

Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Viruspropagation von *Parapoxvirus Ovis NZ-2*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur

(Dr.-Ing.)

von Dipl.-Ing. (FH) Michael Pohlscheidt

geb. am 25.08.1977 in Troisdorf

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

Gutachter:

Prof. Dr. Udo Reichl

Prof. Dr. Helga Rübsamen Waigmann

Dr. Hans-Jürgen Henzler

Promotionskolloquium am 07.10.2005

SUMMARY

The production of recombinant proteins and vaccines in animal cells for therapeutic applications is of increasing interest. Due to the characteristics of mammalian cells, the cultivation requires complex media composition, specific bioreactor design and a sophisticated operation mode. For the production of a chemically inactivated Parapoxvirus ovis NZ-2 (*PPVO NZ-2*) an adherent Bovine Kidney cell line is cultivated on Cytodex® -3 microcarriers in suspension culture. The inactivated and purified virus particles have shown antiviral activity in several animal models. *PPVO NZ-2* is produced by a biphasic batch process at the 3,5 and 10 L scale. Aeration is realised by shear less membrane oxygenation via a tube stator with a central 2-blade anchor impeller. In order to achieve higher efficiency, process robustness and safety, the established process was optimised.

The cell line was adapted to a protein free medium except recombinant insulin in order to increase biosafety. In parallel, the biphasic batch process was optimised with special emphasis on the description of the cell line, different operating conditions and process management (fed-batch, dialysis, etc.). A mathematical model was developed to support the development. The quality of the purified virus particles was assessed by quantitative electron microscopy, residual host cell protein and DNA-content. A physical characterisation of the reactors with respect to oxygenation, shear force and homogenisation was performed up to the 200 L scale to realise substantiated scale-up to a possible production scale.

This integrated approach led to a new safe, robust and high productive large scale production process, called “Volume-Expanded-Fed” Batch. By subsequent dilution of infected cells into next process scale an increase of productivity by factor 40 related to established biphasic batch process was achieved. A possible large scale production process up to 800 L was designed during this work.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Produktion rekombinanter Proteine und von Vakzinen als Therapeutika durch tierische Zellen spielt in der modernen Biotechnologie eine immer größer werdende Rolle. Bedingt durch die spezifischen Charakteristika stellt die Kultivierung tierischer Zellen hohe Ansprüche an die Medienzusammensetzung, die Auslegung von Bioreaktoren und eine fundierte Betriebsweise.

In einem biphasischen Batch Prozess (3,5 und 10 L) wird eine adhärente *Bovine Kidney* Zelllinie auf Cytodex[®] - 3 Microcarriern zur Vermehrung des *Parapoxvirus ovis NZ-2 (PPVO NZ-2)* kultiviert. Die chemisch inaktivierten und aufgereinigten Viruspartikel haben in verschiedenen Tiermodellen antivirale Aktivität gezeigt. Der notwendige Sauerstoffeintrag wird über Membranbegasung realisiert, die zentral auf einen Stator gewickelt sind. Für eine ausreichende Anströmung der Membranen und eine gute Homogenisierung sorgt ein zentral angebrachter 2-Blatt-Ankerrührer. Der Prozess wurde mit dem Ziel höherer Produktivität, Robustheit und Sicherheit optimiert.

Dazu wurde die Zelllinie an ein Medium frei von Komponenten tierischen, pflanzlichen oder humanen Ursprungs adaptiert. Die Analyse des Microcarrierprozesses mit speziellem Augenmerk auf die Beschreibung der Zelllinie, unterstützt von einem einfachen mathematischen Modell, führte zu Änderungen der Betriebsbedingungen und der Prozessführung (Fed-Batch, Dialyse, etc.). Die Qualität der inaktivierten und aufgereinigten Viruspartikel wurde mit Hilfe von quantitativer Elektronenmikroskopie, der Wirtszellprotein-, DNA-Konzentration und der biologischen Aktivität im Tiermodell bewertet. Mit Hilfe einer physikalischen Beschreibung der Reaktoren bezüglich Sauerstoffversorgung, Scherbeanspruchung und Homogenisierung bis in den 200 L Maßstab, konnte eine fundierte Maßstabsvergrößerung vorgenommen werden.

Dieser integrierte Ansatz führte zu einem neuen, sicheren und hochproduktiven Produktionsprozess. Der sogenannte „Volume-Expanded-Fed“ Batch erhöhte durch sequentielle Verdünnung der infizierten Kultur die Produktivität um den Faktor 40. Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf den Ergebnissen der biologischen und verfahrenstechnischen Experimente ein Produktionsprozess bis in den 800 L Maßstab ausgelegt.

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.

Troisdorf, den 07.10.2005

Michael Pohlscheidt

**„It has been said, that something as small as the flutter of a butterfly’s wing
can ultimately cause a typhoon halfway around the world“**

Edward Norton Lorenz

Ich widme dieser Arbeit meinen Eltern Lothar und Andrea Pohlscheidt und insbesondere
meinem Bruder Christoph Pohlscheidt.

Danksagung

Diese Arbeit entstand bei der Bayer HealthCare AG, Pharma-Operations, Biotechnology, Wuppertal Elberfeld in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für „Dynamik komplexer technischer Systeme“, Magdeburg und der Bayer Technologie Services GmbH, Wuppertal.

Herrn Prof. Dr. U. Reichl danke ich für die Betreuung der Arbeit und der Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen.

Frau Prof. Dr. H. Rübsamen - Waigmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heiner Apeler, Herrn Dr. Hans-Jürgen Henzler und Herrn Dr. Berthold Bödeker für die Betreuung der Arbeit vor Ort und das Vertrauen in meine Person.

Für viele anregende Diskussionen und gute Ratschläge möchte ich mich bei Dr. S. Schmidt, Dr. K. Kaiser, Dipl. Ing. D. J. Kauling, Dipl. Ing. D. Havekost, S. Kirchner (alle Bayer Technology Services GmbH), Dr. T. Minuth, Dr. U. Langer, Dr. J. Peters (alle Bayer HealthCare AG) und Dipl. Ing. Lars Möhler (Universität Magdeburg) bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Bayer HealthCare AG und der Bayer Technology Service GmbH möchte ich mich für die Unterstützung während der Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt dem Labor Dr. Apeler, dem Labor Dr. Langer und dem Labor Dr. Minuth für die herzliche Aufnahme und die technische Unterstützung.

Mein tiefster Dank gilt natürlich meinen direkten Kollegen aus dem Labor Dr. Apeler und Labor Dr. Langer. Insbesondere zu K. Brabender und J. Kerper entwickelte sich neben vielen fachlichen Diskussionen vor allem eine tiefe Freundschaft, für die ich dankbar bin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DER ENTWICKLUNGSKANDIDAT <i>PARAPOXVIRUS OVIS NZ-2</i>	6
1.1.1	DIE FAMILIE DER <i>POXVIRIDAE</i> UND DAS <i>PARAPOXVIRUS OVIS NZ-2</i>	7
1.1.2	REAKTIONEN DES IMMUNSYSTEMS	11
1.1.3	HEPATITIS UND AIDS	12
1.2	DER ETABLIERTE MICROCARRIERPROZESS IM LABORMABSTAB	14
1.3	AUFGABENSTELLUNG	17
2	<u>THEORIE</u>	18
2.1	ZELLBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	18
2.1.1	DER ENERGISTOFFWECHSEL DER ZELLE	18
2.1.2	LIMITATIONEN UND INHIBITIONEN	20
2.1.3	MATHEMATISCHE MODELLIERUNG	21
2.2	BESONDERHEITEN ADHÄRENTER ZELLINIEN	28
2.2.1	ADHÄSION VON ZELLEN AN OBERFLÄCHEN	28
2.2.2	STRATEGIEN ZUR ADAPTATION AN SERUMFREIE BEDINGUNGEN UND ANSCHLIEßENDER GENERIERUNG EINER SUSPENSIONSZELLE	29
2.3	PROZESSFÜHRUNG	32
2.3.1	ARTEN DER PROZESSFÜHRUNG IM VERGLEICH	32
2.4	PHYSIKALISCHE BESCHREIBUNG VON BIOREAKTOREN	35
2.4.1	DIE NEWTONZAHL	35
2.4.2	HOMOGENISIERUNG	35
2.4.3	URSACHEN HYDRODYNAMISCHER BEANSPRUCHUNG	36
2.4.4	SAUERSTOFFVERSORGUNG	38

3	MATERIALIEN UND METHODEN	44
3.1	ZELLINIE UND VIRUS	44
3.2	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	45
3.2.1	MEDIEN	45
3.2.2	PUFFER UND LÖSUNGEN	46
3.3	ZELLKULTIVIERUNG UND VIRUSVERMEHRUNG	50
3.3.1	VORKULTURFÜHRUNG	50
3.3.2	TRYPsinIERUNG DER VORKULTUR UND FERMENTERPROBEN	50
3.3.3	CYTODEX 3 [®] MICROCARRIER UND DEREN VORBEREITUNG	51
3.3.4	BATCH FERMENTATION IM LABORMAßSTAB	51
3.3.5	VIRUSVERMEHRUNG IN T- FLASCHEN	52
3.4	AUFARBEITUNG DER VIRUSSUSPENSION	53
3.4.1	FLIEßSCHEMA DER AUFARBEITUNG	53
3.4.2	ERNTE UND DIAFILTRATION DER FERMENTATIONSKULTUR	54
3.4.3	INAKTIVIERUNG	54
3.4.4	KONZENTRIERUNG UND FORMULIERUNG	55
3.5	ANALYTIK	55
3.5.1	ZELLZAHLBESTIMMUNG	55
3.5.2	BESTIMMUNG INFEKTIÖSER PARTIKEL ÜBER TISSUE CULTURE INFECTIVE DOSE 50%	56
3.5.3	QUANTIFIZIERUNG VIRALER PARTIKEL NACH INAKTIVIERUNG	56
3.5.4	BESTIMMUNG DER WIRTSZELLPROTEINKONZENTRATION MITTELS IMMUNO LIGAND ASSAY	57
3.5.5	QUANTIFIZIERUNG DES DNA-GEHALTES	57
3.5.6	BESTIMMUNG VON GLUKOSE UND LAKTAT	57
3.5.7	BESTIMMUNG VON GLUTAMIN, GLUTAMAT UND AMMONIUM	57
3.5.8	AMINOSÄUREANALYSE MIT HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE (HPLC)	57
3.6	PHYSIKALISCHE BESCHREIBUNG DER REAKTOREN	59
3.6.1	VERWENDETE REAKTOREN	59
3.6.2	BESTIMMUNG DER LEISTUNGSCHARAKTERISTIK	60
3.6.3	DURCHFÜHRUNG DER MISCHZEITEXPERIMENTE	60
3.6.4	BESTIMMUNG DER SCHERBEANSPRUCHUNG	61
3.6.5	BESTIMMUNG DES VOLUMETRISCHEN STOFFTRANSPORTKOEFFIZIENTEN KA	64

4	ERGEBNISSE	66
4.1	ADAPTATION DER ZELLINIE AN SERUM- UND PROTEINFREIE MEDIEN	66
4.1.1	WACHSTUM UND MORPHOLOGIE	66
4.1.2	BEWERTUNG DER VIRUSPROPAGATIONSFÄHIGKEIT	69
4.1.3	VERHALTEN DER <i>BK KLON 3A V</i> ZELLINIE IM BIOREAKTOR	73
4.1.4	GENERIERUNG EINER SUSPENSIONSZELLE	76
4.2	RATEN DER ZELLINIE	77
4.2.1	BESTIMMUNG DER SAUERSTOFFVERBRAUCHSRATE DER ZELLINIE	77
4.2.2	BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN RATEN DER ZELLE IM BIOREAKTOR	79
4.2.3	MIGRATION DER ZELLEN UND TESTLAUF IM 50 L BIOREAKTOR	80
4.3	ANALYSE DES ETABLIERTEN PROZESSES	81
4.3.1	ANALYSE DER FERMENTATIONSDATEN	81
4.4	ERGEBNISSE DER MATHEMATISCHEN MODELLIERUNG DES PROZESSES	84
4.4.1	PHASE I: GENERIERUNG VON BIOMASSE	84
4.4.2	PHASE II: MODELLIERUNG DER VIRUSPROPAGATION	85
4.5	VIRUSVERMEHRUNG MIT VERÄNDERTEN FERMENTATIONSBEDINGUNGEN	89
4.5.1	BATCH FERMENTATION MIT ERNIEDRIGTER ZELLZAHL	89
4.5.2	BATCH FERMENTATION MIT ERHÖHTER ZELLZAHL	90
4.5.3	VERMEIDUNG VON SUBSTRATLIMITATIONEN DURCH MEHRFACHE ERNTEN NACH INFEKTION	91
4.5.4	FED-BATCH	93
4.5.5	DIALYSE	94
4.5.6	ETABLIERUNG EINER NEUEN PROZESSFÜHRUNG: „VOLUME-EXPANDED-FED“ BATCH	97
4.5.7	DIREKTE VERDÜNNUNG ALS VARIATION DES „VOLUME-EXPANDED-FED“ BATCH	100
4.5.8	REDUKTION DER MOI IM „VOLUME-EXPANDED-FED“ BATCH	101
4.6	VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN VERFAHREN	102
4.6.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	102
4.6.2	DNA- UND WIRTSZELLPROTEINABREICHERUNG	103
4.6.3	ÜBERPRÜFUNG DER THERAPEUTISCHEN WIRKSAMKEIT IM TIERMODELL	107
4.7	PHYSIKALISCHE BESCHREIBUNG DER REAKTOREN	108
4.7.1	BESTIMMUNG DER LEISTUNGSCHARAKTERISTIK	108
4.7.2	SUSPENDIERUNG DER MICROCARRIER UND HOMOGENISIERUNG DER KULTUR	110
4.7.3	SCHERBEANSPRUCHUNG	112
4.7.4	STOFFTRANSPORT	113

5	DISKUSSION	122
5.1	ADAPTATION UND PHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIE	122
5.1.1	ADAPTATION DER <i>BOVINE KIDNEY KL 3A</i> ZELLE	122
5.1.2	RATEN DER KULTUR	126
5.1.3	DIREKTE EXPANSION DER ZELLINIE	127
5.2	OPTIMIERUNG DES MICROCARRIERPROZESSES	128
5.2.1	ANALYSE DES ETABLIERTEN PROZESSES	128
5.2.2	MATHEMATISCHES MODELL	128
5.2.3	ÄNDERUNGEN DER PROZESSFÜHRUNG	131
5.3	PHYSIKALISCHE BESCHREIBUNG DER REAKTOREN	137
5.3.1	LEISTUNGSKENNZAHLE UND DURCHMISCHUNG	137
5.3.2	SCHERBEANSPRUCHUNG	138
5.3.3	STOFFTRANSPORT	140
5.3.4	DIREKTE BLASENBEGASUNG („SPARGING“)	141
5.4	ABSCHLIEßENDE AUSLEGUNG DES MÖGLICHEN PRODUKTIONS-PROZESSES	143
6	VERZEICHNISSE	146
6.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	146
6.2	TABELLENVERZEICHNIS	152
6.3	LITERATURVERZEICHNIS	154
7	ANHANG	168
7.1	MAßE DER VERSCHIEDENEN REAKTOREN	168
7.2	OBERFLÄCHENBEGASUNG UND KA-WERTE DER VERSCHIEDENEN REAKTOREN	171
7.3	ABHÄNGIGKEIT DER MEMBRANDURCHMESSER	173
7.4	RELEVANTE FERMENTATIONS DATEN ZUR MODELLIERUNG	173
7.5	LISTE DER ANALYSIERTEN AMINOSÄUREN	174
7.6	LEBENS LAUF	175

SYMBOLVERZEICHNIS

Symbol	Bedeutung	Einheit
\bar{a}	Mittlere Konzentration	[ml/ml]
a	Spezifische Phasengrenzfläche	[m ² /m ³]
a'	Korrigierte spezifische Phasengrenzfläche	[m ² /m ³]
A_S	Membranfläche	[m ²]
b	Blattbreite des Rührers	[m]
c^*	Sättigungskonzentration	[mol/L]
c_L^*	Maximalkonzentration in der Flüssigkeit	[mol/L]
c_L	Konzentration in der Flüssigphase	[mol/L]
c_M	Gaskonzentration an der Membranoberfläche	[mol/L]
c_G	Glukosekonzentration	[g/L]
D	Reaktordurchmesser	[m]
ID	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
ID_S	Diffusionskoeffizient der Membran	[m ² /s]
D	Rührerdurchmesser.	[m]
d_1	Innendurchmesser der Membran	[m]
d_1	Korrigierter Innendurchmesser der Membran	[m]
d_2	Außendurchmesser der Membran	[m]
d_2	Korrigierter Außendurchmesser der Membran	[m]
d_{FV}	Vergleichsflockendurchmesser	[m]
d_p	Partikeldurchmesser	[m]
d_{p50}	Mittlerer Partikeldurchmesser	[m]
d_s	Statordurchmesser	[m]
d_w	Wandstärke	[m]
F	Geometrischer Korrekturfaktor	[-]
F	Volumenstrom Flüssigkeit	[m ³ /h]
G	Stoffstrom	[g/h]
H	Rührerhöhe	[m]
h_S	Statorhöhe	[m]
H	Reaktorhöhe	[m]
H_Y	Henrykonstante (Flüssigphase)	[-]
H_{YS}	Henrykonstante des Membranmaterials	[-]
I_c	Anzahl infizierter Zellen	[ml ⁻¹]
k	Integraler Stofftransportkoeffizient	[m/h]
k_{CDV}	Sterberate der Zellen durch Virus	[h ⁻¹]
k_D	Natürliche Sterberate der Zellen	[h ⁻¹]
k_{DV}	Natürliche Abbaurate des Virus	[h ⁻¹]
k_G	Gasseitiger Stofftransportkoeffizient	[m/h]
k_L	Flüssigseitiger Stofftransportkoeffizient	[m/h]
k_m	Membranseitiger Stofftransportkoeffizient	[m/h]
k_{MV}	Michaelis-Menten Konstante	[g/L]
	Virusvermehrung	
k_S	Michaelis-Menten Konstante für Glukose	[g/L]
k_{VA}	Spezifische Anhaftungsrate	[ml h ⁻¹]
k_{VI}	Spezifische Infektionsrate	[ml h ⁻¹]
l	Länge	[m]
L	Membranlänge unter gedehnten Bedingungen	[m]

Symbol	Bedeutung	Einheit
L_0	Membranlänge	[m]
M_D	Drehmoment	[Nm]
M	Durchmischungsgrad	[-]
n	Rührerdrehzal	[s ⁻¹]
n_i	Molarität	[mol/L]
OTR	Oxygen transfer rate	[mg/(Lh)]
OUR	Oxygen uptake rate	[mg/(Lh)]
P	Druck	[bar]
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck	[%]
P	Leistung	[W]
q	Gasdurchsatz	[m ³]
q_{Gemessen}	Gemessener Gasdurchsatz	[m ³]
q_i	Spezifische Verbrauchs- oder Bildungsrate	[mMol/(d)]
r	Spezifische Respirationsrate	[mg/h]
s	Spaltabstand	[m]
S	Substratkonzentration	[g/L]
t	Zeit	[s]
T	Titrationfaktor	[-]
t_M, t_H	Mischzeit	[s]
t_{Puls}	Laufzeit der Partikelabtastung	[s]
u	Flüssigkeitsgeschwindigkeit	[m/s]
U	Rührerdrehzahl	[s ⁻¹]
u'	Turbulente Schwankungsgeschwindigkeit	[m/s]
U_C	Anzahl uninfizierter Zellen	[ml ⁻¹]
u_L	Umfangsgeschwindigkeit des Laserstrahls	[m/s]
u_P	Partikelgeschwindigkeit	[m/s]
V	Viruskonzentration im Modell	[ml ⁻¹]
V	(Reaktor-) Volumen	[m ³]
V_J	Volumen Jod-Kaliumjodidlösung	[m ³]
V_S	Volumen Stärkelösung	[m ³]
V_T	Volumen Natriumthiosulfatlösung	[m ³]
X	Lebendzellzahl	[ml ⁻¹]
X_{Max}	Maximale Zellzahl	[ml ⁻¹]
X_V	Lebendzellzahl	[ml ⁻¹]
$Y_{V/S}$	Ausbeutekoeffizient für die Bildung viraler Partikel durch die Zelle aus Glukose	[ml ⁻¹ /(g/L)]
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient für Zellzahl aus Glukose	[(ml ⁻¹)/(g/L)]

GRIECHISCHE SYMBOLE

Symbol	Bedeutung	Einheit
ε	Energiedissipation	$[\text{m}^2/\text{s}^3]$
ε_M	Maximale Energiedissipation	$[\text{m}^2/\text{s}^3]$
η	Dynamische Viskosität	$[\text{Pas}]$
η_L	Längenmaßstab der Turbulenz	$[\text{m}]$
μ	Wachstumsrate	$[\text{d}^{-1}]$
μ_V	Spezifische Virusproduktionsrate der Zellen	$[\text{h}^{-1}]$
μ_{Max}	Maximale Wachstumsrate	$[\text{d}^{-1}]$
Δ	Größe der Phasengrenzschicht	$[\text{m}]$
N	Kinematische Viskosität	$[\text{m}^2/\text{s}]$
P	Dichte	$[\text{kg}/\text{m}^3]$
Π	Kreiszahl	$[-]$
τ	Schubspannung	$[\text{N}/\text{m}^2]$
τ_T	Turbulente Schubspannung	$[\text{N}/\text{m}^2]$
ϑ	Temperatur	$[\text{°C}]$

DIMENSIONSLOSE KENNZAHLEN

Symbol	Bedeutung	Formel
c_H	Durchmischungskennzahl	$c_H = t_H n$
Ne	Newtonzahl	$Ne = \frac{P}{n^3 d^5 \rho}$
Re	Reynoldszahl	$Re = \frac{nd}{\nu}$
Re_T	Reynoldszahl der Membran	$Re = \frac{\pi d n d'_2}{\nu}$
Sc	Schmidtzahl	$Sc = \frac{\nu}{ID}$
Sh	Sherwoodzahl	$Sh = \frac{k_L d_2}{ID}$

ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
<i>BHK</i>	<i>Baby Hamster Kidney</i>
<i>BK KL 3A</i>	<i>Bovine Kidney Klon 3A</i>
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
CEV	Cell-associated Enveloped Virus
CHO	Chinese Hamster Ovaria Zelllinie
CPE	Cytopathic Effect
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Ethylimin
EMEM	Eagle's Minimal Essentiel Medium
EMV	Extracellular Enveloped Virus
GBF	„Gesellschaft für biotechnologische Forschung“, Braunschweig, Deutschland
GDH	Glutamatdehydrogenase
GMP	Good Manufacturing Practice
IMV	Intracellular mature virus
IEV	Intracellular Enveloped Virus
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IV	Immature Virus
IU	International Units
HBV	Hepatitis-B-Virus
<i>HEK</i>	<i>Human Embryo Kidney</i>
HCP	Host Cell Protein (Wirtszellprotein)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPPF	Humane Plasma Protein Fraktion
kD	Kilo Dalton
<i>MDBK</i>	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
<i>MDCK</i>	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MOI	Multiplicity of Infection
<i>NS 0</i>	<i>Maus Myelom Zelllinie</i>
PBS	Phosphate buffered saline
<i>PPVO</i>	<i>Parapoxvirus ovis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
qEM	Quantitative Elektronenmikroskopie
SF 9	Spodoptera frugiperda 9
TA	Transaminase
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TCID ₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50%
VEF-Batch	Volume Expanded Fed Batch
VERO	Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze
WCB	Working Cell Bank
WFI	Water for Injection
ZUD	Zentrum für ultrastrukturelle Diagnostik

1 EINLEITUNG

In der modernen Biotechnologie spielt die Produktion von rekombinanten Proteinen und Vakzinen in Säugerzellkulturen eine immer größer werdende Rolle. Das zunehmende Wissen über funktionelle Zusammenhänge bei komplexen Krankheitsgeschehen eröffnet neue therapeutische Ansätze, wodurch in den letzten Jahren auch zunehmend der Bedarf an humanen rekombinanten Proteinen gestiegen ist. Von besonderer Bedeutung sind neben diesen Proteinen vor allem Antikörper, die posttranslationale Modifikationen wie zum Beispiel die Glykosylierung aufweisen [M. W. GLACKEN et al. 1983, M. REITER et al. 1990, J. P. MATHER 1990, M. GAWLITZEK et al. 1995, H. G. GASSEN, K. MINOL 2000, L. R. STIENS 2001, M. POHLSCHIEDT 2002].

Aus diesem Grund hat die tierische Zellkultur in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Fähigkeit tierischer Zellen, Proteine richtig zu falten und posttranslationale Modifikationen korrekt durchzuführen, machen diese Zellen häufig zum idealen Expressionssystem [L. XIE, I. C. W. DANIEL 1997, N. Q. HANSHI et al. 2003, F. M. WURM 2004]. Eine Reihe von Zelllinien, teilweise genetisch modifizierte Hochleistungsproduktionsstämme, sind in der Industrie etabliert und haben ihre ökonomische Effizienz in vielen Prozessen unter Beweis gestellt [B. G. D. BÖDEKER 1992, B. G. D. BÖDEKER 2001, L. IKONOUOMO et al. 2002].

Die Verwendung tierischer Zellen stellt jedoch hohe Ansprüche an den Prozess. Das Produktionssystem und der Produktionsprozess müssen individuell nach Produkt und verwendeter Zelllinie gewählt werden. Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Typen von Zellen:

- Suspensionszellen, wie z.B. *Baby Hamster Kidney (BHK)* Zellen oder *NS 0-Myelomzelle*
- Adhärenzte Zelllinien, wie z.B. *Madin Darby Canine Kidney (MDCK)* Zellen oder *VERO* Zellen (Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze), welche zum Wachstum eine Oberfläche benötigen (Zellzahl u. a. limitiert durch die zu bewachsende Fläche)

Suspensionszellen liegen meist als Einzelzellen in der Flüssigkeit vor und werden auf Grund ihrer einfacheren Handhabbarkeit und ihrer besseren Eignung für die Maßstabsvergrößerung bis hin zu großtechnischen Anlagen in der industriellen Produktion bevorzugt.

Generell gilt, dass die meisten Proteine in Suspensionskulturen und die meisten Viren oder Vakzine in der tierischen Zellkultur mit adhärenen Zelllinien hergestellt werden.

Zur Kultivierung adhärenter Zelllinien existieren eine Reihe von etablierten Systemen. Zum einen sind dies einfache, in der Vakzineherstellung oft verwendete, stationäre Kultivierungsmethoden, wie beispielsweise Kulturflaschen oder Wannenstapel, die kosten- und personalintensiv sind. Zum anderen existieren spezifische Bioreaktoren, wie beispielsweise Festbettreaktoren, Wirbelschichtreaktoren oder Hohlfasermodule, die jedoch Probleme bei der Maßstabsvergrößerung aufweisen [J. B. GRIFFITHS et al. 1987].

Eine weitere Methode zur Kultivierung adhärenter Zelllinien ist die Verwendung von Microcarriersystemen [AMERSHAM 2000]. Microcarrier zeichnen sich durch die Bereitstellung großer Oberflächen aus. Häufig handelt es sich um kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 100-300 µm. Sie weisen geringe Dichteunterschiede zum Medium auf, wodurch sie durch Rühren leicht suspendiert werden können. Die Verwendung von Microcarriern wurde bereits in den sechziger Jahren beschrieben. Ihre Verwendung ist bis in den Produktionsmaßstab (1000 Liter) publiziert [B. J. MONTAGNON et al. 1984, B. J. MONTAGNON et al. 1984A, B. BAIJOT et al. 1987, Z. CHEN et al. 1992, L. IKONOUOMO et al. 2002].

Tierische Zellen, gleichgültig ob Suspensions- oder adhärenere Zelllinien, besitzen spezifische Charakteristika, die sie bezüglich der Prozessführung von Mikroorganismen unterscheiden:

- Im Gegensatz zu Mikroorganismen haben eukaryotische Zellen hohe Ansprüche an das Kulturmedium und sind sensitiv gegenüber Schwankungen in den Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise gegenüber pH oder Temperatur.
- Da tierische Zellen keine Zellwand, sondern nur eine äußere Membran besitzen, sind sie sensitiver gegenüber auftretender Scherbeanspruchung (insbesondere bei der Verwendung von Microcarriersystemen) [J. G. AUNIS, H. J. HENZLER 1993, A. BIEDERMANN 1994]
- Tierische Zellen haben verglichen zu Mikroorganismen einen relativ geringen Sauerstoffbedarf [J. G. AUNIS, H. J. HENZLER 1993, H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993]

Diese spezifischen Charakteristika müssen bei der Wahl des Produktionssystems und der Prozessentwicklung beachtet werden. Für den Bereich der Fermentation lassen sich drei Hauptgebiete definieren, die untereinander jedoch nicht unabhängig sind:

1. Medienzusammensetzung

Begründet aus der Herkunft tierischer Zellen, dem multizellulären Organismus, sind diese Zellen im Gegensatz zu Prokaryoten als spezialisierte „Untereinheit“ dieses Organismus oft nicht in der Lage, alle essentiellen Komponenten (z.B. Aminosäuren) selbst herzustellen. Sie benötigen daher eine komplexe Medienzusammensetzung [H. EAGLE 1956, H. EAGLE et al. 1958, H. EAGLE 1959 K. SCHARFENBERG, R. WAGNER 1995, K. SCHARFENBERG 1997]. Im Organismus stellt die Körperflüssigkeit alle notwendigen Komponenten in ausreichendem Maße zur Verfügung. In der Zellkultur nehmen diese Rolle häufig Seren tierischen Ursprungs, Proteinfractionen humanen oder tierischen Ursprungs oder pflanzliche Peptidhydrolysate ein [A. SIEMENSMA 2002]. Sie werden dem Medium mit dem Ziel hoher Produktivität neben Wachstumsfaktoren und/ oder Hormonen bis zu 20% V/V zugesetzt [P. PRICE et al. 2002].

