auch Versuche chinesischer und indischer Ärzte, die Individuen absichtlich mit Krustenstücken von leicht mit Pocken Infizierten zusammenbrachten, so einen milden Verlauf der Krankheit induzierten und die so Behandelten später nicht mehr an den Pocken erkrankten. Edward Jenner infizierte einen Jungen mit Pocken aus einer Kuhpockenpustel - dieser erwies sich bei späteren Infektionen mit Pocken als immun. Dieses Verfahren wurde von Jenner als Vakzination (lat. vacca = Kuh) bezeichnet, der Begriff Vakzine für einen Impfstoff stammt ebenfalls davon ab. Nach diesen Erfolgen wurde die Vakzination weltweit für eine Vielzahl von Krankheiten erfolgreich angewandt, obwohl auch einige Rückschläge zu verzeichnen waren. Als weitere Meilensteine in der Geschichte der Impfstoffentwicklung sind zu nennen [Modrow, S. und Falke, D. 1997, Flint, D. et al. 2004]:

- die Arbeiten von Louis Pasteur zur Keimtheorie (1864) und die Entdeckung der Erreger von Milzbrand (*Bacillus anthracis*, 1876) und Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*, 1881) durch Robert Koch,
- die Entwicklung erster wirksamer Impfstoffe gegen Milzbrand (1881) und Tollwut (1885) durch Louis Pasteur und Emile Roux,
- Entwicklung erster nationaler Impfprogramme zum Ende des 19. Jahrhunderts durch Vorarbeiten u. a. von Emil Behring und Paul Ehrlich,

- Rückschläge, u. a. durch Impfstoffkontaminationen wie im Fall des "Lübecker Impfunglücks" 1930,
- durch Grundlagenforschung und technische Weiterentwicklungen ab Mitte des 20. Jahrhunderts systematische Entwicklung von Impfstoffen gegen eine Vielzahl von Krankheiten (Poliomyelitis, Gelbfieber, Masern, Mumps, Influenza, Pocken),
- seit 1967 weltweite Impfprogramme der WHO, Erfolge u. a. Ausrottung der Pocken (1980) und starker Rückgang der Poliomyelitis.

Impfstoffe können erfolgreich gegen eine ganze Reihe von Infektionserregern bei Menschen und Tieren, zu denen vor allem Viren (lat. Virus = Gift) und Bakterien gehören, eingesetzt werden. Prinzipiell wird bei der Impfung zwischen aktiver und passiver Immunisierung unterschieden. Bei der aktiven Immunisierung, der weitaus häufiger angewendeten Form der Impfung, werden dem Körper im Fall von Lebendimpfstoffen attenuierte, d. h. abgeschwächte, jedoch vermehrungsfähige Erreger, und im Fall von Totimpfstoffen inaktivierte Erreger bzw. lediglich Teile des Erregers, injiziert. Als Folge der Impfung wird das Immunsystem zur Bildung einer spezifisch gegen den Erreger gerichteten Immunantwort veranlasst. Dies geschieht durch Bildung von Lymphozyten, die Antikörper gegen das präsentierte Antigen produzieren. Die Lymphozyten werden später zu Gedächtniszellen und sorgen für eine länger andauernde Immunantwort, die mehrere Monate bis lebenslang anhalten kann. Lebendimpfstoffe mit attenuierten Antigenen generieren im Regelfall eine stärkere und länger andauernde Immunantwort. Sie sind jedoch aufwändiger bei der Herstellung und es besteht die Gefahr einer Rück-Mutation des Impfstammes und damit einer Infektion mit der Krankheit, gegen die geimpft wurde (Beispiel: Poliomyelitis-Schluckimpfung).

Im Gegensatz dazu werden bei der passiven Immunisierung direkt Antikörper, die aus dem Serum von Spendertieren, z. B. Pferden, gewonnen werden, verabreicht. Dies führt zwar einerseits zu einer Zeitersparnis bei der Infektionsbekämpfung, andererseits ist die so induzierte Immunität nicht von langer Dauer, in der Regel nur einige Wochen oder Monate. Heute werden passive Immunisierungen beim Menschen nur noch im Rahmen der Postexpositionsprophylaxe (PEP) d. h. nach direktem Erregerkontakt ohne bestehenden Impfschutz, z. B. bei Tollwut, angewandt. Für die Impfung von Tieren wird die passive Immunisierung mit Immunsereen noch in breiterem Rahmen durchgeführt [Liess, B. und Kaaden, O.-R. 2003].

2.1.2 Aktuelle Tendenzen auf dem Gebiet der Impfstoffentwicklung und –herstellung

Durch den wissenschaftlichen und technischen Fortschritt auf dem Gebiet der Gentechnik und Molekularbiologie hat es in den letzten Jahren eine Reihe von neuen Ansätzen gegeben, um bisher noch nicht durch Impfung beherrschbare Krankheiten, wie z. B. AIDS, Malaria und Hepatitis C, wirksam bekämpfen zu können. Zu diesen Ansätzen gehören u. a. die gezielte Entwicklung neuer attenuierter Impfstämme (z. B. über reversed genetics gewonnene Stämme von Vogelgrippe), die Verwendung rekombinanter Vektorimpfstoffe (z. B. auf Basis von Modified Vaccinia Ankara MVA) und die Entwicklung von DNA-Vakzinen. Auch der Weiterentwicklung der Formulierung von Impfstoffen kommt mit der Forschung an neuen Adjuvantien-Systemen, z. B. den so genannten ISCOM's (Immunostimulating complexes), vermehrt Aufmerksamkeit zu [Modrow, S. und Falke, D. 1997, Rogan, D. und Babiuk, L. A. 2005]. Alle diese Ansätze befinden sich zumeist noch in der experimentellen Phase bzw. in der klinischen Prüfung. Einige dieser neuen Impfstoffe sind jedoch bereits zugelassen und erhältlich, u. a. ein Impfstoff gegen humane Papillomaviren (HPV, Erreger des humanen Cervixkarzinoms) und ein Impfstoff gegen Rotaviren.

Die Herstellung von viralen Impfstoffen erfolgte historisch oft in bebrüteten Hühnereiern. Diese Methode hat einige Nachteile, u. a. absehbare Lieferprobleme beim Auftreten von Epidemien oder Pandemien oder auch Unverträglichkeitsreaktionen, wird jedoch auf Grund der einfachen Herstellung auch heute noch, z. B. für die Herstellung von Grippeimpfstoffen, eingesetzt. Dennoch setzen sich hier in letzter Zeit immer mehr modernere Methoden wie die Verwendung tierischer Zellkulturen als Substrat zur Virusvermehrung durch, so dass in der aktuellen Literatur eine Vielzahl von Herstellungsprozessen für Virus-Impfstoffe in tierischen Zellkulturen beschrieben wurden [Spier, R. E. 2000, Kretzmer, G. 2002, Rogan, D. und Babiuk, L. A. 2005]. Neben der Untersuchung und Optimierung von Herstellungsprozessen kommt auch der Forschung an grundlegenden Fragestellungen der Zell-Virus-Interaktionen, wie z. B. der Bindung der Viruspartikel an Zellrezeptoren in verschiedenen Systemen, in letzter Zeit, besonders durch die Entwicklung neuer analytischer und diagnostischer Möglichkeiten, hohe Bedeutung zu [Rajcani, J. 2003].

Bei der Herstellung und Zulassung gibt es eine Reihe von Unterschieden zwischen Human- und Veterinärimpfstoffen. Bei Human-Impfstoffen liegt sehr großes Augenmerk auf der Sicherheit und Verträglichkeit der Impfstoffe. Entwicklungen gehen dahin, z. B. serumfreie Medien zu verwenden, um das Problem einer möglichen Kontamination von Impfstoffen mit

übertragbaren spongiformen Enzephalopathie Erregern (TSE) und damit einer Gesundheitsgefährdung der Patienten zu umgehen und alle Ausgangsstoffe und das Herstellungsverfahren sehr aufwändig zu testen und zu validieren. An Herstellung und Sicherheit von Veterinärimpfstoffen werden auch hohe Anforderungen gestellt, jedoch werden viele der oben genannten neueren Entwicklungen auch auf Grund der unterschiedlichen Preisspanne bei der Vermarktung nicht in dem Maße angewandt wie bei Human-Impfstoffen. Ausnahmen bilden hier Impfstoffe gegen Zoonosen (z. B. Aviäre Influenza). Diese vergleichsweise geringeren Anforderungen an Veterinärimpfstoffe führen natürlich auch zu einer anderen Herangehensweise bei Prozessentwicklung und -optimierung. In dem in dieser Arbeit zu optimierenden Prozess für die Herstellung eines Mink-Enteritis-Impfstoffes führten diese Gründe zum Beispiel zu der Festlegung, das bisher verwendete Zellkulturmedium (MEM) auch für den zu etablierenden Microcarrier-Prozess zu nutzen und keine Arbeiten hinsichtlich Medienoptimierungen oder serumfreie Medien zu initiieren. Diese nur unter wirtschaftlichen und zulassungsrechtlichen Gesichtspunkten getroffene Festlegung lässt u. U. Schwierigkeiten in Form von Limitierungen, o. ä. bei der Etablierung eines Microcarrier-Prozesses mit höheren Zellzahlen unter Verwendung eines für Rollerflaschen optimierten Minimalmediums erwarten [Spier, R. E. 2000, Kretzmer, G. 2002].

2.2 *Biologische Aspekte bei der Impfstoffherstellung*

2.2.1 Kultivierung tierischer Zellen

Die Unterscheidung tierischer Zellen wird allgemein nach primären Zellen (Zellen, die direkt aus dem Gewebe entnommen werden und nur eine begrenzte Lebensdauer haben) und permanenten Zellen (Zellen, die einer Transformation durch virale Faktoren oder physikalisch-chemische Faktoren unterworfen wurden und prinzipiell unbegrenzt in Kultur gehalten werden können) getroffen [Freshney, R. I. 2005]. Im Folgenden soll nur die Kultivierung permanenter tierischer Zellen, so genannter Zelllinien, behandelt werden.

Erste Ansätze zur Kultivierung tierischer Zellen wurden von Emile Roux und Alexis Carrel gezeigt, die 1885 bzw. dann 1913 erstmals Hühnerzellen für längere Zeit in einer Salzlösung mit Zufütterung von Nährstoffen am Leben halten konnten. Im Jahre 1951 wurden aus einem Cervixkarzinom der Farbigen Henrietta Lacks Epithelzellen entnommen. Aus diesen mit humanen Papillomaviren (HPV) infizierten Zellen wurde dann die erste permanente Zelllinie,

die HeLa-Zelle, entwickelt. In den folgenden Jahren wurden hauptsächlich durch spontane Transformationen entstandene, stabile permanente Zelllinien etabliert, z. B. im Jahr 1958 aus dem Gewebe eines Cocker-Spaniels die MDCK-Zelle (Madin Darby Canine Kidney), 1961 aus Nierengewebe des Syrischen Goldhamsters die BHK21-Zelle und 1962 von Zellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze die VERO-Zelle [Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005].

Die in dieser Arbeit verwendeten embryonalen feline Lungenfibroblasten (E-FL) wurden 1969 in Schweden aus dem Lungengewebe eines weiblichen Katzenembryos isoliert. Die Zellen zeigen eine typisch fibroblastoide Morphologie und werden als Kultivierungssubstrat für das zu vermehrende Mink Enteritis Virus (MEV) eingesetzt [IDT, Standardarbeitsanweisung]. Ein wichtiger Einsatzzweck tierischer Zellen ist die Forschung, aber auch die Impfstoffproduktion und zunehmend die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern und anderen therapeutischen Proteinen in Hybridoma-Zellen (Methode nach Milstein & Köhler 1975) [Chu, L. und Robinson, D. K. 2001, Wurm, F. 2004]. Ein großer Vorteil tierischer Zellen ist dabei die Fähigkeit, Proteine mit nativen Glykosilierungsmustern herstellen zu können. Für die Impfstoffproduktion mit tierischen Zellkulturen sind eine Reihe von Prozessen etabliert und beschrieben worden, z. B. die Produktion von Tollwutimpfstoffen in BHK-21 [Kallel, H. et al. 2003], von Grippeimpfstoffen in VERO-Zellen [Audsley, J. M. und Tannock, G. A. 2004] und von Polioimpfstoffen, ebenfalls in VERO-Zellen [Meignier, B. 2001].

Aktuelle Tendenzen bei der Entwicklung von Zelllinien gehen dahin, definiert transformierte, stabile Zelllinien für Produktionszwecke, so genannte Designerzelllinien, zu entwickeln. Diese Designerzellen sollen, neben einer exakt charakterisierten Passagengeschichte, möglichst auch ohne Zusätze von Serum und frei in Suspension wachsen. Höhepunkt dieser Entwicklung war bisher 1998 die Entwicklung der Zelllinie PER.C6™ der Firma Crucell (Leiden, Niederlande), die genau diese Ansprüche erfüllt, behördlich akzeptiert ist (FDA, EMEA) und für die auch schon verschiedene Anwendungen und mögliche Ansätze in der Human-Impfstoffproduktion (Influenza, Adenovirale Vektoren) beschrieben worden sind [Pau, M. G. 2001 et al., Xie, L. 2003 et al.]. Der schematische Aufbau einer eukaryotischen Zelle mit den zugehörigen Zellorganellen ist in Abbildung 2.-1 dargestellt.

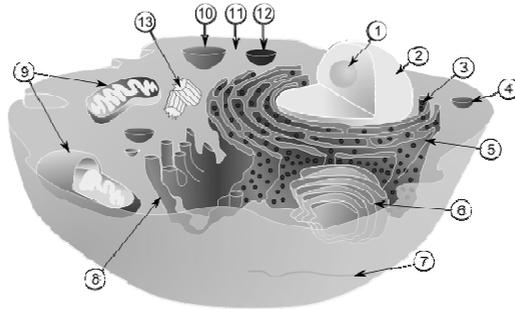


Abbildung 2.-1: Schema des Aufbaus einer eukaryotischen Zelle [Freshney, R. I. 2005, Bild Wikipedia],
Legende: 1. Nukleolus, 2. Zellkern (Nucleus), 3. Ribosomen, 4. Vesikel, 5. Raues Endoplasmatisches Retikulum (ER), 6. Golgi-Apparat, 7. Mikrotubuli, 8. Glattes ER, 9. Mitochondrien, 10. Lysosom, 11. Zytoplasma, 12. Mikrobodies, 13. Zentriolen

Das Wachstum tierischer Zellen kann in die Phasen Einsaat, Adaption und Anheftung, exponentielle Phase, stationäre Phase und ggf. eine Absterbephase eingeteilt werden. In der exponentiellen Phase wird eine konstante maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} erreicht und das Wachstum tierischer Zellen kann allgemein nach Gleichung 2.-1 beschrieben werden, die Verdopplungszeit ergibt sich nach Gleichung 2.-2 [Storhas, W. 2003]. Typische maximale spezifische Wachstumsraten tierischer Zellen in Kultur liegen bei $0,02 - 0,04 \text{ h}^{-1}$ [Pörtner, R. et al. 1996, Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005].

$$\mu_{\max} = \frac{1}{x_L} \cdot \frac{dx_L}{dt}$$

Gleichung 2.-1

μ_{\max} ...maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]

x_L ...Lebendzellzahl [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

t ...Reaktionszeit [h]

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$$

Gleichung 2.-2

t_d ...Verdopplungszeit [h]

μ_{\max} ...maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]

Das Wachstum von tierischen Zellen kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen, zum einen adhären auf Oberflächen oder frei in Suspension. Im Folgenden soll nur das Wachstum adhärenter Zellen betrachtet werden; Suspensionszellen bieten zwar einige prozesstechnische Vorteile, sind jedoch schwer herzustellen, da ein solches Wachstum dem natürlichen Verhalten der Zellen (Wachstum im Gewebsverband) widerspricht [Freshney, R. I. 2005]. Die Phase der Adaptation und Anheftung an das Kultivierungssubstrat kann bei adhären Zellen, z. B. Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen auf Cytodex™ 1 Microcarriern, ca. 4 – 6 h dauern [Reichl, U. und Bock, A. 2003, Möhler, L. 2006]. Die danach beginnende Phase des exponentiellen Zellwachstums (ca. 6 – 48 h) wird im Allgemeinen durch die zur Verfügung stehende Fläche (Oberfläche von Kulturflaschen oder Microcarriern) begrenzt (Flächenlimitierung in Monolayer-Kultur). Nach der exponentiellen Phase kommt es oft noch zu einer weiteren, linear verlaufenden, Zunahme der Zellzahl, bis die zur Verfügung stehende Fläche vollständig genutzt und der über Signalstoffe vermittelte Eintritt der Zellen in die Ruhephase (G_0 -Phase, Kapitel 2.2.3) erfolgt. Für das Zellwachstum benötigte Nährstoffe und Spurenelemente werden den Zellen durch Zellkulturmedien zur Verfügung gestellt, auf diese Medien wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

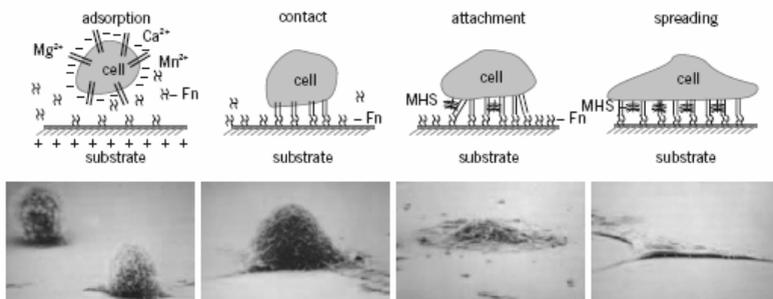


Abbildung 2.-2: (oben) Schematische Darstellung der vier Phasen bei der Anheftung tierischer Zellen an Oberflächen und (unten) entsprechende mikroskopische Aufnahmen von tierischen Zellen in diesen vier Phasen [Pharmacia Biotech, GE Healthcare, 2005]

Die Anheftung adhärenter Zellen an Oberflächen (Glas, Kunststoff, Biopolymere) von Kulturgefäßen wird durch Adhärenzfaktoren wie z. B. Fibronectin, Vitronectin oder Laminin vermittelt, die im Zellkulturmedium durch das zugesetzte Serum in ausreichenden Konzentrationen vorhanden sind. Während der Anheftungsphase, der für die gesamte Zellkultivierung im Allgemeinen kritischsten Phase, können vier einzelne Abschnitte

unterteilt werden, welche die Zellen durchlaufen (Abbildung 2.-2). Essentiell wichtig für die Zelladhäsion sind neben den bereits erwähnten Anheftungs-Faktoren auch elektrische Ladungen, die auf der Kulturoberfläche verteilt sind. Tierische Zellen besitzen unregelmäßig verteilte negative Oberflächenladungen. Für die Anheftung an Substrate wie Glas oder Plastik oder polylysinbeschichtete Oberflächen (z. B. Microcarrier) scheint neben dem Vorhandensein einer Ladung (positiv oder negativ geladen) vor allem die elektrische Ladungsdichte die Hauptrolle zu spielen [Freshney, R. I. 2005, Pharmacia Biotech (GE Healthcare) 2005].

1. Phase der Adsorption

Es kommt zur Adsorption von Adhärenzfaktoren an die Oberfläche des Kulturgefäßes, die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch kugelig, es erfolgt bereits eine leichte, jedoch reversible Anheftung. Eine wichtige Rolle dabei spielt das Vorhandensein von bivalenten Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) im Zellkulturmedium.

2. Kontaktphase

Die Zelle flacht sich leicht ab, die Hauptform bleibt jedoch noch kugelig. Die Adhäsion der Zelle wird vermittelt zwischen den auf der Oberfläche adsorbierten Adhärenzfaktoren und der mit negativen Ladungen besetzten Glykokalix (aus Kohlenhydraten bestehende Schicht an der Zellmembran) der Zelle.

3. Anheftungsphase

Das langsame Ausbreiten der Zelle wird durch selbst synthetisierte, multivalente Heparansulfat-Proteoglykane (MHS, Bestandteil der extrazellulären Matrix) vermittelt. Auf der Zelloberfläche befindliche Integrine senden Signale an das Cytoskelett der Zelle. Wichtige Cofaktoren sind wiederum die bivalenten Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}).

4. Ausbreitungsphase

Die vollständige Abflachung der Zelle ist erfolgt, die Zelle ist fest an der Oberfläche angeheftet. Nach der vollständigen Ausbreitung der Zelle beginnen das Zellwachstum und die weitere Besiedlung der Oberfläche.

Trotz der Adhäsion besitzen tierische Zellen die Eigenschaft, beweglich zu bleiben (cell motility) und sich während der Kultivierung unter Zunahme der Zellkonzentration gemeinsam zu bewegen [Freshney, R. I. 2005, Pharmacia Biotech (GE Healthcare) 2005]. Dieses Verhalten wurde auch für die in dieser Arbeit verwendeten E-FL Zellen durch Langzeitkultivierungen unter mikroskopischer Kontrolle gefunden (Daten nicht gezeigt). Während des Wachstums einer tierischen Zelle kommt es, ausgehend von einem geringen Konfluenzgrad (Abbildung 2.-3 links), zur vollständigen Besiedlung der Kulturoberfläche (Abbildung 2.-3 rechts). Typischerweise werden dabei Monolayer gebildet, nur in Ausnahmefällen wachsen tierische Zellen in mehreren Schichten [Freshney, R. I. 2005]. Der weitere Scale-Up erfolgt durch das Umsetzen (Subpassagieren) der Zellen in größere Kulturgefäße bzw. Reaktoren. Die zwischen den Zellen und zwischen Zellen und Oberflächen bestehenden Bindungen werden durch proteolytische Enzyme, z. B. Trypsin, Collagenase oder Accutase, zerstört [Merten, O. W. 2000, Storhas, W. 2003]. Die Zell-Zell-Interaktionen und Vorgänge bei der Ausbreitung von Zellen sind besonders gut an Epithel-Zellen, u. a. Madin Darby Bovine Kidney Zellen (MDBK), untersucht worden [Ben-Ze'ev, A. 1984, Palavuori, R. und Eskelinen, S. 2000].

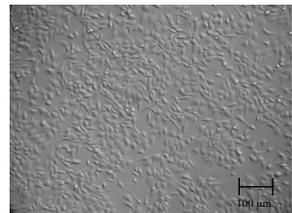
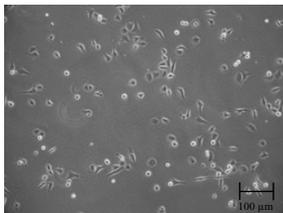


Abbildung 2.-3: (links) Tierische Zellen (MDBK) 4 h nach der Einsaat und (rechts) MDBK-Zellen bei einem Konfluenzgrad von 50 – 60 % ca. 72 h nach der Einsaat, 40-fache Vergrößerung

Weitere Bedingungen, die bei der Kultivierung von tierischen Zellen beachtet werden müssen, sind z. B. Temperatur (Optimum 36 - 38 °C für die meisten Zelllinien), CO₂-Gehalt der Umgebungsluft (Optimum um 5 %, Zusammenwirken mit dem Bicarbonat-Puffer des Zellkulturmediums) und in diesem Zusammenhang der pH-Wert des Zellkulturmediums (Optimum für Anheftung $\approx 7,2 - 7,4$ und für Kultivierung $\approx 6,8 - 7,8$). Das Zusammenwirken dieser Faktoren mit weiteren Einflussgrößen, wie dem Zellkulturmedium, der Art der Prozessführung sowie der Wahl des Bioreaktors, ermöglicht eine erfolgreiche Kultivierung tierischer Zellen und das Erreichen hoher Zellzahlen bei entsprechender Vitalität und hoher Ausbeuten (Viren, monoklonale Antikörper, rekombinante Proteine).

2.2.2 Der Stoffwechsel tierischer Zellen unter *in-vitro* Bedingungen

2.2.2.1 Allgemeines zum Stoffwechsel tierischer Zellen

Für optimales Wachstum und Produktbildung benötigen tierische Zellen u. a. zur Gewinnung von Energie für alle ablaufenden Prozesse und zum Aufbau neuer Zellmasse (Teilung) einen effizient ablaufenden Zellstoffwechsel. Diese Energie und wichtige Bausteine für die Synthese von Proteinen und Lipiden werden von den Zellen über den so genannten Energiestoffwechsel generiert (Abbildung 2.-4). Dabei werden prinzipiell die beiden Hauptsubstrate der tierischen Zellen, Glukose und Glutamin, aus dem Cytosol in die Mitochondrien aufgenommen und dort, bzw. im Fall von Glukose auch bereits im Cytosol, verstoffwechselt [Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005].

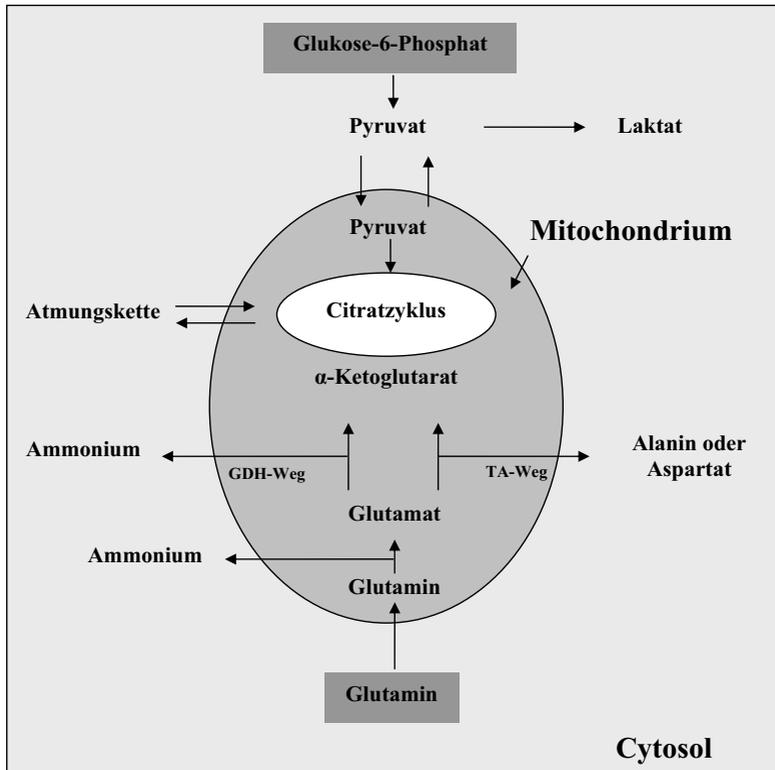
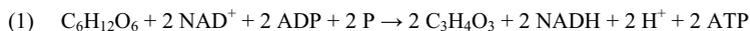


Abbildung 2.-4: Schematische und vereinfachte Darstellung des Energiestoffwechsels von eukaryotischen Zellen [nach Doverskog, M. et al. 1997]

Bei Glukose geschieht dies entweder durch Umwandlung in Pyruvat und dann direkt in Laktat und damit relativ ineffizient nur zur Energiegewinnung oder durch Umwandlung in Ribosen und Desoxyribosen (Bausteine der Nukleotide) über den Pentosephosphatweg oder als Pyruvat über den Zitronensäurezyklus. Glutamin dient sowohl als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle als auch als Energielieferant. Die wichtigsten Stoffwechselwege einer tierischen Zelle, die Glykolyse, der Zitronensäurezyklus (TCC) und die Atmungskette sowie der Glutamin-Stoffwechsel, sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden. Dabei sind besonders die Glykolyse, der TCC und die Atmungskette als Einheit aus, in dieser Reihenfolge, aufeinander aufbauenden Prozessen zu verstehen. Jedoch sind auch der Glutamin-Stoffwechsel und weitere, hier nicht genannte Prozesse mit diesen zentralen Reaktionen eng verknüpft [Vriezen, N. et al. 2001, Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005].

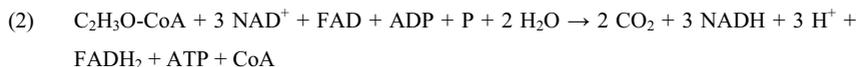
Glykolyse

In der Glykolyse wird Glukose im Cytosol der Zelle zu Pyruvat und weiter zu Laktat abgebaut. Der Reaktionsweg folgt dabei, verkürzt dargestellt, Gleichung (1), durch die Bildung von 2 mol ATP beträgt die Energieausbeute der Reaktion 70 kJ.



Zitronensäurezyklus (TCC)

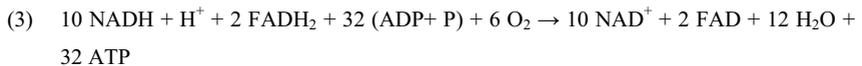
Ausgangsstoff ist das in der Glykolyse erzeugte Pyruvat, das über den Zwischenschritt der oxidativen Decarboxylierung in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Unter Abspaltung von CO_2 wird das Acetyl-CoA ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O-CoA}$) dann im TCC, wie vereinfacht in Gleichung (2) dargestellt, in die Redoxäquivalente NADH und FADH_2 und das Energieäquivalent ATP umgewandelt, die dann für die Atmungskette zur Verfügung stehen.



Im bisherigen Verlauf (Glykolyse und TCC) sind damit 4 mol ATP, 10 mol NADH und 2 mol FADH_2 entstanden.

Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus den Enzym-Komplexen I bis V und den Elektronenüberträgern Ubichinon und Cytochrom C. Es läuft prinzipiell die Knallgasreaktion (Oxidation von Wasserstoff zu Wasser) unter kontrollierten Bedingungen nach Gleichung (3) ab. Durch die aus dem TCC oder der Glykolyse stammenden Reduktionsäquivalente (NADH, FADH₂) wird über die Reaktionen der Atmungskette aus ADP und freiem Phosphat ATP gebildet, das als Energieäquivalent für alle Reaktionen der Zelle dient. Bei vollständiger Oxidation entstehen hier 32 mol ATP, damit beträgt die maximal mögliche Gesamtausbeute des Energiestoffwechsels einer Zelle 36 mol ATP.



Glutaminstoffwechsel

Der Stoffwechsel von Glutamin, des zweiten Hauptsubstrates tierischer Zellen, erfolgt ebenfalls in den Mitochondrien durch Abspaltung der beiden Aminogruppen. Die Abtrennung der ersten Aminogruppe führt zur Bildung von Glutamat und Ammonium (NH₄⁺), die Abspaltung der zweiten Aminogruppe kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen (Abbildung 2.-4):

a) Glutamat-Dehydrogenase-Weg (GDH-Weg)

Nach Abspaltung der zweiten Aminogruppe kommt es zur Bildung eines weiteren Ammonium-Ions und zur Bildung von α-Ketoglutarat unter Gewinn eines Reduktionsäquivalentes NADH. Das α-Ketoglutarat wird in den TCC zurückgeführt.

b) Transaminase-Weg (TA-Weg)

Im Gegensatz zum GDH-Weg wird beim Transaminase-Weg aus Glutamat kein weiteres Ammonium-Ion gebildet, sondern die Aminogruppe wird in Alanin (über Glutamat-Pyruvat-Transferase) oder Aspartat (über Glutamat-Oxalacetat-Transferase) eingebunden.

Der Glutaminstoffwechsel der Zelle kann damit über das Verhältnis (Ausbeute-Koeffizient) von verbrauchtem Glutamin zu gebildetem Ammonium charakterisiert werden (Kapitel 2.3.4).

2.2.2.2 Inhibierungen des Stoffwechsels durch Laktat und Ammonium

Der Stoffwechsel von Glukose und Glutamin in tierischen Zellen ist in der Vergangenheit gut untersucht worden, um Rückschlüsse auf Ansatzpunkte für Optimierungen bei Herstellungsprozessen für Impfstoffe, monoklonale Antikörper und andere Biotherapeutika zu ziehen [Hu, W.-S. et al. 1987, Werner, R. G. et al. 1993, Doverskog, M. et al. 1997, Pörtner, R. et al. 1997]. Dabei wurden Unterschiede im Stoffwechsel primärer Zellen und dem transformierter Zellen nachgewiesen. Prinzipiell ist bei transformierten Zellen die Substrataufnahme erhöht und die Energieausbeute der Reaktionen geringer als bei primären Zellkulturen. Eine Ursache dafür ist die in transformierten Zellen erhöhte Einlagerung von Cholesterol in die Mitochondrienmembran und der damit verbundene erschwerte Transport von Pyruvat, dies führt rückgekoppelt zu einer erhöhten Substrataufnahme. Auch die Aktivität des für die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA nötigen Multienzymkomplexes Pyruvat-Dehydrogenase ist in transformierten Zellen verringert, dadurch kommt es hier zu einer verstärkten Bildung von Laktat [Neermann, J. und Wagner, R. 1996, Vriezen, N. et al. 2001]. Die Metabolite Laktat und auch Ammonium sind als Inhibitoren für das Wachstum und die Produktbildung tierischer Zellen beschrieben worden. Die für eine Inhibierungswirkung nötigen Konzentrationen sind dabei zelltypspezifisch, hierauf wird im Folgenden eingegangen.

Auf Grund der Säurewirkung des Laktats wird (ohne externe pH-Regelung) eine pH-Absenkung des Zellkulturmediums bewirkt. Diese führt, neben der Änderung der Osmolalität, zu einer intrazellulären Änderung des pH-Wertes und damit zur Verlangsamung bzw. Blockierung vor allem enzymatischer Reaktionen, die für das Wachstum der Zellen und die Bildung von Produkten, in diesem Sinne auch die Virusvermehrung, wichtig sind. Hassell et al. beschreiben einen signifikanten negativen Einfluss von Laktat-Konzentrationen $> 20,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf die untersuchten Zelllinien; es kann davon ausgegangen werden, dass Konzentrationen von $25,0 - 35,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf die meisten industriell verwendeten Zelllinien wachstumsinhibierend wirken dürften.

Das beim Glutaminstoffwechsel entstehende Ammonium wird in der Literatur als starkes Zellgift beschrieben [Hassell, T. et al. 1991, Martinelle, K. et al. 1993, Lüdemann, I. et al. 1994, Häggström, L. et al. 1996]. Als inhibierende Wirkung von Ammonium sind dabei verschiedene Mechanismen vorgeschlagen worden, u. a. durch eine Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes ins Basische oder Änderung elektrochemischer Gradienten. Auch die direkte Interaktion mit Enzymen oder die Beeinflussung der Glutamin- und Glukoseaufnahmeraten der Zelle sind beschrieben worden [Schneider, M. et al. 1996, Hassell,

T. et al. 1991, Lüdemann, I. et al. 1994]. Als kritische Ammoniumkonzentrationen im Medium werden in diesen Arbeiten in Abhängigkeit vom Zelltyp Werte zwischen $1,0 - 4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ angesehen. Konzentrationen im Bereich von $4,0 - 8,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dürften für die meisten Zelllinien toxisch sein und zu einer Einstellung des Zellwachstums führen. Die inhibierenden Effekte von Laktat und Ammonium können unter bestimmten Umständen auch synergistisch wirken [Hassell, T. et al. 1991]. Besonders problematisch bei Ammonium ist die Tatsache, dass es nicht nur durch den Stoffwechsel der tierischen Zellen, sondern auch durch den thermischen Zerfall des Glutamins in Ammonium und Pyrrilidoncarboxylsäure im Zellkulturmedium entstehen kann [Ozturk, S. S. et al. 1990, Schneider, M. et al. 1996]. Der Zerfall folgt einer Kinetik 1. Ordnung und es wurden für die untersuchten Medien in Abhängigkeit von pH-Wert, der Temperatur und der Serumkonzentration Halbwertszeiten für Glutamin im Bereich von 7 – 12 Tagen gefunden.

Eine solch hohe Zerfallsrate legt den Schluss nahe, dass zur exakten Charakterisierung des Stoffwechsels tierischer Zellen und zur Berechnung realer Verbrauchs- und Bildungsraten die Bestimmung der Glutamin-Zerfallsrate im jeweiligen Medium unter den verwendeten Bedingungen und deren Einbeziehung in die Bewertung des Stoffwechsels unerlässlich sind. Eine Möglichkeit, den Glutaminzerfall und damit die Ammoniumbildung bei der Lagerung des Mediums (z. B. gekühlt bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bei Raumtemperatur) zu minimieren, ist die direkte Zugabe erst vor Beginn der Kultivierung.

2.2.2.3 Nährmedien in der tierischen Zellkultur

Die Versorgung der Zellen mit allen Nähr- und Vitalstoffen wird über das verwendete Zellkulturmedium realisiert. Grundlegende Arbeiten bei der Entwicklung von Zellkulturmedien wurden in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts durchgeführt; hier sind besonders die bahnbrechenden Arbeiten von Eagle et al. zu Anforderungen tierischer Zellen an Nährsalze (1956), zum Stoffwechsel der Kohlenhydrate in tierischen Zellen (1958) und zum Aminosäure-Stoffwechsel (1959) zu nennen. Diese Veröffentlichungen führten zur Entwicklung einer Reihe von Minimalmedien (minimal essential medium, MEM), die mit Modifikationen an den Konzentrationen der enthaltenen Substrate (Glukose und Glutamin), Nährsalzen, Puffer-Substanzen, Vitaminen und Aminosäuren zu Weiterentwicklungen, wie z. B. DMEM (Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium), GMEM (Glasgow's Modified Minimal Essential Medium) oder IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), führten.

Die meisten der heute verwendeten Medien sind Derivate der damals entwickelten Medien mit oft nur geringen Variationen. Die Versorgung der Zellen mit Adhärenz- und Wachstumsfaktoren bzw. Hormonen und weiteren Stoffen wird allgemein über die Zugabe tierischen Serums, besonders FCS (fetal calf serum) oder NCS (newborn calf serum), realisiert. Ein in den letzten Jahren verstärkt aufkommender Ansatz ist der Ersatz dieser serum-supplementierten Medien durch serumfreie oder auch als Weiterentwicklung davon proteinfreie Formulierungen, die auf einen entsprechenden Zelltyp spezifisch abgestimmte Mengen der o. g. Faktoren enthalten und ähnliche Raten für das Zellwachstum und die Produktbildung garantieren [Scharfenberg, K. 1997, Jäger, V. et al. 1998].

2.2.2.4 Sauerstoff als Substrat für tierische Zellen

Ein weiteres wichtiges Substrat für tierische Zellen ist im Zellkulturmedium gelöster, molekularer Sauerstoff, der für eine Vielzahl von aerob verlaufenden Stoffwechsel-Prozessen substantiell ist. Dabei ist besonders die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ($0,488 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) ein Problem, da den Zellen genügend Sauerstoff zur Verfügung stehen muss und somit eine ständige Nachfütterung über verschiedene Begasungssysteme, wie z. B. Ring-Sparger, INOX-Fritten, Silikonschläuche (blasenfreie Begasung) oder Oberflächenbegasung, nötig ist. Für Zellkulturmedien unter Fermentationsbedingungen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) werden Sauerstofflöslichkeiten im Sättigungszustand von $0,698 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben, die Temperaturabhängigkeit der Sauerstofflöslichkeit kann über die empirische Formel in Gleichung 2-3 beschrieben werden [Reichl, U. und Bock, A. 2003]. Die Sauerstoffkonzentration im Bioreaktor wird über eine Sauerstoffsonde als Partialdruck p_{O_2} gemessen und kann nach Gleichung 2.-4 (Henry'sches Gesetz) in eine Gelöstsauerstoffkonzentration umgerechnet werden.

$$c_{L_{\text{O}_2}}^*(T) = 2,0496 \cdot e^{-0,017 \cdot T}$$

Gleichung 2.-3

$c_{L_{\text{O}_2}}^*$... Gelöstsauerstoffkonzentration im Sättigungszustand [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

T...Temperatur [K]

$$c_{L_{O_2}} = \frac{pO_2}{H_{O_2}} \quad \text{Gleichung 2-4}$$

$c_{L_{O_2}}$... Gelöstsauerstoffkonzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

pO_2 ... Sauerstoffpartialdruck [bar]

H_{O_2} ... Henrykonstante für Sauerstoff (z. B. bei 25 °C = $0,769 \text{ bar} \cdot \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$) [$\text{bar} \cdot \text{L} \cdot \text{mmol}^{-1}$]

$$OTR = k_L a (c_{L_{O_2}}^* - c_{L_{O_2}}) \quad \text{Gleichung 2-5}$$

OTR... Sauerstofftransferate [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

$k_L a$... flächenbezogener Stofftransportkoeffizient [h^{-1}], zusammengesetzt aus k_L (Übergangskoeffizient) und a (Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit)

$c_{L_{O_2}}^*$... Sauerstoffsättigungskonzentration in der Flüssig-Phase [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

$c_{L_{O_2}}$... Sauerstoffkonzentration in der Flüssig-Phase [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

$$OUR = q_{O_2} \cdot (x_L \cdot 1000) \quad \text{Gleichung 2-6}$$

OUR... Sauerstoffaufnahme [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

q_{O_2} ... spezifischer Sauerstoffaufnahme der Zellen [$\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Z}^{-1}$]

x_L ... Lebendzellzahl [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

$$T_{O_2} = \sum_{i=1}^{N-1} \int_{\min, i+1}^{\max, i} \frac{dc_L}{dt} \quad \text{Gleichung 2-7}$$

T_{O_2} ... kumulativer Sauerstoffverbrauch [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

N ... Anzahl der Zutakungen (Kapitel 3.5.3)

t ... Reaktionszeit [h]

Der Sauerstoffeintrag in einen Bioreaktor kann über die so genannte Sauerstofftransferate (OTR, oxygen transfer rate) nach Gleichung 2.-5 beschrieben werden. Der Sauerstoffeintrag in stationären Kulturen geschieht lediglich über die ruhende Oberfläche und kann damit besonders bei längerer Standzeit, limitiert sein. Höhere Sauerstoffeinträge werden in begasten Reaktorsystemen bzw. allgemein in bewegten Systemen, wie z. B. in Rührreaktoren oder Air-Lift-Reaktoren, erhalten. Der Weg des gelösten molekularen Sauerstoffs von der Gasblase in eine tierische Zelle ist schematisch in Abbildung 2.-5 dargestellt. Dabei sind verschiedene Transportwiderstände (δ_G und δ_L) hauptsächlich durch Diffusion und Konvektion zu überwinden. Als Theorie für den Stoffübergang zwischen Flüssig- und Gasphase, also zwischen Zellkulturmedium und Gasblase, hat die Zweifilmtheorie nach Lewis & Whitman

(Abbildung 2.-5) und ihre Erweiterungen breite Anwendung gefunden [Storhas, W. 2003]. Die Sauerstoffaufnahme (OUR) einer Zellkultur im Bioreaktor stellt dann das Produkt aus dem spezifischen Sauerstoffbedarf einer Zelle und der im Reaktor zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Zellzahl dar (Gleichung 2.-6). Die Messung der OUR ist dabei nicht einfach, stark methodenabhängig und mit einem relativ großen Fehler bzw. mit Unsicherheiten verbunden. Typische Werte für spezifische Sauerstoffaufnahme (q_{O2}) tierischer Zellen liegen im Bereich von etwa 1,0 – 3,0 · 10⁻¹⁰ mmol · h⁻¹ · Z⁻¹ [Ruffieux, P.-A. et al. 1998, Deshpande, R. R. und Heinzle, E. 2004]. Die spezifische Aufnahme einer Zelle ist dabei, neben dem Zelltyp, vor allem vom physiologischen Zustand der Zelle, dem Zeitpunkt der Kultivierung und auch von der Betriebsweise des Reaktors (Batch-Betrieb, Fed-Batch Betrieb, kontinuierlicher Betrieb) abhängig [Peng, C. A. und Palsson, B. O. 1996, Ducommun, P. et al. 2000]. Durch die Aufsummierung der OUR-Werte über die Reaktionszeit kommt man zum kumulativen Sauerstoffverbrauch T_{O₂} (Gleichung 2.-7).

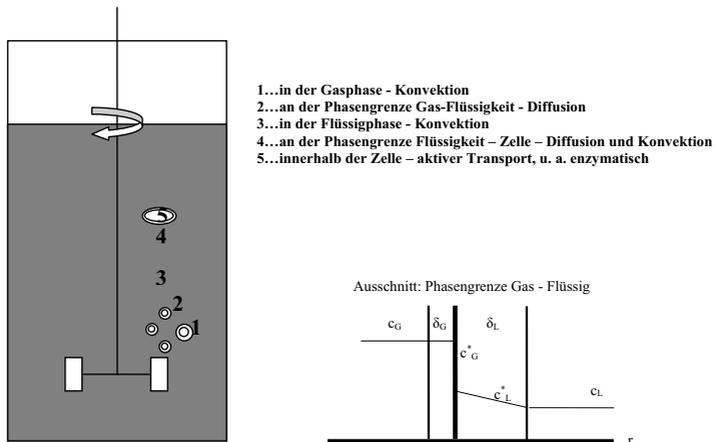


Abbildung 2.-5: Schematische Darstellung des Sauerstoffübergangs von der Gasblase in eine tierische Zelle im Bioreaktor und des Zweifilmmodells nach Lewis & Whitman [Storhas, W. 2003]

Der für die Reaktorauslegung, den Scale-Up und die Bewertung des Sauerstoffeintragsverhaltens wichtige, flächenbezogene Sauerstofftransportkoeffizient k_{La} kann nach mehreren Methoden bestimmt werden, die beiden wichtigsten sind die Sulfit-Methode und die dynamische Ausgasungsmethode. Letztere wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der verwendeten Bioreaktoren eingesetzt [Storhas, W. 2003, Reichl, U. und Bock, A. 2003].

2.2.3 Der Zellzyklus tierischer Zellen

Der Zellzyklus besteht aus den beiden Phasen Mitose und Interphase und kann abhängig vom Zelltyp und äußeren Faktoren zwischen 12 - 24 h dauern (Abbildung 2.-6). Der Begriff Zellzyklus beschreibt dabei die Gesamtheit der Abläufe in einer eukaryotischen Zelle zwischen zwei Zellteilungen [Freshney, R. I. 2005]. Die Mitose ist die eigentliche Teilung der Zellen und besteht aus den Unterphasen Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase mit einer Gesamtdauer von etwa 0,5 – 1,0 h. Die Interphase (Zwischenphase) ist in die Unterphasen G₀-Phase, G₁-Phase, S-Phase und G₂-Phase untergliedert (Abbildung 2.-6). Die einzelnen Abschnitte der Interphase sollen im Folgenden kurz erläutert werden, da der Zustand der Zellen im Zellzyklus für die Infektion mit dem in dieser Arbeit verwendeten Mink Enteritis Virus (MEV) von grundlegender Wichtigkeit ist.

G₁-Phase

Nach der erfolgten Mitose beginnt das Wachstum der Zelle mit der Neusynthese von Bestandteilen des Cytosols oder Cytoplasmas und von Zellorganellen. Weiterhin kommt es zur Vorbereitung der Synthesephase durch Produktion von mRNA, DNA-Polymerasen und Ligasen. Die G₁-Phase dauert *in vitro* ca. 1 – 12 h (ca. 8 h in Maus-Zellen, ca. 10 h in humanen Zelllinien) an. Es liegt ein vollständiger Satz Ein-Chromatid-Chromosomen vor.

S-Phase

Während der Synthesephase kommt es zur DNA-Replikation, es werden sehr viele Histone gebildet. Während der im Mittel 9 – 14 h dauernden S-Phase entstehen aus den Ein-Chromatid-Chromosomen dann Zwei-Chromatid-Chromosomen. Das in dieser Arbeit verwendete Mink Enteritis Virus (MEV) vermehrt sich ausschließlich während der S-Phase (Kapitel 2.2.4).

G₂-Phase

In der prämitotischen G₂-Phase erfolgt die Vorbereitung auf die erneute Zellteilung, u. a. durch Einschmelzung des Endoplasmatischen Retikulums sowie die Synthese von RNA und zellteilungsspezifischen Proteinen. Die mittlere Dauer ist mit 1 – 3 h im Vergleich zu den anderen Phasen relativ kurz.

enthalten. In serumfreien Medien müssen sie in den meisten Fällen in entsprechenden Konzentrationen supplementiert werden [Jäger, V. et al. 1988, Scharfenberg, K. et al. 1997]. Wichtige innere Faktoren der Zellzyklus-Regulation sind die sogenannten Zellzyklusproteine wie die CDK's (cycline dependent kinases) und die Zykline; diese werden durch äußere Faktoren und Wachstumsfaktoren aktiviert und wirken durch die Phosphorylierung weiterer Proteine. Durch diese Zellzyklusproteine besteht die Möglichkeit, Zellen in ihrem Zyklus zu arretieren oder auch die Apoptose einzuleiten [Al-Rubeai, M. et al. 1991, Al-Rubeai, M. und Singh, R. P. 1998].

Der Zellzyklus tierischer Zellen ist in der Vergangenheit sehr gut, vor allem mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden, untersucht worden. Von Relevanz für die virale Impfstoffherstellung sind dabei besonders die Arbeiten von Emmett et al. (2005), die die Beeinflussung des Zellzyklus durch Viren beschrieben, und von Hawboldt et al. (1994), welche die Veränderungen im Zellzyklus bei der Kultivierung von VERO und MRC-5 Zellen auf Microcarriern näher untersuchten. Für diese Dissertation ergaben sich aus beiden Veröffentlichungen wertvolle Aspekte, da bekannt war, dass das MEV sich zellzyklusabhängig repliziert und der Herstellungsprozess in Microcarriersysteme übertragen werden sollte. Somit lag es nahe, für eine detaillierte Prozessuntersuchung und –optimierung eine durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellvermehrung und Viruspropagation anzustreben und zu etablieren.

2.2.4 Das Mink Enteritis Virus (MEV) – Ein Parvovirus

Das in dieser Arbeit untersuchte *Mink Enteritis Virus* (MEV) gehört zur Familie der *Parvoviridae*. Die Familie der *Parvoviridae* wird in zwei Unterfamilien eingeteilt, die wiederum in mehrere Genera aufgeteilt sind. Der Stammbaum ist in der Abbildung 2.-7 dargestellt. Die Unterfamilie *Parvovirinae*, deren Vertreter nur Vertebraten infizieren, wird in die fünf Genera der *Dependoviren*, *Erythroviren*, *Amdoviren*, *Bocaviren* und *Parvoviren* unterteilt. Letztere werden auf Grund ihrer Vermehrung auch als autonom replizierende Parvoviren bezeichnet. Im Gegensatz dazu benötigen z. B. *Dependoviren* (Adenoassoziierte Viren) für ihre Vermehrung Helferviren; zu diesen können *Adenoviren*, *Herpesviren* oder *Vacciniaviren* gehören. Viren aus der Unterfamilie der *Densovirinae* infizieren nur Insekten [Parrish, C. R. et al. 1987, Cotmore, S. F. und Tattersall, P. 1993, Hueffer, K. und Parrish, C. R. 2003].

Die Parvoviren gehören mit einem Durchmesser von 18 – 26 nm zu den kleinsten bekannten Viren (Abbildung 2.-8 links). Daher wird auch der Name abgeleitet (lat. parvus = klein). Die Form des unbehüllten Viruscapsids ist ikosaedrisch (Abbildung 2.-8 rechts). Die 60 Untereinheiten, die das Capsid formen, haben eine β -Faltblattstruktur, die für viele virale Proteine typisch ist. Die Anordnung der Untereinheiten in Kugelform bietet optimalen Schutz für die Partikel (M_w 5,5 – 6,2 · 10⁶ Dalton) bei geringem Codierungsaufwand. Auf Grund der fehlenden Hülle sind Parvoviren extrem stabil gegenüber äußeren Einflüssen wie z. B. Temperatur (bis zu 60 min bei 56 °C), pH (pH 3 – 9 bis zu 3 h) sowie Detergenzien und Lösungsmitteln (Chloroform und Ethylether). Parvoviren können effizient durch Erhitzen auf 80 °C für 10 min sowie Behandlung mit Formalin, β -Propiolacton und Hydroxylamin inaktiviert werden.

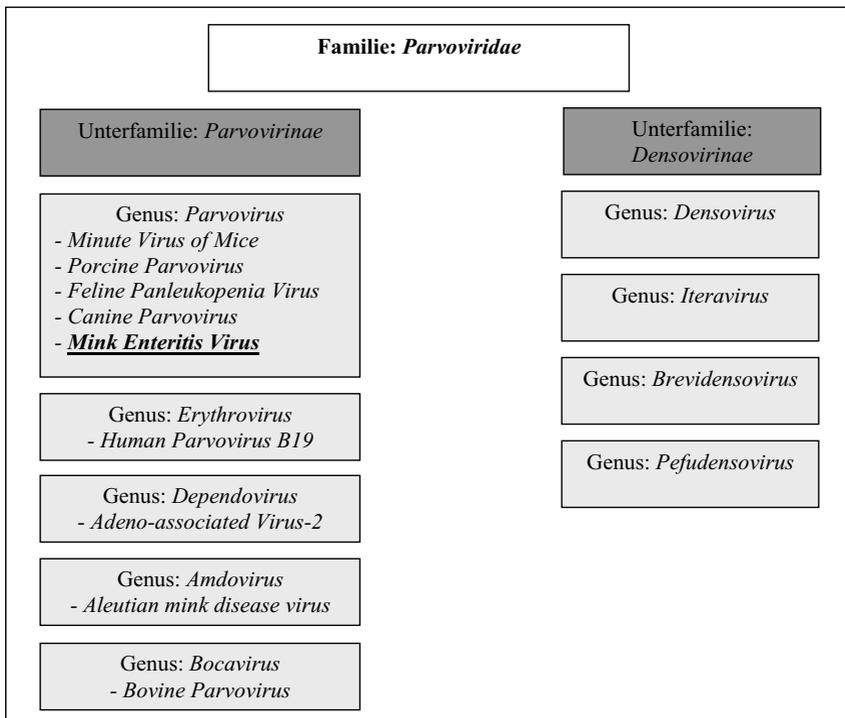


Abbildung 2.-7: Einteilung der Familie der *Parvoviridae* [International Committee of Taxonomy of Viruses Database (ICTVdb), Hueffer, K. und Parrish, C. R. 2003]

Das Genom der Parvoviren liegt als einzelsträngiges DNA-Molekül mit einer Länge von 5000 Nucleotiden vor und kodiert für die drei Strukturproteine VP1 – VP3 sowie zwei Nichtstrukturproteine. Das Parvovirus-Genom hat sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende palindromische Sequenzen mit einer Länge von etwa 115 Nucleotiden. Diese formen sogenannte "hairpins" und spielen bei der viralen Genom-Replikation eine Rolle [Truyen, U. und Parrish, C. R. 1995, Carman, P. S. und Povey, R. C. 1983]. Die komplette Sequenzierung des MEV-Genoms erfolgte 1991 mit dem Stamm "Abashiri"; mit diesen Arbeiten wurde die Grundlage für die potentielle Entwicklung von Peptid- bzw. DNA-Vakzinen gegen MEV gelegt [Kariatsumari, T. et al. 1991].

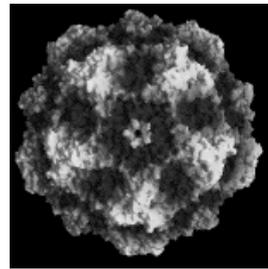
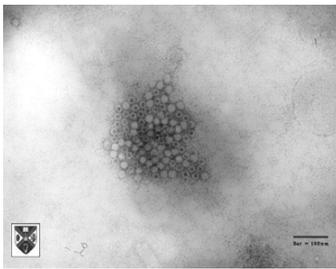


Abbildung 2.-8: (links) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines caninen Parvovirus [Aufnahme: Mc Nulty, S., The Queens University of Belfast, ICTVdb] und (rechts) 3 D – Aufnahme (Computer-Rekonstruktion) des caninen Parvovirus [Aufnahme: Sgro, J. Y., University of Madison]

Der Infektionszyklus der Parvoviren ist sehr gut am Beispiel des caninen Parvovirus und des humanen Parvovirus B19 untersucht [Truyen, U. und Parrish, C. R. 1995, Vihinen-Ranta, M. et al. 2003]. Demnach ist die Replikation autonomer Parvoviren in die Schritte Adsorption des Virus und Internalisierung in die Zelle, Transport in den Zellkern und DNA-Replikation sowie Zusammenbau der Virionen und Freisetzung untergliedert (Abbildung 2.-9).

1. Adsorption des Virus und Internalisierung in die Zelle

- Bindung des Viruspartikels an Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle (für canine und feline Parvoviren der Transferrin-Rezeptor) [Truyen, U. und Parrish, C. R. 1995],
- endocytotische Einschnürung der Zellmembran unter Einschluss des Viruspartikels.

2. Transport in den Zellkern und DNA-Replikation

- Auflösung der eingestülpten Zellmembran und Freisetzung des Viruspartikels,
- Auflösung des Virus-Capsids durch zelleigene Enzyme und Freisetzung des Virus-Genoms. Transport des Genoms in den Zellkern,
- zuerst Transkription der Nichtstrukturproteine in mRNA und Transport zu den Ribosomen der Zelle, dort Synthese der Proteine, danach Transkription der drei Strukturproteine und ebenfalls Proteinsynthese in den Ribosomen,
- Replikation des viralen Genoms (genauer Replikationsprozess noch nicht völlig verstanden), offenbar Nutzung der DNA-Polymerase der Wirtszelle, daher nur Vermehrung in teilenden Zellen (S-Phase des Zellzyklus), da kein autonomer Start der DNA-Replikation der Zelle möglich.

3. Zusammenbau der Virionen und Freisetzung der Virionen durch Zelllyse

- Verpackung des viralen Genoms in die Capside im Cytoplasma und Freisetzung der Viruspartikel durch Lysis der Wirtszelle.

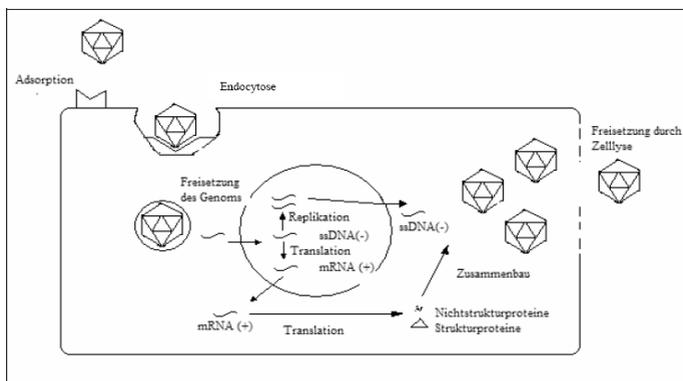


Abbildung 2.-9: Schema der Replikation von Parvoviren [Straube, S. 2005]

Parvoviren sind strikt wirtsspezifisch und können somit zumeist nur eine Spezies infizieren [Truyen, U. und Parrish, C. R. 1995]. Das Mink Enteritis Virus (MEV) gehört zur Untergruppe der felines Parvoviren, zu denen auch das feline Panleukopeniavirus (FPLV), das canine Parvovirus (CPV) und das Raccoon Parvovirus (RPV) gezählt werden. Der

Vergleich des genetischen Materials dieser Viren zeigt Abweichungen von lediglich 2 % im Genom. Dadurch erklärt sich auch die enge serologische Verwandtschaft der felines Parvoviren, die zu einem Kreuzschutz, besonders bei Impfungen führt [Flagstad, A. 1977, Carman, P. S. und Povey, C. R. 1983, Truyen, U. und Parrish, C. R. 1995].

Der Namensgeber der Untergruppe der felines Parvoviren, das feline Panleukopeniavirus, trat erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts als Erreger der "Katzenseuche" in Erscheinung [Flagstad, A. 1977, Parrish, C. R. 1990]. Das Auftreten von MEV wurde erstmals 1947 auf Nerz-Farmen im Gebiet von Fort Williams in Ontario (Kanada) beobachtet. Da man auf diesen Ausbruch nicht vorbereitet und der Erreger zunächst nicht bekannt war, mussten große wirtschaftliche Einbußen hingenommen werden. Dabei waren besonders Jungtiere betroffen, jedoch gab es auch viele Verluste unter erwachsenen Tieren. Der Erreger dieser Krankheit wurde 1949 erstmals von Schofield isoliert, beschrieben und als Mink Enteritis Virus bezeichnet [Schofield, F. W. 1949, McPherson, L. W. 1956, Burger, D. und Gorham, J. R. 1970]. Die Ausbreitung des Virus erfolgte zunächst in Kanada, später wurden in nahezu allen anderen Länder, in denen die Pelztierzucht mit Nerzen betrieben wurde, wie z. B. Dänemark, Schweden und Japan, MEV-Infektionen festgestellt [Kääriäinen, L. et al. 1966]. Ein besonderes Problem war dabei die sehr hohe Stabilität des Virus, die das Überdauern auch unter extremen Umweltbedingungen ermöglichte und damit seine Verbreitung sehr förderte. Die enge serologische Verwandtschaft des MEV mit dem FPV wurde schnell erkannt und es kam ab 1952 zum ersten Einsatz von FPV-Impfstoffen gegen das MEV. Bereits mit diesen nicht-homologen Impfstoffen konnte die Ausbreitung unter Kontrolle gebracht werden [Pridham, T. J. und Wills, C. G. 1960].

Die Entwicklung von Impfstoffen direkt gegen das MEV begann in den 1960er Jahren und vollzog sich über die Etablierung der Virusvermehrung in Zellkulturen, u. a. in Tiger-, Katzen-, Nerz- und Frettchen-Zelllinien [Burger, D. und Gorham, J. R. 1970]. Weitere Schritte waren die Entwicklung großtechnischer Herstellungsverfahren für FPLV-Impfstoffe zur Vakzinierung gegen MEV in Microcarrier-Kultur [Rivera, E. et al. 1987], der Einsatz von im Baculovirus-System produzierten MEV-Capsid-Vakzinen [Christensen, J. et al. 1994], die Nutzung des Kreuzschutzes gegen MEV durch Verwendung von rekombinanten CPV-Capsid-Vakzinen [Langeveld, J. P. M. et al. 2003] und die serumfreie Produktion von MEV-Vakzinen [Zhang, D.-L. 1997]. Im Vergleich zu diesen Ansätzen stellt die MEV-Vakzine "FEBRIVAC 3-PLUS" des IDT einen konventionellen, jedoch sehr wirksamen Weg der MEV-Vakzinierung von Nerzen dar, der durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter verbessert werden sollte.

2.3 Technologische Aspekte bei der Impfstoffherstellung

2.3.1 Prozessführungsstrategien

In der Reaktionstechnik allgemein und der Bioprozesstechnik im Besonderen werden drei Arten der Prozessführung, Batch-Prozess, Fed-Batch-Prozess und kontinuierlicher Prozess, unterschieden. Alle diese Arten der Prozessführung wurden in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Experimenten angewandt und sollen im Folgenden vorgestellt werden. Die Betriebsweisen sollen dabei vor allem durch ihre Volumen- und Zellzahlbilanzen beschrieben werden, die durch Ableitung in die entsprechenden Berechnungsgleichungen für Zellzahlen etc. überführt werden können. Das Wachstum der Zellen wird in dieser Arbeit als exponentiell betrachtet, dabei ist besonders für adhärente Zellen in Microcarrier-Kultur ein beträchtlicher linearer Anteil bekannt [Reichl, U. und Bock, A. 2003]. Die Beschreibung des Stoffwechsels erfolgt aus Gründen der einfacheren Darstellung und der Datenlage ausschließlich mit linearen Ansätzen. Für weiterführende Arbeiten in Richtung modellhafter Prozessbeschreibung wäre hier eine mathematisch exakte Angleichung nötig. Grundsätzlich gilt bei der Prozessbeschreibung die in den Gleichungen 2.-8 und 2.-9 dargestellte allgemeine Bilanzgleichung einer extensiven Zustandsgröße, die dann für die entsprechende Betriebsweise adaptiert werden kann [Storhas, W. 2003, Reichl, U. und Bock, A. 2003].

$$\frac{d(Vy)}{dt} = V \sum r_{gen} - V \sum r_{con} + F_i y_i - F_o y_o \quad \text{Gleichung 2.-8}$$

Auflösung der Klammer auf der linken Seite führt zu

$$V \frac{dy}{dt} + y \frac{dV}{dt} = V \sum r_{gen} - V \sum r_{con} + F_i y_i - F_o y_o \quad \text{Gleichung 2.-9}$$

V...Reaktorvolumen [L]

y...Konzentration einer beliebigen extensiven Zustandsgröße [mmol · L⁻¹]

t...Reaktionszeit [h]

Σ_{r_{gen}}...Summe der Bildungsraten [mmol · L⁻¹ · h⁻¹]

Σ_{r_{con}}...Summe der Verbrauchsdaten [mmol · L⁻¹ · h⁻¹]

F_i...Zulaufvolumenstrom [L · h⁻¹]

y_i...Konzentration einer beliebigen extensiven Zustandsgröße im Zulauf [mmol · L⁻¹]

F_o...Ablaufvolumenstrom [L · h⁻¹]

y_o...Konzentration einer beliebigen extensiven Zustandsgröße im Ablauf [mmol · L⁻¹]

Batch-Prozess

Die Batch-Betriebsweise (diskontinuierliche Betriebsweise) ist die einfachste der drei Arten der Prozessführung. Im klassischen Batch-Betrieb gilt $F_i = F_o = 0$. Damit ist das Reaktorvolumen konstant. Unter Annahme idealer Durchmischung gelten die Gleichungen 2.-10 – 2.-12 zur Prozessbeschreibung. Zu Beginn der Reaktion werden Zellen und Nährmedium in den Reaktor gegeben, das Zellwachstum und ggf. die Produktbildung beginnen unter Verbrauch der im Medium enthaltenen Substrate. Das Zellwachstum wird durch vollständigen Verbrauch der Substrate oder Bildung toxischer Metabolitkonzentrationen und bei adhärennten Zellen durch Flächenlimitierung inhibiert. Die Kultivierung wird beendet und die Ernte dann zum Downstream (Aufarbeitung) transferiert.

$$\text{Volumenbilanz: } \frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{Gleichung 2.-10}$$

$$\text{allgemeine Bilanzgleichung: } V \frac{dy}{dt} = V \sum r_{gen} - V \sum r_{con} \quad \text{Gleichung 2.-11}$$

geteilt durch das Volumen und unter der Annahme, dass keine Zellen absterben ($r_{con} = 0$), ergibt

$$\text{Bilanz der Zellzahl: } \frac{dx}{dt} = r_x \quad \text{Gleichung 2.-12}$$

x...Zellzahl [$Z \cdot \text{mL}^{-1}$]

r_x ...Zunahmerate der Zellzahl [$Z \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

Vorteile der Batch-Betriebsweise sind neben dem einfachen und zuverlässigen Betrieb auch geringe Investitionskosten hinsichtlich peripherer Einrichtungen und geringe Anforderungen an das Know-how der Bediener der Produktionsanlagen. Daher sind Batch-Prozesse trotz offensichtlicher Nachteile, wie z. B. geringer Ausbeuten (Zellzahlen zwischen $1,0 - 3,0 \cdot 10^6 Z \cdot \text{mL}^{-1}$), weit verbreitet. Im industriellen Maßstab der Zellkultur sind zur Produktion monoklonaler Antikörper (mAK) in Chinese Hamster Ovary (CHO) - Zellen Anlagen bis zum 15 000 L-Maßstab beschrieben [Hu, W.-S. und Aunins, J. G. 1997, Spier, R. E. 2000, Kretzmer, G. 2002]. Typische Reaktorvolumina, besonders für die Impfstoffproduktion, liegen mit 500 – 2 500 L weit darunter. Viele Prozesse der Produktion von Impfstoffen sind Batch-Prozesse, oft mit einem Zwei-Phasen-Verlauf für Zellwachstum und Virusvermehrung [Schügerl, K. 2000, Genzel, Y. et al. 2004].