Insbesondere bei der Herstellung pharmazeutischer Produkte ist die Verwendung von Rohstoffen tierischen oder humanen Ursprungs aus verschiedenen Gründen zu vermeiden. Neben Schwankungen in der Zusammensetzung, oft unbekanntem und hohen Proteinkonzentrationen, die sich in der Aufarbeitung negativ auswirken, ist vor allem der Aspekt der biologischen Sicherheit und der Kontaminationsgefahr des Produktes durch Prionen, Viren, Viroide, Bakterien und DNA zu nennen [V. JÄGER et al. 1988, R. WAGNER et al. 1989, F. HESSE, R. WAGNER 2000].

Die Entwicklungen hin zu serumfreien und/ oder proteinfreien Bedingungen ist daher von Vorteil. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren beispielsweise von der „Gesellschaft für biotechnologische Forschung“ (GBF) in Braunschweig eine Reihe von protein- und serumfreien Medien entwickelt, die kommerziell erhältlich sind [K. SCHARFENBERG 1997].

Bei der Adaptation an proteinfreie und serumfreie Bedingungen müssen bei der Kultivierung adhärenter Zellen häufig auch sogenannte Adhärenzfaktoren, wie z. B. Fibronectin, ergänzt werden, um ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche zu verhindern.

Diese Tatsache stellt häufig die Basis zur Generierung einer Suspensionszelllinie dar. Die Erniedrigung der Serum- oder Proteinkonzentration kann neben erhöhter Sensitivität gegenüber Scherkräften vor allem Einfluss auf Wachstum und Produktivität der Zelle haben. Ein Beispiel für eine erfolgreich an Suspensionsbedingungen adaptierte Zelllinie ist die vielfach etablierte *Chinese Hamster Ovaria (CHO)* -Zelle. Viele Zelllinien, wie die *Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)* Zelle, konnten bis dato nicht an Suspensionsbedingungen adaptiert werden.

2. Gestaltung und Auslegung von Bioreaktoren

Neben der Medienzusammensetzung, die durch die physiologischen Bedürfnisse der Zelle bestimmt wird, spielt die Auslegung der Bioreaktoren in der tierischen Zellkultur eine wesentliche Rolle [J. A. BAILEY, D. F. OLLIS 1977, A. KILLINGER 1988, J. M. ENGASSER 1988, W. S. Hu, J. G. AUNIS 1997]. Tierische Zellen werden wie Mikroorganismen in Fermentern kultiviert, in denen sie möglichst optimale Bedingungen für Wachstum und Produktion vorfinden. Neben dem bereits erwähnten pH-Wert, der Temperatur und der Medienformulierung, stehen vor allem verfahrenstechnische Gesichtspunkte im Vordergrund. Unter anderem muss der Reaktor folgende drei Grundoperationen gewährleisten:

- Aufwirbeln der Microcarrier und Homogenisierung der Fermenterbrühe
- Ausreichende Versorgung mit Sauerstoff
- Geringe Scherbeanspruchung

Um eine gute Homogenisierung und ein Aufwirbeln von Partikeln (Microcarriern) zu gewährleisten, muss in den Reaktor Leistung eingetragen werden. Dies kann zum Beispiel durch mechanischen Leistungseintrag in Form von Rühren geschehen. Der Leistungseintrag verursacht eine hydrodynamische Beanspruchung der Zellen. Die Auswirkungen hydrodynamischer Beanspruchung sind in der Literatur beschrieben. Sie reichen von Einflüssen auf die Wachstumsrate und die Produktbildung bis hin zum lethalen „Abschälen“ der Zellen bei der Kultivierung adhärenter Zellen auf Microcarriern. [K. BLÜSCHER 1993, D. EISENKRÄTZER 1995, H. J. HENZLER, A. BIEDERMANN 1996, H. J. HENZLER 1999].

Auf Grund der im Vergleich zu Mikroorganismen niedrigen Sauerstoffverbrauchsraten (r_X) tierischer Zellen ($r_X = 5 - 150 \text{ mg}/(\text{Lh})$ für Zellzahlen $X = 1 \text{ e}07/\text{ml}$) werden geringe Stofftransportkoeffizienten im Bereich von $0,13 - 6 \text{ h}^{-1}$ für Sauerstoffbegasung bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 40% Luftsättigung benötigt. Diese können unter anderem durch das Verfahren der Membranbegasung erreicht werden, welches im Vergleich zum sogenannten „Sparging“ (Blasenbegasung) eine deutlich geringere Scherbeanspruchung verursacht [H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993, J. G. AUNIS, H. J. HENZLER 1993].

3. Prozessführung und Analyse

Im Vergleich zu Mikroorganismen zeigen tierische Zellen niedrigere Produktions- und Wachstumsraten. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden diverse Kultivierungstechniken und komplexe periphere Einrichtungen entwickelt [J. E. BAILEY, D. F. OLLIS 1977, J. B. GRIFFITHS et al. 1987].

Prinzipiell unterscheidet man drei Grundtypen der Prozessführung für Fermenterkulturen: Das Batch Verfahren, das Fed-Batch Verfahren und die sogenannten kontinuierlichen Verfahren, wie Perfusion oder Dialyse. Ziel der verschiedenen Betriebsweisen ist es, den Zellen optimale Lebensbedingungen bereitzustellen und auftretende Limitationen oder Inhibitionen zu vermeiden. Substratlimitationen können bei kontinuierlichen Verfahren oder im Fall von Batchverfahren durch Fütterung (Fed-Batch) umgangen werden, Inhibitionen durch die Abtrennung toxischer Komponenten (z. B. durch kontinuierliche Prozessführung). Für die primär aus dem Energiestoffwechsel resultierenden niedermolekularen Inhibitoren Ammonium und Laktat existiert kein allgemein gültiger Schwellenwert für inhibierende oder toxische Konzentrationen. Er variiert von Zelllinie zu Zelllinie in einem großen Bereich zwischen 2 mMol und 10 mMol. [A. H. KOYAMA, T. UCHIDA 1989, T. HASSEL et al. 1991, S. HEENEMAN et al. 1993, M. SCHNEIDER et al. 1996]. Für den späteren Einsatz eines Verfahrens in der Produktion ist darauf zu achten, dass das Verfahren effizient, sicher, robust und zur Maßstabsvergrößerung geeignet ist.

Die Wahl eines geeigneten Verfahrens hängt unter anderem von Eigenschaften der Zelle, des Mediums und des Produkts ab. Daher ist eine Bestimmung der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten der Zelllinie notwendig. Eine detaillierte Bestimmung der spezifischen Raten der Zelllinie gestaltet sich jedoch auf Grund der Zellzahlbestimmung insbesondere bei der Kultivierung adhärenter Zelllinien langwierig und schwierig (Ablösen der Zellen und Abbruch der Kultur in stationären Kultivierungsgefäßen).

Auf Grund der Anforderungen Prozesse schnell und effektiv zu entwickeln hat sich neben der zeitintensiven „Versuch und Irrtum“ Methode die mathematische Modellierung etabliert. Mit der Hilfe eines Modells können Gesetzmäßigkeiten und Zusammenhänge zwischen interessierenden Einflussgrößen im System erkannt und analysiert werden [C. G. SINCLAIR et al. 1993].

Mit Hilfe des Modells können Simulationen über das Verhalten des Systems bei veränderten Bedingung erstellt, Experimente geplant und auf physikalischer, chemischer und biologischer Basis ein Verständnis für den Prozess erzeugt werden [B. SYTKA et al. 1977, A. MOSER 1981, I. J. DUNN et al. 2000].

Aus den beschriebenen Bedürfnissen, Charakteristika und komplexen Anforderungen der Kultivierung von Säugerzellen und deren Variationen von Zelllinie zu Zelllinie wird deutlich, dass ein individueller und interdisziplinärer Ansatz zur Entwicklung von Fermentationsverfahren notwendig ist. Dieser Ansatz spiegelt sich in der Aufgabenstellung unter 1.3 wider.

1.1 Der Entwicklungskandidat *Parapoxvirus ovis NZ-2*

Ein chemisch inaktiviertes *Parapoxvirus ovis NZ-2* (PPVO NZ-2) wird als immunmodulatorische und antivirale Substanz bei der Bayer HealthCare AG entwickelt. Zur Virusproduktion wird eine adhärente *Bovine Kidney KL 3A* Zelllinie auf Microcarriern in Suspension im Batch-Betrieb kultiviert [A. LANGE 2000].

In der Literatur sind immunmodulatorische Eigenschaften durch Umgehung oder Unterdrückung einer Immunantwort oder einer Aktivierung des Immunsystems bekannt [E. BÖTTCHER et al. 1994, M. BÜTTNER et al. 1995, L. G. GUIDOTTI et al. 1996, D. M. HAIG, A. MERCER 1998, N. KRUSE, O. WEBER 2001, E. S. MOCARSKI 2002, K. L. MOSSMAN 2002, D. M. HAIG et al. 2002, O. WEBER et al. 2003].

Im folgenden Abschnitt sollen das Virus, die Virusfamilie, die immunmodulatorische Wirksamkeit und die von der Bayer HealthCare AG verfolgten Indikationen kurz beschrieben werden. Besonders das Verständnis der Kinetik der Virusvermehrung in der Wirtszelle, ist für die Verfahrensentwicklung von Bedeutung.

1.1.1 Die Familie der *Poxviridae* und das *Parapoxvirus ovis* NZ-2

Die Familie der Pockenviren enthält die größten bekannten Viren und umfasst zwei Subfamilien, die *Chordopox-* (Wirbeltiere) und *Entmopoxviridae* (Insekten) [S. MODROW, D. FALKE 1997]. Zu den *Chordopoxviridae* gehören u. a. die *Orthopox-* (*Variola*, *Vaccinia*), *Parapox-* (*PPVO*) und die *Avipoxviren* (*Canarypox*). Die *Variolaviren* verursachen eine hochgradig ansteckende und teilweise tödlich verlaufende Infektionskrankheit, die Pocken.

Das *Parapoxvirus ovis* NZ-2 ist wie folgt zu klassifizieren:

- Familie:** *Poxviridae*
Genus: *Parapoxvirus*
Spezies: *Parapoxvirus ovis* (ovis = Schaf)
Stamm: NZ-2 (NZ = New Zealand-2)

Parapoxvirus ovis NZ-2 verursacht Hautinfektionen bei Mensch und Tier und wird der biologischen Sicherheitsstufe 2 (S2) zugeordnet.

Pockenviren haben einen komplexen Aufbau, der schematisch am Beispiel des *Vacciniavirus* in Abbildung 1-1 dargestellt ist und im folgenden Text explizit erklärt wird.

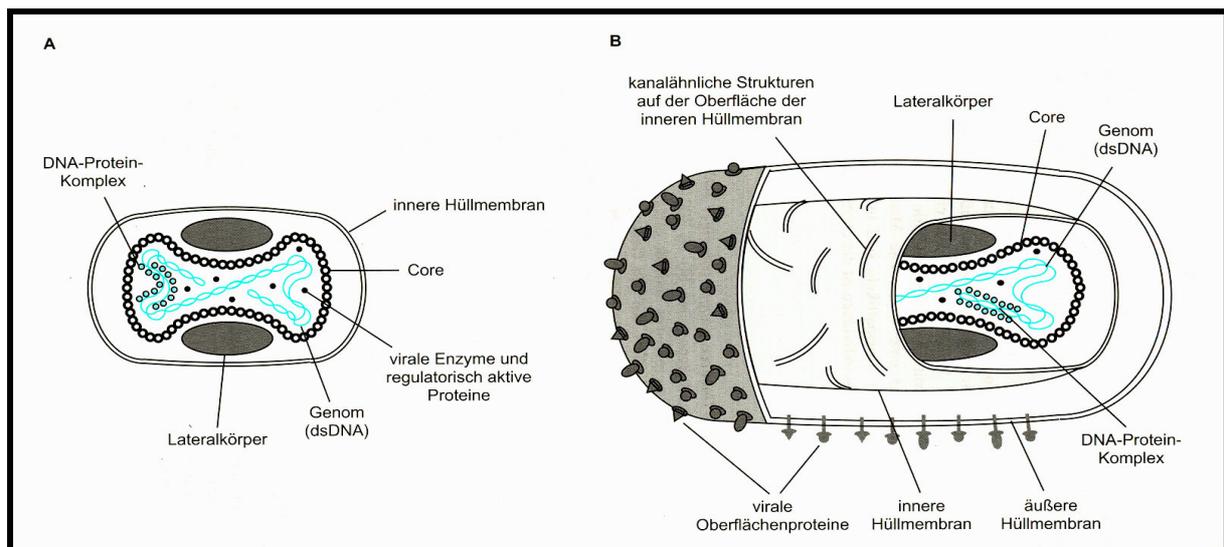


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau des Pockenviruspartikels. A: intracellulär mature virus (IMV), B: extracellulär enveloped virus (EEV) [S. MODROW, D. FALKE 1997].

Die Pockenviruspartikel besitzen eine ovale, ziegelsteinähnliche Form und sind etwa 200 x 300 x 100 nm groß. In den Zellen liegt das Viruspartikel als ein mit einer Membranhülle umgebenes Core vor. Das Core enthält neben dem linearen und doppelsträngigen Genom auch virale Enzyme und regulatorisch aktive Proteine. In den Konkavitäten des Cores befinden sich zwei Lateralkörperchen, deren Funktion und Zusammensetzung unbekannt ist. Die Membranhülle besitzt kanalähnliche Strukturen. In dieser Form wird das Virus als „intracellular mature virus“ (IMV, Abbildung 1-1, A) bezeichnet.

Extrazelluläre Viruspartikel, sogenannte „extracellular enveloped virus“ (EEV, Abbildung 1-1, B), besitzen eine zusätzliche Membran, die auf ihrer Oberfläche spiralförmig um das Partikel gewickelte Proteinstränge aufweisen. Beide Partikel sind infektiös. Für die Übertragung ist die extrazelluläre Form verantwortlich.

Ein grundsätzlich ähnlicher Aufbau wird auch für das 260 nm x 160 nm große *PPVO NZ-2* angenommen.

Der komplexe molekulare Aufbau der Pockenviren ist nicht vollständig geklärt. Analysen der Proteinzusammensetzung der *Vacciniavirus*-Partikel zeigen insgesamt 17 Strukturproteine diverser Molekulargewichte. Sechs dieser Proteine (15 kD bis 42 kD) befinden sich auf der äußeren Membran des EEV. Das prozentual häufigste Protein ist acyliert und besitzt ein Molekulargewicht von 37 kD. Die Hülle der IMV-Partikel besitzt fünf Proteine (Transmembranproteine). Das virale Core besteht zu 70% aus vier Proteinen, die zum größten Teil aus größeren Vorläuferprodukten proteolytisch entstehen. Im Core sind weitere DNA-bindende Proteine assoziiert [B. MOSS 1990, S. MODROW, D. FALKE 1997, G. L. SMITH, A. VANDERPLASSCHEN 1998].

Für *PPVO NZ-2* wird prinzipiell ein homologer Aufbau angenommen.

Das Genom der Pockenviren besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA (dsDNA) bis zu einer Größe von 300 000 Basenpaaren (bp), die 150 bis 200 Gene codieren. Die Enden des Genoms besitzen „inverted terminal repeats“ (ITR-Elemente - die Genomenden sind identisch und in gegenläufiger Ausrichtung).

PPVO NZ-2 besitzt 137 650 bp. Der G-C Gehalt liegt bei 70-80%.

Da sich Pockenviren im Cytoplasma der infizierten Zellen replizieren, können sie im Zellkern lokalisierte zelluläre Enzyme nicht verwenden. Die für die Replikation und Transkription notwendigen Enzyme werden vom Virus selbst codiert. Der Replikationszyklus wird am Beispiel des gut beschriebenen *Vacciniavirus* erklärt (Abbildung 1-2).

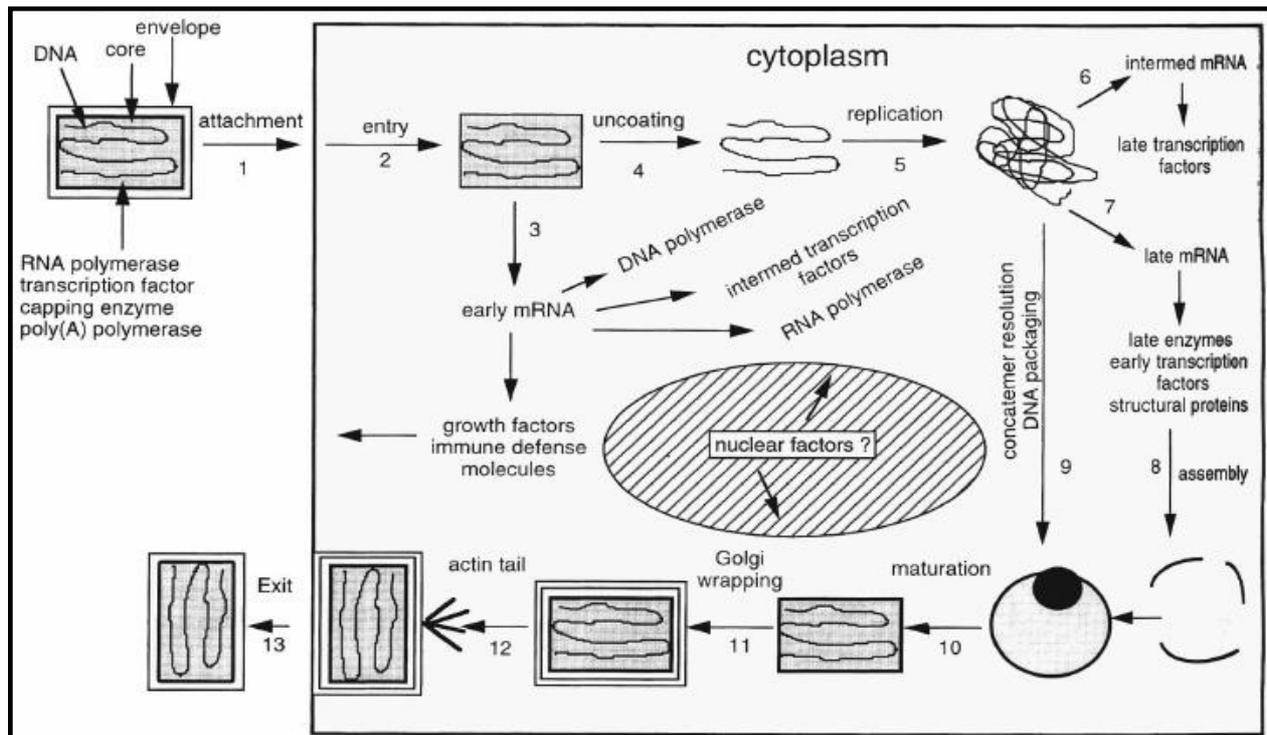


Abbildung 1-2: Schematischer Ablauf der Infektion und der Replikation der Pockenviren am Beispiel des *Vacciniavirus* [B. Moss 1990].

Der für das Anhaften („attachment“, 1) des Viruspartikels an die Zelle verantwortliche Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche ist unbekannt [G. L. SMITH, A. VANDERPLASSCHEN 1998]. Der Mechanismus der Penetration des Virus in die Zelle („entry“, 2) verläuft entweder über Membranfusion oder Endocytose. Im Fall der Infektion mit EEV müssen weitere Membranen abgebaut werden. Das Virus-Core wird ins Cytoplasma entlassen. Bereits zu diesem Zeitpunkt beginnt im Virus-Core die Transkription früher viraler Gene (3). Der in der Literatur beschriebene „immune-escape“ Mechanismus und die immunmodulatorische Eigenschaft durch die Bildung von cytokinähnlichen Proteinen, ist Bestandteil der Überlebensstrategie der Viren und in dieser Phase zu finden [A. MAYR et al. 1990, M. BÜTTNER et al. 1995, N. KRUSE, O. WEBER 2001, D. M. HAIG et al 2002, O. WEBER et al. 2003].

Im Anschluss an die frühe Transkription wird die DNA durch das Auflösen des Virus-Core in das Cytoplasma entlassen und die Replikation beginnt („uncoating“ **4** und „replication“ **5**).

Erst nach der Replikation der DNA wird die intermediäre RNA (kodiert Proteine, die die Transkription der späten oder ‚late‘ RNA regulieren) und die ‚late‘ RNA (kodiert für virale Strukturproteine) gebildet (**6 bis 8**). Der Virus vermehrt sich unter Ausbildung sogenannter „virus-factories“ im Cytoplasma der Zelle (eosinophile Einschlusskörperchen).

Erste Viruspartikel deuten sich durch sichelförmige Fragmente an, die aus intermediären Kompartimenten bestehen und zwischen dem endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat sichtbar werden. Diese bilden ovale, kuppelförmige Partikel, in die der DNA-Nukleoprotein-Komplex gepackt wird, das sogenannte „immature virus“ (IV). Der DNA-Nukleoprotein-Komplex kondensiert und bildet das infektiöse „intracellular mature virus“ (IMV, **10**). Im weiteren Verlauf werden einige der IMV-Partikel mit weiteren Membranen aus dem Golgi-Apparat umgeben („golgi wrapping“, **11**) und es entsteht das sogenannte „intracellular enveloped virus“ (IEV), welches von vier Membranen umgeben wird. Die IEV-Partikel wandern dann entlang der Microtubuli der Zelle zur Zellmembran [B. MOSS, B. M. WARD 2001]. Dabei können die Partikel die Synthese eines Aktinschwanzes induzieren (**12**), der sie in Richtung Zellmembran treibt. Nach Erreichen der Zellmembran treibt der weiter wachsende Aktinschwanz das IEV-Partikel mittels Membranfusion unter Ausbildung sogenannter Microvilli aus der Zelle. Das frei vorliegende Viruspartikel wird „extracellular enveloped virus“ EEV genannt. Bleibt das Virus an der Zellmembran haften, spricht man von „cell-associated enveloped virus“ (CEV). CEV-Partikel können durch Trypsinierung gelöst werden.

Nachdem die „virus-factories“ ein Maximum an Produktivität erreicht haben, schafft die Zelle es nicht mehr, alle Viren auszuschleusen. Tausende Partikel bleiben in der Zelle, welche daraufhin platzt, beziehungsweise lysiert wird. Auf diese Weise werden alle der oben dargestellten Viren freigesetzt.

Es wird angenommen, dass der Replikationszyklus von *PPVO NZ-2* prinzipiell ähnlich verläuft.

Die Vermehrungskinetik des *Parapoxvirus ovis* wurde von T. C. BALASSAU und A. J. ROBINSON (1987) beschrieben. Erste virale DNA wurde 4 - 6 h nach Infektion gefunden. Nach 8 – 16 h kommt es zu einem starken Anstieg viraler DNA, der nach 25 – 30 h in einem Plateau endet. Virusinduzierte Polypeptide wurden 10 h nach Infektion gefunden. Die maximale Expression wird nach 16 – 18 h erreicht, welche dann auf den 10 h Wert zurückfällt. Zelleigene Peptide werden nur minimal synthetisiert. Infektiöse Partikel werden nach 10 - 20 h gefunden, deren Maximalwert nach 40 h erreicht wird und auf einem Plateau verbleibt [T. C. BALASSAU, A. J. ROBINSON 1987]. Diese Erkenntnisse des zeitlichen Ablaufes der Virusvermehrung spielen für die Verfahrensentwicklung eine wichtige Rolle.

Der bereits angesprochene „immune escape“ Mechanismus und die immunmodulatorische Eigenschaft der Viren können nicht ausschließlich auf die von früher mRNA kodierte Proteine zurückzuführen sein. Durch Ethylenimin inaktivierte *Parapoxvirus ovis* NZ-2 zeigen ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften. Durch die Behandlung mit Ethylenimin werden RNA und DNA zerstört. Nach Behandlung des intakten inaktivierten Partikels mit Proteasen (Abbau der äußeren Proteine) verliert das Viruspartikel diese Aktivität. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich folgern, dass Oberflächeneigenschaften oder auf der äußeren Membran intakter Partikel lokalisierte Proteine für die immunmodulatorische Eigenschaft verantwortlich sind. Im nächsten Abschnitt soll die Immunantwort kurz erläutert werden.

1.1.2 Reaktionen des Immunsystems

Das chemisch inaktivierte Viruspartikel *PPVO* NZ-2 stimuliert das Immunsystem unspezifisch und führt zu einer temporär erhöhten Abwehrbereitschaft. In der Literatur sind diese immunstimulierenden Eigenschaften von *PPVO* beschrieben [A. MAYR et al. 1990, D. M. HAIG et al. 2002, O. WEBER et al. 2003]. Eine dauerhafte Immunisierung gegen *PPVO* tritt dabei nicht auf.

PPVO induziert im Rahmen des „immune escape“ Mechanismus die Phagozytose, die Aktivität der natürlichen Killer Zellen (NK), eine Freisetzung von Interferon- α (IFN- α), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-2 (IL-2), und dem „Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor“ (GM-CSF). Im Zuge der immunmodulatorischen Eigenschaften wird eine selbstregulierende Cytokinkaskade induziert, die zu einer vermehrten Bildung von IL-12, IL-18, IFN- γ und IL-4 führt.

Die Kombination aus „immune escape“ Mechanismus und immunmodulatorischen Eigenschaften bezüglich der Sezernierung cytokinähnlicher Faktoren kann verschiedene Vorteile gegenüber etablierten Immuntherapien haben. Die von der Bayer HealthCare AG verfolgten Primärindikationen beziehen sich auf Hepatitis und HIV, bei denen die angesprochene Cytokinkaskade eine wesentliche Rolle in der Immunantwort spielt.

1.1.3 Hepatitis und AIDS

Unter dem Begriff **Hepatitis** versteht man Erkrankungen, die mit einer Entzündung der Leber und einer teilweise chronischen Leberzellschädigung einhergehen. Sie wird durch Viren, Bakterien, Protozoen, Parasiten, toxische Substanzen, Arzneimittel oder Alkohol hervorgerufen. Gegenwärtig werden 5 virale Hepatitisformen (A, B, C, D, E) unterschieden.

Die Erreger gehören zu unterschiedlichen Virusfamilien und besitzen entweder ein DNA-Genom oder ein RNA-Genom. Der Übertragungsweg ist parenteral oder fäkal-oral. Die Übertragung von Hepatitis C erfolgt in erster Linie durch Blut und Blutprodukte. Sie ist die häufigste Form der Posttransfusionshepatitis. Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein einzelsträngiges, umhülltes RNA-Virus. Eine Impfung existiert nicht. [S. MODROW, D. FALKE 1997]. In der Medizin sind Therapieformen mit IFN- α (Monotherapien oder kombinierte Therapien, beispielsweise IFN- α und Lamivudin[®]) bekannt und etabliert.

Das **retrovirale humane Immundefizienzvirus (HIV)** löst nach einer Latenzzeit die Immunschwäche AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) aus. Die Übertragung des Virus erfolgt durch Blut oder Blutprodukte und durch verschiedene Körperflüssigkeiten bei sexuellem Kontakt. Eine pränatale Übertragung im Mutterleib ist ebenfalls möglich. Die Wirtszellen für HIV besitzen auf ihrer Zelloberfläche spezifische Bindungsstellen. Das wichtigste Erkennungsmerkmal ist ein Oberflächenprotein, das CD 4 genannt wird. HIV besitzt auf seiner eigenen Hülle Andockstellen mit dem Namen gp 120 (Glycoprotein 120). CD 4 Zellen sind für das menschliche Immunsystem wichtige Abwehrzellen (T-Helferzellen). CD 4 findet sich außerdem auf einigen Gehirn-, Darm- und Hautzellen. HIV zerstört durch die Infektion dieser T_{H1}-Helferzellen die Verteidigung des menschlichen Körpers gegen HIV. Eine hohe Mutationsrate der Viren führt über eine Veränderung der Epitope (Oberflächenproteine des Virus, an die z. B. Antikörper binden) zu einer hohen Varianz der Viruspopulation. Eine dauerhafte Immunisierung ist nicht möglich.

Bei der durch die Infektion ausgelösten zellulären Immunantwort spielen CD 8 positive cytotoxische T-Zellen eine große Rolle, die HIV-positive Zellen lysieren.

Eine zelluläre Immunantwort wird durch die Sezernierung von IL-2 und IFN- γ vermittelt. Bestehende Therapien arbeiten u. a. mit Integrase, Reverse Transkriptase Hemmer (Nucleosidanaloga) und Protease Hemmern, die aber zu Resistenzen führen können. Cytokine, die zum Ausgleich des CD4/ CD8 T-Zell-Verhältnisses führen, werden ebenfalls eingesetzt.

1.2 Der etablierte Microcarrierprozess im Labormaßstab

Das chemisch inaktivierte *Parapoxvirus ovis* NZ-2 wird in einem biphasischen Batch-Prozess mit einer adhärennten *Bovine Kidney* KL 3A Zelllinie auf Microcarriern in Suspension kultiviert.

Der biphasische Batch-Prozess ist in den Maßstäben 3,5 L und 10 L etabliert. In der ersten Phase des Prozesses wird die adhärennte Zelle auf Cytodex[®]-3 Microcarriern in einem proteinhaltigem Medium vermehrt. Während der zweiten Phase erfolgt die Infektion und Vermehrung von *PPVO* NZ-2 in einem chemisch definierten Medium. Abbildung 1-3 zeigt schematisch den Prozessablauf, der im Folgenden erklärt wird.

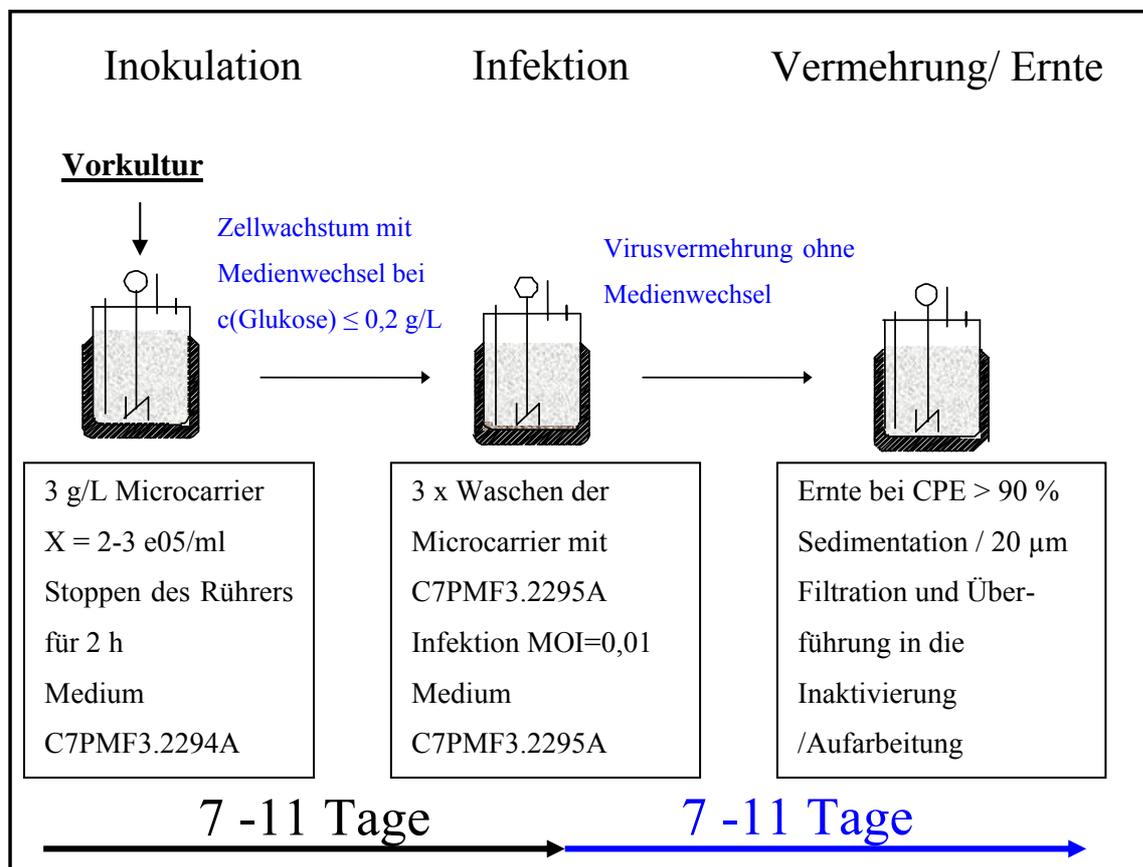


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des etablierten Batch Prozesses (Prozess I).

Mit der aus der Vorkultur stammenden Microcarrier-Zellsuspension wird der Fermenter inokuliert. Die Inokulationsdichte beträgt $X = 2-3 \text{ e}05/\text{ml}$. Zur Förderung der Anhaftung wird der Rührer für 2 h gestoppt. Im 3,5 L Reaktor beträgt die Drehzahl $n = 40 \text{ U/min}$ und im 10 L Reaktor $n = 30 \text{ U/min}$.

Das in der Phase der Zellvermehrung verwendete Medium C7PMF 3.2294A ist mit einer humanen Proteinfraction und rekombinantem Insulin supplementiert. Die Zellen besiedeln unter Verbrauch von Substraten die Microcarrier. Bei Erreichen einer Glukosekonzentration $\leq 0,2$ g/L, wird über Sedimentation ein Medienwechsel durchgeführt. Die Zellen werden im Reaktor bis zum Erreichen der "stationären" Wachstumsphase, d.h. wenn sich die Zellzahl nicht mehr als 10 - 20% pro Tag erhöht, kultiviert. Während dieser 7-11 Tage wird eine maximale Zellzahl von $X \sim 3 \cdot 10^6$ /ml erreicht.

Anschließend wird die Infektion durchgeführt. Um die Supplementkonzentration (Insulin und Proteinfraction in Medium C7PMF 3.2294A) zu erniedrigen, werden die sedimentierten Microcarrier dreifach mit Medium C7PMF 3.2295A (chemisch definiert) gewaschen, der Reaktor mit dem Viruspropagationsmedium auf das Arbeitsvolumen aufgefüllt und die Infektion mit einer "Multiplicity of Infection" (MOI) von 0,01 durchgeführt.

Die Virusvermehrung erfolgt ohne Medienwechsel. Nach 7 -11 Tagen hat das lytische Virus etwa 90% der Zellen (bezogen auf den Beginn der Infektion) zerstört. Dieser "cytopathische Effekt" (CPE) von mehr als 90% stellt das Abbruchkriterium der Fermentation dar.

Nach erneuter Sedimentation der Microcarrier wird der Überstand 20 μ m filtriert. Die Virussuspension wird tiefgefroren (-70°C) und nach Auftauen in die Inaktivierung und Aufarbeitung überführt.

Als In-Prozess-Kontrollen (IPK) werden täglich Zellzahl und Vitalität bestimmt, der pH-Wert extern kontrolliert und ggf. korrigiert. Die Glukose- und Laktatkonzentration werden bestimmt und während der Virusvermehrung ebenfalls der Titer infektiöser Viruspartikel ($TCID_{50}$) ermittelt. Der pH-Wert wird über Natriumhydrogencarbonat und CO_2 bei 7,2 geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration c_L wird auf einen Wert, der 40% Luftsättigung entspricht, geregelt. Die Begasung des Reaktors wird mittels Silikonmembranen ($d_2 = 2$ mm, $d_1 = 1$ mm) realisiert, die auf einen sogenannten Membrankorb gewickelt sind. Um eine gute Anströmung der Membranen zu gewährleisten und ein Anhaften der Zellen an den Membranen zu vermeiden, werden Abstandhalter aus Teflon verwendet. Die Teflonringe, welche die selbe Breite wie die Silikonmembranen besitzen, sind an einer Seite zu etwa 1/3 geöffnet, so dass diese auf den Ringen des Korbes angebracht werden können. Für eine ausreichende Homogenisierung sorgt ein zentral angebrachter 2-Blatt Ankerrührer. In Abbildung 1-4 ist der schematische Aufbau des Reaktors dargestellt.

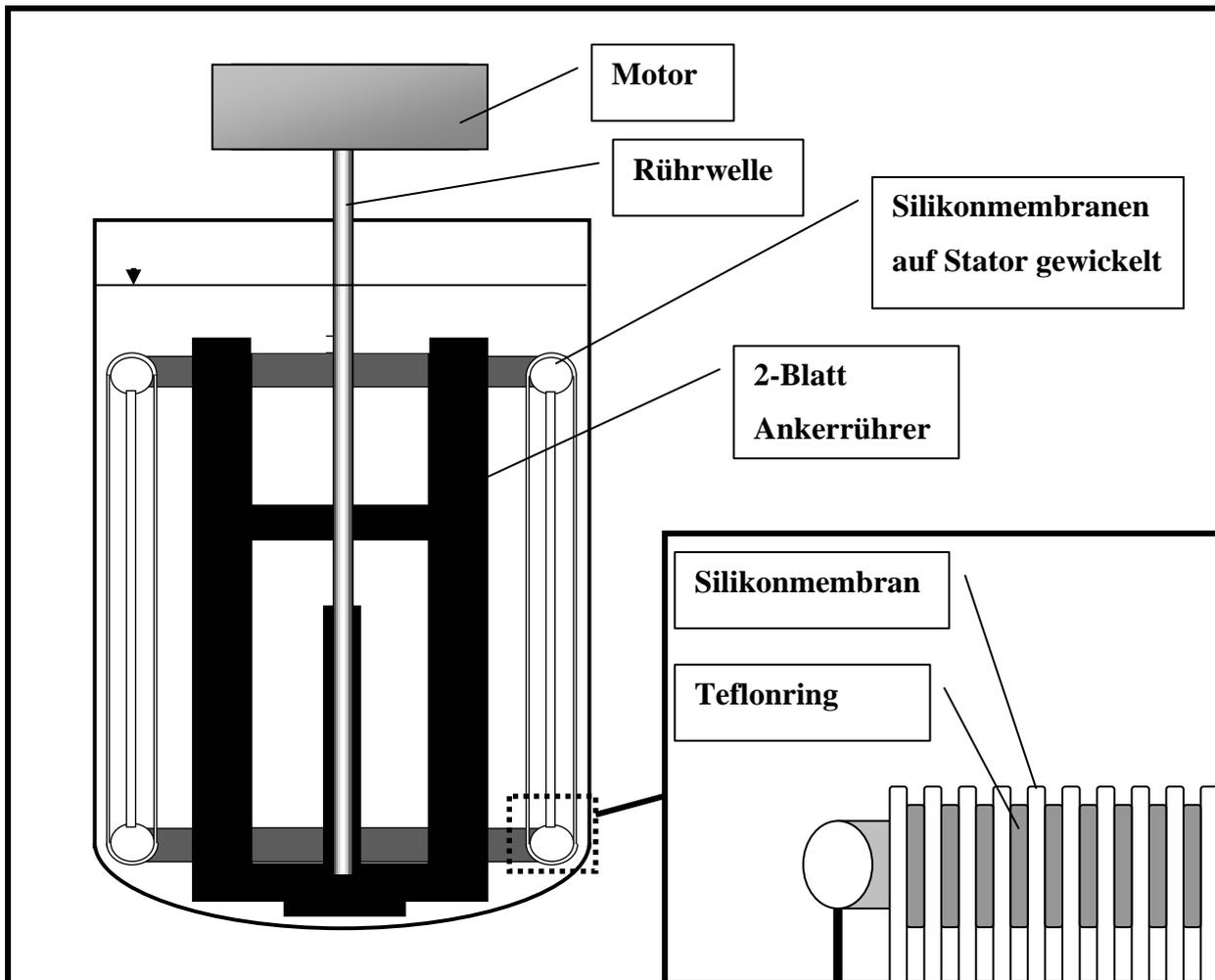


Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau des Bioreaktors. Der Reaktor ist mit einem Statorkorb ausgestattet, auf den die verwendeten Silikonmembranen mit Abstandhaltern gewickelt sind (vergrößerter Ausschnitt). Ein zentral angebrachter 2-Blatt Ankerrührer sorgt für eine ausreichende Homogenisierung und die notwendige Anströmung der Schläuche.

1.3 Aufgabenstellung

Übergeordnetes Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Virus Propagation von *PPVO NZ-2* im zu erwartenden Produktionsmaßstab von 200 L. Es ließen sich drei Teilziele formulieren:

- Zunächst sollte eine Adaptation der verwendeten *Bovine Kidney Kl 3A* Zelle an serumfreie und proteinfreie Medien durchgeführt werden. Dabei wurden kommerziell erhältliche Medien mit einem etablierten „in house“-Medium verglichen. Der Schwerpunkt lag hier auf einer Bewertung bezüglich Wachstum, Morphologie und Produktivität.
In einem folgenden Schritt war eine Adaptation der verwendeten adhärenen *BK KL 3A* Zelllinie an Suspensionsbedingungen geplant.
- Parallel zur Entwicklung eines Suspensionsklons wurde als Hauptschwerpunkt dieser Arbeit eine Optimierung des „small-scale“ Microcarriersystems hinsichtlich Ausbeute, Sicherheit und Skalierbarkeit definiert. Um eine Optimierung des Verfahrens durchzuführen, musste zunächst eine Analyse des Batch Prozesses im Labormaßstab durchgeführt werden. Dazu wurde ein Ansatz verwendet, der auf der „Versuch und Irrtum“ Methode basierte. An dieser Stelle sollte ebenfalls ein einfaches mathematisches Modell zur Beschreibung der Zellvermehrung und der Virusvermehrung im Reaktor entwickelt werden.
- Der Produktionsmaßstab für die Microcarrierkultur war zu Beginn dieser Arbeit mit 200 L veranschlagt. Um eine fundierte Maßstabsvergrößerung durchführen zu können, mussten Reaktoren bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften verfahrenstechnisch beschrieben werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Scherbeanspruchung, der Suspendierung, Homogenisierung und dem Stofftransport. Anhand des Vergleiches mit den zu ermittelnden Kennzahlen in verschiedenen Maßstäben und Geometrien, sollte der voraussichtlich zu erreichende maximale Produktionsmaßstab bestimmt und die zu erwartenden Probleme identifiziert werden.

2 THEORIE

2.1 Zellbiologische Grundlagen

2.1.1 Der Energiestoffwechsel der Zelle

Unter anderem benötigt die Zelle Energie um sich zu teilen, osmotische Arbeit zu verrichten und Produkte zu bilden. Die Energie und notwendige Grundbausteine für Proteine und Nucleotide werden über den Energiestoffwechsel der Zellen zur Verfügung gestellt. Die essentiellen Substratquellen für diese Aufgaben sind Glukose und Glutamin.

Glutamin ist als Kohlenstoffquelle und Stickstoffquelle, sowie als primärer Energielieferant im Allgemeinen bedeutender als Glukose. Aus Glutamin werden ebenfalls Vorstufen für die Proteinbiosynthese erzeugt.

Aus Glukose werden neben Energie vor allem Grundbausteine von Nucleotiden (Ribosen oder Desoxyribosen) über den Pentosephosphatweg generiert. Abbildung 2-1 zeigt schematisch den Energiestoffwechsel der Zellen.

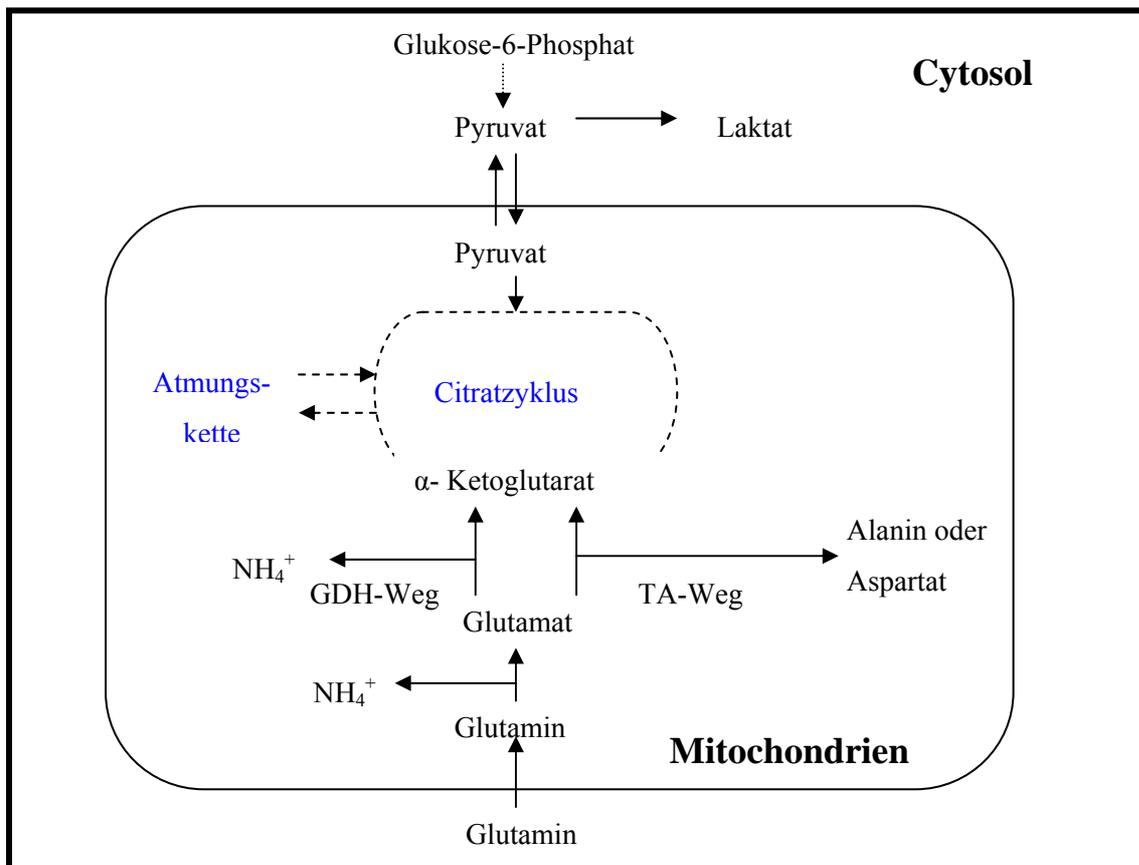


Abbildung 2-1: Vereinfachte schematische Darstellung des Energiestoffwechsels in der Zelle.

Hauptwege des Energiestoffwechsels sind die Glykolyse, der Zitronensäurezyklus und abschließend die Atmungskette in unlimitierten aeroben Prozessen. Aus der Glukose ($C_6H_{12}O_6$) entsteht bei der Glykolyse das Pyruvat. Überschüssiges Pyruvat wird in Milchsäure (Laktat, $C_3H_6O_3$) umgewandelt. Laktat ist ein bekannter Inhibitor. Für die Bildung von Pyruvat aus Glukose gilt:

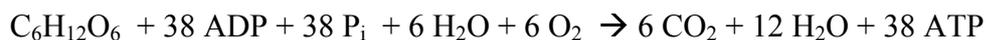


Die in diesen 2 Mol ATP gespeicherte Energie beträgt ~ 70 kJ. Dies entspricht einer Energieausbeute von etwa 40% [P. KARLSON et al. 1994].

Das Pyruvat kann in den Mitochondrien im Zitronensäurezyklus über oxidative Decarboxylierung in AcetylCoA umgewandelt werden:



Das energiereiche AcetylCoA wird im Zitronensäurezyklus unter Abspaltung von CO_2 in Redox- und Energieäquivalente umgewandelt. Die Bildung des aeroben Abbaus von Glukose über die Glykolyse, Zitronensäurezyklus und Atmungskette ergibt:



In diesen 38 Mol ATP werden ~ 1330 kJ Energie gespeichert. Durch den aktiven Transport aus den Mitochondrien werden 2 – 4 Mol ATP dieser theoretisch möglichen 38 Mol ATP verbraucht.

Der Stoffwechsel von Glutamin erfolgt in den Mitochondrien. Dazu werden zunächst beide Aminogruppen abgespalten. Durch die Abspaltung der ersten Aminogruppe entsteht Glutamat und ein Ammoniumion (NH_4^+). Ammonium ist neben Laktat ein Inhibitor tierischer Zellen und wird von der Zelle aktiv ausgeschleust. Die Abspaltung der zweiten Aminogruppe kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen erfolgen:

Beim sogenannten Glutamat-Dehydrogenase-Weg (GDH) wird unter Abspaltung der zweiten Aminogruppe ebenfalls ein Ammoniumion gebildet. Unter Gewinn von NADH entsteht α -Ketoglutarat, welches in den Zitronensäurezyklus eingespeist wird.

Beim Transaminaseweg (TA-Weg) wird bei der Verstoffwechslung von Glutamat kein freies Ammoniumion gebildet, sondern die Aminogruppe liegt gebunden in der Aminosäure Alanin (aus Glutamat und Pyruvat) oder Aspartat (aus Glutamat und Oxalacetat) vor.

Am Glutaminstoffwechsel sind prinzipiell alle Wege beteiligt. Eine Charakterisierung des Stoffwechsels kann über das Verhältnis von gebildeten Ammoniumionen zu verbrauchtem Glutamin vorgenommen werden.

2.1.2 Limitationen und Inhibitionen

Während der Limitation stehen Nährstoffe (eine oder mehrere Substrate oder Sauerstoff) in so geringen Konzentrationen zur Verfügung, dass die Zellen geringere (limitierte) spezifische Raten (z. B. Glukoseverbrauchsrate pro Zelle) als ihre maximal möglichen erreichen. Im unlimitierten Bereich sind die spezifischen Raten keine Funktion der Substratkonzentrationen. Es existieren verschiedene Modelle und Theorien zur Beschreibung von Limitationen. Für das Zellwachstum hat sich das Monod-Modell etabliert.

Sogenannte Inhibitoren verzögern oder blockieren biochemische Reaktionen. In der tierischen Zellkultur sind Laktat und Ammonium die bekanntesten Inhibitoren. Sie resultieren zum größten Teil aus dem Energiestoffwechsel der Zellen (siehe 2.1.1) und wirken ab zellspezifischen Konzentrationen inhibierend auf Wachstum, Produktbildung und Virusvermehrung [A. H. KOYAMA, T. UCHIDA 1989, M. SCHNEIDER et al. 1996].

Bedingt durch die Komplexität des Metabolismus, der verschiedenen Herkunft von Zellen und der Verwendung von Hybridomazellen, die häufig veränderte Stoffwechselaktivitäten vorweisen, existiert kein allgemein gültiger Schwellenwert für inhibitorische oder gar toxische Konzentrationen dieser Stoffwechselendprodukte. Er variiert für Ammonium in einem Bereich von 2 – 10 mMol [M. SCHNEIDER et al. 1996].

Eine Erhöhung der Laktatkonzentration bewirkt eine direkte Änderung des pH-Werts und der Osmolalität. Dadurch wird intrazellulär ebenfalls der pH-Wert geändert, so dass es zu Inhibitionen bestimmter Enzyme kommen kann.

Die inhibitorische Wirkung von intrazellulärem Ammonium kann verschiedene Auswirkungen haben. Zum einen kann Ammonium den intrazellulären oder intraorganellen pH-Wert ändern (z.B. Erniedrigung des pH-Wertes in Lysosomen) oder elektrochemische Gradienten ändern. Dabei diffundiert unprotoniertes Ammonium schnell und direkt durch die Membranen, während protoniertes Ammonium entweder deutlich langsamer diffundiert oder über Transportproteine (wie die Na^+/K^+ ATPase) unter Energieverbrauch ausgeschleust wird. Eine andere Wirkung besteht in der direkten Interaktion mit Enzymen, wie zum Beispiel die für die Entstehung von Glutamat und Ammonium verantwortlichen Glutaminase, deren Aktivität durch Ammonium negativ beeinflusst wird. Ammonium kann ebenfalls den Zellmetabolismus durch Beeinflussung der aufgenommenen Mengen an Glutamin und Glukose ändern [M. SCHNEIDER et al. 1996].

Die Bestimmung des Einfluss limitierender oder inhibitorischer Konzentrationen auf die spezifischen Raten der Zellen gestaltet sich insbesondere bei der Kultivierung adhärenter Zellen problematisch.

2.1.3 Mathematische Modellierung

Im Gegensatz zu empirischen Ansätzen („Versuchs- Irrtum“ Methode), versucht ein mathematisches Modell anhand von wenig experimentellen Daten das Verhalten der Zellen im Bioreaktor zu erklären und eine Simulation bei veränderten Betriebsbedingungen zu ermitteln [I. J. DUNN et al. 2000].

Generell dient ein Modell der Beschreibung von Beobachtungen, der Ableitung von Zusammenhängen und Gesetzmäßigkeiten und der Identifizierung prozessbestimmender Variablen. Durch die kritische Auseinandersetzung mit dem Modell (Vergleich der Simulation mit den experimentell ermittelten Daten) sorgt das Modell indirekt für ein vertieftes Verständnis [C. G. SINCLAIR et al. 1993, I. J. DUNN et al. 2000].

Die Hauptanwendungsgebiete liegen in der Analyse und Planung von Experimenten, der Inter- und Extrapolation von Ergebnissen und in der Erklärung eines Prozesses auf Basis der chemischen, biologischen und physikalischen Grundlagen [B. SIKYTA et al. 1977].

In biologischen Systemen unterscheidet man im Allgemeinen vier Modellansätze, die in Abbildung 2-2 dargestellt sind:

	Unstrukturiert	Strukturiert
Nicht Segregiert	Zellpopulation homogen zusammengesetzt	Zellpopulation heterogen zusammengesetzt
Segregiert	Individuelle Zellpopulation Betrachtung eines Elementes	Heterogene Zellpopulation Betrachtung mehrerer Elemente

Abbildung 2-2: Darstellung der vier Modellansätze in der Biologie [J. E. BAILEY, D. F. OLLIS 1977].

Den schwierigsten Modellansatz stellt die segregierte und strukturierte Betrachtungsweise dar. Sie unterscheidet zwischen jedem individuellen Element der Zellpopulation und versucht gleichzeitig den strukturierten Aufbau der Zellen (Kompartimente) wiederzugeben.

Ein einfacherer Modellansatz ist die segregierte und unstrukturierte Betrachtung, die zwar jedes Element der Zellpopulation individuell behandelt, jedoch nicht den strukturierten Aufbau der Zelle berücksichtigt.

In der nicht segregierten, aber strukturierten Betrachtung wird mit einer „mittleren Zelle“, die die durchschnittlichen Eigenschaften der Zellpopulation repräsentiert, gearbeitet. Die Zelle wird jedoch als aus mehreren Komponenten aufgebaut betrachtet.

Der einfachste und auch in dieser Arbeit verwendete Modellansatz (nicht segregiert und unstrukturiert) betrachtet eine „mittlere Zelle“, bei der die innere Struktur vernachlässigt wird. Mit Hilfe dieses Modellansatzes lassen sich beispielsweise Parameter für kinetische Ansätze ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Modell für das Zellwachstum auf Microcarriern im Batch-verfahren, sowie die folgende Viruspropagation im Batchverfahren entwickelt werden. Das Modell besteht aus einfachen Differentialgleichungen, zur deren Lösung die Software MatLab/ SimuLink 6.5, Version 13 verwendet wird. Das Modell wurde in Anlehnung an MÖHLER et al. 2005 erstellt.

Der erste Schritt zur Erstellung des Modells ist eine grundlegende Darstellung der verschiedenen Prozessphasen:

A) Wachstumsphase auf Microcarriern:

Die aus der Vorkultur stammende Microcarrier-Zellsuspension wird in den Reaktor transferiert, wo die Zellen dann nach Anlagerung und einer kurzen Zeitverzögerung die Microcarrier unter Verbrauch von Nährstoffen mit der Wachstumsrate μ_{max} besiedeln. Falls die Markersubstanz Glukose (S) eine kritische Konzentration unterschreitet, wird durch Sedimentation ein Medienwechsel durchgeführt. Bedingt durch die Kultivierungsbedingungen existiert eine geringe natürliche Sterberate (k_D) der Zellen. Die maximale Zellzahl (X_{Max}) ist nicht nur abhängig von der Substratverfügbarkeit, sondern wird ebenfalls bedingt durch die zu bewachsende Fläche (Kontaktinhibition) von der Microcarrierkonzentration bestimmt.

Aus diesen Überlegungen lässt sich eine Differentialgleichung zur zeitlichen Änderung der Lebendzellzahl (X_V) mit einem Monod-Modell erstellen:

$$\frac{d(X_V)}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{S + k_S} \frac{X_{Max} - X_V}{X_{Max}} X_V - k_D X_V \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Die Änderung der Substratkonzentration ergibt sich zu:

$$\frac{d(S)}{dt} = -\mu_{max} \frac{S}{S + k_S} \frac{X_{Max} - X_V}{X_{Max}} \frac{X_V}{Y_{X/S}} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Die Lösung der Differentialgleichungen verläuft nach der Methode von Runge-Kutta. Die Anzahl der Medienwechsel und die kritische Glukosekonzentration können variiert werden.

Die benötigten Parameter k_S (Michaelis-Menten Konstante), die Wachstumsrate μ_{max} , die natürliche Sterberate k_D und der Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ können an Hand der Fermentationsdaten beispielsweise über Transformationen (Lineweaver-Burk, etc.) abgeschätzt werden.