Fed-Batch-Prozess

Die Limitierung an Substraten im Bioreaktor kann durch Zufütterung von Medien bzw. Nährstoffen umgangen werden [Storhas, W. 2003]. Dabei werden prinzipiell zwei Varianten unterschieden, zum einen die Konstanzhaltung des Volumenstroms bei Zufütterung ($F_i > 0$ und $F_o = 0$) und zum anderen die Konstanzhaltung der Konzentration eines Stoffes im Reaktor. Als Fed-Batch-Prozesse können auch die Einmal-Zugabe eines Substrates bzw. ein Medienwechsel betrachtet werden. Die Anwendung von Fed-Batch-Regimes erfordert im Allgemeinen eine vertiefte Prozesskenntnis und die Entwicklung spezieller Feedingstrategien unter Kenntnis der spezifischen Verbrauchsraten der Zellen (Gleichungen 2.-13 - 2.-15). Sehr oft sind Fed-Batch-Prozesse mit einem erhöhten Regelungsaufwand verbunden [Lavric, V. et al. 2005]. Durch die Zufütterung kommt es zu einer höheren Zellausbeute, verlängerter Wachstums- und Produktbildungsphase und höheren Produktausbeuten. Allerdings wird das Problem der Akkumulation inhibierender Metabolite nur zum Teil gelöst und es kann, abhängig von der Feed-Strategie, sogar zu erhöhten Konzentrationen von Inhibitoren (Laktat, Ammonium, Kapitel 2.2.2) kommen. Mit Fed-Batch-Prozessen wurden Zellzahlen von bis $9,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ für CHO-Zellen und hohe mAK-Titer erreicht [Bibila, T. A. et al. 1995]. Es sind Reaktoren mit maximalen Volumina bis 15 000 L und typischen Volumina zwischen 2 000 und 5 000 L beschrieben [Hu, W.-S. und Aunins, J. G. 1997, Kretzmer, G. 2002].

$$\text{Volumenbilanz: } \frac{dV}{dt} = F_i \quad \text{Gleichung 2.-13}$$

$$\text{allgemeine Bilanzgleichung: } V \frac{dy}{dt} + y \frac{dV}{dt} = V \sum r_{gen} - V \sum r_{con} + F_i y_i \quad \text{Gleichung 2.-14}$$

geteilt durch das Volumen, mit $x_i = 0$ und unter der Annahme, dass keine Zellen absterben ($r_{con} = 0$)

$$\text{Bilanz der Zellzahl: } \frac{dx}{dt} = r_x - \frac{F_i}{V} x = r_x - Dx \quad \text{Gleichung 2.-15}$$

D...Verdünnungsrate (F_i/V) [h^{-1}]

Einen Spezialfall des Fed-Batch-Prozesses stellen sogenannte Mehrfachernte-Systeme ("multiple harvest" oder repeated-batch) dar, die sowohl im industriellen Prozess der MEV-Vakzine-Produktion am IDT als auch in Experimenten dieser Arbeit in verschiedenen Reaktoren angewandt wurden. Dabei werden während der Vermehrung von MEV 90 – 95 %

des Reaktorvolumens ausgetauscht und damit zwischen 3 und 6 Virusernten mit einem Virusgehalt erzielt, der über dem nötigen Mindesttiter von $10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ liegt. Die Ursache für diese Möglichkeit der mehrfachen Ernte liegt in der Eigenschaft des MEV, sich nur in mitotischen Zellen (S-Phase) zu vermehren. Damit überlebt wahrscheinlich ein Teil der Zellen die erste Infektionsrunde und kann erst später bei Eintreten in die S-Phase von den Viren infiziert werden und damit neue Viren produzieren (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4).

Kontinuierlicher Prozess

Bei kontinuierlichen Prozessen werden Prozesse mit und ohne Zellrückhaltung unterschieden. Im Folgenden soll nur auf den kontinuierlichen Prozess mit Zellrückhaltung (Perfusion) eingegangen werden, dessen mögliche Anwendbarkeit für den MEV-Produktionsprozess in Microcarriersystemen in dieser Arbeit untersucht wurde. Bei der Perfusion wird dem Reaktor kontinuierlich mit konstantem Zulaufvolumenstrom Medium zugeführt und mit (im Idealfall gleichem) konstantem Ablaufvolumenstrom wird Medium aus dem Reaktor entnommen ($F_i = F_o = F \neq 0$; Gleichung 2.-16 – 2.-18). Dabei werden die Zellen durch geeignete Maßnahmen, wie z. B. Spinfilter, Ultraschallrückhaltesysteme, Immobilisierung der Zellen auf Microcarriern und Kombination mit Filtern o. ä. oder einfache Sedimentationsstrecken (Steigrohre), im Reaktor gehalten. Es kommt unter idealen Bedingungen, d. h. bei optimaler Einstellung der Förderraten für den Prozess, zu konstanten Konzentrationen von Substraten und Metaboliten. Dadurch stehen den Zellen immer ausreichend Nährstoffe zur Verfügung, während die Metabolitkonzentrationen unterhalb von inhibierenden Leveln gehalten werden können [Büntemeyer, H. et al. 1987, Ghanem, A. und Shuler, M. L. 2000, Storhas, W. 2003, Pohlscheidt, M. 2005].

$$\text{Volumenbilanz: } \frac{dV}{dt} = F_i - F_o = 0 \quad \text{Gleichung 2.-16}$$

$$\text{allgemeine Bilanzgleichung: } V \frac{dy}{dt} = V \sum r_{gen} - V \sum r_{con} + F(y_i - y_o) \quad \text{Gleichung 2.-17}$$

geteilt durch das Volumen, unter Vernachlässigung des Zelltds und ohne Zufuhr bzw. Entnahme von Zellen ergibt sich

$$\text{Bilanz der Zellzahl: } \frac{dx}{dt} = r_x$$

Gleichung 2.-18

x_{vo} ...Zellzahl im Ablauf, bei Zellrückhaltung im Idealfall $x_{vo} = 0$, [$Z \cdot \text{mL}^{-1}$]

Durch die Perfusion erhöhen sich sowohl Vitalität und Zellausbeuten besonders in Suspensionszellsystemen ($> 1,0 \cdot 10^7 Z \cdot \text{mL}^{-1}$), es entsteht jedoch ein beträchtlicher Peripherie- und Regelungsaufwand und es ist eine sehr detaillierte Prozesskenntnis nötig, um die Perfusion unter optimalen Bedingungen betreiben zu können. Trotz dieser Aufwendungen überwiegen für einige Anwendungen, besonders im kleinen Maßstab, die Vorteile der Perfusion und es wurden bereits Prozesse in verschiedenen Reaktorsystemen und für verschiedene Applikationen beschrieben. Typische Reaktorgrößen für Perfusionssysteme liegen, je nach Reaktor-Typ und Anwendung, bei 0,25 – 10 L im Labormaßstab und 10 – 200 L im industriellen Maßstab. Butler et al. etablierten 1983 für adhärenente MDCK Zellen einen Microcarrierprozess im 0,5 L-Maßstab unter Perfusionsbedingungen und erreichten Zellzahlen um $8,0 \cdot 10^6 Z \cdot \text{mL}^{-1}$. Durch Entwicklung eines mit Vibration arbeitenden Systems zur gleichzeitigen Zellrückhaltung und -begasung erreichten Reiter et al. 1990 in einem 6 L wv Microcarriersystem Zellzahlen bis $1,0 \cdot 10^7 Z \cdot \text{mL}^{-1}$. Sie fanden eine leichte Skalierbarkeit des Systems, damit verbunden schlussfolgerten sie eine relativ einfache Adaption des Systems für eine großtechnische Anwendung. Geserick et al. erkannten 2000 eine erhöhte Produktivität für einen IgG-Antikörper im 5 L-Maßstab in BHK-Zellen für einen Zeitraum von sieben Wochen. Eine industrielle Anwendung wurde z. B. von Bödeker et al. 2001 mit der Herstellung von Faktor VIII in BHK-Zellen im 200 L-Maßstab beschrieben.

2.3.2 Bioreaktoren für die tierische Zellkultur

Die bei der Kultivierung tierischer Zellen im Allgemeinen und bei der Produktion von Impfstoffen im Besonderen eingesetzten Bioreaktoren sind in Art, Technik, Größe sowie Zugriffsmöglichkeiten auf den Prozess sehr unterschiedlich und umfassen sowohl weit etablierte Systeme, wie Rollerflaschen, Wannenstapel und Rührreaktoren, als auch neuere Reaktortypen, wie den Wave[®] Bioreaktor, und Spezialformen, wie Airlift-Reaktoren oder Hollow-Fiber-Reaktoren [Glacken, M. W. et al. 1983, Engasser, J.-M. 1988, Hesse, F. und Wagner, R. 2000, Kretzmer, G. 2002, Dürrschmid, M. P. et al. 2003, Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005]. Im Folgenden soll nur auf die in dieser Arbeit relevanten Reaktorsysteme, wie statische und semistatische Reaktoren, Rührreaktoren sowie den Wave[®] Bioreaktor, eingegangen werden.

Statische und semistatische Bioreaktorsysteme

Die einfachsten Systeme zur Kultivierung adhärenter tierischer Zellen stellen Gewebekulturflaschen und Rollerflaschen dar, die entsprechend der geringen Scherkräfte als statische (Gewebekulturflaschen bzw. Wannenstapel) bzw. semistatische (Rollerflaschen) Bioreaktorsysteme bezeichnet werden (Abbildung 2.-10 links). Die Zellen wachsen auf einer Kunststoffoberfläche, die mit Anheftungsfaktoren, wie z. B. Poly-L-Lysin, beschichtet sein kann. Bei Rollerflaschen erfolgt die Drehung der Flaschen in einem entsprechenden Inkubator, die Zellen wachsen auf der inneren Oberfläche und werden durch einen über die Drehung der Flasche generierten, dünnen Flüssigkeitsfilm mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Typische Zellkulturflaschen haben eine Oberfläche von 25, 75 und 175 cm², Wannenstapel sind in Größen von ca. 1 000 – 10 000 cm² erhältlich, typische Rollerflaschen haben Oberflächen von 850 – 1 700 cm². Das Zellwachstum in diesen Systemen ist dabei vor allem durch die Wachstumsfläche begrenzt. Auch die nicht geregelten Parameter pH-Wert und pO₂ wirken wachstumsinhibierend und damit auch begrenzend auf die Produktausbeute. Dennoch werden besonders Rollerflaschen und Wannenstapel auf Grund der einfachen Handhabung sehr verbreitet vor allem für die Impfstoffproduktion eingesetzt. Nachteile der Systeme sind auch der hohe Personalaufwand beim Einsatz der Rollerflaschen und ein relativ großes Kontaminationsrisiko durch die oft hohe Zahl der Rollerflaschen. In dem in dieser Arbeit untersuchten und zu optimierenden Prozess der MEV-Impfstoffproduktion werden ca. 400 – 500 Rollerflaschen für einen Ansatz (Kampagne) verwendet.

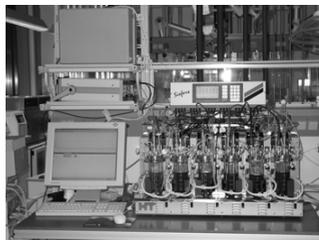


Abbildung 2.-10: (links) Statische und semistatische Kultivierungssysteme (Gewebekulturflaschen und Rollerflaschen) zur *in-vitro* Anzucht tierischer Zellen und (rechts) Parallelrührreaktor-System (0,5 L-Maßstab) zur Kultivierung tierischer Zellen

Rührreaktoren

Rührreaktoren stellen sowohl in der chemischen Verfahrenstechnik als auch in der Biotechnologie weit verbreitete und gut untersuchte Reaktorsysteme aus Edelstahl oder - im kleinen Maßstab - aus Glas dar. Die Zellen werden in Rührreaktoren entweder als Suspensionszellen oder im Fall von adhärenenten Zellen auf Substraten, wie z. B. Microcarriern, kultiviert. Letztere Technologie wurde auch in dieser Arbeit genutzt und wird im Kapitel 2.3.3 näher vorgestellt. Rührreaktoren sind typischerweise mit Sonden (pH, T, p, pO₂) und einer Reaktorsteuerung ausgestattet und können pH- und pO₂-kontrolliert betrieben werden. Die Arbeitsvolumina von Rührreaktoren für die Zellkultivierung reichen von kleinen Laborsystemen (0,5 L-Maßstab, Abbildung 2.-10 rechts) über Laborsysteme mittlerer Größe (5 L-Maßstab, Abbildung 2.-11 links) und Systeme im Technikumsmaßstab (50 – 500 L-Maßstab) bis hin zu großtechnischen Anlagen mit bis zu 15 000 L Arbeitsvolumen [Engasser, J.-M. 1988, Hesse, F. und Wagner, R. 2000, Kretzmer, G. 2002].



Abbildung 2.-11: (links) Rührreaktor (5 L Arbeitsvolumen) mit Peripherie und (rechts) Wave® Bioreaktor 20 SPS (1 - 10 L Arbeitsvolumen) zur Kultivierung tierischer Zellen

Bei der Kultivierung tierischer Zellen in Rührreaktoren wirken im Vergleich zu statischen Systemen sehr viel höhere Scherkräfte auf die Zellen, die auf Grund der fehlenden Zellwand darauf sehr viel sensitiver als z. B. Bakterien reagieren. Daher liegt großes Augenmerk auf der verfahrenstechnischen Charakterisierung der Rührreaktoren unter Zuhilfenahme von Parametern, wie z. B. Leistungseintrag über den Rührer, Stofftransportkoeffizienten, Verweil- und Mischzeiten sowie Wärmeaustausch [Henzler, H.-J. 1982, Pohlscheidt, M. 2005]. Der Scale-Up von Rührreaktoren ist ebenfalls gut untersucht worden; dies führte zur Festlegung von empirischen Scale-Up-Regeln, die für jedes System optimiert werden müssen [Henzler, H.-J. 1982, Glacken, M. W. et al. 1983, Engasser, J.-M. 1988]. Nachteile sind vor allem der hohe Reinigungs- und Validierungsaufwand sowie die hohen Anschaffungskosten dieser Systeme.

Wave® Bioreaktor

Der Wave® Bioreaktor (Abbildung 2.-11 rechts) ist ein erst 1998 eingeführtes und patentiertes Einweg-System ("disposable bioreactor") zur Kultivierung von Zellen im Maßstab von 1 – 100 L [Singh, V. 1998]. Die Zellen werden in CellBags, zumeist aus LDPE Polymer USPXXII class VI, kultiviert. Der Gas- und Stoffaustausch wird über eine in Amplitude (Kippwinkel) und Frequenz (Kipptrate) variable, wellenförmige Bewegung der Auflagefläche des CellBags realisiert (Kapitel 3.5.4). Der Wave® Bioreaktor wurde in Zusammenarbeit mit der FH Wädenswil (CH) entwickelt und dort auch verfahrenstechnisch hinsichtlich von Parametern wie Reynolds-Zahl (modifizierte Reynolds-Zahl Re_{mod} als dimensionslose Kennzahl), $k_L a$ -Wert und Mischzeit (t_M) charakterisiert [Eibl, R. et al. 2005]. Für ausgewählte Arbeitsvolumina sind diese Parameter unter Beachtung der entsprechenden Parameter für Kipptrate und Kippwinkel in Tabelle 2.-1 zusammengefasst.

Tabelle 2.-1: Ausgewählte Parameter zur verfahrenstechnischen Charakterisierung des Wave® Bioreaktors [Eibl, R. et al. 2005]

Arbeitsvolumen	Reynolds-Zahl Re_{mod}	$k_L a$ -Wert [h^{-1}]	Mischzeit t_M [s]
1 L	≈ 750	4,5	9 – 264
10 L	≈ 1750	3,9	40 – 1402

Die Reynolds-Zahlen liegen im laminaren Bereich bzw. Übergangsbereich zwischen laminarer und turbulenter Strömung, was einen relativ hohen, jedoch beherrschbaren Einfluss der Strömungsverhältnisse (Scherkräfte) auf die Zellkultur erwarten läßt. Die erreichten $k_L a$ -Werte liegen in einem Bereich, der auch in Rührreaktoren realisiert wird, es sind keine Probleme bei der Sauerstoffversorgung tierischer Zellen zu erwarten. Hinsichtlich der Mischzeiten erweist sich der 10 L vv CellBag als relativ ungünstig. Inwiefern hier Einflüsse auf die Kultivierung von Zellen bestehen, müssten weitere Untersuchungen zeigen. Die Anwendung des Wave® Bioreaktors wurde bereits in einer ganzen Reihe von Prozessen untersucht. Zum Beispiel etablierten Weber et al. 2002 einen Prozess zur Proteinproduktion mit dem Baculovirus/Sf-9-System, Chen et al. untersuchten 2004 Scale-Up Bedingungen für die Produktion von AAV-Vektoren ebenfalls in Sf-9-Zellen. Auch die Kultivierung von pflanzlichen Zellen im Wave® Bioreaktor wurde bereits beschrieben [Palazon, J. et al. 2003]. Unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Perfusions-CellBags etablierten Ohashi et al. 2001 einen Perfusionsprozess. Die Anwendung für die Prozessoptimierung bei der Impfstoffproduktion wurde für einen Prozess der Herstellung von Pferde-Influenza Virus in serumfreier MDCK-Zellkultur im Batch-Prozess untersucht [Genzel, Y. et al. 2006].

2.3.3 Microcarrier als Kultivierungssubstrate für adhärenz tierische Zellen

Die Anfänge der Microcarrier-Technologie gehen auf Arbeiten der Gruppe um van Wezel zurück, die 1967 herausfanden, dass sich tierische Zellen auf der Oberfläche des Säulenmaterials für Chromatographiesäulen (Sephadex G-50) anheften und sich darauf in suspensierter Form kultivieren lassen [van Wezel, A. L. 1967, van Hemert, P. et al. 1969]. Weiterentwicklungen durch Änderungen der Beschichtung des Dextran-Trägermaterials mit DEAE-Gruppen bzw. Gelatine führten zur Etablierung der Microcarrier Cytodex™ 1 bzw. Cytodex™ 3 (Eigenschaften von Cytodex™ 1 in Tabelle 3.-4). Heute existiert neben diesen, mittlerweile Standard-Microcarriern (Pharmacia Biotech, GE Healthcare), auch von anderen Firmen eine Vielzahl von Microcarrier-Typen (Abbildung 2.-12), sowohl mit glatter als auch poröser Oberfläche, unterschiedlicher Größe (50 – 500 µm) und aus unterschiedlichen Materialien, wie z. B. Glas, Biopolymere oder Kunststoffe [GE Healthcare, Pharmacia Biotech 2005].

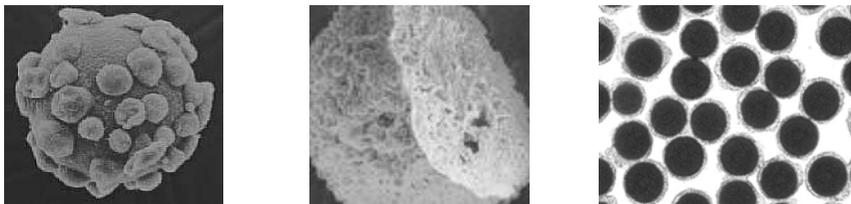


Abbildung 2.-12: Überblick zu derzeit verwendeten kommerziellen Microcarrier-Typen, (links) MA-104 Zellen auf Cytodex™ 1 (Pharmacia Biotech, USA), (Mitte) CHO-Zellen in den Poren von Cytopore™ Microcarriern (Pharmacia Biotech, USA) und (rechts) Schweinenieren-Zellen auf Hillex II Microcarriern (Solohill, USA)

Die Anheftung der Zellen an die Microcarrier läuft nach den bereits im Kapitel 2.2.1 gezeigten Phasen ab (Abbildung 2.-2). Die Gruppe von Hirtenstein, Clark & Gebb untersuchte und optimierte in den 1980er Jahren eine Reihe von Microcarrierprozessen und erarbeitete Kultivierungs- und Scale-Up-Strategien für die Microcarrier-Technologie. Wichtige Erkenntnisse waren u. a. die Entwicklung von Inokulationsstrategien (Start der Kultur mit geringerem Volumen und spätere Medienzufuhr, um so die statistische Wahrscheinlichkeit der Anheftung zu erhöhen), die Erarbeitung optimaler Inokulationsverhältnisse (je nach Zelltyp 5 – 30 Zellen/Partikel) sowie Versuche zur serumfreien Kultur von Zellen auf Microcarriern [Hirtenstein, M. et al. 1980, Clark, J. M. et al. 1980, 1981, 1981 und 1982].

Neuere Trends der Microcarrier-Technologie sind die Entwicklung von makroporösen Microcarriern zur Oberflächenvergrößerung und von Microcarriern zum Einsatz in serumfreier bzw. proteinfreier Kultur [Reuveny, S. und Thoma, R. W. 1986, Varani, J. et al. 1998]. In dieser Arbeit wurde vor allem aus Kostengründen (Prozessoptimierung für einen Veterinärimpfstoff) auf Cytodex™ 1 zurückgegriffen. Dieser Microcarrier wurde bereits in einer Reihe von Kultivierungsprozessen für verschiedene tierische Zellen verwendet, ist mit einem Drug Master File bei der FDA angemeldet und somit behördlich akzeptiert. In Batch-Kultivierungen wurden bereits Zellzahlen von $2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ in Minimalmedien erreicht. Limitierend war bei der Batch-Kultivierung neben der Wachstumsfläche vor allem die Akkumulation inhibierender Substanzen im Medium [Butler, M. 1985].

Durch die Vorteile der Microcarrier-Technologie, z. B. die relativ leichte Anwendbarkeit für eine Vielzahl von adhärennten Zellen, die hohe Zellausbeute und oft auch hohe Produktausbeute pro Volumen, die relativ einfache Skalierbarkeit bis in Produktionsvolumina und die mit diesen Faktoren verbundene, hohe Rentabilität ergab sich eine breite industrielle Anwendung, vor allem auch in der Produktion von Impfstoffen. Es wurden sowohl Herstellungsprozesse im Maßstab von 100 – 2 000 L für humane Impfstoffe, wie z. B. Polioimpfstoff in VERO-Zellen [Montagnon, B. J. et al. 1984] und Hepatitis A-Impfstoff [Widell, A. et al. 1984], als auch für veterinäre Vakzinen, wie z. B. gegen die Aujeszkysche Krankheit [Bajiot, B. et al. 1987] und die Maul- und Klauenseuche [Meignier, B. 1979] beschrieben. Ein besonderer Vorteil von Microcarriern, der auch in dieser Arbeit genutzt wurde, ist ihre leichte Anwendbarkeit in Perfusionsprozessen durch die Immobilisierung der Zellen; in einem solchen Perfusions-Prozess wurden z. B. rekombinante Proteine in Vaccinia-Viren hergestellt [Bleckwenn, N. A. et al. 2005].

2.3.4 Zusammenfassung der verwendeten Gleichungen zur Prozessbeschreibung

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Gleichungen zur Beschreibung von Wachstum und Stoffwechsel der E-FL sowie der MEV-Vermehrung im Batch- bzw. Fed-Batch und Perfusionsbetrieb zusammenfassend dargestellt. Auf die Gründe für die Nutzung exponentieller Ansätze zur Beschreibung des Zellwachstums und linearer Ansätze zur Beschreibung des Stoffwechsels wurde bereits in Kapitel 2.3.1 näher eingegangen. Bei mehreren Anwendungen derselben Gleichung wird auf den Gültigkeitsbereich der Gleichung verwiesen. Die hier verwendeten bzw. dargestellten Gleichungen finden breite Anwendung in der Bioprozess- und Bioreaktionstechnik [Reichl, U. und Bock, A. 2003, Storhas, W. 2003].

Beschreibung des Wachstums tierischer Zellen

Die Beschreibung des Wachstums tierischer Zellen auf Microcarriern erfolgt über die im Bioreaktor vorhandene Lebendzellzahl x_L bestimmt nach Gleichung 3.-2 (ggf. kann ein Korrekturfaktor K_F eingeführt werden, bestimmt nach Gleichung 3.-4, Kapitel 3.9.1) sowie die spezifische Wachstumsrate μ (Gleichung 2.-1) und die daraus resultierende Verdopplungszeit t_d (Gleichung 2.-2). Die Zellzahl auf Microcarriern - und damit auch alle daraus berechneten Werte - kann allgemein als der mit dem größten Fehler bzw. Variabilität behaftete Parameter bei der Prozessbeschreibung eingeschätzt werden.

Beschreibung des Stoffwechsels tierischer Zellen

Der Stoffwechsel tierischer Zellen kann über allgemeine (r_x) und spezifische (q_x) Aufnahme- und Bildungsraten von Substraten und Metaboliten sowie über Ausbeutekoeffizienten beschrieben werden. In dieser Arbeit untersuchte Substrate sind Glukose, Laktat und in einigen Experimenten Sauerstoff. Daraus ergeben sich im Batch-Betrieb bzw. bei Annahme einer Ernte als ein Batch-Ansatz auch im Repeated-Batch-Betrieb (mehrfache Ernte) die allgemeinen Aufnahmeraten r_{Gluk} , r_{Lak} und r_{O_2} analog Gleichung 2.-20 und die spezifischen Aufnahmeraten q_{Gluk} , q_{Lak} und q_{O_2} analog Gleichung 2.-21. Allgemein gilt für die Umrechnung allgemeiner in spezifische Verbrauchs- oder Bildungsraten die Gleichung 2.-19. Für die Metabolite Laktat und Ammonium gelten für den Batch- und Repeated-Batch-Betrieb die Gleichungen 2.-22 und 2.-23 zur Berechnung der allgemeinen und speziellen Bildungsraten. Ausbeutekoeffizienten wurden für die Umsetzung von Glukose zu Laktat $Y_{\text{Lak/Gluk}}$, Glutamin und Ammonium $Y_{\text{Amm/Gln}}$ und allgemein Substrat zu Zellzahl $Y_{\text{X/S}}$ analog den Gleichungen 2.-25 – 2.-27 bestimmt. Dabei handelt es sich um Koeffizienten ("total molar yields") über den gesamten Kultivierungszeitraum oder in Einzelfällen über einen definierten und angegebenen Zeitraum der Kultivierung.

$$q = \frac{r}{x} \quad \text{mit} \quad \bar{x} = \frac{x_A + x_E}{2}$$

Gleichung 2.-19

q ...spezifische Verbrauchs- oder Bildungsrate [$\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Z}^{-1}$]

r ...allgemeine Verbrauchs- oder Bildungsrate [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

x_A ...Zellzahl am Anfang des betrachteten Zeitintervalls [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

x_E ... Zellzahl am Ende des betrachteten Zeitintervalls [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

$$r_{x_S} = \frac{dc_{x_S}}{dt} = \frac{c_{x_0} - c_{x_1}}{t_1 - t_0} \quad \text{Gleichung 2.-20}$$

r_{x_S} ...allgemeine Substratverbrauchsrate, z. B. r_{Gluk} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

c_{x_S} ...Substratkonzentration, z. B. c_{Gluk} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

t ...Reaktionszeit [h]

$$q_{x_S} = \frac{dc_{x_S}}{dt \cdot x_t} \quad \text{Gleichung 2.-21}$$

q_{x_S} ...spezifische Substratverbrauchsrate, z. B. q_{Gluk} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Z}^{-1}$]

\bar{x}_t ...in dem Zeitintervall, für das die spezifische Substratverbrauchsrate berechnet wird, vorliegende mittlere Zellzahl analog Gleichung 2.-19 [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

$$r_{x_M} = \frac{dc_{x_M}}{dt} = \frac{c_{x_1} - c_{x_0}}{t_1 - t_0} \quad \text{Gleichung 2.-22}$$

r_{x_M} ...allgemeine Metabolitbildungsrate, z. B. r_{Lak} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

c_{x_M} ...Metabolitkonzentration, z. B. c_{Lak} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

$$q_{x_M} = \frac{dc_{x_M}}{dt \cdot x_t} \quad \text{Gleichung 2.-23}$$

q_{x_M} ...spezifische Metabolitbildungsrate, z. B. q_{Lak} bzw. Analoga [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Z}^{-1}$]

\bar{x}_t ...in dem Zeitintervall, für das die spezifische Metabolitbildungsrate berechnet wird, vorliegende mittlere Zellzahl analog Gleichung 2.-19 [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

Die entsprechenden Raten in Perfusionsversuchen berechnen sich unter Verwendung der Bilanzgleichung für die Perfusion (Gleichungen 2.-16 - 2.-18), wie in einem Beispiel für r_{Gluk} in Gleichung 2.-24 dargestellt ist. Alle weiteren Raten berechnen sich analog dazu. Das aus dem Reaktor durch die Probenahme entnommene Volumen bzw. die Zahl der darin enthaltenen Zellen wird hier der Einfachheit halber vernachlässigt. Die im Folgenden gezeigte Berechnung der Ausbeutekoeffizienten ist für den Batch- bzw. Repeated-Batch-Betrieb gezeigt, für die Berechnung im Perfusionsbetrieb muss die Bilanzgleichung der Perfusion (Gleichung 2.-10) entsprechend einbezogen werden.

$$r_{Gluk} = \left| \frac{V_{R_{t_0}} \cdot c_{Gluk_{t_0}} - V_{R_t} \cdot c_{Gluk_t} + F_i \cdot t \cdot c_{Gluk_{Feed}} - F_o \cdot t \cdot c_{Gluk_t}}{V_{R_{t_0}} \cdot t} \right| \quad \text{Gleichung 2.-24}$$

$V_{R_{t_0}}$ und V_{R_t} ...Reaktorvolumen [mL oder L] zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ h und zu einer bestimmten Zeit t
 $c_{Gluk_{t_0}}$ und c_{Gluk_t} ...Glukosekonzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ h und zu einer bestimmten Zeit t
 F_i und F_o ...Perfusions-Volumenstrom des Feeds und der Ernte [$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$ oder $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$] zum Zeitpunkt t

$$Y_{Lak/Gluk} = \frac{c_{Lak_{t_1}} - c_{Lak_{t_0}}}{c_{Gluk_{t_0}} - c_{Gluk_{t_1}}} \quad \text{Gleichung 2.-25}$$

$$Y_{Amm/Gln} = \frac{c_{Amm_{t_1}} - c_{Amm_{t_0}}}{c_{Gln_{t_0}} - c_{Amm_{t_1}}} \quad \text{Gleichung 2.-26}$$

$Y_{Lak/Gluk}$ und $Y_{Amm/Gln}$...Ausbeutekoeffizienten für Glukose zu Laktat und Glutamin zu Ammonium [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. vereinfacht ohne Einheit -]

c_{S_0} / c_{S_t} und c_{M_0} / c_{M_t} ...Substrat- bzw. Metabolitkonzentrationen zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ h und t [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] oder [$\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$]

$$Y_{X/S} = \frac{x_{t_1} - x_{t_0}}{c_{S_0} - c_{S_t}} \quad \text{Gleichung 2.-27}$$

$Y_{X/S}$...Ausbeutekoeffizient (allg. Form, S = Glukose, Glutamin oder Sauerstoff) Substrat/Zellzahl [$\text{Z} \cdot \text{mmol}^{-1}$]
 x_{t_0} und x_{t_1} ...Zellzahl zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ h und t [$\text{Z} \cdot \text{L}^{-1}$] oder [$\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$]

Beschreibung der Virusvermehrung von MEV

Die Vermehrung von MEV kann über die Angabe des Virustiters als $\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ analog Gleichung 3.-3, über die Anzahl insgesamt in einem Ansatz generierten Viruspartikel I_{VP} analog Gleichung 2.-28 (nicht volumenbezogen) und die Produktivität P_V analog Gleichung 2.-29 (Anzahl generierter Viruspartikel pro eingesäter Zelle) charakterisiert werden. Die

Virusvermehrung wird hier in Relation zu den eingesäten Zellen gesetzt, mit den zur Verfügung stehenden Assays konnte nicht zwischen dem Anteil infizierter und nicht-infizierter Zellen unterschieden werden. Weiterhin kann bei MEV neben der Zahl der infektiösen Viruspartikel auch von einem relevanten Anteil nicht-infektiöser Viruspartikel ausgegangen werden. Diese sind sicherlich für die Immunantwort nach der Vakzinierung auch bedeutsam, wurden jedoch im Rahmen der Arbeit nicht, z. B. über einen Hämagglutinations-Test, quantifiziert.

$$I_{VP} = 10^{TCID_{50}} \cdot V_{R_i} \quad \text{Gleichung 2.-28}$$

I_{VP} ...Anzahl der in einem Ansatz generierten infektiösen MEV-Partikel (volumenunabhängig) [Partikelzahl]

V_{R_i} ...Volumen des Reaktors im Batch-Betrieb, Volumen der Ernte im Repeated-Batch / Perfusionbetrieb [mL]

$$P_V = \frac{I_{VP}}{x_{i_0}} \quad \text{Gleichung 2.-29}$$

P_V ...Produktivität des MEV-Herstellungsprozesses als Quotient aus der Zahl der MEV-Partikel bezogen auf die Einsatzzellzahl [Partikelzahl - / Einsatzzellzahl Z]

x_{i_0} ...Einsatzzellzahl (volumenunabhängig) [Z]

3 **Material und Methoden**

3.1 **Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Tabelle 3.-1: Liste der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Herkunft
Autoklav Typ Tuttnauer 5075 EL VC	Systec, Deutschland
Tischdampfsterilisator 65 T	H + P, Deutschland
Schlauchpumpen Typ 101 U/R und 505 S	Watson-Marlow, Deutschland
Schlauchpumpe Typ ISM 832 A	Ismatec, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse II Herasafe	Heraeus, Deutschland
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Kendro Laboratory Products, USA
Waagen Typ PG 50002 - S	Mettler-Toledo, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Deutschland
Rollerflaschenschrank	Wheaton Science Products, USA
Trockenschrank	Heraeus, Deutschland
Spinnerflaschen (0,25 L wv)	Wheaton Science Products, USA
Multifermentieranlage „Sixfors“	Infors AG, Schweiz
Wave [®] Bioreaktor (20 SPS)	Wave Biotech, Schweiz
Rührreaktor 5 L Typ CT5-SK	Sartorius BBI, Deutschland
Vitros DT 60-II	Ortho Clinical Diagnostics, Deutschland
Metabolic Analyzer YSI 7100 MBS	Yellow Springs Instruments, USA
Digitalkamera	Nikkon, Japan
Lichtmikroskope Axioskop 2 und Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Deutschland
Raster-Elektronenmikroskop DSM-942	Carl Zeiss AG, Deutschland
Reinstwasseranlage membranure	Millipore, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop 510	Carl Zeiss AG, Deutschland
pH-Meter Typ Inolab	WTW, Deutschland
Rollerflaschen (850 cm ²)	Greiner Bio-One, Deutschland
Gewebekulturflaschen (25 – 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Deutschland

Gerätebezeichnung	Herkunft
Pipetten (0,1 – 5,0 mL)	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann, Deutschland
Einwegpipetten (steril)	Greiner Bio-One, Deutschland Corning, Deutschland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Assistent, Deutschland
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius, Deutschland
Reagenzgefäße (1,8 und 2,2 mL)	Eppendorf, Deutschland
Reagenzgefäße (15 und 50 mL)	Becton Dickinson, USA
Laborflaschen (0,1 – 5,0 L)	Schott, Deutschland

3.2 Liste der Chemikalien und Einsatzstoffe

Tabelle 3.-2: Liste der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Chemikalien und Einsatzstoffe

Bezeichnung	Charge bzw. Bestell-Nr.	Herkunft
Aceton	K 33023814412	Merck KGaA, Deutschland
CASO-Bouillon	VM 92175923	Fluka, Deutschland
CertiPUR	OC344812	Merck KGaA, Deutschland
Cytodex™ 1 Microcarrier	17-0448-03	GE Healthcare, USA
DMSO	D2650, Lot. No. 35K2331	Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA	59H0359	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol	17L7894	Sigma-Aldrich, Deutschland
FCS	40F3332K	Gibco Deutschland
FITC-Konjugat	-	Kirkegaard & Perry, USA
FITC-VAD-FMK	-	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glukose	X997.3	Carl Roth, Deutschland
GMEM	14K2389	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hyperimmuserum gegen MEV	-	IDT, Deutschland
L-Glutamin	101K0012	Sigma-Aldrich, Deutschland
MEM	lt. SOP, IDT	Sigma-Aldrich, Deutschland
NaHCO ₃	6885.3	Carl Roth, Deutschland

Bezeichnung	Charge bzw. Bestell-Nr.	Herkunft
NaOH	13O4452	Sigma-Aldrich, Deutschland
Paraformaldehyd	119H1377	Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS	-	Universität MD, Deutschland
PBS/EDTA	-	Universität MD, Deutschland
Pluronic F 68	M451.7	Carl Roth, Deutschland
Propidiumiodid	H784.1	Carl Roth, Deutschland
Silikonöl	H441.3-	Carl Roth, Deutschland
Sytox Green	74G4744	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypanblau	ZC137932348	Merck KGaA, Deutschland
Triton X-100	-	Merck KGaA, Deutschland
Trypsin 1:250 Pulver 300 USP	1140299	Gibco, Deutschland
Trypsin/EDTA	22K8454	Sigma-Aldrich, Deutschland

3.3 Verbrauchslösungen und verwendete Zellkulturmedien

3.3.1 Verbrauchslösungen

Trypsin/EDTA-Lösung

Das Ablösen der adhärennten Zellen von der Kulturoberfläche erfolgte mit einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung in PBS. Nach dem Einwiegen und Auflösen des Trypsins und des EDTA wurde die Lösung mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert und bei -20 °C bzw. aufgetaut bei 4 °C gelagert.

PBS/EDTA-Lösung

Zum Waschen (Entfernen von Serumresten) der Zellkulturen vor dem Passagieren wurde eine 0,20 % PBS/EDTA-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen mit vollentsalztem Wasser (Tabelle 3.-3) hergestellt. Die Lösung wurde bei 121 °C für 30 min autoklaviert und dann bei Raumtemperatur gelagert. Die Herstellung erfolgte bedarfsgerecht bei einer maximalen Verwendbarkeitsdauer der Lösung von einem Jahr.

Tabelle 3.-3 Zusammensetzung der PBS/EDTA-Lösung

Bezeichnung	Konzentration
NaCl	8,00 g · L ⁻¹
KCl	0,20 g · L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,20 g · L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	1,15 g · L ⁻¹
EDTA	0,20 g · L ⁻¹

Formalinlösung

Zur Fixierung von Zellen auf den Microcarriern wurde eine 2 % ige Formalinlösung verwendet. Dazu wurde Paraformaldehyd durch Einstellung des pH-Wertes mit 5 M NaOH in PBS gelöst. Anschließend erfolgte die Neutralisierung der Lösung mit 5 M HCl. Es erfolgte keine Sterilisation. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert. Die Verwendung der Formalinlösung erfolgte auf Grund der potenziellen Gesundheitsgefährdung ausschließlich unter einem Tischabzug.

Trypanblau-Lösung

Die Trypanblau-Lösung wurde bei der Bestimmung der Lebendzellzahl eingesetzt. Dazu wurden 5 g · L⁻¹ Trypanblaupulver und 9 g · L⁻¹ NaCl in Reinstwasser gegeben und anschließend mit einem Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Stammlösung Cytodex™ 1 Microcarrier

Als Kultivierungssubstrat für die Suspensionskultur von E-FL Zellen wurden Cytodex™ 1 Microcarrier (GE Healthcare, Pharmacia Biotech, USA) verwendet. Diese Microcarrier bestehen aus einer quervernetzten Dextran-Matrix, in der positiv geladene Diethylaminoethyl-Gruppen verteilt sind. Wichtige physikalische Eigenschaften dieser Microcarrier sind in Tabelle 3.-4 zusammengefasst.

Tabelle 3.-4: Ausgewählte physikalische Eigenschaften von Cytodex™ 1 Microcarriern nach Herstellerangaben [Pharmacia Biotech (GE Healthcare) 2005]

Physikalische Eigenschaft	Wert
Dichte	1,03 g · L ⁻¹
Größe d ₅₀	190 µm
d ₅₋₉₅	147 - 248 µm
Mittlere Fläche je g Carrier	4 400 cm ² · g ⁻¹
Mittlere Anzahl je g Carrier	4,3 · 10 ⁶
Quellfaktor	20

Die Microcarrier-Stammlösung wurde nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt:

- Einwiegen der gewünschten Menge Microcarrier, z. B. 20 g für 0,5 L einer 40 g · L⁻¹ Stammlösung,
- Vorquellen in PBS für mindestens 4 – 6 h oder über Nacht
- Dekantieren des Überstandes und dreimaliges Waschen mit PBS, Einstellung des gewünschten Endvolumens mit PBS
- Autoklavieren (121 °C, 30 min), Lagerung der sterilen und gebrauchsfertigen Lösung bei 4 °C, Haltbarkeitsdauer: ein Jahr

Supplemente

Supplementlösungen, z. B. Glukose, Glutamin oder NaHCO₃, wurden in möglichst hoher Konzentration, d. h. nahe der Löslichkeitsgrenze, angesetzt, um Verdünnungseffekte bei der Zugabe zum Zellkulturmedium so gering wie möglich zu halten. Alle Lösungen wurden nach der Herstellung mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert und entsprechend der im experimentellen Ansatz vorgesehenen Konzentration dem Medium zugesetzt.

3.3.2 Zellkulturmedium

In der Arbeit wurde ein Minimal Essential Medium (MEM) verwendet. Die Zusammensetzung dieses Basalmediums ist in Tabelle 3-5 dargestellt, es wird fortan als Erhaltungsmedium (EM) bezeichnet. Für die Kultivierung der E-FL Zellen wurden dem EM 10 % fötales Kälberserum (FCS) und 2 - 3 % L-Glutamin (200 mM Stammlösung, 0,22 µm sterilfiltriert) zugegeben. Dieses supplementierte Medium wird im Folgenden als Wachstumsmedium (WM) bezeichnet.

In einigen Experimenten, besonders im 5 L wv Rührreaktor, wurden weitere Supplementierungen des WM, u. a. mit Glukose, Pluronic F 68 und NaHCO₃, vorgenommen. Typische Endkonzentrationen waren in diesem Fall: Glukose 20 mmol · L⁻¹, Pluronic F 68 0,10 % und NaHCO₃ 2,35 g · L⁻¹. Dieses supplementierte Medium wird im Folgenden erweitertes Wachstumsmedium (EWM) genannt. Für die Medienwechsel bei der Vermehrung von MEV wurde WM oder EM verwendet, die Details dazu sind beim jeweiligen Experiment dargestellt. Das WM bzw. EWM hatte vor dem Gebrauch einen pH-Wert von 7,4 – 7,6, die Osmolalität lag bei Werten zwischen 280 - 320 mOsm · kg⁻¹.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des Zellkulturmediums (EM) nach Herstellerangaben [Sigma-Aldrich, D]

Komponente	Konzentration (g · L ⁻¹)
Anorganische Salze	
Kalziumchlorid (entwässert)	0,1396
Magnesiumsulfat (entwässert)	0,0977
Kaliumchlorid	0,4000
Kaliumphosphat (entwässert)	0,0600
Natriumchlorid	8,0000
Natriumphosphat (entwässert)	0,0479
Aminosäuren	
L-Arginin · HCl	0,1260
L-Cystin · 2 HCl	0,0313
L-Glutamin	0,2920
L-Histidin · HCl · H ₂ O	0,0420
L-Isoleucin	0,0520
L-Leucin	0,0520

Komponente	Konzentration (g · L ⁻¹)
L-Lysin · HCl	0,0725
L-Methionin	0,0150
L-Phenylalanin	0,0320
L-Threonin	0,0480
L-Tryptophan	0,0100
L-Tyrosin · 2 Na · 2 H ₂ O	0,0519
L-Valin	0,0460
Vitamine	
Cholinchlorid	0,0010
Folsäure	0,0010
Myo-Inositol	0,0020
Niacinamid	0,0010
D-Pantothensäure	0,0010
Pyridoxal · HCl	0,0010
Riboflavin	0,0001
Thiamin · HCl	0,0010
Weitere Zusatzstoffe	
Glukose	1,0000
Phenolrot · Na	0,0110
Antibiotikum Neomycinsulfat	0,0500

3.4 Das biologische System

3.4.1 Embryonale feline Lungenfibroblasten (E-FL)

Zelllinie

Bei allen Experimenten dieser Arbeit wurde mit embryonalen feline Lungenfibroblasten (E-FL) gearbeitet. Diese kontinuierliche adhärenzte Zelllinie wurde 1969 am schwedischen Veterinärinstitut in Uppsala (SVA) aus dem Lungengewebe eines Katzenembryos isoliert. Die Zellen sind als Risikogruppe 1-Organismen klassifiziert, der Umgang mit den E-FL erfolgte in einem Labor der Sicherheitsstufe S 2.

Seedlot-Systeme

Die E-FL Zellen sind im Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH (IDT) als Master Cell Seed (MCS) gelagert. Dieses MCS (Passage 137) ist entsprechend den gesetzlichen Vorgaben für Ausgangsstoffe von Veterinärimpfstoffen auf Sterilität, Identität sowie Abwesenheit von Fremdviiren und Mykoplasmen getestet. Ausgehend von diesem MCS wurde am IDT als Ausgangsmaterial für die Impfstoffherstellung ein Working Cell Seed (WCS) hergestellt. Für die Experimente dieser Arbeit wurde aus einem Kryo-Röhrchen dieses WCS (Passage 144) ein Research Cell Seed (RCS) angelegt. Das RCS enthielt 30 Kryo-Röhrchen mit je 1,8 mL Zellsuspension ($4,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$). Als Einfriermedium wurde ein Gemisch von 70 % Zellkulturmedium, 20 % fötalem Kälberserum (FCS) und 10 % DMSO verwendet.

Nach der Herstellungsanweisung für den Impfstoff und den zugrunde liegenden behördlichen Bestimmungen dürfen die Zellen für 20 Passagen, d. h. bis maximal zur Passagenzahl 156, für Produktionszwecke verwendet werden [IDT, Standardarbeitsanweisung]. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten bzw. um Verfälschungen der Ergebnisse durch eventuelle karyotypische Veränderungen an der Zelle vorzubeugen, wurden auch bei allen Experimenten dieser Arbeit nur Zellen bis zu einer maximalen Passagenzahl von 156 verwendet. Als Passage wird hier der Transfer (Umsetzen) der Zellen von einem in das nächste Kultivierungsgefäß verstanden.

Subkultivierung der Zellen (Passagieren)

Nach dem schnellen Auftauen des Kryoröhrchens wurden die Zellen in eine Gewebekulturflasche (75 cm²) eingesät. Nach 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um das für die Zellen toxische DMSO aus der Kultur zu entfernen. Die Vorkulturen für die Experimente wurden entsprechend Abb. 3.-1 passagiert. Die Konfluenz der Zellen war abhängig von der Einsaat-Zellzahl nach 3 - 5 Tagen erreicht.

Beim Passagieren wurden die adhärennten Zellen nach einmaligem Waschen mit einer PBS/EDTA-Lösung mit einer 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (2 - 10 mL entsprechend der Größe des Kulturgefäßes) von der Oberfläche des Gefäßes abgelöst. Die Einwirkzeit betrug etwa 5 - 10 min bei Raumtemperatur, der Ablösevorgang wurde mechanisch durch vorsichtiges Schütteln und Klopfen der Kulturgefäße unterstützt. Nach dem vollständigen

Ablösen der Zellen wurde das Trypsin durch Zugabe einer entsprechenden Menge Wachstumsmedium (2 - 10 mL, je nach Größe des Kulturgefäßes) inaktiviert. Um eine mögliche Einwirkung des Trypsins auf die Anheftung der Zellen bei der späteren Kultivierung in Microcarrier-Systemen völlig auszuschließen, wurde das Gemisch (Trypsin, Zellen, Medium mit FCS) zentrifugiert (5 min, 150 g, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in der gleichen Menge Wachstumsmedium (WM) resuspendiert. Bei der standardmäßigen Subkultivierung der Zellen wurde nach Splitrate umgesetzt, bei Versuchen in statischen und dynamischen Systemen erfolgten eine Zellzählung und die Einsaat in der gewünschten Zellzahl in das neue Kultivierungssystem (Abbildung 3.-1).

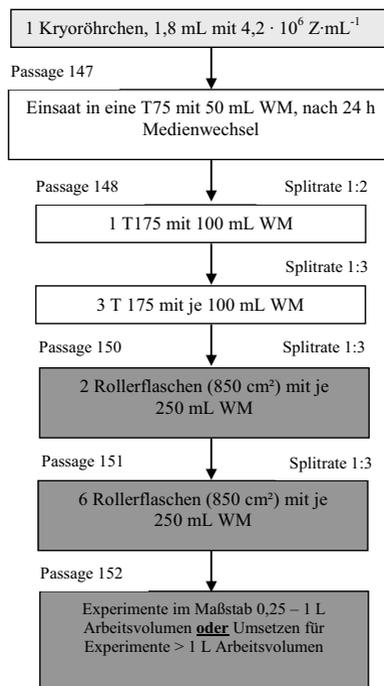


Abbildung 3.-1: Passageschema für eine typische Vorkultur von E-FL Zellen

3.4.2 Mink Enteritis Virus (MEV)

In der Arbeit wurde das Parvovirus MEV (engl. Mink = Nerz) verwendet. Der Stamm „E-Mink-F1“ wurde 1983 in der fünften Gewebekulturpassage im Schwedischen Veterinärinstitut (SVA) in Uppsala (Schweden) gewonnen und bei -70 °C gelagert. Das für die Experimente in dieser Arbeit verwendete Saatmaterial ($10 \cdot 100\text{ mL}$) wurde von IDT bezogen und hatte einen Ausgangstitert von $10^{7.2}\text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Qualität des Saatmaterials, d. h. die durchgeführten Testungen auf Sterilität, Mykoplasmen, Fremdviere etc., entsprach der eines Research Seed Virus (RSV), d. h. es konnte nur für Forschungszwecke eingesetzt werden. Das Virusmaterial wurde bei -70 °C gelagert, bei Bedarf aufgetaut und entsprechend des experimentellen Ansatzes verwendet. Die Infektion erfolgte mit multiplicities of infection (moi's) von 0,001 - 5 bei einer time of infection (toi) von 0 - 48 h, die Details dazu sind beim jeweiligen Experiment dargestellt.

Die Einstellung des benötigten Volumens an Virussaatmaterial bei einer definierten moi und Startzellzahl erfolgt entsprechend Gleichung 3.-1 durch Umstellung nach der gesuchten Größe V_{WSV} . Bei einem zu geringen Volumen des einzusetzenden Saatvirus wurde das RSV mit sterilem PBS entsprechend vorverdünnt. MEV ist in die Risikogruppe 2 eingeordnet; auf Grund der Wirtsspezifität von Parvoviren jedoch nicht humanpathogen. Der Umgang mit dem Virus erfolgte dementsprechend in einem Labor der Sicherheitsstufe 2.

$$moi = \frac{\frac{n_{IVP}}{V_{WSV}}}{\frac{n_{Zellen}}{V_{Reaktor}}}$$

Gleichung 3.-1

moi...multiplicity of infection

n_{IVP} ...Zahl der infektiösen Viruspartikel [P]

V_{WSV} ...einzusetzendes Volumen des Virussaatmaterials [mL]

n_{Zellen} ...Zahl der im Reaktor vorhandenen lebenden Zellen [Z]

$V_{Reaktor}$...Arbeitsvolumen des Reaktors [mL]

3.5 **Verwendete Kultivierungssysteme und -bedingungen**

3.5.1 **Kultivierung der E-FL in statischen und semistatischen Systemen (Arbeitsvolumen 20 – 250 mL)**

Bei der statischen Kultivierung der E-FL wurden Gewebekulturflaschen ohne gasdurchlässige Membran (Abbildung 2.-10 links) der Firmen Greiner (Deutschland) oder Corning (Deutschland) eingesetzt. Die Inkubation der Zellen in Gewebekulturflaschen erfolgte bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus, Deutschland), jedoch aufgrund des gasdichten Verschlusses ohne CO₂-Einfluss. Als semistatische Kultursysteme wurden Rollerflaschen (Abbildung 2.-10 links) der Firmen Greiner (Deutschland) verwendet. Die Inkubation der Rollerflaschen erfolgte in einem auf 37 °C temperierten Rollerflaschenschrank (Wheaton Science Products, USA) bei 0,25 U · min⁻¹ ohne CO₂-Einfluss. Typische Flächen, Medienvolumina und Einsaat-Zellzahlen der Kulturgefäße sind in Tabelle 3.-6 aufgeführt. Die statischen und semistatischen Kultivierungssysteme waren weder pH- noch pO₂-kontrolliert.

Tabelle 3.-6: Parameter für die Subkultivierung von E-FL in statischen und semistatischen Systemen

Kulturgefäß	Einsaat-Zellzahl (Zellen · cm⁻²)	Fläche (cm²)	Volumen des Mediums (mL)
T 25	3,0 - 5,0 · 10 ⁴	25	20
T 75		75	50
T 175		175	100
Rollerflasche	5,0 - 6,0 · 10 ⁴	850	250

3.5.2 **Kultivierung der E-FL in der Multifermentieranlage „Sixfors“ (Arbeitsvolumen 0,15 – 0,50 L)**

Zur Kultivierung der Zellen auf Microcarriern unter geregelten Bedingungen (pH, pO₂) wurde die Multifermentieranlage „Sixfors“ (Abbildung 2.-10 rechts) der Firma Infors (CH) eingesetzt. Das System bestand aus sechs parallel und unabhängig betreibbaren Glasbioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 150 - 500 mL. Jeder Reaktor hatte einen Satz Sonden (Temperatur, pH und pO₂) sowie Vorrichtungen zum Befüllen und zur

Probenahme. Zusammen mit dem Rührer waren diese Teile in den abnehmbaren, mit einer Clamp-Verbindung verschließbaren Deckel integriert. Als Rührelemente waren zwei verstellbare Marine-Impeller auf einer Rührerwelle angeordnet, der Antrieb erfolgte magnetisch. Die Temperierung wurde über die Reaktorhalterung (Thermobacken) realisiert. Für jeden Reaktor standen drei separate Schlauchquetschpumpen zur Verfügung. Diese Pumpen wurden einzeln angesteuert und bei Bedarf durch eine kontinuierlich laufende Welle angetrieben. Die Begasung erfolgte mit reinem Sauerstoff, der über einen 0,22 µm Sterilfilter (Millipore, Deutschland) in eine INOX-Fritte geführt und dort dispergiert wurde. Die Datenaufzeichnung der Sondensignale sowie die Regelung relevanter Parameter, z. B. pH, Drehzahl, Temperatur und pO₂, erfolgte mit dem Prozessleitsystem IRIS 4.1 (Infors, CH). Die Reaktoren wurden nach der Vorbereitung (Zusammenbau des Reaktors, Einbau und Kalibrierung der Sonden) in einem Autoklaven bei 121 °C für 30 min sterilisiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 50 rpm kultiviert und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf Werte von 7,1 – 7,4 geregelt. Die Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgte durch eine Taktregelung, durch die der pO₂ im Bereich > 55 % gehalten wird. Typische Startbedingungen für Einsaat-Zellzahlen und Carrierkonzentrationen waren $1,0 - 3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $1 - 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1, die genauen Startparameter sind im experimentellen Teil der Arbeit entsprechend dargestellt.

3.5.3 Kultivierung der E-FL im Labor-Rührreaktor (Arbeitsvolumen 3,5 – 5,0 L)

Für die Kultivierung der Zellen auf Microcarriern im Maßstab bis 5 L kam ein Rührreaktor (Abbildung 2.-11 links) der Firma Sartorius BBI (Deutschland) zum Einsatz. Das System hatte ein Arbeitsvolumen von 3,5 – 5,0 L und war in-situ sterilisierbar. Die Sterilisation erfolgte mit Hilfe eines Dampferzeugers (Varioklav, Deutschland). Der Bioreaktor war u. a. mit Druck-, pH-, Temperatur- und pO₂-Sonden ausgestattet, die Zugabe und Probenahme erfolgte über die entsprechenden dampfsterilisierbaren Armaturen. Be- und Entlüftung wurden über Sterilfilterkerzen (Pall, Deutschland) realisiert. Der Rührer, bestehend aus zwei Marine Impellern auf einer Welle, wurde von unten über einen E-Motor angetrieben, die Rührerdurchführung war durch eine doppelte Gleitringdichtung mit Dampfsperre steril abgeteilt. Die Temperierung erfolgte über den mit Wasser gefüllten Doppelmantel. Die Datenaufzeichnung der Sondensignale sowie die Regelung der relevanten Parameter, z. B. pH, Drehzahl, Temperatur und pO₂, erfolgte über das Prozessleitsystem PCS 7 (Siemens, Deutschland).

Die Zellen wurden bei 37 °C und 50 rpm inkubiert und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf $\approx 7,2$ geregelt. Die Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgte durch eine Taktregelung, durch die der pO_2 im Bereich $> 40 \%$ gehalten wurde. Typische Startbedingungen für Einsaat-Zellzahlen und Carrierkonzentrationen lagen auch hier im Bereich von $1,0 - 3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $1 - 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1, Details dazu sind bei den entsprechenden Experimenten dargestellt.

3.5.4 Kultivierung der E-FL im Wave® Bioreaktor (Arbeitsvolumen 1 - 10 L)

Als Alternative zum Rührreaktor wurde für die Kultivierung der E-FL Zellen auf Microcarriern ein Wave® Bioreaktor 20 SPS (Abbildung 2.-11 rechts) eingesetzt. Dieses System bestand aus drei Komponenten: dem Grundgerät, der Versorgungsstation und einem Kultivierungsgefäß, dem Wave® Bag.

Grundgerät

In das Grundgerät konnten zwei 1 L wv Wave® Bags oder ein 10 L wv Wave® Bag eingespannt werden. Über die Bewegung der Grundplatte in definiertem Winkel und Intervall wurde eine wellenförmige Bewegung der Flüssigkeit induziert und darüber der Gas- und Stoffaustausch realisiert. Die Temperierung des Systems erfolgte über zwei separat nutzbare Heizplatten, die in die Grundplatte integriert waren. Die Wave® Bags befanden sich während der Kultivierung eingespannt in einer Halterung innerhalb der Inkubatorkammer. Am Grundgerät befanden sich auch die wichtigsten Bedienelemente des Wave® Bioreaktors.

Versorgungsstation

Die Gasmischstation im Versorgungsgerät stellte sicher, dass dem Luftstrom kontinuierlich ein entsprechender Volumenanteil CO_2 (0 - 15 %) zugegeben wurde. Weiterhin befanden sich am Versorgungsgerät Anschlüsse für pH- und Sauerstoffsonden (optional) sowie den Temperaturmessfühler (Pt 100). Die aufgezeichneten Werte konnten bei Bedarf über einen Thermodrucker ausgegeben werden. Optional war der Anschluss eines PC's möglich, dies wurde in dieser Arbeit aus Kostengründen nicht realisiert.

Wave® Bag

Der Wave® Bag aus LDPE Polymer USPXXII class VI stand als steriles Einwegsystem für die Zellkultivierung zur Verfügung. Anschlüsse für Mediumzufuhr und sterile Probenahme waren in das System integriert, ebenso Sterilfilter für Zu- und Abluft. Durch die Verwendung einer elektrischen Heizmantels, der sogenannten Filterheizung, konnte das Verblocken des Abluftfilters durch Kondenswasser während Langzeitkultivierungen verhindert werden.

Die Zellen wurden bei 37 °C und einer Wippfrequenz von 6 min⁻¹ bei einem Wippwinkel von 5° inkubiert, für die Probenahme wurde der Wippwinkel kurzzeitig auf 10° und die Wippfrequenz auf 10 min⁻¹ erhöht. Die Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgte durch eine permanente Begasung mit 0,1 L · min⁻¹ (1 L wv) bzw. 0,3 L · min⁻¹ (10 L wv) steriler Luft mit 2 - 10 Vol.-% CO₂. Der pH-Wert wurde auf Grund der fehlenden Möglichkeiten zur Regelung im Verlauf der Kultivierung durch die manuelle Variation der CO₂-Konzentration auf physiologische Werte im Bereich von 6,8 – 7,6 eingestellt. Typische Startbedingungen für Einsaat-Zellzahlen und Carrierkonzentrationen waren 1,0 – 2,0 · 10⁵ Z · mL⁻¹ und 1 - 2 g · L⁻¹ Cytodex™ 1, entsprechende Details sind beim jeweiligen Experiment dargestellt.

3.6 *Analytische Methoden*

Probenahme

Aus den Kultivierungssystemen wurden in Intervallen von 6 - 12 h Proben entnommen. Das Probenvolumen war vom Arbeitsvolumen des Reaktors abhängig. In statischen und semi-statischen Kultursystemen lag das Probenvolumen bei 1 - 3 mL, im 0,5 L wv Rührreaktor bei 5 mL, im Wave® Bioreaktor bei 5 - 10 mL und im 4 – 5 L wv Rührreaktor bei 50 mL je Probenahme. Die Gesamtprobe wurde in Einzelproben zur pH-Messung, Zellzählung, Bestimmung extrazellulärer Metabolite, zur Virustitration und Mikroskopie geteilt. Die Bestimmung von pH-Wert und Zellzahl erfolgte direkt nach Probenahme, Proben für die Mikroskopie wurden in 2 % Formalin bei 4 °C, Metabolitproben bei –20 °C bis zur Messung gelagert. Die Proben zur Virusquantifizierung wurden bei –70 °C eingefroren.

3.6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl mit der Trypan-Blau Methode

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit der Trypan-Blau Methode in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die relative Standardabweichung dieser Methode lag bei etwa 15 %. Ein größeres Problem als die eigentliche Zellzählung stellte das Entnehmen einer repräsentativen Probe aus dem Bioreaktor dar. Dies spielte besonders bei den Kultivierungen im Wave[®] Bioreaktor eine Rolle. Hier wurde versucht, durch die Einführung eines Korrekturfaktors für die in einer Probe enthaltenen Microcarrier den Fehler bei der Zellzahlbestimmung zu minimieren (Kapitel 3.9.1). Die Zellzählung wurde mit Proben aus Microcarriersystemen wie folgt durchgeführt:

1. Die Probe (1 mL) für die Zellzählung wurde in ein 2,2 mL Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach ca. 5 min waren die Microcarrier sedimentiert. Es wurden 900 μ L Medium als Überstand verworfen und die Probe einmal mit 900 μ L PBS gewaschen.
2. Nach erneuter Sedimentation der Carrier und dem Verwerfen von 900 μ L Überstand wurde die Probe mit 900 μ L Trypsinlösung (10 x konzentriert) versetzt.
3. Die Eppendorf-Cups wurden bei 37 °C für 30 – 45 min unter mehrmaligem leichten Schwenken inkubiert. Das vollständige enzymatische Ablösen der Zellen von den Microcarriern wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.
4. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen von den Microcarriern wurde die Probe durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert und eine Verdünnung mit Trypanblau je nach erwarteter Zellzahl von 1:5 - 1:100 angesetzt (z.B. 100 μ L Zellsuspension in 900 μ L Trypanblau-Lösung für eine 1:10 Verdünnung).
5. Es wurden jeweils fünf von 16 Großquadraten (Volumen von 1 μ L) auf beiden Seiten der Zählkammer ausgewertet. Dabei wurde zwischen lebenden (hellen) und nicht-lebenden (blauen) Zellen differenziert. Der Mittelwert aus den Zahlen beider Seiten der Zählkammer ergab einen Wert für die Zellzahlen (lebend und tot).