B) Viruspropagation der konfluent bewachsenen Microcarrier

Nach Erreichen der stationären Phase, wird die Infektion mit einer bestimmten MOI durchgeführt. Die Lebendzellzahl (X_V) setzt sich aus der Zahl der uninfizierten (U_C) und den infizierten Zellen (I_C) zusammen. Uninfizierte Zellen wachsen unter Verbrauch von Substrat ($Y_{X/S}$) entsprechend der bereits für das Wachstum erklärten Beziehung. Durch die Infektion mit dem Virus (V) und der spezifischen Infektionsrate (k_{VI}) werden uninfizierte zu infizierten Zellen (I_C). Bedingt durch die Kultivierungsbedingungen stirbt ein Teil der Zellen ab (k_D). Unter Annahme, dass infizierte Zellen bis kurz vor ihrer Lyse auf den Carriern verbleiben, ergibt sich der Verlauf der Lebendzellzahl zu:

$$\frac{d(U_C)}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{S+k_S} \frac{X_{\max} - (U_C + I_C)}{X_{\max}} U_C - k_D U_C - k_{VI} U_C V \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Infizierte Zellen werden wie zuvor besprochen gebildet. Bedingt durch den Fortschritt der Infektion werden die Zellen mit einer spezifischen Rate (k_{CDV}) zerstört.

$$\frac{d(I_C)}{dt} = k_{VI} U_C V - k_{CDV} I_C \quad \text{Gleichung 2-4}$$

Die Sterberate wird in einen Bereich vor Verbrauch der Substrate und einen Bereich nach Verbrauch der Substrate (höherer Wert) unterschieden. Die infizierten Zellen bilden nach der Infektion das Virus mit einer spezifischen Produktionsrate μ_V . Es wird angenommen, dass die Zelle dazu Substrat verbraucht ($Y_{V/S}$). Ein Teil des Virus wird z. B. bedingt durch im Medium frei vorliegende Proteasen abgebaut oder verliert seine Infektiosität (k_{VD}). Es ist somit nicht mehr im Titrationstest (TCID₅₀) detektierbar. Die freigesetzten infektiösen Viruspartikel infizieren in einer Kettenreaktion weitere uninfizierte Zellen. Sie adsorbieren mit einer Anhaftungsrate (k_{VA}) an die Zellen und liegen somit nicht mehr frei vor. Daraus ergibt sich für die infektiösen Viruspartikel folgende Differentialgleichung:

$$\frac{d(V)}{dt} = \mu_V \frac{S}{S+k_{MV}} I_C - k_{VD} V - k_{VA} U_C V \quad \text{Gleichung 2-5}$$

Der Substratverbrauch ergibt sich aus der gebildeten Biomasse und aus der Annahme, dass die Zelle zur Virusvermehrung durch Bereitstellung viraler Proteine und DNA Substrat verbraucht ($Y_{V/S}$).

$$\frac{d(S)}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S}{S + k_S} \frac{X_{\max} - (U_C + I_C)}{X_{\max}} \frac{U_C}{Y_{X/S}} - \mu_V \frac{S}{S + k_{MV}} \frac{I_C}{Y_{V/S}}$$

Gleichung 2-6

Die zur Erstellung des Modells erforderlichen Parameter sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2) dargestellt. Sie werden zunächst aus den Fermentationsdaten abgeschätzt und anschließend mit einer nicht linearen Parameteroptimierung nach dem „Nelder-Mead“ Simplex Algorithmus optimiert. In Tabelle 2-3 sind die gemessenen Variablen dargestellt.

Tabelle 2-1: Parameter des Prozessmodells für die Generierung von Biomasse.

Abkürzung	Bezeichnung	Dimension	Ermittelt aus/ mit
μ_{\max}	Max. Wachstumsrate	$[h^{-1}]$	Aus Fermentationsdaten mittels Transformation nach Lineweaver-Burk
k_S	Michaelis-Menten Konstante für Glukose	$[g/L]$	Aus Fermentationsdaten mittels Transformation nach Lineweaver-Burk
k_D	Natürliche Sterberate	$[h^{-1}]$	Abschätzung aus Fermentationsdaten
X_{\max}	Maximale Zellzahl	$[ml^{-1}]$	Abschätzung aus Fermentationsdaten
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient für Zellzahl aus Glukose	$[(ml^{-1})/(g/L)]$	Ermittlung aus Fermentationsdaten

Tabelle 2-2: Parameter des Prozessmodells für die Virusvermehrung.

Abkürzung	Bezeichnung	Dimension	Ermittelt aus/ mit
Parameter aus Vorkultur werden für Wachstum der Zellen und Substratverbrauch ebenfalls verwendet			
k_{VI}	Spezifische Infektionsrate	[ml h ⁻¹]	Abgeschätzt
k_{VA}	Spezifische Anhaftungsrate	[ml h ⁻¹]	Abgeschätzt
μ_V	Spezifische Produktionsrate des Virus durch die Zelle	[h ⁻¹]	Abgeschätzt
k_{CDV}	Sterberate der Zellen durch Virus	[h ⁻¹]	Abgeschätzt aus Fermentationsdaten
k_{DV}	Natürliche Abbaurate des Virus	[h ⁻¹]	Abgeschätzt aus Fermentationsdaten
k_{MV}	Michaelis-Menten Konstante zur Virusvermehrung	[g/L]	Abgeschätzt
$Y_{V/S}$	Ausbeutekoeffizient für die Bildung viraler Partikel durch die Zelle aus Glukose	[ml ⁻¹ /(g/L)]	Abgeschätzt aus Fermentationsdaten

Tabelle 2-3: Variablen des Prozessmodells.

Abkürzung	Bezeichnung	Dimension	Fehler
X_V	Lebendzellzahl	[1/ml]	+/- 15%
c_G	Glukosekonzentration	[g/L]	+/- 5%
$\log_{10}(TCID_{50})$	Konzentration infektiöser Viruspartikel	[1/ml]	+/- 0,3 log ₁₀ *

* Verdünnungsfehler der Bestimmungsmethode

In der folgenden Abbildung sind der Verlauf der Virusvermehrung und die getroffenen Annahmen des Modells visuell dargestellt.

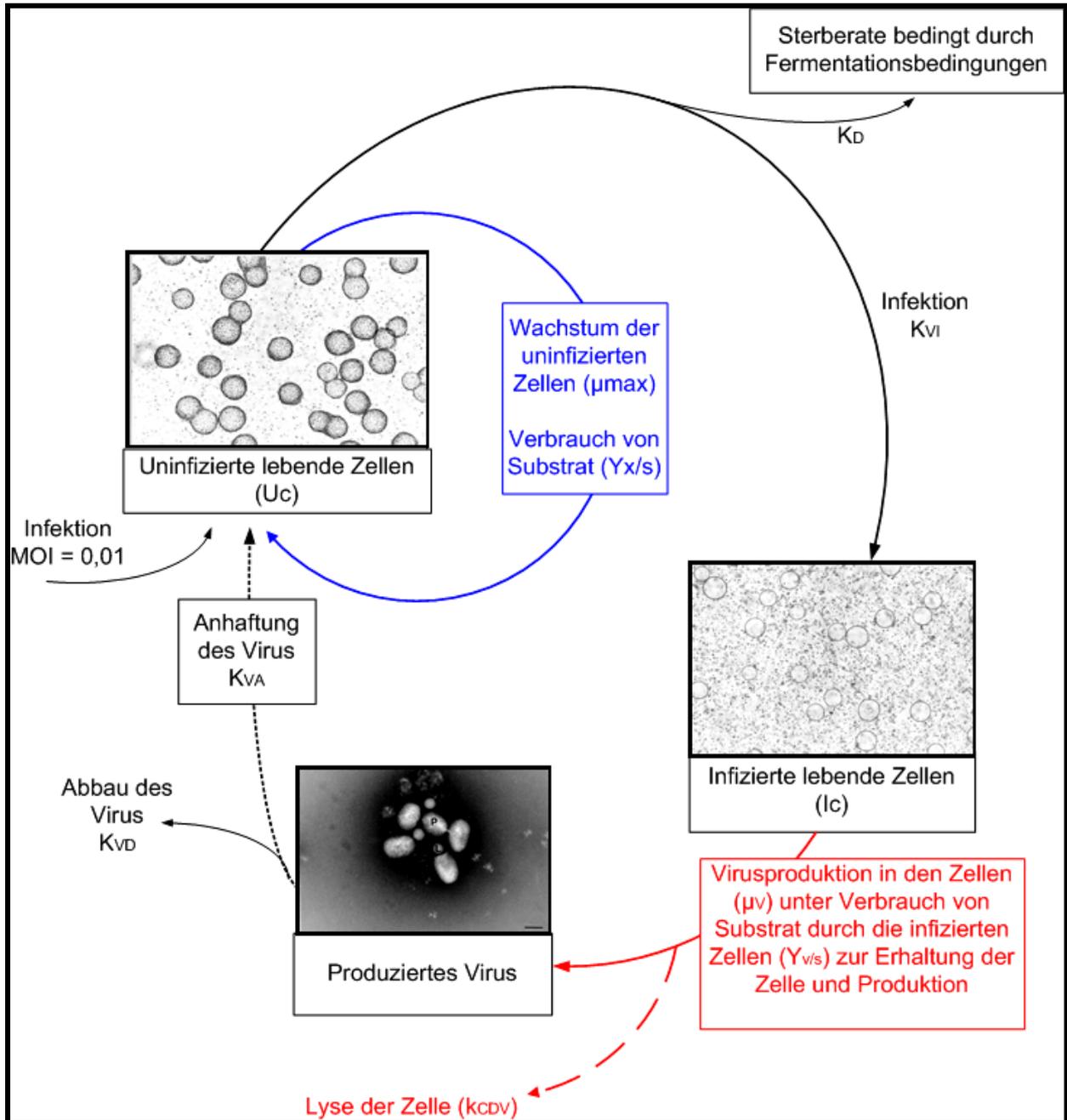


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Virusvermehrung im Modell.

2.2 Besonderheiten adhärenter Zelllinien

2.2.1 Adhäsion von Zellen an Oberflächen

Die Adhäsion adhärenter Zellen an Oberflächen (Kulturflaschen, Microcarrier, etc.) spielt für Wachstum und Produktbildung eine essentielle Rolle. Die Adhäsion lässt sich in vier wesentliche Schritte gliedern (Abbildung 2-4).

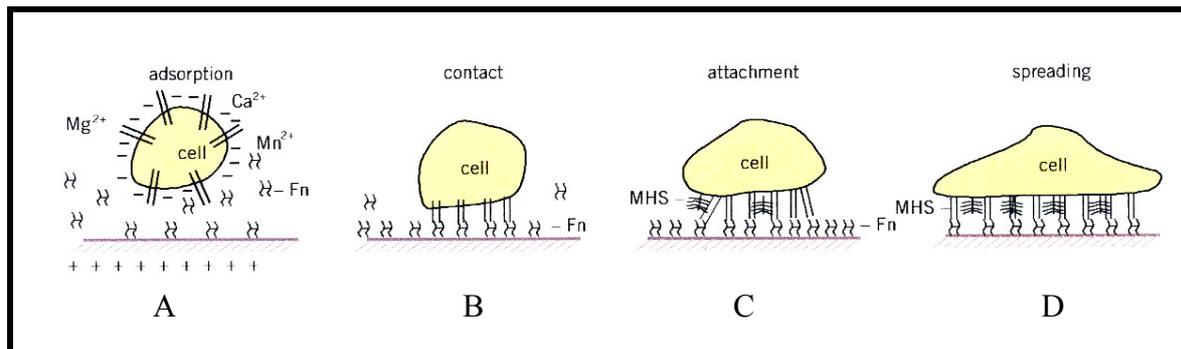


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Adhäsion von Zellen an Oberflächen [AMERSHAM 2000].

A) Die durch das Medium bereitgestellten „Adhärenzfaktoren“, wie beispielsweise Fibronectin oder Vitronectin, werden auf der Oberfläche adsorbiert. Die Faktoren werden durch dem Medium zugesetzte Seren oder Proteinfractionen zur Verfügung gestellt oder von den Zellen selbst hergestellt. Im Fall von serumfreien Kulturen müssen diese Faktoren teilweise zur Wahrung der Adhärenz zugegeben werden [AMERSHAM 2000].

Die Adhäsion wird neben den Adhärenzfaktoren wesentlich von Eigenschaften der Oberflächen beeinflusst (positiv geladene Oberflächen, Collagenbeschichtungen, etc.).

B) Die Zelle adhärert durch den Kontakt zwischen den auf der Oberfläche adsorbierten Adhärenzfaktoren und der partial negativ geladenen Glykocalix der Zelle.

C+D) Von der Zelle synthetisierte multivalente Heparansulfat-Proteoglykane vermitteln das essentielle Ausbreiten der Zelle. Von besonderer Bedeutung sind hier Integrine (Glykoproteinrezeptoren). Der innere Teil der Integrine interagiert mit dem Cytoskelett der Zelle, wodurch diese in der Lage ist, sich auf der Oberfläche auszubreiten. Ohne dieses Ausbreiten der Zellen ist kein Wachstum möglich. Hier sind bivalente Ionen von besonderer Bedeutung.

Nach Anhaftung besiedeln die Zellen die Oberflächen. Um eine Expansion der Zellen in weiteren Passagen zu ermöglichen, müssen die Zellen von der Oberfläche gelöst werden. Dazu müssen die „Adhärenzproteine“ wieder gelöst oder zerstört werden. Zu diesem Zweck haben sich vor allem proteolytische Enzyme, wie z.B. Collagenasen, Accutasen und Trypsin, etabliert. Die Verwendung proteolytischer Enzyme und deren Inaktivierung sind kostenintensiv und bei Fermentationen in größeren Maßstäben schwierig.

Eine Inokulation des nächsten Prozessmaßstabs durch Migration der Zellen (Wanderung auf nicht besiedelte Oberflächen) stellt die optimale Lösung zur Zellexpansion dar. Eine Zellexpansion ohne proteolytische Enzyme oder andere aktive Eingriffe in den Prozess ist für Festbettreaktoren unter Verwendung nicht rein adhärent wachsender Zellen (*BHK* oder *CHO*) in kleinen Maßstäben bereits beschrieben. [E. LINDNER et al. 1987, AMERSHAM 2000, M. P. DÜRRSCHMID et al. 2003A].

Da die notwendigen Adhärenzfaktoren durch Serum oder Proteinfractionen zur Verfügung gestellt werden, stellt die Adaptation an serum-/ proteinfreie Bedingungen den ersten Schritt zur Generierung einer Suspensionszelle dar.

2.2.2 Strategien zur Adaptation an serumfreie Bedingungen und anschließender Generierung einer Suspensionszelle

Um Proteingehalte, Sicherheitsrisiken (z.B. BSE, Prione, Viren) und Produktionskosten zu minimieren, haben sich serumfreie und proteinfreie Medien etabliert. Es existieren verschiedene Strategien zur Adaptation von Zellen, die für verschiedene Zellen und Medien bereits erfolgreich eingesetzt wurden.

Grundlage einer bei der GBF entwickelten Strategie ist es, die Zellen schonend an die neuen Bedingungen zu adaptieren und stillgelegte metabolische Potentiale zu reaktivieren. Eine Verminderungen der Wachstumsrate und der Produktivität soll dabei vermieden werden. [V. JÄGER et al. 1988, WAGNER et al. 1989, K. SCHARFENBERG, R. WAGNER 1995, K. SCHARFENBERG 1997, F. HESSE, R. WAGNER 2000]. Die Strategie lässt sich in zwei Phasen gliedern:

In Phase 1 wird die Zelle ausgehend von einem serum-/ proteinhaltigen Medium schonend an serum-/ proteinfreie Bedingungen gewöhnt. Dazu wird in einer konfluent bewachsenen T-Flasche ohne Passagierung der Zellen der Serumgehalt durch den sequentiellen Austausch von serum-/ proteinfreiem Medium verringert.

Um die Selbstkonditionierung der Zellen auszunutzen, verbleiben ~ 10 bis 20% konditioniertes Medium in der Kultur. Die Konfluenz der Zellen sorgt zusätzlich für die schnelle Einstellung eines unterstützenden Milieus.

Durch den Entzug des Serums bzw. der Proteinfraction werden den Zellen Adhärenzfaktoren entzogen und es kann bedingt durch ein Ablösen der Zellen zur Ausbildung von Zellaggregaten im Überstand der Kultur kommen. In einer zweiten Phase können diese potentiellen Suspensionsklone in ein geeignetes Kultivierungsgefäß (z.B. silikonisierte Spinnerflaschen) überführt und dann gegebenenfalls in Suspension kultiviert werden. Zur Verminderung der Aggregatbildung kann eine Erhöhung der Drehzahl oder eine Modifikation der Medienzusammensetzung (beispielsweise Ca^{2+} oder Mg^{2+} frei) notwendig sein. Eine Selektion der gewünschten „Einzelzellen“ erfolgt unter Ausnutzung der verschiedenen Sedimentationseigenschaften der Aggregate und der Einzelzellen [K. SCHARFENBERG 1997].

Mit dieser Strategie wurden bereits eine Reihe von Zellen an spezifisch entwickelte Medien adaptiert und in einigen Fällen konnten ebenfalls Suspensionsklone generiert werden. Ein Beispiel für eine erfolgreich an Suspensionsbedingungen adaptierte Zelllinie ist die ursprünglich adhärent wachsende *CHO* Zelle.

Eine weitere Strategie besteht in der sequentiellen Reduktion des Serum-/ Proteinanteils nach jeder Passage während der ersten Phase der Adaptation. Im Gegensatz zum oben geschilderten Verfahren kann auf diese Weise schon während der Adaptationsphase ein Vergleich zur Ausgangskultur bezüglich Wachstumsrate, Morphologie, etc., gezogen werden. Prinzipiell beruht die Strategie auf der gleichen Basis. Die Verwendung von konditionierten Medium und hohen Zelldichten zur Inokulation der nächsten Passage führt zur schnellen Einstellung eines unterstützenden Milieus. Zellaggregate aus dem Überstand können wie bereits beschrieben in Phase 2 zur Generierung eines Suspensionsklons verwendet werden. Abbildung 2-5 zeigt schematisch das Verfahren der sequentiellen Erhöhung des Anteils an serumfreiem Medium nach jeder Passage. Die Adaptation wird in T-75 cm² Flaschen durchgeführt. Ausgehend von einer 100% serum-/ proteinhaltigen Kultur wird der Anteil des serum-/ proteinfreien Mediums um beispielsweise 25% erhöht.

Dabei verbleiben jeweils 5 - 10% V/V konditioniertes Medium in der Kultur. Nach vier Passagen ist die Adaptation abgeschlossen. Die Kultivierung der serum-/ proteinfreien Zellen wird ohne die Verwendung von konditioniertem Medium fortgesetzt. Um den Einfluss von Speichereffekten der Zellen auszuschließen, erfolgt eine Beurteilung der Adaptation 4-5 Passagen nach Ende der Adaptation.

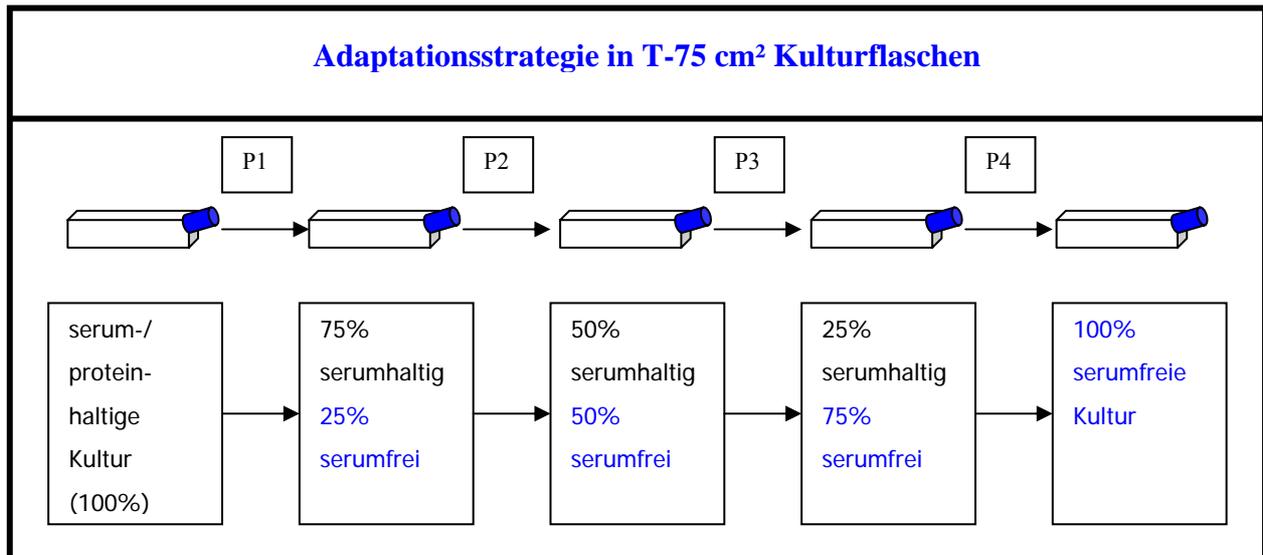


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der entwickelten Adaptationsstrategie beispielhaft in T-75 cm² Zellkulturflaschen. Ausgehend von einer serum-/ proteinhaltigen Kultur wird nach jeder Passage der Anteil an serum-/ proteinfreiem Medium sequentiell erhöht. Um die Selbstkonditionierung der Zellen auszunutzen, werden in den Passagen etwa 10% konditioniertes Medium aus der vorherigen Passage verwendet.

2.3 Prozessführung

2.3.1 Arten der Prozessführung im Vergleich

Bedingt durch die von physiologischen Ansprüchen der Zellen bestimmten Medienzusammensetzung und der von den physikalischen Ansprüchen abhängigen Reaktorauslegung, kann es z. B. durch den Verbrauch von Nährstoffen zu Limitationen und Inhibitionen kommen. Um negative Einflüsse auf Wachstum und Produktivität der Zellen zu vermeiden, wurden verschiedene Arten der Prozessführungen entwickelt. In der folgenden Abbildung sind exemplarisch verschiedene Betriebsweisen in ihrem schematischen Aufbau und der prinzipielle zeitliche Verlauf verschiedener Komponenten dargestellt.

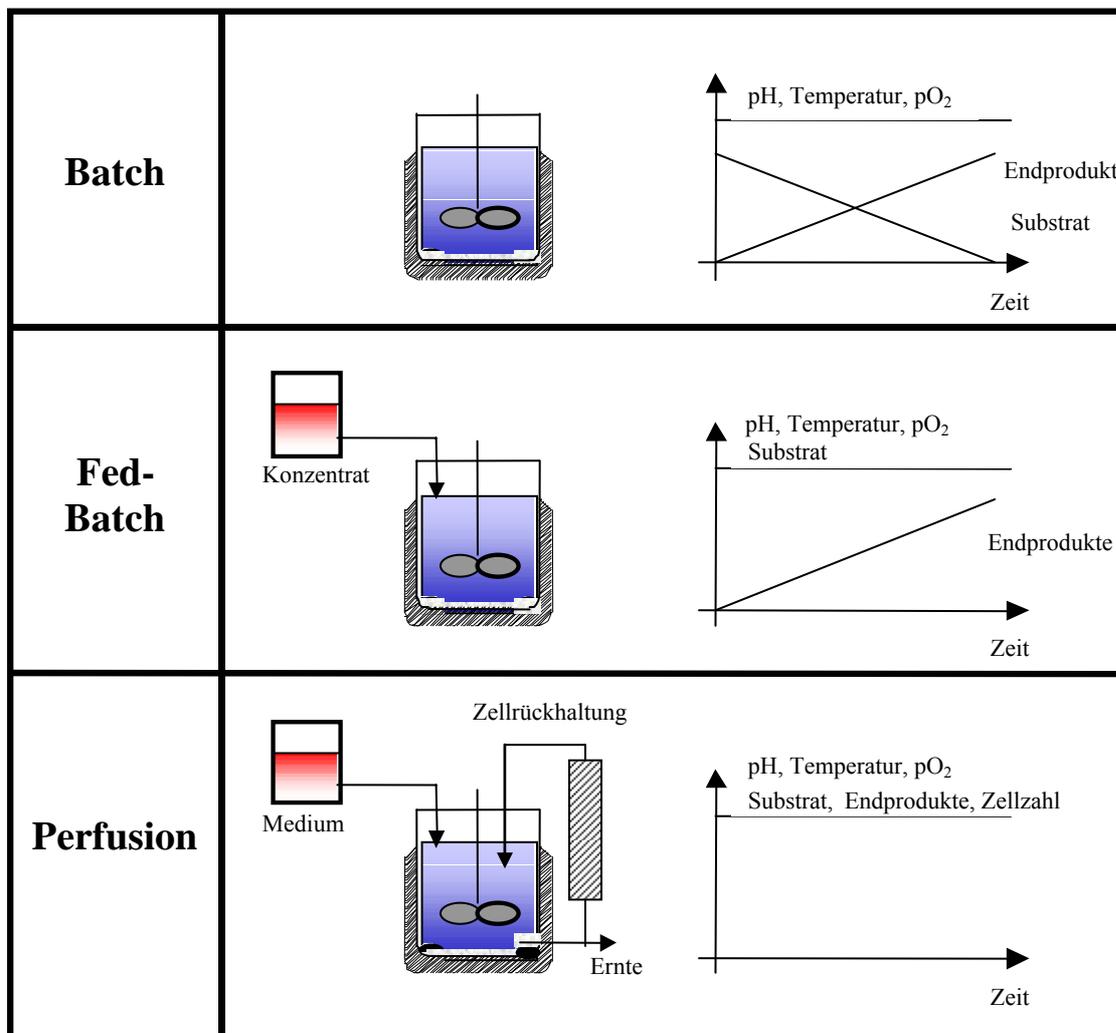


Abbildung 2-6: Exemplarische Darstellung der verschiedenen Betriebsweisen Batch, Fed-Batch und Perfusion mit Zellrückhaltung (Prinzipieller Aufbau und zeitlicher Verlauf).

Die sogenannte **Batch-Kultur** gehört zu den diskontinuierlichen Betriebsweisen. Der Reaktor ist ideal durchmischt (keine örtlichen Gradienten). Bei anderen Komponenten wie Zellzahl, Produktkonzentration, etc., kommt es zu Konzentrations-Zeit-Verläufen, die durch die spezifische Kinetik der Zellen determiniert sind.

Nach Inokulation des Reaktors verbrauchen die Zellen zum Wachstum und zur Produktbildung Substrate. Durch den Verbrauch der Nährstoffe wird die Kultur limitiert und durchläuft die charakteristische Wachstumskurve. Die Fermentation wird durch Ernte abgebrochen und der komplette Ansatz in die Aufarbeitung transferiert [D. SCHLEE, H. P. KLEBER 1990].

Die Batch Betriebsweise ist die einfachste und kürzeste Betriebsweise. Sie erfordert wenig periphere Einrichtungen. Die Limitation der Kultur führt zu geringen Zellzahlen und Produkttitern. Die bei *CHO* Fermentationen erreichten Zelldichten im Batchbetrieb liegen bei $X = 1-2 \cdot 10^6/\text{ml}$. In der Industrie sind Arbeitsvolumina bis 15 m^3 realisiert.

Um die auftretende Substratlimitierung zu umgehen, kann dem Fermenter im sogenannten **Fed-Batch Verfahren** konzentrierte Nährlösung in Intervallen oder kontinuierlich zugeführt werden. Die Vorteile des Fed-Batch bestehen in der Umgehung von Repressionen und Substratinhibierungen als Funktion der metabolischen Aktivität der Zellen, zu deren Umgehung eine detaillierte Analyse des Prozesses und der spezifischen Raten der Kultur notwendig ist. Durch die Zufütterung werden höhere Zelldichten und Produkttiter erreicht. Für *CHO*-Zellfermentationen werden Zelldichten im Bereich von $X = 5-8 \cdot 10^6/\text{ml}$ erreicht.

Im sogenannten **repeated Fed-Batch-Verfahren** wird ein Teil der Kultur entnommen und mit frischem Medium wieder auf das Arbeitsvolumen aufgefüllt. Dadurch wird eine „quasikontinuierliche“ Kulturführung möglich.

Bedingt durch die Verstoffwechslung der gefütterten Substratkonzentrate kann es zu erhöhten Inhibitorkonzentrationen kommen. Die Entwicklung einer effizienten Fütterungsstrategie (Low-Glutamin-Fed-Batch, dynamischer Fed-Batch, computergestützter Fed-Batch) erfordert detaillierte Kenntnis über den Stoffwechsel der Zellen und somit eine längere Entwicklungszeit [D. SCHLEE, H. P. KLEBER 1990, R. FIKE et al. 1993, J. LJUNGGREN, L. HÄGGSTRÖMN 1994, R. PÖRTNER et al. 1996, W. ZHOU et al. 1997, L. XIE, I. C. W. DANIEL 1997, P. W. SAUER et al. 2000, Y. Y. LEE et al. 2003, S. F. GORFIEN et al. 2003]. In der Industrie sind Arbeitsvolumina bis 15 m^3 realisiert.