Die Zahl der toten Zellen lag jedoch bei den meisten Versuchen an der Nachweisgrenze der Methode und wurde daher nicht näher betrachtet. Entsprechend Gleichung 3.-2 kann die Lebendzellzahl x_L im Kultivierungssystem berechnet werden.

$$x_L = x_{L,gez.} \cdot F \cdot 1000$$

Gleichung 3.-2

x_L ...Lebendzellzahl im Kultivierungssystem [$Z \cdot \text{mL}^{-1}$]

$x_{L,gez.}$...gezählte Lebendzellzahl

F...Verdünnungsfaktor der Probe

Das Protokoll zur Bestimmung anderer Zellzahlen (lebende Zellen im Überstand, tote Zellen im Überstand) aus der Gesamtzellpopulation war analog zur o. g. Vorgehensweise. Bei ausgewählten Versuchen, z. B. zur durchflusszytometrischen Untersuchung, wird der Anteil toter Zellen auf Grund der Relevanz dieser Daten für die Aussage des Versuches mit dargestellt. Bei der Bestimmung von Zellzahlen im Überstand bzw. aus statischen Systemen entfielen die Punkte 1 – 3 und die Probe wurde direkt zu Trypanblau gegeben und dann ausgezählt.

3.6.2 Virustitration zur Bestimmung des Gehaltes an infektiösem Virus

Der Titer von virushaltigen Proben wurde als kulturinfektiöse Dosis (tissue culture infectious dose, $\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$) bestimmt. Mit dieser Methode wird die Anzahl von infektiösen Viruspartikeln erfasst, die in der Lage ist, 50 % einer permissiven, d. h. empfänglichen Zellkultur bei einer bestimmten Verdünnung zu infizieren. Die Angabe erfolgt im Allgemeinen als logarithmischer Wert, z. B. $10^{7,0} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($1,0 \cdot 10^7$ infektiöse Viruspartikel $\cdot \text{mL}^{-1}$). Die Bestimmungsmethode basiert auf einer Standardarbeitsanweisung von IDT und wurde wie folgt realisiert:

- Herstellung einer Zellsuspension mit ca. 80 – 90 % konfluenten E-FL (3 - 4 d alt),
- Einsaat von 0,1 mL dieser Suspension in die 96 Kavitäten einer Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner, Deutschland), Verschluss mit Deckel,
- innerhalb einer Stunde Infektion der Zellkulturen mit den entsprechenden Verdünnungen (in WM, vorher zwei Gefrier/Tau-Zyklen $-20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{RT}$ der Proben) der MEV-haltigen Lösung (i. A. $10^{-1} - 10^{-6}$),
- Inkubation der Platten für drei Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 im Brutschrank,

- Abgießen des Mediumüberstandes und Fixierung mit 80 % Aceton-Lösung (30 min, 4 °C, dadurch Inaktivierung des MEV),
- Entleerung der Platte durch Ausschütten, Spülen mit je 0,1 mL PBS + 1 % FCS,
- Zugabe von 40 µl einer 1:50 Verdünnung eines Hyperimmunserums vom Nerz (IDT, Primärantikörper) in jede Kavität, Inkubation (60 min, 37 °C),
- Entleerung der Platte, Spülen mit PBS + 1 % FCS,
- Zugabe von 40 µl eines fluoreszenzmarkierten (FITC) Antikörpers (Kirkegaard & Perry, Sekundärantikörper) in jede Kavität, Inkubation (60 min, 37 °C),
- Entleerung der Platte, Spülen mit PBS + 1 % FCS und anschließend Spülen mit entsalztem Wasser, Lufttrocknung der Platte für ca. 15 – 30 min,
- Untersuchung der Platte auf virusspezifische Kernfluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskop und Berechnung des Virustiters nach Spearman und Kärber analog Gleichung 3.-3.

$$\frac{\log_{10} TCID_{50}}{mL} = b + 0.5 \cdot d + d \cdot \sum \left(\frac{r}{n} \right) \quad \text{Gleichung 3.-3}$$

b...der \log_{10} des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Kavitäten positiv sind

d...der \log_{10} des Verdünnungsfaktors (z.B. d=1 bei Verdünnungsfaktor 1:10)

r...die Anzahl der positiven Kavitäten pro Gruppe

n...die Anzahl der Kavitäten, die für jede Verdünnung eingesetzt wurden

Die Standardabweichung dieser Titrationsmethode beträgt etwa $\log 10^{0,3} TCID_{50} \cdot mL^{-1}$, die Nachweisgrenze der Methode liegt bei $10^{2,4} TCID_{50} \cdot mL^{-1}$. Bei jeder Titration wurde ein MEV-Standard ($10^{6,0} TCID_{50} \cdot mL^{-1}$) mitgeführt; lag dieser Standard außerhalb eines Fensters von $10^{6,0} TCID_{50} \cdot mL^{-1} \pm \log 10^{0,3}$, war die Prüfung, d. h. alle Platten dieser Titration, nicht gültig und wurde wiederholt. Die Validierung der Methode wurde im IDT in der Abteilung virologische Qualitätskontrolle (QV) durchgeführt. Während der Arbeit wurden einige Virusproben bei IDT-QV als Kontrolle untersucht. Die Differenzen lagen im Bereich der Standardabweichung der Methode und zeigten keinen Trend.

3.6.3 Messung der extrazellulären Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Die extrazellulären Konzentrationen von Glukose, Laktat und Glutamin wurden an einem YSI 7100 MBS (YSI, Deutschland) gemessen. Eine besondere Probenvorbereitung war nicht notwendig, lediglich die Microcarrier wurden durch Dekantieren aus der Probenflüssigkeit bereits vor dem Einfrieren entfernt. Die Funktion des Gerätes beruht auf der katalytischen Reaktion (Oxidation) der Substrate mit immobilisierten Enzymen zu H_2O_2 (Abbildung 3.-2).

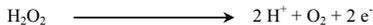


Abbildung 3.-2: Enzymreaktionen zur Messung der Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat am YSI 7100 MBS

Der durch Reduktion des Wasserstoffperoxids an einer Platinelektrode entstehende Strom wurde detektiert und war proportional zur Konzentration der entsprechenden Substanz. Die Konzentration von Glutamat wurde zwar in allen Proben bestimmt, jedoch in dieser Arbeit, auf Grund der ermittelten geringen Konzentrationsdifferenzen, nicht weiter betrachtet. Die Bestimmung der Glutamatkonzentration war jedoch für die Bestimmung der Glutaminkonzentration entscheidend.

Die Messung von extrazellulärem Ammonium erfolgte mit dem Vitros DT 60-II (Ortho Clinical Diagnostics, USA). Das Messprinzip basiert auf der chemischen Reaktion von Ammonium-Ionen zu Ammoniak bei einem pH-Wert von 9,2. Das gasförmige Ammoniak diffundiert durch eine semipermeable Membran und reagiert in einer Indikatorschicht mit Bromphenolblau. Die Blaufärbung wird durch die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 605 nm detektiert und ist proportional der Ammoniumkonzentration in der Probe. Da die Ammoniumkonzentration in den Proben generell über dem validierten Bereich lag, wurden die Proben 1:10 mit glutamin- und ammoniumfreiem Medium (GMEM)

verdünnt. Zur Korrektur des Messgerätes von der ursprünglichen Applikation, der Messung von Blutproben auf die Messung von Ammonium in Zellkulturmedium, wurde vor jeder Messreihe eine Eichkurve mit einer Ammonium-Standardlösung, die mit glutamin- und ammoniumfreiem Medium verdünnt wurde, angefertigt. Durch Auftragen der gemessenen Werte der Probe gegen die Werte der Eichkurve wurde eine Geradengleichung ermittelt, die zur Korrektur der Ammoniumwerte der Proben verwendet wurde. Tabelle 3.-7 zeigt die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen für die Messung von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium (Standardarbeitsanweisung, Uni MD). Im Ergebnisteil sind zur Illustration des Kurvenverlaufes im jeweiligen Versuch z. T. auch Konzentrationen dargestellt, die unterhalb der Quantifizierungs- bzw. Nachweisgrenze liegen.

Tabelle 3.-7: Ausgewählte statistische Eigenschaften der Assays für die Bestimmung der Konzentrationen an Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Substanz	Nachweisgrenze	Quantifizierungsgrenze
Glukose	0,29 mmol · L ⁻¹	0,88 mmol · L ⁻¹
Laktat	0,45 mmol · L ⁻¹	1,37 mmol · L ⁻¹
Glutamin	0,10 mmol · L ⁻¹	0,25 mmol · L ⁻¹
Ammonium	0,02 mmol · L ⁻¹	0,03 mmol · L ⁻¹

3.6.4 Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von Zellpopulationen hinsichtlich des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen sowie des Zellzyklus wurde ein Durchflusszytometer Epics XL (Beckman Coulter, Deutschland) eingesetzt. Es wurden mindestens $1,0 \cdot 10^4$ Zellen je Probe vermessen, dazu war eine Zellkonzentration von $2,0 \cdot 10^6$ Z · mL⁻¹ in der Probenflüssigkeit einzustellen [persönliche Mitteilung, Schulze-Horsel, J.].

Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation

Die Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen beruht auf der Verwendung des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid. Nach dem Ablösen der Zellen und verschiedenen Zentrifugations- und Waschschritten mit anschließender Zentrifugation erfolgte die Zugabe von 5 µL Propidiumiodid zu jeder Probe. Nach einer Reaktionszeit von 5 min wurde die Probe zytometrisch vermessen.

Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation über FLICA

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde bei dieser Methode über den fluoreszenzmarkierten Farbstoff FITC-VAD-FMK (FLICA/IDAC) bestimmt. Dieser zellpermeable Pancaspase-Inhibitor bindet an aktive Caspasen. Zur Probenvorbereitung wurden 0,5 µL Farbstoff (1:500 verdünnt) zur Probe gegeben. Die Reaktionszeit betrug 20 min bei 37 °C. Nach Zentrifugation und Spülen mit PBS wurde die Probe 15 min bei 37 °C inkubiert, so dass ungebundener Farbstoff aus den Zellen diffundierte. Anschließend wurde die Probe mit Formaldehyd fixiert, nach weiteren Zentrifugations- und Waschschrinen wurde die Probe im Durchflusszytometer vermessen.

Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen und des Zellzyklus einer Zellpopulation über DNA-Färbung

Nach der Probenvorbereitung und Einstellung der Zellzahl auf $2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ wurden die Zellen einer Probe zunächst in 70 % Ethanol fixiert. In einem nächsten Schritt erfolgte der Zellaufschluss mit dem Detergens Triton X 100 und der enzymatische Abbau von zellulärer RNA mit Hilfe von RNase A. Die DNA der Zellen wurde dann mit Propidiumiodid angefärbt und die Probe im Zytometer gemessen. Der DNA-Gehalt erlaubt sowohl Aussagen über einzelne Zellzyklusstadien ($G_{0/1}$, S-Phase, G_2) als auch über den Anteil apoptotischer Zellen.

3.7 Mikroskopische Analysemethoden

Alle mikroskopischen Untersuchungen an E-FL aus statischen oder Microcarriersystemen wurden an Proben durchgeführt, die zuvor mit einer 2 % Formalinlösung fixiert wurden.

3.7.1 Lichtmikroskopische Analysen

Die lichtmikroskopischen Analysen erfolgten an einem Zeiss Varioskop bzw. an einem Zeiss Axiovert. Diese Analysen wurden zur Prozesskontrolle, d. h. Dokumentation von Wachstum und Morphologie der Zellen in verschiedenen Kultursystemen (Gewebekulturflasche, Rollerflasche, Microcarriersystem) genutzt. Es wurde mit Vergrößerungen zwischen Faktor 100 - 400 und den Phasenkontrasten 1 und 3 gearbeitet. Die erhaltenen Bilder bzw. Bildfolgen wurden mit einer Digitalkamera (Nikon, Deutschland) aufgezeichnet.

3.7.2 **Laser-Scanning-Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie**

Fragestellungen, die mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM, Carl Zeiss, Deutschland) beantwortet werden konnten, waren z. B. die Bestimmung von Zellgrößen in statischen und in Microcarriersystemen oder der Verteilung von Zellen auf den Microcarriern. Dafür wurden die Zellproben mit dem Fluoreszenz-Kernfarbstoff SytoxGreen angefärbt. Eine weitere Vorbereitung der Proben war nicht nötig. Als Lichtquelle kamen zwei Laser zum Einsatz, durch Kombination der beiden Laser und verschiedener Filter war es u. a. möglich, dreidimensionale Aufnahmen der Zellen auf Microcarriern anzufertigen.

An einem Rasterelektronenmikroskop (REM, Typ DSM 942, Carl Zeiss, Deutschland) wurde u. a. die Morphologie der Zellen auf Microcarriern untersucht. Auf Grund des hohen Auflösungsvermögens und Vergrößerung bot das REM hier wesentliche Vorteile gegenüber der Lichtmikroskopie. Die Microcarrier mit den Zellen wurden in Alkoholverdünnsreihen entwässert und dann auf einen Metallträger gegeben. Nach abschließender Trocknung wurde die Probe mit einer dünnen, leitfähigen Goldschicht überzogen. Die Analyse der Proben erfolgte bei einer Spannung von 2 – 10 kV.

3.8 **Versuchsaufbau und Betriebsparameter für die Kultivierung der E-FL in Perfusion**

Perfusion

Der Begriff Perfusion bezeichnet eine Betriebsweise von Reaktoren bei der Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen (Kapitel 2.3.1). Dabei wird das verbrauchte Medium im Bioreaktor kontinuierlich gegen frisches Medium getauscht, um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten und eine Akkumulation möglicherweise toxischer Metabolite zu verhindern. Im Falle tierischer Zellen auf Microcarriern erfolgt die Zellrückhaltung über die Rückhaltung der Microcarrier durch geeignete technische Lösungen. Typischerweise wird die Perfusion erst nach einer kurzen Phase (48 - 96 h) im Batch-Betrieb gestartet. Die verwendeten Durchflussraten liegen dabei je nach Applikation im Bereich von $0,25 - 1,00 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$.

3.8.1 Aufbau der Perfusion im Wave® Bioreaktor

Für Perfusionsversuche im Wave® Bioreaktor wurde zunächst ein kommerziell erhältlicher Perfusionsbag (Wave Biotech, CH) mit einer beweglichen Filtermembran eingesetzt (Abbildung 3.-3 links). Die Erfahrungen aus ersten Kultivierungen zeigten jedoch, dass dieser Aufbau für die Kultivierung der E-FL auf Microcarriern ungeeignet ist. Die permanente Bewegung der Filtermembran im Reaktor führte zu einer extremen Scherbelastung auf die Microcarrier und Zellen, was sich in zerstörten Microcarriern und einer starken Abnahme der Zellzahl auf Werte $< 1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ widerspiegelte (Abbildung 3.-3 rechts). Daher wurde für die Perfusion im Wave® Bioreaktor ein neuartiges Modul mit Metallfiltergaze entwickelt (Abbildung 3.-4 links). Problematisch war das Einsetzen des Moduls in die bereits vorsterilisierten Wave® Bags. Hierzu musste das autoklavierte Modul steril durch einen der Probenahmestutzen in den Bag eingeführt werden. Damit war die zur Verfügung stehende Filterfläche konstruktiv auf ca. $1,5 \text{ mm}^2$ begrenzt. Trotz der geringen Filterfläche konnten mit diesem System die o. g. Probleme vermieden und erfolgreich Versuche zur Kultivierung der E-FL und zur Vermehrung des MEV im Wave® Bioreaktor in Perfusionsbetrieb durchgeführt werden (Abbildung 3.-4 rechts).

Das Arbeitsvolumen im Wave® Bioreaktor betrug 1 L. Apparativ bedingt konnte nicht mit Oberflächenabsaugung gearbeitet werden, daher musste die Volumenkonstanz durch entsprechende Einstellung der Förderraten an den Pumpen erreicht werden. Bei Bedarf wurde manuell nachkorrigiert, da keine entsprechenden Regeleinrichtungen zur Verfügung standen. Die Perfusion wurde, abhängig vom experimentellen Ansatz, nach 48 – 96 h Kultivierung im Batch-Betrieb mit Perfusionsraten von $200 - 500 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,2 - 0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) gestartet. In einer Vorlage-Flasche wurden ca. 2 L WM für die Versuche zur Zellkultivierung bzw. EM für die Versuche zur Virusvermehrung vorgelegt und mit einer Pumpe (Watson Marlow, Typ 505 S, USA) in den Reaktor gefördert. Auf die gleiche Art erfolgte über das Perfusionsmodul der Austrag von verbrauchtem Medium in eine Ernteflasche. Die Änderungen des Volumens in Vorlage- und Ernteflasche wurden gravimetrisch erfasst und manuell aufgezeichnet. Bei der kontinuierlichen Virusernte (Virusvermehrung in Perfusionsbetrieb) wurde die Ernte mit einem Wasserbad auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt, um die Verluste an infektiösem Virus zu minimieren. In allen anderen Fällen wurden Vorlage- und Erntemedium bei Raumtemperatur gehalten.

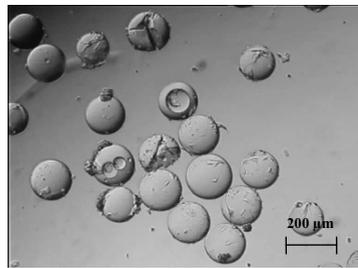
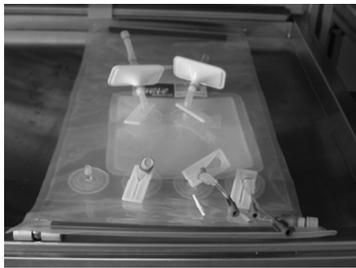


Abbildung 3-3: (links) Kommerzieller Perfusionsbag (Wave Biotech, CH) mit Filtermembran und (rechts) Auswirkung der Membranbewegung auf Microcarrier und Zellen

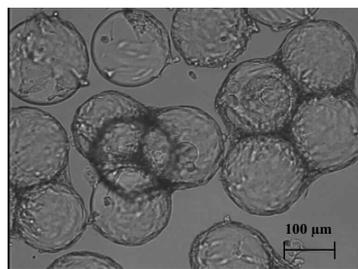
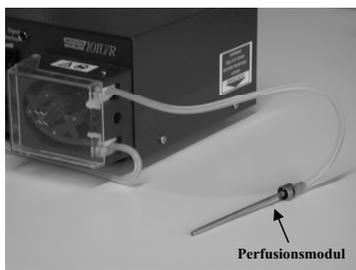


Abbildung 3-4: (links) selbstentwickeltes Perfusionsmodul mit Metallfiltergaze und (rechts) Zellwachstum der E-FL nach 120 h unter Verwendung des selbstentwickelten Perfusionsmoduls

3.8.2 Aufbau der Perfusion im Rührreaktor

Auf Grund der Arbeitsvolumina im Bereich von 0,15 – 0,50 L und geeigneter konstruktiver Gegebenheiten wurde für die Perfusion im Rührreaktor das Multifermentersystem „Sixfors“ (Infors, CH) gewählt (Abbildung 3-5 links). Für die Zellrückhaltung wurde ein zweites höhenverstellbares Tauchrohr in den Reaktor eingebaut und damit die Perfusion von der Probenahme entkoppelt. Am unteren Ende dieses Tauchrohres wurden verschiedene Systeme zur Zellrückhaltung angebracht und experimentell getestet. Dazu zählten ein Flüssigkeitsfilter (0,22 µm, Millipore, Deutschland), eine Metallfritte und das bereits im Wave® Bioreaktor erfolgreich eingesetzte, selbst entwickelte Filtermodul, welches für die Anwendung im Rührreaktor adaptiert wurde und auch hier gute Ergebnisse zeigte (Abbildung 3-5 rechts). Das Arbeitsvolumen bei der Perfusion betrug 400 – 450 mL, die Volumenkonstanz im Reaktor wurde durch Oberflächenabsaugung erreicht. Die Perfusion wurde, abhängig vom experimentellen Ansatz, nach 48 – 96 h Kultivierung im Batch-Betrieb mit Perfusionsraten

von 200 - 450 mL · d⁻¹ gestartet. In der Vorlageflasche wurden ca. 2 L WM für die Versuche zur Zellkultivierung bzw. EM für die Versuche zur Virusvermehrung vorgelegt und mit einer Pumpe (Watson Marlow, Typ 505 S, USA) in den Reaktor gefördert. Ebenso erfolgte die Austragung von verbrauchtem Medium in eine Ernteflasche. Die Änderungen des Volumens in Vorlage- und Ernteflasche wurden gravimetrisch erfasst und von einem Prozessleitsystem (PCS 7, Siemens, Deutschland) aufgezeichnet. Bei der kontinuierlichen Virusernte (Perfusionsversuche zur Virusvermehrung) wurde die Ernte mit einem Wasserbad auf 4 °C gekühlt, um die Verluste an infektiösem Virus zu minimieren. In allen anderen Fällen wurden Vorlage- und Erntemedium bei Raumtemperatur gehalten.



Abbildung 3.-5: (links) Aufbau der Perfusion im Rührreaktor und (rechts) an den Rührreaktor adaptiertes Perfusionsmodul

3.9 Vorversuche zu grundlegenden Fragestellungen

Im Folgenden sind Ergebnisse von Vorversuchen dargestellt, die zur Charakterisierung von Reaktor- und Medieneigenschaften, z. B. Sauerstoffübergang und Glutaminstabilität, für die Bestimmung von morphologischen oder kinetischen Parametern des biologischen Systems und für die Vermeidung von Fehlern bei der Analyse der Zellzahlen große Bedeutung haben.

3.9.1 Einführung eines Korrekturfaktors für die Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung repräsentativer Lebendzellzahlen stellte besonders im Wave[®] Bioreaktor ein Problem dar. Der Grund hierfür ist in der Einstellung niedriger Parameter für Amplitude und Frequenz (Wippwinkel und Wippfrequenz) der Bewegung des Reaktors zu sehen, die zwar das Wachstum der E-FL ermöglichten, jedoch nicht zu einer homogenen Verteilung der

Microcarrier im Reaktor führten. Die nach der Standardmethode (Kapitel 3.6.1) bestimmten Lebendzellzahlen stimmten offensichtlich nicht mit den real vorhandenen Zellzahlen überein, da die Microcarrierkonzentration, visuell eindeutig erkennbar, bei jeder Probenahme differierte. Daher wurde versucht, durch die Einführung eines Korrekturfaktors den Einfluss der Probenahme auf das Ergebnis der Zellzählung zu minimieren.

Es wurden drei Stammlösungen von Cytodex™ 1 Microcarriern mit Konzentrationen von 1, 2 und 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ hergestellt. Diese Stammlösungen wurden 1:1000 mit PBS verdünnt und in einer 96-well Platte jeweils sechs Einzelproben mikroskopisch ausgezählt. Aus den Mittelwerten der Partikelzahl bei jeder Carrierkonzentration erhält man durch lineare Regression eine Eichkurve (Abbildung 3.-6). Aus der Partikelzahl von $3650 \cdot \text{mL}^{-1}$ je $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Carrier ergibt sich bei einem mittleren Partikeldurchmesser von 190 μm eine Wachstumsfläche von $4100 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ Carrier. Dieser Wert konnte durch weitere Untersuchungen mit der gleichen Methode der mikroskopisch manuellen Partikelzählung bestätigt werden [persönliche Mitteilung A. Bock] und ist damit um etwa 10 % geringer als die vom Hersteller angegebene Fläche von $4400 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ Carrier. Ein Grund dafür könnte das Entfernen der Partikelfraktion $< 50 \mu\text{m}$ durch die Spülschritte sein, diese Fraktionen wurden eventuell durch den Hersteller bei der Flächenermittlung mit bestimmt.

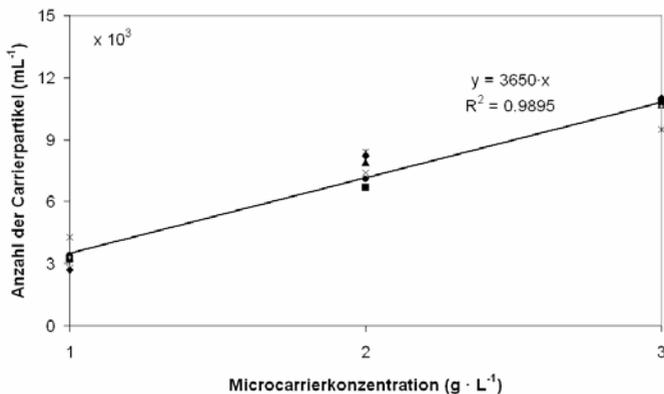


Abbildung 3.-6: Eichkurve für die Bestimmung der Partikelzahl von Cytodex™ 1 Microcarriern bei verschiedenen Microcarrierkonzentrationen als Mittelwert einer 6-fach Bestimmung unter dem Lichtmikroskop

$$X_L = X_{L,gezählt} \cdot \frac{C_{MC,Probe}}{C_{MC,Referenz}}$$

Gleichung 3.-4

X_L ...korrigierte Lebendzellzahl [$Z \cdot mL^{-1}$]

$X_{L,gezählt}$...mikroskopisch nach Kapitel 3.6.1 gezählte Lebendzellzahl [$Z \cdot mL^{-1}$]

$C_{MC,Probe}$...Anzahl der Microcarrier in der jeweiligen Probe

$C_{MC,Referenz}$...Anzahl der Microcarrier in der Referenz (3 650 Microcarrier je $g \cdot L^{-1}$ entsprechend Abbildung 3.-6)

Bei jeder Probenahme am Wave[®] Bioreaktor wurde die Zahl der Microcarrierpartikel in der Probe nach der entsprechenden Verdünnung mikroskopisch bestimmt und die Abweichungen mit der Eichkurve korreliert. Der so erhaltene Korrekturfaktor wurde mit den gezählten Zellzahlen multipliziert (Gleichung 3.-4) und ergab damit einen berichtigten Wert für die Zellzahl, der wesentlich besser mit den realen Verhältnissen übereinstimmte. Probenahmebedingte grobe Fehler und Schwankungen bei der Zellzahlbestimmung im Wave[®] Bioreaktor konnten so minimiert werden. Alle dargestellten Zellzahlen aus den Wave[®] Bioreaktor Kultivierungen wurden entsprechend Gleichung 3.-4 korrigiert.

3.9.2 Bestimmung morphologischer Parameter von E-FL Zellen im statischen System

Für die Abschätzung von theoretisch erreichbaren Zellzahlen in statischen und dynamischen Systemen ist die Kenntnis des Flächenbedarfs der E-FL bei verschiedenen Zellzahlen unabdingbar. Die mikroskopische Analyse der Zellen ist unter statischen Bedingungen sehr viel einfacher und genauer möglich als im dynamischen System auf Microcarriern. Daher wurde bei der Größenbestimmung der E-FL auf Gewebekulturflaschen als Modellsystem, unter der Annahme ähnlicher Verhältnisse auch auf Microcarriern, zurückgegriffen. Zur Ermittlung der Zellgröße, d. h. der im adhärenen Zustand benötigten Fläche, wurden Zellen mit $4,0 \cdot 10^4 Z \cdot cm^{-2}$ in drei Gewebekulturflaschen ($175 cm^2$) eingesät. Nach 24, 96 und 120 h Kultivierungsdauer wurden das Zellkulturmedium dekantiert, die Zellen mit Formalin fixiert, mit einem Kernfarbstoff (Sytox Green) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch mit dem LSM untersucht. Aus jeder Flasche wurden 30 zufällig ausgewählte Zellen, wie beispielhaft für Zellen bei 24 und 96 h Kultivierungsdauer in Abbildung 3.-7 gezeigt, vermessen (AIM Image Browser, Carl Zeiss, Deutschland). Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h betrug die mittlere Fläche einer E-FL Zelle $1373 \mu m^2$, mit fortschreitender Kultivierungsdauer sank dieser Wert bis auf $782 \mu m^2$ nach 120 h (Tabelle 3.-8). Zu diesem Zeitpunkt betrug der Konfluenzgrad nahezu 100 %, d. h. die Zellen befanden sich im Zustand der

Kontaktinhibierung. Ausgehend von der Kugelform direkt nach dem Trypsinieren (mittlerer Durchmesser 11,4 μm , mittlere Oberfläche einer Zelle 410 μm^2) entwickeln die E-FL zu Beginn der Kultivierung eine typisch fibroblastoide Morphologie. Bei Erreichen der Konfluenz nach ca. 120 h lassen sich Einzelzellen relativ schwierig differenzieren. Charakteristisch für diesen späten Zustand der Kultivierung ist eine Art Wachstumsachse, wie z. B. in Abbildung 3.-7 b, von links oben nach rechts zu sehen, im Gegensatz zu den Zellen in Abbildung 3.-7 a, die keine Anordnung entlang einer Vorzugsrichtung erkennen lassen. Anhand der Werte aus Tabelle 3.-8 lässt sich im statischen System eine theoretisch erreichbare Zellzahl von $1,3 \cdot 10^5$ Zellen $\cdot \text{cm}^{-2}$ errechnen.

Im Microcarriersystem können bei $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1, basierend auf den in Kapitel 3.9.1 ermittelten Werten, für die zur Verfügung stehende Carrieroberfläche maximal $1,0 \cdot 10^6$ Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht werden. Auf einem Cytodex™ 1 Microcarrier haben im konfluenten Zustand demnach maximal 150 E-FL Platz. Dieser Wert konnte in der Größenordnung durch mikroskopische Untersuchungen am LSM bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

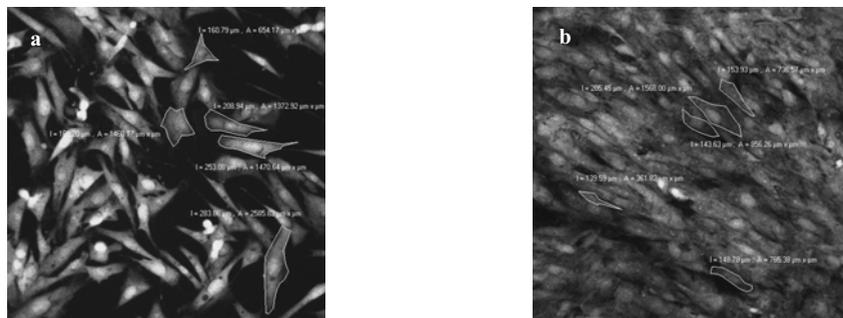


Abbildung 3.-7: Flächenvermessung von E-FL in Gewebekulturflaschen (175 cm^2) am Beispiel von je 5 Einzelzellen nach a) 24 h und b) 96 h

Tabelle 3.-8: Mittlere Flächen von E-FL im statischen System (Gewebekulturflasche mit 175 cm^2) bei verschiedenen Konfluenzgraden

Untersuchtes System	Mittlere Fläche einer Zelle (μm^2)	Absolute Standardabweichung (μm^2)	Relative Standardabweichung (%)
E-FL nach 24 h	1373	401	29,2
E-FL nach 96 h	1205	366	30,4
E-FL nach 120 h	782	239	30,6

3.9.3 Temperaturstabilität des Mink Enteritis Virus bei 4 °C und 37 °C

Die Kenntnis der Temperaturstabilität des produzierten Mink Enteritis Virus ist von großer Bedeutung für die Prozesskontrolle, besonders bei langen Kultivierungszeiten und das Erzielen optimaler Virusausbeuten. Auch für eine mathematische Modellierung der Virusreplikation wäre die Kenntnis der Virusstabilität und damit der Infektiösität der Viruspartikel im Reaktor notwendig. Die Viruspartikel werden im Zellkulturmedium durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, u. a. Proteasen, welche die Integrität des Virus zerstören und damit die Infektiösität signifikant verringern. Die Enzymaktivität ist dabei temperaturabhängig.

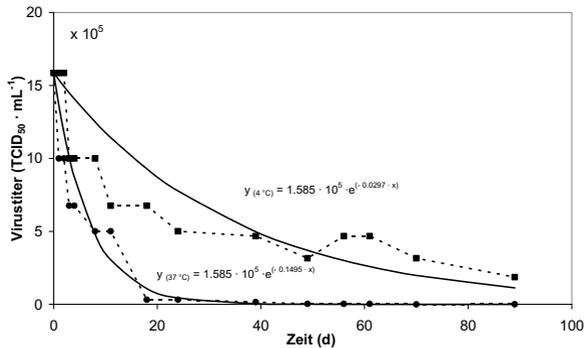


Abbildung 3-8: Vergleich der MEV-Stabilität bei 4 °C (■-) und 37 °C (●-) anhand experimenteller Werte unter Annahme einer Abbaukinetik 1. Ordnung

In einem Modellversuch wurde eine native Virussuspension mit einem Titer von $1,6 \cdot 10^6$ TCID₅₀ · mL⁻¹ jeweils bei 4 °C und 37 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und titriert. Abbildung 3-8 zeigt die experimentellen Werte und eine Simulation mit MatLab 6.5 (MathWorks, USA) unter Annahme einer Abbaureaktion 1. Ordnung. Bei einer Temperatur von 37 °C verliert das Virus sehr schnell seine Infektiösität, die Halbwertszeit beträgt hier ca. 5 Tage. Diese geringe Stabilität lässt lange Kultivierungszeiten bei der Produktion von MEV-Vakzinen, wie sie z. B. bei Batch-Kultivierungen ohne Virusernie möglich wären, als ungeeignet erscheinen. Diesem Problem kann mit der bereits aus anderen Gründen angewandten Methode der Mehrfach-Ernten begegnet werden. Bei einer Temperatur von 4 °C ist das MEV hingegen relativ stabil, die

Halbwertszeit beträgt hier etwa 24 Tage. Damit wäre eine Temperatur von 4 °C eine geeignete Lagertemperatur für kurze Lagerzeiten (5 – 15 Tage) und könnte mit relativ geringem energetischem Aufwand z.B. für die Kühlung der kontinuierlichen Ernte bei Perfusionssystemen angewendet werden. Für eine längere Lagerung sollte die Virussuspension bei –70 °C eingefroren werden.

3.9.4 Bestimmung der Glutaminstabilität im Zellkulturmedium bei 37 °C

Die essentielle Aminosäure L-Glutamin ist ein integraler Bestandteil von Zellkulturmedien für tierische Zellen. Glutamin ist jedoch thermisch instabil und zerfällt, in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert, in L-Pyrrolidonsäure und das für Zellen toxische Ammonium [Ozturk, S. S. und Palsson, B. O. 1990]. Aus einem Mol Glutamin entsteht dabei ein Mol Ammonium. Die Glutamin-Zugabe erfolgt daher in der Regel direkt vor der Verwendung des Mediums. Auch während der Kultivierung kommt es zu einer Zerfallsreaktion. Zur mathematischen Beschreibung dieses Vorganges finden die Gleichungen 3.-5 und 3.-6 Anwendung.

$$\frac{dc}{dt} = -k \cdot c \quad \text{Gleichung 3.-5}$$

Integration und Umstellung nach der gesuchten Größe $c_{\text{Glutamin,Zerfall,t}}$ führt zu

$$c_{\text{Glutamin,Zerfall,t}} = c_{\text{Glutamin,t}_0} \cdot e^{(-k \cdot t)} \quad \text{Gleichung 3.-6}$$

$c_{\text{Glutamin,Zerfall,t}}$... Glutaminkonzentration zu einem definierten Zeitpunkt t der Zerfallsreaktion [mmol · L⁻¹]

$c_{\text{Glutamin,Zerfall,t}_0}$... Glutaminkonzentration zu Beginn (t₀) der Zerfallsreaktion [mmol · L⁻¹]

t...Zeit [h]

k...Zerfallskonstante [h⁻¹] (bestimmt nach Abbildung 3.-9, mit k = 0,00105 h⁻¹)

Zur Ermittlung der Zerfallskonstante der Reaktion 1. Ordnung für das verwendete WM wurde der Glutaminzerfall unter definierten Bedingungen (Abbildung 3.-9) über einen Zeitraum von 50 Tagen experimentell untersucht und die Messdaten mit MatLab 6.5 (MathWorks, USA) ausgewertet.

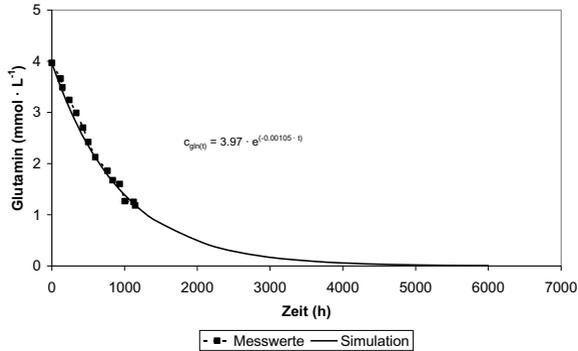


Abbildung 3.-9: Darstellung der Messwerte und Simulation für den thermischen Zerfall von Glutamin im WM unter definierten Bedingungen (Reaktion 1. Ordnung)

Die Halbwertszeit von Glutamin im WM beträgt etwa 672 h (entspricht 28 d) (Abbildung 3.-9). Die analoge Vorgehensweise führt unter der Annahme eines Zerfalls von Glutamin zu Ammonium im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 zu Gleichung 3.-10. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden alle in der Arbeit angegebenen Glutamin- und Ammoniumkonzentrationen entsprechend der Gleichungen 3.-9 und 3.-10 korrigiert.

$$c_{Gln,t} = c_{Gln,Messwert,t} + c_{Gln,Zerfall,t} \quad \text{Gleichung 3.-9}$$

$$c_{Amm,t} = c_{Amm,Messwert,t} - c_{Amm,Zerfall,t} \quad \text{Gleichung 3.-10}$$

$c_{Gln,t}$ und $c_{Amm,t}$... "reale" Konzentration, d. h. allein durch Einfluss der Zellen verursachte Konzentration zu einem definierten Zeitpunkt t [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

$c_{Gln,Messwert,t}$ und $c_{Amm,Messwert,t}$... zu einem definierten Zeitpunkt t gemessene Konzentration [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

$c_{Gln,Zerfall,t}$ und $c_{Amm,Zerfall,t}$... Anteil des Gln-Zerfalls zu einem definierten Zeitpunkt t [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$]

3.9.5 **Charakterisierung des Sauerstoffübergangs ($k_{L,a}$ -Wert) im Rührreaktor und im Wave[®] Bioreaktor**

Eine wichtige Größe bei der Charakterisierung eines Bioreaktors stellt der flächenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient, $k_{L,a}$ -Wert, dar (Kapitel 2.2.2.4). Der $k_{L,a}$ -Wert muss für jedes Reaktorsystem unter definierten voreingestellten Bedingungen, z. B. Drehzahl, Begasungsrate und Reaktoreinbauten bestimmt werden. In dieser Arbeit kam die dynamische Methode, d. h. wechselnde Begasung mit reinem Stickstoff und reinem Sauerstoff bis zur jeweiligen Sättigung, zur Anwendung. Durch die halblogarithmische Auftragung der Konzentrationsänderung des Sauerstoffs als pO_2 über der Zeit ergibt sich eine Gerade, deren durch lineare Regression ermittelter Anstieg dem $k_{L,a}$ -Wert des Systems entspricht. Beim Sixfors-Multifermentersystem kamen Standard- pO_2 -Elektroden (Mettler Toledo, Deutschland) zum Einsatz, im Wave[®] Bioreaktor wurden die für den jeweiligen Reaktortyp vom Hersteller Wave Biotech gelieferten DO-Sonden verwendet. Alle Sonden wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und polarisiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte unter Einstellung bzw. Einhaltung der in den Abbildungen 3.-10 und 3.-11 dargestellten Parameter (Drehzahl, Medium, Begasung,...).

In dem für die Experimente dieser Arbeit auch verwendeten 5 L-Rührreaktor der Fa. Sartorius BBI wurde bei Einstellung der Kultivierungsparameter (n , T , Medienvolumen, ...) von Bock et. al ein $k_{L,a}$ -Wert von $5,0 \text{ h}^{-1}$ bestimmt [persönliche Mitteilung A. Bock]; dieser Wert liegt innerhalb der vom Hersteller Sartorius BBI angegebenen Spanne. Der Versuch wurde daher nicht wiederholt, es wurde von diesem Wert ausgegangen. Im Sixfors-Rührreaktor wurde unter den eingestellten Bedingungen ein $k_{L,a}$ -Wert von $117,4 \text{ h}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 3.-10), dieser Wert stimmte in der Größenordnung mit entsprechenden Herstellerangaben überein (persönliche Mitteilung Infors AG, CH). Der relativ hohe Wert hat seine Ursache unter anderem in der verwendeten INOX-Fritte, dem Zutaktungsprofil (1 – 2 s Ventilöffnung), der Verwendung von reinem Sauerstoff, der Lokalisation der pO_2 -Sonde direkt über der INOX-Fritte sowie der Reaktorgeometrie.

Im Wave[®] Bioreaktor wurden die $k_{L,a}$ -Werte bei fast vollständig geschlossenem Abluftventil, d. h. bei dem größten möglichen Reaktorinnendruck, bestimmt. Diese Einstellung wurde auch für die Kultivierungen gewählt. Damit wurde im 1 L *wv* Wave[®] Bioreaktor ein $k_{L,a}$ -Wert von $4,7 \text{ h}^{-1}$ und im 10 L *wv* Wave[®] Bioreaktor ein $k_{L,a}$ -Wert von $1,4 \text{ h}^{-1}$ ermittelt (Abbildung 3.-11). Beide Werte sind nahezu identisch mit den von der Firma Wave Biotech angegebenen Daten [Eibl, R. et al. 2005]. Nach den im Kapitel 2.2.2.4 dargestellten Überlegungen ($q_{O_2} = 1,88 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot Z^{-1}$) kann hinsichtlich des Sauerstoffbedarfs im

5 L-Rührreaktor das Wachstum von $6,2 \cdot 10^6 \text{ Z mL}^{-1}$ unterstützt werden. Auf ähnlichem Niveau liegt der 1 L vv Wave® Bioreaktor mit $5,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und mit 10 L vv mit $1,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Im Sixfors-Rührreaktor könnten theoretisch Zellzahlen von $1,5 \cdot 10^8 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht werden. Andere Limitationen (Medium, Fläche,...) wären hier für das Wachstum begrenzend.

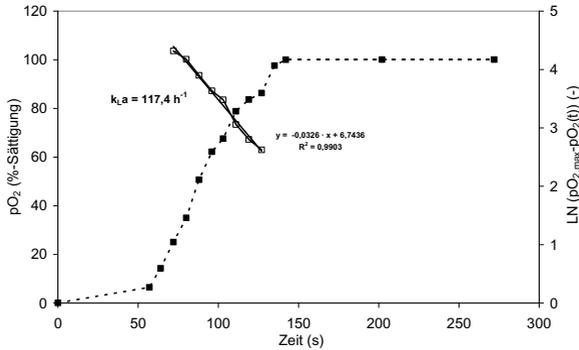


Abbildung 3-10: Bestimmung des k_{La} -Wertes mit der dynamischen Methode in einem 0,45 L vv Sixfors-Rührreaktor unter definierten Bedingungen (Begasung mit O_2 und N_2 , aqua dest. 450 mL vv, 50 rpm, 37 °C, Rührerposition und Begasungsrate mit Standardeinstellungen)

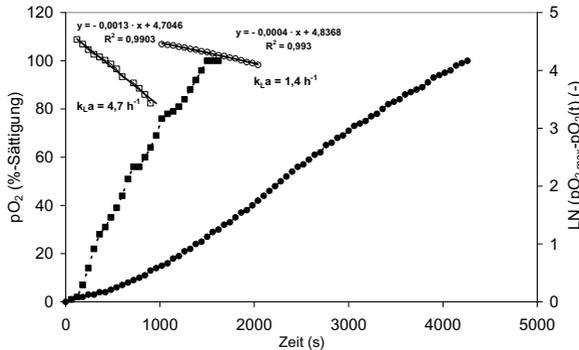


Abbildung 3-11: Bestimmung des k_{La} -Wertes mit der dynamischen Methode im Wave® Bioreaktor mit 1 (■) und 10 L vv (□) unter definierten Bedingungen (Begasung mit O_2 und N_2 , aqua dest. 1 und 10 L vv, Wipptrate 6 min^{-1} , Wippwinkel 5° , 37 °C, Begasungsrate 0,1 bzw. $0,3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$)

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum und Stoffwechsel der E-FL und Vermehrung von MEV im statischen System

4.1.1 Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Gewebekulturflaschen

Die Charakterisierung von Zellwachstum und Stoffwechsel der E-FL Zellen in Gewebekulturflaschen liefert wichtige Anhaltspunkte zur Entwicklung eines Kultivierungsprozesses für die E-FL im Microcarriersystem. Besonders wichtig ist die Kenntnis von Parametern wie der spezifischen Wachstumsrate μ_{\max} , der Verdopplungszeit t_d , den Aufnahmeraten für Glukose und Glutamin (r_{Gluk} und r_{Gln}) und den Bildungsraten für Laktat und Ammonium (r_{Lak} und r_{Amm}), den spezifischen Verbrauchsraten für Glukose und Glutamin (q_{Gluk} und q_{Gln}) und den spezifischen Bildungsraten für Laktat und Ammonium (q_{Lak} und q_{Amm}) sowie von Ausbeutekoeffizienten ($Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amm/Gln}}$).

Ansatz

Es wurden insgesamt drei Versuchsreihen angesetzt, für jede Reihe wurden sechs Gewebekulturflaschen (75 cm^2) mit $0,4 - 0,7 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ inokuliert. In definierten Zeitintervallen erfolgte die Ernte und Zählung der Zellen aus jeweils einer Flasche. Bei den Versuchen wurden zusätzlich die Metabolitkonzentrationen quantifiziert.

Zellwachstum

Bei der Zellzählung nach 24 h war in allen Fällen eine leichte Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Einsaatzellzahl festzustellen. Das ist auf übliche Zellverluste beim Transfer der Zellen und eine kurze Adaptionsphase der Zellen an die Bedingungen in der neuen Kulturflasche zurückzuführen. Im mikroskopischen Bild war nach 24 h die typisch fibroblastoide Morphologie der E-FL zu sehen, einzelne Zellen befanden sich noch abgekugelt im Überstand und waren sehr wahrscheinlich nicht mehr vital (Abbildung 4.-1 links). Die Konfluenz der Kultur zu diesem Zeitpunkt wurde auf 15 % geschätzt.

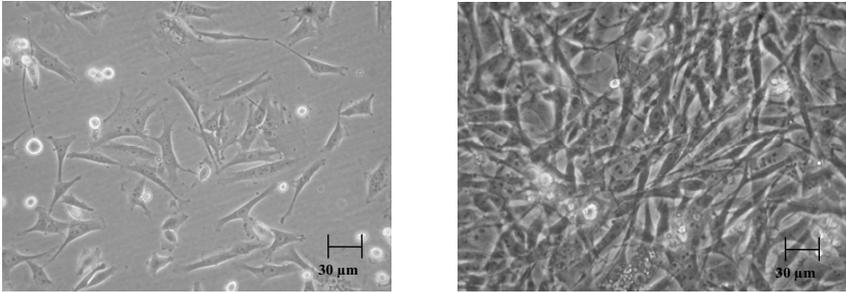


Abbildung 4.-1: links) Lichtmikroskopische Aufnahme der E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) nach 24 h und rechts) nach 120 h Kultivierungsdauer, keine Virusinfektion, 100-fache Vergrößerung

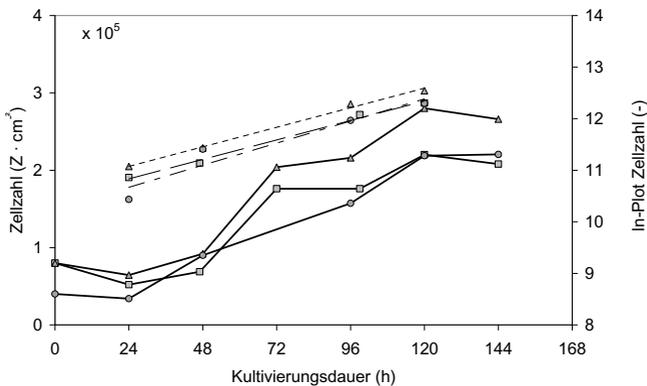


Abbildung 4.-2: Wachstumskurven von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) und logarithmische Auftragung der Zellzahlen im Intervall von 24 – 120 h, Versuch 1 (□-), Versuch 2 (△-) und Versuch 3 (○-), durchgezogene Linien = Zellzahl, gestrichelte Linien = ln der Zellzahl

Nach 120 h Kultivierungsdauer wurde in allen drei Versuchsreihen, unabhängig von der Einsaat-Zellzahl, die maximale Zellzahl erreicht (Abbildung 4.-2). Diese lag in einem Bereich von $2,0 - 2,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$. Zu diesem Zeitpunkt war im mikroskopischen Bild ein konfluenter Zellrasen (Monolayer) zu sehen (Abbildung 4.-1 rechts). Die logarithmische Auftragung der Zellzahl nach Gleichung 2.-1 und 2.-2 ergab maximale spezifische Wachstumsraten μ_{max} von $0,016 - 0,018 \text{ h}^{-1}$ und damit Verdopplungszeiten von etwa 40 h (Abbildung 4.-2). Nach dem Erreichen der maximalen Zellzahl nach 120 h blieb die Zellzahl im Verlauf der weiteren Kultivierung in allen drei Versuchsreihen konstant.

pH-Profile

Die pH-Werte sanken in allen Ansätzen, ausgehend von $7,6 \pm 0,2$, auf Werte von $6,8 \pm 0,2$ am Ende der Kultivierung (Daten nicht gezeigt). Die pH-Werte am Ende der Kultivierung sind als kritisch und inhibierend auf das Zellwachstum einzuschätzen. Versuche in Gewebekulturflaschen mit gasdurchlässiger Membran, also mit CO_2 -Einfluss (5 %) auf die Zellen, zeigten jedoch eine signifikante Inhibierung des Zellwachstums. Die Zellen erreichten in keinem Fall Konfluenz. Daher wurden für alle weiteren Versuche in statischen Systemen gasdichte Kulturflaschen verwendet. Offensichtlich war die geringe Pufferkapazität des Mediums ($0,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$) hier ein limitierender Faktor für das Zellwachstum. Im Hinblick auf die spätere Kultivierung in Microcarriersystemen liegt eine Supplementierung des Mediums mit NaHCO_3 nahe. Die pH-Verläufe waren prinzipiell in allen Kultivierungen in statischen Systemen, egal ob mit oder ohne MEV-Infektion, ähnlich. Daher wird im Folgenden auf eine explizite Darstellung der pH-Werte verzichtet.

Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Die Profile der Glukose- und Laktatkonzentration zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung zwischen den drei Versuchsreihen (Abbildung 4.-3). Ausgehend von Startkonzentrationen von etwa 5,0 mM Glukose und 2,0 mM Laktat änderten sich die Werte, bedingt durch den Stoffwechsel der Zellen, auf ein Level von 1,5 - 2,0 mM Glukose und 6,0 - 6,5 mM Laktat am Ende der Kultivierung nach 144 h. Nach Gleichung 2.-20 ergab sich eine Glukoseverbrauchsrate r_{Gluk} im Bereich von $0,028 \text{ mmol} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ und nach Gleichung 2.-22 eine Laktatbildungsrate r_{Lak} von $0,035 \text{ mmol} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. Der spezifische molare Ausbeutekoeffizient Glukose zu Laktat ($Y_{\text{Lak/Gluk}}$) erreichte nach Gleichung 2.-25 Werte von 1,21 - 1,32. Auch die Profile für die Glutamin- und Ammoniumkonzentration zeigten in allen drei Ansätzen eine gute Übereinstimmung (Abbildung 4.-4). Die Glutaminkonzentration sank von einem Startniveau von ca. 5,0 mM auf ein Niveau von ca. 3,5 mM am Ende der Kultivierung. Das entsprach nach Gleichung 2.-20 unter Beachtung von Gleichung 3.-9 Glutaminverbrauchsrate r_{Gln} von ca. $0,0013 \text{ mmol} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Konzentration von Ammonium nahm von anfänglich ca. 0,2 - 0,5 mM auf Endwerte von 1,5 - 2,3 mM zu. Nach Gleichung 2.-22 betrug die Ammoniumbildungsrate r_{Amm} damit ca. $0,014 \text{ mmol} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. Der spezifische molare Ausbeutekoeffizient Glutamin zu Ammonium $Y_{\text{Amm/Gln}}$ lag nach Gleichung 2.-26 in einem Bereich von 1,04 - 1,15.

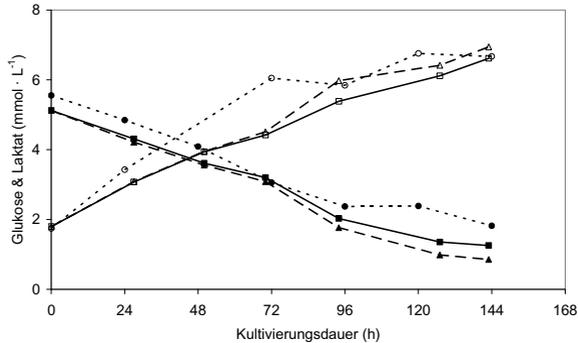


Abbildung 4-3: Profile der Glukose- (-■- Versuch 1, -△- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Laktatkonzentrationen (-□- Versuch 1, -△- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²)

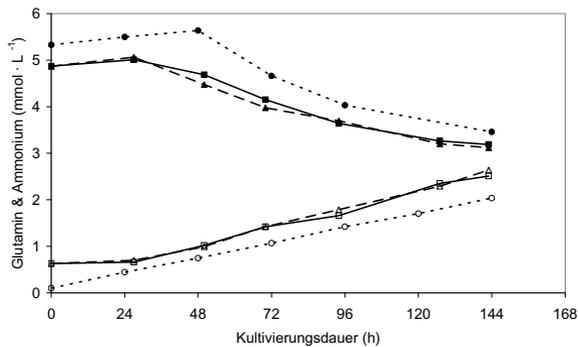


Abbildung 4-4: Profile der Glutamin- (-■- Versuch 1, -△- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Ammoniumkonzentrationen (-□- Versuch 1, -△- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²)

4.1.2 Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Rollerflaschen

Beim bisherigen industriellen Verfahren der Herstellung der MEV-Vakzine werden Rollerflaschen verwendet. Daher sollte in diesem Versuch das Wachstum und der Stoffwechsel der E-FL in Rollerflaschen charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurde auf die Aufnahme einer Wachstumskurve in Rollerflaschen verzichtet, es wird angenommen, dass keine relevanten Abweichungen zu den in Gewebekulturflaschen ermittelten Werten auftreten.

Ansatz

Es wurden drei Rollerflaschen mit jeweils $0,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ inokuliert, die Flaschen wurden täglich auf das Zellwachstum untersucht und Proben für die Bestimmung der Stoffwechselleistungen entnommen. Ein Medienwechsel wurde nicht vorgenommen, um das Einfachernte-Schema, das später bei der Virusinfektion mit MEV angewendet wurde, zu simulieren.

Zellwachstum

Die mikroskopische Kontrolle der Zellen in Rollerflaschen zeigte ein zu Gewebekulturflaschen identisches Wachstum und Zellmorphologie. Die durchschnittlichen Zellausbeuten lagen bei Erreichen des konfluenten Zustandes (72 – 120 h) im Mittelwert bei etwa $1,0 - 1,5 \cdot 10^8 \text{ Z} / \text{Rollerflasche}$ ($1,2 - 1,8 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$). Unter Beachtung der bei Rollerflaschen aus technischen Gründen bei der Ernte höheren Verluste an Zellen lagen diese Werte in einem Bereich, der leicht unter dem Niveau lag, das in Gewebekulturflaschen erreicht wurde.

Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Die Profile für den Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration zeigten mit hoher Übereinstimmung für alle drei Ansätze während einer Kultivierungsdauer von 168 h eine Glukoseabnahme von etwa 3,0 mM und eine Laktatzunahme von etwa 4,4 mM (Abbildung 4.-5). Das entsprach einer r_{Gluk} von $0,018 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer r_{Lak} von $0,026 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ lag im Bereich von 1,43 – 1,47, d. h., dass etwa 70 % der Glukose direkt zu Laktat umgewandelt wurden. Die Glutamin- und Ammoniumkonzentrationsprofile zeigten eine hohe Übereinstimmung innerhalb der drei Ansätze. Die Glutaminkonzentration sank innerhalb von 168 h Kultivierungsdauer um etwa $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, die Konzentration von Ammonium nahm im gleichen Zeitraum um etwa $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu (Abbildung 4.-6). Die Glutaminaufnahmerate r_{Gln} betrug dementsprechend $0,007 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, die Ammoniumfreisetzungsrage r_{Amm} lag bei $0,011 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ lag bei etwa 1,53.

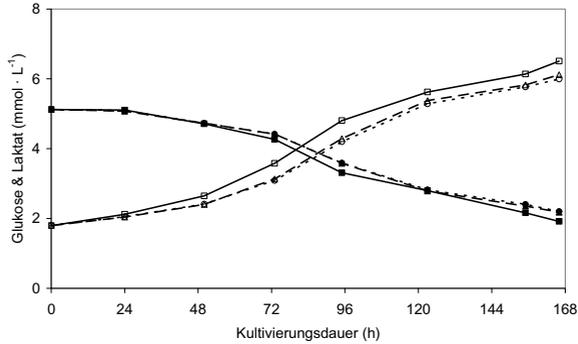


Abbildung 4-5: Profile der Glukose- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Laktatkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Rollerflaschen

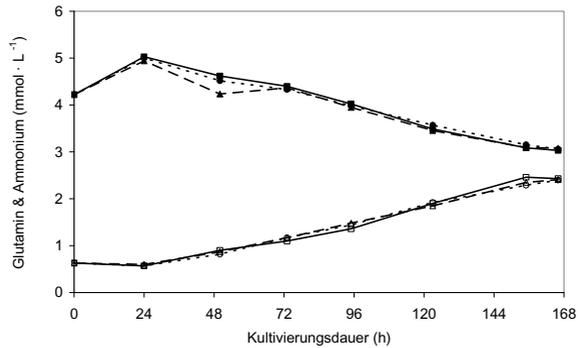


Abbildung 4-6: Profile der Glutamin- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Ammoniumkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Rollerflaschen

4.1.3 Vermehrung von MEV im statischen System

In den folgenden Experimenten sollte die Vermehrung des MEV in statischen Systemen (Gewebekulturflaschen, Rollerflaschen) untersucht werden. Wichtige Parameter für das Erreichen hoher Virusausbeuten sind die „time of infection“ (toi), die „multiplicity of infection“ (moi) und, als Besonderheit in diesem biologischen System, die Entscheidung für ein Einfach- oder Mehrfachernte-Schema bzw. die Wahl der entsprechenden Erntezeitpunkte.

4.1.3.1 Vermehrung von MEV in Gewebekulturflaschen (75 cm²) im Einfachernte-Schema

In diesem Versuch sollte die MEV-Vermehrung in Gewebekulturflaschen in Abhängigkeit von der *toi* untersucht werden. Da MEV nur Zellen in der S-Phase infizieren kann, stand zu erwarten, dass die *toi* einen großen Einfluss auf den Verlauf der Infektion und die Virusausbeuten haben würde (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Besonders interessant war die Frage, ob die vom ursprünglichen Prozess im IDT vorgegebene *toi* von 0 h tatsächlich optimal ist, oder ob sich durch eine kurze Adaptions- und Anheftungsphase der Zellen (6, 12, 24,... 48 h), bedingt durch die dann höhere Zellzahl, eine höhere Virusausbeute ergeben würde.

Ansatz

Es wurden sieben Gewebekulturflaschen (75 cm²) mit $0,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ inokuliert und mit einer *moi* von 0,01 nach 0, 6, 12, 24, 36 und 48 h mit MEV infiziert. Eine Flasche wurde nicht infiziert und als Zellkontrolle mitgeführt.

Zellwachstum

In der Kontrolle wuchsen die Zellen innerhalb von 96 h zu Konfluenz mit typischer Morphologie (Abbildung 4.-7 links), während in den infizierten Ansätzen bereits ca. 24 h p. i. erste Anzeichen für einen cytopathischen Effekt (CPE) zu sehen waren. Nach 96 h p. i. waren nur noch einzelne Zellen zu erkennen, der Zellrasen war komplett abgelöst und viele Zellen tot im Überstand (Abbildung 4.-7 rechts). Anzeichen für eine Infektion konnten aber bereits 24 h p. i. an einem verzögerten Wachstum der infizierten Kulturen im Vergleich zur Zellkontrolle gesehen werden.

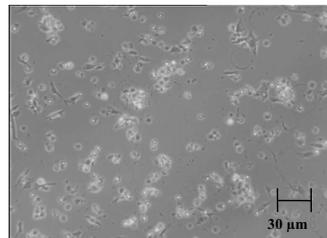
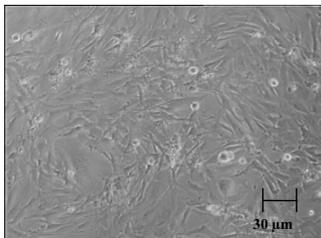


Abbildung 4.-7: (links) nicht-infizierte E-FL Kultur nach 96 h und (rechts) Beispiel für eine MEV-infizierte E-FL Kultur 96 h p. i. (*moi* 0,01 und *toi* 0 h) in Gewebekulturflaschen (75 cm²), 40-fache Vergrößerung

Verlauf der Virusinfektion und der MEV-Ausbeuten

In der sofort bei der Zelleinsaat mit MEV infizierten Gewebekulturflasche stieg der Titer innerhalb von 72 h auf einen Wert von $10^{6,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ an. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm der Virustiter nur geringfügig zu und blieb auf einem Niveau von $10^{5,5}$ – $10^{6,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹. Ein ähnlicher Verlauf mit niedrigeren Titern zwischen $10^{5,0}$ – $10^{6,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ wurde für die 6, 12 und 24 h nach der Zelleinsaat infizierten Ansätze gefunden. Auch hier dauerte der Anstieg bis zum ersten Titermaximum etwa 72 h (Abbildung 4.-8). Signifikant langsamer verlief die Vermehrung des MEV in dem 36 h nach Zelleinsaat infizierten Ansatz. Das Maximum von $10^{5,8}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ wurde hier erst nach ca. 110 h erreicht. In der 48 h nach der Zelleinsaat infizierten Kultur konnte im Versuchszeitraum keine Vermehrung des MEV nachgewiesen werden. Der Titer sank 24 h p. i. unter den Ausgangstitern und stieg im Verlauf der Kultivierung innerhalb von 192 h lediglich wieder auf das Ausgangsniveau von $10^{3,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ an. Auch im mikroskopischen Bild war in diesem Fall - im Gegensatz zu den anderen Ansätzen - kein Einfluss der Virusinfektion auf die Morphologie und das Wachstum der Zellen zu erkennen.

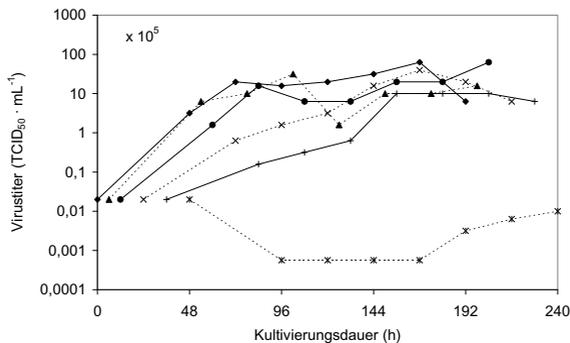


Abbildung 4.-8: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) von infizierten E-FL Kulturen bei einer moi von 0,01, (-♦- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, -*- toi 36 h und -.- toi 48 h)

Die Ergebnisse des Versuches belegen deutlich, dass toi's von 36 und 48 h unter den untersuchten Bedingungen zu keiner Erhöhung der Virusausbeuten führen. Offensichtlich waren hier viele Zellen nicht mehr in der S-Phase des Zellzyklus, sondern schon in die G₀-Phase übergegangen. Damit konnten diese Zellen durch das ausschließlich in S-Phase-Zellen replizierende MEV nicht mehr infiziert werden. Im Gegensatz dazu führten toi's von 12 und 24 h zwar zu ähnlich hohen Virusausbeuten, wie sie im Prozess mit einer toi von 0 h erreicht wurden, jedoch war das Maximum des Virustiters um 24 – 48 h verzögert. Eine toi von 6 h

fürte zu gleich hohen Virusausbeuten wie im Standardprozess und auch das Titermaximum wurde nach gleicher Zeit erreicht. Sowohl durch die hohen Ausbeuten und das frühe Titermaximum von etwa 72 h und auch aus technischen Gründen, d. h. auf Grund der Einfachheit des bisherigen Verfahrens mit gleichzeitiger Zelleinsaat und Infektion, wurde das Verfahren mit einer *toi* von 0 h für alle weiteren Versuche favorisiert und angewendet.

Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Allgemein waren die Verbrauchs- und Bildungsraten für die Metabolite in der nicht-infizierten Kontrolle am höchsten (Tabelle 4.-1 und Abbildungen 4.-9 – 4.-12). Hier wurden ca. 5,5 mM Glukose und 2,6 mM Glutamin verbraucht, es entstanden 5,0 mM Laktat und 2,8 mM Ammonium. Daraus ergeben sich die folgenden Werte für die Verbrauchs- und Bildungsraten: $r_{\text{Gluk}} = 0,032 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Lak}} = 0,029 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Gln}} = 0,016 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Amm}} = 0,016 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Bei den Zellen, die bereits nach 0, 6 bzw. 12 h mit MEV infiziert wurden, kam es zu einem deutlichen Einfluss der Infektion auf den Zellstoffwechsel. Es wurden etwa 3,3 mM Glukose und 2,1 mM Glutamin verbraucht und 4,5 mM Laktat bzw. 1,5 mM Ammonium gebildet. Das entspricht folgenden Werten der Verbrauchs- und Bildungsraten: $r_{\text{Gluk}} = 0,017 - 0,020 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Lak}} = 0,021 - 0,027 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Gln}} = 0,009 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und $r_{\text{Amm}} = 0,005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amm/Gln}}$ erreichten Werte von 1,26 – 1,35 bzw. 0,54 – 0,60.

Tabelle 4.-1: Zusammenfassung der Verbrauchs- und Bildungsraten sowie der Ausbeutekoeffizienten für die Vermehrung von MEV in E-FL im Einfachernte-Schema unter Variation der „time of infection“ (*toi*)

Ansatz	r_{Gluk} (mmol · L⁻¹ · h⁻¹)	r_{Lak} (mmol · L⁻¹ · h⁻¹)	$Y_{\text{Lak/Gluk}}$ (-)	r_{Gln} (mmol · L⁻¹ · h⁻¹)	r_{Amm} (mmol · L⁻¹ · h⁻¹)	$Y_{\text{Amm/Gln}}$ (-)
Kontrolle	0,033	0,029	0,97	0,012	0,013	1,07
<i>toi</i> 0 h	0,020	0,027	1,35	0,009	0,005	0,60
<i>toi</i> 6 h	0,017	0,021	1,26	0,009	0,005	0,54
<i>toi</i> 12 h	0,020	0,027	1,34	0,009	0,005	0,58
<i>toi</i> 24 h	0,029	0,035	1,21	0,010	0,008	0,81
<i>toi</i> 36 h	0,033	0,039	1,18	0,011	0,010	0,94
<i>toi</i> 48 h	0,030	0,031	1,03	0,012	0,013	1,06

Anmerkung zu Tabelle 4.-1:

Um die Vergleichbarkeit der Daten zu sichern, wurden alle Verbrauchs- und Bildungsraten sowie die Ausbeutekoeffizienten im Intervall von 0 – 168 h berechnet, unabhängig davon, ob, bedingt durch die Virusinfektion, noch Konzentrationsänderungen (Raten > 0) stattfanden oder nicht. Die gezeigten Daten sind damit als mittlere Werte aufzufassen und zu interpretieren.

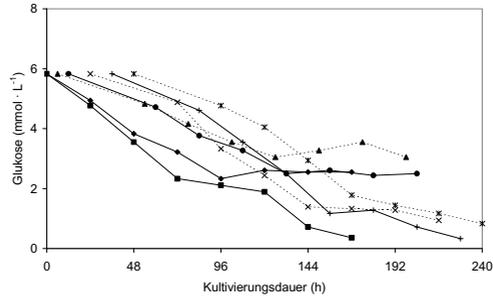


Abbildung 4.-9: Profile der Glukosekonzentrationen für nicht-infizierte und infizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -◆- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h)

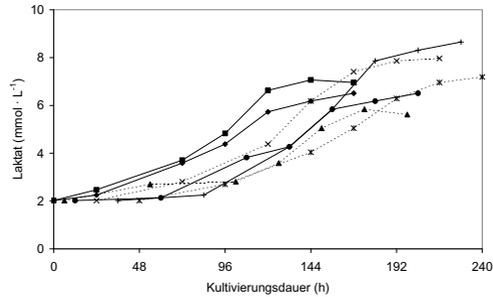


Abbildung 4.-10: Profile der Laktatkonzentrationen für nicht-infizierte und infizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -◆- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h)

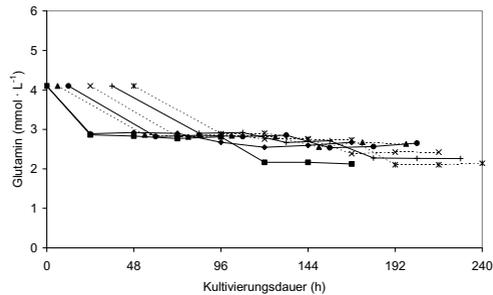


Abbildung 4.-11: Profile der Glutaminkonzentrationen für nicht-infizierte und infizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -◆- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h)

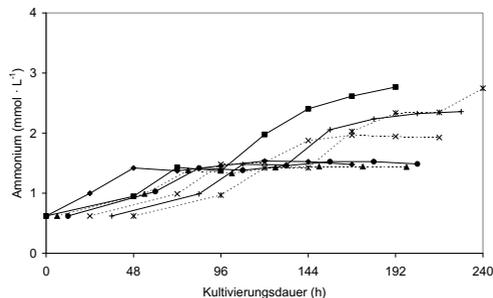


Abbildung 4-12: Profile der Ammoniumkonzentrationen für nicht-infizierte und infizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -◇- toi 0 h, -△- toi 6 h, -●- toi 12 h, -×- toi 24 h, -+- toi 36 h und -* -toi 48 h)

In den Ansätzen, die mit einer hohen t_{oi} von 24, 36 und 48 h infiziert wurden, lagen die Verbrauchs- und Bildungsraten ($r_{\text{Gluk}} = 0,030 - 0,033 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Lak}} = 0,031 - 0,039 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Gln}} = 0,010 - 0,012 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $r_{\text{Amm}} = 0,008 - 0,013 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) auf dem Niveau der nicht-infizierten Kontrolle (Tabelle 4.-1). Auch die Ausbeutekoeffizienten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Bedingt durch die variierte t_{oi} , konnten die Zellen zunächst unbeeinflusst wachsen und die spätere Infektion hatte keinen großen Einfluss auf die Zellkultur mehr. Die Zellen befanden sich zu diesen Zeitpunkten offensichtlich mehrheitlich nicht mehr in der S-Phase des Zellzyklus und waren daher für das MEV nicht mehr ausreichend permissiv.

4.1.3.2 Vermehrung von MEV in Rollerflaschen (850 cm²) im Mehrfachernte-Schema

Nach dem Festlegen der optimalen t_{oi} von 0 h sollte auch in der Rollerflasche als Produktionssystem untersucht werden, welchen Einfluss die Wahl der m_{oi} (0,01 und 0,10) auf Wachstum und Stoffwechsel sowie die Virusausbeute hat. Daher wurde in diesem Versuch der Produktionsprozess mit vier Viruserntes (Medienwechsel 100 % vv) nach 94, 120, 142 und 188 h in einem Mehrfachernte-Schema simuliert. Die erhaltenen Ergebnisse sollen für die späteren Kultivierungen in Microcarriersystemen einen Standard darstellen, an dem die dort erhaltenen Ausbeuten evaluiert werden können.

Ansatz

In drei Rollerflaschen wurden $0,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ inokuliert, direkt mit der Zelleinsaat wurden zwei Rollerflaschen mit MEV in einer *moi* von 0,01 bzw. 0,10 infiziert. Die dritte Rollerflasche wurde nicht infiziert und als Kontrolle mitgeführt.

Zellwachstum

Der Verlauf des Zellwachstums und der Einfluss der MEV-Infektion waren prinzipiell identisch zu den bereits für Gewebekulturflaschen gezeigten Ergebnissen. In der Kontrolle wurde nach ca. 96 h Konfluenz erreicht, wogegen in den infizierten Rollerflaschen der Viruseinfluss bereits nach ca. 24 h p. i. an einem verringerten Zellwachstum und einer veränderten Zellmorphologie, d. h. die Zellen erschienen optisch „schmäler“ (Einfluss der Apoptose), erkennbar war (Bilder hier nicht gezeigt, identisch zu Abbildung 4.-7).

Verlauf der Virusinfektion und der MEV-Ausbeuten

Die unterschiedlich hohe *moi* führte zu einem zeitlich verschobenen Maximum des Virustiters. Im Ansatz mit einer höheren *moi* von 0,10 wurde das Maximum von $10^{6,2} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ bereits nach 72 h p. i., im Ansatz mit einer niedrigeren *moi* von 0,01 wurde der maximale Titer von $10^{5,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ erst nach 96 h p. i. erreicht (Abbildung 4.-13). Nach dem Erreichen des Maximums (1. Virusernte) verblieb der Titer im Ansatz mit einer *moi* von 0,01 bei allen weiteren Virusernten auf etwa diesem Niveau, d. h. es waren noch ausreichend vitale Zellen für die Virusproduktion vorhanden. Im Ansatz mit der höheren *moi* von 0,10 war dagegen in den weiteren Ernten ein stetiger Abfall des Virustiters von jeweils etwa einer log-Stufe zu sehen (entspricht der Verdünnung). Bedingt durch die höhere *moi*, waren in diesem Fall offensichtlich die meisten Zellen bereits nach der ersten Virusernte nach 96 h p. i. nicht mehr vital und standen damit, im Gegensatz zu der langsamer verlaufenden Infektion im Ansatz mit der *moi* von 0,01, nicht mehr für die Neuproduktion von MEV zur Verfügung.

Prinzipiell erscheinen beide *moi*'s als geeignet für eine erfolgreiche Infektion der E-FL mit MEV, die nach Gleichung 2.-28 aufsummierten Ausbeuten lagen auf etwa demselben Niveau ($3,8 \cdot 10^8$ infektiöse Partikel bei *moi* von 0,10 und $4,4 \cdot 10^8$ infektiöse Partikel bei *moi* von 0,01). Die geringen Unterschiede waren nicht signifikant und lagen innerhalb der

Toleranzgrenze des Assays von $\pm 0,3$ log-Stufen. Im Einzelfall sollte aus prozesstechnischen Gründen (Dauer der Infektion aus Sicht einer kostengünstigen Produktion) eine der beiden moi's für die Infektion der Zellen in statischen Systemen ausgewählt werden. Für die Infektion im Microcarrier-System sollten entsprechende Versuche durchgeführt werden; hier ist nicht zwingend von einer Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auszugehen, sondern eher mit einer gewissen Variabilität durch die geänderten Prozessbedingungen zu rechnen.

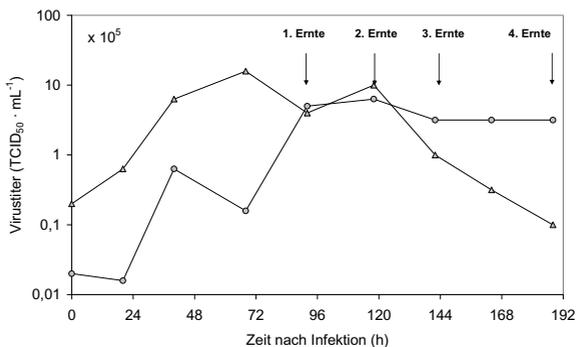


Abbildung 4-13: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) von MEV-infizierten E-FL Kulturen mit einer moi von 0,01 (○) und 0,10 (△) in Rollerflaschen (toi 0 h) mit Mehrfach-Ernteschema

Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

Bis zum ersten Medienwechsel nach 92 h waren kaum Unterschiede in den Konzentrationen zu finden, lediglich in der mit einer moi von 0,10 waren die Glukoseaufnahmerate r_{Gluk} und die Ammoniumfreisetzungsrates r_{Amm} etwas geringer als in den beiden anderen Ansätzen (Abbildungen 4-14 – 4.17). Für die zweite Ernte nach 119 h war in der Rollerflasche mit der moi von 0,10 keine Glukose- und Glutaminaufnahme mehr nachweisbar. Es erfolgte jedoch eine Zunahme der Laktat- und Ammoniumkonzentration, was möglicherweise auf Freisetzung der intrazellulären Pools lysierter Zellen zurückgeführt werden kann. In der Kontrolle waren unverändert hohe Aufnahme- und Bildungsrate zu sehen, wogegen in der Rollerflasche mit einer moi von 0,01 nur noch geringe Konzentrationsänderungen festzustellen waren. Nach der dritten Ernte war in der Kontrolle die metabolische Aktivität weiterhin unverändert hoch, in dem mit einer moi von 0,10 infizierten Ansatz war keine Konzentrationsänderung und im infizierten Ansatz mit einer moi von 0,01 nur noch eine sehr geringe Änderung der Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium festzustellen.

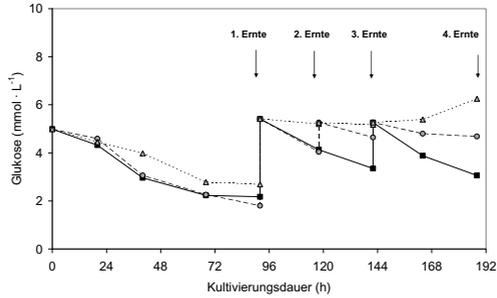


Abbildung 4-14: Profile der Glukosekonzentration für nicht-infizierte und MEV-infizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)

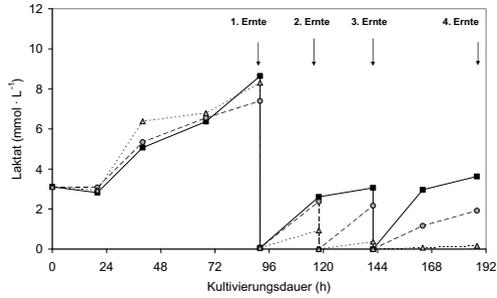


Abbildung 4-15: Profile der Laktatkonzentration für nicht-infizierte und MEV-infizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)

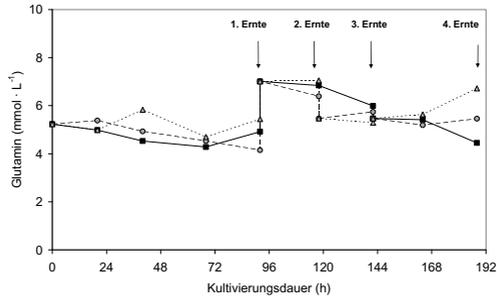


Abbildung 4-16: Profil der Glutaminkonzentration für nicht-infizierte und MEV-infizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)

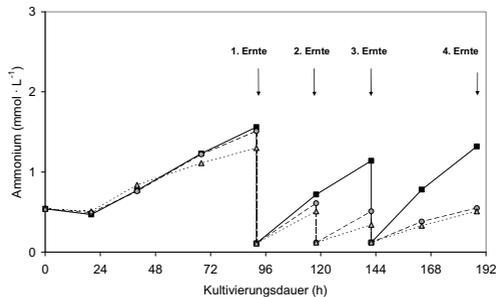


Abbildung 4.-17: Profile der Ammoniumkonzentration für nicht-infierte und MEV-infierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -□- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)

4.1.3.3 Vermehrung von MEV in Rollerflaschen (850 cm²) im Einfachernte-Schema

In diesem Versuch sollte die Virusausbeute, die mit einmaliger Ernte am Ende der Kultivierung erreicht wurde, mit den Ausbeuten nach dem Mehrfachernte-Schema verglichen werden. Es konnte erwartet werden, dass mit dem Einfachernte-Schema zwar ein höherer Maximaltiter, jedoch eine geringere Gesamtvirusausbeute erreicht wird.

Ansatz

Es wurden drei Rollerflaschen mit $0,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ inokuliert, eine Rollerflasche wurde als nicht-infierte Kontrolle mitgeführt. Die beiden anderen Rollerflaschen wurden mit MEV bei einer toi von 0 h und einer moi von 0,01 und 0,10 infiziert. Es wurde täglich Probe genommen und die Zellkulturen auf Veränderungen der Morphologie untersucht. Nach 144 h p. i. wurden die Ansätze geerntet.

Zellwachstum

Die Zellen in der nicht-infierten Kontrollflasche erreichten nach 96 h Konfluenz. In den beiden MEV-infierten Rollerflaschen war bereits nach 24 h p. i. ein deutlicher Einfluss der Virusinfektion im Vergleich zum Kontrollansatz zu sehen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich ein deutlicher CPE analog zu Abbildung 4.-7 rechts. Eine Korrelation zur moi war dabei nicht festzustellen. Nach 144 h p. i. war nahezu keine Zelle mehr an der Oberfläche der Flaschen angeheftet.

Verlauf der Virusinfektion und der MEV-Ausbeuten

In beiden infizierten E-FL Ansätzen kam es 24 h p. i. zu einem Abfall des Virustiters um eine log-Stufe (Abbildung 4-18). Im weiteren Infektionsverlauf stieg der Titer 96 h p. i. bis auf Maximalwerte von $10^{6,6}$ TCID₅₀ · mL⁻¹. Ein Einfluss der moi war dabei weder auf den Zeitpunkt noch auf die Höhe des Maximaltiters festzustellen. Die Werte für den Titerverlauf bis zum Ende der Kultivierung zeigten ein uneinheitliches Bild, was u. U. auf Abweichungen bei der Titration zurückzuführen ist. Nach Erfahrungswerten bzw. nach der Kenntnis der MEV-Stabilität ist jedoch davon auszugehen, dass der Virustiter konstant bleibt bzw. leicht abfällt. Im Vergleich zum Mehrfachernteverfahren wurden signifikant höhere Maximaltiter (+ 0,5 log-Stufen) erreicht. Bei einem Erntezeitpunkt von 96 h p. i. würde man mit diesem Verfahren trotz der einmaligen Ernte eine um Faktor 2 höhere Gesamtvirusausbeute von $8,0 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln erreichen. Aus Gründen, die im Diskussionsteil der Arbeit näher vorgestellt werden, wird im industriellen Prozess jedoch das Mehrfachernte-Verfahren bevorzugt.

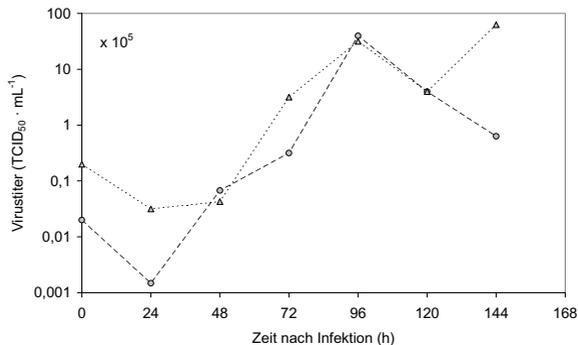


Abbildung 4-18: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) von MEV-infizierten E-FL Kulturen mit einer moi von 0,01 (-o-) und 0,10 (-▲-) in Rollerflaschen (toi 0 h) mit Einfach-Ernteschema

Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium

In den Profilen der Metabolitkonzentrationen (Abbildungen 4.-19 und 4.-20) sind nur geringe Unterschiede zwischen der Kontrolle und den infizierten Ansätzen zu sehen. Diese ohnehin geringen Unterschiede in den Kurvenverläufen relativieren sich weiter bei Betrachtung der Verbrauchs- und Bildungsraten der einzelnen Metabolite und der Yield-Koeffizienten (Tabelle 4.-2). Demnach lagen die Aufnahme- und Bildungsraten für die einzelnen Metabolite auf dem gleichen Level, lediglich bei der Glukoseaufnahme r_{Gluk} und der r_{Amm} war beim Ansatz mit der höchsten m_{oi} ein Abfall zu sehen. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch bei den Yield-Koeffizienten $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amm/Gln}}$. Auch hier lagen die Kontrolle und der Ansatz mit der m_{oi} von 0,01 auf gleichem Niveau, beim Ansatz mit der m_{oi} von 0,10 wurde ein signifikant höherer $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und ein deutlich niedrigerer $Y_{\text{Amm/Gln}}$ von < 1 erreicht.

Tabelle 4-2: Ausgewählte Parameter zum Stoffwechsel von nicht-infizierten und infizierten E-FL in Rollerflaschenkultivierungen

Ansatz	r_{Gluk}^1 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	r_{Lak} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{\text{Lak/Gluk}}$ (-)	r_{Gln} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	r_{Amm} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$Y_{\text{Amm/Gln}}$ (-)
Kontrolle	0,029	0,043	1,45	0,015	0,014	1,02
m_{oi} 0,01	0,029	0,045	1,55	0,011	0,013	1,15
m_{oi} 0,10	0,024	0,043	1,81	0,011	0,010	0,88

¹ Bestimmung aller Parameter im Intervall von 0 – 144 h analog Tabelle 4.-1

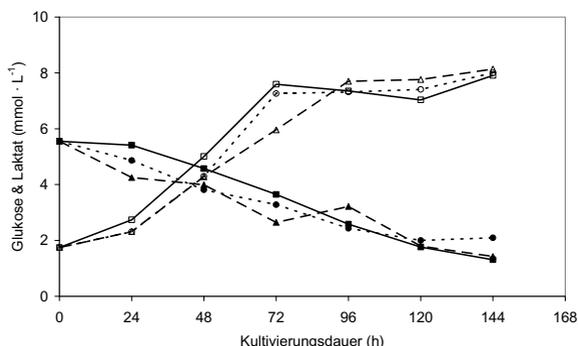


Abbildung 4.-19: Profile der Glukose- (-■- Kontrolle, -▲- m_{oi} 0,01 und -●- m_{oi} 0,10) und Laktatkonzentration (-□- Kontrolle, -○- m_{oi} 0,01 und -△- m_{oi} 0,10) für nicht-infizierte und MEV-infizierte E-FL Zellen in Rollerflaschen mit Einfach-Ernteschema

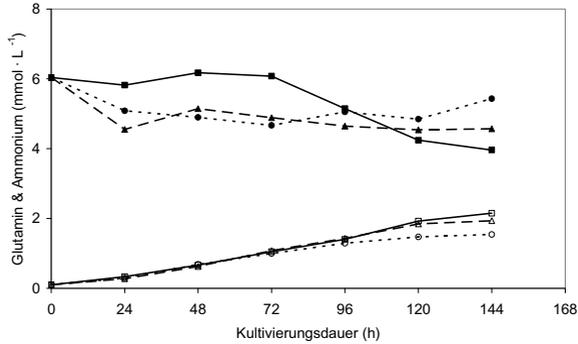


Abbildung 4-20: Profile der Glutamin- (-■- Kontrolle, -▴- moi 0,01 und -●- moi 0,10) und Ammoniumkonzentration (-□- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -△- moi 0,10) für nicht-infizierte und MEV-infizierte E-FL Zellen in Rollerflaschen mit Einfach-Ernteschema

Überraschenderweise deuten diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Beobachtungen des Zellwachstums und der Zellmorphologie darauf hin, dass die mit einer niedrigen moi infizierte E-FL Zellen trotz des Einflusses der Infektion auf das Zellwachstum Stoffwechselleistungen zeigten, die auf dem Niveau einer nicht-infizierten Kontrolle lagen. Im Unterschied dazu war bei einer hohen Infektionsmultiplizität (moi) der Einfluss auf die Stoffwechselleistungen sichtbar, jedoch nicht so stark wie u. U. zu erwarten wäre, d. h. es kam nicht zum vollständigen Erliegen der Stoffwechselaktivität. Unter der Annahme, dass infizierte Zellen, die in den Stoffwechselleistungen kaum Unterschiede zu nicht-infizierten Zellen zeigen, weitestgehend vital sind, legen die Ergebnisse nahe, eher mit einer geringen moi zu infizieren. Dadurch sollte es möglich sein, möglichst lange lebende, und damit für die Virusreplikation kompetente Zellen in der Kultur zu halten.

4.1.4 Zusammenfassung ermittelter Parameter für Wachstum und Stoffwechsel der E-FL sowie die Vermehrung von MEV in statischen Systemen

Zum Vergleich der Ergebnisse der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in statischen Systemen sind relevante Parameter in Tabelle 4.-3 zusammengefasst. Auf die dort gezeigten Parameter soll im Folgenden kurz eingegangen werden, um ihre Bedeutung für den Prozess in der statischen Kultur zu bewerten und daraus Schlussfolgerungen für die geplante Übertragung des Prozesses in Microcarriersysteme zu ziehen.

Tabelle 4.-3: Ausgewählte Parameter zu Wachstum und Stoffwechsel der E-FL und Vermehrung von MEV in Gewebekultur- und Rollerflaschen

Parameter ^{1,2}	Gewebekulturflasche (75 cm ²)	Rollerflaschen (850 cm ²)
maximale flächenbezogene Zellausbeute X_{Amax} (Z · cm ⁻²)	2,0 – 2,6 · 10 ⁵	1,2 – 1,8 · 10 ⁵
maximale volumetrische Zellausbeute X_{Vmax} (Z · mL ⁻¹)	3,0 – 3,9 · 10 ⁵	4,1 – 6,1 · 10 ⁵
μ_{max} (h ⁻¹)	0,016 – 0,018	n. b.
r_{Gluk} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹) ¹	0,028	0,018
	0,020	0,029
q_{Gluk} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	1,90 · 10 ⁻¹⁰ (24 – 96 h p. i.)	n. b.
$Y_{X/S}$ Glukose (Z · mmol ⁻¹)	0,64 · 10 ⁸	n. b.
r_{Lak} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,035	0,026
	0,027	0,045
q_{Lak} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	2,02 · 10 ⁻¹⁰ (24 – 96 h p. i.)	n. b.
$Y_{Lak/Gluk}$ (-)	1,21 – 1,32	1,43 – 1,47
	1,37	1,55
r_{Gln} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,013	0,007
	0,013	0,011
q_{Gln} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	1,11 · 10 ⁻¹⁰ (24 – 96 h p. i.)	n. b.
$Y_{X/S}$ Glutamin (Z · mmol ⁻¹)	1,30 · 10 ⁸	n. b.
r_{Amm} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,014	0,011
	0,009	0,013

Parameter ^{1,2}	Gewebekulturflasche (75 cm ²)	Rollerflaschen (850 cm ²)
q_{Amm} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	8,09 · 10 ⁻¹¹ (24 – 96 h p. i.)	n. b.
$Y_{\text{Amm/Gln}}$ (-)	1,04 – 1,15	1,53
	0,71	1,15
max. Virusausbeute (TCID ₅₀ · mL ⁻¹) ²	Einfachernte: 10 ^{6,5}	Einfachernte: 10 ^{6,6}
	Mehrfachernte: n. b.	Mehrfachernte: 10 ^{5,8}
P_V (Partikel · Zelle)	-	Einfachernte: 15,7
		Mehrfachernte: 8,6
Gesamtvirusausbeute I_{VP} (infektiöse Partikel) ²	-	Einfachernte: 8,0 · 10 ⁸
		Mehrfachernte: 4,4 · 10 ⁸

¹ Aufnahme- und Bildungsraten beziehen sich auf Versuche mit Einfachernteschema und vergleichbarer Kultivierungsdauer und Einsatzzellzahl. Daraus ergibt sich die Vergleichbarkeit der Daten. Für infizierte Kulturen und Rollerflaschen-Kultivierungen können wegen der nicht vorhandenen Daten für die Zellzahlen keine spezifischen Raten angegeben werden.

² Die für die Virusinfektion gezeigten Werte sind grau schattiert und beziehen sich auf Versuche mit einer toi von 0 h und einer moi von 0,01.

Zellwachstum der E-FL in statischen Systemen

Die flächenbezogene Zellausbeute liegt in der Gewebekulturflasche bei einem mittleren Wert von etwa $2,3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ und im Vergleich dazu in der Rollerflasche etwas geringer bei einem mittleren Wert von $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$. Diese Unterschiede sind zum größten Teil nicht durch das Kultivierungssystem bedingt, sondern durch systembedingte Verluste (keine vollständige Entleerung der Rollerflasche möglich, Restvolumen mit Zellen ca. 1 - 2 mL entspricht ca. 10 - 20 % der gesamten Zellen bei der Ernte) beim Ernten der Zellen in der Rollerflasche. Allgemein kann jedoch von leicht geringeren Zellzahlen pro Fläche in der Rollerflasche im Vergleich zur Gewebekulturflasche ausgegangen werden. Ob hierfür neben dem o. g. Verlust durch den Transfer der Zellen weitere Ursachen in Betracht kommen, wurde nicht näher untersucht. Bedingt durch das bessere Verhältnis von zur Verfügung stehender Fläche und verwendetem Volumen an Zellkulturmedium in der Rollerflasche, wird in diesem System eine höhere volumetrische Ausbeute von etwa $5,1 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Vergleich zu $3,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ in der Gewebekulturflasche erreicht. Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} wurde nur in Gewebekulturflaschen bestimmt und erreichte dort einen mittleren Wert von $0,017 \text{ h}^{-1}$. Es wurde davon ausgegangen, dass dieser Wert repräsentativ für das Wachstum der E-FL in statischer Kultur unter Verwendung eines mit 10 % Serum supplementierten Minimalmediums ist. Optimierungen der Zellausbeute bzw. des Zellwachstums in statischen Systemen waren, wie bereits erwähnt, nicht das Ziel der Arbeit.

Dennoch kann eingeschätzt werden, dass durch Medienoptimierungen u. ä. möglicherweise Spielräume für höhere Ausbeuten vorhanden wären.

Stoffwechsel der E-FL in statischen Systemen

Die Parameter zur Charakterisierung des Stoffwechsels zeigen im Vergleich von nicht-infizierten und infizierten Kulturen ein uneinheitliches Bild. Ausgehend von theoretischen Überlegungen würde man einen signifikanten Unterschied in den Aufnahme- und Bildungsraten der einzelnen Metabolite in der Weise erwarten, dass nicht-infizierte Zellen höhere Stoffwechselraten haben als infizierte Zellen. Dieser erwartete Unterschied kann anhand der Ergebnisse nicht dargestellt werden (Tabelle 4.-2). Während in Gewebekulturflaschen in nicht-infizierter Kultur höhere Verbrauchsdaten von Glukose und Glutamin sowie höhere Bildungsraten von Laktat und Ammonium gezeigt werden konnten, wurde in Rollerflaschen ein dem widersprechendes Ergebnis gefunden. Dort liegen die Raten in der infizierten Kultur z. T. höher als in der Kontrolle. Auch aus den Yield-Koeffizienten lassen sich keine Trends zu Unterschieden zwischen Kontrolle und infiziertem Ansatz erkennen. Damit ergibt sich insgesamt auch kein eindeutiges Bild, was den Vergleich der beiden Kultivierungssysteme betrifft. Die Ursachen für diese von den theoretischen Erwartungen abweichenden Resultate können auf Grund der Datenlage nicht näher spezifiziert werden und bleiben damit spekulativer Natur. Als Vergleichswerte für die Bewertung des Stoffwechsels der E-FL in Microcarriersystemen werden die Werte aus den Rollerflaschenkultivierungen herangezogen.

MEV-Vermehrung in statischen Systemen

In den maximal erreichten Virustitern sind keine Unterschiede zwischen beiden statischen Systemen zu sehen. Nach 72 – 96 h p. i werden Titer von ca. $10^{6,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ im Einfachernte-Schema erreicht. Bei Mehrfachernten (vier Ernten) in Rollerflaschen liegen die Maximaltiter mit $10^{5,8}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ signifikant niedriger. Die Gesamtvirusausbeute ist im Einfachernte-Schema mit $8,0 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln pro Ansatz um etwa Faktor 2 höher als im Mehrfachernte-Schema. Aus technischen Gründen (Mischung mehrerer Ernten auf einen mittleren Titer mit ausreichender Immunogenität) kommt im industriellen Einsatz auch weiterhin das Mehrfachernteschema zum Einsatz. Ein Einfluss der moi konnte im Bereich von 0,01 – 0,10 nicht gefunden werden. Ebenso ist sowohl aus Gründen einer einfachen Technologie als auch einer hohen Ausbeute eine t_{oi} von 0 h das Optimum, das auch bei den weiteren Kultivierungen in Microcarriersystemen Anwendung findet.

4.2 Zellkultivierung in Microcarriersystemen im Batch-Betrieb

In orientierenden Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) in Spinnerflaschen (0,5 L-Maßstab) wurde das Wachstum der E-FL auf Cytodex™ 1 Microcarriern untersucht. Auf Grund der positiven Ergebnisse dieser Versuche, der zu erwartenden unproblematischen Zulassung dieser Microcarrier für die Produktion von Veterinärimpfstoffen und aus wirtschaftlichen Gründen wurde entschieden, Cytodex™ 1 Microcarrier für die Entwicklung des Produktionsprozesses zu nutzen. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse im 5 L-Rührreaktor beschrieben und anschließend Ergebnisse für die vergleichende Kultivierung im 1 L-Wave® Bioreaktor dargestellt. Dabei werden Zellwachstum, Stoffwechsel und Sauerstoffaufnahme näher betrachtet.

4.2.1 Microcarrierkultivierungen der E-FL im 5 L-Rührreaktor (Batch-Betrieb) unter Variation der Microcarrierkonzentration und Einsaat-Zellzahl

4.2.1.1 Zellwachstum und –morphologie der E-FL im 5 L-Rührreaktor

In den ersten drei Kultivierungen zur Prozessetablierung im 5 L-Rührreaktor wurden verschiedene Microcarrierkonzentrationen und Einsaat-Zellzahlen im Hinblick auf ein stabiles Zellwachstum und das Erreichen hoher Zellzahlen ($> 1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) untersucht. Die Kultivierungen wurden mit den in Tabelle 4.-4 dargestellten Startbedingungen durchgeführt. Alle weiteren Bedingungen (pH, T, n, ...) wurden konstant gehalten (Kapitel 3.5.3).

Tabelle 4.-4: Startbedingungen für verschiedene E-FL Kultivierungen im 5 L-Maßstab

Kultivierung	Microcarrierkonzentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Einsaat-Zellzahl ($\text{Z} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Besonderheiten
1	1	$1,0 \cdot 10^5$	-
2	2	$1,8 \cdot 10^5$	Zugabe: 15 mM Glukose, $2,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, 0,1 % Pluronic
3	5	$1,2 \cdot 10^5$	90 % Medienwechsel nach 75 h

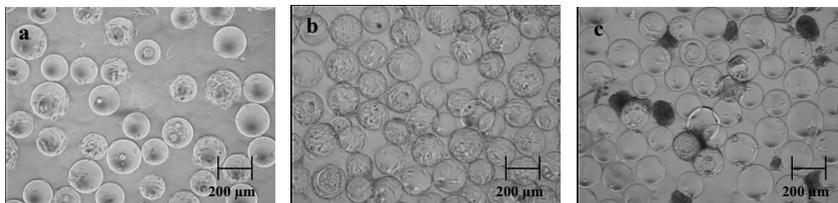


Abbildung 4.-21: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) nach a) 24 h, b) 96 h und c) 144 h bei Batch-Kultivierung 1

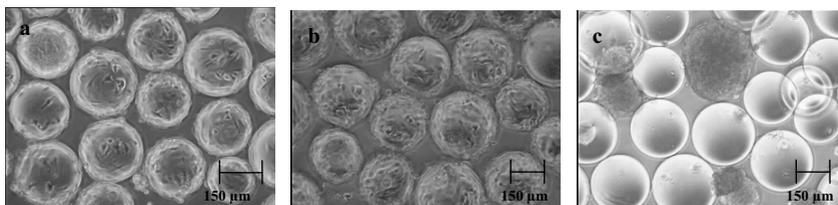


Abbildung 4.-22: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) nach a) 22 h, b) 92 h und c) 120 h bei Batch-Kultivierung 2

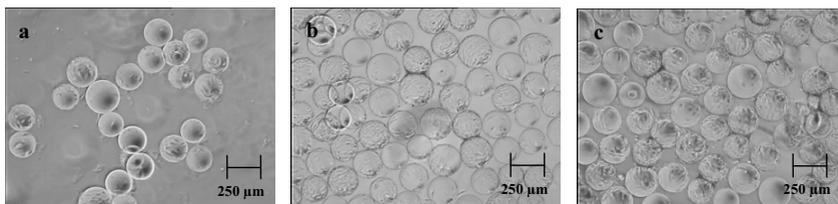


Abbildung 4.-23: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) nach a) 24 h, b) 90 h und c) 168 h bei Batch-Kultivierung 3

Die Verteilung der Zellen auf den Microcarriern 24 h nach der Einsaat war in den drei Kultivierungen sehr unterschiedlich. In Kultivierung 2 erschien die Verteilung optisch am günstigsten; hier waren alle Microcarrier gleichmäßig mit Zellen belegt (Abbildung 4.-22 a). Auch bei Kultivierung 1 war die Belegung der Microcarrier mit Zellen nach 24 h relativ gleichmäßig, wenn auch geringer als bei Kultivierung 2 (Abbildung 4.-21 a). Im Fall von Kultivierung 3 war die Verteilung schlecht; viele Microcarrier waren leer und nur wenige mit ausreichend Zellen belegt (Abbildung 4.-23 a). Auch im weiteren Verlauf der Kultivierung (90 – 96 h) erschien die Kultur 2 hinsichtlich der Belegung der Microcarrier und der Zellmorphologie wesentlich besser als die Ansätze 1 und 3. Die Microcarrier waren hier

nahezu konfluent mit Zellen belegt und es waren keine Agglomerate o. ä. zu erkennen. Im Unterschied dazu waren in den Ansätzen 1 und 3 zu diesem Zeitpunkt noch viele Microcarrier nicht vollständig konfluent und ein relativ großer Anteil von ca. 20 % völlig ohne Zellen. Am Ende der Kultivierung, nach 120 – 168 h, war in den Kultivierungen 1 und 2 ein Ablösen der Zellen von den Microcarriern und die Agglomeration der Zellen zu sehen (Abbildung 4.21 c und 4.22 c). Dieser Effekt trat bei Kultivierung 3, bei der ein Medienwechsel nach 75 h durchgeführt wurde, nicht auf. Möglicherweise waren für die Agglomeration der Zellen toxische Effekte durch Metabolite bzw. Limitierungen an einem oder mehreren Nährstoffen verantwortlich.

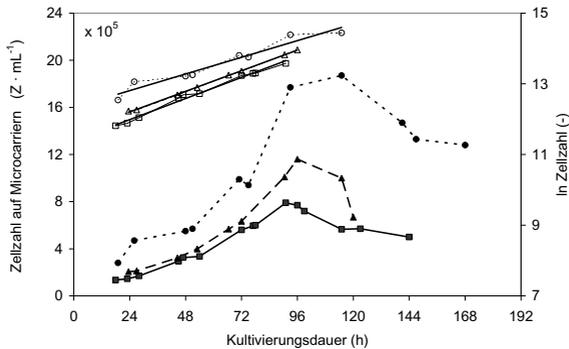


Abbildung 4-24: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahlen von E-FL Zellen im Rührreaktor mit verschiedenen Microcarrier-Startkonzentrationen bei den Batch-Kultivierungen 1 - 3, (-○- Zellzahl 1 mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -△- Zellzahl 2 mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -●- Zellzahl 3 mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -□- ln Zellzahl 1 mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -△- ln Zellzahl 2 mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC und -○- ln Zellzahl 3 mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC)

Die eingesäten Startzellzahlen waren 24 h nach dem Start der Kultivierung in allen drei Kultivierungen als lebende Zellen auf den Microcarriern wieder zu finden (Wiederfindungsrate für Kultivierung 1 und 2 bei 100 %). Teilweise kam es, wie z. B. bei Kultivierung 3, bereits zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl in diesem Zeitraum (Abbildung 4.-24). Im weiteren Kultivierungsverlauf kam es zu einem Wachstum der Zellen bis auf Maximalwerte von $0,9 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei Kultivierung 1 nach 93 h, $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei Kultivierung 2 nach 96 h und $1,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei Kultivierung 3 nach 120 h. Nach dem Erreichen der Maximalzellzahl blieben die Zellzahlen nicht konstant, sondern nahmen in allen drei Ansätzen um ungefähr 25 % ab. Während dieser Phase kam es zur Ausbildung großer Zell-Microcarrier-Agglomerate ($> 0,5 \text{ mm}$ Durchmesser). Die maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{max} wurden nach Gleichung 2.-1 für alle drei Kultivierungen im

exponentiellen Teil der Wachstumsphase (Bereich 24 – 96 h) berechnet (Abbildung 4.-24). Die μ_{\max} -Werte zeigten eine sehr gute Übereinstimmung und lagen im Bereich von $0,022 - 0,025 \text{ h}^{-1}$. Diesen Werten entsprachen Verdopplungszeiten von 28 – 32 h.

4.2.1.2 Sauerstoffaufnahme der E-FL im 5 L-Rührreaktor

Die Sauerstoffaufnahme der E-FL kann anhand der Profile des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (%), der Sauerstoffaufnahme rate OUR ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), der spezifischen Sauerstoffaufnahme rate qO_2 ($\text{mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) charakterisiert werden. Der Sauerstoffpartialdruck wurde für die Kultivierungen 1 – 3, wie in den Kapiteln 2.2.2.4 und 3.9.5 beschrieben, gemessen und daraus die Werte für OUR, qO_2 und T_{O_2} nach den Gleichungen 2.-5 – 2.-7 berechnet (Abbildungen 4.-25 – 4.-27).

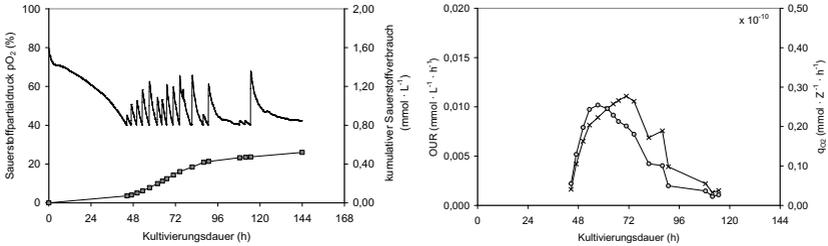


Abbildung 4.-25: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (---) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (-■-) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme rate OUR (-x-) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme rate qO_2 (-o-) für Kultivierung 1 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

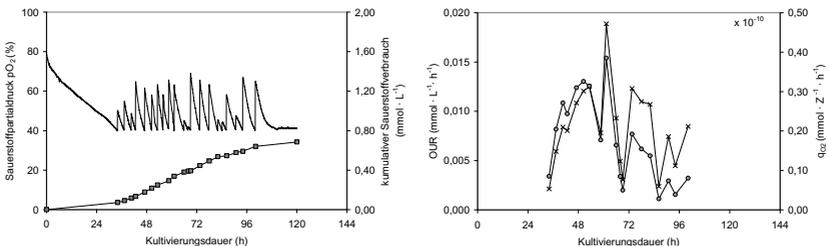


Abbildung 4.-26: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (---) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (-■-) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme rate OUR (-x-) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme rate qO_2 (-o-) für Kultivierung 2 ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L – Maßstab)

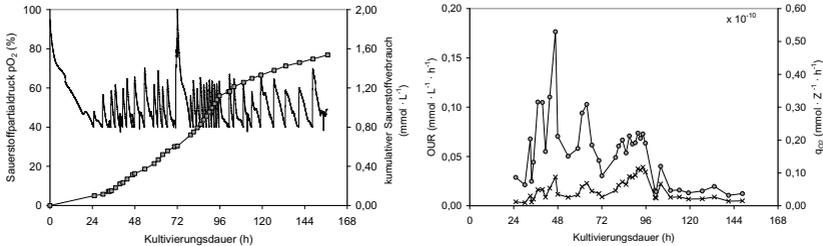


Abbildung 4-27: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 (—) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (—■) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme rate OUR (—x) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme rate q_{O_2} (—●) für Kultivierung 3 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L – Maßstab), Medienwechsel nach 72 h

Ausgehend von Startwerten im Bereich von 80 – 100 % pO_2 war in allen drei Kultivierungen ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks in den ersten 24 h festzustellen. Entsprechend der Einstellung im Prozessleitsystem PCS 7 (Kapitel 3.5.3) wurde bei Unterschreitung eines Schwellenwertes von 40 % pO_2 reiner Sauerstoff zugetaktet. Der Zeitpunkt der ersten Zutaktung war dabei in den drei Kultivierungen unterschiedlich. Bei Kultivierung 1 mit einer geringen Start-Zellzahl von $1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Microcarriern erfolgte die erste Zutaktung nach 48 h Kultivierungsdauer. Die Erhöhung der Startzellzahl auf $1,8 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und eine Carrierkonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ führte bei Kultivierung 2 zu einer ersten Zutaktung bereits nach 36 h Kultivierungsdauer. Für die Kultivierung 3 mit einer Startzellzahl von $1,2 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ war die erste Zutaktung bereits nach 24 h Kultivierungsdauer festzustellen. Ein direkter Zusammenhang zwischen vorhandener Zellzahl und Verlauf des Sauerstoffprofils war in jedem Fall erkennbar. Im weiteren Verlauf der Kultivierung spiegelte sich das Zellwachstum in allen drei Kultivierungen in immer kürzeren Zeitintervallen bei der Zutaktung des Sauerstoffs wider (Abbildung 4-25 – 4-27 links). Zum Ende der Kultivierung waren bei den Kultivierungen 1 und 2 nur geringe Änderungen in der Sauerstoffkonzentration zu sehen. Durch die erreichten höheren Zellzahlen in Kultivierung 3 war der kumulative Sauerstoffverbrauch mit etwa $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ entsprechend höher als in den Kultivierungen 1 und 2 mit Werten von 0,5 bzw. $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4-25 – 4-27 links).

Bei der Betrachtung der Sauerstoffaufnahmeleistungen OUR und der spezifischen Sauerstoffaufnahmeleistungen q_{O_2} war trotz relativ stark schwankender Werte in den Kultivierungen 1 und 2 ein prinzipiell ähnliches Bild zu sehen (Abbildung 4.-25 – 4.27 rechts), Kultivierung 3 zeigte ein dazu abweichendes Bild. Zu Beginn der Kultivierung 1 lagen die Werte für die OUR und q_{O_2} bei $0,005 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $0,10 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Im weiteren Verlauf wurde ein Maximum nach etwa 48 – 72 h mit Werten von $0,010 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die OUR und $0,200 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die q_{O_2} erreicht. Zum Ende der Kultivierung fielen beide Werte wieder auf bzw. unter das Ausgangsniveau zurück. In Kultivierung 2 war ein prinzipiell ähnlicher Kurvenverlauf zu erkennen, die Ausgangswerte für die OUR und die q_{O_2} lagen im selben Bereich wie bei der Kultivierung 1. Das Maximum beider Parameter wurde auch bei Kultivierung 2 nach etwa 48 – 72 h erreicht; allerdings lagen die Werte dabei auf einem deutlich höheren Level (OUR $0,015 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, q_{O_2} $0,300 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Bei der Kultivierung 3 (Medienwechsel nach 72 h) war der für die beiden anderen Kultivierungen typische Kurvenverlauf in deutlich variiert Form zu sehen. Die OUR lag zu Beginn bei sehr niedrigen Werten von etwa $0,001 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und stieg im Verlauf der Kultivierung auf ein Maximum von etwa $0,003 - 0,004 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach 48 h, welches über einen langen Zeitraum (bis etwa 100 h) konstant blieb. Danach war wieder ein Abfall auf das Ausgangsniveau festzustellen. Die spezifische Sauerstoffaufnahmeleistung q_{O_2} erreichte, ausgehend von Werten um $0,200 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, nach 48 h ein Maximum von $0,450 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Danach war für etwa 48 h eine Plateauphase im Bereich von $0,200 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zu erkennen, bevor es, wie auch in den anderen beiden Kultivierungen, zu einem Abfall auf das Ausgangsniveau kam.

4.2.1.3 Stoffwechsel der E-FL im 5 L-Rührreaktor

In den Kultivierungen 1 - 3 wurden unterschiedliche Ausgangsbedingungen hinsichtlich der Medienversorgung der Zellen realisiert. Kultivierung 1 wurde als Batch-Kultivierung mit WM ohne weitere Zusätze durchgeführt. In der Kultivierung 2 wurde dem WM NaHCO_3 zur Erhöhung der Pufferkapazität und Pluronic F 68 zur Verringerung der Wirkung von Scherkräften zugesetzt und die Startkonzentration von Glukose auf $20,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erhöht. Für Kultivierung 3 wurden die gleichen Ausgangsbedingungen wie für Kultivierung 2 realisiert, allerdings ohne Erhöhung der Glukosekonzentration. Stattdessen wurde nach 72 h ein 90 % wv Medienwechsel mit WM durchgeführt.

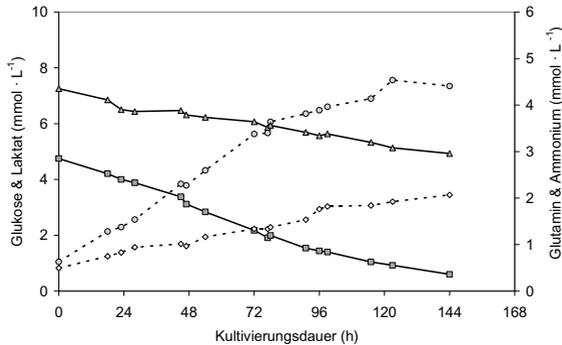


Abbildung 4-28: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (■), Laktat (□), Glutamin (▲) und Ammonium (○) für E-FL Zellen auf ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) bei Kultivierung 1

In der Kultivierung 1 mit einer Microcarrierkonzentration von $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde bis zum Ende der Kultivierung nahezu die gesamte Glukose verbraucht, die Endkonzentration lag hier bei $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-28). Möglicherweise war diese Konzentration bereits nahe an der Limitierung. Die Laktatkonzentration stieg von $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf ein Niveau von $7,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zum Ende der Kultivierung an. Die Konzentration von Glutamin nahm von $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab. Die Endkonzentration von Ammonium lag bei etwa $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Verbrauchs- und Freisetzungsraten für Glukose und Glutamin, die Freisetzungsraten für Laktat und Ammonium sowie die Yield-Koeffizienten $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amn/Gln}}$ sind in Tabelle 4.-5 zusammengefasst dargestellt.

Bei Kultivierung 2 mit einer Microcarrierkonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ führte die Glukose-Supplementierung auf eine Konzentration von $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu einer jederzeit ausreichenden Glukoseversorgung der Zellen (Abbildung 4.-29). Am Ende der Kultivierung nach 120 h war eine Glukosekonzentration von $8,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ festzustellen. Die Laktatkonzentration nahm im Verlauf der Kultivierung von $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $19,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu. Auch für das zweite Substrat, Glutamin, war keine Limitierung festzustellen. Die Konzentration sank hier von $4,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Endkonzentration an Ammonium betrug $2,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Verbrauchs- und Freisetzungsraten der Substrate und Metabolite sowie die Ausbeutekoeffizienten sind in Tabelle 4.-5 dargestellt.

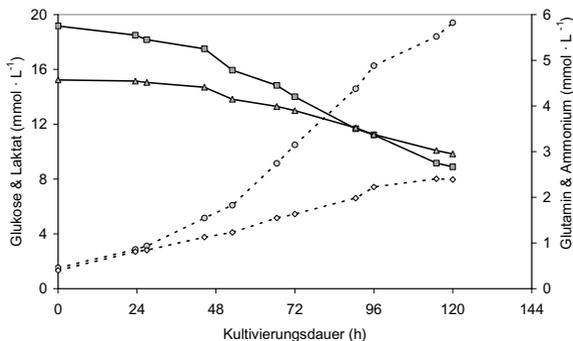


Abbildung 4-29: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (■), Laktat (◐), Glutamin (▲) und Ammonium (◊) für E-FL Zellen (2 g · L⁻¹ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) in Kultivierung 2

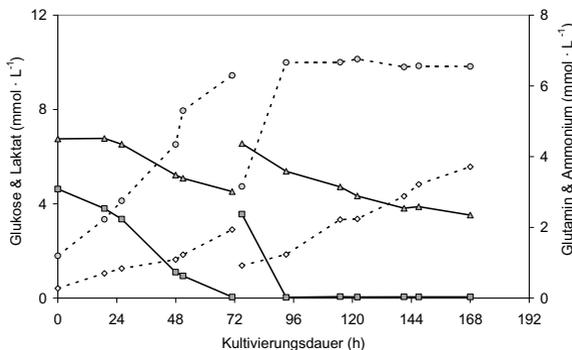


Abbildung 4-30: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (■), Laktat (◐), Glutamin (▲) und Ammonium (◊) für E-FL Zellen (5 g · L⁻¹ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) in Kultivierung 3, Medienwechsel (90 % ww mit WM) nach 72 h

Bei Kultivierung 3 wurde keine höhere Glukosekonzentration vorgelegt, sondern nach 72 h, etwa in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, ein 90 % ww Medienwechsel mit frischem WM durchgeführt. Dadurch standen den Zellen wieder alle Nährstoffe und Substrate, also nicht nur Glukose, zur Verfügung, und die bis zu diesem Zeitpunkt akkumulierten Metabolite wurden aus der Kultur entfernt. Nach 72 h war die Glukosekonzentration auf Werte um 0 mmol · L⁻¹ gesunken; auch die durch den Medienwechsel zugeführte Glukose wurde durch die Zellen innerhalb von 24 h verbraucht (Abbildung 4-30). Die Zellkultur in Kultivierung 3 war somit für einen großen Teil der Kultivierungsdauer glukoselimitiert. Diese Limitierung drückte sich auch im

Laktatkonzentrationsprofil aus. Bei ausreichender Glukoseversorgung stieg die Laktatkonzentration bis auf $9,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, nach dem Erreichen der Glukoselimitierung blieb die Konzentration dann auf diesem Niveau bis zum Ende der Kultivierung. Die Glutaminkonzentration sank bei Kultivierung 3 im ersten Teil der Kultivierung von $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und im zweiten Teil der Kultivierung nach dem Medienwechsel von $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Konzentration von Ammonium stieg in diesen Zeitintervallen auf $2,0$ bzw. $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Die entsprechenden Bildungs- und Verbrauchsraten bzw. Yield-Koeffizienten sind in Tabelle 4.-5 zu finden.

4.2.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für Wachstum und Stoffwechsel der E-FL im 5 L-Rührreaktor

Die Ergebnisse aus den Batch-Kultivierungen 1 - 3 zeigen, dass der Transfer der Kultivierung von E-FL Zellen aus statischen Systemen in ein Cytodex™ 1–Microcarriersystem im Rührreaktor (5 L–Maßstab) erfolgreich verlief (Tabelle 4.-5). Es wurden maximale Zellzahlen von $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Microcarriern und $1,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 erreicht. Für weitere Untersuchungen werden Startbedingungen im Bereich von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 und $1,0 - 2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ als günstig erachtet. Das Erreichen dieser Zellzahlen war jedoch nur durch Supplementierung des WM vor allem mit Glukose bzw. durch einen Medienwechsel möglich. Durch die Supplementierung wurde jedoch ein z. T. kritisches Konzentrationsniveau von Laktat und Ammonium mit Werten $> 20,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht. Damit zeigen sich bereits in diesen Kultivierungen sehr deutlich die Limitationen des verwendeten MEM bei höheren Zellzahlen im Batch-Betrieb.

Tabelle 4.-5: Parameter zum Stoffwechsel der E-FL im 5 L–Rührreaktor in Batch-Kultivierung 1 - 3

Parameter	Kultivierung 1	Kultivierung 2	Kultivierung 3
$r_{\text{Gluk}} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0,029	0,086	0,065 (0 – 72 h)
$r_{\text{Lak}} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0,044	0,149	0,108 (0 – 72 h)
$Y_{\text{Gluk/Lak}} (-)$	1,52	1,74	1,74 (0 – 72 h)
$r_{\text{Gln}} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0,010	0,014	0,021 (0 – 168 h)
$r_{\text{Amm}} (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0,011	0,017	0,023 (0 – 72 h) und 0,029 (72 – 168 h)
$Y_{\text{Amm/Gln}} (-)$	1,13	1,22	1,10 (0 - 72 h) und 1,38 (72 - 168 h)

4.2.2 Transfer des Kultivierungsverfahrens vom 5 L-Rührreaktor in den Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) im Batch-Betrieb

Das geplante industrielle Kultivierungsverfahren für E-FL zur Herstellung einer MEV-Vakzine sollte auf der Verwendung von Wave® Bioreaktoren im 100 L-Maßstab basieren. Daher wurde versucht, die Erfahrungen aus den Kultivierungen 1 - 3 im 5 L-Rührreaktor auf den Wave® Bioreaktor zunächst im 1 L-Maßstab zu übertragen. Das Ziel war es, ein stabiles Zellwachstum mit Zellzahlen um $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Wave® Bioreaktor als Ausgangspunkt für den Scale Up (10 L) und die Versuche zur Infektion der E-FL mit MEV zu zeigen. Der Reaktor wurde mit 1 L wv WM befüllt und mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 Microcarriern und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ gestartet. Die weiteren Kultivierungsbedingungen für den Wave® Bioreaktor wurden, wie im Kapitel 3.5.4 beschrieben, eingestellt.

4.2.2.1 Zellwachstum und -morphologie von E-FL im 1 L-Wave® Bioreaktor

Die Anheftung und Verteilung der E-FL auf den Microcarriern war ca. 24 h nach der Einsaat als sehr gut zu beurteilen, alle Microcarrier waren mit Zellen belegt (Abbildung 4.-31 links). Zu diesem Zeitpunkt lag die Zellzahl bei $1,3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies entsprach einer Wiederfindungs-Rate von 65 % (Abbildung 4.-32). Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Zellzahl bis auf ein Niveau von $9,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 115 h Kultivierungsdauer zu, alle Microcarrier waren zu diesem Zeitpunkt konfluent mit Zellen belegt (Abbildung 4.-31 rechts). Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} im Wave® Bioreaktor betrug für den Zeitraum von 24 – 96 h (exponentielle Phase) $0,021 \text{ h}^{-1}$ (Abbildung 4.-32).

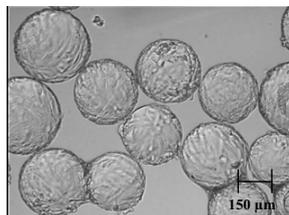
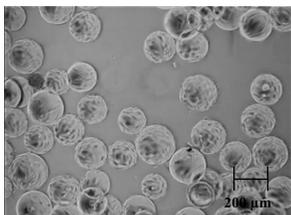


Abbildung 4.-31: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) nach (links) 20 h und (rechts) 123 h bei Kultivierung 4

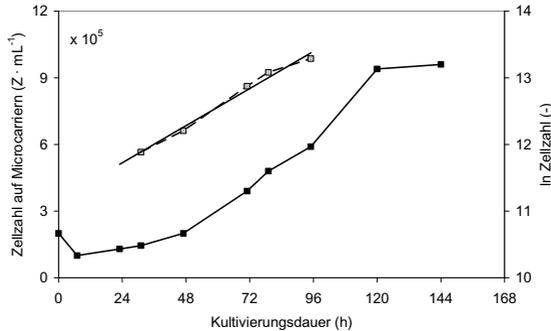


Abbildung 4-32: Lebendzellzahlen von E-FL Zellen im 1 L-Wave® Bioreaktor bei Kultivierung 4, -■- Zellzahl und -□- \ln der Zellzahl

4.2.2.2 Stoffwechsel von E-FL im 1 L-Wave® Bioreaktor

Bei der Kultivierung 5 im 1 L Wave® Bioreaktor war während der Kultivierung keine Glukoselimitierung festzustellen (Abbildung 4-33). Ausgehend von einer Glukosestartkonzentration von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, sank diese auf Werte um $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung. Die Laktatkonzentration stieg im selben Zeitraum auf $9,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Für die Glukoseverbrauchsrate r_{Gluk} und die Laktatfreisetzungsrates r_{Lak} ergaben sich damit Werte von $0,030 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $0,051 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ betrug bei dieser Kultivierung 1,69. Bei Kultivierung 4 kam es irrtümlich durch eine zusätzliche Glutaminzugabe zu einer im Vergleich zu typischen Startwerten höheren Glutaminstartkonzentration von $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Mit einer r_{Gln} von $0,011 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ lag die Endkonzentration bei $4,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4-33). Für Ammonium wurde eine Endkonzentration von $1,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt, die Freisetzungsrates r_{Amm} lag bei $0,008 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Damit ergab sich der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ zu 0,73.

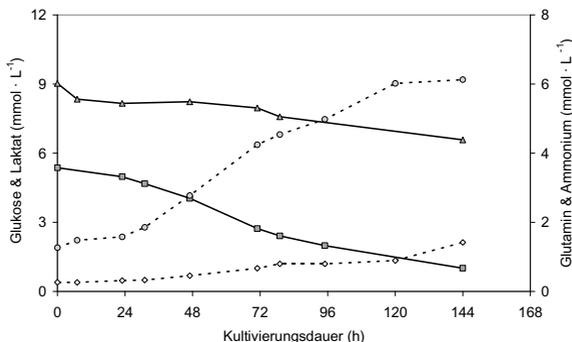


Abbildung 4-33: Profile der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-▲-) und (-◆-) Ammonium für E-FL Zellen bei Kultivierung 4 im 1 L Wave® Bioreaktor

4.2.3 Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme für E-FL im Batch-Betrieb

In Tabelle 4-6 sind vergleichend relevante Parameter zur Kultivierung der E-FL in Microcarriersystemen im Rührreaktor (5 L-Maßstab) und im Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) dargestellt. Dabei wurden zwei Kultivierungen (Kultivierung 2 und 4) ausgewählt, welche als repräsentativ für das jeweilige Reaktorsystem angesehen werden können und mit den gleichen Konzentrationen für Microcarrier und Zellen ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) gestartet wurden. Im Folgenden soll auf die dort gezeigten Parameter eingegangen werden, um ihre Bedeutung für den Transfer des Prozesses von der statischen Kultur in Microcarriersysteme zu bewerten und daraus Schlussfolgerungen für die geplanten weiteren Entwicklungs- und Optimierungsschritte des Prozesses abzuleiten, die dann auch auf die Entwicklung eines Infektionsverfahrens mit MEV und die Verwendung von Repeated-Batch- und Perfusionsstrategien abzielen. Die Zellausbeute zeigte keine Unterschiede in den beiden untersuchten Systemen (Tabelle 4-6). Es wurden reproduzierbar Zellzahlen im Bereich von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit guter Verteilung der Zellen auf den Microcarriern erreicht. Damit konnten die Größen von E-FL Zellen und die Berechnungen zu theoretisch erreichbaren Zellzahlen bei $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 aus Kapitel 3.9.2 bestätigt werden. Diese Zellausbeuten im Batch-Betrieb sind Grundlage für die Durchführung von Experimenten zur Vermehrung von MEV in E-FL-Microcarriersystemen.

Tabelle 4.-6: Ausgewählte Parameter zu Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Cytodex™ 1 Microcarriersystemen im Rührreaktor (5 L-Maßstab) und Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab)

Parameter	Kultivierung 2 5 L-Rührreaktor	Kultivierung 4 1 L-Wave® Bioreaktor
maximale flächenbezogene Zellausbeute $X_{Amax} (Z \cdot cm^{-2})$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
maximale volumetrische Zellausbeute $X_{Vmax} (Z \cdot mL^{-1})$	$11,6 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^5$
$\mu_{max} (h^{-1})$	0,024	0,021
$r_{Gluk} (mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})^1$	0,088	0,030
$q_{Gluk} (mmol \cdot Z^{-1} \cdot h^{-1})$	$1,06 \cdot 10^{-10}$ (24 – 96 h)	$4,98 \cdot 10^{-11}$ (24 – 96 h)
$Y_{X/S} \text{ Glukose} (Z \cdot mmol^{-1})$	$0,9 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
$r_{Lak} (mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	0,149	0,051
$q_{Lak} (mmol \cdot Z^{-1} \cdot h^{-1})$	$2,60 \cdot 10^{-10}$ (24 – 96 h)	$9,17 \cdot 10^{-11}$ (24 – 96 h)
$Y_{Lak/Gluk} (-)$	1,74	1,69
$r_{Gln} (mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	0,014	0,011
$q_{Gln} (mmol \cdot Z^{-1} \cdot h^{-1})$	$2,36 \cdot 10^{-10}$ (24 - 96 h)	$2,98 \cdot 10^{-11}$ (24 – 120 h)
$Y_{X/S} \text{ Glutamin} (Z \cdot mmol^{-1})$	$5,9 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^8$
$r_{Amm} (mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	0,017	0,008
$q_{Amm} (mmol \cdot Z^{-1} \cdot h^{-1})$	$2,91 \cdot 10^{-10}$ (24 - 96 h)	$7,97 \cdot 10^{-12}$ (24 – 120 h)
$Y_{Amm/Gln} (-)$	1,22	0,73

Die zum Erreichen dieser Zellzahlen realisierten Stoffwechselleistungen waren in den beiden Kultivierungssystemen unterschiedlich. Die Aufnahme- und Bildungsraten für die Metabolite lagen im Wave® Bioreaktor um Faktor 5 niedriger als im Rührreaktor. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{Lak/Gluk}$ lagen bei den Kultivierungen, unabhängig vom Kultivierungssystem, im Bereich von 1,64 – 1,74. Beim Ausbeutekoeffizienten $Y_{Amm/Gln}$ gab es Abweichungen: im Rührreaktor waren Werte von 1,22 – 1,24 zu finden, im Wave®

Bioreaktor hingegen wurden Werte von 0,73 berechnet. Hier ist ein Austragungseffekt von flüchtigem Ammonium durch die permanente Begasung denkbar. Dieser Effekt wurde in der Arbeit jedoch nicht quantifiziert. Der Verlauf der Ammonium-Konzentration im Wave[®] Bioreaktor ist daher möglicherweise im Vergleich zum Rührreaktor prinzipiell fehlerbehaftet.