Um eine Überlagerung der Limitationen durch Inhibitionen zu vermeiden, ist es notwendig, die inhibierenden Komponenten abzutrennen. Die Identifizierung von Inhibitoren und deren Grenzwert gestaltet sich insbesondere bei gekoppelten Kinetiken, wie dies bei der Viruspropagation der Fall ist, schwierig. Eine Abtrennung der inhibierenden Komponenten kann prinzipiell auf verschiedene Weisen erfolgen:

Bei der **kontinuierlichen Prozessführung** mit Zellrückhaltung erfolgt eine kontinuierliche Zuführung von Frischmedium bei gleichzeitiger Ernte der im Reaktor befindlichen Kultur. Dabei werden die Zellen entweder intern oder extern zurückgehalten (Spinfilter, Ultraschallrückhaltesysteme, Sedimentationstanks, etc.) und in den Reaktor zurückgeführt. Das verbrauchte Medium und das Produkt werden kontinuierlich aus dem Reaktor entfernt, über das Zellrückhaltesystem geführt und die Zellen zusammen mit dem zugeführten Strom Frischmedium in den Reaktor transportiert. Das Arbeitsvolumen bleibt konstant. Dabei stellt sich in Abhängigkeit von der Perfusionsrate D ($D = F/V_R$) nach einer Anfahrperiode ein stationärer Zustand ein, der über mehrere Monate aufrechterhalten werden kann. Bei der Perfusion mit Zellrückhaltung können Zelldichten von etwa $X = 1-3 \cdot 10^7/\text{ml}$ erreicht werden. Ein erfolgreich etablierter Prozess ist die Herstellung von Faktor VIII (Kogenate[®]) mit *BHK* Zellen in Suspension im 200 L Maßstab [B. G. D. BÖDEKER 2001].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abtrennung niedermolekularer Inhibitoren bei Batchverfahren über **Dialysemodule**, die entweder intern oder über einen externen Kreislauf betrieben werden können. Hier kommt es auf Grund der Konzentrationsdifferenz zu einem Austausch der Medienkomponenten [S. R. ADAMSON et al. 1983, M. J. COMER et al. 1990, R. PÖRTNER, H. MÄRKEL 1998]. In Abhängigkeit der Molekularausschlussgrenze der Dialysemembran diffundieren kleine Moleküle durch die Membran, während größere, wie beispielsweise Antikörper, zurückgehalten werden. Bei der Verwendung von Dialysemembranen besteht jedoch insbesondere bei der Kultivierung adhärenter Zelllinien die Gefahr der Verblockung durch Ablagerung der Zellen im oder am Modul. Die erreichten Zelldichten betragen $X = 1-3 \cdot 10^7/\text{ml}$. In der Pharmaindustrie sind Reaktoren mit einem Arbeitsvolumen von bis zu 1 m^3 etabliert.

Spezielle Reaktoren, wie beispielsweise Hohlfaserreaktoren, sind mit einem Arbeitsvolumen von bis zu etwa 1 L etabliert. In ihnen wachsen die immobilisierten Zellen gewebeartig und werden kontinuierlich mit frischem Medium versorgt. In diesen Reaktoren können Zelldichten von bis zu $X = 1 \cdot 10^8/\text{ml}$ Festbettvolumen realisiert werden. Problematisch sind in diesem Fall vor allem die Bestimmung der Zellzahlen und die Maßstabsvergrößerung.

Die geschilderten kontinuierlichen Prozesse erfordern komplexe periphere Einrichtungen und stellen hohe Ansprüche an den Bearbeiter und die Steriltechnik. Es ist darauf zu achten, dass der entwickelte Prozess robust, sicher und ausreichend skalierbar ist. Ein verfahrenstechnisches Problem stellt dabei häufig die Sauerstoffversorgung bei der Kultivierung hoher Zelldichten in großen Maßstäben dar. Eine Aussage zur Skalierbarkeit kann durch die physikalische Beschreibung der Reaktoren erfolgen.

2.4 Physikalische Beschreibung von Bioreaktoren

2.4.1 Die Newtonzahl

Die Leistungskennzahl oder Newtonzahl ist zur Berechnung der Rührerleistung erforderlich. Die in den Reaktor eingetragene Leistung P hängt unmittelbar von der Behältergeometrie, der Drehzahl n , dem Rührerdurchmesser d , der Dichte ρ und der kinematischen Viskosität ν ab ($P = f(n, d, \rho, \nu)$). Im Fall der Membranbegasung nimmt der Gasdurchsatz keinen Einfluss auf Ne . Daraus ergibt sich folgender Ähnlichkeitstheoretischer Zusammenhang:

$$Ne = f(Re)$$

mit

Gleichung 2-7

$$\text{Newton } Ne = \frac{P}{n^3 d^5 \rho} \quad \text{und} \quad \text{Reynolds: } Re = \frac{nd^2}{\nu}$$

2.4.2 Homogenisierung

Um zeitliche und räumliche Gradienten abzubauen, muss der Rührer eine gute Homogenisierung der Fermentationsbrühe gewährleisten. Nach Zugabe einer Inhomogenität (Störsignal) in den Rührreaktor ist zur Erreichung eines bestimmten Homogenisierungsgrads eine Zeit erforderlich, die als Mischzeit t_m oder Homogenisierungszeit t_H bezeichnet wird. Sie ist von der Geometrie der Reaktoren abhängig und kann auf physikalischem oder chemischem Weg ermittelt werden (siehe 3.6.5) [H. J. HENZLER 1978].

Die Größe der experimentell zu ermittelnden Mischzeit t_H ist von der Definition des Durchmischungsgrades M abhängig:

$$M = 1 - \frac{\delta a}{\bar{a}} \quad \text{Gleichung 2-8}$$

\bar{a} bezeichnet die mittlere Konzentration einer Komponente A, die bei der Vermischung zweier Flüssigkeiten der Komponente B zugesetzt wird. Sie erfährt eine örtliche und zeitliche Änderung, bis sich ein bestimmter Endwert einstellt. Nach dieser Homogenisierung ergibt sich der Endwert der Komponente A zu

$$\bar{a} = \frac{V_a}{V_a + V_b} \quad \text{Gleichung 2-9}$$

Während des Homogenisierungsprozesses verringern sich die Konzentrationsschwankungen δa . Gewöhnlich wird eine Homogenität von 95% für ausreichend betrachtet. Dies entspricht einem Durchmischungsgrad $M = 0,95$, so dass $\delta a < 5\%$ ist.

Das Produkt aus der Drehzahl n und der experimentell ermittelten Mischzeit t_H ist die sogenannte Durchmischungskennzahl c_H , die im turbulenten Strömungsbereich $Re > 10^4$ bei voll bewehrten Systemen einen konstanten Wert annimmt [H. J. HENZLER 1978]. Sie ergibt sich aus Gleichung 2-10.

$$c_H = t_H n \neq f(Re) \quad \text{Gleichung 2-10}$$

2.4.3 Ursachen hydrodynamischer Beanspruchung

Hydrodynamische Beanspruchung resultiert aus der Relativgeschwindigkeit zwischen Partikel und Fluid. Unterscheiden sich auf Grund von Dichtedifferenzen auch deren mittlere Strömungsgeschwindigkeiten, kommt es zusätzlich zu Stoßbeanspruchung (Rührer und Partikel, etc). Die Stoßbeanspruchung ist bei geringen Dichtedifferenzen, wie es bei biologischen Systemen der Fall ist, und geringen Partikelkonzentrationen vernachlässigbar.

Bei laminarer Strömung ergibt sich die auftretende Beanspruchung aus dem Newton'schen Schubspannungssatz:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} \quad \text{Gleichung 2-11}$$

Im Bereich turbulenter Strömung, wie sie in den meisten Bioreaktoren vorliegt, ist diese von untergeordneter Bedeutung. Im turbulenten Strömungsfeld stellt die turbulente Schwankungsgeschwindigkeit $\sqrt{u'^2}$ die maßgebliche Relativgeschwindigkeit dar. Die auf die Partikel wirkende dynamische Beanspruchung lässt sich durch den Reynoldschen Spannungsansatz erfassen:

$$\tau_T = \rho \sqrt{u'^2} \quad \text{Gleichung 2-12}$$

Die Intensität der turbulenten Schwankungsgeschwindigkeit $\sqrt{u'^2}$ ist von der Größe der Wirbel abhängig. Folgt man der von KOLMOGOROV aufgestellten isotropen Turbulenztheorie, wird die Turbulenz durch die Überlagerung von Wirbeln unterschiedlicher Größe und Energieinhalts erklärt. Die größten Wirbel werden am energieübertragenden Organ (hier der Rührer) erzeugt. Die entstandenen Wirbel zerfallen in kleinere Wirbel, bis die kleinsten Wirbel (Größe $\sim 3 \eta_L$, η_L = Mikromaßstab der Turbulenz) ihre Energie durch Reibung in Wärme verwandeln. Der Mikromaßstab der Turbulenz lässt sich nach KOLMOGOROV wie folgt bestimmen:

$$\eta_L = \left(\frac{v^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} \quad \text{Gleichung 2-13}$$

Je nach Energieinhalt und Partikelgröße d_p sind Wirbel aus dem Trägheitsbereich ($d_p > 25 \eta_L$) bis in den Dissipationsbereich ($d_p < 6 \eta_L$) bestimmend. Maßgeblich für die Beanspruchung sind Wirbel vergleichbarer Größe zum Partikel. Größeren Wirbeln folgt der Partikel durch eine konvektive Bewegung, kleinere Wirbel besitzen zu wenig Energie, um eine Beanspruchung zu verursachen.

In der Zellkultur ist bedingt durch die Größe von Zellen, Zellagglomeraten, bewachsenen Carriern und dem möglichen Leistungseintrag der Dissipationsbereich entscheidend [H. J. HENZLER 1999].

Nach KOLMOGROV kann die turbulente Schwankungsgeschwindigkeit durch die mittlere Energiedissipation beschrieben werden:

$$\sqrt{u'^2} \sim d_p^2 \frac{\varepsilon}{\nu} \quad \text{mit} \quad \varepsilon = \frac{P}{V \rho} \quad \text{Gleichung 2-14}$$

Aus 2-12 und 2-14 folgt schließlich für die Partikelbeanspruchung im turbulenten Strömungsfeld:

$$\tau_T \sim \rho d_p^2 \frac{\varepsilon}{\nu} \quad \text{Gleichung 2-15}$$

Auf Grund der ungleichförmigen Energieverteilung erfahren die Partikel bei der Zirkulation durch den Reaktor unterschiedliche Beanspruchungen. Meist können in Zonen hoher Energiedichten, wie z. B. im Nachlaufbereich des Rührers, keine Messungen durchgeführt werden. Einer integralen Betrachtung fällt also eine besondere Rolle zu. Daher kann die Partikelbeanspruchung nur indirekt erfasst werden. Dazu sind Messungen an Modellpartikelsystemen oder lebenden Zellen erforderlich [H. J. HENZLER 1999].

2.4.4 Sauerstoffversorgung

Um das Potential aerober Prozesse mit hohen Zelldichten auszunutzen, ist eine ausreichende Versorgung der Zellen mit O₂ erforderlich. Um die Sauerstoffaufnahme (OUR) der Zellen zu befriedigen und eine ausreichende Aufrechterhaltung der Gelöstsauerstoffkonzentration c_L zu gewährleisten, muss der Reaktor begast werden [G. DAUN 1990]. Bedingt durch die relativ geringe Löslichkeit von O₂ in Wasser oder Kulturmedien gestaltet sich insbesondere eine ausreichende Versorgung schersensitiver tierischer Zellen problematisch.

Die Sättigungskonzentration einer typischen Nährlösung bei einer Temperatur von 37°C wurde von Henzler und Kauling für $pO_2 = 0.21$ bar mit 6,5 mgO₂/L bestimmt. [H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993].

Das geeignete Begasungsverfahren, mit welchem ein ausreichender Stofftransport von gasförmig nach flüssig erreicht werden kann, muss individuell festgelegt werden. Prinzipiell unterscheidet man drei verschiedene Verfahren:

Bei der sogenannten **Oberflächenbegasung** findet der Stofftransport lediglich über die freie Oberfläche des Reaktors statt. Dieses Verfahren wird beispielsweise bei der Vakzineherstellung in Rollerflaschen oder Wannenstapeln verwendet [MATHEWS et al. 1992]. Bei der Verwendung hoher und schlanker Reaktoren, wie sie in der Biotechnologie üblich sind, ist dieses Verfahren auf Grund der kleinen Phasengrenzfläche im technischen Maßstab irrelevant [J. G. AUNIS, H. J. HENZLER 1993].

Das Verfahren der **Blasenbegasung**, das sogenannte „Sparging“ oder „Micro-Sparging“, ermöglicht zwar durch die Bereitstellung großer Phasengrenzflächen eine hohe Stofftransportrate, erzeugt jedoch unter Umständen starke Zellschädigungen.

Diese werden zum einen direkt durch den Gaseintrag und zum anderen durch Adsorptions- und Desorptionseffekte der Zelle an der Phasengrenzfläche, sowie dem Zerplatzen der Blasen an der Oberfläche (und der damit zum Teil verbundenen Schaumbildung) erzeugt. Diese Effekte lassen sich zwar durch die Zugabe von Seren oder synthetischen Polymeren positiv beeinflussen, können sich aber negativ in der Aufarbeitung auswirken [F. BAVARIAN et al. 1991, J. J. CHALMERS 1993, J. AUNIS, H. J. HENZLER 1993]. Insbesondere bei der Kultivierung adhärenter Zelllinien auf Microcarriern, die meist eine geringe Dichtedifferenz zum Medium aufweisen, kann es bei hohen Gasdurchsätzen zum Auftreiben der Microcarrier kommen, die dann im Prozess nicht mehr zur Verfügung stehen.

Ein Verfahren, das minimale Scherbeanspruchung verursacht und trotzdem noch relevante Stofftransportraten gewährleistet, ist das Verfahren der **Membranbegasung**. Dabei wird der Sauerstoff über gaspermeable Diffusionsmembranen oder offenporige Membranen in das Kulturmedium eingetragen. In der Biotechnologie werden neben externen oder internen Hohlfasermodulen [Q. ZHANG, E.L. CLUSSER 1985, P. COTE et al. 1989] hauptsächlich interne Diffusionsmembranen verwendet, die häufig in Form von Schläuchen (Außendurchmesser $d_2 = 0,8 - 4$ mm) auf einen Korb gewickelt sind.

Dabei eignet sich Silikon auf Grund seines höheren Diffusionskoeffizienten und seiner höheren Löslichkeit für O_2 im Vergleich zu Wasser besser als andere Materialien [H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993].

Die Kultur wird entweder durch einen zentral angebrachten Rührer oder durch exzentrische Bewegung des Korbes selbst (Diessel Reaktor) homogenisiert [H. BÜNTEMEYER et al. 1987, J. VORLOP, J. LEHMANN 1988]. Das Verfahren der Membranbegasung eignet sich vor allem bei der Kultivierung adhärenter Zellen und schersensitiver Systeme, wie beispielsweise durch Viren infizierte Zellen.

In Abbildung 2-7 ist schematisch der Stofftransport gasförmig-flüssig durch eine Membran dargestellt. Die Gasphase wird von der flüssigen Phase durch die Wand der Membran (Silikonschlauch) mit der Dicke d_w und der Oberfläche A_S getrennt. Das Gas absorbiert an der Membran und diffundiert durch diese. Zwischen der Oberfläche der Membran und der Flüssigkeit bildet sich eine Phasengrenzschicht der Dicke δ aus, durch welche ebenfalls ein diffusiver Stofftransport stattfindet. Die treibende Kraft ist das Konzentrationsgefälle zwischen der Sättigungskonzentration c^* und der Gelöstsauerstoffkonzentration c_L .

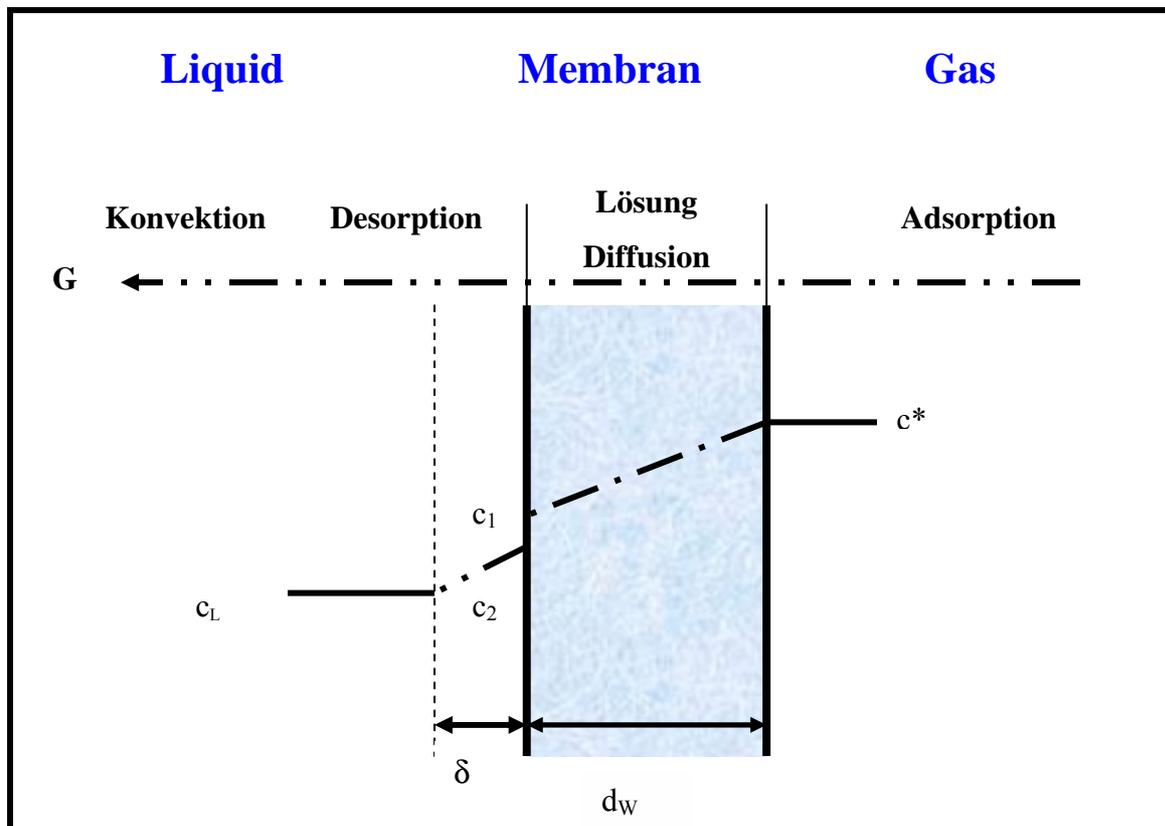


Abbildung 2-7: Schematischer Verlauf des Sauerstofftransportes von der Gasphase im Membranschlauch über die Membran in die Flüssigkeit [H. J. BRÄUTIGAM 1985].

Ähnlich dem Zweifilmmodell wird der Stofftransport durch die Diffusion gasförmig-flüssig bestimmt. Die Sauerstofftransportrate OTR (Oxygen Transfer Rate) berechnet sich unter zulässiger Vernachlässigung des gasseitigen Stofftransportwiderstandes ($k_G \gg k_L$) und dem Widerstand in den Zellen oder Zellagglomeraten zu:

$$OTR = \frac{G}{V} = ka \Delta c = k \frac{A_S}{V} (c^* - c_L) = k \frac{A_S}{V} \left(\frac{pO_2}{H_y} - c_L \right) \quad \text{Gleichung 2-16}$$

Die volumenspezifische Fläche a ist für den Fall der Begasung über Diffusionmembranen der Quotient aus der Membranfläche A_S und dem Reaktorvolumen V_R . Der „integrale“ Stofftransportkoeffizient k setzt sich aus dem flüssigseitigen Stofftransportkoeffizienten k_L und dem membranspezifischen Stofftransportkoeffizienten k_M zusammen. Danach ergibt sich der „integrale“ Stoffübergangskoeffizient k aus Gleichung 2-16 zu

$$k = \frac{1}{\frac{1}{k_L} + \frac{1}{k_M}} \quad \text{Gleichung 2-17}$$

wobei k_m sich für rohrförmige Membranen prinzipiell berechnen lässt zu

$$\frac{1}{k_M} = \frac{d_2 \ln(d_2/d_1) f}{2 ID_S H_Y/H_{YS}} \quad \text{Gleichung 2-18}$$

$ID_S H_Y/H_{YS}$ beschreibt eine Materialkonstante, die nach BRÄUTIGAM (1985) im Temperaturbereich von $10^\circ\text{C} \leq \vartheta \leq 40^\circ\text{C}$ folgende Abhängigkeit zeigt [H. J. BRÄUTIGAM 1985]:

$$ID_S H_Y/H_{YS} \sim 7.3 \cdot 10^{-9} \exp(0,024\vartheta) \quad \text{Gleichung 2-19}$$

Die geometrische Eigenschaften des Schlauches haben einen signifikanten Einfluss auf den membranspezifischen Stofftransportkoeffizienten k_M und somit auf die Bestimmung der Maßstabsregeln über den flüssigseitigen Stofftransportkoeffizienten k_L . Der in Gleichung 2-18 beschriebene geometrische Korrekturfaktor f berücksichtigt die durch Dehnung und Beaufschlagung mit Druck bedingte Änderung der Abmaße der Schlauchmembranen. Er ergibt sich nach Abschätzung und Korrektur des Außen- und Innendurchmessers als Funktion des Längenverhältnisses L/L_0 und vor allem des Druckes p zu [H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993, N. Q. HANSHI et al. 2003].

$$f = \frac{d_2 \ln(d_2/d_1)}{d'_2 \ln(d'_2/d'_1)} = f\left(\frac{L}{L_0}, p\right) \quad \text{Gleichung 2-20}$$

Gleichfalls muss die Korrektur der Schlauchdurchmesser und die Dehnung des Schlauches zur Berechnung der spezifischen Membranfläche a berücksichtigt werden.

$$a' = a \frac{L d'_2}{L_0 d_2} \quad \text{Gleichung 2-21}$$

Grundlage der physikalischen Beschreibung der Reaktoren bezüglich ihrer Sauerstoffversorgung ist die Bestimmung des volumetrischen Stofftransportkoeffizienten k_a . Unter Berücksichtigung der Gleichungen 2-16 bis 2-21, lauten die für den Maßstabsübertrag relevanten dimensionslosen Beziehungen wie folgt:

$$Sh = f(Re_T, Sc) \quad \text{Gleichung 2-22}$$

mit

$$Sh = \frac{k_L d_2}{ID}$$

$$Re_T = \frac{\pi d n d_2}{\nu}$$

Gleichung 2-23

$$Sc = \frac{\nu}{D}$$

Sie erlauben einen direkten Vergleich der Reaktoren.

Neben der Beurteilung des möglichen Stoffstroms G/V ist vor allem der integrale Stofftransportkoeffizient k als Funktion des volumenspezifischen Leistungseintrages von besonderer Bedeutung.

Eine Intensivierung des Stofftransportes lässt sich mit folgenden Maßnahmen erreichen:

- Eine Erhöhung der Drehzahl führt durch eine Intensivierung der Flüssigkeitsbewegung zu einer Erhöhung von k_L .
- Die Begasung mit reinem Sauerstoff und/ oder eine Erhöhung des Membrandruckes führen zu einer höheren Sättigungskonzentration c^* , wodurch die Konzentrationsdifferenz eine Intensivierung des Stoffstroms bewirkt.
- Die Verwendung geringer Wandstärken der Membranschläuche wirken sich direkt auf die Diffusion aus. Die Verwendung kleinster Membranstärken kann jedoch nur unter geringem Druck erfolgen, da sonst die Gefahr des Platzens der Membranen besteht.
- Vergrößerung der Membranfläche im Reaktor.

Kommt es zu hohen Druckdifferenzen zwischen Membran und Reaktor und einem hohen k/k_L Verhältnis, kann es zur Übersättigung an der Membran kommen. Diese wird durch geringe Wandstärken und wenig Bewegung an der Schlauchoberfläche begünstigt und führt zur ungewollten Ausbildung kleiner Gasblasen an der Membran, die sich ab einer kritischen Größe ablösen, an die Oberfläche wandern und zerplatzen. Dies verursacht wie bei der Blasenbegasung Scherbeanspruchung und steht dem ursprünglichen Gedanken des Verfahrens entgegen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Zelllinie und Virus

Bovine Kidney Klon 3A (BK KL 3A) Zelllinie

Die verwendete Zelllinie ist eine klonierte *Bovine Kidney* Zelle, die 1963 aus einem fötalen Kalb isoliert wurde. In Passage 177 wurde bei der Bayer AG eine „Master Cell Bank“ (MCB) generiert. Eine weitere MCB wurde in Passage 197 hergestellt (*BK Kl 3*). Diese Zelle wurde in mit FCS (FCS = fötales Kälberserum) supplementiertem Medium kultiviert und anschließend charakterisiert.

Für die Herstellung von *PPVO NZ-2* wurden Zellen dieser Zellbank an serumfreie, aber proteinhaltige Bedingungen adaptiert und eine weitere MCB hergestellt (Passage 202). Dabei wurde das Medium unter anderem mit rekombinanten Insulin und 0,1 g/L humaner Plasma Protein Fraktion (HPPF) supplementiert.

Diese Zelle wird *Bovine Kidney Klon 3A* genannt und bildet die Basis für weitere Adaptationsschritte.

Parapoxvirus ovis NZ-2 (PPVO NZ-2)

Die Beschreibung des aus der Familie der *Poxviridae* stammenden *PPVO NZ-2* erfolgte bereits in der Einleitung. An dieser Stelle soll kurz die Herkunft des Virus erläutert werden.

Das Virus wurde ursprünglich aus dem Schorf eines infizierten Schafes isoliert. Nach Plaquevereinzellung wurde es *NZ-2* genannt [D. M. HAIG, A. MERCER 1998]. Das Virus wurde 1994 zur Bayer AG transferiert und im Anschluss auf der charakterisierten *BK Klon 3* Zelle über 4 Passagen in EMEM w/o Serum vermehrt (BSM 726). Nach einer weiterer Plaquevereinzellung wurde ein weiterer „Master Virus Stock“ (MVS) hergestellt. Aus diesem Seed wurde ein „Research Seed“ erstellt, der für die Experimente verwendet wurde.

3.2 Medien, Puffer und Lösungen

3.2.1 Medien

C7PM3.22

Ein intern entwickeltes Medium wurde für die Kultivierung der *BK Klon 3A* Zelle verwendet. Es handelt sich um eine Bayer-Formulierung, die der Geheimhaltung unterliegt. Das Medium wurde als Pulver (C7PMF3.22) von einem Hersteller für Gewebekulturmedien geliefert und in „Wasser für Injektionszwecke“ (WFI) gelöst. Je nach Supplementierung können folgende Typen unterschieden werden:

C7PMF 3.2292C

Das C7PMF 3.2292C-Medium wurde mit 0,05 g/L HPPF, 1140 IU/L rekombinanten Insulin und 2,2 g/L Natriumhydrogencarbonat supplementiert. Im Prozess wurde es zur Vorkulturführung in T-Flaschen und Rollerflaschen verwendet.

C7PMF 3.2294A

Das C7PMF 3.2294A-Medium wurde mit 0,1 g/L HPPF, 570 IU/L rekombinanten Insulin und 2,2 g/L Natriumhydrogencarbonat supplementiert. Im Prozess wurde es während der Fermentation zur Generierung von Biomasse vor Infektion verwendet.

C7PMF 3.2295A

Das C7PMF 3.2295A-Medium wurde mit 2,2 g/L Natriumhydrogencarbonat supplementiert und ist chemisch definiert. Es wurde im Prozess zur Virusvermehrung eingesetzt.

C7PMF 3.2295A V

Das C7PMF 3.2295A V-Medium wurde lediglich mit 2,2 g/L Natriumhydrogencarbonat und 1040 IU/L rekombinanten Insulin supplementiert. Es wurde zur Adaptation der Zelllinie eingesetzt.

Alle Medien wurden sterilfiltriert (0,2 µm Sartoflour[®], Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland oder 0,22 µm Millipak[®] 20 Gamma Gold, Fa. Millipore, Schwalbach, Deutschland) und bei einer Temperatur von + 4°C gelagert.

SMIF 8[®] Medium

Das SMIF 8[®] - Medium gehört zur von der „Gesellschaft für biotechnologische Forschung“ (GBF), Braunschweig, Deutschland, entwickelten SMIF-Medienserie, an die bereits verschiedene Zelllinien erfolgreich adaptiert wurden.

Das Medium ist serum- und proteinfrei. Die genaue Zusammensetzung ist unbekannt. Das Medium wurde über Invitrogen[®] (ehemals Gibco[®]), Karlsruhe, Deutschland, auf Anfrage bezogen. Eine Katalognummer ist nicht existent. Es wurde als Flüssigmedium zu je 1 L geliefert. Nach Herstellerangaben wurden dem Medium zusätzlich 4 mM Glutamin zugesetzt. Um Einflüsse des Wachstumsfaktors Insulin zu untersuchen, wurde das Medium mit und ohne Insulin verwendet (570 IU/L).