4.3 Optimierung des Prozesses durch Einsatz von Perfusionsverfahren

Die Kultivierung tierischer Zellen in Perfusions-Betrieb, also mit kontinuierlicher Medienzuführung unter Rückhaltung der Zellen, führt in vielen Fällen zu einer Erhöhung der Zellausbeute und damit zur Optimierung des Kultivierungsverfahrens. In dem in dieser Arbeit untersuchten System E-FL / MEV bietet sich das bereits verwendete Mehrfachernte-Schema für eine weitere Optimierung hin zu einem kontinuierlichen Produktionsverfahren an. Zur Optimierung der Zellvermehrung wurden drei Versuche im 0,5 L-Rührreaktor (Sixfors, Infors AG, CH) unter Verwendung des in dieser Arbeit selbst entwickelten Perfusionsmoduls (Kapitel 3.8.1 und 3.8.2) durchgeführt. Die prinzipielle Eignung des verwendeten Reaktorsystems Sixfors zur Kultivierung von E-FL Zellen auf Microcarriern wurde in Vorversuchen bestätigt (Daten nicht gezeigt). In den im Folgenden gezeigten Versuchen zur Optimierung des Verfahrens durch Perfusion (Perfusionsversuch I – III) wurde die Startkonzentration der Microcarrier und der Zellen variiert. Hinweise auf zu verwendende Perfusionsraten ergaben sich aus den in den Batch-Versuchen ermittelten Verbrauchsdaten von Glukose und Glutamin (Tabelle 4.-5 und 4.-6). In einem weiteren Perfusionsversuch IV sollte dann das Perfusionsverfahren aus dem Rührreaktor in den 1 L-Wave[®] Bioreaktor als möglichem späteren produktionsnahen System übertragen werden.

4.3.1 Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch I (0,5 L-Rührreaktor)

In diesem ersten Versuch zur Kultivierung der E-FL unter Perfusionsbedingungen wurden die Startwerte für Microcarrierkonzentration und Zellzahl mit Werten von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und $1,8 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nahe an den als Optimum im Batch-Betrieb ermittelten Werten von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ gewählt. Zum direkten Vergleich wurden zwei Reaktoren (0,45 L wv) unter gleichen Bedingungen gestartet und betrieben, Reaktor 1 wurde als Kontrolle im Batch Betrieb geführt und bei Reaktor 2 wurde nach 48 h die Perfusion mit einer Perfusionsrate von $340 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,75 \text{ RV d}^{-1}$) gestartet. Als Perfusionsmedium wurde WM mit folgenden

Startkonzentrationen verwendet: Glukose $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Kultivierung in beiden Reaktoren wurde nach insgesamt 261 h Dauer, davon 213 h unter Perfusions-Betrieb, auf Grund des limitierten Volumens der Medienvorlage (3 L) beendet. Der Reaktorinhalt wurde damit etwa 6,5-mal ausgetauscht.

4.3.1.1 Zellwachstum und -morphologie der E-FL im Perfusionsversuch I

Das Wachstum der E-FL verlief bis 96 h in beiden Reaktoren identisch, die Anheftung und Morphologie der Zellen zeigte keine Unterschiede zu vorangegangenen Versuchen im Batch-Betrieb im größeren Maßstab. Nach dieser Zeit kam es offensichtlich im Reaktor 1 im Batch-Betrieb zu Limitierungen bzw. toxischen Einflüssen von Metaboliten, so dass sich hier das auch in früheren Batch-Versuchen beobachtete Bild der Ablösung der Zellen von den Microcarriern und die Bildung größerer Agglomerationen im Überstand bzw. teilweise noch an den Carriern anhaftender Agglomerate zeigte (Abbildung 4.-34 links). Dieser Effekt war im Reaktor 2, der ab 48 h unter Perfusions-Betrieb lief, nicht zu beobachten; hier waren die Microcarrier weiter konfluent mit Zellen belegt und es konnte keine Ablösung gesehen werden (Abbildung 4.-34 rechts). Dieses Bild im Reaktor 2 änderte sich bis zum Ende der Kultivierung nach 261 h nicht, im Reaktor 1 war zum Ende der Kultivierung ein völliges Ablösen der Zellen von den Carriern und die Ausbildung großer Zellagglomerate (bis 0,5 mm) zu sehen.

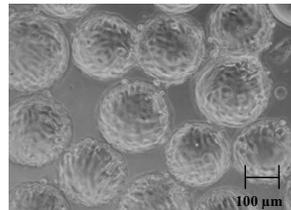
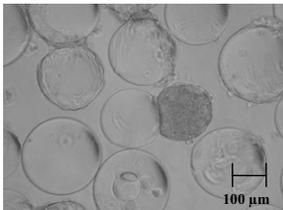


Abbildung 4.-34: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL (links) im Batch-Betrieb nach 144 h und (rechts) im Perfusions-Betrieb nach 144 h Kultivierungsdauer bei Perfusionsversuch I



Abbildung 4.-35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der E-FL auf Cytodex™ 1 von einer Probe aus Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 144 h Kultivierungsdauer bei Perfusionsversuch I

Zur besseren Analyse der Zellmorphologie und der Anheftung der Zellen auf den Microcarriern wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von E-FL aus einer Probe aus Reaktor 2 nach 144 h Kultivierung angefertigt. Diese Aufnahmen illustrieren die dichte Belegung der Microcarrier-Oberfläche mit Zellen, die Morphologie der Zellen und die typische Ausbildung von „Carrier-Brücken“ durch agglomerierende Zellen im späteren Stadium der Kultivierung bei höheren Zellzahlen (Abbildung 4.-35). Die Zellzahlen nach 24 h lagen in beiden Reaktoren bei etwa $1,8 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit betrug die Wiederfindungs-Rate 100 % (Abbildung 4.-36). Im weiteren Verlauf der Kultivierung stieg die Zellzahl in beiden Reaktoren bis auf ein Maximum von $8,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) und $1,1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 96 h. Im Reaktor 1 war danach, korrespondierend zum mikroskopischen Bild (Abbildung 4.-34 links), ein Abfall der Lebendzellzahl bis auf Werte von $1,0 - 3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ ab einer Kultivierungsdauer von 150 h festzustellen. Im Gegensatz dazu blieb die Zellzahl im Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) bis zum Ende der Kultivierung mit Schwankungen im Bereich von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eine weitere Zunahme der Zellzahl war auf Grund der Flächenlimitierung durch die Microcarrierkonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nicht zu erwarten. Die erreichte Zellzahl von $1,1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ stellte auch nach den theoretischen Berechnungen (Kapitel 3.9.2) unter diesen Bedingungen das Maximum dar. Damit zeigte sich eindeutig ein positiver Effekt der Perfusion sowohl auf die Zellausbeute als auch auf die Morphologie der E-FL über einen längeren Zeitraum.

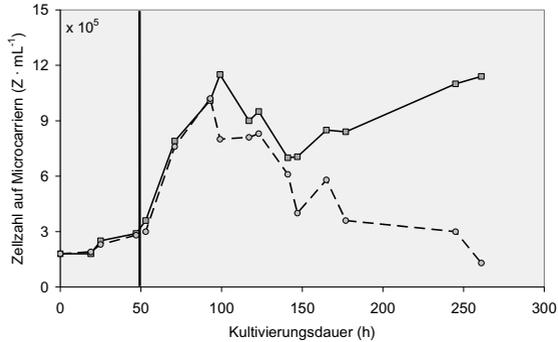


Abbildung 4-36: Lebendzellzahl für die Kultivierung im Reaktor 1 (—•— Batch-Betrieb) und Reaktor 2 (—■— Perfuisions-Betrieb) bei Perfuisionsversuch I ($0,45 \text{ L ww}$, $0,75 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfuisions-Betriebes

4.3.1.2 Stoffwechsel der E-FL im Perfuisionsversuch I

Die Glukosekonzentration im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) sank von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf 0 nach einer Kultivierungsdauer von ca. 100 h (Abbildung 4.-37). Damit war die Zellkultur im Reaktor 1 nach dieser Zeit glukoselimitiert. Die beobachteten Effekte im mikroskopischen Bild und das Sinken der Zellzahl können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf diese Limitierung zurückgeführt werden. Im Reaktor 2 sank die Glukosekonzentration von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 48 h. Während der Phase der Perfusion (48. - 261. Kultivierungsstunde) bewegte sich die Glukosekonzentration in Reaktor 2 im Bereich von $3,0 - 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, die Kultur war damit zu jedem Zeitpunkt ausreichend mit Glukose versorgt. Im Reaktor 1 stieg die Laktatkonzentration bis zum Zeitpunkt der Glukoselimitierung (ca. 100 h) auf $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Im Gegensatz dazu wurde sie im Reaktor 2 auf dem Niveau von $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gehalten, bei dem die Perfusion gestartet wurde. In der Phase der Glukoselimitierung fiel die Laktatkonzentration im Reaktor 1 dann leicht bis zum Ende der Kultivierung auf $8,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab (Abbildung 4.-37).

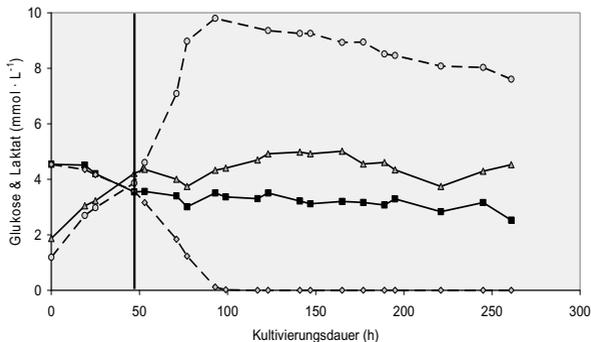


Abbildung 4-37: Profile der Konzentrationen von Glukose (—○— Batch Reaktor 1 und —■— Perfusion Reaktor 2) und Laktat (---○--- Batch Reaktor 1 und ---▲--- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch I (0,5 L-Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes

Die Konzentration von Glutamin sank im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) bis zur Phase der Glukoselimitierung nach ca. 96 h von $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-38). Im weiteren Verlauf der Kultivierung war eine Abnahme der Glutaminkonzentration in Reaktor 1 bis auf $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 261 h zu verzeichnen. Im Reaktor 2 erfolgte bis zum Start der Perfusion nach 48 h ein leichter Abfall der Glutaminkonzentration von $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Danach blieb die Konzentration über die gesamte Kultivierungsdauer durch die permanente Zufuhr von WM konstant in einem Bereich von $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-38). Die Konzentration von Ammonium stieg in Reaktor 1 kontinuierlich von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung (Abbildung 4.-38) an. Durch den permanenten Medien austausch im Reaktor 2 konnte die Ammonium-Konzentration hier auf einem signifikant niedrigeren Niveau von $0,8 - 1,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gehalten werden, lediglich zum Ende der Kultivierung hin war ein leichter Anstieg auf $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ festzustellen. Insgesamt gesehen konnte durch die Perfusion in Reaktor 2 eine Limitierung der Substrate, besonders Glukose, und eine Akkumulation der Metabolite Laktat und Ammonium vermieden werden. Dies traf möglicherweise auch auf weitere, nicht quantifizierte Substanzen zu und führte zu den geringfügig höheren Zellausbeuten bei gleichzeitig deutlich verbesserter Morphologie der Zellen im Perfusions-Reaktor.

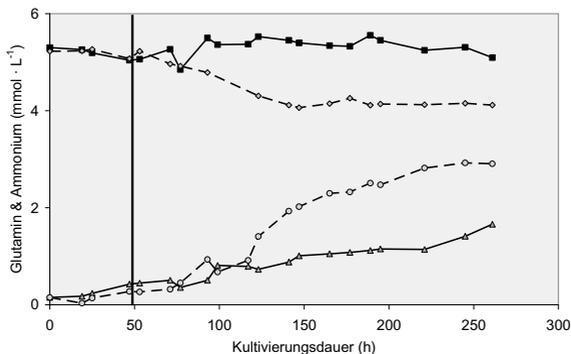


Abbildung 4-38: Profile der Konzentrationen von Glutamin (○- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Ammonium (○- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch I (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes

4.3.2 Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch II (0,5 L-Rührreaktor)

Durch Erhöhung der Microcarrierkonzentration auf $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und der Einsaatzellzahl auf $4,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ sollte untersucht werden, ob damit eine Steigerung der Zellausbeute möglich ist. Nach theoretischen Überlegungen zum Flächenbedarf der E-FL (Kapitel 3.9.2) sollten damit Zellzahlen im Bereich von $2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreichbar sein. Durch das gleich bleibende Verhältnis Microcarrierkonzentration zu Einsaat-Zellzahl sollten optimale Bedingungen für Anheftung und Wachstum der Zellen gewährleistet werden. Es wurden zwei Reaktoren (0,45 L wv) unter gleichen Bedingungen betrieben, Reaktor 1 wurde als Kontrolle im Batch-Betrieb geführt, bei Reaktor 2 wurde nach 48 h die Perfusion mit einer Perfusionsrate von $400 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,90 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) gestartet. Da auf Grund der höheren Microcarrier- und Zellkonzentration höhere Zellzahlen erwartet werden konnten, wurde die Perfusionsrate unter Annahme etwa gleicher Substrataufnahmeraten der Zellen im Vergleich zum Perfusionsversuch I mit $0,75 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ gewählt. Als Perfusionsmedium wurde WM mit folgenden Startkonzentrationen verwendet: Glukose $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Kultivierung in beiden Reaktoren wurde nach insgesamt 325 h Dauer, davon 277 h unter Perfusions-Betrieb, auf Grund des limitierten Volumens der Medienvorlage (5 L) beendet. Der Reaktorinhalt wurde damit insgesamt 11-mal ausgetauscht.

4.3.2.1 Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch II

Nach 24 h Kultivierung lag die Zellzahl auf Microcarriern in beiden Reaktoren bei ca. $2,3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit betrug die Wiederfindungs-Rate trotz theoretisch gleicher Ausgangsverhältnisse (Microcarrierkonzentration, Einsaat-Zellzahl) lediglich 58 % im Vergleich zu 100 % im Perfusionsversuch I (Abbildung 4.-40). Im mikroskopischen Bild konnte die suboptimale Anheftung der Zellen bestätigt werden (Abbildung 4.-39 oben links und unten links). Ein Teil der Microcarrier in beiden Reaktoren war nach 48 h Stunden 50 % konfluent mit Zellen belegt; allerdings waren viele Microcarrier leer bzw. nur mit wenigen Zellen besetzt. Da von den E-FL Zellen nicht beobachtet wurde, dass im Lauf der Kultivierung ein Transfer von Zellen zwischen Microcarriern erfolgt, war zu erwarten, dass die Maximalzellzahl nicht im theoretisch erwarteten Bereich liegen würde. Das Maximum der Zellzahl im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) wurde nach 96 h mit $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht, im Reaktor 2, in dem nach 48 h die Perfusion mit einer Perfusionsrate von $0,90 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ gestartet wurde, lag die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt mit $8,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ knapp darunter. Im weiteren Verlauf der Kultivierung (96. – 325. h) nahm die Zellzahl im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) langsam auf Werte von $4,0 - 7,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ ab. Dazu korrespondierend ist die mikroskopische Aufnahme der Zellkultur im Reaktor 1 nach ca. 250 h Kultivierung zu sehen; einige Microcarrier waren ungleichmäßig mit Zellen besetzt, andere hingegen völlig leer (Abbildung 4.-39 oben rechts). Im Gegensatz zu Reaktor 1 war im Reaktor 2 in Perfusions-Betrieb ein weiterer Anstieg der Zellzahl bis auf ein Maximum von $1,4 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 270 h Kultivierung zu verzeichnen. Im mikroskopischen Bild waren 100 % konfluente Carrier mit Ausbildung von „Carrierbrücken“, also typischen Zeichen einer E-FL Zellkultur am Maximum der erreichbaren Zellausbeute, zu sehen (Abbildung 4.-39 unten rechts). Allerdings war auch hier wieder ein relativ großer Teil der Carrier (ca. 20 %) nicht mit Zellen belegt. Der Perfusions-Betrieb des Reaktors 2 zeigte somit auch in diesem Versuch signifikant höhere Zellausbeute und eine deutlich verbesserte Morphologie der Zellen im Vergleich zur Kontrolle im Batch-Reaktor 1. Auch im Vergleich zum Reaktor 2 im Perfusionsversuch I mit geringerer Microcarrierkonzentration war eine leichte Zunahme der Zellausbeute zu sehen. Dennoch führte die nicht optimale Anheftung und Verteilung der Zellen zu Beginn der Kultivierung letztlich nicht zu den theoretisch möglichen Zellausbeuten. Eine Ursache für die nicht optimale Zellverteilung ist nicht eindeutig festzustellen. Denkbar wäre jedoch eine Agglomerationen der Zellen beim Transfer von der Rollerflasche in den Rührreaktor.

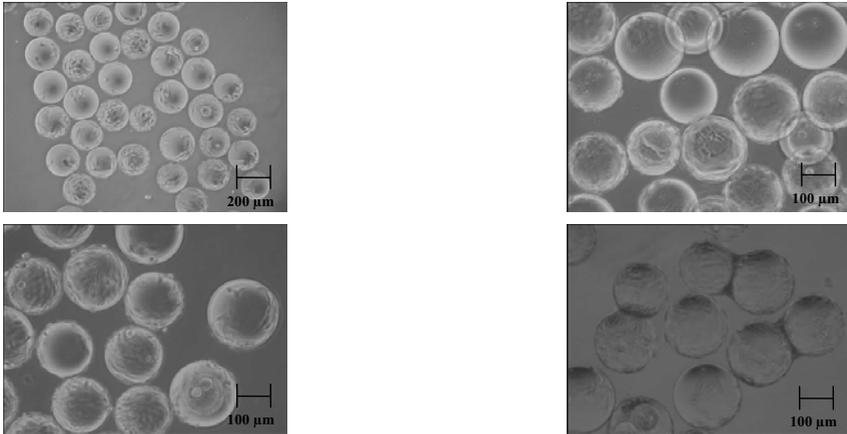


Abbildung 4-39: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL (oben links) Reaktor 1 (Batch-Betrieb) nach 48 h, (oben rechts) Reaktor 1 (Batch-Betrieb) nach 250 h, (unten links) Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 48 h und (unten rechts) Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 270 h bei Perfusionsversuch II

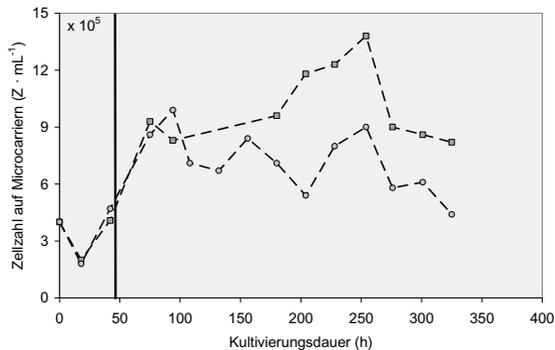


Abbildung 4-40: Lebendzellzahl für die Kultivierung im Reaktor 1 (○- Batch-Betrieb) und Reaktor 2 (■- Perfusions-Betrieb) bei Perfusionsversuch II (450 mL ww , $0,90 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes

4.3.2.2 Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch II

Die Glukosekonzentration nahm im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) von anfänglich $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach einer Kultivierungsdauer von 96 h ab (Abbildung 4-41). Die Zellkultur im Reaktor 1 war somit, wie auch bereits im Reaktor 1 des Perfusionsversuches I, ab dieser

Zeit glukoselimitiert. Auch in dieser Kultivierung war nach 96 h im Reaktor 1 ein Abfall der Zellzahl auf den Microcarriern zu sehen, der sehr wahrscheinlich mit dieser Limitierung zusammenhängt. Im Reaktor 2 sank die Glukosekonzentration von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 48 h. Durch die Perfusion (48. - 325. Kultivierungsstunde) wurde in Reaktor 2 eine Konstanz der Glukosekonzentration im Bereich von $2,5 - 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gewährleistet (Abbildung 4.-41), die Zellen waren damit zu jedem Zeitpunkt ausreichend mit Glukose versorgt. Der Verlauf der Laktatkonzentration war auch in diesem Versuch von der Betriebsweise des Reaktors abhängig. Während im Reaktor 1 die Laktatkonzentration bis zur Phase Glukoselimitierung auf $8,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ stieg, wurde diese im Reaktor 2 nach dem Start der Perfusion auf einem Niveau von etwa $4,0 - 5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gehalten (Abbildung 4.-41). Während der Glukoselimitierung sank die Laktatkonzentration im Reaktor 1 leicht bis zum Ende der Kultivierung auf $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab.

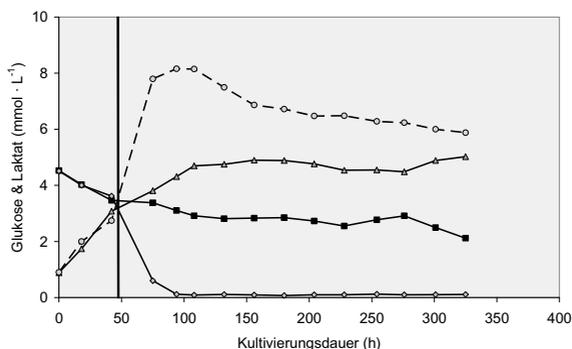


Abbildung 4.-41: Profile der Konzentrationen von Glukose (--- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Laktat (--- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch II (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes

Die Glutaminkonzentration sank im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) bis zur Phase der Glukoselimitierung nach ca. 96 h von $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-42). Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm die Glutaminkonzentration dann bis auf $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 325 h ab. Im Reaktor 2 war bis zum Start der Perfusion nach 48 h ein leichter Abfall der Glutaminkonzentration von anfänglich $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen. Durch die Perfusion mit WM blieb die Konzentration danach über die gesamte Kultivierungsdauer konstant in einem Bereich von $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-42). Die Ammonium-Konzentration stieg im Reaktor 1 (Batch-Betrieb) kontinuierlich von

0,2 mmol · L⁻¹ auf 3,4 mmol · L⁻¹ am Ende der Kultivierung nach 325 h (Abbildung 4.-42) an. Durch den permanenten Medienwechsel in Reaktor 2 konnte die Ammonium-Konzentration auf einem signifikant niedrigeren Niveau von 1,2 – 1,6 mmol · L⁻¹ gehalten werden, lediglich zum Ende der Kultivierung hin war ein Anstieg auf 1,9 mmol · L⁻¹ zu sehen. Insgesamt betrachtet, konnte auch in diesem Versuch, wie bereits im Perfusionsversuch I, durch die Perfusion im Reaktor 2 eine Limitierung der Substrate, besonders Glukose, und eine Akkumulation der Metabolite Laktat und Ammonium vermieden werden. Dies führte zu höheren Zellausbeuten und -vitalitäten im Vergleich zum Reaktor 1 im Batch-Betrieb.

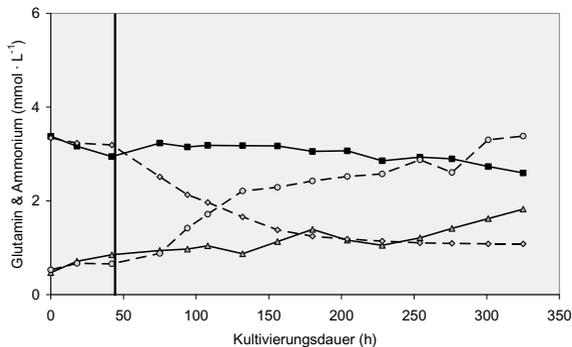


Abbildung 4.-42: Profile der Konzentrationen von Glutamin (--- Batch Reaktor 1 und --- Perfusion Reaktor 2) und Ammonium (--- Batch Reaktor 1 und --- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch II (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes

4.3.3 Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch III (0,5 L-Rührreaktor)

Eine weitere Erhöhung der Microcarrier-Startkonzentration und der Startzellzahl auf 5 g · L⁻¹ und 5,0 · 10⁵ Z · mL⁻¹ sollte, verbunden mit einer besseren Homogenisierung der Zellen beim Transfer von der Vorkultur in den Rührreaktor beim Perfusionsversuch III zu einer weiteren Erhöhung der Zellzahl führen. Dabei wurden auf Grund der theoretischen Überlegungen zur Größe von E-FL Zellen (Kapitel 3.9.2) Zellzahlen im Bereich von 3,0 – 4,0 · 10⁶ Z · mL⁻¹ angestrebt. Aus technischen Gründen konnte in diesem Versuch nur mit einer Medienvorlage von 2 L gearbeitet werden. Um dennoch eine Laufzeit der Perfusion von mindestens sieben Tagen zu gewährleisten, wurde die Perfusionsrate hier nur auf 0,5 RV · d⁻¹ eingestellt. Auf Grund dieser im Vergleich zu den vorherigen Kultivierungen geringeren Perfusionsrate waren auf Grund der ermittelten Verbrauchsdaten Limitierungen besonders von Glukose bei

Zellzahlen $> 2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu erwarten. Dennoch wäre auch für eine mögliche spätere Übertragung des Verfahrens in die Produktion eine Verringerung der Perfusionsraten bei gleich bleibender Zellausbeute und –Vitalität aus wirtschaftlichen Aspekten sinnvoll. Im Perfusionsversuch III wurde nur ein Reaktor gestartet, das Verhalten der E-FL Zellen in diesem System unter Batch-Bedingungen konnte in den vorherigen Versuchen bereits ausreichend charakterisiert werden. Als Perfusionsmedium wurde WM mit folgenden Startkonzentrationen verwendet: Glukose $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Nach 48 h Kultivierungsdauer wurde die Perfusion mit einer Perfusionsrate von $225 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) gestartet und nach 188 h Dauer bei einer Gesamtkultivierungsdauer von 230 h beendet. Danach wurde die Kultivierung im Batch-Betrieb bis zum Ende des Versuches nach 283 h fortgeführt. Der Reaktorinhalt wurde damit insgesamt 4,5-mal ausgetauscht.

4.3.3.1 Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Perfusionsversuch III

Die bessere Homogenisierung der Zellen bei der Einsaat führte zu einer besseren Anheftung der Zellen an die Microcarrier (Abbildung 4.-43 links). Die Zellzahl auf den Microcarriern lag nach 24 h bei $3,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, die Wiederfindungs-Rate bei 70 % (Abbildung 4.-44). Bis zum Start der Perfusion nach 48 h stieg die Zellzahl auf Werte im Bereich von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und lag damit höher als in den vorherigen Versuchen zu diesem Zeitpunkt. Während der Phase der Perfusion (48. – 230. h) kam es zu einer weiteren Zunahme der Zellzahl, das Maximum wurde nach 210 h mit $6,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. Mit Ende der Perfusion sank die Zellzahl leicht auf ein Niveau von $5,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ ab (Abbildung 4.-44). Die Zellkonzentration war zu diesem Zeitpunkt so hoch, dass sich durch Zellen verbundene Agglomerate aus 20 – 50 Microcarriern bildeten (Abbildung 4.-43 rechts), die auch makroskopisch im Reaktor sichtbar waren. Mit den erreichten Zellausbeuten kann der Perfusionsversuch III als Hochzelldichte-Kultivierung bezeichnet werden, deren Zellzahlen wohl das Maximum des mit diesem Medium und den eingestellten Bedingungen Erreichbaren darstellen. Die weitere Steigerung der Zellausbeute auf etwa $1,0 \cdot 10^7 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ könnte durch Einsatz eines höherwertigen Mediums (DMEM, IMDM), Optimierung der Perfusionsbedingungen und einer Erhöhung der Microcarrier-Startkonzentration ($6 – 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) realisierbar sein, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht angestrebt.



Abbildung 4.-43: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL im Reaktor 1 (Perfusions-Betrieb) (links) nach 28 h und (rechts) nach 185 h bei Perfusionsversuch III

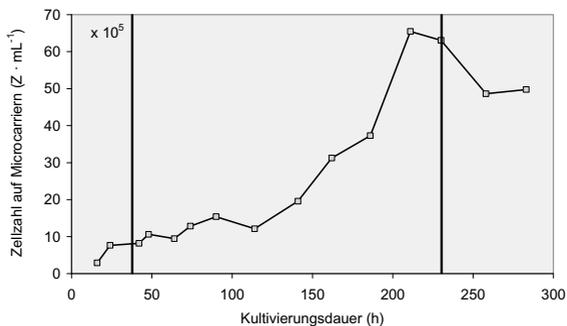


Abbildung 4.- 44: Lebendzellzahl für die Kultivierung der E-FL bei Perfusionsversuch III (450 mL ww, 0,50 RV · d⁻¹), schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusions-Betriebes

4.3.3.2 Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch III

Die Glukosekonzentration nahm bis zum Beginn der Perfusionsphase von $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab. Trotz der permanenten Zufuhr von WM (Glukose $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) sank die Konzentration dann weiter, bis nach 120 h ein Niveau von $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht wurde (Abbildung 4.-45). Die Zellkultur blieb bis zum Ende der Kultivierung glukoselimitiert. Bis zum Perfusionsstart nach 48 h stieg die Laktatkonzentration von $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $8,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, während der Perfusion war keine weitere Akkumulation von Laktat, sondern eine Konstanz der Konzentration auf einem Niveau von $7,0 - 9,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen. Nach dem Ende der Perfusionsphase und der folgenden Phase im Batch-Betrieb (230 – 283 h) war ein Abfall der Laktatkonzentration auf $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu erkennen. Die Glutaminkonzentration sank in den ersten 48 h von $6,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab

(Abbildung 4.-45). Während der Perfusion (48 – 230 h) war trotz der Zufuhr von WM mit einer Konzentration von $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glutamin eine leichte, aber signifikante Abnahme der Glutaminkonzentration von $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu verzeichnen. In der Batch-Phase am Ende der Kultivierung sank die Glutaminkonzentration dann auf $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab. Die Ammoniumkonzentration nahm bis zum Perfusionsstart von $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu (Abbildung 4.-45). Während der Perfusion war trotz des Medienausstausches ein weiterer Anstieg auf $3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu verzeichnen. In der Batch-Phase am Ende der Kultivierung stieg die Ammoniumkonzentration dann auf $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an.

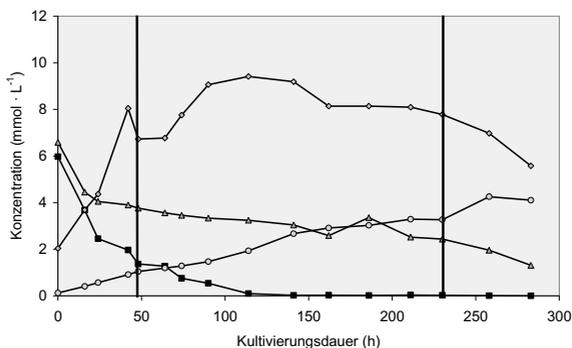


Abbildung 4.-45: Profile der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-△-) und Ammonium (-○-) für die Kultivierung von E-FL bei Perfusionsversuch III im 0,45 L wv Rührreaktor im Batch- und Perfusionsbetrieb, schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusions-Betriebes

Die Perfusionsrate von $0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ war offenbar zu gering, um bei den erreichten hohen Zellzahlen ($\approx 5,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) eine Versorgung der Zellkultur zu gewährleisten. Infolgedessen kam es zu Limitierungen, vor allem an Glukose, so dass die Kultur während zwei Dritteln der Perfusionsdauer bei Glukosemangel gehalten wurde. Als Folge war eine erhöhte Glutaminaufnahme zu sehen. Die Konzentrationen von Laktat und Ammonium konnten nicht, wie bei den Perfusionsversuchen I und II, konstant gehalten werden; es war ein langsamer Konzentrationsanstieg zu sehen, der jedoch unterhalb der im Batch-Betrieb erreichten Werte blieb.

4.3.4 **Kultivierung von E-FL Zellen im Perfusionsversuch IV im 1 L-Wave® Bioreaktor**

In diesem Versuch sollten die bisher im Rührreaktor angewendeten Perfusions-Strategien in den 1 L-Wave® Bioreaktor übertragen werden. Da zunächst das Verfahren transferiert werden sollte, war das Erreichen sehr hoher Zellzahlen nicht das Ziel. Die Einsaatbedingungen wurden daher analog zum Perfusionsversuch I ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) gewählt. Mit diesen Startwerten lagen im Rührreaktor Vergleichsdaten vor, die belegten, dass unter diesen Bedingungen mit guter Zellmorphologie und höheren Zellausbeuten im Vergleich zum Batch-Verfahren zu rechnen war. Die Perfusion wurde hier nicht nach einer definierten Zeit, sondern bei Erreichen einer Zellzahl von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, in diesem Fall nach 80 h Kultivierungsdauer, gestartet. Als Perfusionsmedium wurde WM mit folgenden Startkonzentrationen verwendet: Glukose $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Als Perfusionsrate wurden $250 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,25 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) eingestellt, nach 220 h war die Vorlage von 2,3 L WM verbraucht. Damit wurde das Reaktorvolumen 2,3-mal vollständig ausgetauscht. Nach Ende der Perfusionsphase nach 300 h wurde die Kultivierung für weitere 69 h im Batch-Betrieb fortgesetzt.

4.3.4.1 Zellwachstum und -morphologie der E-FL im Perfusionsversuch IV

Im mikroskopischen Bild war nach 24 h eine gute Verteilung der Zellen auf den Microcarriern und die typische fibroblastoide Morphologie zu erkennen (Abbildung 4.-46 links). Nach 24 h Kultivierung betrug die Zellzahl auf den Microcarriern $1,2 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, demnach lag die Wiederfindungs-Rate bei 60 % (Abbildung 4.-47). Die Zellzahl stieg dann bis auf $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 80 h und die Perfusion wurde gestartet. Im weiteren Verlauf der Perfusions-Kultivierung kam es zu einer weiteren Zunahme der Zellzahl bis auf ein Plateau bei etwa $1,2 - 1,6 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Zeitraum von 80 – 200 h. Zu diesem Zeitpunkt waren die Microcarrier konfluent mit Zellen belegt (Abbildung 4.-46 Mitte), lediglich Microcarrier, die zu Beginn der Kultivierung nicht mit Zellen belegt waren, blieben weiterhin leer. Nach ca. 200 h begann ein weiterer Anstieg der Zellzahl auf ein Maximum von $2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei 250 h (Abbildung 4.-47). Dieser Anstieg könnte durch das Agglomerieren der Zellen und der Ausbildung von „Carrierbrücken“ erklärt werden, wodurch zusätzlicher Platz für das Zellwachstum zur Verfügung stand. Dieser Effekt wurde auch im mikroskopischen Bild

sichtbar (Abbildung 4.-46 rechts). Die Zellzahl begann nach Perfusionsende zu sinken und lag am Ende der Kultivierung wieder auf einem Niveau von etwa $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die in diesem Versuch erreichten Zellzahlen liegen signifikant über Vergleichswerten aus Batch-Experimenten (maximal $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) und belegen, dass die Perfusion auch im Wave[®] Bioreaktor erfolgreich eingesetzt werden kann. Das dazu verwendete, selbst entwickelte Perfusionsmodul erwies sich, trotz einiger Schwierigkeiten beim Einbau, als - im Gegensatz zu den kommerziellen Perfusions-Bags - prinzipiell sehr geeignetes System zur Durchführung von Perfusionsansätzen im Wave[®] Bioreaktor.

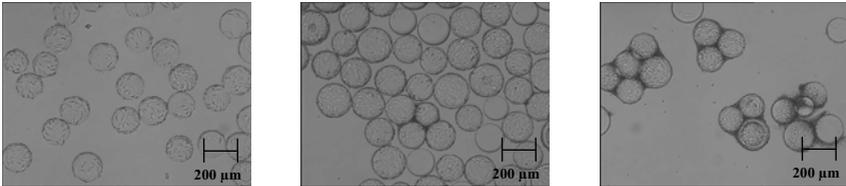


Abbildung 4.-46: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL bei Perfusionsversuch IV im Wave[®] Bioreaktor (links) nach 25 h, (Mitte) nach 168 h und (rechts) nach 230 h Kultivierungsdauer

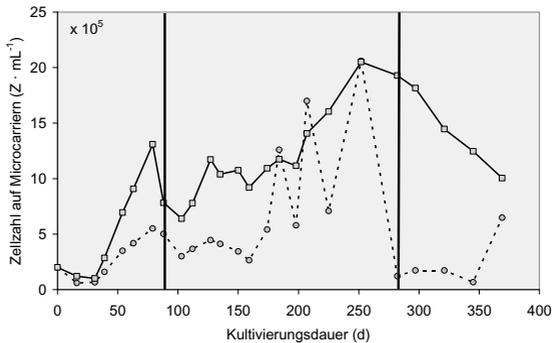


Abbildung 4.-47: Lebendzellzahl (-○- Rohdaten und -■- mit Korrekturfaktor analog Kapitel 3.9.1) für die Kultivierung der E-FL bei Perfusionsversuch IV im Wave[®] Bioreaktor (1 L ww , $0,25 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$), schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusionsbetriebes

4.3.4.2 Stoffwechsel der E-FL im Perfusionsversuch IV

Die Konzentration von Glukose sank bis zum Start der Perfusion von einem Anfangswert von $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab (Abbildung 4.-48). Durch die Zugabe von WM mit einer Glukosekonzentration von $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer Perfusionsrate von $0,25 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ war während der Perfusionsphase (80 – 300 h) keine Glukoselimitierung, jedoch ein Abfall der Konzentration auf unter $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen. In der abschließenden Batch-Phase (300 – 369 h) war keine Glukose mehr im Medium vorhanden. Die Laktatkonzentration stieg bis zum Beginn der Perfusion von $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $8,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an (Abbildung 4.-48). In der Perfusionsphase lagen die Konzentrationen trotz schwankender Einzelwerte (Nachmessung wurde vorgenommen, Ursache der Variation der Einzelwerte nicht bekannt) relativ konstant in einem Bereich um $7,0 - 9,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In der Batch-Phase am Ende der Kultivierung war keine signifikante Konzentrationsänderung mehr zu verzeichnen.

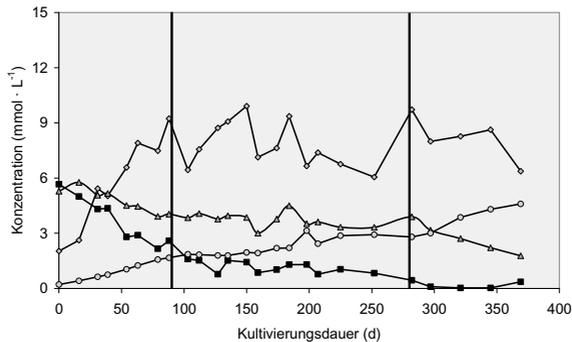


Abbildung 4.-48: Profile der Konzentrationen von Glukose (■-), Laktat (○-), Glutamin (△-) und Ammonium (□-) für die Kultivierung von E-FL bei Perfusionsversuch IV im 1 L wv Wave® Bioreaktor, schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusionsbetriebes

Für die Glutaminkonzentration war in den ersten 80 h ein leichter Abfall von $5,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu verzeichnen. In der Perfusionsphase wurde die Glutaminkonzentration durch die Zugabe des WM mit einer Konzentration von $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf einem Niveau von etwa $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ gehalten (Abbildung 4.-48). Nach dem Ende der Perfusion sank die Glutaminkonzentration in den letzten 69 h der Kultivierung auf $2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab. Die Ammoniumkonzentration stieg bis zum Beginn der Perfusion von $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, danach war während der Perfusion ein weiterer leichter Anstieg auf eine

Konzentration von $2,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 300 h Kultivierung zu erkennen (Abbildung 4.-48). In der Batch-Phase von 300 – 369 h stieg die Ammoniumkonzentration dann relativ stark auf $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung an. Durch die permanente Medienzufuhr konnte auch in diesem Versuch, wie in allen Perfusionsexperimenten, außer der Hochzelldichte-Kultivierung im Perfusionsversuch III, eine Limitierung der Zellkultur an den Substraten Glukose und Glutamin sowie eine starke Akkumulierung der Metabolite Laktat und Ammonium vermieden werden.

4.3.5 Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme für E-FL im Perfusions-Betrieb

Die Anwendung der Perfusion brachte in allen vier durchgeführten Kultivierungen, im Rührreaktor drei Kultivierungen und im Wave[®] Bioreaktor eine Kultivierung, Vorteile für das Zellwachstum der E-FL Zellen. Dies zeigte sich sowohl im direkten Vergleich zu mitgeführten Batch-Reaktoren als auch im Vergleich zu früheren Batch-Experimenten in signifikant höheren Zellzahlen und einer besseren Morphologie (Verbleib der Zellen auf den Microcarriern, keine Agglomeration frei in Suspension) der Zellen. So konnte z. B. mit der oft eingesetzten Kombination (Standardparameter) einer Startzellzahl von $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und einer Microcarrierkonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 im Rührreaktor eine leichte Erhöhung der Zellzahl auf $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Vergleich zum Batch-Reaktor mit $9,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 h sowie vor allem eine bessere Morphologie über die gesamte Kultivierungsdauer von 261 h erreicht werden (Perfusionsversuch I in Kapitel 4.3.1).

Eine Erhöhung der Startzellzahl auf $4,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und der Microcarrierkonzentration auf $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 brachte zwar eine weitere Erhöhung der Zellausbeute auf $1,4 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit sich, die jedoch weit von den theoretisch möglichen Ausbeuten im Bereich von $2,0 - 3,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ entfernt lag (Perfusionsversuch II in Kapitel 4.3.2). Sehr hohe Zellausbeuten konnten erst mit einer weiteren Steigerung der Einsaatzellzahl auf $5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und der Microcarrierkonzentration auf $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 erzielt werden. In dieser Hochzelldichte-Kultivierung wurde nach 200 h eine Maximalzellzahl von $6,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. Die Zellzahl blieb über etwa 150 h in einem Bereich von $> 5,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei sehr guter Morphologie der Zellen (Perfusionsversuch III in Kapitel 4.3.3). Auch im 1 L wv Wave[®] Bioreaktor konnte die Kultivierung unter Perfusionsbedingungen mit Standardparametern ($2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1)

erfolgreich durchgeführt werden. Die maximalen Zellausbeuten lagen im Bereich von $1,5 - 2,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ über eine Dauer von ca. 200 h und damit höher als beim vergleichbaren Perfusionsversuch I im Rührreaktor (Perfusionsversuch IV in Kapitel 4.3.4). Die Perfusion wurde entweder nach 48 h (Perfusionsversuche I - III) oder in einem Fall nach Erreichen einer Zellzahl $> 1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Perfusionsversuch IV) mit Perfusionsraten von $0,25 - 1,00 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ gestartet.

Da zum Zeitpunkt der Versuche keine Vergleichsdaten für Perfusionskultivierungen von E-FL in Microcarriersystemen bzw. Verbrauchsdaten für Nährstoffe nur in begrenztem Umfang zur Verfügung standen, war die Wahl der Perfusionsraten hauptsächlich auf Grund von technischen Gegebenheiten (Durchfluss des Perfusionsmoduls) limitiert bzw. wurde im Sinne einer möglichst langen Perfusiondauer getroffen. Ein positiver Einfluss der Perfusion für die Zufuhr der Nährstoffe Glukose und Glutamin sowie einer Entfernung der Metabolite konnte anhand konstanter bzw. im Vergleich zum Batch-Experiment variierender Konzentrationsverläufe dieser Stoffe in allen vier Kultivierungen nachgewiesen werden. Während es in Batch-Experimenten bereits nach etwa 100 h zu einer Limitierung der Kultur an Glukose bzw. zur Akkumulation von Laktat ($> 9,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) und Ammonium ($> 3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) kam, konnte das in allen vier Perfusionsexperimenten vermieden werden. Lediglich bei der Hochzelldichte-Kultivierung im Perfusionsversuch III reichte die Perfusionsrate offensichtlich nicht aus und die Kultur wurde am Rand der Glukoselimitierung gefahren. Das bessere Wachstum und die erhöhten Zellausbeuten waren sehr wahrscheinlich auf die über Perfusion erreichte, konstante Nährstoffzufuhr und Entfernung der toxischen Metabolite zurückzuführen.

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass Perfusionsexperimente in der tierischen Zellkultur sehr komplexe Systeme mit einer Vielzahl von Variationsmöglichkeiten, wie z. B. Einsatzzellzahl, Microcarrierkonzentration, Zeitpunkt des Starts der Perfusion und Perfusionsrate, sind. Trotz der empirischen Vorgehensweise in den gezeigten Experimenten konnte das Potenzial der Perfusion für den untersuchten Prozess gezeigt werden. Die Ergebnisse stellen sicher noch nicht das Optimum des Prozesses dar, dies kann nur durch weiterführende Experimente mit einer auf diesen Ergebnissen basierenden, umfassenden Betrachtung, ggf. in Form eines experimentellen Designs oder mathematischen Modells, erreicht werden. Für das Erzielen hoher Zellzahlen bietet sich das im Perfusionsversuch III gewählte System mit hoher Startzellzahl und Microcarrierkonzentration sowie ggf. einer noch

höheren Perfusionsrate an. Für die Experimente zur Vermehrung von MEV unter Perfusionsbedingungen und kontinuierlicher Virusernte sollte dagegen für die ersten Versuche zur Prinziplösung, auch aus Gründen der Wirtschaftlichkeit, eine Kombination, wie in den Perfusionsversuchen I und IV (Standardparameter) verwendet, Anwendung finden.

4.4 MEV-Infektion in Rührreaktoren und Wave® Bioreaktoren

Die Infektion von E-FL Zellen mit MEV im statischen System wurde im Kapitel 4.1 beschrieben und charakterisiert. In Anlehnung an den industriellen Prozess standen dabei Rollerflaschen mit Mehrfachernte-Schema im Fokus der experimentellen Untersuchungen. Der Rahmen für die erfolgreiche Durchführung der Infektion war dabei weitgehend durch Erfahrungswerte bzw. in Standardarbeitsanweisungen (IDT GmbH) festgelegte Parameter gesteckt. In den folgenden Experimenten sollte auf der Basis dieser Ergebnisse das Infektionsverfahren (Mehrfachernte-Schema) vom statischen System in die für das Wachstum der Zellen bereits etablierten Microcarriersysteme überführt werden. Für erste Untersuchungen zur Variation der moi und Erntezeitpunkte bot sich das Sixfors-System an. Weitere Versuche sollten dann bei erfolgreichem Ergebnis im Sixfors, d. h. bei Erreichen ähnlich hoher Virusausbeuten wie in Rollerflaschen mit drei bis sechs Virusernten, im 1 – 10 L-Maßstab im Wave® Bioreaktor durchgeführt werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind im Folgenden mehrere Kultivierungen, die von einer Vorkultur ausgingen und parallel durchgeführt wurden, als ein Versuch zusammengefasst.

4.4.1 MEV-Vermehrung im Versuch MEV 1 (0,5 L-Rührreaktor)

In dieser Kultivierung sollte erstmals die MEV-Vermehrung im Microcarriersystem charakterisiert und durch Variation der moi in den Reaktoren ein erstes Optimum für das Erreichen hoher Virusausbeuten gefunden werden. Es wurden parallel fünf Rührreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 0,45 L WM angesetzt und mit $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 inokuliert. Ein Reaktor wurde nicht infiziert und als Kontrolle mitgeführt. Die anderen vier Reaktoren wurden bei Zelleinsaat ($t_{oi} = 0 \text{ h}$), abgestuft mit moi 's von 0,01, 0,10, 1 und 5, mit MEV infiziert. Es wurden in allen Reaktoren zwei Medienwechsel nach 99 und 135 h durchgeführt, im Kontroll-Reaktor mit WM und in den infizierten Ansätzen mit EM.

Dementsprechend wurden in den vier infizierten Reaktoren drei Virusernten mit einem Volumen von 400 mL (ca. 50 mL Verlust durch Volumen der Microcarrier) erzielt.

4.4.1.1 Zellwachstum und –morphologie der E-FL im Versuch MEV 1

Die Zellzahlen auf Microcarriern lagen 24 h nach Einsaat im Bereich von $1,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Kontroll-Reaktor und bis zu $3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ in der mit MEV bei einer moi von 5 infizierten Zellkultur in Reaktor 5 (Abbildung 4.-49). Dabei war auffällig, dass die Wiederfindungs-Rate in den infizierten Reaktoren mit Werten bis zu 150 % größer war als in der nicht-infizierten Kontrolle mit 80 %. Im Kontrollreaktor 1 nahm die Zellzahl dann bis zu einem Maximum von $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 110 h zu und blieb auf einem Niveau von etwa $9,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierung nach 203 h (Abbildung 4.-49).

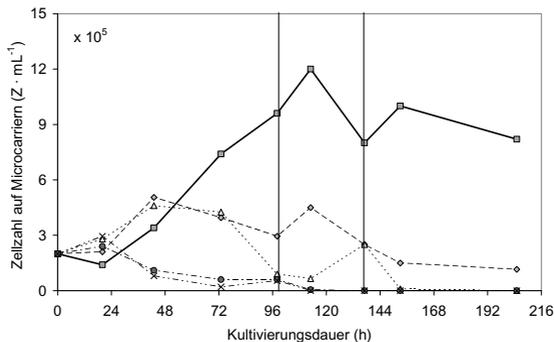


Abbildung 4.-49: Lebendzellzahlen für die Kultivierung der E-FL und die Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 1 im Parallelansatz von fünf Rührreaktoren im 0,5 L-Maßstab, senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 99 und 135 h (—■- Reaktor 1 Kontrolle, -+- Reaktor 2 mit moi 0,01, -▲- Reaktor 3 mit moi 0,10, -●- Reaktor 4 mit moi 1 und -X- Reaktor 5 mit moi 5)

In den Reaktoren 2 und 3 mit relativ geringen moi's von 0,01 und 0,10 wurde das Maximum der Zellzahl nach 44 h mit $4,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht, danach war ein langsamer Abfall der Zellzahl bis auf $0,5 - 1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ am Ende der Kultivierung zu sehen. In den mit relativ hohen moi's von 1 und 5 infizierten Reaktoren 4 und 5 wurde das Maximum der Zellzahl mit etwa $3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bereits nach 20 h beobachtet, danach erfolgte in beiden Reaktoren eine Abnahme der Zellzahl bis auf $0,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 h. Ab einer Kultivierungsdauer von

etwa 144 h war die Zellzahl unter die Nachweisgrenze von ca. $5,0 \cdot 10^3 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ gesunken. Der Verlauf des Wachstums der E-FL im Kontrollreaktor 1 war adäquat zu vergleichbaren Kultivierungen im Sixfors-System. Nach 20 h war eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Microcarriern und typische Morphologie zu erkennen, nach 99 h waren die Microcarrier zu 75 % mit Zellen belegt (Abbildung 4.-50 oben links und rechts). Im Vergleich dazu ist, beispielhaft für die anderen MEV-infizierten Reaktoren, der Wachstumsverlauf für Reaktor 3 dokumentiert. Hier war nach 20 h ebenfalls eine gute Anheftung und Verteilung der Zellen zu erkennen (Abbildung 4.-50 unten links), der Einfluss der MEV-Infektion zeigte sich bereits nach ca. 48 h, und nach 99 h waren nur noch einzelne Zellen mit untypischer (kugelförmiger) Morphologie auf den Microcarriern sichtbar (Abbildung 4.-50 unten rechts).

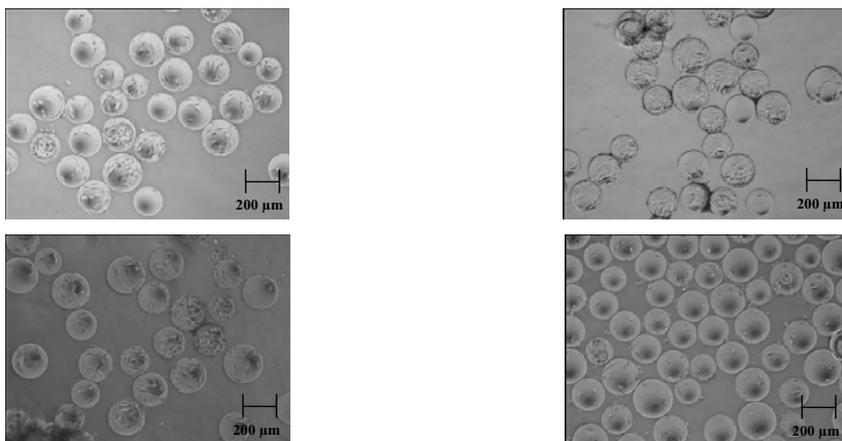


Abbildung 4.-50: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL bei Versuch MEV 1 im 0,5 L-Rührreaktor (oben links), Kontroll-Reaktor 1 nach 20 h (oben rechts), Kontroll-Reaktor 1 nach 99 h (unten links), Reaktor 3 mit MEV-Infektion bei $\text{moi} = 0,10$ nach 20 h und (unten rechts) Reaktor 3 mit MEV-Infektion bei $\text{moi} = 0,10$ nach 144 h Kultivierungsdauer

4.4.1.2 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 1

Das WM wurde in allen Ansätzen zu Beginn mit $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glukose auf eine Endkonzentration von $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ supplementiert. Das für die Medienwechsel verwendete WM wurde nicht zusätzlich mit Glukose versetzt. Die Glukosekonzentration nahm bis zum ersten Medienwechsel nach 99 h im Kontrollreaktor 1 von $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf ca. $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab (Abbildung 4.-51). Die stärkste Abnahme war im Reaktor 2 mit einer

moi von 0,01 zu finden. In den anderen Reaktoren war ein geringerer Glukoseverbrauch zu sehen, besonders in den Reaktoren 3 und 5 (moi von 0,10 bzw. 5), in denen die Glukosekonzentration nach 99 h noch ca. $12,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ betrug. Im weiteren Verlauf der Kultivierung war nach den beiden Medienwechseln nach 99 und 135 h ein abnehmender Glukoseverbrauch, besonders in den mit MEV infizierten Reaktoren, zu finden. Die Profile für die Laktatkonzentrationen zeigten in Reaktor 1 die höchste Laktatbildung mit $12,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 99 h, in den infizierten Reaktoren war mit $6,1 - 9,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ eine geringere Laktatbildung zu finden, wobei ein Einfluss der moi nicht erkennbar war (Abbildung 4-51). Nach den Medienwechseln (99 und 135 h) nahm die Laktatbildung in allen Reaktoren stark ab, ein Zusammenhang mit der moi war nicht zu sehen. Die Laktatkonzentration erreichte hier ein Niveau von $3,0 - 7,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

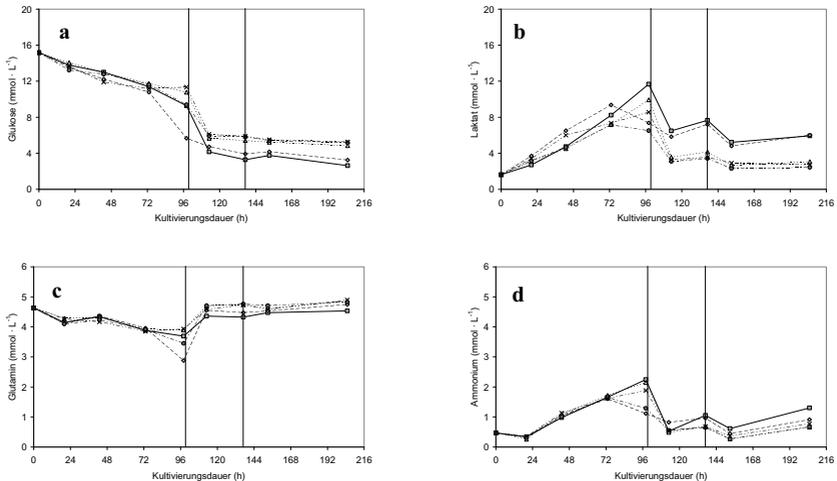


Abbildung 4-51: Profile der a) Glukose-, b) Laktat-, c) Glutamin- und d) Ammoniumkonzentration bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 1 im Parallelansatz von fünf Rührreaktoren (0,5 L-Maßstab), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 99 und 135 h (—■- Reaktor 1 Kontrolle, -+- Reaktor 2 mit moi 0,01, -▲- Reaktor 3 mit moi 0,10, -□- Reaktor 4 mit moi 1 und -X- Reaktor 5 mit moi 5)

Die Glutaminkonzentration sank in allen fünf Reaktoren bis zum ersten Medienwechsel nach 99 h von der Ausgangskonzentration von $4,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf etwa $2,9 - 4,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, die stärkste Abnahme war im Reaktor 2 mit einer moi von 0,01 zu sehen (Abbildung 4-51). In der gleichen Zeit stieg die Ammoniumkonzentration von $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf

0,9 – 2,2 mmol · L⁻¹ an, die höchste Konzentration wurde im Kontrollreaktor 1 erreicht (Abbildung 4.-51). Nach den Medienwechseln war hinsichtlich der Glutaminkonzentration kaum eine Änderung zu sehen, die Konzentrationen blieben im Wesentlichen im Bereich der Ausgangswerte. Die Ammoniumkonzentrationen stiegen von etwa 0,5 mmol · L⁻¹ auf etwa 1,0 mmol · L⁻¹ an. Möglicherweise wurde Ammonium hier nicht über Glutamin, sondern über Verstoffwechslung anderer Aminosäuren generiert. In den Stoffwechselfdaten bestand kein starker Unterschied zwischen Kontrollreaktor und infizierten Reaktoren. Bis zum ersten Medienwechsel war im Kontrollreaktor eine höhere Stoffwechselaktivität zu sehen, nach den Medienwechseln waren die Unterschiede zwischen infizierten Ansätzen und Kontrolle geringer, als man nach den Zellzahlen und den mikroskopischen Aufnahmen erwarten konnte. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der moi und Stoffwechselaktivität konnte für die gemessenen Parameter Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium nicht festgestellt werden.

4.4.1.3 Vermehrung von MEV im Versuch MEV 1

In der ersten Virusernte nach 99 h wurde der höchste Virustiter mit 10^{7,1} TCID₅₀ · mL⁻¹ im Reaktor 3 mit einer relativ geringen moi von 0,10 erzielt (Abbildung 4.-52). In den beiden Reaktoren mit einer hohen moi von 1 bzw. 5 lag die Viruskonzentration zu diesem Zeitpunkt bei 10^{6,6} – 10^{6,8} TCID₅₀ · mL⁻¹, wogegen im Reaktor 2 mit der niedrigsten moi von 0,01 nur ein geringer Virustiter von 10^{5,1} TCID₅₀ · mL⁻¹ erreicht wurde. Offensichtlich hatte im Reaktor 2 das MEV auf Grund der geringen moi noch nicht vollständig die gesamte Zellkultur infiziert und die Virusvermehrung befand sich noch im Anfangsstadium. In der zweiten Virusernte nach 135 h und in der dritten Ernte nach 203 h war eine gleichmäßige Verteilung der erreichten Virusausbeuten ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen zu sehen (Abbildung 4.-52). In der zweiten Ernte lagen die Ausbeuten im Bereich von 10^{6,3} – 10^{6,8} TCID₅₀ · mL⁻¹, in der letzten Ernte auf einem Niveau von 10^{6,1} – 10^{6,5} TCID₅₀ · mL⁻¹. Insgesamt lagen die Ausbeuten damit höher als in Rollerflaschen. Weitere Versuche sollten zeigen, ob sich die Titer auf diesem Niveau stabilisieren bzw. noch optimieren lassen. Auf Grund der guten Ergebnisse in diesem Versuch sowie weiteren Experimenten (Daten nicht gezeigt) und auch aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurde im Folgenden mit relativ niedrigen moi's im Bereich von 0,01 – 0,10 gearbeitet. Die Verwendung von niedrigen moi's stellt auch einen deutlichen Prozessvorteil dar, da das Volumen des eingesetzten Saatvirus gering gehalten werden kann.

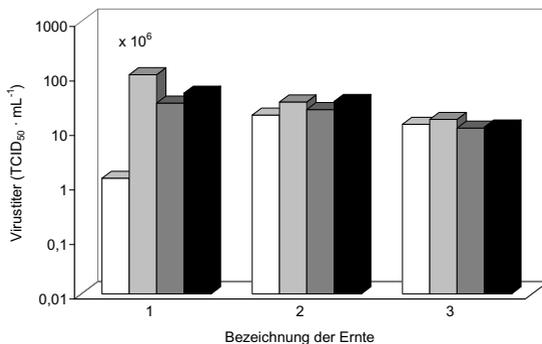


Abbildung 4-52: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 1 (0,5 L-Maßstab) unter Variation der moi, Ernte 1 nach 99 h, Ernte 2 nach 135 h und Ernte 3 nach 203 h, -□- Reaktor 2 mit moi 0,01, -■- Reaktor 3 mit moi 0,10, -▣- Reaktor 4 mit moi 1 und -■- Reaktor 5 mit moi 5

4.4.2 MEV-Vermehrung im Versuch MEV 2 (0,5 L-Rührreaktor)

Nach der Charakterisierung der für eine MEV-Vermehrung mit hohen Ausbeuten günstigen moi sollte im Versuch MEV 2 das Intervall zwischen den einzelnen Virusernten variiert werden, um so ein optimales Ernteschema zu identifizieren. Es wird davon ausgegangen, dass ein optimales Ernteschema zu mindestens fünf Virusernten mit relativ gleichmäßiger Verteilung der Virusausbeuten ($> 10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹) führen sollte. Zu frühe bzw. zu späte Erntezeitpunkte führen dabei zu einem Verlust an Virusmaterial. Es wurden parallel vier Rührreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 0,45 L wv WM angesetzt und mit jeweils $2,0 \cdot 10^5$ Z · mL⁻¹ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ CytodexTM 1 inokuliert. Reaktor 1 wurde nicht mit MEV infiziert und als Kontrolle mitgeführt. Die anderen drei Reaktoren wurden direkt bei Zelleinsaat (toi = 0 h) mit MEV bei einer moi von 0,01 infiziert. Bei Reaktor 1 wurde, beginnend ab 72 h Kultivierungsdauer, zum Erhalt der Vitalität der Zellkultur und zur besseren Vergleichbarkeit alle 72 h ein vollständiger Medienwechsel (insgesamt fünf Medienwechsel) mit WM durchgeführt. In den infizierten Reaktoren lag das Intervall der fünf Medienwechsel mit EM, beginnend nach einer Kultivierungsdauer von 72 h, bei 24 h im Reaktor 2, bei 48 h im Reaktor 3 und bei 72 h im Reaktor 4. Die gesamte Kultivierungsdauer betrug somit 400 h.

4.4.2.1 Zellwachstum und -morphologie der E-FL im Versuch MEV 2

In diesem Versuch wurde nach 24 h keine Probe aus den Reaktoren entnommen; es wurde davon ausgegangen, dass die Anheftung und Morphologie der Zellen den bisher ermittelten typischen Verläufen mit Werten für die Wiederfindungs-Rate von 60 – 80 % entsprach. Nach 48 h lag die Zellzahl im Kontrollreaktor 1 bei $2,4 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, in den infizierten Reaktoren waren niedrigere Zellzahlen von $1,8 - 2,1 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu sehen (Abbildung 4.-53). Im weiteren Versuchsverlauf nahm die Zellzahl im nicht-infizierten Reaktor 1 bis auf ein Maximum von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 140 h zu, danach verblieb die Zellzahl auf einem Niveau um $5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bis zum Ende der Kultivierung nach 400 h. In den infizierten Reaktoren 2 – 4 war ab 48 h p. i., unabhängig vom gewählten Ernteintervall, eine durch die Virusinfektion induzierte Abnahme der Zellzahl bis zum Erreichen der Nachweisgrenze ($< 2,0 \cdot 10^3 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) nach 140 h p. i. zu sehen (Abbildung 4.-53). Der regelmäßige Medienwechsel (Intervall 24 – 72 h) hatte offensichtlich die erwarteten positiven Auswirkungen auf den Erhalt der Vitalität der Zellkultur in Reaktor 1, führte jedoch nicht zu einer verlängerten Lebensdauer der infizierten Zellen in den Reaktoren 2 – 4.

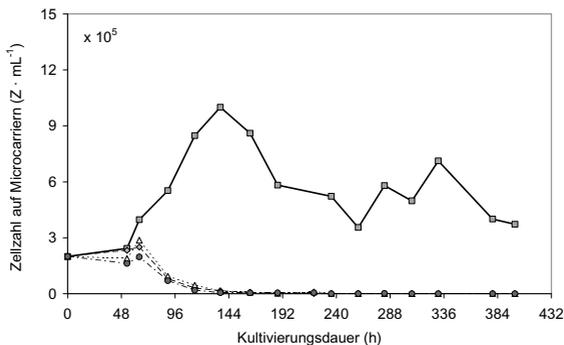


Abbildung 4.-53: Lebendzellzahlen bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 2 im Parallelansatz von vier Rührreaktoren im 0,5 L-Maßstab (—■— Reaktor 1 Kontrolle Intervall 72 h, -·- Reaktor 2 mit Ernteintervall 24 h, -▲- Reaktor 3 mit Ernteintervall 48 h und -●- Reaktor 4 mit Ernteintervall 72 h)

4.2.2.2 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 2

Im nicht-infizierten Reaktor 1 war über die gesamte Kultivierungsdauer ein gleichmäßiger Konzentrationsverlauf der beobachteten Stoffwechselfparameter zu sehen (Abbildung 4.-54). Die Glukosekonzentration sank zwischen den Medienwechseln von etwa $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf Werte nahe $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, Limitierungen konnten durch die Medienwechsel im 72 h-Intervall vermieden werden. Die Konzentration von Laktat lag am Ende des jeweiligen Intervalls bei einem mittleren Wert von etwa $8,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; eine Ausnahme war die Zeit bis zum ersten Medientausch, hier wurden bei einem auch geringeren Glukoseverbrauch lediglich ca. $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Laktat gebildet. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ lag damit bei einem mittleren Wert von 1,60 und damit im typischen Bereich für eine E-FL Zellkultur im Rührreaktor. Die Glutaminkonzentration sank im Reaktor 1 in den Intervallen von jeweils ca. $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,8 - 4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, Ausnahme war auch hier wieder der Zeitraum von 0 – 72 h, in dem sowohl weniger Glutamin verbraucht als auch Ammonium gebildet wurde (Abbildung 4.-54). Es wurden im Mittelwert Ammoniumkonzentrationen von $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht, so dass sich ein mittlerer Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ von 1,33 ergab.

Im Reaktor 2 (MEV-Infektion, Ernteintervall 24 h) lag die Glukosekonzentration nach 70 h (Erntebeginn) bei $3,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Laktatkonzentration betrug $4,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, damit ergab sich ein $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ von 1,56 (Abbildung 4.-55). In der weiteren Kultivierung waren zwischen der ersten und zweiten sowie der zweiten und dritten Ernte (70 – 118 h) für Glukose und Laktat noch Konzentrationsänderungen zu sehen, die auf dem Niveau der ersten 70 h liegen. Danach war eine starke Abnahme der Glukoseaufnahme und Laktatbildung zu erkennen, so dass ab etwa 192 h kaum noch Konzentrationsänderungen zu sehen waren (Abbildung 4.-55). Während der ersten 70 h nahm die Glutaminkonzentration im Reaktor 2 von $5,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, im gleichen Zeitraum stieg die Ammoniumkonzentration von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ betrug 0,90 (Abbildung 4.-55). Während der folgenden Medienwechsel im 24 h-Intervall war weiterhin eine Abnahme der Glutaminkonzentration und eine Zunahme der Ammoniumkonzentration auf etwa demselben Niveau zu sehen. Nach dem letzten Medienwechsel nach 166 h war eine Konstanz in der Glutaminkonzentration bis zum Kultivierungsende bei weiter ansteigender Ammoniumkonzentration auf $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu verzeichnen. (Abbildung 4.-55). Das deutete, ebenso wie die Konstanz der Glukosekonzentration, auf das Absterben der Zellen hin.

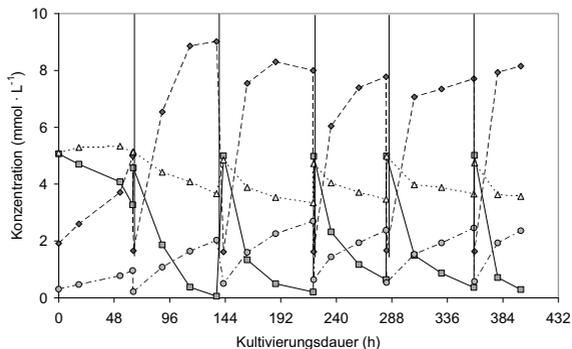


Abbildung 4-54: Profil der Konzentrationen von Glukose (—■—), Laktat (---◆---), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 1 (nicht-infizierte Kontrolle), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 139, 220, 284 und 356 h Kultivierung

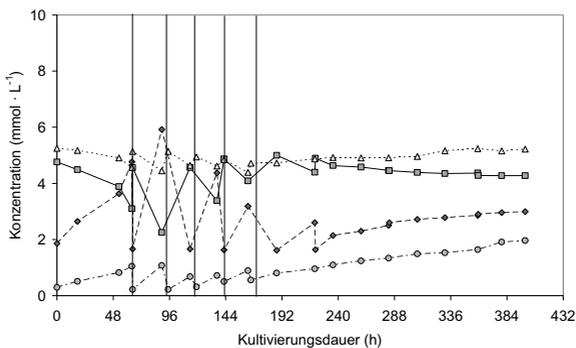


Abbildung 4-55: Profil der Konzentrationen von Glukose (—■—), Laktat (---◆---), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 2 (MEV mit $\text{moi } 0,01$, Ernteintervall 24 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 94, 118, 142 und 166 h Kultivierung

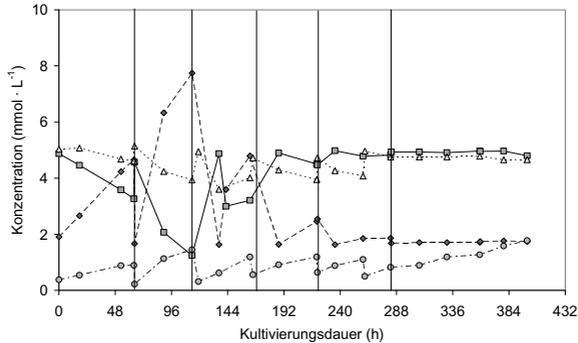


Abbildung 4-56: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-○-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 3 (MEV mit $\text{moi } 0,01$, Ernteintervall 48 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 118, 166, 214 und 272 h Kultivierung

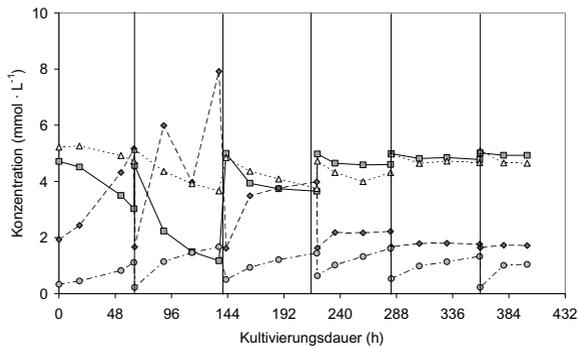


Abbildung 4-57: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-○-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 4 (MEV mit $\text{moi } 0,01$, Ernteintervall 72 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 139, 220, 284 und 356 h Kultivierung

Im Reaktor 3 (Ernteintervall 48 h) betrug die Glukosekonzentration nach 70 h (Beginn der Ernten) $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Laktatkonzentration lag zu dieser Zeit bei $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, damit ergab sich ein $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ von 1,56 (Abbildung 4.-56). In der weiteren Kultivierung waren zwischen der ersten und zweiten sowie der zweiten und dritten Ernte (70 – 118 h) für Glukose und Laktat noch Konzentrationsänderungen zu sehen, die auf dem Niveau der ersten 70 h lagen. Danach war eine starke Abnahme der Glukoseaufnahme und Laktatbildung zu finden, so dass ab etwa 192 h kaum noch Konzentrationsänderungen zu erkennen waren (Abbildung

4.-56). Während der ersten 70 h nahm die Glutaminkonzentration im Reaktor 3 von $5,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, im gleichen Zeitraum stieg die Konzentration von Ammonium von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $0,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amn/Gln}}$ betrug 1,00 (Abbildung 4.-56). Während der folgenden Medienwechsel im 48 h-Intervall war eine Abnahme der Glutaminkonzentration und eine Zunahme der Ammoniumkonzentration auf etwa demselben Niveau zu sehen. Nach etwa 220 h war eine Konstanz im Glutaminniveau bis zum Kultivierungsende bei weiter ansteigender Ammoniumkonzentration auf ähnliche Endkonzentrationen wie zuvor zu finden (Abbildung 4.-56). Dies deutet, wie bereits das Profil für Reaktor 2, auf den virusinduzierten Tod der Zellen hin.

Die Konzentration an Glukose lag im Reaktor 4 (Ernteintervall 72 h) nach 70 h bei $2,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, die Laktatkonzentration bei $5,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Damit betrug der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ 1,68 (Abbildung 4.-57). Zwischen der ersten und zweiten Ernte (70 – 139 h) war eine Glukoseabnahme und Laktatzunahme zu sehen, mit Raten, die auf dem Niveau der ersten 70 h lagen. In den folgenden Ernteintervallen war eine starke Abnahme der Stoffwechselaktivität hinsichtlich Glukose und Laktat zu erkennen, bis zum völligen Erliegen der Glukoseaufnahme und der Laktatfreisetzung im dritten Ernteintervall nach etwa 220 h (Abbildung 4.-57). Die Glutaminkonzentration sank während der ersten 70 h von $5,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $4,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, im gleichen Zeitraum nahm die Ammoniumkonzentration von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu. Damit ergab sich ein $Y_{\text{Amn/Gln}}$ von 0,86 (Abbildung 4.-57). In den folgenden Ernteintervallen war für den Zeitraum zwischen erster und zweiter sowie zweiter und dritter Ernte eine auf diesem Level liegende Glutaminaufnahme und Ammoniumfreisetzung zu sehen. Ab etwa 220 h verblieb die Glutaminkonzentration konstant, während Ammonium in nahezu gleich bleibender Konzentration freigesetzt wurde.

4.4.2.3 Vermehrung von MEV im Versuch MEV 2

In der ersten Virusernte nach 70 h lag der Virustiter in den Reaktoren 2 und 3 bei $10^{4,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$, im Reaktor 4 um eine Titerstufe höher, bei $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Abbildung 4.-58). Die zweite Virusernte war bei den Reaktoren um jeweils 24 h verschoben. Auf Grund der längeren Kultivierungsdauer ist der Titer im Reaktor 4 mit $10^{7,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ am höchsten, in den beiden anderen Reaktoren 2 und 3 wurden $10^{6,5}$ bzw. $10^{7,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. In den folgenden Ernten 3 – 5 war in allen Reaktoren tendenziell eine Abnahme des Virustiters zu sehen, die stärkste Abnahme war dabei im Reaktor 4 mit dem Ernteintervall von 72 h zu verzeichnen. Im Reaktor 2 mit einem Ernteintervall von 24 h war hingegen ein relativ

konstanter Titer von $10^{7,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ in den Ernten 3 – 5 zu finden. Möglicherweise kam es bei einem längeren Ernteintervall zu einem starken Einfluss von Zerfallsprozessen auf die Virusinfektiösität, die durch die Neuproduktion nicht aufgewogen wurden. In der letzten Ernte nach 400 h lag der Titer im Reaktor 2 mit $10^{5,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ am höchsten, in den Reaktoren 3 und 4 wurden Titer von $10^{4,7}$ bzw. $10^{4,2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ erreicht. Sowohl aus Gründen der Wirtschaftlichkeit (Höhe der Titer) als auch aus Gründen der Dauer des Prozesses erscheinen Ernteintervalle von 24 h mit sechs Virusernten im Vergleich zu längeren Ernteintervallen optimal zu sein.

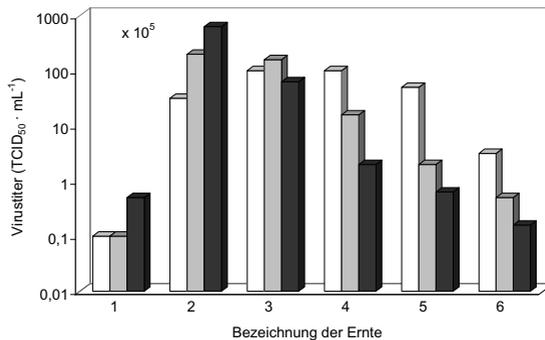


Abbildung 4-58: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 2 im 0,5 L-Maßstab unter Variation des Ernteintervalles von 24 – 72 h, -□- Reaktor 2 mit Ernteintervall 24 h, -■- Reaktor 3 mit Ernteintervall 48 h und -■- Reaktor 4 mit Ernteintervall 72 h

4.4.3 MEV-Vermehrung im Versuch MEV 3 (1 L-Wave[®] Bioreaktor)

Im Versuch MEV 3 sollte erstmalig die MEV-Vermehrung im Microcarriersystem im Wave[®] Bioreaktor charakterisiert werden. Grundlage dafür bildeten Ergebnisse der vorhergehenden Versuche MEV 1 und MEV 2. Es wurden zwei Reaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1 L WM angesetzt und mit jeweils $2,0 \cdot 10^5$ Z · mL⁻¹ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 inokuliert. Ein Reaktor wurde nicht mit MEV infiziert und als Kontrolle mitgeführt. Der andere Reaktor wurde direkt bei Zelleinsaat (toi = 0 h) mit einer moi von 0,01 mit MEV infiziert. In beiden Reaktoren wurden drei Medienwechsel nach 73, 154 und 244 h Kultivierungsdauer durchgeführt, im Kontroll-Reaktor mit WM und im infizierten Ansatz mit EM. Dementsprechend wurden im infizierten Reaktor vier Virusernten mit einem Volumen von 950 mL (ca. 50 mL Verlust durch Volumen der Microcarrier) erzielt. In diesem Versuch wurden keine Zellzahlen bestimmt; Grund war die nicht repräsentative Probenahme aus dem

Wave® Bioreaktor (Inhomogenität der Probe). Das Problem wurde erst in späteren Versuchen durch Einführung eines Korrekturfaktors K_F (Kapitel 3.9.1) gelöst.

4.4.3.1 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 3

In der Kontrolle lag die Glukosekonzentration beim ersten Medienwechsel (73 h) bei $2,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, im infizierten Reaktor 2 mit $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ leicht darüber (Abbildung 4.-59). Die nach dieser Zeit erreichte Laktatkonzentration lag in der Kontrolle bei $6,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und im Reaktor 2 mit $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ leicht darunter. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ betrug für diese Zeit 1,52 für beide Reaktoren. Für die folgenden Zeiträume zwischen den Medienwechseln war in beiden Reaktoren eine starke Abnahme der Glukosekonzentration innerhalb der 72 h-Ernteintervalle bis auf Werte nahe Null festzustellen. Im infizierten Reaktor war der Glukoseverbrauch im Vergleich zu vorhergehenden infizierten Kulturen hoch und fast auf dem Niveau der Kontrolle. Ähnlich stellte sich auch der Verlauf der Laktatprofile dar, hier wurden in beiden Ansätzen am Ende des jeweiligen Ernteintervalls Laktatkonzentrationen von etwa $8,0 - 9,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht (Abbildung 4.-59). Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ lagen für diese Zeit in einem Bereich von 1,50 – 1,60 in beiden Reaktoren.

In beiden Ansätzen nahmen die Glutaminkonzentrationen von $5,5 - 6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf etwa $4,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, die Ammoniumkonzentrationen lagen im Bereich von $2,0 - 3,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-59). Die Kontrolle zeigte auch hier leicht höhere Werte für Glutaminverbrauch und Ammoniumfreisetzung. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ lagen bei 1,00 – 1,20.

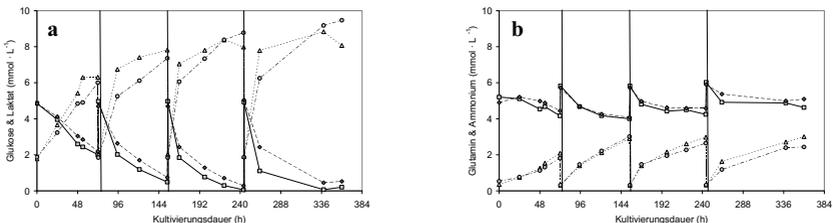


Abbildung 4.-59: Konzentrationsprofile von a) Glukose (■- Reaktor 1 Kontrolle, ▨- Reaktor 2 moi 0,01) und Laktat (▲- Reaktor 1 Kontrolle, ▩- Reaktor 2 moi 0,01) und von b) Glutamin (▲- Reaktor 1 Kontrolle, ▩- Reaktor 2 moi 0,01) und Ammonium (▲- Reaktor 1 Kontrolle, ▩- Reaktor 2 moi 0,01) bei Versuch MEV 3 im Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion, moi 0,01), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 73, 154 und 244 h

4.4.3.2 Charakterisierung der MEV-Vermehrung im Versuch MEV 3

In der ersten Virusernte nach 73 h lag der Virustiter relativ niedrig bei $10^{4,2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ (Abbildung 4.-60). In der zweiten Ernte nach 154 h war ein Anstieg des Titers auf $10^{6,7}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ zu sehen. Dieses Niveau wurde auch in der dritten Ernte mit $10^{6,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ erreicht. Die vierte Ernte am Ende der Kultivierung zeigte dann mit $10^{5,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ einen um eine log-Stufe niedrigeren Titer. Insgesamt lagen die Virustiter damit nahezu auf dem Niveau der Ernten aus dem Rührreaktor; es wurden relativ gleichmäßig hohe Titer erreicht, jedoch keine Maximaltiter $> 10^{7,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹. Das 72 h-Ernteintervall erwies sich hier als nicht nachteilig auf das Erreichen hoher Virusausbeuten, führte allerdings zu einer langen Prozessdauer von 360 h. Da alle vier Virusernten einen Titer von $> 10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ aufwiesen, wären alle Ernten unter industriellen Produktionsaspekten für eine Verwendung als Vakzine nutzbar.

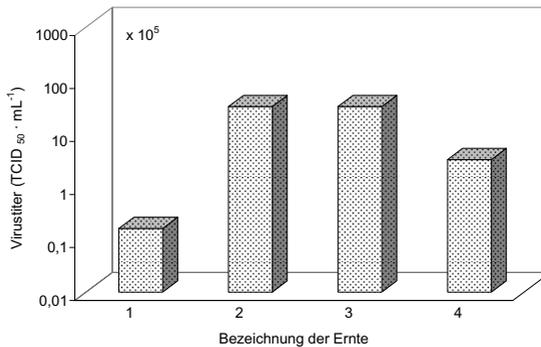


Abbildung 4.-60: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 3 im 1 L-Wave[®] Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,01) mit Ernte 1 nach 73 h, Ernte 2 nach 154 h, Ernte 3 nach 244 h und Ernte 4 nach 360 h

4.4.4 **MEV-Vermehrung im Versuch MEV 4 (1 L-Wave[®] Bioreaktor)**

In diesem Versuch stand die Änderung des Ernteintervalls von 72 h auf 24 h und damit die Verkürzung der Prozessdauer im Vordergrund des Interesses. Es wurden zwei Wave[®] Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1 L WM angesetzt und mit $2,0 \cdot 10^5$ Z · mL⁻¹ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 inokuliert. Als Kontrolle wurde eine Zellkultur in einer T 175-

Gewebekulturflasche mitgeführt, diese zeigte typisches Wachstum und keine Auffälligkeiten. Die beiden Reaktoren wurden direkt bei Zelleinsaat (toi = 0 h), abgestuft mit moi's von 0,01 (Reaktor 1) und 0,10 (Reaktor 2), mit MEV infiziert. Es wurden in beiden Reaktoren, beginnend ab 96 h Kultivierungsdauer, fünf Medienwechsel nach 96, 120, 144, 168 und 192 h Kultivierungsdauer mit EM durchgeführt. Dementsprechend wurden sechs Virusernten mit einem Volumen von 950 mL (ca. 50 mL Verlust durch Volumen der Microcarrier) erzielt. Es wurden auch in diesem Versuch keine Zellzahlen bestimmt.

4.4.4.1 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 4

Die Glukosekonzentration sank im Ansatz 1 (moi 0,01) von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ innerhalb der ersten 96 h auf $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, im Ansatz 2 mit der 10-fach höheren moi lag die Konzentration nach dieser Zeit bei $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Abbildung 4.-61). Bedingt durch den höheren Glukoseverbrauch in Ansatz 2, wurde hier auch mit $9,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Vergleich zu $8,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Reaktor 1 die höhere Laktatkonzentration erreicht. Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ lagen in beiden Reaktoren bei 1,70 – 1,80 und damit relativ hoch. Beginnend ab dem ersten Medienwechsel nach 96 h war eine starke Abnahme des Glukoseverbrauchs und der Laktatbildung zu sehen. Besonders gut war diese verringerte Stoffwechselintensität im Reaktor 2 mit der höheren moi zu erkennen, nach dem dritten Medienwechsel nach 144 h war auch im Reaktor 1 kaum noch Stoffwechselaktivität zu finden. Die Konzentrationsverläufe für Glukose und Laktat zeigten für die letzten Medienwechsel keine Änderungen der Konzentration mehr (Abbildung 4.-61).

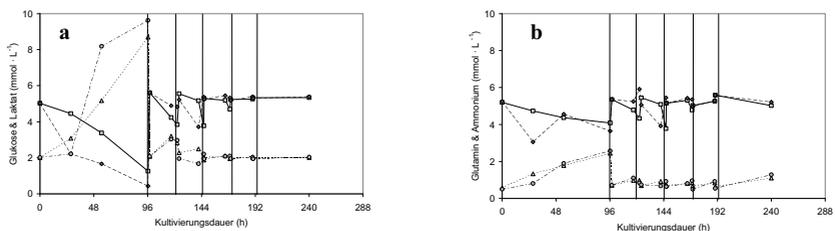


Abbildung 4-61: Profil der Konzentrationen von a) Glukose (\square - Reaktor 1 moi 0,01 und \circ - Reaktor 2 moi 0,10) und Laktat (\triangle - Reaktor 1 moi 0,01 und \diamond - Reaktor 2 moi 0,10) und von b) Glutamin (\square - Reaktor 1 moi 0,01 und \circ - Reaktor 2 moi 0,10) und Ammonium (\triangle - Reaktor 1 moi 0,01 und \diamond - Reaktor 2 moi 0,10) bei Versuch MEV 4 im Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,01 und 0,10), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 96, 120, 144, 168 und 192 h Kultivierung

Der Kurvenverlauf für Glutamin und Ammonium stellte sich adäquat zu den Profilen für Glukose und Laktat dar. In beiden Ansätzen nahm die Glutaminkonzentration in den ersten 96 h von $5,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf etwa $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, die Ammoniumkonzentration stieg auf $2,0 - 2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($Y_{\text{Amm/Gln}} 1,00 - 1,10$). Im weiteren Verlauf war ab 96 h zunächst eine verringerte Glutaminaufnahme zu sehen, die später nahezu Null erreichte. Die Ammoniumkonzentration stieg weiter leicht auf $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an (Abbildung 4.-61).

4.4.4.2 *MEV-Vermehrung im Versuch MEV 4*

In der ersten Virusernte nach 96 h lag der Virustiter in beiden Reaktoren bei $10^{6,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Abbildung 4.-62). In den folgenden Virusernten waren nur geringe, nicht signifikante Unterschiede im Titer zwischen den beiden Reaktoren zu sehen. Die unterschiedliche *moi* hatte offensichtlich keinen Einfluss auf die erreichten Virusausbeuten. In der zweiten Ernte nach 120 h lagen die Titer im Bereich von $10^{6,5} - 10^{6,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ und damit auf gleich hohem Niveau wie in der ersten Ernte. Die Ernten 3 – 5 zeigten dann einen Titerabfall um durchschnittlich jeweils eine log-Stufe (Abbildung 4.-62). In der letzten Ernte nach 240 h wurden dann nur noch durchschnittlich $10^{4,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. Durch die Anwendung eines 24 h-Ernteintervalls konnten in diesem Versuch sechs Virusernten erzielt werden, die alle Titer von $> 10^{4,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreichten. Eine reale Zunahme von Viruspartikeln wurde nur bis zur zweiten Ernte nach 120 h gefunden, die weiteren Ernten bilden die 1 : 10-Verdünnungen bei den Medienwechseln ab. Die Prozesszeit konnte im Vergleich zum vorigen Versuch von 360 h auf 240 h verkürzt werden.

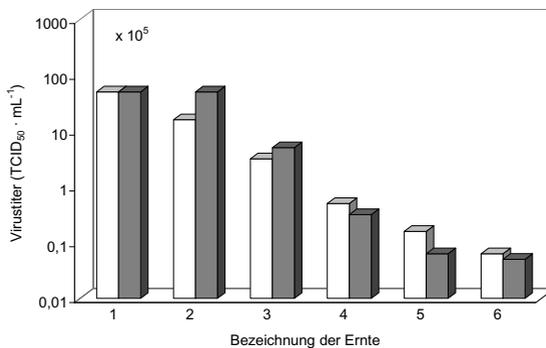


Abbildung 4.-62: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID_{50}) bei Versuch MEV 4 im 1 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit *moi* 0,01 und 0,10) mit Ernte 1 nach 96 h, Ernte 2 nach 120 h, Ernte 3 nach 144 h, Ernte 4 nach 168 h, Ernte 5 nach 192 h und Ernte 6 nach 240 h, -□- Reaktor 1 mit *moi* 0,01 und -■- Reaktor 2 mit *moi* 0,10

4.4.5 MEV-Vermehrung im Versuch MEV 5 (10 L-Wave® Bioreaktor)

Im Versuch MEV 5 sollte erstmals die MEV-Vermehrung im 10 L *Wave*® Bioreaktor charakterisiert werden. Dieser 1 : 10 Scale-Up führt das Verfahren schon relativ nahe an die geplanten Produktionsmaßstäbe von 50 – 100 L im *Wave*® Bioreaktor heran. Der *Wave*® Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 10 L WM wurde mit $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 inokuliert. Als Kontrolle wurde eine nicht-infiizierte Zellkultur in einer T 75 – Gewebekulturflasche mitgeführt, die während des Experimentes das typische Wachstum der E-FL und keine Auffälligkeiten zeigte. Der Reaktor wurde direkt bei Zelleinsaat ($t_{oi} = 0 \text{ h}$) mit einer m_{oi} von 0,10 mit MEV infiziert. Es wurden vier Medienwechsel im 48 h-Intervall nach 96, 144, 189 und 238 h Kultivierungsdauer mit EM durchgeführt. Dementsprechend wurden fünf Virusernten mit einem Volumen von 9,6 L (ca. 400 mL Verlust durch Volumen der Microcarrier) erzielt. In diesem Versuch wurden, wie bereits in den vorigen Versuchen im *Wave*® Bioreaktor, aus den dort genannten Gründen keine Zellzahlen bestimmt.

4.4.5.1 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV 5

Bis zum ersten Medienwechsel nach 96 h fiel die Glukosekonzentration von $5,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, im gleichem Zeitraum stieg die Laktatkonzentration auf $11,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ für dieses Zeitintervall betrug 1,93 (Abbildung 4.-63). Bereits nach dem ersten Medienwechsel war eine Abnahme der Glukoseaufnahme und der Laktatfreisetzung bis auf Werte nahe Null zu sehen. Nach dem zweiten Medienwechsel bei 144 h Kultivierungsdauer kam die Stoffwechselaktivität bezüglich Glukose und Laktat vollständig zum Erliegen.

Die Konzentration von Glutamin sank bis zum ersten Medienwechsel von $4,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $3,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab, die Ammoniumkonzentration stieg in dieser Zeit von $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an (Abbildung 4.-63). Der für diesen Zeitabschnitt berechnete $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ betrug 2,8 und lag damit extrem hoch und außerhalb des Bereiches, der für Glutamin als alleinige Quelle des entstehenden Ammoniums infrage kommt. Ab einer Zeit von 96 h kam die Glutaminaufnahme völlig zum Erliegen, für die Ammoniumkonzentration war bis zum Ende der Kultivierung ein leichter Anstieg auf Werte um $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen.

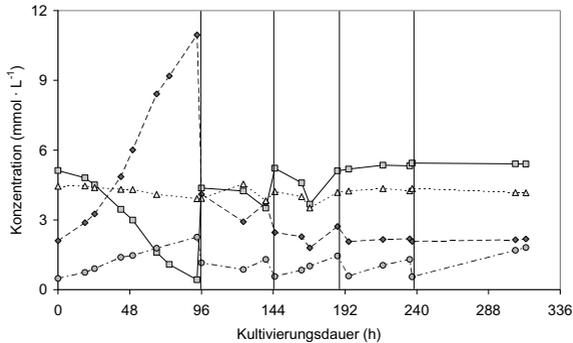


Abbildung 4-63: Profil der Konzentrationen von Glukose (—■—), Laktat (---◆---), Glutamin (-△-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 5 im 10 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,10), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 96, 144, 189 und 238 h Kultivierung

4.5.5.2 MEV-Vermehrung im Versuch MEV 5

In der ersten Virusernte nach 96 h p. i. wurde ein Virustiter von $10^{7,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ quantifiziert (Abbildung 4.-69). Auf diesem Niveau lag auch der Titer der zweiten Ernte nach 144 h. In den folgenden Ernten war ein Titerabfall um etwa jeweils eine log-Stufe bis auf $10^{4,7}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ in der letzten Ernte nach 316 h zu finden. Die MEV-Infektion bei einer moi von 0,10 in Verbindung mit einem 48 h-Ernteintervall führte damit in diesem Versuch zu hohen Virusausbeuten, die auf dem gleichen Niveau, das bereits im 1 L-Wave® Bioreaktor gezeigt werden konnte, lagen. Alle gewonnen Virusernten wären für eine Verwendung im kommerziellen MEV-Impfstoff geeignet gewesen. Damit war ein erfolgreicher Scale-Up des Verfahrens in den 10 L-Maßstab gelungen.

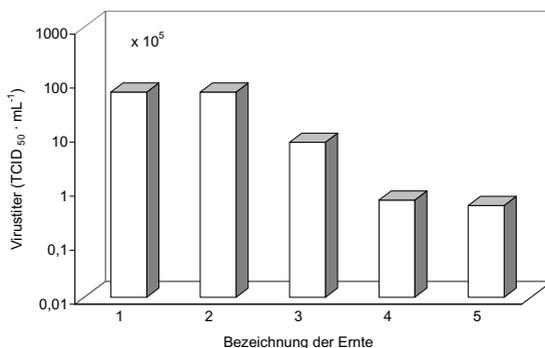


Abbildung 4-64: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 5 im 10 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,10) mit Ernte 1 nach 96 h, Ernte 2 nach 144 h, Ernte 3 nach 189 h, Ernte 4 nach 238 h und Ernte 5 nach 316 h

4.4.6 Vergleich der MEV-Vermehrung im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor

In Tabelle 4-7 sind die für eine Bewertung der MEV-Vermehrung relevanten Parameter Maximaltitel, Zahl der insgesamt produzierten, infektiösen Viruspartikel nach Gleichung 2.-28 und Produktivität nach Gleichung 2.-29 für die Versuche MEV 1 - 5 im Rührreaktor (0,5 L-Maßstab) und Wave® Bioreaktor (1 – 10 L-Maßstab) gegenübergestellt. Da teilweise in den Versuchen mehrere Reaktoren eingesetzt waren, wurde darauf geachtet, hinsichtlich der Parameter der Virusvermehrung (moi 0,01 und Ernteintervall ca. 48 h) gleiche bzw. zumindest ähnliche Reaktoren auszuwählen. Die Startzellzahl betrug in allen Kultivierungen $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, das sicherlich vorhandene Zellwachstum in einer kurzen Phase bis 48 h p. i. wurde für die Berechnung der Produktivität auf Grund der nicht ausreichenden Datenlage nicht mit betrachtet. Es ist zu beachten, dass auf Grund der Methodenschwankung der Titration von $\pm 0,3$ log-Stufen bei der Berechnung von Ausbeuten mit hohen Titern eine entsprechende Abweichung zu großen Fehlern führen kann. Die Angabe der Erntevolumina stellt die Summe der einzelnen Ernten unter Berücksichtigung des im Reaktor verbleibenden Volumens von 10 % (Volumen der Microcarrier) dar.

Tabelle 4-7: Ausgewählte Parameter zur MEV-Vermehrung in Cytodex™ 1 Microcarriersystemen im Rührreaktor (0,5 L-Maßstab) und Wave® Bioreaktor (1 – 10 L-Maßstab)

Versuch	Maximaltiter (TCID ₅₀ · mL ⁻¹)	Gesamtausbeute I _{VP} (infektiöse Partikel)	Produktivität (I _{VP} /Zelle)
Versuch MEV 1 (0,5 L ww Rührreaktor, 3 Ernten, 1,4 L)	10 ^{7,0} nach 103 h p. i.	6,6 · 10 ⁹	33
Versuch MEV 2 (0,5 L ww Rührreaktor, 6 Ernten, 2,7 L)	10 ^{7,3} nach 139 h p. i.	1,7 · 10 ¹⁰	85
Versuch MEV 3 (1 L ww Wave® Bioreaktor, 4 Ernten, 3,6 L)	10 ^{6,7} nach 154 h p. i.	3,8 · 10 ⁹	19
Versuch MEV 4 (1 L ww Wave® Bioreaktor, 6 Ernten, 4,5 L)	10 ^{6,7} nach 96 h p. i.	6,2 · 10 ⁹	31
Versuch MEV 5 (10 L ww Wave® Bioreaktor, 5 Ernten, 47,5 L)	10 ^{7,0} nach 96 h p. i.	2,0 · 10 ¹¹	100

Die bei der Vermehrung von MEV in E-FL Microcarriersystemen erreichten Maximaltiter lagen relativ gleichmäßig auf einem Niveau von 10^{6,7} – 10^{7,3} TCID₅₀ · mL⁻¹ und wurden nach 96 – 154 h p. i. erreicht (Tabelle 4-7). Signifikante Unterschiede in den Maximaltitern zwischen Rührreaktor und Wave® Bioreaktor konnten nicht herausgearbeitet werden. Die höchsten Gesamtausbeuten wurden im 10 L ww Wave® Bioreaktor (Versuch MEV 5) mit 2,0 · 10¹¹ infektiösen Partikeln und im 0,5 L-Rührreaktor (Versuch MEV 1) mit 1,7 · 10¹⁰ infektiösen Partikeln erreicht. Die Ausbeuten in den anderen Experimenten lagen auf etwa gleichem Niveau im Bereich von 3,8 – 6,9 · 10⁹ infektiösen Partikeln. Daraus resultierend berechnet sich auch die höchste Produktivität im 10 L ww Wave® Bioreaktor beim Versuch MEV 5 mit 100 infektiösen Partikeln pro Zelle bei Einsaat. Im Versuch MEV 2 wurden 85 infektiöse Partikel pro Zelle erreicht. Die Produktivitäten in den anderen Experimenten lagen im Bereich von 19 – 33 infektiösen Partikeln pro Zelle. Anhand der in Tabelle 4-7 dargestellten Daten lässt sich belegen, dass sowohl E-FL Microcarriersysteme im Rührreaktor als auch im Wave® Bioreaktor geeignete Systeme zur Vermehrung von MEV darstellen. Auch der Scale Up im Wave® Bioreaktor von 1 L ww auf 10 L ww kann als erfolgreich herausgestellt werden.

4.5 Transfer des MEV-Produktionsprozesses in ein kontinuierliches Ernteverfahren unter Perfusionsbedingungen

In den gezeigten Versuchen konnte die erfolgreiche MEV-Vermehrung in Microcarriersystemen in Rührreaktoren und Wave[®] Bioreaktoren bis zum 10 L-Maßstab unter Anwendung von Mehrfachernte-Strategien gezeigt werden. Schwerpunkt war dabei die Variation von moi und Ernteintervall. Bereits mit diesen Verfahren wäre eine Umstellung des Herstellungsprozesses für die MEV-Komponente des Impfstoffes FEBRIVAC 3-PLUS wirtschaftlich und prozesstechnisch sinnvoll und möglich. Auf Grund der Besonderheiten des hier verwendeten biologischen Systems eines sich ausschließlich in S-Phase-Zellen replizierenden Virus ($\text{time of infection} = 0 \text{ h}$) und der Möglichkeit, die Kultur mehrfach zu ernten, lag es nahe zu versuchen, die Virusernte unter kontinuierlichen Bedingungen bei Rückhaltung der Zellen (Perfusion) durchzuführen. Im Folgenden werden dazu verschiedene Ansätze in 0,5 L wv Rührreaktoren und 1 L wv Wave[®] Bioreaktoren vorgestellt.

4.5.1 Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 1 (0,5 L-Rührreaktor)

In einem ersten Versuch zur kontinuierlichen Virusernte wurden zwei 0,45 L wv Rührreaktoren mit WM gefüllt und entsprechend der in Kapitel 3.8.2 dargestellten Anordnung unter Verwendung des selbstentwickelten Perfusionsmoduls aufgebaut. Beide Reaktoren wurden mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert und bei einer toi von 0 h (Reaktor 1) und 24 h (Reaktor 2) mit MEV ($\text{moi} 0,01$) infiziert. Die kontinuierliche Virusernte (Perfusion) wurde nach 72 h in beiden Reaktoren mit einer Flussrate von $0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ gestartet. Das Feedmedium (EM) hatte die folgenden Startkonzentrationen: Glukose $5,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $3,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Virusernte wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten, nach 48 h Perfusionsdauer war die Vorlage von 1 L EM verbraucht und die Kultivierung wurde bis zum Kultivierungsende nach 200 h im Batch-Betrieb fortgeführt. Insgesamt lag das Volumen der Virusernte bei 1,45 L, dem entsprechen ungefähr drei Virusernten im bisher verwendeten Mehrfachernte-Schema.

4.5.1.1 Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 1

Nach einer Kultivierungsdauer von 24 h betrug die Zellzahl im Reaktor 1, der bereits mit MEV infiziert wurde (toi 0 h), $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit lag die Wiederfindungs-Rate bei 75 % (Abbildung 4.-65). Im Reaktor 2, der erst nach 24 h mit MEV infiziert wurde, lag die Zellzahl mit $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Wiederfindungs-Rate 100 %) höher. Bis zum Start der Perfusion (kontinuierliche Virusernte) nach 72 h nahm die Zellzahl in beiden Reaktoren auf $2,3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu. In der Perfusionsphase (72 – 120 h) sank die Zellzahl im Reaktor 1 signifikant auf $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, im 24 h später infizierten Reaktor 2 war hingegen eine konstante Zellzahl festzustellen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung (Batch-Phase von 120 – 200 h) war für Reaktor 1 eine weiter abnehmende Zahl der lebenden Zellen bis auf ein Niveau nahe Null zu sehen. Im Reaktor 2 war bis zum Ende der Kultivierung eine Zellzahl um $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu finden (Abbildung 4.-65). Diese Zellzahlen waren im Vergleich zu entsprechenden Ansätzen im Batch-Betrieb sehr hoch und sind damit als potentiell günstig für die MEV-Vermehrung einzuschätzen.

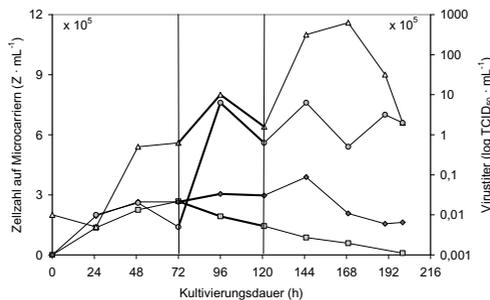


Abbildung 4.-65: Lebendzellzahlen (—■— Reaktor 1 toi 0 h und —●— Reaktor 2 toi 24 h) und der Virustiter als TCID_{50} (—▲— Reaktor 1 toi 0 h und —○— Reaktor 2 toi 24 h) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 120 h) im Rührreaktor (0,5 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 1

Im Reaktor 1 (toi 0 h) lag der Virustiter 24 h p. i. mit $10^{2.7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ leicht unterhalb des Titors bei Infektion mit $10^{3.0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Abbildung 4.-65). Bis zum Perfusionsstart nach 72 h war dann ein Anstieg des Virustiters auf $10^{5.0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu sehen. Während der kontinuierlichen Virusernte lag der Virustiter im Reaktor 1 in einem Bereich von $10^{5.0} - 10^{6.0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Probenahme direkt aus dem Erntestrom). Nach dem Ende der

Perfusionsphase ab 120 h war ein Anstieg des Titers auf maximal $10^{7,8}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ nach 169 h p. i. zu finden (Probenahme direkt aus dem Reaktor). Der mittlere Titer der bei 4 °C gehaltenen Ernte mit einem Volumen von 1 L lag bei $10^{5,2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹. Der Virustiter im Reaktor 2 (toi 24 h) lag 24 h p. i. bei $10^{2,7}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ und damit, wie in Reaktor 1, leicht unterhalb des Titers bei der Infektion (Abbildung 4.-65). Nach 72 h (48 h p. i.) zeigte der Titer einen leichten Abfall auf $10^{2,7}$ TCID₅₀ · mL⁻¹, erreichte dann jedoch in der Perfusionsphase Werte im Bereich von $10^{4,8} - 10^{5,8}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ (Probe direkt aus dem Erntestrom). In der Batch-Phase am Ende der Kultivierung stieg der Titer nicht wie in Reaktor 1 signifikant an, sondern verblieb auf diesem Niveau (Probenahme direkt aus dem Reaktor). Der mittlere Titer der gekühlten Ernte erreichte hier einen Wert von $10^{4,6}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ und lag damit signifikant unter dem Titer in Reaktor 1.

Die Variation des Infektionszeitpunktes hatte in den beiden Reaktoren deutliche Auswirkungen sowohl auf den zeitlichen Verlauf der Virusinfektion als auch auf die Höhe der Virusausbeuten. Eine toi von 0 h erwies sich auch unter Perfusionsbedingungen für die Virusausbeute als günstiger als ein um 24 h verschobener Infektionszeitpunkt. Der mittlere Erntetiter lag in beiden Reaktoren über dem Mindest-Titer von $10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹, der für die Verwendung im Impfstoff nötig ist. Als Optimum konnte in diesem Versuch die Perfusion im Reaktor 1 mit einem Titer von $10^{5,2}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ in 1 L Erntevolumen (Perfusion) und die Ernte von 0,45 L Reaktorvolumen nach 169 h p. i. mit einem Titer von $10^{7,8}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ ermittelt werden.

4.5.1.2 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 1

Die Glukosekonzentration nahm in beiden Reaktoren bis zum Beginn der Perfusion nach 72 h von $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf etwa $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab (Abbildung 4.-71). Im gleichen Zeitraum stieg die Laktatkonzentration im Reaktor 1 (toi 0 h) auf $6,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, im Reaktor 2 (toi 24 h) war nach 72 h eine geringere Laktatkonzentration von $4,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ betrug für diesen Zeitraum 1,70 in Reaktor 1 und 0,93 in Reaktor 2. In der Perfusionsphase von 72 – 120 h war in beiden Ansätzen ein Anstieg der Glukosekonzentration von $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf Werte um $3,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu sehen. Die Laktatkonzentration fiel auf $3,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Reaktor 1 und $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Reaktor 2 (Abbildung 4.-71). In der Batch-Phase am Ende der Kultivierung war dann wieder ein Abfall der Glukosekonzentration auf $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Reaktor 1 und $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in Reaktor 2 zu erkennen. Analog dazu stiegen die Laktatkonzentrationen auf $7,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Reaktor 1 bzw. $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ im Reaktor 2.

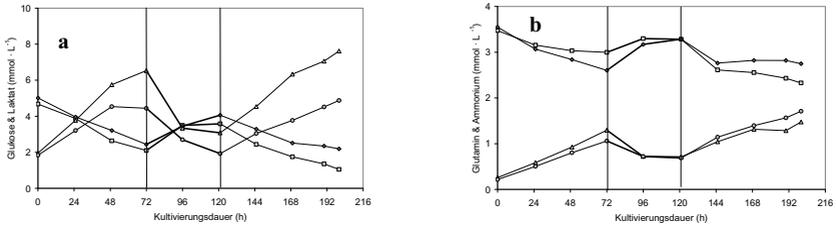


Abbildung 4.-66: Profil der Konzentrationen von a) Glukose (—■— Reaktor 1 toi 0 h, -+— Reaktor 2 toi 24 h) und Laktat (-▲- Reaktor 1 toi 0 h, -●- Reaktor 2 toi 24 h) und von b) Glutamin (—■— Reaktor 1 toi 0 h, -+— Reaktor 2 toi 24 h) und Ammonium (-▲- Reaktor 1 toi 0 h, -●- Reaktor 2 toi 24 h) bei Versuch MEV-Perfusion 1 im Rührreaktor (MEV-Infektion mit kontinuierlicher Virusernte), senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 120 h)

Die Konzentration von Glutamin sank in beiden Ansätzen auf Werte um $2,7 - 3,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 72 h ab. Für die Perfusionsphase war dann ein Anstieg bzw. später eine Konstanz bei etwa $3,2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ festzustellen (Abbildung 4.-65). In der Batch-Phase von 120 – 200 h sanken die Glutaminkonzentrationen auf ein Level von $2,6 - 3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ab. Für Ammonium war der entsprechende Verlauf zu finden. Einem Anstieg in der initialen Batch-Phase auf etwa $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in beiden Reaktoren folgte in der Perfusionsphase, wie durch den Medien austausch zu erwarten, ein Abfall auf $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und später die Zunahme auf etwa $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 200 h Kultivierung (Abbildung 4.-65).

4.5.2 Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 2 (1 L-Wave[®] Bioreaktor)

Im Versuch MEV-Perfusion 2 sollten die im vorherigen Versuch gewonnenen Erkenntnisse zur kontinuierlichen Virusernte im Rührreaktor genutzt und das Verfahren mit ähnlichen Parametern in einen 1 L *wv Wave*[®] Bioreaktor übertragen werden. Als Perfusionsystem kam das in Kapitel 3.8.1 beschriebene, selbst entwickelte Perfusionsmodul in der Adaptation für den *Wave*[®] Bioreaktor zum Einsatz. Der *Wave*[®] Bioreaktor wurde mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1 und $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert und die Kultur bei einer toi von 0 h mit MEV (moi 0,01) infiziert. Nach 72 h wurde die Perfusion (kontinuierliche Virusernte, Flussrate von $0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) gestartet. Das Feedmedium (EM) hatte die folgenden Startkonzentrationen: Glukose $5,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Virusernte wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten, nach 72 h Perfusionsdauer war die Vorlage von 1,5 L EM verbraucht und die Kultivierung wurde beendet.

4.5.2.1 Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 2

Die Zellzahl auf Microcarriern lag nach 24 h bei $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit betrug die Wiederfindungs-Rate 75 % (Abbildung 4.-67). Das Maximum der Zellzahl wurde nach 32 h mit $6,3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht, danach war, bedingt durch den Einfluss der Virusinfektion, bis zum Beginn der Perfusion ein kontinuierlicher Abfall der Zellzahl bis auf $3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu sehen. Während der Perfusionsphase (72 – 144 h) nahm die Zellzahl weiter ab und erreichte nach 120 h Werte nahe Null. Damit war ein ähnlicher Verlauf wie in der vorherigen Kultivierung im Versuch MEV-Perfusion 1 zu erkennen.

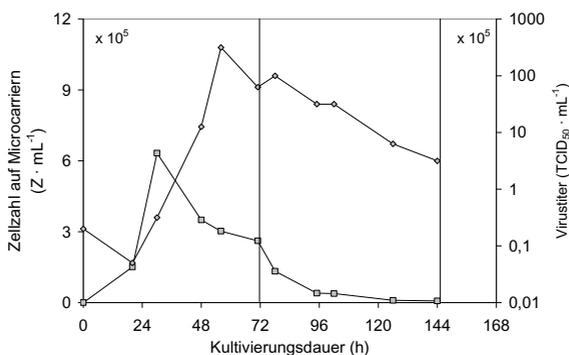


Abbildung 4.-67: Lebendzellzahlen (—■—) und Virustiter als TCID_{50} (---○---) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 144 h) im Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 2

Der Virustiter lag nach 20 h p. i. mit $10^{3,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ leicht unter dem Einsaat-Titer von $10^{4,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Abbildung 4.-67). Bis zum Beginn der Perfusionsphase 72 h p. i. war ein Anstieg des Virustiters auf ein Niveau zwischen $10^{6,8} - 10^{7,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu finden. In der Perfusionsphase von 72 – 144 h p. i. (Ende der Kultivierung) war eine Abnahme des Virustiters im Erntestrom auf Werte um $10^{5,5} - 10^{6,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu erkennen (Abbildung 4.-67). Der Titer der bei 4°C gehaltenen Ernte lag bei $10^{4,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit wäre die Virusernte von 2,5 L Volumen für die Herstellung einer MEV-Vakzine verwendbar.

4.5.2.2 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 2

Die Glukosekonzentration im Reaktor sank von etwa $6,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu Beginn der Kultivierung auf $2,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 72 h ab (Abbildung 4.-68). Im gleichen Zeitraum stieg die Laktatkonzentration von $1,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $5,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ für diesen Zeitraum betrug damit 1,1. Während der Perfusionsphase von 72 – 144 h war ein Anstieg der Glukosekonzentration auf $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung zu sehen. Die Konzentration von Laktat sank auf $2,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 144 h ab. Da diese Konzentrationen nahezu den Werten im zugeführten Medium entsprachen, war dies ein Indiz für den virusinduzierten Tod der Zellkultur im Reaktor, der auch visuell bzw. am Verlauf der Zellzahl ersichtlich war.

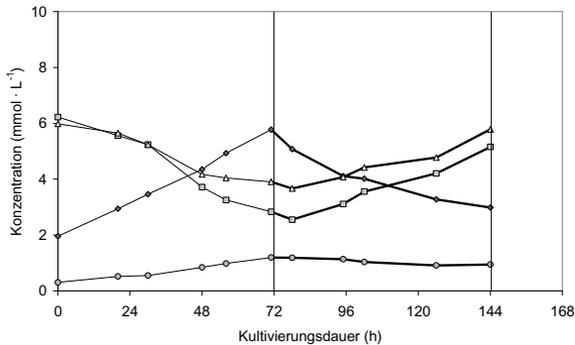


Abbildung 4.-68: Profil der Konzentrationen von Glukose (■), Laktat (◆), Glutamin (▲) und Ammonium (●) bei Versuch MEV-Perfusion 2 im Wave® Bioreaktor, senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 120 h)

Die Glutaminkonzentration sank von $5,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu Beginn des Experiments auf $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 72 h ab (Abbildung 4.-68). In dieser Zeit stieg die Ammoniumkonzentration von $0,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an, der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ betrug hier 0,4. In der Phase der Perfusion (72 – 144 h) war, ähnlich wie für Glukose und Laktat, ein Anstieg der Glutaminkonzentration auf $5,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und eine Abnahme der Ammoniumkonzentration auf $0,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung zu sehen (Abbildung 4.-68).

4.5.3 Kontinuierliche Virusernte im Versuch MEV-Perfusion 3 (1 L-Wave® Bioreaktor)

In einem weiteren Versuch zur kontinuierlichen Virusernte im Wave® Bioreaktor sollten die im vorherigen Versuch erzielten Ergebnisse verifiziert werden. Alle Ansatzparameter wurden daher bis auf geringfügige Änderungen (Startzellzahl, Perfusionsbedingungen) konstant gehalten. Zur Zellrückhaltung wurde auch hier das in den Kapiteln 3.8.1 und 3.8.2 vorgestellte, selbst entwickelte Perfusionsmodul eingesetzt. Der Wave® Bioreaktor wurde mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 und $3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert und die Kultur bei einer t_{01} von 0 h mit MEV (moi 0,01) infiziert. Als Kontrolle wurde eine T 175–Gewebekulturflasche mitgeführt, die während des Versuches typisches Wachstum zeigte. Nach 68 h wurde die Perfusion (kontinuierliche Virusernte mit einer Flussrate von $0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$) gestartet. Das Feedmedium (EM) hatte folgende Startkonzentrationen: Glukose $5,3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Laktat $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Glutamin $4,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und Ammonium $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Virusernte wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten, nach ca. 96 h Perfusionsdauer war die Vorlage von 2 L EM verbraucht und die Perfusion wurde nach ca. 168 h beendet. Der Versuch wurde danach noch 93 h im Batch-Betrieb weitergeführt. Der Reaktorinhalt wurde damit 2-mal vollständig ausgetauscht und eine Ernte von insgesamt 3 L virushaltigem Material erzielt.

4.5.3.1 Zellwachstum der E-FL und Ausbeute von MEV im Versuch MEV-Perfusion 3

Nach 24 h wurden $2,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf den Microcarriern gezählt, die Wiederfindungs-Rate lag damit auf einem hohen Level von 83 % (Abbildung 4.-69). Bis zum Beginn der Perfusionskultivierung nach 72 stieg die Zellzahl auf von ca. $5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ an. Während der Perfusion (72 – 168 h) verblieb die Zellzahl trotz der Virusinfektion dann auf einem Level von $4,0 - 5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Mit Beginn des Batch-Betriebs (168 – 261 h) war ein starker Abfall der Zellzahl auf Werte von $0,5 - 1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ am Ende der Kultivierung festzustellen (Abbildung 4.-69). Der Virustiter lag 24 h p. i. bei $10^{1,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ und damit signifikant unter dem Einsaat-Titer von $10^{4,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$. Bereits 48 h p. i. war ein Anstieg auf $10^{3,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ festzustellen, dieser setzte sich bis zum Beginn der Perfusion nach 72 h p. i. auf $10^{6,3} - 10^{7,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ fort (Abbildung 4.-69). Während der Perfusion kam es zu einem rapiden Abfall des Virustiters auf Werte zwischen $10^{3,0} - 10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Probenahme im Erntestrom). Mit dem Beginn der finalen Phase im Batch-Betrieb war wieder ein Anstieg des Virustiters im Reaktor auf ein Niveau von $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu sehen. Der Gesamt-Titer der bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gehaltenen Ernte betrug $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$.

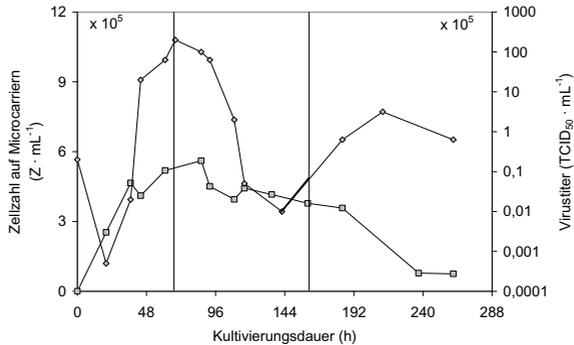


Abbildung 4-69: Lebendzellzahlen (—■—) und Virustiter als TCID₅₀ (—○—) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 168 h) im Wave[®] Bioreaktor (1 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 3

4.5.3.2 Stoffwechsel der E-FL im Versuch MEV-Perfusion 3

Die Konzentration von Glukose sank von der Ausgangskonzentration von $4,9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ zu Beginn der Perfusionsphase nach 72 h (Abbildung 4.-70) ab. Im gleichen Zeitraum stieg die Laktatkonzentration von $1,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $7,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Der Ausbeutekoeffizient $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}}$ betrug für diese Zeit 1,84. Während der Perfusion (72 – 168 h) stieg die Glukosekonzentration langsam und verblieb dann auf einem Niveau von $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Laktatkonzentration sank und blieb bei etwa $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ konstant. In der Batch-Phase am Ende des Versuches war eine Abnahme der Glukosekonzentration bis auf $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und ein Anstieg von Laktat auf $6,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ erkennbar. Die Glutaminkonzentration sank von $3,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bis auf $3,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 72 h. In der gleichen Zeit stieg die Konzentration von Ammonium von $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $1,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an (Abbildung 4.-70). Während der Perfusion (72 – 168 h) blieb die Glutaminkonzentration etwa bei $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und die Ammoniumkonzentration bei $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ konstant. In der abschließenden Phase im Batch-Betrieb war eine konstante Glutaminkonzentration bei $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ und eine bis auf $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ steigende Ammoniumkonzentration zu verzeichnen. Diese Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, dass für die Ammoniumfreisetzung auch andere Aminosäuren außer Glutamin in Frage kommen.

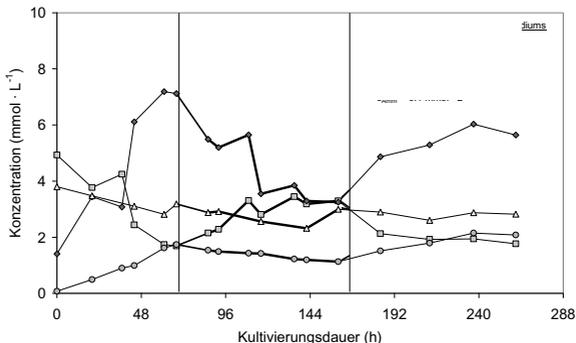


Abbildung 4-70: Profil der Konzentrationen von Glukose (■-■-), Laktat (◆-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV-Perfusion 3 im Wave[®] Bioreaktor, senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 168 h

4.6 Durchflusszytometrische Untersuchungen zum E-FL Wachstums und zur MEV-Vermehrung im Rührreaktor

Die im Folgenden dargestellten Studien zur durchflusszytometrischen Untersuchung des E-FL Wachstums und der MEV-Vermehrung sollten zur näheren Charakterisierung des Herstellungsprozesses dienen (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Die gewonnenen Aussagen zur Zellzyklus-Verteilung während der einzelnen Kultivierungsphasen und zum Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in der Zellpopulation sollten die Möglichkeit eröffnen, den Kultivierungsprozess ohne Virusinfektion auf seine Eignung zur Zellkultivierung zu evaluieren und andererseits den Einfluss einer Virusinfektion auf die Zellkultur zu charakterisieren. Das Durchflusszytometer EPICS XL (Beckman Coulter, Deutschland) stand erst zu diesem Zeitpunkt der Arbeit für zwei abschließende Experimente (ohne und mit MEV-Infektion) zur Verfügung. Die verwendeten Methoden wurden von Josef Schulze-Horsell erarbeitet und sind im Kapitel 3.6.5 dargestellt.

4.6.1 Durchflusszytometrische Untersuchung einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

In diesem Versuch sollte eine Kultivierung von E-FL im 5 L-Rührreaktor durchgeführt werden, um durch die durchflusszytometrische Analyse zu einer Bewertung des etablierten Zellkultivierungsverfahrens ohne Einfluss einer MEV-Infektion im Microcarriersystem zu kommen. Eine besondere Rolle dafür spielt neben der Zellzyklus-Verteilung der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen, der während der gesamten Kultivierung möglichst gering ($< 5 - 10 \%$) bleiben sollte. Die Werte für den Anteil der Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus ergeben in Summe theoretisch 100 %. Die Summe des Anteils der Zellen in Apoptose und Nekrose ergibt den Wert der toten Zellen (%), der Anteil der vitalen Zellen ergibt sich aus 100 %, verringert um den Anteil der toten Zellen. Der Rührreaktor wurde mit 4,5 L wv WM mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 befüllt und mit $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert. Im 24 h-Intervall wurden Proben entnommen und entsprechend der im Kapitel 3.6.5 dargestellten Methoden analysiert. Alle weiteren Prozessbedingungen wurden entsprechend der in Kapitel 3.5.3 dargestellten Parameter eingestellt. Auf den Stoffwechsel wird hier nicht näher eingegangen, die ermittelten Werte stimmen in der Größenordnung mit den in Kapitel 4.2 gezeigten Daten (Kultivierung 1 – 3) überein.

4.6.1.1 Zellwachstum und -morphologie einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

Nach 19 h lag die Zellzahl bei $1,2 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit ergab sich eine Wiederfindungs-Rate von 80 % (Abbildung 4-71). Im weiteren Verlauf war die Zunahme der Zellzahl bis auf ein Maximum von $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 120 h zu sehen. Die Zellzahl blieb für etwa 48 h auf diesem Niveau und begann nach 168 h rapide zu sinken. Am Ende der Kultivierung nach 212 h waren noch $1,1 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf den Microcarriern vorhanden. Im Intervall von 24 – 96 h wurde eine maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} von $0,022 \text{ h}^{-1}$ ermittelt (Abbildung 4-71). Dem entsprach eine Verdopplungszeit von 31,5 h. Die Kultivierung kann sowohl bezüglich der Zellausbeuten und Parameter des Zellwachstums als auch der morphologischen Eigenschaften der Kultur (Bilder nicht gezeigt) als Standardkultivierung der E-FL im 5 L-Maßstab bezeichnet werden. Die im Folgenden gezeigten Werte für die Verteilung des Zellzyklus und des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen können damit vermutlich als repräsentativ für alle Kultivierungen mit ähnlichen Start- und Kultivierungsbedingungen gesehen werden.

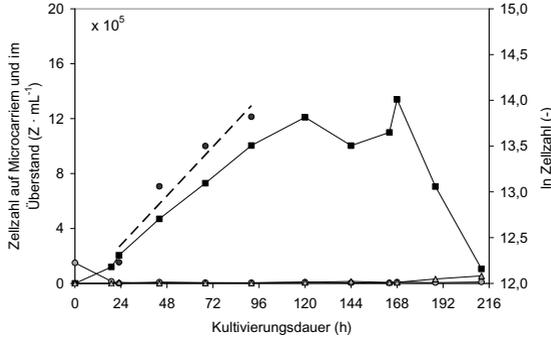


Abbildung 4.-71: Zellzahlen (lebend und tot) auf Microcarriern und im Überstand einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- lebende Zellen auf Microcarriern, -- lebende Zellen im Überstand, -▲- tote Zellen im Überstand und -●- \ln der Zellzahlen auf Microcarriern mit Regressionsgerade

4.6.1.2 Zellzyklus und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

Zu Beginn der Kultivierung lag der Anteil der Zellen in der G_0/G_1 -Phase bei 60 %, der Zellen in der G_2 -Phase bei 10 % und der in der S-Phase befindlichen Zellen bei 20 % (Abbildung 4.-72). Nach 24 h war der Anteil der G_0/G_1 -Phase auf 35 % gesunken, gleichzeitig stiegen die Anteile der Zellen in der G_2/M -Phase auf 25 % und der S-Phase auf 35 %. Der höchste Anteil von Zellen in der S-Phase war nach 48 h mit 46 % zu sehen. Zu dieser Zeit lag der Anteil der G_0/G_1 -Phase konstant bei 35 %, der Anteil der G_2 -Phase bei 18 %. Tendenziell war im weiteren Verlauf der Kultivierung die Abnahme des Anteils von Zellen in der S-Phase bis auf ein Niveau von 15 – 20 % zum Ende der Kultivierung hin zu sehen. In dieser Zeit stieg der Anteil der Zellen in der G_0/G_1 -Phase auf ein Niveau von 70 – 80 %. Der Anteil von Zellen in der G_2/M -Phase blieb bis zum Ende der Kultivierung konstant bei 10 – 15 %.

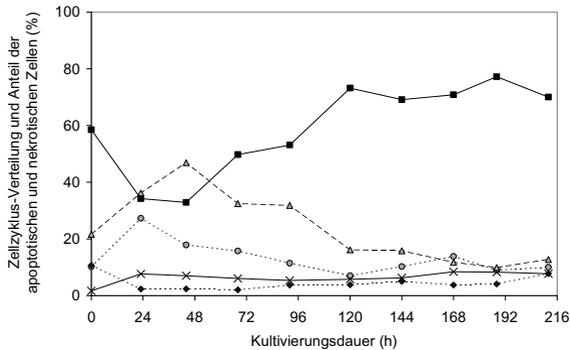


Abbildung 4-72: Zellzyklus-Verteilung und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- Zellen in der G₀/G₁ - Phase, -○- Zellen in der S-Phase, -△- Zellen in der S-Phase, -◇- Zellen in Apoptose und -X- Zellen in Nekrose

Der Anteil apoptotischer Zellen (Vorkultur, Zellen aus dem Überstand) betrug zu Beginn der Kultivierung etwa 10 %, ca. 3 % der Zellen waren nekrotisch. Dies wurde sehr wahrscheinlich durch den Transfer der Vorkultur (Trypsinwirkung) in den Rührreaktor verursacht. Im weiteren Verlauf des Experiments lag der Anteil apoptotischer Zellen bei etwa 5 %, der Anteil nekrotischer Zellen bei etwa 7 % (Abbildung 4.-72). Dabei sind Zellen aus dem Überstand und Zellen auf den Microcarriern insgesamt untersucht wurden. Nach den vorliegenden Daten der Zellzahlen ist der Anteil von Zellen im Überstand vernachlässigbar gering (Abbildung 4.-71).

4.6.2 Durchflusszytometrische Untersuchung einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

In diesem Experiment sollte eine Kultivierung von E-FL im 5 L-Rührreaktor mit Einfluss einer MEV-Infektion durchgeführt werden, um durch die durchflusszytometrische Analyse zu einer zusätzlichen Charakterisierung des etablierten Zellkultivierungsverfahrens und der MEV-Vermehrung in diesem System zu gelangen. Auch hier wurden wie im vorherigen Versuch ohne MEV-Infektion die Zellzyklus-Verteilung und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen gemessen und bewertet. Der Rührreaktor wurde mit 4,5 L wv WM mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 befüllt und mit $2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert. Da kein Medienwechsel geplant war, wurde im Gegensatz zu bisherigen Versuchen in diesem Experiment WM (mit FCS) auch zur Virusvermehrung eingesetzt, um zu Beginn ein Anheften der Zellen an die

Microcarrier zu gewährleisten. Typische Produktionen von MEV kommen aus Kostengründen nach dem ersten Medienwechsel ohne die Zugabe von Serum aus; es sind jedoch durch das Serum keine negativen Auswirkungen auf den Infektionsverlauf oder die Virusausbeuten zu erwarten. Die Kultur wurde bei einer toi von 0 h, d. h. direkt bei Zelleinsaat mit MEV bei einer moi von 0,01 infiziert. Im 24 h-Intervall wurden Proben entnommen und entsprechend der im Kapitel 3.6.5 dargestellten Methoden analysiert. Alle weiteren Prozessbedingungen wurden entsprechend der in Kapitel 3.5.3 dargestellten Parameter eingestellt. Auf den Stoffwechsel wird auch hier nicht näher eingegangen, die ermittelten Werte stimmen mit den in Kapitel 4.3 für das Sixfors-System gezeigten Daten überein.