Das Medium wurde sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfiltereinheit, 1 L, Fa. Nalgene[®], USA) und bei + 4°C gelagert.

Opti Pro[®] Serum Free Medium (Katalognummer 12309-019)

Das Opti Pro[®] Medium wurde von der Firma Invitrogen[®] (ehemals Gibco[®]), Karlsruhe, Deutschland, entwickelt. Die genaue Zusammensetzung ist unbekannt. Es beinhaltet jedoch pflanzliches Hydrolysat. Es wurde als Flüssigmedium zu je 1 L bezogen.

Um Einflüsse des Wachstumsfaktors Insulin zu untersuchen, wurde das Medium mit und ohne Insulin verwendet (570 IU/L). Das Medium wurde sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfiltereinheit, 1 L, Fa. Nalgene[®], USA) und bei + 4°C gelagert.

3.2.2 Puffer und Lösungen**Phosphat buffered saline (PBS)**

PBS-Puffer wurde in Form von Tabletten von der Fa. Sigma Aldrich, Deutschland, geliefert. Die Tabletten werden nach Händlerangaben in WFI gelöst und sterilfiltriert (0,22 µm Millipak[®] 20 Gamma Gold, Fa. Millipore, Schwalbach, Deutschland). Die Lagerung erfolgte bei + 4°C für 6 Monate.

Humane Plasma Protein Fraktion (HPPF), Plasmanate[®] (Code Nr. 613 – 25)

Hitzeinaktiviertes Plasmanate[®] (HPPF) wurde als 5%-ige Lösung zu 250 ml von der Bayer Corp., Elkhart, Indiana, USA bezogen. Die Lagerung erfolgte bei + 4°C.

Insulin Stammlösung

Das rekombinante Insulin wurde als Pulver von der Fa. Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, USA, bezogen (speziell für Bayer hergestellt). In PBS wurde eine Stammlösung mit einer Aktivität von 200 IU/ml hergestellt, sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfiltereinheit, 1 L, Fa. Nalgene[®], USA) und bei + 4°C gelagert.

Viralex[®] Trypsin/ EDTA Lösung (Katalognummer L 11-660)

Die Trypsin/ EDTA Lösung wurde zu Einheiten je 100 ml als fertige Lösung von der Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich bezogen. Die Lösung ist einfach konzentriert und wurde vor Einsatz bei – 20°C gelagert. Nach Anbrechen der Lösung wurde sie für maximal 7 Tage bei + 4°C gelagert.

Trypanblaulösung (0,4%)

Trypanblau wurde von der Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland als fertige Lösung zu 100 ml Einheiten geliefert.

100 x nicht essentielle Aminosäure- Lösung (Katalognummer 111 40-035)

Die Lösung wurde von der Fa. Invitrogen[®](ehemals Gibco[®]), Karlsruhe, Deutschland als fertige Lösung zu je 100 ml Einheiten bezogen. Die Lösung beinhaltet kein L-Glutamin. Sie wurde bei + 4° C gelagert.

100 x L-Glutaminlösung (Katalognummer 111 40-035)

Die Lösung wurde von der Fa. Invitrogen[®] (ehemals Gibco[®]), Karlsruhe, Deutschland als fertige Lösung zu je 100 ml Einheiten bezogen. Sie wurde bei - 20° C gelagert. Nach Auftauen wurde sie maximal 7 Tage bei + 4°C gelagert.

Die folgenden Lösungen wurden in der Inaktivierung und Aufarbeitung verwendet.

Diafiltrationspuffer 100mM TRIS/ 10 mM EDTA, pH 8,0

121,1 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan und 45,2 g EDTA wurden in 9 L VE Wasser gelöst, anschließend mit 2 N HCL auf pH 8,0 titriert und ad 10 L aufgefüllt. Nach Sterilfiltration ist der Puffer bei Lagerung zwischen + 2°C und + 8°C für 6 Monate haltbar.

1M TRIS Stammlösung

Zur Herstellung einer 1 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan - Lösung wurden 121,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in 1 L WFI gelöst. Die sterilfiltrierte Lösung ist bei + 2°C bis + 8°C für 6 Monate haltbar.

10 mM TRIS/HCL Lösung, pH 8,0

Zur Herstellung der Lösung wurden 10 ml der 1 M TRIS Stammlösung in 800 ml WFI gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 2 N HCL auf 8,0 titriert und auf 1 L aufgefüllt. Nach Sterilfiltration konnte die Lösung bei + 2°C bis + 8°C für 12 Monate gelagert werden.

10 mM TRIS/HCL Lösung, pH 7,5

Zur Herstellung der Lösung wurden 10 ml der 1 M TRIS Stammlösung in 800 ml WFI gelöst. Der pH-Wert wurde mit 2 N HCL auf 7,5 titriert und auf 1 L aufgefüllt. Nach Sterilfiltration konnte die Lösung bei + 2°C bis + 8°C für 12 Monate verwendet werden.

25% Polygeline pH 7,5 zur Formulierung

Zur Herstellung einer 25%-igen Polygelinelösung wurden 62,5 g Haemacell[®] Polygeline in 200 ml WFI gelöst. Nach Einstellung des pH-Werts mittels 0,5 N NaOH auf 7,5 wurde die Lösung ad 250 ml aufgefüllt und autoklaviert (60 min bei 121°C). Haemacell[®] Polygeline wurde über die Fa. Calbiochem Novabiochem, Deutschland, bezogen. Hersteller ist Aventis Pharma, Deutschland. Die Lösung ist bei Lagerung zwischen + 2°C bis + 8°C für 12 Monate haltbar.

Die folgend aufgeführten Chemikalien, Puffer und Lösungen wurden zur Durchführung der verfahrenstechnischen Experimente verwendet.

CaCl₂ – Lösung

Zur Einstellung der Leitfähigkeit des in den Experimenten zur Scherbeanspruchung verwendeten Wassers wurde eine gesättigte CaCl₂-Lösung hergestellt. Das CaCl₂ p.a. wurde von Fluka Chemika, Steinheim, Deutschland bezogen.

Praestol BC 650 – Lösung

Bei Praestol BC 650 handelt es sich um ein vernetzendes Polymer, dass über Nacht bei Raumtemperatur in VE-Wasser zu 2 g/L gelöst wurde. Das Praestol wurde von der Fa. Stockhausen, Krefeld, Deutschland bezogen.

1 N Natriumthiosulfatlösung

Zur Durchführung der Mischzeitexperimente wurde eine 1 N Natriumthiosulfatlösung in VE Wasser hergestellt. Die Chemikalie $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ wurde von der Fa. Acros Organics, Geel, Belgien, bezogen.

1 N Jod-Kaliumjodid-Lösung

Die 1 N Jod-Kaliumjodid-Lösung wurde ebenfalls zur Bestimmung der Mischzeit verwendet. Dazu werden 250 g Kaliumjodid (Acros Organics, Geel, Belgien) und 128 g Jod (Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland) in 1 L VE-Wasser gelöst. Die Lösung wurde dunkel gelagert.

Stärkelösung (10%)

Eine zehnpromzentige Stärkelösung wurde mit Stärke p.a. der Fa. Riedel de Haen AG, Seelze, Deutschland, hergestellt. Dazu wurden 10 g Stärke unter Aufkochen (10 min) gelöst und nach Abkühlen ad 1 L aufgefüllt.

3.3 Zellkultivierung und Virusvermehrung

3.3.1 Vorkulturführung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in begasten T-Zellkulturflaschen, Typ Falcon[®] 0,2 µm VentCap[®], Fa. Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich. Die Inokulationsdichte betrug $X = 1,5 - 4 \cdot 10^4/\text{cm}^2$. Es wurden T-Flaschen in den Größen 25 cm², 75 cm² und 175 cm² verwendet. Die Kultivierung im jeweiligen Medium erfolgte in einem begasten Brutschrank bei 37°C mit 5 - 7% CO₂-Atmosphäre, woraus ein pH-Wert von ~7,2 resultierte.

Eine weitere Expansion erfolgte in unbegasten Rollerflaschen (Einstellung des pH-Wertes bei Inokulation). Die Animpfdichte lag zwischen $X = 1,5 - 2,5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$. Das Kulturvolumen betrug 200 ml bei einer zu bewachsenden Fläche von 850 cm². Die Kultivierung erfolgte in einem 37°C Brutraum. Der pH-Wert von etwa 7,2 wurde mit CO₂ eingestellt. Die Rollerflaschen wurden auf einem Rollerflaschengestell Typ Modular Cell Production Roller Apparatus, Model III, Fa. Wheaton Instruments, USA, mit 0,25 U/min gedreht. In allen Fällen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von ~ 90% eine Passagierung bzw. Ernte durch Trypsinierung.

3.3.2 Trypsinierung der Vorkultur und Fermenterproben

Die Trypsinierung wurde nach einem bei der Bayer HealthCare AG entwickelten Verfahren:

- Entfernen des Überstandes und Waschen mit 5 – 25 ml PBS (auf 37°C vorgewärmt). Im Fall von Fermenterproben müssen diese dazu bereits hier zentrifugiert werden (10 min, 1000 U/min (150 g) bei Raumtemperatur in Laborfuge GL, Heraeus, Deutschland)
- Zugabe der auf 37°C erwärmten Trypsin/ EDTA Lösung (10 ml)
- Inkubation im Brutschrank (10 min bei 37°C)
- Aufnehmen der Trypsin-Zell-Suspension in PBS – Puffer (7 –20 ml)
- Zentrifugation (10 min, 1000 U/min (150 g) bei Raumtemperatur in Laborfuge GL, Heraeus, Deutschland)
- Dekantieren des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in Medium
- Zentrifugation (10 min, 1000 U/min (150 g) bei Raumtemperatur in Laborfuge GL, Heraeus, Deutschland)
- Resuspendierung und Zellzählung

3.3.3 Cytodex 3[®] Microcarrier und deren Vorbereitung

Die verwendeten Cytodex[®]-3 Microcarrier wurden von der Fa. Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden, bezogen. Die Oberfläche der Microcarrier bildet eine Schicht aus denaturiertem Kollagen, das kovalent an eine Matrix aus quervernetztem Dextran gebunden ist. Die charakteristischen Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Angaben beziehen sich auf eine Vorbereitung der Microcarrier in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl).

Tabelle 3-1: Physikalische Charakteristika der verwendeten Cytodex-3 Microcarrier [Amersham 2000].

Eigenschaften der Cytodex[®]-3 Microcarrier	
ρ [g/L]	1,04
Größe d_{50} [μm]	175
Größe d_{5-95} [μm]	133-215
Fläche pro g Trockengewicht [cm^2/g]	4,600
Anzahl der Microcarrier pro g Trockengewicht [cm^2/g]	4 e06
Schwellung pro g Trockengewicht [ml/g]	14

Die Microcarrier wurden nach Einwaage mehrmals in PBS aufgeschlemmt und gewaschen. Im Anschluss wurden sie in einem Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen der Microcarrier wurde der Überstand dekantiert und die Microcarrier dreimal mit Medium gewaschen. Das Inokulum wurde aufgegeben und die Microcarrier-Zellsuspension steril in den Bioreaktor überführt.

3.3.4 Batch Fermentation im Labormaßstab

Das etablierte Batch Verfahren wurde unter 1.2 bereits beschrieben.

3.3.5 Virusvermehrung in T- Flaschen

Prinzipiell verläuft die Vermehrung in T- Flaschen ähnlich der Fermentation in zwei Phasen. Zunächst erfolgte die Inokulation der T-Flaschen mit möglichst homogenem Inokulum. Dazu wurden die T-Flaschen mit $X = 2 - 3 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ inokuliert.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90% wurde die Kultur infiziert. Zunächst wurde das verbrauchte Medium entfernt und durch Medium C7PMF 3.2295A ersetzt. Die zur Berechnung der MOI notwendige Zellzahl wurde aus dem Mittelwert mindestens dreier T-Flaschen bestimmt.

Anschließend erfolgte die Infektion mit der spezifischen MOI. Proben zur TCID_{50} Bestimmung (siehe 3.5.2), Glukose und Laktat Bestimmung wurden täglich gezogen. Bei einer Glukosekonzentration kleiner 0,5 g/L wurde das Experiment abgebrochen.

3.4 Aufarbeitung der Virussuspension

3.4.1 Fließschema der Aufarbeitung

Die folgende Abbildung illustriert kurz den Ablauf der Aufarbeitung. Zu verschiedenen Aufarbeitungsstufen wurden Proben zur Bestimmung von analytischen Parametern, wie beispielsweise den Wirtszellproteingehalt (HCP), DNA-Konzentration, etc., gezogen. Deren Bezeichnung ist ebenfalls dargestellt. Details zu den einzelnen Schritten sind im Anschluss beschrieben.

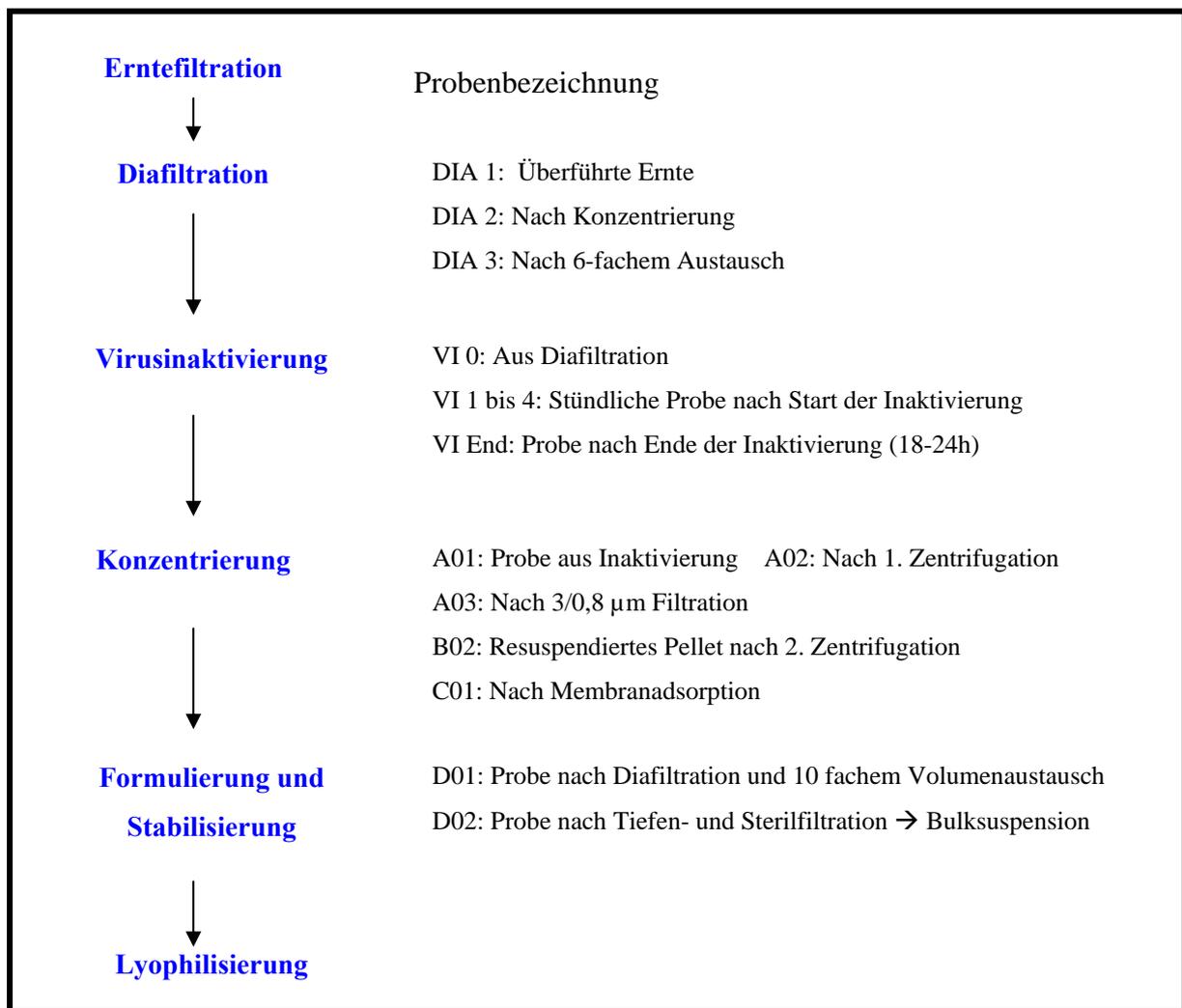


Abbildung 3-1: Fließschema zum prinzipiellen Ablauf der Aufarbeitung. Bezeichnungen und Bedeutung der gezogenen Proben sind ebenfalls dargestellt.

3.4.2 Ernte und Diafiltration der Fermentationskultur

Nach Sedimentation der Microcarrier wurde der Kulturüberstand über eine 20 µm Filterkapsule der Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland filtriert. Die microcarrierfreie Ernte wurde in einem sterilen Einwegbeutel der Fa. HyClone, Bonn, Deutschland, bei -70°C gelagert. Über ein Hollow Fiber Modul, Typ L-C-100-H, 0.1 µm, 0.558 m², der Fa. Minntech, USA, wurde die Ernte gegen den Diafiltrationspuffer (100 mM TRIS/ 10 mM EDTA, pH 8,0) diafiltriert und drei- bis vierfach konzentriert. Zur Umpufferung wurde ein 6-facher Volumenaustausch durchgeführt. Abschließend wurde die konzentrierte Suspension über einen Tiefenfilter, Typ Millistak CE 20 Capsule, der Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland, in einen sterilen Einwegbeutel der Fa. HyClone, Bonn, Deutschland filtriert. Die Virus-suspension wurde für bis zu 4 Tage bei + 4°C gelagert und in die Virusinaktivierung überführt.

3.4.3 Inaktivierung

Die Virusinaktivierung erfolgte in einem 5 L Glasreaktor, in welchem Temperatur und pH-Wert kontrolliert wurden. Für eine ausreichende Homogenisierung sorgte ein Ankerrührer, an dessen Ende zusätzlich ein Marine-Impeller angebracht war.

Die Inaktivierung erfolgte mit 10 mM Ethylenimin, das *in-situ* generiert wurde. Ethylenimin und andere Aziridine sind hochgradig toxisch und bewirken eine Alkylierung und Fragmentierung von Nukleinsäuren. Der pH-Wert des Diafiltrats wurde mit 0,5 N NaOH auf pH 8,3 bis 8,6 mit 0,5 N NaOH justiert. Nach Zugabe einer 0,488 M 2-Bromethylammoniumbromid - Lösung (10%) erfolgte durch das alkalische Milieu die Bildung von binärem Ethylenimin. Die Temperatur betrug 37°C und die Rührerdrehzahl 130 und 150 U/min während der Inaktivierung. Der pH-Wert wurde kontrolliert und lag zwischen 7,3 und 8,2. Die Inaktivierung erfolgte für 4 h im 5 L Glasbehälter. Es wurde stündlich eine Probe gezogen, so dass eine Inaktivierungskinetik bestimmt werden konnte. Nach 4 h wurde die Suspension aseptisch in zwei Rollerflaschen überführt (2- Tank- Prinzip). Die Rollerflaschen wurden bei 37°C mit n = 8 U/min auf einem Rollerflaschengestell gedreht. Die Inaktivierung wurde nach einer Gesamtzeit von 19 bis maximal 24 h durch die Zugabe einer 2 M Na₂S₂O₃ (20 mM Endkonzentration) beendet (Neutralisierung des binären Ethylenimin). Der Erfolg der Inaktivierung wurde über 3 Passagen mit BK KL 3A in T-75 cm² Zellkulturflaschen durchgeführt (Restlebensvirusbestimmung).

3.4.4 Konzentrierung und Formulierung

Zur Konzentrierung der Virussuspension wurde diese zunächst in 1 L Zentrifugenbecher überführt, austariert und im Anschluss 10 min bei 4000 U/min (~ 5350 g) zentrifugiert (Typ Cyrofuge 6000i). Der Überstand wurde vereinigt und über eine 3/0,8 µm Filterkapsule der Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland, filtriert. Der filtrierte Überstand wurde anschließend für 2,5 h bei 4240 U/min (~ 6010 g) zentrifugiert (Typ Cyrofuge 6000i). Nach Dekantierung des Überstands wurde das entstandene Pellet in 10 mM Tris/HCL Puffer pH 8,0 resuspendiert und anschließend über einen Membranadsorber, Typ Sartobind SingleSep Q, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland, gepumpt (DNA Abreicherung). Das auf diese Weise aufgearbeitete und inaktivierte Virusmaterial hatte ein Volumen von 150 – 200 ml. Zur Formulierung erfolgte erneut eine Diafiltration über ein Hohlfasermodule 0,1 µm Polyethersulfon, Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland. Dabei wurde ein 10-facher Volumenaustausch gegen 10 mM Tris/HCL, pH 7,5 durchgeführt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 10% V/V der Polygelinlösung oder mit einer proteinfreien Lösung formuliert. Nach Tiefen- (50 CE Tiefenfilter Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) und 0,45 µm Filtration (Millipak Gold 0,45 µm, Millipore, Deutschland) erfolgte die Lagerung der Bulksuspension bei -70°C. Nach Einstellung der Dosis pro ml erfolgte die Lyophilisation.

3.5 Analytik

3.5.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte über die Farbausschlussmethode mit Trypanblau.

Während der Vorkultur geschah dies vollautomatisch mit dem Cedex Zellzählgerät, der Fa. Innovatis, Bielefeld, Deutschland. Während der Fermentation wurde die Zellzahl manuell mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

3.5.2 Bestimmung infektiöser Partikel über Tissue Culture Infective Dose 50%

Die Tissue Culture Infective Dose 50% (TCID₅₀)-Bestimmung erfolgte in 96-Well Platten. Die Berechnung des logarithmischen Virustiters log₁₀(TCID)₅₀/ ml für die einzelnen Proben wurde nach der Formel von Spearman-Kaerber in einer vereinfachten Version bestimmt:

$$\frac{\log_{10}(TCID_{50})}{ml} = a + 0,5 + \frac{n}{r} + 0,82 \quad \text{Gleichung 3-1}$$

TCID ₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50%
a	negativer log ₁₀ Wert der höchsten Verdünnung mit kompletter CPE
n	Summe aller weiteren Wells, die in den nächsten Verdünnungsstufen einen CPE aufweisen
r	Wiederholungen pro Verdünnung (8)
0,82	Volumenfaktor (6,66), um das Probenvolumen von 150 µl auf 1 ml zu beziehen (log ₁₀ 6,66 = 0,82)

3.5.3 Quantifizierung viraler Partikel nach Inaktivierung

Die Partikelkonzentration in der Bulksuspension wurde extern am „Zentrum für Ultrastrukturelle Diagnostik“ (ZUD), Bielefeld, Deutschland, mittels quantitativer Elektronenmikroskopie durchgeführt. Hier wurde das Verfahren der Negativkontrastierung verwendet und statistisch ausgewertet. Dazu wurde 1 ml der Probe mit 100 µl einer 1:50 verdünnten Latexbeadsuspension gemischt. 10 µl dieser Mischung wurden dann für die Negativkontrastierung auf ein beschichtetes Nickelgrid aufgetragen und mit Phosphorwolframsäure kontrastiert, luftgetrocknet und unter dem Elektronenmikroskop gescreent. Aus dem Verhältnis von Latexbeads zu Virus wurde die Anzahl der Viren berechnet.

3.5.4 Bestimmung der Wirtszellproteinkonzentration mittels Immuno Ligand Assay

Die Konzentration der Wirtszellproteine (HCP) wurde im Lab. Dr. Dörschug über das Threshold Immunoassay System der Fa. Molecular Devices, München, Deutschland durchgeführt. Es handelt sich um ein unspezifisches „Sammelsignal“.

3.5.5 Quantifizierung des DNA-Gehaltes

Der DNA-Gehalt wurde fluorometrisch durch Färbung mit dem Pico Green dsDNA Quantitation Kit, der Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande, durchgeführt. Es wurden unbehandelte Proben, mit Proteinase K und mit Benzonase behandelte Proben vermessen. Die Konzentration wurde über einen externen Standard berechnet (DNA aus Lambda-Phagen).

3.5.6 Bestimmung von Glukose und Laktat

Glukose und Laktat wurden enzymatisch mit Hilfe des YSI 2700, Fa. Kreienbaum, Langenfeld, Deutschland, bestimmt.

3.5.7 Bestimmung von Glutamin, Glutamat und Ammonium

Glutamin, Glutamat und Ammonium wurden u. a. mit Hilfe des 6 Kanalanalysegerätes 7100 MBS der Fa. Kreienbaum, Langenfeld, Deutschland, bestimmt.

3.5.8 Aminosäureanalyse mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

44 Aminosäuren (siehe Anhang) wurden durch HPLC bestimmt. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Bayer Technology Services GmbH, Wuppertal, Deutschland, durchgeführt. Die direkt aus dem Fermenter stammenden Proben wurden für 10 min bei 5000 U/min (~ 800 g) mit einer Laborfuge GL, Heraeus, Deutschland zentrifugiert, eingefroren und nach Auftauen wie folgt bearbeitet:

- 400 µl Probe mit 400 µl Seraprep[®] zur Proteinfällung versetzen (Pickering Lab., USA)
- Inkubation 10 min bei Raumtemperatur
- Zentrifugation in Eppendorf Tischzentrifuge, Typ 5417 (10 min, 13200 U/min (~20000 g))

- Überstand sterilfiltrieren (Spritzenvorsatzfilter, Typ Minisart®, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- 200 µl des filtrierten Überstandes mit Lithium Diluent® (Pickering Laboratories, USA) 1:4 verdünnen
- Abfüllung in 1 ml Probengläser, Typ N11-1HP/ Vials, Fa. Macherey und Nagel, Düren, Deutschland, verschliessen und in den Autosampler, Model 410, Fa. Varian, USA, stellen

Nach der Separation in der Lithium-Ionenaustauscher-Säule (Kationenaustausch mit pH-Gradient) wurde die Probe mit Ninhydrin (Trione®, Pickering Lab., USA) derivatisiert. Die derivatisierten Aminosäuren wurden spektroskopisch mit einem UV/ VIS Detektor, Model 345, Fa. Varian, USA, detektiert und die Konzentration der einzelnen Komponenten über einen Standard bestimmt.

3.6 Physikalische Beschreibung der Reaktoren

3.6.1 Verwendete Reaktoren

Die verwendeten Reaktoren waren prinzipiell ähnlich aufgebaut. Der schematische Aufbau ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Die physikalische Beschreibung der Reaktoren wurde in verschiedenen Maßstäben ($V=3,5$ bis 200 L) in den Geometrien $H/D = 1$ bis $2,3$ durchgeführt. Die verwendeten Membranschläuche Typ Fluidflex HG Silikonschläuche, Fa. LiquidScan, Überlingen, Deutschland, besaßen einen Nenndurchmesser von $d_2 = 2$ mm (außen) und $d_1 = 1$ mm (innen), die an die Betriebsbedingungen (Dehnung, Beaufschlagung mit Druck, etc.) angepasst werden mussten. Details zu den Geometrien der Reaktoren sind im Anhang aufgeführt.