4.6.2.1 Zellwachstum und -morphologie einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

Nach 24 h betrug die Zellzahl auf Microcarriern $0,4 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, damit wurde nur eine geringe Wiederfindungs-Rate von 20 % erreicht (Abbildung 4.-73). Hier machte sich wahrscheinlich bereits der Einfluss der MEV-Infektion bemerkbar. Im weiteren Verlauf der Kultivierung war keine Zunahme der Zellzahl zu sehen. Nach ca. 120 h Kultivierungsdauer waren keine lebenden Zellen mehr auf den Microcarriern nachzuweisen. Diese Zellzahlen konnten durch entsprechende mikroskopische Aufnahmen (Bilder nicht gezeigt) bestätigt werden. In diesem Versuch wurden keine Virusausbeuten quantifiziert. Auf Grund des Verlaufes der Zellzahlen und von Erfahrungen der bisherigen Versuche wird von Virustitern im Bereich von $10^{6,0} - 10^{7,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 72 – 120 h p. i. ausgegangen.

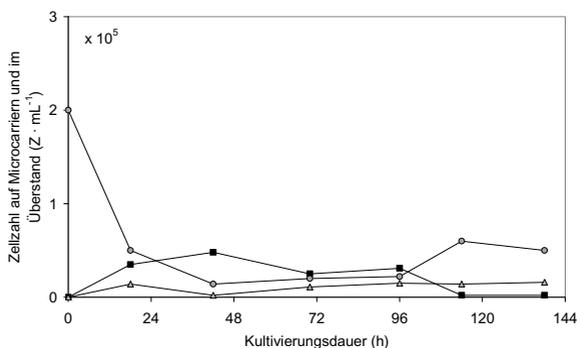


Abbildung 4.-73: Zellzahlen (lebend und tot) auf Microcarriern und im Überstand einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- lebende Zellen auf Microcarriern, -○- lebende Zellen im Überstand und -▲- tote Zellen im Überstand

4.6.2.2 Zellzyklus und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab)

Auf Grund der Virusinfektion gestaltete es sich in diesem Versuch prinzipiell als sehr schwierig, die für die durchflusszytometrischen Analysen geforderte Mindest-Zellzahl von $2,0 \cdot 10^6$ Zellen/Probe (Untersuchung von $1,0 \cdot 10^4$ Zellen/Analyse) in der Probe zu erreichen. Durch Entnahme von Proben mit ca. 100 mL Volumen und Poolen der Zellen konnte für alle Proben nur eine Zellzahl von etwa $0,2 \cdot 10^4$ Zellen untersucht werden. Die so gewonnenen und im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind unter diesem Aspekt zu bewerten.

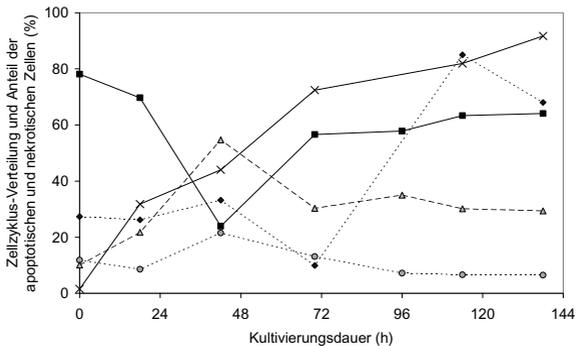


Abbildung 4-74: Zellzyklus-Verteilung und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- Zellen in der G₀/G₁ – Phase, -○- Zellen in der G₂ – Phase, -▲- Zellen in der S-Phase, -◆- Zellen in Apoptose und -X- Zellen in Nekrose

Am Anfang der Kultivierung lag der Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase bei 78 %, der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase und der in der S-Phase befindlichen Zellen bei jeweils 10 % (Abbildung 4-74). Nach 24 h sank der Anteil der G₀/G₁-Phase auf 70 % und dann weiter rapide auf 24 % nach 48 h. Gleichzeitig stiegen die Anteile der Zellen in der G₂/M-Phase auf ein Maximum von 22 % und der S-Phase auf ein Maximum von 55 % jeweils nach 48 h. Im weiteren Verlauf der Kultivierung war dann tendenziell wieder eine Zunahme des Anteils der Zellen in der G₀/G₁-Phase auf ein Niveau von 50 – 60 % und eine Abnahme der Zellen in G₂-Phase und S-Phase auf 10 % bzw. 30 % bis zum Ende des Experiments zu erkennen. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug zu Beginn der Kultivierung etwa 27 %, ca. 1,5 % der Zellen befanden sich in nekrotischem Zustand. Im weiteren Verlauf des Experiments blieb der Anteil der Zellen in Apoptose bis 72 h p. i. zunächst etwa auf gleichem

Niveau, stieg dann zum Ende der Kultivierung rasant auf 70 – 90 % an. Der Anteil nekrotischer Zellen stieg kontinuierlich von 1,5 % auf Werte von 70 % nach 72 h p. i. und weiter auf ein Niveau von 90 % am Ende der Kultivierung nach 138 h p. i. (Abbildung 4.-74).

Im Vergleich der Kultivierung ohne MEV-Infektion (Kapitel 4.6.1) und dieser Kultivierung mit MEV-Infektion waren deutliche Unterschiede im Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen zu finden. Der Anteil toter Zellen war im infizierten Reaktor bereits 24 h p. i. hoch und stieg im weiteren Kultivierungsverlauf stark an. Im nicht-infizierten Reaktor lag dieser Anteil in Summe (Apoptose und Nekrose) während der gesamten Kultivierung bei maximal 10 – 15 %. Der Verlauf der Zellzyklus-Verteilung war hingegen in beiden Reaktoren ähnlich. Ausgehend von einem mit 70 – 80 % hohen Anteil ruhender Zellen (G_0 -Phase) begannen die Zellen mit der Zellteilung. Der Anteil S-Phase-Zellen war in beiden Reaktoren nach ca. 36 – 48 h mit 50 – 60 % am höchsten. Danach war wieder eine Zunahme der Zellen in der G_0/G_1 -Phase auf nahezu das Ausgangsniveau zu sehen. Auch der Verlauf der G_2/M -Phase war in beiden Reaktoren ähnlich, ein Maximum wurde mit ca. 20 % nach 24 – 36 h erreicht, danach war eine Abnahme und Konstanz bei 10 % Anteil zu finden.

5 **Diskussion**

Das Ziel der Dissertation war die Entwicklung eines Herstellungsverfahrens für einen MEV-Impfstoff in Microcarriersystemen (Wave[®] Bioreaktor) bis zum 10 L Maßstab. Die daraus resultierenden Schwerpunkte der Arbeit sind im Kapitel 1 formuliert und die Ergebnisse im Kapitel 4 detailliert dargestellt worden. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse im Hinblick auf die eingangs gestellten Ziele diskutiert, bewertet und mit anderen Impfstoffherstellungsprozessen verglichen werden. Eine Zusammenfassung und ein Ausblick zu möglichen weiteren Schritten der Verfahrensoptimierung sollen dann die Arbeit beschließen.

5.1 ***Wachstum und Stoffwechsel der E-FL sowie Vermehrung von MEV in statischen Systemen***

Zunächst sollten das Wachstum und der Stoffwechsel der E-FL sowie die MEV-Vermehrung in statischen Systemen (Gewebekulturflasche, Rollerflasche) charakterisiert werden. Dadurch wurden eine vertiefte Prozesskenntnis des bereits am IDT etablierten Herstellungsprozesses für MEV in Rollerflaschen (Status Quo) und auch Vergleichs- bzw. Ansatzpunkte für die geplante Entwicklung eines Microcarrierprozesses im nächsten Schritt der Verfahrensoptimierung erwartet.

5.1.1 **Zellwachstum der E-FL in statischen Systemen**

Das Zellwachstum von E-FL wurde in Gewebekulturflaschen und Rollerflaschen quantitativ erfasst. Die Zellzahlbestimmung in Rollerflaschen war aus technischen Gründen (keine vollständige Entleerung der verwendeten Rollerflaschen, 10 – 15 % Verlust, auch stärkere Agglomeration der Zellen als in Gewebekulturflaschen) mit einem großen Fehler behaftet. Daher soll hier nur auf die in Gewebekulturflaschen bestimmten Zellzahlen eingegangen werden. Ausgehend von Einsaat-Zellzahlen von $0,4 - 0,7 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$, erreichten die E-FL Zellkulturen mit einer mittleren Wachstumsrate μ_{\max} von $0,017 \text{ h}^{-1}$ nach drei bis vier Tagen Konfluenz. Die volumetrische Zellausbeute lag demnach bei $3,0 - 4,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die flächenbezogene Zellzahl bei einem Konfluenzgrad von 100 % wurde mit $2,0 - 2,6 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ bestimmt (Tabelle 4.-3). Die Berechnung der Fläche einer einzelnen E-FL Zelle bei Konfluenz ergab nach diesen Werten ca. $430 \mu\text{m}^2$ und lag damit um ca. 45 %

niedriger als die in Kapitel 3.9.2 beschriebenen, mit Kernfarbstoff gefärbten und elektronisch vermessenen E-FL Zellen. Die Ursachen für diese abweichenden Werte liegen im relativ großen Fehler bei der Zellzahlbestimmung und möglicherweise auch in der Auswahl einer nicht völlig konfluenten Kultur bei der Größenbestimmung bzw. in den Schwierigkeiten, die bei der Abgrenzung von Einzelzellen in einem geschlossenen Zellrasen auftreten. Der Vergleich mit erreichten Zellzahlen und Wachstumsraten im statischen System aus anderen Arbeiten mit MDBK, MDCK, MRC-5 und VERO-Zellen bestätigt jedoch die hier genannten Werte [Doyle, A. und Griffith, B. 1998, Reichl, U. und Bock, A. 2003]. Pohlscheidt ermittelte z. B. für MDBK-Zellen, die an serumfreie Bedingungen adaptiert wurden, leicht höhere Wachstumsraten von $0,024 \text{ h}^{-1}$ und Zellausbeuten von $1,0 - 3,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^2$ im statischen System [Pohlscheidt, M. 2005]. In diesem Zusammenhang muss aber auf die unterschiedliche Größe von verschiedenen Zelltypen bzw. das unterschiedliche Wachstumsverhalten von Zellen in Abhängigkeit von Zellkulturmedien und Kultivierungsbedingungen hingewiesen werden. Es wird angenommen, dass die hier erreichten Zellzahlen im Batch-Betrieb unter Verwendung eines Minimalmediums die maximal erreichbaren Ausbeuten im statischen System darstellen. Die Kultur war nach Erreichen der Konfluenz flächenlimitiert, ein mehrschichtiges Wachstum (Multilayer) von E-FL oder vergleichbaren Katzenlungen-Fibroblasten wurde nie beobachtet und ist auch in der Literatur nicht dokumentiert.

5.1.2 Stoffwechselraten der E-FL in statischen Systemen

Die für E-FL Zellen im statischen System ermittelten Stoffwechselraten sind in Tabelle 4.-3 zusammengefasst. Die spezifische Glukoseaufnahme q_{Gluk} ($1,90 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) scheint nach diesen Daten leicht höher als die spezifische Glutaminaufnahme ($1,11 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) zu sein, dies steht im Widerspruch zum allgemein in der tierischen Zellkultur geltenden Grundsatz, dass Glutamin das wichtigere Substrat für die Zellen sei [Storhas, W. 2003, Freshney, R. I. 2005]. Allerdings wurde eine hohe Glutaminaufnahme besonders bei primären Zellen und bei Hybridoma-Zellen beobachtet [Pörtner, R. et al. 1994, Haggström, L. et al. 1996]. Hiervon unterscheiden sich die E-FL Zellen auf Grund ihrer Historie und der Einordnung als permanente Zelllinie deutlich. Wichtig bei der Betrachtung von Aufnahme- und Bildungs-raten sind auch der physiologische Zustand der Zellen und die Betriebsweise des Kultivierungssystems [Doyle, A. und Griffith, B. 1998, Freshney, R. I. 2005]. Die Literaturwerte schwanken relativ stark und liegen im Bereich von $7,0 \cdot 10^{-12} - 5,0 \cdot 10^{-10} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die Glukoseaufnahme,

$2,4 \cdot 10^{-10} - 1,0 \cdot 10^{-11} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die Laktatfreisetzung, $5,7 \cdot 10^{-10} - 4,0 \cdot 10^{-11} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die Glutaminaufnahmerate und $5,0 \cdot 10^{-10} - 3,0 \cdot 10^{-11} \text{ mmol} \cdot \text{Z}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ für die Ammoniumfreisetzung [Doyle, A. und Griffith, B. 1998, Reichl, U. und Bock, A. 2003, Pohlscheidt, M. 2005, Möhler, L. 2006]. Diese Schwankungsbreite verdeutlicht, dass die ermittelten Raten für die E-FL Zellen in der Größenordnung durchaus mit Werten anderer Zellen übereinstimmen.

Weiterhin fallen in der Rollerflaschenkultur im Vergleich zu Gewebekulturflaschen leicht höhere Werte für die Ausbeutekoeffizienten $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amm/Gln}}$ auf. Die erreichten Maximalkonzentrationen für die Metabolite Laktat und Ammonium liegen bei $6,0 - 7,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ für Laktat und $2,0 - 3,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ für Ammonium. Unterschiede zwischen E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen und Rollerflaschen waren dabei nicht zu sehen (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2). Die Laktatkonzentrationen sind dabei als unkritisch und sehr wahrscheinlich, außer durch ihre pH-senkende Wirkung (Kapitel 4.1.1), als nicht inhibierend für das Zellwachstum einzuschätzen. Als inhibierend wurden Konzentrationen von $> 20,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ beschrieben [Hassel, T. et al. 1991, Lüdemann, I. et al. 1994]. Problematischer erscheinen die zum Ende der Kultivierung erreichten Ammoniumkonzentrationen von $> 2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Diese Konzentrationswerte wurden bereits als kritisch für das Wachstum tierischer Zellen beschrieben [Hassel, T. et al. 1991]. Hier wäre zu prüfen, ob ggf. eine Verringerung der Glutaminstartkonzentration von $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ eine Verbesserung, d. h. eine Verringerung der Ammoniumkonzentrationen bei gleich bleibendem Zellwachstum, bringen kann.

Die Verbrauchs- und Bildungsraten der Metabolite für MEV-infizierte E-FL Kulturen zeigen im Vergleich zu Kontrollen ein uneinheitliches Bild (Tabelle 4.-3). Teilweise sind diese Raten bei den infizierten Kulturen, gerade am Anfang der Kultivierung, deutlich höher, in manchen Fällen aber auch geringer als in den Kontrollen. Eine deutliche Tendenz zeigen jedoch die Yield-Faktoren $Y_{\text{Lak/Gluk}}$ und $Y_{\text{Amm/Gln}}$. Diese liegen in den infizierten Ansätzen signifikant über den Werten der Kontrolle. In keinem Fall kann von einem sofortigen und deutlichen Einfluss der MEV-Infektion auf den Stoffwechsel der E-FL gesprochen werden, wie es auf Grund von Literaturangaben für andere Zell-Virusssysteme, wie z. B. MDCK-Zellen und Influenza, zu erwarten wäre [Genzel, Y. et al. 2004 und 2006]. Offensichtlich zeigen Parvoviren, zumindest im untersuchten Zeitraum, einen deutlich geringeren Einfluss auf den Zellstoffwechsel als andere Viren bzw. es kommt zu Überlagerungseffekten mit der Freisetzung intrazellulärer Pools lysierter Zellen.

5.1.3 MEV-Vermehrung in statischen Systemen

Der Einfluss der MEV-Infektion auf die E-FL Zellen war bereits 24 – 36 h p. i., in Abstufung zur Höhe der moi , an einem im Vergleich zur Kontrolle verringerten bzw. veränderten Zellwachstum zu erkennen. In allen Fällen kam es nicht zu einer Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, sondern 72 – 120 h p. i. zum Tod der Zellkultur (Abbildung 4.-7). Versuche zur Optimierung der time of infection (toi) belegten, dass nur toi's von 0 – 12 h für eine erfolgreiche MEV-Infektion und das Erreichen hoher Virusausbeuten sinnvoll sind. Damit wurden theoretische Überlegungen, Literaturkenntnisse zur Infektion von Parvoviren bzw. die in Standardarbeitsanweisungen von IDT getroffenen Festlegungen und die dort beinhalteten Erfahrungen zur Herstellung des Impfstoffes gegen MEV bestätigt (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4).

Die erreichten Virusausbeuten im Einfachernte-Schema lagen in Gewebekulturflaschen und in Rollerflaschen mit Maximaltitern von $10^{6,5} - 10^{6,6} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 72 – 96 h p. i. auf vergleichbarem Niveau. Im Mehrfachernteschema, welches nur in Rollerflaschen untersucht wurde, lagen die Titer bei einer moi von 0,01 bei $10^{5,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit vier Ernten. Die insgesamt generierte Zahl der infektiösen Viruspartikel I_{VP} lag demnach nach Gleichung 2.-28 im Einfachernte-Schema bei $8,0 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln und bei $4,4 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln im Mehrfachernteschema (Tabelle 4.-3). Dem entsprechen nach Gleichung 2.-29 Werte für die Produktivität von 15,6 infektiösen Partikeln pro Zelle im Einfachernte-Schema und 8,6 infektiösen Partikeln pro Zelle im Mehrfachernte-Schema. Die Zunahme der Zahl der Viruspartikel und die damit höheren Einzeltiter im Einfachernte-Schema waren zu erwarten, aus technologischen Gründen und auf Grund der trotz geringerer Titer gegebenen Wirksamkeit von Virusmaterial bis $10^{4,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ wird jedoch im Herstellungsprozess im IDT das Mehrfachernte-Schema favorisiert. Diese Gründe liegen in der Erzeugung größerer Volumina von infektiösem Material und der Kenntnis, dass dieses so erzeugte Material eine signifikant höhere Immunogenität und Schutzwirkung im MEV-Challenge bei Nerzen erzielt als nur z. B. mit PBS verdünntes Material mit hohem Titer aus Einfachernten. Offensichtlich spielt für die Ausprägung der Immunantwort im Zieltier auch der Anteil der im Reaktor erzeugten nicht-infektiösen, und damit in der Titration nicht nachgewiesenen, MEV-Partikel eine wichtige Rolle. Nähere Untersuchungen dazu waren nicht Bestandteil der Arbeit. Die im IDT routinemäßig in Rollerflaschen erzielten Titer liegen im Bereich von $10^{4,0} - 10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei vier Ernten.

In der Literatur wurden deutlich höhere Ausbeuten für MEV mit bis zu $10^{9,7}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ beschrieben. Allerdings wurden hier als Substrat andere Zelllinien, z. B. permanente feline Nierenzellen, verwendet und auch die zur Quantifizierung eingesetzte Titrationsmethode weicht deutlich von der in dieser Arbeit verwendeten Methode ab. Auch der verwendete MEV-Stamm ist sicherlich eine Ursache für die erreichten hohen Titer. Inwieweit in dieser Arbeit eine Adaptation des Virus an die Zelle über Passagierung erfolgte, war nicht erkennbar. Trotz der schwierigen Vergleichbarkeit sind diese Ergebnisse als Anhaltspunkte für erreichbare Ausbeuten bei der Herstellung von MEV-Impfstoffen zu sehen [Zhang, D.-L. 1997].

5.2 Etablierung eines Herstellungsprozesses für MEV mit Mehrfachernte-Schema (Microcarrier-Prozess I)

Die Etablierung eines Microcarrierprozesses zur MEV-Herstellung verlief in mehreren Schritten zunächst über die Charakterisierung des Wachstums im 5 L-Rührreaktor, dann über die Etablierung von MEV-Infektions- und Ernteschemata im 0,5 L-Rührreaktor und abschließend wurde die Überführung dieser Erkenntnisse in den Wave® Bioreaktor im 1 – 10 L-Maßstab im Mehrfachernte-Schema zum so genannten "Microcarrier-Prozess I" realisiert.

5.2.1 Zelladhäsion und Wachstum der E-FL im Microcarriersystem im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor

In ersten Versuchen wurden im 5 L-Rührreaktor verschiedene Parameter für Einsatzzellzahl und Microcarrierkonzentration untersucht. Dabei konnte ein Einsaat-Verhältnis von $1,8 - 2,0 \cdot 10^5$ Z · mL⁻¹ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1 im Batch-Betrieb als optimal herausgearbeitet werden. Damit wurden Zellzahlen von $1,2 \cdot 10^6$ Z · mL⁻¹ nach 96 – 120 h bei einer Wachstumsrate μ_{\max} von $0,025 \text{ h}^{-1}$ erreicht, die Anheftung der Zellen erfolgte stabil und reproduzierbar mit Wiederfindungs-Raten nach 24 h zwischen 70 – 100 % (Kapitel 4.2.1).

Bei einer Konzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sind $7300 \text{ Microcarrier} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($7,3 \cdot 10^6 \text{ Microcarrier} \cdot \text{L}^{-1}$) mit einer Oberfläche von $8200 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ($16200 \text{ cm}^2 \cdot \text{L}^{-1}$) im Reaktor vorhanden (Kapitel 3.9.1). Mit dieser Microcarrierkonzentration und einem Arbeitsvolumen von 4 L ergibt sich eine flächenbezogene Zellausbeute von $1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei einer Belegung von 164 Zellen pro Microcarrier (Startwert 27 Zellen pro Microcarrier).

Die durchschnittliche Größe der E-FL Zellen im Zustand der maximalen Zellzahl beträgt damit, unter Annahme eines mittleren Durchmessers der Microcarrier von $190 \mu\text{m}^2$, etwa $700 \mu\text{m}^2$. Die in Kapitel 3.9.2 ermittelten Flächenwerte und Abschätzungen aus dem statischen System wurden damit auch für ein Microcarrier-System im Batch-Betrieb bestätigt. Inwieweit es in Microcarrier-Systemen, ggf. unter Variation der Kultivierungsbedingungen und des Mediums, zu einer dichteren Packung der Zellen kommt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Durch die Ergebnisse wurde jedoch deutlich, dass ohne Erhöhung der Microcarrierkonzentrationen im Batch-Betrieb keine wesentlichen Ausbeutezunahmen der Zellzahl zu erwarten sind. Insgesamt wurden im Microcarriersystem keine höheren flächenbezogenen Zellausbeuten, jedoch deutlich höhere volumetrische Zellausbeuten als in statischen Systemen erreicht. Die Microcarrier-Technologie zeigt hier eindrucksvoll das Potenzial zur Erzeugung höherer volumetrischer Ausbeuten durch das günstige Oberfläche–Volumen-Verhältnis (Kapitel 2.3.3).

Das im Rührreaktor erfolgreich etablierte Verfahren konnte in weiteren Versuchen unter Beibehaltung der Parameter für Agitation, pH-Wert, Startzellzahlen und Belüftung in Wave® Bioreaktoren im 1 – 10 L–Maßstab transferiert werden. Im Wave® Bioreaktor lagen zunächst keine Zellzahlen vor (Kapitel 3.6.1 und 3.9.1), durch Vergleich in der Belegung der Microcarrier konnte von Zellzahlen im Bereich von $1,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ ausgegangen werden. Der stabile Transfer des Zellkultivierungs-Verfahrens in den als späteres Produktionssystem vorgesehenen Wave® Bioreaktor kann daher bis zum 10 L–Maßstab als erfolgreich eingeschätzt werden (Kapitel 4.2). Die im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführten Medienwechsel (Simulation des Mehrfachernte-Schemas auch bei nicht-infizierten Zellkulturen) erwiesen sich für die Morphologie und Belegung der Microcarrier mit Zellen im Vergleich zum Batch-Betrieb als vorteilhaft. Das im Batch-Betrieb häufig beobachtete Ablösen der Zellen von den Carriern und Agglomerieren im Überstand wurde bei Kultivierungen mit Mehrfachernte-Schema (Medienwechsel) nie beobachtet (Kapitel 4.2 und 4.4). Die insgesamt in den Microcarriersystemen im Batch-Betrieb erreichten maximalen Zellzahlen liegen im Bereich anderer Zellsysteme (VERO, MRC-5) für Cytodex™ 1 Microcarrier im Rührreaktor [Clark, J. et al. 1981, Widell, A. et al. 1984, Baijot, B. et al. 1987,] bzw. Wave® Bioreaktor [Genzel, Y. et al. 2006]. Weitere Erhöhungen der Zellzahlen sind nur im Zusammenhang mit Perfusions-Betriebsweisen und höheren Microcarrierkonzentrationen denkbar.

Der Einfluss der MEV-Infektion wurde auch im Microcarrier-System (0,5 L-Rührreaktor, 1 – 10 L Wave® Bioreaktor) nach ca. 24 – 48 h p. i. durch eine veränderte Morphologie der

Zellen sichtbar (Kapitel 4.4). In manchen infizierten Kulturen kam es allerdings auch zu einer höheren Wiederfindungs-Rate der Zellen. Das Maximum der Zellzahl wurde nach 48 – 72 h p. i. mit Werten erreicht, die bereits unterhalb der Zellzahlen der Kontrollen lagen. Nach dieser Zeit kam es zum weiteren virusinduzierten Absterben der Zellkultur nach ca. 120 – 168 h p. i. Diese Werte liegen leicht über den im statischen System gefundenen Werten, nach denen bereits 72 – 120 h p. i. die Zellkultur abstarb (Kapitel 5.1.3). Offensichtlich hatten besonders die Medienwechsel im Mehrfächernte-Schema und die Kultivierung in Microcarriersystemen allgemein einen positiven Einfluss auf das Überleben der virusinfizierten Zellen. Eine Abhängigkeit zur eingesetzten m_{oi} war dabei deutlich zu sehen, besonders bei starken Abstufungen, z. B. m_{oi} 0,01 und 1 (Kapitel 4.4.1).

5.2.2 Stoffwechsel der E-FL in Microcarriersystemen im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor

In nicht-infizierten E-FL Kulturen im Microcarrier-System wurden im Vergleich zu Kulturen in statischen Systemen in allen Fällen höhere Aufnahme- und Bildungsraten der einzelnen Substrate und Metabolite gefunden (Tabelle 4.-5). Die Ursache dafür lag klar in den deutlich höheren volumetrischen Zellausbeuten im Microcarriersystem. In Einzelfällen (Kultivierungen in Kapitel 4.2.1 und 4.3.1) kam es dadurch im Batch-Betrieb zur Limitierung von Substraten, besonders von Glukose. Die spezifischen Aufnahme und Bildungsraten lagen in Rührreaktoren auf dem Niveau der Kultivierungen in statischen Systemen; im Wave® Bioreaktor sogar deutlich darunter. Der Grund für die im Wave® Bioreaktor deutlich geringeren Verbrauchs- und Bildungsraten muss auf Grund der ansonsten annähernd konstanten Bedingungen (Agitation, Belüftung, pH, ...) im Kultivierungssystem gesehen werden. Über die genaue Ursache kann jedoch auf Grund der Datenlage nur spekuliert werden. denkbar wären Effekte durch eine mangelnde Sauerstoffversorgung der Zellen durch die inhomogene Verteilung der Microcarrier im Reaktor. Dies würde zwar eine permanente Limitierung bedeuten, deren Auswirkung auf das Zellwachstum eigentlich sichtbar sein sollte, würde aber theoretisch als Erklärung zu den geringen Raten in Übereinstimmung stehen. Eventuell würden dann hier Effekte des Reaktorvolumens eine Rolle spielen und ein Einfluss auf das Wachstum erst bei höheren Volumina durch die dort noch geringeren k_{La} -Werte bzw. höheren Inhomogenitäten erkennbar sein.

Die Ausbeutekoeffizienten $Y_{Lak/Gluk}$ und $Y_{Amm/Gln}$ lagen in Rührreaktoren mit 1,64 – 1,74 bzw. 1,22 – 1,24 höher als in statischen Systemen. Besonders für $Y_{Lak/Gluk}$ deutet das auf eine

stärkere direkte Umwandlung von Pyruvat zu Laktat hin. Diese Beobachtung ist bei vielen tierischen Zellen, besonders bei Vorliegen eines Substratüberflusses, zu sehen [Lüdemann, I. et al. 1994, Pörtner, R. et al. 1994, Haggström, L. et al. 1996]. Die Maximalkonzentrationen von Laktat lagen, abhängig von der Glukose-Startkonzentration, bei 8,0 – 12,0 mM für Glukosestartkonzentrationen von 5,0 mM bis hin zu 20,0 mM Laktat bei Glukosesupplementierung auf 20,0 mM. Allerdings sollten auch diese Konzentrationen neben der pH-senkenden Wirkung und der daraus resultierenden, potentiell schädlich auf das Zellwachstum wirkenden Laugenzugabe kaum eine direkte Inhibierung der Zellkultur zur Folge haben, da inhibierende Wirkungen von Laktat auf Zellen erst ab Konzentrationen > 20,0 mM beschrieben worden sind [Hassel, T. et al. 1991, Lüdemann, I. et al. 1994]. Die maximalen Ammoniumkonzentrationen lagen bei > 2,0 mM. Es wurden einzelne Werte von > 3,0 mM erreicht, diese sind bereits als kritisch für das Wachstum tierischer Zellen einzustufen [Hassel, T. et al. 1991]. Es sollte versucht werden, diese Konzentrationen z. B. durch geeignete Feed-Strategien (Glukose- und/oder Glutaminzufütterung) bzw. den Einsatz der Perfusion zu vermeiden.

Virusinfizierte Zellkulturen zeigten, abhängig von der verwendeten moi , eine Abnahme des Stoffwechsels im Repeated-Batch-Betrieb (Mehrfachernte-Schema). In Ansätzen, die mit niedrigen moi 's von 0,01 – 0,10 infiziert wurden, war bis zu einer Kultivierungsdauer von 120 – 168 h p. i. bzw. bis zum dritten oder vierten Medienwechsel noch Stoffwechselaktivität zu finden. Die Infektion mit hohen moi 's > 1 führte regelmäßig zum Erliegen der Stoffwechselaktivität nach 72 – 120 h p. i. bzw. nach der ersten oder zweiten Ernte beim Repeated-Batch-Betrieb (Kapitel 4.4). Damit bestätigen sich die bereits in statischen Systemen unter Verwendung von ebenfalls niedrigen moi 's von 0,01 – 0,10 gefundenen Tendenzen einer relativ langen Stoffwechselaktivität der E-FL unter Einfluss der MEV-Infektion im Mehrfachernte-Schema (Kapitel 5.1.2).

5.2.3 MEV-Ausbeuten in Microcarriersystemen im Rührreaktor und Wave® Bioreaktor

In Microcarriersystemen wurden auf Grund der Nähe zum derzeitigen Produktionsverfahren im IDT und der bisherigen Erkenntnisse (Kapitel 5.1.3) nur Mehrfachernte-Schemata mit einer t_{oi} von 0 h untersucht. Die erreichten Virusausbeuten lagen im Rührreaktor (0,5 L – Maßstab) im Mittel bei $10^{5,0} - 10^{7,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ mit drei bis fünf Ernten (Tabelle 4.-6). Einzelne Ernten erreichten Maximaltitere > $10^{7,5}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ (Kapitel 4.4). Der

Verfahrenstransfer in den Wave[®] Bioreaktor im 1 – 10 L-Maßstab brachte Ausbeuten auf ähnlichem Niveau mit drei bis sechs Ernten (Titer > $10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹). Als geeignete mo's erwiesen sich dabei Werte von 0,01 und 0,10 (Kapitel 4.4.1), höhere mo's erbrachten keine Ausbeutesteigerung.

Die Zahl der produzierten infektiösen Viruspartikel I_{VP} lag nach Gleichung 2.-28 in Abhängigkeit vom Erntevolumen im Rührreaktor bei $6,6 \cdot 10^9 - 1,7 \cdot 10^{10}$ infektiösen Partikeln und im Wave[®] Bioreaktor auf Grund der höheren Volumina bei $3,8 \cdot 10^9 - 2,0 \cdot 10^{11}$ infektiösen Partikeln (Tabelle 4.-6). Dem entsprechen nach Gleichung 2.-29 Produktivitätswerte von 33 - 85 infektiösen Partikeln pro Zelle im Rührreaktor und 19 - 100 infektiösen Partikeln pro Zelle im Wave[®] Bioreaktor. Unter Berücksichtigung der Schwankungen bzw. Fehler bei biologischen Assays wie der Zellzählung ($\pm 15\%$) und der Virustritation ($\pm 0,3$ log-Stufen) sind sowohl die Virusausbeuten als auch die Produktivitäten im Rührreaktor und im Wave[®] Bioreaktor als auf dem gleichen Niveau liegend zu bewerten. Die in Microcarriersystemen erreichten MEV-Ausbeuten und die Produktivitäten liegen damit deutlich über denen in statischen Systemen. Unter Zugrundelegung der in der Rollerflasche erzielten Ausbeute von $4,4 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln je Flasche können mit einem 10 L wv Wave[®] Bioreaktor-Ansatz ($2,0 \cdot 10^{11}$ Gesamtzahl infektiöser Partikel) rechnerisch bis zu 450 Rollerflaschen (ca. 110 L wv) ersetzt werden. Damit ist der Verfahrenstransfer der MEV-Herstellung von der Rollerflasche in den Wave[®] Bioreaktor mit höheren stabilen Ausbeuten und unter technologischer Vereinfachung überzeugend gelungen. Auch das Sterilitätsrisiko der Rollerflaschenkultur konnte durch das neue Verfahren (Microcarrier-Prozess I) deutlich gesenkt werden.

Die in der Literatur genannten, extrem hohen MEV-Ausbeuten ($> 10^{9,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹) wurden auch durch die Umstellung des Verfahrens in Microcarrier-Systeme nicht erreicht. Ganz offensichtlich stellt aber ein Titer-Bereich von $10^{7,5} - 10^{8,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ das Maximum des mit dem in dieser Arbeit verwendeten MEV-Stamms "E-Mink F1" in E-FL Zellen dar und es sind auch durch weitere Prozessoptimierungen keine wie in den Arbeiten von Zhang genannten Ausbeuten realistisch. Hier muss auf die Unterschiede einzelner Virusstämme bei der effizienten Infektion der Substratzellen und bei der Ausbeutehöhe sowie natürlich auch auf die Auswahl und Durchführung der Quantifizierungsmethode verwiesen werden [Zhang, D.-L. 1991 und 1997].

5.2.4 Scale-Up des Verfahrens "Microcarrier-Prozess I" und Transfer zum IDT – Produktion von drei Validierungschargen im 50 L-Maßstab im Wave® Bioreaktor

Das in der bisherigen Diskussion dargestellte Verfahren zur MEV-Produktion im Wave® Bioreaktor kann, wie in Abbildung 5.-1 schematisch dargestellt, zusammengefasst werden. Dieses Verfahren wurde zum IDT übertragen und es wurden dort im Bereich Virusimpfstoffproduktion (IVP) drei Validierungschargen unter GMP-Bedingungen im Wave® Bioreaktor (50 L–Maßstab) durchgeführt. Diese Validierungschargen sind für eine Änderungsanzeige für das Herstellungsverfahren eines Impfstoffes bei der entsprechenden Behörde nach den EU- und nationalen Richtlinien gefordert, um die Plausibilität, Konformität und Validität des neuen Herstellungsverfahrens im Vergleich zum alten Prozess zu zeigen. Im Folgenden soll auf die Ergebnisse und Erkenntnisse aus diesen drei Validierungschargen näher eingegangen werden.

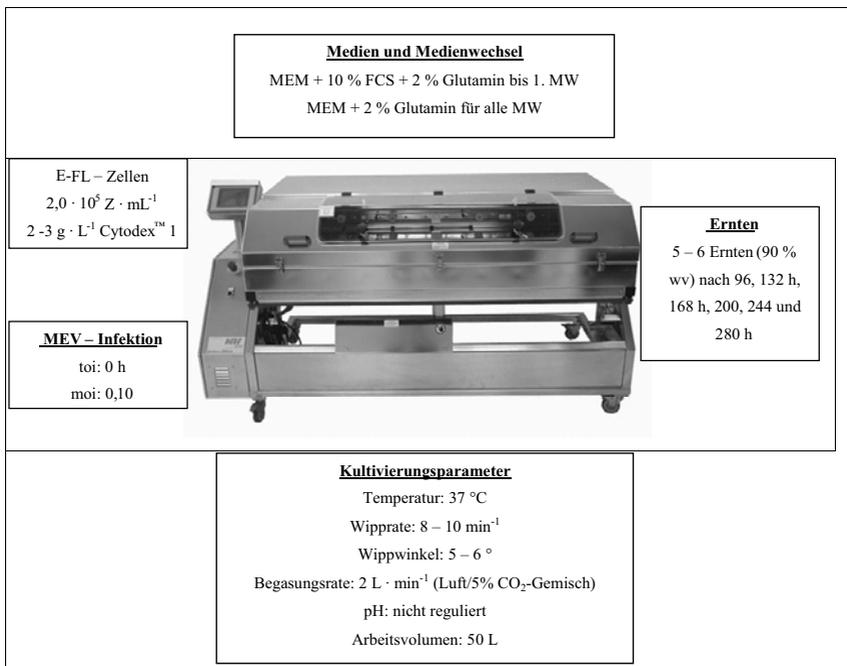


Abbildung 5.-1: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen MEV-Herstellungsprozesses ("Microcarrier-Prozess I") im 50 L-Wave® Bioreaktor

Bei der Durchführung der Validierungskultivierungen wurde aus technischen Gründen und internen Überlegungen im IDT in Einzelfällen von dem in Abbildung 5.-1 vorgeschlagenen Kultivierungsschema abgewichen. Diese Abweichungen betrafen im Einzelnen die Verwendung von newborn calf serum (NCS) anstelle des bei der Verfahrensentwicklung genutzten FCS, die Erhöhung der Microcarrierkonzentration auf $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, die Verringerung der Agitationsparameter auf eine Wipprate von 6 min^{-1} und einen Wippwinkel von $4,5^\circ$ auf Grund vorliegender Erfahrungen mit dem Wave® Bioreaktor 200 SPS (dem Produktionssystem mit 50 – 100 L wv) sowie die Verwendung geringfügig veränderter Ernteschemata. Während der drei Kultivierungen unter GMP-Bedingungen wurden keine Proben zur Bestimmung der Zellzahl und zur Quantifizierung von Metabolit-Konzentrationen entnommen. Der Grund hierfür war in fehlenden Prüfplänen bzw. SOP's für etablierte und validierte Inprozesskontrollen zu suchen; diese liegen üblicherweise erst bei vollständiger Übernahme des Herstellungsverfahrens als Standardverfahren vor. Die Validierungskultivierungen wurden mit den in Tabelle 5.-1 gezeigten Parametern gestartet.

Tabelle 5.-1: Zusammenfassung der Startparameter für Zellwachstum und Virusinfektion und Ergebnisse (Erntevolumen und -zeiten sowie Titer) der drei Validierungschargen des neuen MEV-Herstellungsprozesses im 50 L-Wave® Bioreaktor

Charge	E-FL-Zellen	MEV-Infektion	Ernten und Titer
1	114 Rollerflaschen (850 cm ²) mit $9,9 \cdot 10^9 \text{ Z}$ $= 1,9 \cdot 10^5 \text{ Z mL}^{-1}$ mit $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1	toi 0 h moi 0,01	Ernte 1: $10^{3,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 h mit 30 L Ernte 2: $10^{3,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 144 h mit 30 L Ernte 3: $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 181 h mit 30 L Ernte 4: $10^{5,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 216 h mit 25 L Ernte 5: $10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 240 h mit 50 L
2	114 Rollerflaschen (850 cm ²) mit $1,4 \cdot 10^{10} \text{ Z}$ $= 2,7 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1	toi 0 h moi 0,01	Ernte 1: $10^{4,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 h mit 30 L Ernte 2: $10^{5,3} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 168 h mit 30 L Ernte 3: $10^{5,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 216 h mit 30 L Ernte 4: $10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 240 h mit 30 L Ernte 5: $10^{5,5} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 264 h mit 50 L
3	114 Rollerflaschen (850 cm ²) mit $7,6 \cdot 10^9 \text{ Z}$ $= 1,5 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1	toi 0 h moi 0,01	Ernte 1: $10^{5,2} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 h mit 30 L Ernte 2: $10^{5,2} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 144 h mit 30 L Ernte 3: $10^{5,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 192 h mit 30 L Ernte 4: $10^{5,7} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 264 h mit 30 L Ernte 5: $10^{5,8} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 312 h mit 30 L Ernte 6: $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 360 h mit 50 L

Die in den drei Validierungschargen erreichten Maximaltiter lagen im Bereich von $10^{5,8} - 10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 240 – 300 h p. i., durchschnittlich wurden in den jeweils fünf bis sechs Ernten Titer von $10^{4,0} - 10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. Damit lagen die Titer zwar über dem für den Impfstoff geforderten Mindesttiter von $10^{4,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$, jedoch um 1 – 2 log-Stufen unterhalb der in den Versuchen zur Prozessentwicklung (10 L-Maßstab) gezeigten Werte. Die erreichten Ausbeuten an infektiösen Viruspartikeln lagen gleichmäßig bei $6,1 - 6,8 \cdot 10^{10}$ Partikel in Charge 1 – 3 (Tabelle 5.-2). Die Ausbeuten, bezogen auf die Startzellzahl, lagen im Bereich von 5,1 – 8,4 infektiösen Partikeln pro eingesäter Zelle und damit ebenfalls unterhalb der Werte von 50 – 100 infektiösen Partikeln pro eingesäter Zelle, die in den experimentellen Untersuchungen der Dissertation bis zum 10 L-Maßstab im Wave® Bioreaktor erreicht wurden.

Tabelle 5.-2: Gesamtausbeuten und Produktivitäten in den drei Validierungschargen zur MEV-Herstellung im 50 L-Wave® Bioreaktor

Charge	I_{VP} [infektiöse Partikel]	V_P [infektiöse Partikel/Zelle]
1	$6,1 \cdot 10^{10}$	6,2
2	$6,8 \cdot 10^{10}$	5,1
3	$6,4 \cdot 10^{10}$	8,4

Die Hauptursache für die in den Validierungschargen geringeren Ausbeuten dürfte die aus Kostengründen erfolgte Verwendung von NCS anstelle des bisher üblichen FCS gewesen sein. Es ist bekannt, dass fötales Serum die Proliferation und Vitalität tierischer Zellen durch höhere Konzentrationen von Hormonen und Wachstumsfaktoren besser unterstützt und es weniger Antikörper und spezielle Inhibitoren, die für die Virusvermehrung hemmend sein können, enthält [Spier, R. E. 2003, Freshney, R. I. 2005]. Weitere mögliche Ursachen können im leicht veränderten Verhältnis von Startzellzahl zu Microcarrierkonzentration oder allgemein in Problemen beim Scale-Up im Wave® Bioreaktor zu sehen sein. Die genaue Beurteilung dieser letzteren Punkte ist schwierig, da bisher keine Daten zum Zellwachstum von nicht-infizierten E-FL Kulturen im Maßstab von 50 – 100 L im Wave® Bioreaktor vorliegen. Die sehr konsistenten Ausbeuten belegen trotz der genannten Abstriche die Validität und Vorteile des Verfahrens. Optimierungsbedarf besteht hinsichtlich der benötigten Zahl an Rollerflaschen zur Vorkultur und einer Erhöhung der Virusausbeute (Verwendung von FCS). Es wurde entschieden, das im Wave® Bioreaktor produzierte MEV-Material zu inaktivieren und als Bulk bis zur vorgesehenen Verwendung im Impfstoff "FEBRIVAC 3-PLUS" bzw. "FEBRIVAC ENT" zu lagern.

5.2.5 Weiterführende Prozessanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Analyse von Zellkultivierungs- und Impfstoffherstellungsprozessen mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist ein verbreitetes und aussagekräftiges Tool zur Prozesscharakterisierung und zur Visualisierung von Ansatzpunkten zur Prozessoptimierung [al-Rubeai, M. et al. 1991 und 1998, Hawboldt, K. A. et al. 1994]. Die anhand der beiden Experimente im Kapitel 4.6 erfolgte, vergleichende Analyse der E-FL Kultivierung in Microcarriersystemen im Rührreaktor und der MEV-Vermehrung in diesem System erbrachte eine Reihe von interessanten Ansatzpunkten, die bestehende Arbeitsweisen bestätigten und auch Ansätze für weitere Überlegungen und Untersuchungen aufzeigen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Zellzyklus in nicht-infizierter Kultur

Typisch ist hier der hohe Anteil von G_0/G_1 -Zellen zu Beginn der Vorkultur, da die Zellen aus konfluenten Rollerflaschen in den Reaktor überführt wurden (Kapitel 4.6.1). Der Anteil ist jedoch noch als günstig für den Start der Zellkultivierung, d. h. die Vorkultur war noch nicht überaltert ($G_0/G_1 > 90\%$). Danach, mit Beginn der Zellwachstums-Phase, verschiebt sich der G_0/G_1 -Anteil zu einem größeren Anteil von Zellen in der S-Phase (24 – 48 h). Mit Erreichen hoher Zellzahlen und dem Beginn der Phase der Kontaktinhibition bzw. der Akkumulation von Metaboliten sinkt der Anteil der Zellen in der S-Phase wieder zu Gunsten der G_0/G_1 -Zellen. Dieses Verlaufsschema ist als typisch für das Wachstum einer adhärenz Zelle in Microcarrier-Systemen zu werten [al Rubeai, M. et al. 1991 und 1998]. Auch Hawboldt et al. fanden 1994 ähnliche Verläufe für ihre Versuche mit variierenden Einsatzzellzahlen mit VERO und MRC-5 Zellen in Microcarrier-Kulturen im Rührreaktor.

Ansatzpunkte für eine Prozessoptimierung wären vor allem eine um etwa einen Tag frühere Ernte der Vorkultur. Dadurch wäre der Anteil ruhender Zellen geringer bzw. man würde bereits bei Start der Kultivierung einen höheren Anteil von Zellen in der S-Phase haben. Ggf. kann auch über eine Verschiebung der t_{oi} auf 24 h nachgedacht werden. Demgegenüber stehen aber die Erkenntnisse aus Kapitel 4.1.3.1, in denen gezeigt wurde, dass nur eine t_{oi} von 0 – 12 h zu hohen MEV-Ausbeuten führt. Dennoch könnten solche Optimierungsarbeiten unter permanenter durchflusszytometrischer Analyse hilfreich sein. Es wäre z. B. denkbar, dass bei einem geringen Anteil von Zellen in der S-Phase zu Beginn der Kultivierung nicht alle zur Infektion eingesetzten Viren permissive Zellen finden, sondern stattdessen ein

Großteil der eingesetzten infektiösen Partikel durch Temperatur- bzw. enzymatische Einflüsse abgebaut wird. Da die Berechnung der m_{oi} jedoch von einem Verhältnis infektiöser Partikel zu permissiver Zelle ausgeht, kommt es hier zu Verfälschungen bzw. Verschiebungen in der Infektionsdynamik, die ggf. mit Hilfe der Durchflusszytometrie aufgeklärt werden können. Eine Variation der Einsaat- bzw. Infektionsbedingungen könnte somit letztendlich zu höheren Virusaussbeuten führen.

Apoptose und Nekrose in nicht-infizierter Kultur

Der Anteil apoptotischer Zellen lag zu Beginn der Kultur relativ hoch, dies wurde sehr wahrscheinlich durch den Transfer der Zellen von der Rollerflasche und die damit einhergehende Trypsinwirkung verursacht (Kapitel 4.6.1). Im Verlauf der Kultivierung lag der Anteil toter bzw. sterbender Zellen als Summe von apoptotischen und nekrotischen Zellen $< 10\%$. Insgesamt lagen die Werte innerhalb der für tierische Zellen als typisch beschriebenen Bereiche für die Kultivierung in geregelten (pH, pO_2) Reaktor-Systemen ohne zu starken Einfluss inhibierender Faktoren [al-Rubeai, M. et al. 1991 und 1998]. Auffällig war jedoch, dass der Nachweis der mit Hilfe der Durchflusszytometrie als tot charakterisierten Zellen mit Hilfe der manuellen Trypan-Blau-Zählung (Anteil $< 1,0 \cdot 10^4 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) nicht möglich war. Dies kann u. U. durch die schnelle Lysis der Zellen und Abbau der integralen Bestandteile durch Proteasen und andere Enzyme erklärt werden.

Zellzyklus sowie Apoptose und Nekrose in MEV-infizierter Kultur

Im Gegensatz zur Kultivierung der E-FL ohne MEV-Infektion schien die Vorkultur in diesem Versuch fast überaltert zu sein, der Anteil von Zellen in der G_0/G_1 -Phase liegt bei 80% , und nur etwa 10% der Zellen befanden sich in der S-Phase (Kapitel 4.6.2). Hier wäre die Schlussfolgerung für zukünftige MEV-Vermehrungsversuche, eine Vorkultur mit geringerem Alter und damit höherem Anteil von für das MEV permissiven Zellen in der S-Phase zu verwenden. Nach der Anheftung der Zellen an die Microcarrier begann das Wachstum der Kultur und der Anteil von Zellen in der S-Phase stieg auf Werte um 50% . Mit zunehmender Kultivierungs- und Infektionsdauer nahm der Anteil der Zellen in der S-Phase wieder leicht zu Gunsten des Anteils der G_0/G_1 -Phase Zellen ab. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen, der zu Beginn der Kultur bereits relativ hoch lag, nahm bedingt durch die Virusinfektion mit MEV, akkumulativ auf Werte von $80 - 90\%$ am Ende der Kultivierung zu.

Die Interpretation dieser Daten aus dem späten Teil der Kultivierung (ab ca. 96 h p. i.) war allerdings auf Grund der geringen Zellzahl zur Analyse ($\approx 2,0 \cdot 10^4$ Zellen) schwierig. Insgesamt zeigen die durchflusszytometrischen Daten der infizierten E-FL Kultur den erwarteten Verlauf (Kapitel 2.2.3). Optimierungsansätze sind hauptsächlich in der Nutzung besserer Vorkulturen und in der Prolongation der Lebensdauer MEV-infizierter E-FL Zellen, z. B. durch Anwendung von Perfusionsstrategien bei gleichzeitiger durchflusszytometrischer Analyse, zu sehen.

5.3 *Ansätze zur Etablierung eines Herstellungsprozesses für MEV in kontinuierlicher Ernte ("Microcarrier-Prozess II")*

5.3.1 Zellwachstum unter Perfusionsbedingungen

In den Versuchen zur Optimierung des Zellwachstums der E-FL Zellen unter Perfusionsbedingungen im 0,5 L Rührreaktor und im 1 L Wave[®] Bioreaktor konnten bei Verwendung der Standard-Einsaatbedingungen ($\approx 2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1) im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen im Batch-Betrieb ca. 20 % höhere Zellausbeuten erreicht werden (Kapitel 4.3.1 und 4.3.4). Weiterhin war auch nach dem Erreichen der Maximalzellzahl eine verlängerte Verweildauer der Zellen auf den Microcarriern in den Perfusionsreaktoren im Vergleich zu den Batch-Reaktoren, in denen es ab etwa 120 h Kultivierung zur Ablösung der Zellen und Agglomerationsbildungen im Überstand kam, zu sehen. Allerdings lagen die Maximalzellzahlen mit $1,0 - 1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im selben Bereich, der bereits in Batch-Kultivierungen im 5 L Rührreaktor erreicht wurde. Damit konnte nicht in allen Kultivierungssystemen unter Standardbedingungen ($\approx 2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex[™] 1) ein signifikant positiver Effekt der Perfusion auf die erreichte Maximalzellausbeute gefunden werden. Die Ursache dafür liegt sehr wahrscheinlich neben Limitierungen durch das Medium vor allem in Limitierungen des E-FL Wachstums durch die zur Verfügung stehende Wachstumsfläche von etwa $8200 \text{ cm}^2 \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer Carrierkonzentration von $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (siehe Flächenberechnung von E-FL Zellen in den Kapiteln 3.9.2 und 5.2.1). Demnach war nur durch eine Erhöhung der Microcarrierkonzentration eine Erhöhung der Zellausbeute im Perfusionsbetrieb zu erwarten. Dies konnte in einem Versuch, in dem $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Microcarrier eingesetzt und die Einsaatzellzahl auf $5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhöht wurde, gezeigt werden (Kapitel 5.2.4). Hier

wurden Maximalzellzahlen von $6,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und Werte im Bereich um $5,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ für ca. 120 h bei guter Verteilung der Zellen auf den Microcarriern erreicht.

Diese Zellausbeuten stellen wahrscheinlich das Maximum der mit dem verwendeten MEM erreichbaren Zellzahlen unter Perfusionsbedingungen dar. Sehr wahrscheinlich kommt es trotz ausreichend hoher Substratkonzentrationen von Glukose und Glutamin zur Limitierung weiterer, in der Arbeit nicht quantifizierter, Substrate (Aminosäuren, Vitamine, ...). Weitere Steigerungen der Microcarrierkonzentration wurden nicht angestrebt, da das Ziel der Teilarbeiten zur Perfusion nicht in der Maximierung der Zellausbeuten, sondern eher im Erreichen einer möglichst langen Vitalitätsdauer der Zellen und nachfolgend in der Etablierung eines kontinuierlichen Virusernteverfahrens lag. In anderen Microcarriersystemen wurden bereits ähnliche Zellausbeuten von $5,0 - 8,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ als Maximum dargestellt [Butler, M. et al. 1983, Butler, M. 1985, Geserick, C. et al. 2000, Schügerl, K. 2000]. Höhere Zellzahlen sind mit Perfusionsystemen bei der Kultivierung von Suspensionszellen beschrieben worden. Besonders mit CHO-Zellen zur Produktion rekombinanter Antikörper wurden durch die wachstumsgekoppelte Produktbildung durch die hohen Zellausbeuten $> 1,0 \cdot 10^7 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ bei der Perfusion auch höhere Proteinausbeuten erreicht [Wen, Z. Y. et al. 2000, Gorenflo, V. M. et al. 2002, Cannizzaro, C. et al. 2003].

Als technische Lösung zur Durchführung der Perfusion im Rührreaktor und Wave Bioreaktor wurde auf Grund mangelnder bzw. für die Microcarrier-Technologie unbrauchbarer Alternativen seitens der Hersteller der Bioreaktoren ein eigenes Perfusionsmodul entwickelt (Kapitel 3.8.1 und 3.8.2). Trotz einiger Probleme durch Verblocken dieses selbst entwickelten Perfusionsmoduls auf Grund des geringen Querschnitts konnte die Tauglichkeit des Systems in allen Versuchen nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit den Herstellern, besonders der Firma Wave Biotech, war geplant, diese Module bereits vorab eingebaut mit den CellBags als Perfusionsysteme zu konstruieren. Mittlerweile sind allerdings bereits ähnliche Systeme der Firma Wave Biotech auf dem Markt, die ähnlich gute bzw. auf Grund größerer Filterflächen bessere Möglichkeiten zur Perfusionskultur von adhärennten Zellen im Wave® Bioreaktor erwarten lassen.

Bei der Kultivierung MEV-infizierter E-FL Zellen unter Perfusionsbedingungen war in zwei der drei durchgeführten Versuche eine etwa um 48 – 72 h längere Vitalität der Zellen (d. h. Lebendzellzahl $> 1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Vergleich zu Versuchen im Mehrfach-Ernteschema zu finden. Offensichtlich sind Effekte der Perfusion auf die Vitalität der infizierten Zellen vorhanden. Auf Grund der geringen Zahl der durchgeführten Versuche ist jedoch nicht klar, ob diese Effekte ausschließlich auf die Anwendung der Perfusion zurückzuführen. Dies ist

u. U. auch durch den Start der Perfusion erst 48 – 72 h nach Einsaat, d. h. auch 48 – 72 h p. i., zu erklären. Zu dieser Zeit tritt jedoch bereits ein erstes Maximum der Virusinfektion auf und die Zellzahl beginnt rapide zu sinken. Effekte der Perfusion wären ggf. bei Verwendung geringerer Startzellzahlen ($1,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$), einer verzögerten Infektion nach 24 – 48 h p. i. und dann einem Start der Perfusion erst 96 – 120 h nach Einsaat der Zellen, zu erwarten. Mit einem solchen Schema würde es theoretisch zunächst zu einer relativ starken Zunahme der Zellzahl bis auf ca. $3,0 - 5,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach ca. 48 h mit einem hohen Anteil von Zellen in der S-Phase (entspricht in etwa der logarithmischen Wachstumsphase in der Bioprozesstechnik) kommen. Bei der Virusinfektion mit einer relativ geringen moi (0,01) wären damit höhere Zellzahlen vorhanden und die Anwendung der Perfusion vor dem Ende der ersten Infektionswelle, d. h. der Freisetzung größerer Mengen infektiöser Partikel ab ca. 48 – 72 h p. i. (Kapitel 4.1.3), würde möglicherweise zu einem weiteren Wachstum der noch nicht infizierten Zellen bzw. zur Verlängerung der Vitalität der gesamten Zellkultur führen. Eine solche Strategie sollte, unter vorheriger Verwendung entsprechender mathematischer Modelle zur Infektionsdynamik des MEV in E-FL, zukünftig experimentell auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden.

5.3.2 Stoffwechselraten unter Perfusionsbedingungen

Die Stoffwechselprofile der beiden nicht-infizierten experimentellen Ansätze "Perfusionsversuch 1 und 2" im Rührreaktor (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) mit den Standard-Startparametern ($2,0 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cytodex™ 1) zeigten nach dem Start der Perfusion eine Konstanz in den Konzentrationen der Substrate und Metabolite. Die Zellkulturen waren zu jeder Zeit ausreichend mit Glukose und Glutamin versorgt und die Konzentrationen von Laktat und Ammonium erreichten lediglich nicht inhibierend wirkende Werte von $4,0$ bzw. $2,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [Hassel, T. et al. 1991]. Im Gegensatz dazu stiegen die Laktat- und Ammonium-Konzentrationen in den Batch-Reaktoren auf das typische Niveau dieser Standardkultivierungen von $10,0$ bzw. $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ an (Kapitel 4.2). Durch den Einsatz der Perfusion mit Perfusionsraten von $0,75 - 0,90 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ konnte besonders die Konzentration des als kritisch für das Zellwachstum angesehenen Ammoniums in diesen Versuchen signifikant gesenkt werden. Durch eine Erhöhung der Microcarrierkonzentration kam es in einem weiteren "Perfusionsversuch 3" zu einer deutlichen Steigerung der volumetrischen Zellausbeute auf ein Level von durchschnittlich $3,0 - 5,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Kapitel 4.3.3). Hier konnte mit der eingestellten Perfusionsrate von $0,5 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ die Nährstoffversorgung der Zellen auf Grund der sehr hohen Zellzahlen nicht sichergestellt

werden. Es kam zu Limitationen der Zellkultur - besonders kritisch ist die Glukoselimitation der Kultur ab 120 h zu sehen. Abhilfe könnte in weiteren Versuchen eine Erhöhung der Perfusionsrate oder besser eine Supplementierung von Glukose in das Feedmedium auf Konzentrationen von ca. $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bringen. Allerdings sind, besonders bei NSO und CHO Zellen, auch Versuche mit low-glucose-feeding Strategien und damit geringerer Laktatbildung mit hohen Zellausbeuten bzw. erhöhten Produktausbeuten (z. B. monoklonale Antikörper oder rekombinante Proteine) beschrieben worden [Frahm, B. et al. 2003, Meuwly, F. et al. 2006]. Die für das in dieser Arbeit verwendete System nahe liegende Verwendung eines besseren Zellkulturmediums (IMDM, DMEM) zum Erreichen und zur Versorgung hoher Zellzahlen war unter zulassungsrechtlichen Aspekten des Impfstoffes nicht möglich und wurde daher nicht untersucht.

Die Verbrauchs- und Bildungsraten der Substrate und Metabolite sind für die Perfusionsversuche 1 – 4 nach den in Kapitel 2.3.4 gezeigten Gleichungen (Gleichung 2.-24) berechnet worden und in Tabelle 5.-3 vergleichend dargestellt. Die Berechnung von spezifischen Raten war auf Grund der schwankenden Zellzahlen, besonders in den Perfusionskultivierungen 3 und 4, schwierig (Kapitel 4.3). Daher wurde für den Perfusionszeitraum der jeweiligen Kultivierung eine mittlere Zellzahl abgeschätzt (Tabelle 5.-3). Die Konzentrationswerte der Substrate und Metabolite wurden über den Perfusionszeitraum gemittelt (Tabelle 5.-3). Die Aufnahme- und Bildungsraten für die Substrate Glukose und Glutamin und die Metabolite Laktat und Ammonium zeigen innerhalb der vier Perfusionsversuche deutliche Unterschiede (Tabelle 5.-3). In den Versuchen 1 und 2 liegen die Werte mit geringen Abweichungen auf einem Level. Die spezifischen Aufnahmeraten liegen im Vergleich zu Batch-Versuchen niedriger (Tabelle 4.-6), sind aber mit Literaturwerten für andere permanente Zelllinien vergleichbar [Doyle, A. und Griffith, B. 1998, Reichl, U. und Bock, A. 2003]. Der Perfusionsversuch 3 fällt auf Grund der Glukoselimitierung aus dem Vergleich mit den anderen Versuchen heraus; es scheint jedoch Tendenzen zu einer höheren Glutaminaufnahme der Zellen bzw. auch zu einer Aufnahme von Laktat zu geben. Auffällig sind die im Vergleich zu den Versuchen in Rührreaktoren (1 – 3) signifikant geringeren Aufnahmeraten der Kultur im Wave[®] Bioreaktor (Versuch 4) unter Perfusionsbedingungen (Tabelle 5.-3). Die Werte liegen hier um 50 – 80 % niedriger als in den Versuchen 1 – 3. Da in den Batch-Kultivierungen bereits ebenfalls niedrige Stoffwechselraten der Zellen nachgewiesen wurden, scheint es sich um ein systembedingtes Verhalten der Zellen im Wave[®] Bioreaktors zu handeln (Tabelle 4.-6). Über die genaue Ursache kann an dieser Stelle bei der unzureichenden Datenlage nur spekuliert werden.

Tabelle 5-3: Allgemeine und spezifische Verbrauchs- und Bildungsraten für die Substrate und Metabolite in den Perfusionskultivierungen 1 – 3 im Rührreaktor und 4 im Wave® Bioreaktor (Kapitel 4.3)

Parameter	Perfusions- versuch 1	Perfusions- versuch 2	Perfusions- versuch 3	Perfusions- versuch 4
Perfusionsparameter (Rate und Dauer der Perfusion)	0,0142 L · h ⁻¹ 213 h	0,0167 L · h ⁻¹ 277 h	0,0094 L · h ⁻¹ 188 h	0,0104 L · h ⁻¹ 220 h
mittlere Zellzahl im Perfusionszeitraum (Z · mL ⁻¹)	1,0 · 10 ⁶	1,0 · 10 ⁶	3,0 · 10 ⁶	1,4 · 10 ⁶
mittlere Glukosekonzentration im Perfusionszeitraum (mmol · L ⁻¹)	3,5	3,1	0,1	1,2
mittlere Laktatkonzentration im Perfusionszeitraum (mmol · L ⁻¹)	4,1	4,6	8,5	8,1
mittlere Glutaminkonzentration im Perfusionszeitraum (mmol · L ⁻¹)	5,4	3,1	3,6	4,6
mittlere Ammonium- konzentration im Perfusionszeitraum (mmol · L ⁻¹)	1,0	1,2	2,1	1,9
r _{Gluk} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,064	0,081	0,101	0,051
r _{Lak} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,066	0,092	0,097	0,028
r _{Gln} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,032	0,029	0,047	0,027
r _{Amm} (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	0,024	0,034	0,041	0,019
q _{Gluk} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	6,4 · 10 ⁻¹¹	8,1 · 10 ⁻¹¹	3,4 · 10 ⁻¹¹	3,6 · 10 ⁻¹¹
q _{Lak} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	6,6 · 10 ⁻¹¹	9,2 · 10 ⁻¹¹	3,2 · 10 ⁻¹¹	2,0 · 10 ⁻¹¹
q _{Gln} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	3,2 · 10 ⁻¹¹	2,9 · 10 ⁻¹¹	1,6 · 10 ⁻¹¹	1,9 · 10 ⁻¹¹
q _{Amm} (mmol · Z ⁻¹ · h ⁻¹)	2,4 · 10 ⁻¹¹	3,4 · 10 ⁻¹¹	1,3 · 10 ⁻¹¹	1,4 · 10 ⁻¹¹

Allgemein kann eingeschätzt werden, dass die Perfusion in allen Versuchen zu einer besseren Versorgung der Zellen mit Nährstoffen führte und eine Akkumulation von Metaboliten im Übermaß verhinderte. Die längere Vitalität der Zellen und die erreichten höheren Zellausbeuten bei entsprechender Verfügbarkeit von Wachstumsfläche (Erhöhung der Microcarrierkonzentration) sind, wie bereits auch vielfach in der Literatur beschrieben, darauf zurückzuführen [Butler et al. 1983, Geserick, C. et al. 2000, Gorenflo, V. M. et al. 2002].

5.3.3 MEV-Vermehrung unter Perfusionsbedingungen

Die Bestimmung der MEV-Stabilität bei verschiedenen Lagertemperaturen (4 °C und 37 °C) erbrachte den Nachweis einer hohen Stabilität der MEV-Partikel bei einer Lagertemperatur von 4 °C mit einer Halbwertszeit von 28 Tagen (Kapitel 3.9.3). Daher wurden die Virusernten in den drei durchgeführten Versuchen zur MEV-Vermehrung in kontinuierlicher Ernte bei 4 °C im Wasserbad gekühlt gehalten. Die in Tabelle 5-4 dargestellten Ausbeuten (I_{VP} , Produktivität P_V) sind als Summe aus dem mittleren Titer der gekühlten Virusernte und dem am Ende der Kultivierung im Reaktor vorliegenden Virustiter berechnet (Kapitel 4.5).