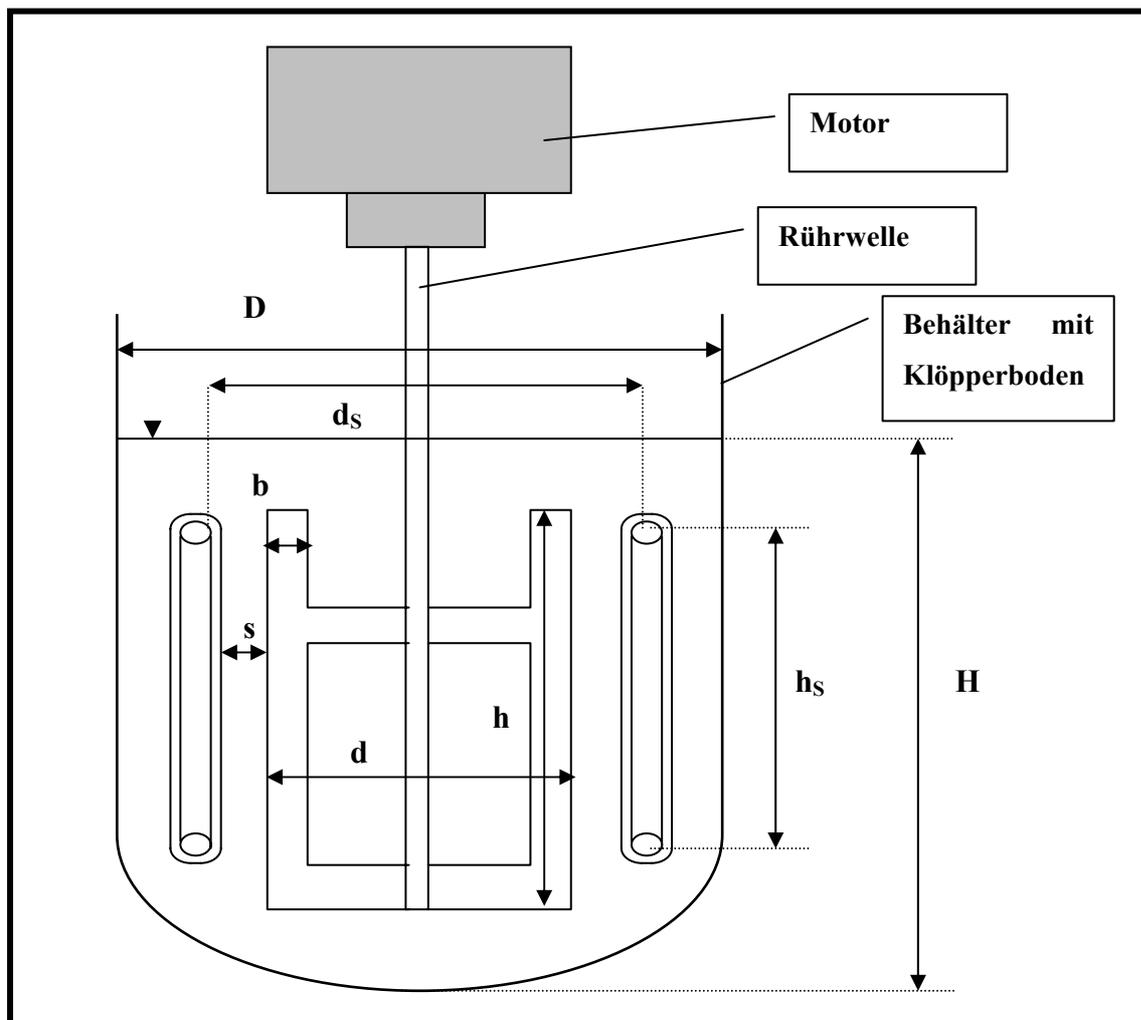


Abbildung 3-2: Prinzipieller Aufbau der zur physikalischen Beschreibung verwendeten Reaktoren. Details zu den Abmessungen der Reaktoren sind im Anhang aufgeführt.

3.6.2 Bestimmung der Leistungscharakteristik

Die Bestimmung der Newtonzahl erfolgte über eine Messung des Drehmoments M_D . Dazu wurde ein Drehmomentsensors (Fa. ETH, Gschwend, Deutschland) verwendet, mit dessen Hilfe der Leistungseintrag wie folgt berechnet werden konnte:

$$P = 2 \pi n M_D \quad \text{Gleichung 3-2}$$

3.6.3 Durchführung der Mischzeitexperimente

Die Homogenisierungseigenschaften von Reaktoren lassen sich durch die sogenannte Mischzeit beschreiben. Diese wird durch eine instationäre Methode auf physikalischem (Leitfähigkeitsmessung) oder chemischem (Farbumschlagmethode) Weg bestimmt. In dieser Arbeit wurde die Farbumschlagmethode verwendet. Hier wurde der Reaktorinhalt zunächst mit Stärke und Jod gefärbt und anschließend durch die Reduktion des Jods mit Natriumthiosulfat wieder entfärbt.

Vor Beginn wurde durch Titration das genaue stöchiometrische Verhältnis der Natriumthiosulfat- und Jod-Kaliumjodidlösung (V_J) ermittelt. Die zugegebene Menge an Natriumthiosulfat (V_T) konnte unter Berücksichtigung des ermittelten Titrationsfaktor T auf ein Molaritätsverhältnis von 1,025 eingestellt werden (Überschuss an Natriumthiosulfat). Nach längerem Gebrauch musste das stöchiometrische Verhältnis überprüft werden, da durch Sauerstoff und Licht die Jodlösung an Aktivität verliert. Zur Verstärkung der Färbung wurde dem Fermenterinhalt eine 1%-ige Stärkelösung (V_S) zugesetzt, deren Volumen sich wie folgt berechnet:

$$\frac{V_S}{V} = 0,002 \quad \text{Gleichung 3-3}$$

Das notwendige Volumen der Kaliumjodid-Jod Lösung (V_J) ergibt sich wie folgt:

$$\frac{n_J V_J}{V} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ m mol L}^{-1} / D \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Nachdem der Behälterinhalt ausreichend durchmischt ist (3 bis 5-fache Mischzeit), wurde zur Entfärbung und Start der Messung die 1 N Natriumthiosulfatlösung (V_T) zugegeben. Das Volumen ergab sich aus

$$\frac{n_T V_T}{n_J V_J} = 1,025 \quad T \qquad \text{Gleichung 3-5}$$

T beschreibt den ermittelten Titrationsfaktor der Lösung. Die Zugabe erfolgte vorsichtig nahe der Rührerwelle, um einen Impuls und die damit verbundene positive Beeinflussung der Durchmischung zu verhindern. Parallel wurde die Zeitmessung gestartet. Die Zugabezeit muss dabei klein im Verhältnis zur Mischzeit sein.

Mit Verschwinden der letzten Färbung war die Zeitmessung zu stoppen. Die Messungen wurden viermal je Arbeitspunkt (Drehzahl) wiederholt. Dazu wurde vor Beginn des nächsten Experiments der Behälterinhalt auf den Umschlagspunkt eingestellt [H. J. HENZLER 1978].

Mit der ermittelten Mischzeit ließ sich, wie unter 2.4.2 beschrieben, die Durchmischungskennzahl c_H berechnen.

3.6.4 Bestimmung der Scherbeanspruchung

Zur Beschreibung der integralen hydrodynamischen Beanspruchung wurde ein Blauton-Polymer-Flockensystem verwendet. Dazu wurde das entsprechende Wasservolumen mit einer gesättigten CaCl_2 -Lösung auf eine Leitfähigkeit von $1000 \mu\text{S/L}$ eingestellt. Die Messung erfolgte mit einem Konduktometer, Typ CG855, Fa. Schott, Hofheim, Deutschland. Anschließend wurden 5 g/L Wittschlicker Blauton, Fa. Braun Tonbergbau, Deutschland, und 1 g/L NaCl zugegeben und homogenisiert ($\sim 20 \text{ min}$).

Der Prozess der Flockung wurde durch die Zugabe von 5 ml/L einer Praestol BC 650 Lösung gestartet. Prinzipiell werden beim Prozess der Flockung kleine Primärteilchen zusammengeballt. Dabei unterscheidet man zwischen Flockulation (Vernetzung durch Polymere) und Koagulation (Kompensation der Oberflächenladung). Nach erfolgter Flockung wurde die Zerstörungskinetik aufgenommen und bewertet. Bei der Zerstörung von Flocken wird die Erosion (Ausreißen von Teilchen aus der Flocke) und der Bruch von Flocken unterschieden, die jedoch beide parallel stattfinden und im Experiment nicht unterscheidbar sind.

Bedingt durch die Scherbeanspruchung sinkt der Partikeldurchmesser bis ein Gleichgewicht zwischen der herrschenden Beanspruchung und der inneren Festigkeit des Partikels erreicht ist. Dies gilt auf Grund der natürlichen Alterung des Polymers nicht für das Blauton-Polymer Flockensystem, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Um eine Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, wird der Durchmesser $d_{p,50}$ bestimmt, der sich durch folgende Bedingung aus der Änderung von d_p ergibt:

$$\frac{d(d_p)}{dt} \leq 0,0055 \mu\text{m} / \text{s} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Die einsetzende Flockung und der folgende Zerstörungsprozess wurden über eine Laser Scanning Sonde, Typ Lasentec D600, der Fa. Lasentec, Deutschland, *in-situ* aufgenommen.

Dazu wurde der aus einer Laser-Lichtquelle austretende Strahl mit Hilfe einer rotierenden Linse zu einem Lichtpunkt fokussiert. Dieser Lichtpunkt überstrich die vor der Sonde vorbeiströmenden Partikel. Aus dem Reflektionssignal der Partikel wurde die mittlere Sehnenlänge l bestimmt.

$$l = u_L \cdot t_{Puls} \quad \text{Gleichung 3-7}$$

t_{Puls} : Laufzeit der Partikelabtastung u_L : Umfangsgeschwindigkeit des Laserstrahls

Die Sehnenlänge l ist direkt proportional zum vom Messgerät angegebenen Partikeldurchmesser d_p :

$$l = \frac{d_p}{1 + \frac{u_p}{u_L}} \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Ist die Geschwindigkeit der Partikel wesentlich kleiner als die Geschwindigkeit des rotierenden Lasers, so vereinfacht sich dieser Ausdruck zu $l = d_p$. Die Abtastgeschwindigkeit des Lasers liegt bei 2 m/s. In Abbildung 3-3 ist die Arbeitsweise der Sonde schematisch dargestellt.

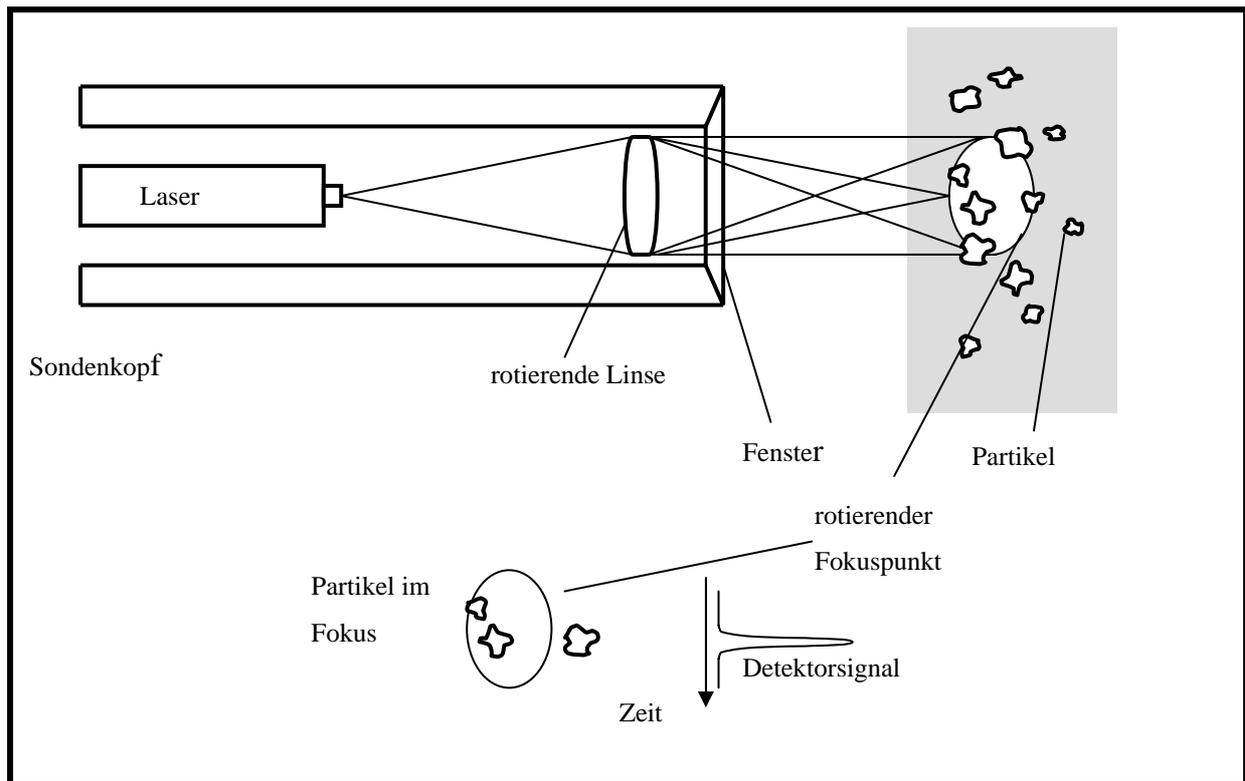


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Messprinzips der Laser-Scanning-Sonde.

Der aus der Kinetik ermittelte mittlere Flockendurchmesser d_{p50}' wurde durch eine von BIEDERMANN und HENZLER (1996) entwickelte Funktion, welche die Strömungsbedingungen bei einem volumenspezifischen Leistungseintrag einbezieht, korrigiert. Hieraus ergibt sich der Vergleichsflockendurchmesser d_{VF} aus:

$$d_{VF} = m d'_{p50} - b \quad \text{mit} \quad m = 1,3e^{-6} \left(\frac{P}{V}\right)^2 + 1,37e^{-3} \left(\frac{P}{V}\right) + 2,46 \quad \text{Gleichung 3-9}$$

$$b = 8,12e^{-5} \left(\frac{P}{V}\right)^2 + 6,48e^{-3} \left(\frac{P}{V}\right) + 76,9$$

Der ermittelte Vergleichsflockendurchmesser erlaubt einen direkten Vergleich der herrschenden integralen Scherbeanspruchung bei einem spezifischen Leistungseintrag.

Zur Berechnung des Leistungseintrages und der Newtonzahl (Ne) musste die Leistungscharakteristik bestimmt werden.

3.6.5 Bestimmung des volumetrischen Stofftransportkoeffizienten ka

Der ka -Wert wurde mit Hilfe der instationären Methode bestimmt. Dazu wurde zunächst der Sauerstoff durch Stickstoff „ausgestrippt“ und im Anschluss die Begasung mit Pressluft begonnen. Die Kinetik der Aufsättigung wurde mit Hilfe einer schnell ansprechenden Sauerstoffelektrode, WTW Microprocessor Oximeter OXI 196, Fa. WTW GmbH, Weilheim, Deutschland, gemessen und in einem Speichergerät, Fa. Alborn, Typ Almemo 2250, aufgezeichnet. Die Elektrode wurde vor jeder Messung kalibriert und zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit die Ansprechzeit der Sonde bestimmt. Dazu wurde die Sonde zunächst in eine sauerstofffreie Natriumascorbatlösung und anschließend in eine mit Pressluft gesättigten Lösung getaucht. Die Zeit bis zum Erreichen einer relativen Sauerstoffkonzentration von 90% wurde bestimmt und die Ansprechzeit der Sonde ermittelt. Der Stofftransportkoeffizient ka wurde für verschiedenen Gasdurchsätze gemessen. Aus der Sauerstoffbilanz für die Flüssigphase

$$\frac{dc_L}{dt} = ka(c_L^* - c_L) \quad \text{Gleichung 3-10}$$

ergibt sich nach Integration

$$\ln \frac{(c_L^* - c(t))}{(c_L^* - c_0)} = -ka t \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Durch halblogarithmische Auftragung der relativen Konzentrationsänderung aus Gleichung 3-11 über der Zeit t ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der ka – Wert ist. Die Kinetik wurde bis zum Erreichen der stationären Phase aufgenommen, um die notwendige maximale Konzentration c_L^* zu ermitteln. Der ermittelte ka -Wert bildet die Grundlage der für den Vergleich der Reaktoren notwendigen Berechnungen der dimensionslosen Betrachtung nach Sherwood und Reynolds.

Zur Messung des Gasvolumenstroms wurden kalibrierte Rotameter verwendet. Zur Berechnung des Volumenstroms musste der bedingt durch Geometrie und Länge der Membransegmente entstehende Druckverlust berücksichtigt werden. Abbildung 3-4 zeigt schematisch den experimentellen Aufbau.

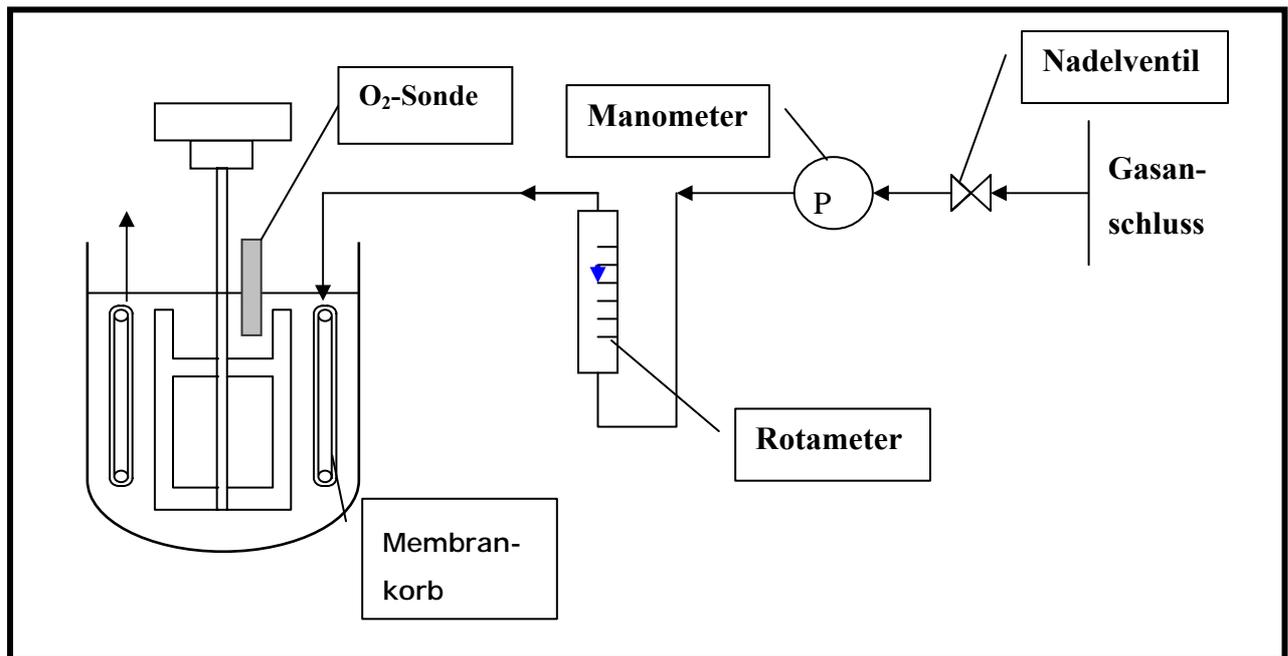


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung des k_a -Wertes. Zunächst wird das aus dem Hausanschluss bezogene Gas (N_2 oder Pressluft) über einen Druckminderer geführt, um Druckschwankungen in der Hausleitung abzufangen (nicht dargestellt). Über ein Nadelventil wird der Durchfluss, welcher am Rotameter angezeigt wird, eingestellt. Der entstehende Druckverlust in Zuleitung und Membrankorb wird über ein kalibriertes Manometer gemessen. Um eine ausreichende Anströmung der Sauerstoffsonde zu gewährleisten, wird diese rührernah eingebaut.

Die bedingt durch den Druckverlust notwendige Korrektur des am Rotameter gemessenen Volumenstroms q_{gemessen} ergibt sich zu:

$$q = q_{\text{gemessen}} \cdot \sqrt{1 + \frac{\Delta p}{p_0}}$$

Gleichung 3-12

4 ERGEBNISSE

4.1 Adaptation der Zelllinie an serum- und proteinfreie Medien

4.1.1 Wachstum und Morphologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide unter 2.2.2 geschilderten Adaptationsstrategien verwendet. Zwei kommerziell erhältliche Medien, SMIF[®] 8 und OptiPro[®] SFM mit und ohne Insulinzugabe, und ein „in-house“ Medium (C7PMF 3.2295A V), das frei von tierischen, humanen oder pflanzlichen Komponenten war, wurden zur Adaptation verwendet. Dem „in-house“ Medium wurde ebenfalls rekombinantes Insulin zugesetzt.

Zellen, die nach der Adaptationsstrategie der GBF kultiviert wurden, zeigten unabhängig vom verwendeten Medium und dessen Supplementierung kein Wachstum. Die entwickelte Strategie mit sequentieller Reduktion des Mediums mit humaner Proteinfraction nach jeder Passage (siehe 2.2.2) war für alle Medien, die rekombinantes Insulin enthielten, erfolgreich. Ohne Zugabe von rekombinantem Insulin zeigten die Zellen in allen Medien bereits während oder kurz nach der Adaptationsphase kein Wachstum (nicht dargestellt). Die Bewertung des Erfolgs der Adaptation wurde 8 Passagen nach Ende des Adaptationsprotokolls vorgenommen. Zur Bewertung des Wachstums und der Morphologie wurden die T-75 cm²-Flaschen (n=5) vor Erreichen vollständiger Konfluenz abgebrochen und die Wachstumsrate μ (hier dX/dt) der Zellen als Maß für die Adaptation bestimmt. Tabelle 4-1 zeigt die für die verschiedenen Medien bestimmten Wachstumsraten.

Tabelle 4-1: Ermittelte Wachstumsraten (dX/ dt) der *BK Klon 3A* Zelllinie nach Adaptation an verschiedene Medien. Dargestellt ist der aus fünf T-Flaschen bestimmte Mittelwert.

Medium	$\mu = dX/dt$ [1/d]	Standardabw. [1/d]	Rel. Fehler [%]
C7PMF3.2292C (Kontrolle)	0,57	0,042	7,4
C7PMF 3.2295A V	0,58	0,057	9,8
OptiPro [®] SFM + 570 IU/L rekombinantes Insulin	0,58	0,069	11,9
SMIF [®] 8 + 570 IU/L rekombinantes Insulin	0,51	0,105	20,6

Die ermittelte „integrale“ Wachstumsrate μ war bei allen getesteten Medien vergleichbar. In allen Fällen lag die Vitalität der Zellen höher als 96% und der Durchmesser der Zellen zwischen 13,5 μm und 17 μm . Signifikante Unterschiede zur Kontrolle waren nicht feststellbar.

Die folgenden Abbildungen illustrieren exemplarisch den Vergleich von Zellzahl, Vitalität und mittlerem Durchmesser der an C7PMF 3.2295A V adaptierten Zellen im Vergleich zur Kontrollkultur (in C7PMF 3.2292C kultiviert). Die Inokulationsdichten und Kultivierungszeiten der jeweiligen Passagen variierten, waren jedoch innerhalb der Passagen untereinander gleich. Für die Passagen 205 bis 207 ist der jeweilige Anteil (V/V [%]) C7PMF 3.2295A V in Klammern angegeben. Für die Passagen 208 bis 219 ist die Gesamtzahl der ausschließlich in C7PMF 3.2295A V kultivierten Passagen in Klammern angegeben.

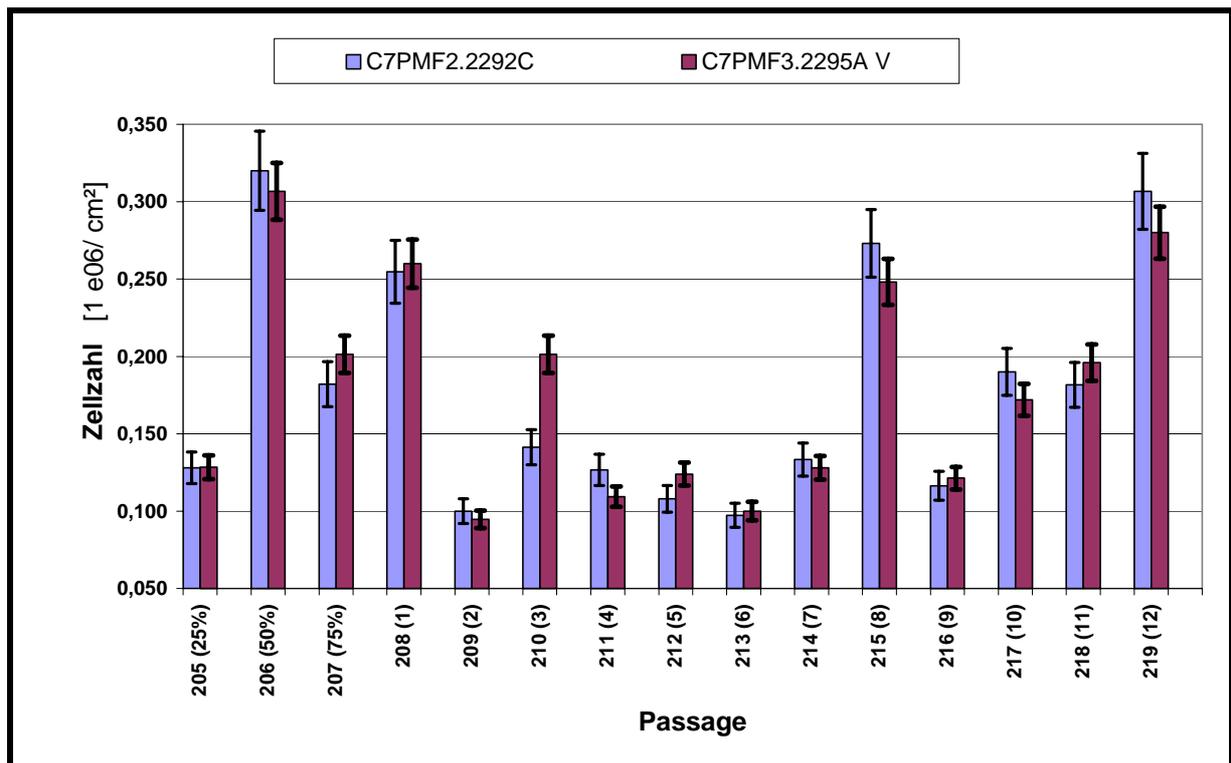


Abbildung 4-1: Verlauf der Zellzahl während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V. Für die Passagen 205 bis 207 ist der jeweilige Anteil (V/V) C7PMF 3.2295A V in Klammern angegeben. Für die Passagen 208 bis 219 ist die Gesamtzahl der ausschließlich in C7PMF 3.2295A V kultivierten Passagen angegeben.

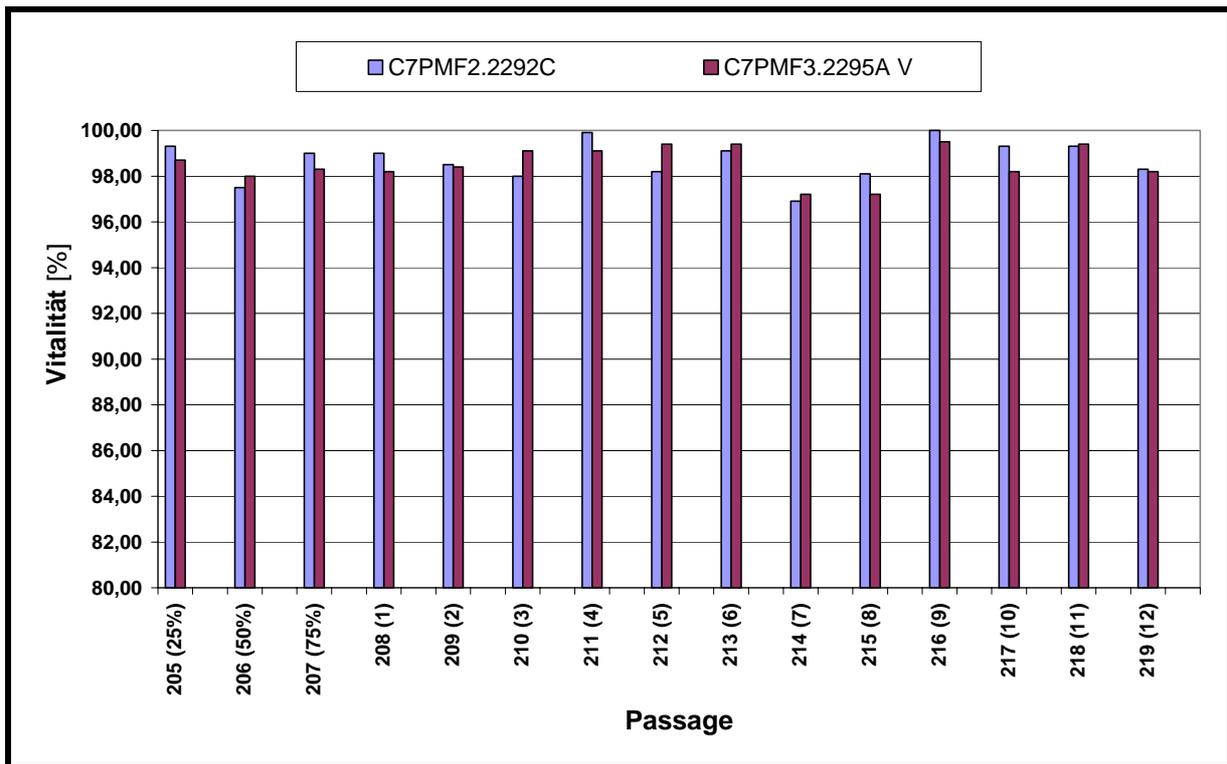


Abbildung 4-2: Verlauf der Vitalität während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V.