Tabelle 5-4: Virusausbeuten und Produktivitäten in den Versuchen zur kontinuierlichen MEV-Ernte

Versuch	I_{VP} [infektiöse Partikel]	Produktivität P_V [infektiöse Partikel/Zelle]
MEV-Perfusion 1	$3,0 \cdot 10^8$	3,3
MEV-Perfusion 2	$4,1 \cdot 10^8$	2,1
MEV-Perfusion 3	$3,0 \cdot 10^8$	1,0

Die in den gekühlten Virusernten quantifizierten Virustiter lagen in allen drei Versuchen auf einem Niveau von etwa $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Kapitel 4.5) und damit niedriger als die Mittelwerte der Ernten aus den Versuchen mit Mehrfachernte-Schema (Kapitel 4.4). Diese relativ geringen Titer in der gepoolten Ernte der Versuche 1 – 3 sind auch ursächlich für die geringeren Ausbeuten an infektiösen Partikeln und die niedrigeren Produktivitäten (Tabelle 5.4). Die Virusausbeuten liegen dennoch in den drei Versuchen gleichmäßig bei $3,0 - 4,1 \cdot 10^8$ infektiösen Partikeln und $1,0 - 3,3$ infektiösen Partikeln pro eingesäter Zelle. Trotzdem wurden nach Ende der Perfusion in der weiterführenden Batch-Phase, bzw. teilweise auch vor Start der Perfusion, höhere Einzeltiter im Reaktor erreicht. Auch die Titer während der Perfusion lagen trotz sinkender Tendenz höher als die letztendlich erreichten Titer im Erntepool. Möglicherweise kam es im Ernte-Pool trotz Kühlung zu Abbauprozessen.

Die erreichten Virustiter im Pool lagen dennoch deutlich über dem Limit von $10^{4,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ und ein Einsatz des Materials als Vakzine wäre problemlos möglich.

Insgesamt betrachtet, erscheint es als möglich, dass in weiteren Versuchen unter Variation der Prozessparameter der kontinuierlichen Ernte, z. B. Startzeitpunkt der Perfusion und Perfusionsrate, höhere Virusausbeuten im Bereich von $10^{6,0}$ TCID₅₀ · mL⁻¹ in der Ernte erzielt werden können. Inwiefern trotz der offenkundigen Vorteile eines geschlossenen Systems eine kontinuierliche Virusernte von MEV ("Microcarrier-Prozess II") in einem industriellen Prozess eine Rolle spielen kann, bleibt, neben der Kostenbewertung, vor allem der Beantwortung der Frage nach einem stabilen Prozess mit höheren Ausbeuten auf dem Niveau des etablierten Prozesses "Microcarrier-Prozess I" vorbehalten. Derzeit sind für die Herstellung von Veterinärimpfstoffen keine kontinuierlichen Ernteverfahren beschrieben. Neben der notwendigen prinzipiellen Eignung des biologischen Systems für eine kontinuierliche Ernte ist vor allem der verfahrenstechnische Aufwand im großen Maßstab verbunden der Notwendigkeit eines stabilen und sicheren Prozesses und dem damit einhergehenden Aufwand zur Feinabstimmung des Prozesses dafür verantwortlich.

Kontinuierliche Prozesse bei der Impfstoffherstellung bzw. bei der Herstellung viraler Antigene sind bisher in der Literatur wenig beschrieben. Für die Optimierung des Zellwachstums sind Perfusionsysteme z. B. von Merten für die Produktion retroviraler Vektoren zum gentherapeutischen Einsatz vorgeschlagen worden [Merten, O.-W. 2004]. In diesem Zusammenhang ist auch die Produktion von Reoviren für den Einsatz als Therapeutikum in der Krebstherapie in Mouse L-929 Suspensionszellen zu sehen [Jung, S. et al. 2004]. In einem zweistufigen Perfusionsprozess für Zellwachstum und Virusvermehrung wurde dort in Abhängigkeit von Temperatur, μ und Erntezeitpunkt die Virusausbeute optimiert. Cortin et al. untersuchten einen Prozess zur Herstellung adenoviraler Vektoren in humanen 293S-Zellen und erreichten durch Einsatz von Perfusionsstrategien mit relativ hohen Perfusionsraten von $1,0 \text{ RV} \cdot \text{d}^{-1}$ Zellzahlen von $8,0 - 14,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Damit einhergehend konnten die Virusausbeuten signifikant auf $7,8 \cdot 10^9$ infektiöse Partikel · mL⁻¹ gesteigert werden [Cortin, V. et al. 2004].

In allen drei Beispielen wurden jedoch im Unterschied zu dem in der Arbeit etablierten Perfusions-Microcarriersystem als Substrate für die Antigenproduktion Suspensionszellen verwendet, diese sind prozesstechnisch mit weniger Aufwand zu handhaben und zu kontrollieren. Der Einsatz der Perfusion beschränkte sich in diesen Fällen auch auf den Teilschritt der Optimierung des Zellwachstums und nicht auf die Phase der Viruspropagation.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die beiden hauptsächlichen Ziele der Arbeit, zum einen die Charakterisierung des bestehenden Herstellungsprozesses für MEV in Rollerflaschen und zum anderen der Verfahrenstransfer in Microcarriersysteme im Wave[®] Bioreaktor (Mehrfachernte-Schema), konnten unter Einhaltung der gestellten Prämissen, vor allem die Anzahl der Änderungen am Prozess so gering wie möglich zu halten (Medium), erfolgreich abgeschlossen werden. Die Produktion von drei Validierungschargen im 50 L-Maßstab unter GMP-Bedingungen im Wave[®] Bioreaktor belegte trotz geringerer Ausbeuten als in der Phase der Prozessentwicklung (10 L-Maßstab), vermutlich auf Grund der Verwendung eines anderen Serums, die Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit des Verfahrens. Das neue Verfahren bietet sowohl technologische Vorteile, d. h. ein 50 – 100 L Ansatz im Wave[®] Bioreaktor kann zwischen 500 - 1000 Rollerflaschen ersetzen, als auch Vorteile bei der Ausbeute ($\approx 10^{7,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Vergleich zum bisherigen Rollerflaschen-Verfahren ($\approx 10^{6,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$). Nach derzeitigem Stand stellt dieses als "Microcarrier-Prozess I" bezeichnete Verfahren den ersten Ansatz für ein großtechnisches Herstellungsverfahren, basierend auf adhärennten Zellen in Microcarrier-Kultur, im Wave[®] Bioreaktor dar. Bisherige Verfahren arbeiten hauptsächlich mit Suspensionszellen, z. B. CHO-Zellen, bzw. mit adhärennten Zellen (MDCK) auf Microcarriern im 1 – 2 L-Maßstab [Weber, W. et al. 2002, Genzel, Y. et al. 2006].

Durch die Kombination eines sicheren und effizienten Herstellungsverfahrens für MEV mit der Prozesstechnologie des Wave[®] Bioreaktors als "disposable bioreactor" ergeben sich für die Produktion von Impfstoffen für Tiere wesentliche Kosten- und Verfahrensvorteile. Die zukünftige Nutzung des Prozesses hängt vor allem auch von einer besseren verfahrenstechnischen Charakterisierung des Wave[®] Bioreaktors als Reaktorsystem für Kultivierungen im größeren Maßstab (100 – 300 L) ab. Obwohl hier bereits einige Vorarbeiten geleistet wurden, lassen die bisherigen Scale-Up Schritte einen weiteren Transfer des Verfahrens in größere Wave[®] Bioreaktoren als problematisch erscheinen [Eibl, R. et al. 2005]. Das bereits im kleineren Maßstab beobachtete Problem der Inhomogenität der Kultur dürfte in größeren Maßstäben eher zunehmen und könnte sich bis zur Unmöglichkeit eines Verfahrens im Maßstab > 200 L für diesen Prozess potenzieren. Besonders problematisch könnten in diesem Zusammenhang die Sauerstoffversorgung der Zellen im unteren Teil des Reaktors (Sedimentationseffekte) bzw. auftretende Scher- und Prallkräfte bei häufigen Kollisionsereignissen der Microcarrier werden.

Eine Möglichkeit, ein Scale-Up Problem zu umgehen, bot sich bei dem untersuchten Prozess auf Basis von Mehrfachernten mit der Einführung eines Perfusionsverfahrens an. Hier konnte auch mit dem bezüglich der Substratkonzentrationen relativ limitierten Minimalmedium bei Erhöhung der Microcarrier-Konzentration auf $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eine deutliche Optimierung von Zellwachstum bis auf $5,0 - 6,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ gegenüber Werten von $1,0 - 1,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ im Batch-Betrieb erreicht werden. Die Möglichkeiten der Perfusion werden auch in anderen Bereichen der Zellkultivierung angewandt, bisher jedoch hauptsächlich für die mAK-Produktion und seltener für Impfstoffe [Noé, W. et al. 1992, Geserick, C. et al. 2000, Wen, Z. Y. et al. 2000, Merten, O.-W. 2004]. Versuche zur Etablierung eines nahe liegenden kontinuierlichen Virusernteverfahrens für MEV ("Microcarrier-Prozess II") erbrachten zwar für eine Verwendung als Vakzine ausreichende, jedoch im Vergleich zum Mehrfachernte-Schema geringere Virusausbeute im Bereich von $10^{5,0} \text{ TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Als weitere Verbesserungen am Prozess bieten sich vor allem Variationen der Zellzahl, moi , toi , Startzeitpunkt der Perfusion, Flussraten, etc. an. Zu diesen Arbeiten sollte vor allem die eingehende durchflusszytometrische Analyse des Prozesses (Zellwachstum, Virusvermehrung) zählen; hier können wichtige Aussagen zu Ansätzen für eine Optimierung (Status der Vorkultur, Stand der Kultur, Zeitpunkt der Infektion etc.) gemacht werden. Die zu erwartenden Daten sollten in Form eines mathematischen Prozessmodells aufbereitet werden, um so die komplexen Beziehungsgefüge zwischen Zelle, Virus und der Prozessumgebung besser abbilden zu können und die relevanten Zusammenhänge überschaubar und nutzbar darzustellen. Auch sollten bei einer völligen Neuentwicklung des Herstellungsprozesses, wie sie der "Microcarrier-Prozess II" darstellt, Fragen der Medienoptimierung und Stammauswahl (MEV-Stamm) im Rahmen des Gesamt-Projektes sowie zulassungsrechtliche Fragen (Aufwand einer Neuzulassung) ggf. neu betrachtet und bewertet werden. Hier stellt sich vor allem auch die Frage, ob der Aufwand für eine solche komplexe Prozessentwicklung kostendeckend für einen Veterinärimpfstoff für eine "Nischen-Tierart" wie den Nerz betrieben werden kann oder ob die Erfahrungen und Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit auf andere, ggf. finanziell aussichtsreichere Impfstoffentwicklungen, möglicherweise auch für Human-Impfstoffe, adaptiert werden können.

6 Verzeichnisse

6.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1.-1: Schematische Darstellung der Herstellung von MEV (IDT, Standardarbeitsanweisung).. 1

Abbildung 2.-1: Schema des Aufbaus einer eukaryotischen Zelle [Freshney, R. I. 2005, Bild Wikipedia],
Legende: 1. Nukleolus, 2. Zellkern (Nukleus), 3. Ribosomen, 4. Vesikel, 5. Raues Endoplasmatisches
Retikulum (ER), 6. Golgi-Apparat, 7. Mikrotubuli, 8. Glattes ER, 9. Mitochondrien, 10. Lysosom, 11.
Zytoplasma, 12. Mikrobodies, 13. Zentriolen 10

Abbildung 2.-2: (oben) Schematische Darstellung der vier Phasen bei der Anheftung tierischer Zellen an
Oberflächen und (unten) entsprechende mikroskopische Aufnahmen von tierischen Zellen in diesen vier
Phasen [Pharmacia Biotech, GE Healthcare, 2005] 11

Abbildung 2.-3: (links) Tierische Zellen (MDBK) 4 h nach der Einsaat und (rechts) MDBK-Zellen bei
einem Konfluenzgrad von 50 – 60 % ca. 72 h nach der Einsaat, 40-fache Vergrößerung..... 13

Abbildung 2.-4: Schematische und vereinfachte Darstellung des Energiestoffwechsels von eukaryotischen
Zellen [nach Doverskog, M. et al. 1997] 14

Abbildung 2.-5: Schematische Darstellung des Sauerstoffübergangs von der Gasblase in eine tierische
Zelle im Bioreaktor und des Zweifilmmodells nach Lewis & Whitman [Storhas, W. 2003] 21

Abbildung 2.-6: Schematische Darstellung des Zellzyklus tierischer Zellen [Stein, G. S. et al., 1999] 23

Abbildung 2.-7: Einteilung der Familie der *Parvoviridae* [International Committee of Taxonomy of
Viruses Database (ICTVdb), Hueffer, K. und Parrish, C. R. 2003] 25

Abbildung 2.-8: (links) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines caninen Parvovirus [Aufnahme:
Mc Nulty, S., The Queens University of Belfast, ICTVdb] und (rechts) 3 D – Aufnahme (Computer-
Rekonstruktion) des caninen Parvovirus [Aufnahme: Sgro, J. Y., University of Madison]..... 26

Abbildung 2.-9: Schema der Replikation von Parvoviren [Straube, S. 2005]..... 27

Abbildung 2.-10: (links) Statische und semistatische Kultivierungssysteme (Gewebekulturflaschen und Rollerflaschen) zur <i>in-vitro</i> Anzucht tierischer Zellen und (rechts) Parallelrührreaktor-System (0,5 L-Maßstab) zur Kultivierung tierischer Zellen.....	34
Abbildung 2.-11: (links) Rührreaktor (5 L Arbeitsvolumen) mit Peripherie und (rechts) Wave [®] Bioreaktor 20 SPS (1 - 10 L Arbeitsvolumen) zur Kultivierung tierischer Zellen.....	35
Abbildung 2.-12: Überblick zu derzeit verwendeten kommerziellen Microcarrier-Typen, (links) MA-104 Zellen auf Cytodex [™] 1 (Pharmacia Biotech, USA), (Mitte) CHO-Zellen in den Poren von Cytopore [™] Microcarrier (Pharmacia Biotech, USA) und (rechts) Schweinenieren-Zellen auf Hillex II Microcarrier (Solohill, USA).....	37
Abbildung 3.-1: Passageschema für eine typische Vorkultur von E-FL Zellen.....	51
Abbildung 3.-2: Enzymreaktionen zur Messung der Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat am YSI 7100 MBS.....	60
Abbildung 3.-3: (links) Kommerzieller Perfusionsbag (Wave Biotech, CH) mit Filtermembran und (rechts) Auswirkung der Membranbewegung auf Microcarrier und Zellen.....	65
Abbildung 3.-4: (links) selbstentwickeltes Perfusionsmodul mit Metallfiltergaze und (rechts) Zellwachstum der E-FL nach 120 h unter Verwendung des selbstentwickelten Perfusionsmoduls.....	65
Abbildung 3.-5: (links) Aufbau der Perfusion im Rührreaktor und (rechts) an den Rührreaktor adaptiertes Perfusionsmodul.....	66
Abbildung 3.-6: Eichkurve für die Bestimmung der Partikelzahl von Cytodex [™] 1 Microcarrier bei verschiedenen Microcarrierkonzentrationen als Mittelwert einer 6-fach Bestimmung unter dem Lichtmikroskop.....	67
Abbildung 3.-7: Flächenvermessung von E-FL in Gewebekulturflaschen (175 cm ²) am Beispiel von je 5 Einzelzellen nach a) 24 h und b) 96 h.....	69
Abbildung 3.-8: Vergleich der MEV-Stabilität bei 4 °C (-■-) und 37 °C (-●-) anhand experimenteller Werte unter Annahme einer Abbaukinetik 1. Ordnung.....	70
Abbildung 3.-9: Darstellung der Messwerte und Simulation für den thermischen Zerfall von Glutamin im WM unter definierten Bedingungen (Reaktion 1. Ordnung).....	72
Abbildung 3.-10: Bestimmung des k_{La} -Wertes mit der dynamischen Methode in einem 0,45 L wv Sixfors-Rührreaktor unter definierten Bedingungen (Begasung mit O ₂ und N ₂ , aqua dest. 450 mL wv, 50 rpm, 37 °C, Rührerposition und Begasungsrate mit Standardeinstellungen).....	74

- Abbildung 3.-11: Bestimmung des $k_{1,a}$ -Wertes mit der dynamischen Methode im Wave[®] Bioreaktor mit 1 (-■-) und 10 L wv (-●-) unter definierten Bedingungen (Begasung mit O₂ und N₂, aqua dest. 1 und 10 L wv, Wipprate 6 min⁻¹, Wippwinkel 5°, 37 °C, Begasungsrate 0,1 bzw. 0,3 L · min⁻¹)..... 74
- Abbildung 4.-1: (links) Lichtmikroskopische Aufnahme der E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) nach 24 h und (rechts) nach 120 h Kultivierungsdauer, keine Virusinfektion, 100-fache Vergrößerung 76
- Abbildung 4.-2: Wachstumskurven von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) und logarithmische Auftragung der Zellzahlen im Intervall von 24 – 120 h, Versuch 1 (-■-), Versuch 2 (-▲-) und Versuch 3 (-●-), durchgezogene Linien = Zellzahl, gestrichelte Linien = ln der Zellzahl 76
- Abbildung 4.-3: Profile der Glukose- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Laktatkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) 78
- Abbildung 4.-4: Profile der Glutamin- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Ammoniumkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Gewebekulturflaschen (75 cm²) 78
- Abbildung 4.-5: Profile der Glukose- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Laktatkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Rollerflaschen 80
- Abbildung 4.-6: Profile der Glutamin- (-■- Versuch 1, -▲- Versuch 2 und -●- Versuch 3) und Ammoniumkonzentrationen (-□- Versuch 1, -Δ- Versuch 2 und -○- Versuch 3) für das Wachstum von E-FL in Rollerflaschen..... 80
- Abbildung 4.-7: (links) nicht-infiizierte E-FL Kultur nach 96 h und (rechts) Beispiel für eine MEV-infiizierte E-FL Kultur 96 h p. i. (moi 0,01 und toi 0 h) in Gewebekulturflaschen (75 cm²), 40-fache Vergrößerung 81
- Abbildung 4.-8: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) von infiizierten E-FL Kulturen bei einer moi von 0,01, (-♦- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h) 82
- Abbildung 4.-9: Profile der Glukosekonzentrationen für nicht-infiizierte und infiizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -♦- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h) 84
- Abbildung 4.-10: Profile der Laktatkonzentrationen für nicht-infiizierte und infiizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm²), (-■- Kontrolle, -♦- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, +- toi 36 h und -* - toi 48 h) 84

Abbildung 4.-11: Profile der Glutaminkonzentrationen für nicht-infiizierte und infiizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm ²), (-■- Kontrolle, -◆- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, -+- toi 36 h und -*- toi 48 h)	84
Abbildung 4.-12: Profile der Ammoniumkonzentrationen für nicht-infiizierte und infiizierte E-FL Kulturen in Gewebekulturflaschen (75 cm ²), (-■- Kontrolle, -◆- toi 0 h, -▲- toi 6 h, -●- toi 12 h, -x- toi 24 h, -+- toi 36 h und -*- toi 48 h)	85
Abbildung 4.-13: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID ₅₀) von MEV-infiizierten E-FL Kulturen mit einer moi von 0,01 (-●-)und 0,10 (-▲-) in Rollerflaschen (toi 0 h) mit Mehrfach-Ernteschema	87
Abbildung 4.-14: Profile der Glukosekonzentration für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -●- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)	88
Abbildung 4.-15: Profile der Laktatkonzentration für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -●- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)	88
Abbildung 4.-16: Profil der Glutaminkonzentration für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -●- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)	88
Abbildung 4.-17: Profile der Ammoniumkonzentration für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL in Rollerflaschen mit Mehrfach-Ernteschema, (-■- Kontrolle, -●- moi 0,01 und -▲- moi 0,10)	89
Abbildung 4.-18: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID ₅₀) von MEV-infiizierten E-FL Kulturen mit einer moi von 0,01 (-●-) und 0,10 (-▲-) in Rollerflaschen (toi 0 h) mit Einfach-Ernteschema	90
Abbildung 4.-19: Profile der Glukose- (-■- Kontrolle, -▲- moi 0,01 und -●- moi 0,10) und Laktatkonzentration (-□- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -△- moi 0,10) für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL Zellen in Rollerflaschen mit Einfach-Ernteschema	91
Abbildung 4.-20: Profile der Glutamin- (-■- Kontrolle, -▲- moi 0,01 und -●- moi 0,10) und Ammoniumkonzentration (-□- Kontrolle, -○- moi 0,01 und -△- moi 0,10) für nicht-infiizierte und MEV-infiizierte E-FL Zellen in Rollerflaschen mit Einfach-Ernteschema	92
Abbildung 4.-21: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 (1 g · L ⁻¹) im Rührreaktor (5 L- Maßstab) nach a) 24 h, b) 96 h und c) 144 h bei Batch-Kultivierung 1	97
Abbildung 4.-22: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 (2 g · L ⁻¹) im Rührreaktor (5 L- Maßstab) nach a) 22 h, b) 92 h und c) 120 h bei Batch-Kultivierung 2	97
Abbildung 4.-23: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL auf Cytodex™ 1 (5 g · L ⁻¹) im Rührreaktor (5 L- Maßstab) nach a) 24 h, b) 90 h und c) 168 h bei Batch-Kultivierung 3	97

- Abbildung 4-24: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellzahlen von E-FL Zellen im Rührreaktor mit verschiedenen Microcarrier-Startkonzentrationen bei den Batch-Kultivierungen 1 - 3, (-■- Zellzahl 1 mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -▲- Zellzahl 2 mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -●- Zellzahl 3 mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -□- ln Zellzahl 1 mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC, -△- ln Zellzahl 2 mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC und -○- ln Zellzahl 3 mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC)..... 98
- Abbildung 4-25: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks p_{O_2} (---) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (-■-) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme OUR (-x-) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme q_{O_2} (-●-) für Kultivierung 1 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L-Maßstab) 99
- Abbildung 4-26: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks p_{O_2} (---) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (-■-) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme OUR (-x-) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme q_{O_2} (-●-) für Kultivierung 2 ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L – Maßstab) 99
- Abbildung 4-27: (links) Profil des Sauerstoffpartialdrucks p_{O_2} (---) und des kumulativen Sauerstoffverbrauchs T_{O_2} (-■-) sowie (rechts) Verlauf der Sauerstoffaufnahme OUR (-x-) und der spezifischen Sauerstoffaufnahme q_{O_2} (●) für Kultivierung 3 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) von E-FL im Rührreaktor (5 L – Maßstab), Medienwechsel nach 72 h 100
- Abbildung 4-28: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-◆-) für E-FL Zellen auf ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) bei Kultivierung 1 102
- Abbildung 4-29: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-◆-) für E-FL Zellen ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) in Kultivierung 2..... 103
- Abbildung 4-30: Verlauf der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-◆-) für E-FL Zellen ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Rührreaktor (5 L-Maßstab) in Kultivierung 3, Medienwechsel (90 % wv mit WM) nach 72 h 103
- Abbildung 4-31: Mikroskopische Aufnahmen von E-FL ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MC) im Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab) nach (links) 20 h und (rechts) 123 h bei Kultivierung 4 105
- Abbildung 4-32: Lebendzellzahlen von E-FL Zellen im 1 L-Wave® Bioreaktor bei Kultivierung 4, -■- Zellzahl und -■- ln der Zellzahl 106
- Abbildung 4-33: Profile der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-●-), Glutamin (-▲-) und (-◆-) Ammonium für E-FL Zellen bei Kultivierung 4 im 1 L Wave® Bioreaktor 107
- Abbildung 4-34: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL (links) im Batch-Betrieb nach 144 h und (rechts) im Perfusions-Betrieb nach 144 h Kultivierungsdauer bei Perfusionsversuch I..... 110
- Abbildung 4-35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der E-FL auf Cytodex™ 1 von einer Probe aus Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 144 h Kultivierungsdauer bei Perfusionsversuch I..... 111

Abbildung 4.-36: Lebendzellzahl für die Kultivierung im Reaktor 1 (-●- Batch-Betrieb) und Reaktor 2 (-■- Perfusions-Betrieb) bei Perfusionsversuch I (0,45 L wv, 0,75 RV · d ⁻¹), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	112
Abbildung 4.-37: Profile der Konzentrationen von Glukose (-♦- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Laktat (-●- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch I (0,5 L-Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	113
Abbildung 4.-38: Profile der Konzentrationen von Glutamin (-♦- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Ammonium (-●- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch I (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	114
Abbildung 4.-39: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL (oben links) Reaktor 1 (Batch-Betrieb) nach 48 h, (oben rechts) Reaktor 1 (Batch-Betrieb) nach 250 h, (unten links) Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 48 h und (unten rechts) Reaktor 2 (Perfusions-Betrieb) nach 270 h bei Perfusionsversuch II.....	116
Abbildung 4.-40: Lebendzellzahl für die Kultivierung im Reaktor 1 (-●- Batch-Betrieb) und Reaktor 2 (-■- Perfusions-Betrieb) bei Perfusionsversuch II (450 mL wv, 0,90 RV · d ⁻¹), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	116
Abbildung 4.-41: Profile der Konzentrationen von Glukose (-♦- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Laktat (-●- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch II (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	117
Abbildung 4.-42: Profile der Konzentrationen von Glutamin (-♦- Batch Reaktor 1 und -■- Perfusion Reaktor 2) und Ammonium (-●- Batch Reaktor 1 und -▲- Perfusion Reaktor 2) für die Kultivierung bei Perfusionsversuch II (0,5 L Rührreaktor), schwarze senkrechte Linie zeigt Start des Perfusions-Betriebes	118
Abbildung 4.-43: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL im Reaktor 1 (Perfusions-Betrieb) (links) nach 28 h und (rechts) nach 185 h bei Perfusionsversuch III	120
Abbildung 4.- 44: Lebendzellzahl für die Kultivierung der E-FL bei Perfusionsversuch III (450 mL wv, 0,50 RV · d ⁻¹), schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusions-Betriebes	120
Abbildung 4.-45: Profile der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-♦-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) für die Kultivierung von E-FL bei Perfusionsversuch III im 0,45 L wv Rührreaktor im Batch- und Perfusionsbetrieb, schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusions-Betriebes	121

- Abbildung 4.-46: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL bei Perfusionsversuch IV im Wave® Bioreaktor (links) nach 25 h, (Mitte) nach 168 h und (rechts) nach 230 h Kultivierungsdauer 123
- Abbildung 4.-47: Lebendzellzahl (-●- Rohdaten und -■- mit Korrekturfaktor analog Kapitel 3.9.1) für die Kultivierung der E-FL bei Perfusionsversuch IV im Wave® Bioreaktor (1 L wv, 0,25 RV · d⁻¹), schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusionsbetriebes..... 123
- Abbildung 4.-48: Profile der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) für die Kultivierung von E-FL bei Perfusionsversuch IV im 1 L wv Wave® Bioreaktor, schwarze senkrechte Linien zeigen Start und Ende des Perfusionsbetriebes 124
- Abbildung 4.-49: Lebendzellzahlen für die Kultivierung der E-FL und die Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 1 im Parallelansatz von fünf Rührreaktoren im 0,5 L-Maßstab, senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 99 und 135 h (-■- Reaktor 1 Kontrolle, -◆- Reaktor 2 mit moi 0,01, -▲- Reaktor 3 mit moi 0,10, -●- Reaktor 4 mit moi 1 und -X- Reaktor 5 mit moi 5) 128
- Abbildung 4.-50: Lichtmikroskopische Aufnahmen der E-FL bei Versuch MEV 1 im 0,5 L-Rührreaktor (oben links), Kontroll-Reaktor 1 nach 20 h (oben rechts), Kontroll-Reaktor 1 nach 99 h (unten links), Reaktor 3 mit MEV-Infektion bei moi = 0,10 nach 20 h und (unten rechts) Reaktor 3 mit MEV-Infektion bei moi = 0,10 nach 144 h Kultivierungsdauer 129
- Abbildung 4.-51: Profile der a) Glukose-, b) Laktat-, c) Glutamin- und d) Ammoniumkonzentration bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 1 im Parallelansatz von fünf Rührreaktoren (0,5 L-Maßstab), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 99 und 135 h (-■- Reaktor 1 Kontrolle, -◆- Reaktor 2 mit moi 0,01, -▲- Reaktor 3 mit moi 0,10, -●- Reaktor 4 mit moi 1 und -X- Reaktor 5 mit moi 5) 130
- Abbildung 4.-52: Halblogarithmische Darstellung des Virusfitters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 1 (0,5 L-Maßstab) unter Variation der moi, Ernte 1 nach 99 h, Ernte 2 nach 135 h und Ernte 3 nach 203 h, -□- Reaktor 2 mit moi 0,01, -■- Reaktor 3 mit moi 0,10, -■- Reaktor 4 mit moi 1 und -■- Reaktor 5 mit moi 5 132
- Abbildung 4.-53: Lebendzellzahlen bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV bei Versuch MEV 2 im Parallelansatz von vier Rührreaktoren im 0,5 L-Maßstab (-■- Reaktor 1 Kontrolle Intervall 72 h, -◆- Reaktor 2 mit Ernteintervall 24 h, -▲- Reaktor 3 mit Ernteintervall 48 h und -●- Reaktor 4 mit Ernteintervall 72 h) 133
- Abbildung 4.-54: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 1 (nicht-infizierte Kontrolle), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 139, 220, 284 und 356 h Kultivierung 135

- Abbildung 4-55: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 2 (MEV mit moi 0,01, Ernteintervall 24 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 94, 118, 142 und 166 h Kultivierung 135
- Abbildung 4-56: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 3 (MEV mit moi 0,01, Ernteintervall 48 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 118, 166, 214 und 272 h Kultivierung..... 136
- Abbildung 4-57: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 2 im Reaktor 4 (MEV mit moi 0,01, Ernteintervall 72 h), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 70, 139, 220, 284 und 356 h Kultivierung..... 136
- Abbildung 4-58: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 2 im 0,5 L-Maßstab unter Variation des Ernteintervalles von 24 – 72 h, -□- Reaktor 2 mit Ernteintervall 24 h, -■- Reaktor 3 mit Ernteintervall 48 h und -■- Reaktor 4 mit Ernteintervall 72 h 138
- Abbildung 4-59: Konzentrationsprofile von a) Glukose (-■- Reaktor 1 Kontrolle, -◆- Reaktor 2 moi 0,01) und Laktat (-▲- Reaktor 1 Kontrolle, -●- Reaktor 2 moi 0,01) und von b) Glutamin (-■- Reaktor 1 Kontrolle, -◆- Reaktor 2 moi 0,01) und Ammonium (-▲- Reaktor 1 Kontrolle, -●- Reaktor 2 moi 0,01) bei Versuch MEV 3 im Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion, moi 0,01), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 73, 154 und 244 h 139
- Abbildung 4-60: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 3 im 1 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,01) mit Ernte 1 nach 73 h, Ernte 2 nach 154 h, Ernte 3 nach 244 h und Ernte 4 nach 360 h 140
- Abbildung 4-61: Profil der Konzentrationen von a) Glukose (-■- Reaktor 1 moi 0,01 und -◆- Reaktor 2 moi 0,10) und Laktat (-▲- Reaktor 1 moi 0,01 und -●- Reaktor 2 moi 0,10) und von b) Glutamin (-■- Reaktor 1 moi 0,01 und -◆- Reaktor 2 moi 0,10) und Ammonium (-▲- Reaktor 1 moi 0,01 und -●- Reaktor 2 moi 0,10) bei Versuch MEV 4 im Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,01 und 0,10), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 96, 120, 144, 168 und 192 h Kultivierung..... 141
- Abbildung 4-62: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 4 im 1 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,01 und 0,10) mit Ernte 1 nach 96 h, Ernte 2 nach 120 h, Ernte 3 nach 144 h, Ernte 4 nach 168 h, Ernte 5 nach 192 h und Ernte 6 nach 240 h, -□- Reaktor 1 mit moi 0,01 und -■- Reaktor 2 mit moi 0,10 142
- Abbildung 4-63: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV 5 im 10 L-Wave® Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,10), senkrechte Linien zeigen Medienwechsel nach 96, 144, 189 und 238 h Kultivierung 144

- Abbildung 4.-64: Halblogarithmische Darstellung des Virustiters (TCID₅₀) bei Versuch MEV 5 im 10 L-Wave[®] Bioreaktor (MEV-Infektion mit moi 0,10) mit Ernte 1 nach 96 h, Ernte 2 nach 144 h, Ernte 3 nach 189 h, Ernte 4 nach 238 h und Ernte 5 nach 316 h..... 145
- Abbildung 4.-65: Lebendzellzahlen (-■- Reaktor 1 toi 0 h und -◆- Reaktor 2 toi 24 h) und der Virustiter als TCID₅₀ (-▲- Reaktor 1 toi 0 h und -●- Reaktor 2 toi 24 h) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 120 h) im Rührreaktor (0,5 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 1 148
- Abbildung 4.-66: Profil der Konzentrationen von a) Glukose (-■- Reaktor 1 toi 0 h, -◆- Reaktor 2 toi 24 h) und Laktat (-▲- Reaktor 1 toi 0 h, -●- Reaktor 2 toi 24 h) und von b) Glutamin (-■- Reaktor 1 toi 0 h, -◆- Reaktor 2 toi 24 h) und Ammonium (-▲- Reaktor 1 toi 0 h, -●- Reaktor 2 toi 24 h) bei Versuch MEV-Perfusion 1 im Rührreaktor (MEV-Infektion mit kontinuierlicher Virusernte), senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 120 h)..... 150
- Abbildung 4.-67: Lebendzellzahlen (-■-) und Virustiter als TCID₅₀ (-◆-) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 144 h) im Wave[®] Bioreaktor (1 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 2..... 151
- Abbildung 4.-68: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV-Perfusion 2 im Wave[®] Bioreaktor, senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 120 h)..... 152
- Abbildung 4.-69: Lebendzellzahlen (-■-) und Virustiter als TCID₅₀ (-◆-) bei der Kultivierung von E-FL und der Vermehrung von MEV in kontinuierlicher Ernte (senkrechte Linien zeigen Start und Ende bei 72 und 168 h) im Wave[®] Bioreaktor (1 L-Maßstab) bei Versuch MEV-Perfusion 3..... 154
- Abbildung 4.-70: Profil der Konzentrationen von Glukose (-■-), Laktat (-◆-), Glutamin (-▲-) und Ammonium (-●-) bei Versuch MEV-Perfusion 3 im Wave[®] Bioreaktor, senkrechte Linien zeigen Start und Ende der kontinuierlichen Ernte bei 72 und 168 h 155
- Abbildung 4.-71: Zellzahlen (lebend und tot) auf Microcarriern und im Überstand einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- lebende Zellen auf Microcarriern, -●- lebende Zellen im Überstand, -▲- tote Zellen im Überstand und -◆- In der Zellzahlen auf Microcarriern mit Regressionsgerade..... 157
- Abbildung 4.-72: Zellzyklus-Verteilung und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen einer nicht-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- Zellen in der G₀/G₁ - Phase, -●- Zellen in der G₂ - Phase, -▲- Zellen in der S-Phase, -◆- Zellen in Apoptose und -X- Zellen in Nekrose..... 158
- Abbildung 4.-73: Zellzahlen (lebend und tot) auf Microcarriern und im Überstand einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- lebende Zellen auf Microcarriern, -●- lebende Zellen im Überstand und -▲- tote Zellen im Überstand..... 159

Abbildung 4.-74: Zellzyklus-Verteilung und Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen einer MEV-infizierten E-FL Zellkultur im Rührreaktor (5 L-Maßstab), -■- Zellen in der G_0/G_1 – Phase, -●- Zellen in der G_2 – Phase, -▲- Zellen in der S-Phase, -♦- Zellen in Apoptose und -X- Zellen in Nekrose 160

Abbildung 5.-1: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen MEV-Herstellungsprozesses "Microcarrier-Prozess I" im 50 L-Wave® Bioreaktor 171

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.-1: Liste der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien 43

Tabelle 3.-2: Liste der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Chemikalien und Einsatzstoffe 44

Tabelle 3.-3 Zusammensetzung der PBS/EDTA-Lösung 46

Tabelle 3.-4: Ausgewählte physikalische Eigenschaften von Cytodex™ 1 Microcarriern nach Herstellerangaben [Pharmacia Biotech (GE Healthcare) 2005] 47

Tabelle 3.-5: Zusammensetzung des Zellkulturmediums (EM) nach Herstellerangaben [Sigma-Aldrich, D] 48

Tabelle 3.-6: Parameter für die Subkultivierung von E-FL in statischen und semistatischen Systemen 53

Tabelle 3.-7: Ausgewählte statistische Eigenschaften der Assays für die Bestimmung der Konzentrationen an Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium 61

Tabelle 3.-8: Mittlere Flächen von E-FL im statischen System (Gewebekulturflasche mit 175 cm²) bei verschiedenen Konfluenzgraden 69

Tabelle 4.-1: Zusammenfassung der Verbrauchs- und Bildungsraten sowie der Ausbeutekoeffizienten für die Vermehrung von MEV in E-FL im Einfachernte-Schema unter Variation der „time of infection“ (toi) 83

Tabelle 4.-2: Ausgewählte Parameter zum Stoffwechsel von nicht-infizierten und infizierten E-FL in Rollerflaschenkultivierungen 91

Tabelle 4.-3: Ausgewählte Parameter zu Wachstum und Stoffwechsel der E-FL und Vermehrung von MEV in Gewebekultur- und Rollerflaschen	93
Tabelle 4.-4: Startbedingungen für verschiedene E-FL Kultivierungen im 5 L-Maßstab.....	96
Tabelle 4.-5: Parameter zum Stoffwechsel der E-FL im 5 L-Rührreaktor in Batch-Kultivierung 1 - 3... 	104
Tabelle 4.-6: Ausgewählte Parameter zu Wachstum und Stoffwechsel der E-FL in Cytodex™ 1 Microcarriersystemen im Rührreaktor (5 L-Maßstab) und Wave® Bioreaktor (1 L-Maßstab).....	108
Tabelle 4.-7: Ausgewählte Parameter zur MEV-Vermehrung in Cytodex™ 1 Microcarriersystemen im Rührreaktor (0,5 L-Maßstab) und Wave® Bioreaktor (1 – 10 L-Maßstab).....	146
Tabelle 5.-1: Zusammenfassung der Startparameter für Zellwachstum und Virusinfektion und Ergebnisse (Erntevolumen und -Zeiten sowie Titer) der drei Validierungs-Batches des neuen MEV-Herstellungsprozesses im 50 L-Wave® Bioreaktor.....	172
Tabelle 5.-2: Gesamtausbeuten und Produktivitäten in den drei Validierungs-Batches zur MEV-Herstellung im 50 L-Wave® Bioreaktor	173

6.3 *Literaturverzeichnis*

- [1] al-Rubeai, M., Chalder, S., Bird, R., Emery, A. N., "Cell cycle, cell size and mitochondrial activity of hybridoma cells during batch cultivation", *Cytotechnology*, 7 (3), 1991, 179-186
- [2] al-Rubeai, M., Singh, R. P., "Apoptosis in cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, 9 (2), 1998, 152-156
- [3] Audsley, J. M., Tannock, G. A., "The role of cell culture vaccines in the control of the next influenza pandemic", *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4 (5), 2004, 709-717
- [4] Bajiot, B., Duchene, M., Stephenne, J., "Production Of Aujeszky Vaccine By The Microcarrier Technology 'From the Ampoule To The 500 Litre Fermentor'", *Develop. biol. Standard*, Vol. 66, 1987, 523-530
- [5] Ben-Ze'ev, A., "Differential Control of Cytokeratins and Vimentin Synthesis by Cell-Cell Contact and Cell Spreading in Cultured Epithelial Cells", *The Journal of Cell Biology*, Volume 99, 1984, 1424-1433
- [6] Bibila, T. A., Robinson, D. K., "In Pursuit of the Optimal Fed-Batch Process for Monoclonal Antibody Production", *Biotechnological Progress*, 11, 1995, 1-13
- [7] Bleckwenn, N. A., Golding, H., Bentley, W. E., Shiloach, J., "Production of Recombinant Proteins by Vaccinia Virus in a Microcarrier Based Mammalian Cell Perfusion Bioreactor", *Biotechnology & Bioengineering*, 90 (6), 2005, 663-674
- [8] Bödeker, B. G., "Production processes of licensed recombinant factor VIII preparations", *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 27 (4), 2001, 385-394
- [9] Büntemeyer, H., Bödeker, B. G. D., Lehmann, J., "Membrane-stirrer-reactor for bubble free aeration and perfusion", *Modern Approaches to animal cell technology. European Society of Animal Cell Technology*, 1987, 411-419

- [10] Burger, D.; Gorham, J. R. "Mink virus enteritis." In: Davis, J. W.: Infectious Diseases of wild animals. Ames, IA: Iowa State University Press, 1970, 76-84
- [11] Butler, M., Imaruma, T., Thomas, J., Thilly, W. G., "High Yields From Microcarrier Cultures By Medium Perfusion", *Journal of Cell Science*, 61, 1983, 351-363
- [12] Butler, M., "Growth Limitations In High Density Microcarrier Cultures", *Develop. biol. Standard.*, 60, 1985, 269-280
- [13] Cannizzaro, C., Gugerli, R., Marison, I., von Stockar, U., "On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy", *Biotechnology & Bioengineering*, 84 (5), 2003, 597-610
- [14] Carman, P. S.; Povey, R. C. "Comparison of the viral proteins of canine parvovirus-2, mink enteritis virus and feline panleukopenia virus", *Veterinary Microbiology*, 8 (5), 1983, 423-435
- [15] Chen, H., Zhou, S., Pierce, G. P., Colosi, P., "Adaptation of the Wave Bioreactor to Baculoviral Production of AAV Vectors: Scale-Up Considerations", *Molecular Therapy*, 9 (1), 2004, 160
- [16] Christensen, J.; Alexandersen, S.; Bloch, B.; Aasted, B.; Uttenthal, A. "Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink", *Journal of General Virology*, 75, 1994, 149-155
- [17] Chu, L., Robinson, D. K., "Industrial choices for protein production by large-scale cell culture", *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 2001, 180-187
- [18] Clark, J., Hirtenstein, H., Gebb, C., "Critical Parameters In The Microcarrier Culture Of Animal Cells", *Develop. biol. Standard*, 46, 1980, 117-124

- [19] Clark, J. M., Hirtenstein, M. D., High Yield Culture of Human Fibroblasts on Microcarrier: A First Step in Production of Fibroblast-Derived Interferon (Human Beta Interferon), *Journal of Interferon Research*, 1 (3), 1981, 391-400
- [20] Clark, J. M., Hirtenstein, M. D., "Optimizing Culture Conditions For The Production Of Animal Cells In Microcarrier Culture", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 369, 1981, 33-46
- [21] Clark, J. M., Gebb, C., Hirtenstein, M. D., " Serum Supplements and Serum-Free Media: Applicability For Microcarrier Culture Of Animal Cells", *Develop. biol. Standard.*, 50 ,1982, 81-91
- [22] Cortin, V., Thibault, J., Jacob, D., Garnier, A., "High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture", *Biotechnological Progress*, 20 (3), 2004, 858-863
- [23] Cotmore, S. F.; Tattersall, P., "The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates, *Advances in Virus Research*", 33, 1993, 91-174
- [24] Deshpande, R. R., Heinzle, E., On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors", *Biotechnol. Letters*, 26 (9), 2004, 763-767
- [25] Doverskog, M., Ljunggren, J., Öhman, L., Häggström, L., "Physiology of cultured animal cells", *Journal of Biotechnology*, 59, 1997, 103-115
- [26] Doyle, A., Griffith, B., "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology", Wiley-VCH, New York, 1998
- [27] Ducommun, P., Ruffieux, P., Furter, M., Marison, I., von Stockar, U., "A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures", *Journal of Biotechnology*, 78 (2), 2000, 139-147

- [28] Dürschmid, M. P., Landauer, K.-H., Simic, G., Klug, H., Keijzer, T., Trampler, F., Oudshoorn, A., Gröschl, M., Müller, D., Doblhoff-Dier, O., "Comparison of Fluidized Bed and Ultrasonic Cell-Retention Systems for High Cell Density Mammalian Cell Culture", *Biotechnological Progress*, 19, 2003, 1045-1048
- [29] Eagle, H., "The Salt Requirements of Mammalian Cells in Tissue Culture", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 61, 1956, 356-366
- [30] Eagle, H., Barban, S., Levy, M., Schulze, H. O., "The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures", *Journal of Biol. Chemistry*, 233, 1958, 551-558
- [31] Eagle, H., "Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures", *Science*, Vol. 130, 1959, 432-437
- [32] Eibl, R., Eibl, D., Lettenbauer, C., "Verfahrenstechnische Charakterisierung des BioWave disposable Bioreaktor", *Fortschrittsbericht der FH Wädenswil (CH)*, 2005, 1-14
- [33] Emmett, S. R., Dove, B., Mahoney, L., Wurm, T., Hiscox, J. A., "The Cell Cycle and Virus Infection", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 296, 2005, 197-218
- [34] Engasser, J.-M., "Bioreactor Engineering: The Design and Optimization of Reactors With Living Cells", *Chemical Engineering Science*, 43 (8), 1988, 1739-1748
- [35] Flagstad, A., "Feline Panleukopenia Virus and Mink Enteritis Virus – A Serological Study", *Acta. Vet. Scand.*, 18 (8), 1977, 1-9
- [36] Flint, S. J., Enquist, L. W., Racianello, V. R., "Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses, American Society for Microbiology", Washington D. C., 2004
- [37] Frahm, B., Lane, P., Märkl, H., Pörtner, R., "Improvement of a mammalian cell culture process by adaptive, model-based dialysis fed-batch cultivation and suppression of apoptosis", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 26 (1), 2003, 1-10

- [38] Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique", Wiley-Liss, 5. Auflage, 2005
- [39] Genzel, Y., Behrendt, I., König, S., Sann, H., Reichl, U., "Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture", *Vaccine*, 22 (17-18), 2004, 2202-2208
- [40] Genzel, Y., Olmer, R. M., Schäfer, B., Reichl, U., "Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media", *Vaccine*, 24 (35-36), 2006, 6074-6087
- [41] Geserick, C., Bonarius, H. P. J., Kongerslev, L., Hauser, H. J., Müller, P. P., "Enhanced Productivity During Controlled Proliferation of BHK Cells in Continuously Perfused Bioreactors", *Biotechnology and Bioengineering*, 69 (3), 2000, 266-274
- [42] Ghanem, A., Shuler, M. L., "Characterization of a Perfusion Reactor Utilizing Mammalian Cells on Microcarrier Beads", *Biotechnological Progress*, 16 (3), 2000, 471-479
- [43] Ghani, K., Garnier, A., Coelho, H., Transfiguracion, J., Trudel, P., Kamen, A., "Retroviral vector production using suspension-adapted 293 GPG cells in a 3 L acoustic filter-based perfusion bioreactor", *Biotechnology & Bioengineering*, 95 (4), 2006, 653-660
- [44] Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., Sinskey, A. J., "Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up", *Trends in Biotechnology*, 1 (4), 1983, 102-108
- [45] Gorenflo, V. M., Smith, L., Dedinsky, B., Persson, B., Piret, J. M., "Scale-up and optimization of an acoustic filter for 200 L/day perfusion of a CHO cell culture", *Biotechnology & Bioengineering*, 80 (4), 2002, 438-444
- [46] Häggström, L., Ljunggren, J., Öhmann, L., "Metabolic Engineering of Animal Cells", *Ann. New York Acad. Sci.*, 782, 1996, 40-52

- [47] Hassell, T., Gleave, S., Butler, M., " Growth Inhibition in Animal Cell Culture: The Effect of Lactate and Ammonia", Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 30, 1991, 29-41
- [48] Hawboldt, K. A., Linardos, T. I., Kalegorakis, N., Behie, L. A., "Cell cycle dynamics of microcarrier cultures", Journal of Biotechnology, 34, 1994, 133-147
- [49] Henzler, H.-J., "Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter", Chem.-Ing.-Tech., 54 (5), 1982, 461-476
- [50] Hesse, F., Wagner, R., "Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures", Trends in Biotechnology, 18, 2000, 173-180
- [51] Hirtenstein, M., Clark, J., Lindgren, G., Vretblad, P., "Microcarriers For Animal Cell Culture: A Brief Review Of Theory And Practice", Develop. biol. Standard, 46, 1980, 109-116
- [52] Hu, W. S., Dodge, T. C., Frame, K. K., Himes, V. B., "Effect Of Glucose On The Cultivation Of Mammalian Cells", Development biol. Standard., Vol. 66, 1987, 279-290
- [53] Hu, W.-S., Aunins, J. G., "Large-scale mammalian cell culture", Current Opinion in Biotechnology, 8 (2), 1997, 148-153
- [54] Hueffer, K.; Parrish, C. R. "Parvovirus host range, cell tropism and evolution", Current Opinion in Microbiology, 6, 2003, 392-398
- [55] Jäger, V., Lehmann, J., Friedl, P., "Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors", Cytotechnology, 1, 1988, 319-329

- [56] Jung, S., Behie, L. A., Lee, P. W., Farrell, P. J., "Optimization of reovirus production from mouse L-929 cells in suspension culture", *Biotechnology & Bioengineering*, 85 (7), 2004, 750-760
- [57] Kallel, H., Rourou, S., Majoul, S., Loukil, H., "A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61 (5-6), 2003, 441-446
- [58] Kääriäinen, L.; Kangas, J.; Keränen, S., Nyholm, M.; Weckström, P., "Studies on Mink Enteritis Virus", *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 19 (2), 1966, 197-209
- [59] Kariatsumari, T., Horiuchi, M., Hama, E., Yaguchi, K., Ishiguro, N., Goto, H., Shinagawa, M., "Construction and nucleotide sequence analysis of an infectious DNA clone of the autonomous parvovirus, mink enteritis virus", *Journal of General Virology*, 72 (4), 1991, 867-875
- [60] Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., Matanguihan, C., Michaels, J., Naveh, D., "The 'push-to-low' approach for optimization of high density perfusion cultures of animal cells", *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 101, 2006, 75-98
- [61] Kretzmer, G., "Industrial Processes with Animal Cells", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, No. 2 – 3, 2002, 135-142
- [62] Langeveld, J. P. M.; Kamstrup, S.; Uttenthal, A.; Strandbygaard, B.; Vela, C.; Dalsgaard, K.; Beekman, N. J. C. M.; Meloen, R. H.; Cascal, J. I., "Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein", *Vaccine*, 13 (11), 2003, 1033-1037
- [63] Lavric, V., Ofiteru, I. D., Woinaroschy, A., "A sensitivity analysis of the fed-batch animal-cell bioreactor with respect to some control parameters", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 41 (1), 2005, 29-35

- [64] Liess, B., Kaaden. O.-R., "Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Haussäugetiere und Fische", Schlütersche, 2. Auflage, 2003
- [65] Lindner, E., Arvidsson, A.-C., Wergeland, I., Billig, D., "Subpassaging Cells On Microcarriers: The Importance For Scaling Up To Production", *Develop. biol. Standard.*, 66, 1987, 299-305
- [66] Lüdemann, I., Pörtner, R., Märkl, H., "Effect of NH₃ on the cell growth of a hybridoma cell line", *Cytotechnology*, 14, 1994, 11-20
- [67] Martinelle, K., Häggström, L., "Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes", *Journal of Biotechnology*, 30, 1993, 339-350
- [68] McPherson, L. W., "Feline Enteritis Virus – Its Transmission to Mink under Natural and Experimental Conditions", *Can. Journal Comp. Med. Vet. Sci.*, 20, 1956, 197-202
- [69] Meignier, B., "Cell Culture On Beads Used For The Industrial Production Of Foot-And-Mouth Disease Virus", *Develop. biol. Standard.*, 42, 1979, 141-145
- [70] Meignier, B., "Industrial experience with live polio vaccine prepared on the Vero continuous cell line", *Dev. Biol. (Basel)*, 106, 2001, 341-344
- [71] Merten, O.-W., "Cell Detachment." In: Spier, R. E.: *Encyclopedia of cell technology*. Vol. 1, New York: Wiley, 2000, 351-365
- [72] Merten, O.-W., "State-of-the-art of the production of retroviral vectors", *Journal of Gene Medicine*, 6 (1), 2004, 105-124
- [73] Meuwly, F., Weber, U., Ziegler, T., Gervais, A., Mastrangeli, R., Crisci, C., Rossi, M., Bernard, A., von Stockar, U., Kadouri, A., "Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality", *Journal of Biotechnology*, 123 (1), 2006, 106-116

- [74] Modrow, S., Falke, D., "Molekulare Virologie", Spektrum Akademischer Verlag, 1997
- [75] Möhler, L., Segregierte mathematische Modelle zum Wachstum adhärenter tierischer Zellen (MDCK) und zur Influenza Virus Replikation, Gilles, E. D. (Editor), Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme Magdeburg, Shaker-Verlag, 2006, 1-160
- [76] Montagnon, B. J., Fanget, B., Vincent-Falquet, J. C., "Industrial Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of Vero Cells on Microcarrier", *Reviews of Infectious Diseases*, 6 (2), 1984, 341-344
- [77] Nahapetian, A. T., Thomas, J. N., Thilly, W. G., "Optimization of environment for high density Vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites", *Journal of Cell Science*, 81, 1986, 65 - 103
- [78] Neermann, J., Wagner, R., "Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells", *Journal of Cell Physiology*, 166 (1), 1996, 152-169
- [79] Nehring, D., Gonzalez, R., Pörtner, R., Czermak, P., "Experimental and modelling study of different process modes for retroviral production in a fixed-bed reactor", *Journal of Biotechnology*, 122 (2), 2006, 239-253
- [80] Ohashi, R., Singh, V., Hamel, J.-P. P., "Perfusion Cell Culture in Disposable Bioreactors", E. Lindner-Olsson et al. (eds.), *Proceedings of the 17th ESACT*, Tylosand, Sweden, *Animal Cell Technology: From Target to Market*, 2001, 403-409
- [81] Ozturk, S. S., Palsson, B. O., "Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration", *Biotechnol. Prog.*, 6, 1990, 121-128

- [82] Ozturk, S. S., Palsson, B. O., "Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor", *Biotechnol. Progress*, 7 (6), 1991, 481 - 494
- [83] Palazon, J., Mallol, A., Eibl, R., Lettenbauer, C., Cusido, R. M., Pinol, M. T., "Growth and Ginsenoside Production in Hairy Root Cultures of *Panax ginseng* using a Novel Bioreactor", *Planta Med.*, 69, 2003, 344-349
- [84] Palovuori, R., Eskelinen, S., "Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDBK cells", *European Journal of Cell Biology*, 79, 2000, 961-974
- [85] Parrish, C. R.; Leathers C. W.; Gorham, J. R., "Comparisons of feline panleukopenia virus, canine parvovirus, raccoon parvovirus and mink enteritis virus and their pathogenicity for mink and ferrets", *American Journal of Veterinary Research*, 48 (10), 1987, 1429-1435
- [86] Parrish, C. R., "Emergence, Natural History and Variation of Canine, Mink and Feline Parvoviruses", *Advances in Virus Research*, 38, 1990, 403-449
- [87] Pau, M. G., Ophorst, C., Koldjik M. H., Schouten G., Mehtali, M., Uytdehaag, F., "The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines", *Vaccine*, 19, 2001, 2716-2721
- [88] Peng, C. A., Palsson, B. O., "Determination of specific oxygen uptake rates in human hematopoietic cultures and implications for bioreactor design", *Annuals Biomed. Eng.*, 24 (3), 1996, 373-381
- [89] Pharmacia Biotech (GE Healthcare), "Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods", 2005, 1-172
- [90] Piez, K. A., Eagle, H., "The Free Amino Acid Pool Of Cultured Human Cells" *Journal of Biol. Chem.*, 231, 1958, 533-545

- [91] Pörtner, R., Bohmann, A., Lüdemann, I., Märkl, H., "Estimation of specific glucose uptake rates in cultures of hybridoma cells", *Journal of Biotechnology*, 34, 1994, 237-246
- [92] Pörtner, R., Schäfer, T., "Modelling hybridoma cell growth and metabolism – a comparison of selected models and data", *Journal of Biotechnology*, 49 (1-3), 1996, 119-135
- [93] Pohlscheidt, M., "Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Viruspropagation von *Parapoxvirus Ovis NZ-2*", Dissertation, 2005, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, 1-178
- [94] Pridham, T. J.; Wills, C. G., "Variations in the Effectiveness of Commercial Infectious Feline Enteritis Vaccines in Preventing Virus Enteritis of Mink", *Canadian Veterinary Journal*, 1 (2), 1960, 51-57
- [95] Rajcani, J., "Molecular Mechanisms of Virus Spread And Virion Components As Tools Of Virulence", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50 (4), 2003, 407-431
- [96] Reichl, U., Bock, A., "Vorlesungskript: Modellierung von Bioprozessen", 2003, Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg
- [97] Reiter, M., Weigang, F., Ernst, W., Katinger, H. W. D., "High density microcarrier culture with a new device which allows oxygenation and perfusion of microcarrier cultures", *Cytotechnology*, 3, 1990, 39-42
- [98] Reuveny, S., Thoma, R. W., "Apparatus and Methodology for Microcarrier Cell Culture", *Advances In Applied Microbiology*, 31, 1986, 139-179
- [99] Rivera, E., Karlsson, K.-A., Bergman, R., "The Propagation Of Feline Panleukopenia Virus In Microcarrier Cell Culture And Use Of The Inactivated Virus In The Protection Of Mink Against Viral Enteritis", *Veterinary Microbiology*, 13 (4), 1987, 371-381

- [100] Rogan, D., Babiuk, L. A., "Novel Vaccines from Biotechnology", Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 24 (1), 2005, 159-174
- [101] Ruffieux, P.-A, Stockar von, U., Marison, I. W., "Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures", Journal of Biotechnology, 63, 1998, 85-95
- [102] Sardonini, C. A., Barngrover, D., "Oxygen, Bicarbonate, and Acid Metabolism Determinations in Mouse Cell Microcarrier Culture", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 32, 1988, 1079-1078
- [103] Scharfenberg, K., "Die Kultivierung von Säugerzellen in definierten proteinfreien Medien, eine Weiterentwicklung serumfreier Kulturbedingungen", Bioscope, 1997, 17-24
- [104] Schmidt, D., "Edward Jenner: Pionier der Schutzimpfung", mta Spektrum, 4, 182-184, 2001
- [105] Schneider, M., Marison, I. W., v. Stockar, U., "The importance of ammonium in mammalian cell culture", Journal of Biotechnology, Volume 46, 1996, 161-185
- [106] Schofield, F. W., "Virus Enteritis in Mink", North American Veterinarian, 30, 1949, 651-654
- [107] Schügerl, K., "Development of Bioreaction Engineering", Advances in Biochemical Engineering, 70, 2000, 41-105
- [108] Singh, V., "Method for culturing cells using wave-induced agitation", US Patent 000006190913B1, 1998, 1-9
- [109] Spier, R. E., "Encyclopedia of Cell Technology: Viral Vaccine Production In Cell Culture", Vol. 2, Wiley & Sons Inc., New York, 2000, 1182-1206
- [110] Storhas, W., "Bioverfahrensentwicklung", Wiley-VCH, 2003

- [111] Stein, G. S., Baserga, R., Giordano, A., Denhardt, D. T. (Editors), *The molecular basis of cell cycle and growth control*, Wiley-Liss, 1999, 4
- [112] Straube, S., "Kultivierung von felinen Lungenfibroblasten und Vermehrung von Mink Enteritis Virus in Microcarriersystemen bei Batch- und Perfusionsbetrieb", Diplomarbeit, Hochschule Anhalt (FH) und MPI Magdeburg, 2005
- [113] Trabelski, K., Rourou, S., Loukil, H., Majoul, S., Kallel, H., "Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor", *Journal of Biotechnology*, 121 (2), 2006, 261-271
- [114] Truyen, U.; Parrish, C. R., "The evolution and control of parvovirus host ranges", *Virology*, 6, 1995, 311-317
- [115] van Hemert, P., Kilburn, D. G., van Wezel, A. L., "Homogeneous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products", *Biotechnology & Bioengineering*, 11 (5), 1969, 875-885
- [116] van Wezel, A. L., "Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture", *Nature*, 216, 1967, 64-75
- [117] Varani, J., Piel, F., Josephs, S., Beals, T. F., Hillegas, W. J., "Attachment and growth of anchorage-dependent cells on a novel, charged-surface microcarrier under serum-free conditions", *Cytotechnology*, 28, 1998, 101-109
- [118] Vihinen-Ranta, M.; Suikkanen S.; Parrish, C. R., "Pathways of Cell Infection by Parvoviruses and Adeno-Associated Viruses", *Journal of Virology*, 78 (13), 2003, 6709-6714
- [119] Vriezen, N., van Dijken, J., Häggström, L., *Mammalian Cell Culture*, In: Ratledge, C., Kristiansen, B. (Editors), *Basic Biotechnology*, 2nd edition, Cambridge University Press, 2001, 449-470

- [120] Weber, W., Weber, E., Geisse, S., Memmert, K., "Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture", *Cytotechnology*, 38, 2002, 77-85
- [121] Wen, Z. Y., Teng, X. W., Chen, F., "A novel perfusion system for animal cell cultures by two step sequential sedimentation", *Journal of Biotechnology*, 79 (1), 2000, 1-11
- [122] Noé, W., Konrad, A., "Safety and economic aspects of continuous mammalian cell culture", *Journal of Biotechnology*, 22 (1-2), 1992, 51-68
- [123] Werner, R. G., Noé, W., "Mammalian Cell Cultures Part I: Characterization, morphology and metabolism", *Drug Research*, 43 (11), No. 10, 1993, 1134-1139
- [124] Widell, A., Hansson, B. G., Nordenfelt, E., "A Microcarrier Cell Culture System For Large Scale Production of Hepatitis A Virus", *Journal of Virological Methods*, 8, 1984, 63-71
- [125] Wurm, F., "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", *nature biotechnology*, 22 (11), 2004, 1393-1398
- [126] Xie, L., Metallo, C., Warren J., Pilbrough, W., Peltier, J., Zhong, T., Pikus, L., Yancy, A., Leung, J., Aunins, J. G., Zhou, W., "Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER.C6 cell culture under sparging conditions", *Biotechnol Bioeng.*, 83(1), 2003, 45-52
- [127] Zhang, D.-L., "Studies on Preparation of Inactivated Vaccines from Cell Cultures of Mink Enteritis Virus (MEV) and their Immunity", *Science in China (Series B)*, 34 (8), 1991, 947-962
- [128] Zhang, D.-L., "Studies on Isolation, Serum-free Cultivation and Manufacture of Mink Enteritis Virus Optimized for Vaccine Preparation", *Biologicals*, 25, 1997, 103-111

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 22.10.1976
Geburtsort: Bernburg/Saale
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: geschieden

Schulbildung

September 1983 – August 1991, POS "Wilhelm Pieck", Ilberstedt
September 1991 – Juli 1995, Gymnasium "Carolinum", Bernburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1996 – November 2000, Studium der Biotechnologie, Vertiefungsrichtung Biotechnische Verfahren / Pharmatechnik an der FH Anhalt in Köthen, Abschluss als Dipl.-Ing. (FH) für Biotechnologie

Promotion

Februar 2002 – Mai 2005, wissenschaftliche Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Betreuung der Industriekooperation mit dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH

Praktika

Dr. Felgenträger öko.-chem & Pharma GmbH, Rodleben, 8-wöchiges Betriebspraktikum, Februar und August 1997

Toxlabs GmbH, Wolfen-Greppin, Praxissemester im Rahmen des Studiums an der FH Anhalt, Oktober 1998 – Februar 1999

BASF AG, Abt. Forschung, Ludwigshafen, Diplomarbeit zum Thema "Aufbau einer kontinuierlichen Laborfermentation zur Herstellung konjugierter Linolsäure mit *Bifidobacterium breve*", Betreuer Dr. O. Zelder, April – Oktober 2000

Berufserfahrung

Dezember 2000 – Februar 2002, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmitteltechnik und Qualitätssicherung e. V. (ILTQ), Aninstitut der Hochschule Anhalt (FH), Köthen

Februar 2002 – Mai 2005, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Betreuung der Industriekooperation mit dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH

seit Juni 2005, Arbeitsgruppenleiter Technikum im Bereich Forschung und Entwicklung am Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH

Wehrersatzdienst

September 1995 – September 1996, Grünflächenamt, Bernburg/Saale

Publikationen

Hundt, B., Straube, S., Schlawin, N., Kaßner, H., Reichl, U., "Cultivation of E-FL in Perfusion Mode Using Wave[®] Bioreactor and Stirred-Tank Reactor for Parvovirus Vaccine Production", Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, 2005

Hundt, B., Best, C., Schlawin, N., Kaßner, H., Genzel, Y., Reichl, U., "Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave[®] Bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale", Vaccine, 25 (20), 2007, 3987 – 3995

Steckby, 08.05.2007

Boris Hundt