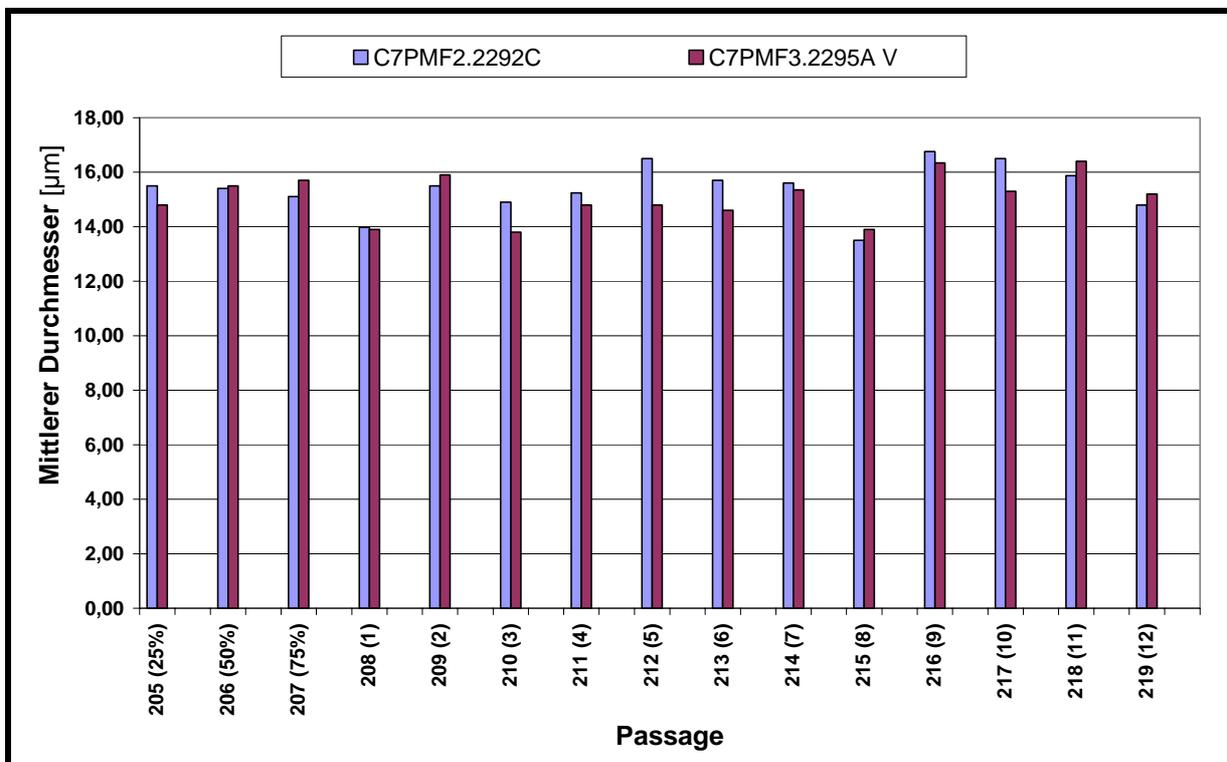


Abbildung 4-3: Verlauf des mittleren Durchmessers der Zellen während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V.

Für OptiPro[®] SFM + 570 IU/L Insulin und SMIF[®] 8 + 570 IU/L Insulin ergaben sich prinzipiell ähnliche Verläufe (nicht dargestellt). Ein Verlust der Adhärenz in T-Flaschen war in keinem Fall erkennbar.

4.1.2 Bewertung der Viruspropagationsfähigkeit

Um die Viruspropagation in den verschiedenen Medien zu bewerten, wurden die an verschiedene Medien adaptierten Zelllinien in jeweils fünf T-75 cm² Flaschen mit einer von MOI = 0,01 infiziert. Zur Bestimmung der mittleren Zellzahl wurden drei zusätzlich angesetzte Kulturen zum Zeitpunkt der Infektion abgebrochen. Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion war in allen Fällen vergleichbar ($X \sim 0,26 \cdot 10^6/\text{cm}^2 \pm 15\%$).

Während der Virusvermehrung wurden die Glukose- und die Laktatkonzentration, sowie der Virustiter über TCID₅₀ täglich bestimmt. Zusätzlich erfolgte lichtmikroskopisch eine visuelle Kontrolle des Fortschritts der Virusvermehrung. Die Glukosekonzentration war zu keinem Zeitpunkt limitierend (> 0,3 g/L).

Während der Infektion zeigte die visuelle Betrachtung unter dem Lichtmikroskop deutliche Unterschiede zwischen den kommerziell erhältlichen Medien OptiPro SFM[®] und SMIF[®] 8 zur Kontrolle, welche in den Abbildungen 4-4 bis 4-6 dargestellt sind. Zwischen der Kontrolle und den an C7PMF 3.2295A V adaptierten Zellen waren keine Unterschiede erkennbar (nicht dargestellt).



Abbildung 4-4: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion im Kontrollmedium (50-fach vergrößert). Einige Plaques sind markiert.

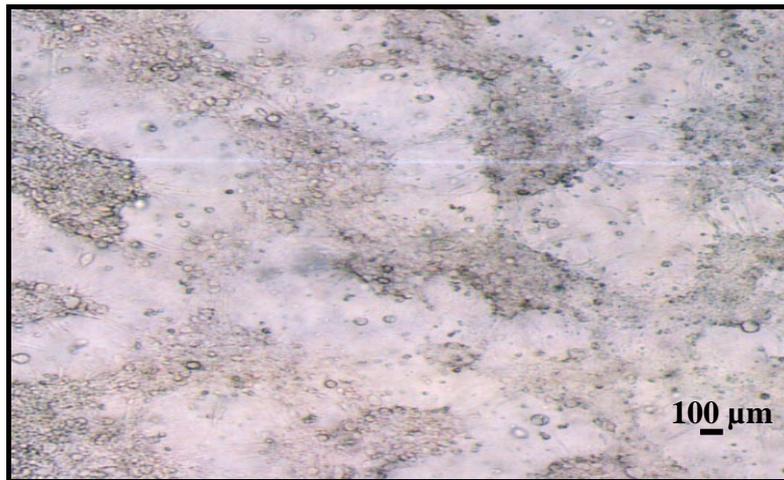


Abbildung 4-5: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion in OptiPro® SFM (50-fach vergrößert).

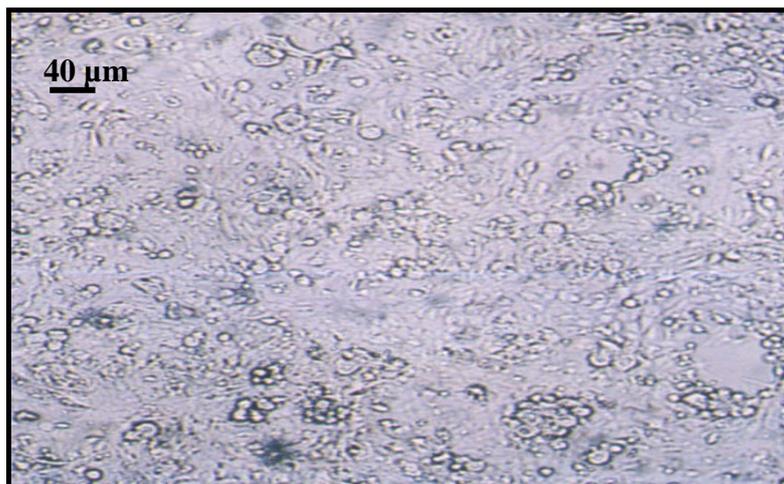


Abbildung 4-6: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion in SMIF® 8 (200-fach vergrößert).

Abbildung 4-4 zeigt eine 50-fach vergrößerte lichtmikroskopische Aufnahme der in C7PMF 3.2292 C kultivierten Zellen 4 Tage nach Infektion mit *PPVO NZ-2*. Der Fortschritt der Virusvermehrung ist an Hand der Plauebildung zu erkennen. Die noch bewachsenen Flächen zeigen eine homogene Verteilung der Zellen. Die Zellen waren deutlich vergrößert Zellen und zeigten ein körniges Inneres, was auf die Infektion des Virus zurückzuführen ist.

Abbildung 4-5 zeigt die Virusvermehrung in OptiPro® SFM Medium (50-fach vergrößert). Es sind deutlich größere freie Flächen zu erkennen. Dies deutet auf einen größeren Fortschritt der Virusvermehrung hin.

Die verbliebenen Zellen zeigen keine homogene Verteilung, sondern scheinen sich zu größeren Aggregaten zusammengelagert zu haben. Bedingt durch die Virusinfektion sind ebenfalls größere Zellen mit körnigem Inneren zu erkennen.

Die Viruspropagation in SMIF® 8 Medium illustriert die größten Unterschiede zur Kontrolle (Abbildung 4-6). Die Kultur ist nahezu konfluent. Zwar sind einige Zellen infiziert, jedoch lassen sich nur vereinzelt Plaques erkennen.

Die an Hand der mikroskopischen Beobachtungen abgeleiteten Vermutungen zum Fortschritt und der Produktivität der Virusvermehrung lassen sich nur teilweise durch die Infektionskinetik bestätigen. Die während der Infektion erreichten maximalen Titer infektiöser Viruspartikel ($\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) waren bei allen Kulturen nach etwa 4 - 5 Tagen erreicht. Dabei zeigten beide kommerziell erhältlichen Medien einen signifikant niedrigeren Virustiter (Abbildung 4-7).

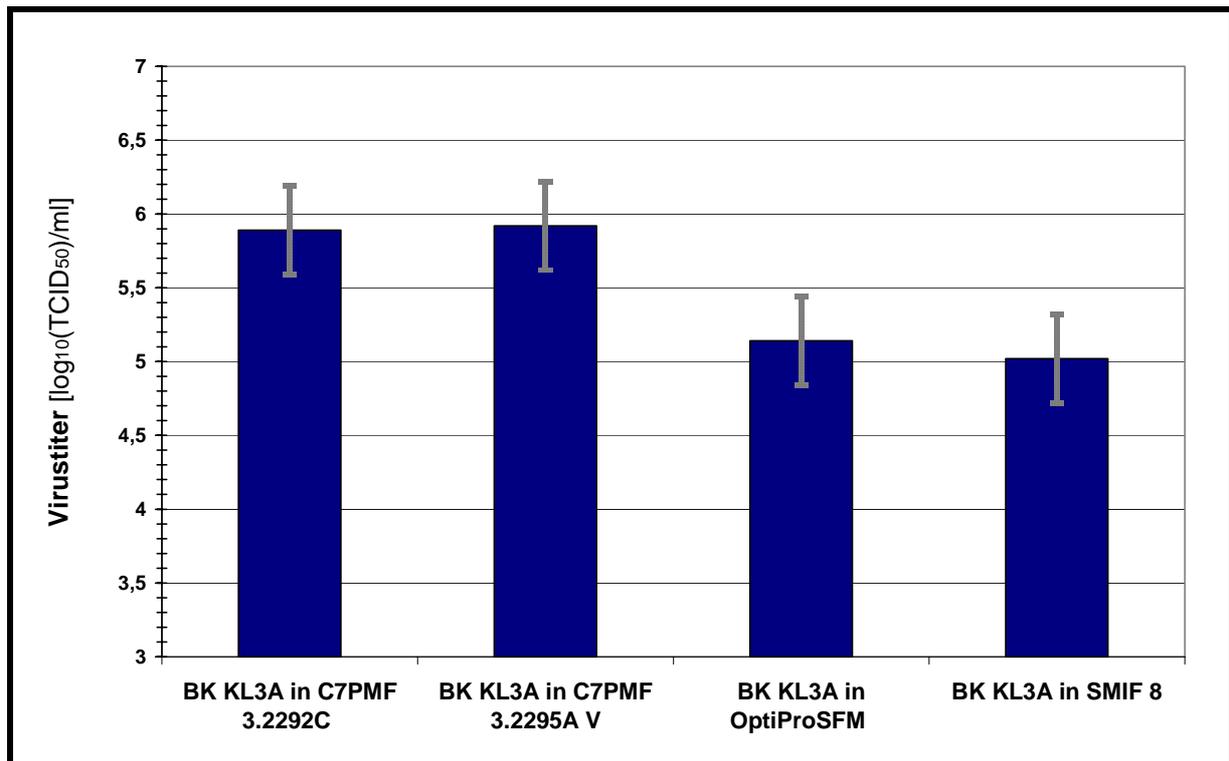


Abbildung 4-7: Darstellung des während der Virusvermehrung erreichten maximalen Virustiters $\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Der ermittelte Verdünnungsfehler der Bestimmungsmethode von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde ebenfalls eingezeichnet ($n=5$, $\text{MOI} = 0,01$).

Die in C7PMF 3.3395A V kultivierte Zelllinie zeigte im Vergleich zur etablierten *BK KL 3A* Zelle absolut vergleichbare Virustiter. Auch bezüglich der Infektionskinetik waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Abbildung 4-8 zeigt einen repräsentativen Verlauf der Infektionskinetik der an C7PMF 3.2295A V adaptierten Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle.

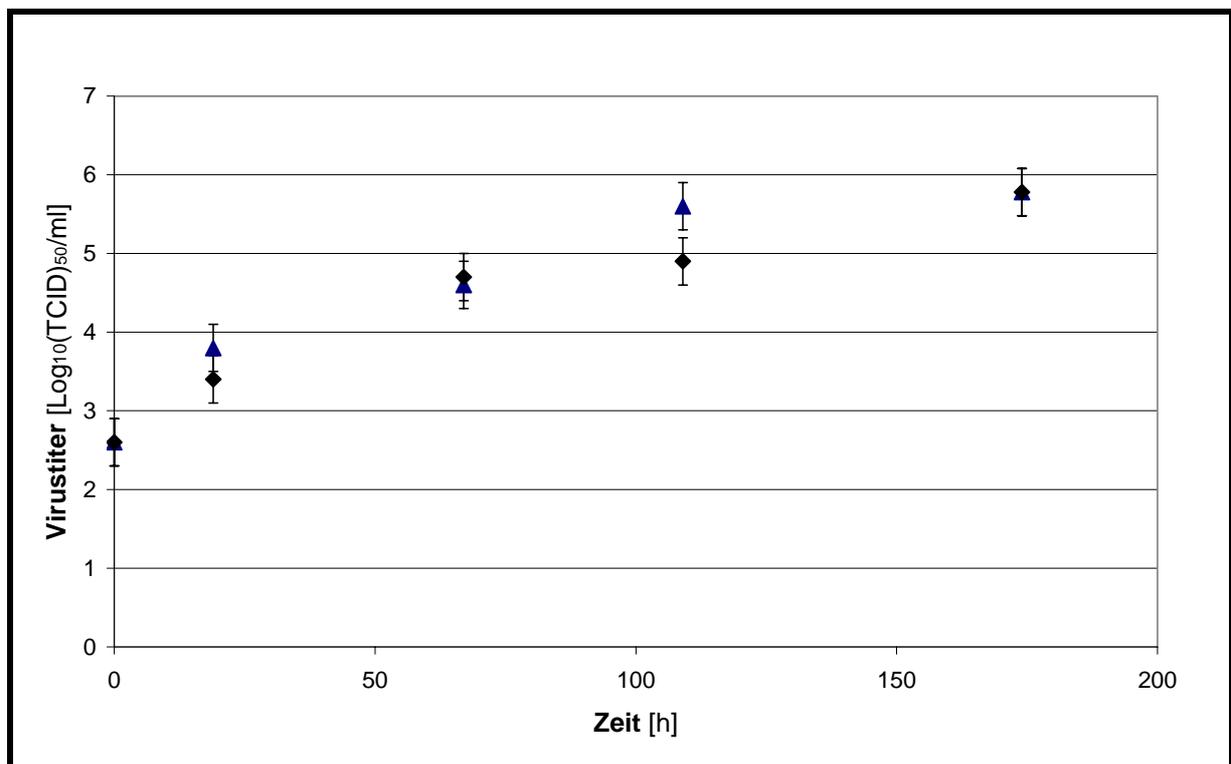


Abbildung 4-8: Vergleich der Infektionskinetik zwischen der an C7PMF 3.2295A V (▲) adaptierten Zelllinie und der in C7PMF 3.2292 C (◆) kultivierten *BK KI 3 A* Zelllinie (Kontrolle). Der Verdünnungsfehler von $\pm 0,3 \text{ log}_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde ebenfalls eingezeichnet.

Auf Grund der höheren Virusproduktivität und des niedrigeren Medienpreises wurde der Schwerpunkt für weitere Entwicklungen auf die an C7PMF 3.2295A V adaptierte Zelllinie gelegt. Sie wird im folgenden *BK Klon 3A V* genannt. Eine Forschungszellbank wurde in Passage 209 angelegt. Die Zellen wurden mit 10% DMSO und der Zugabe von 1g/L Pluronic F68 in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auftaute Zellen zeigten keine Änderungen bezüglich Wachstumsverhalten und wurden in den folgenden Experimenten eingesetzt.

4.1.3 Verhalten der *BK Klon 3A V* Zelllinie im Bioreaktor

Um einen Einfluss durch die fehlende humane Proteinfraction (HPPF) während der Fermentation auszuschließen, wurden Testläufe im Bioreaktor durchgeführt. Dazu wurde die Zelllinie im biphasischen Batchprozess (10 L Maßstab Prozess I) kultiviert (s. 1.2).

Neben den In-Prozess-Kontrollen wurden die Anhaftung der Zellen, die Besiedlung der Microcarrier und der Fortschritt der Virusvermehrung lichtmikroskopisch beobachtet.

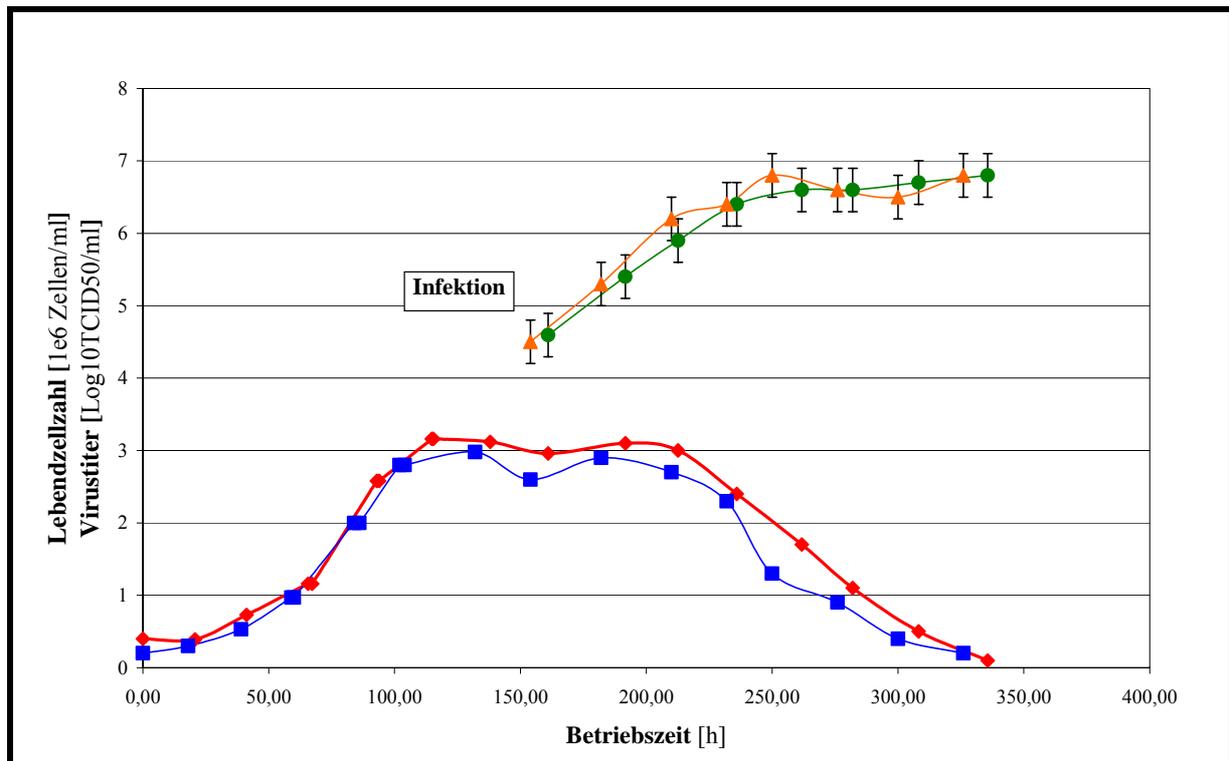


Abbildung 4-9: Repräsentativer Vergleich der beiden Zelllinien im 10 L Bioreaktor kultiviert nach Prozess I (*BK KL 3A*: Zellzahl ◆, Virustiter ●; *BK KL 3A V*: Zellzahl ■, Virustiter ▲). Der Verdünnungsfehler von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ ist eingezeichnet.

Der Fermentationsverlauf zeigte bezüglich Zellwachstum und Virustiter keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4-9). Diese Beobachtungen ließen sich ebenfalls in der lichtmikroskopischen Betrachtung bestätigen. Zwei bis sechs Stunden nach Inokulation des Reaktors mit der Microcarrier-Zellsuspension waren die Zellen nahezu vollständig auf der Oberfläche der Microcarrier adhäriert und begannen nach einer kurzen lag-Phase die Carrier zu besiedeln.

Abbildung 4-10 zeigt exemplarisch eine lichtmikroskopische Aufnahme 48 h nach Inokulation (50-fache Vergrößerung). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen begonnen haben, die Carrier zu besiedeln.

Nach 8 bis 10 Tagen waren die Microcarrier konfluent bewachsen (Abbildung 4-11, 50-fache Vergrößerung). Die stationäre Phase wurde in einem vergleichbaren Zeitraum im Vergleich zur etablierten *BK KL 3A* erreicht. Bezüglich der erreichten Zellzahlen konnten keine signifikanten Unterschiede zur etablierten Zelllinie festgestellt werden.

Nach der Infektion mit *PPVO NZ-2* konnten keine Unterschiede bezüglich der Abnahme der Lebendzellzahl und der Kinetik der Virusvermehrung festgestellt werden. Als Folge der Infektion und dem damit verbundenen CPE, wurden die Zellen zerstört. Abbildung 4-12 zeigt eine Fermenterprobe kurz vor Ernte. Der erreichte CPE war in allen Fällen > 90% und somit zum etablierten Prozess vergleichbar.

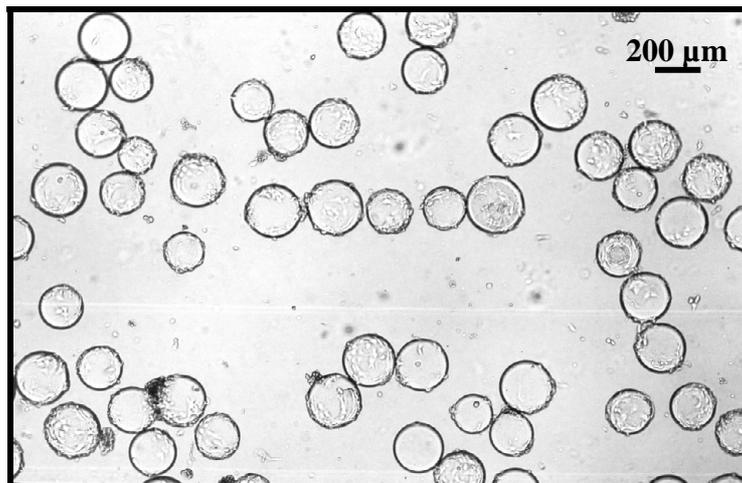


Abbildung 4-10: Lichtmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen Fermenterprobe 48 h nach Inokulation des Reaktors.

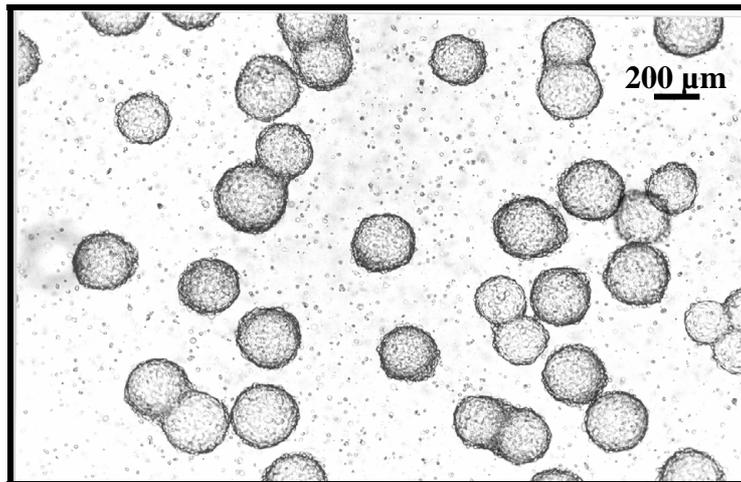


Abbildung 4-11: Lichtmikroskopische Aufnahme vollständig konfluent bewachsener Microcarrier nach 8 bis 10 Tagen Kultivierung (teilweise Multilayer Bildung).

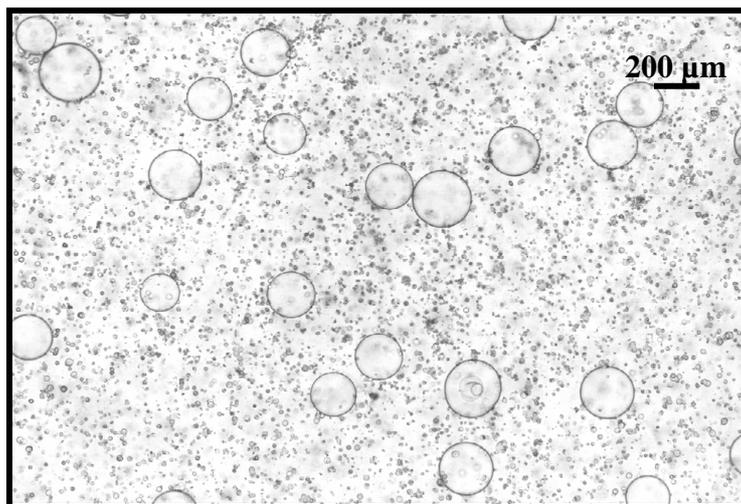


Abbildung 4-12: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe kurz vor Ernte.

In den durchgeführten Testläufen konnten keine auffälligen Unterschiede bezüglich Anhaftung der Zellen, Wachstum der Zellen und Virusproduktivität im Bioreaktor festgestellt werden. Dies spiegelte sich auch im Vergleich der im Durchschnitt maximal erreichten Virustiter wider ($\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$), welche in Abbildung 4-13 dargestellt ist.

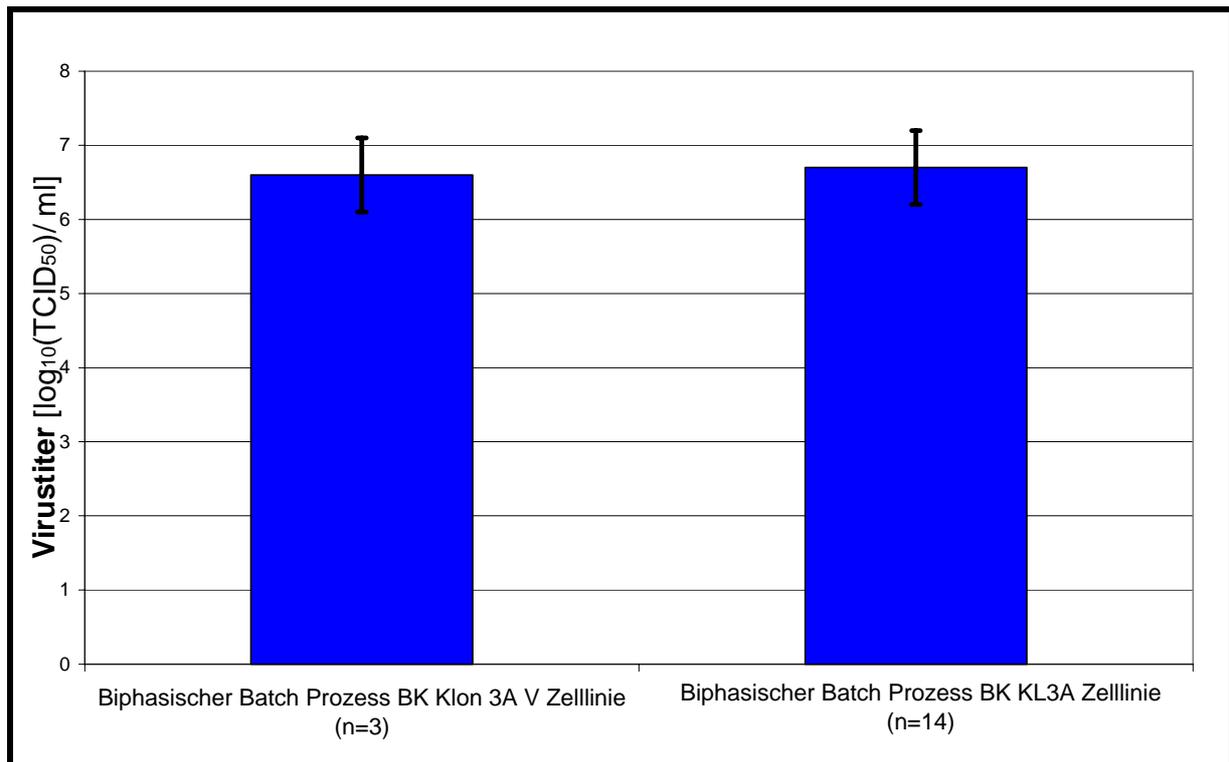


Abbildung 4-13: Vergleich der Virustiter im biphasischen Batchprozess zwischen der etablierten *BK Klon 3A* Zelllinie und der neu generierten *BK Klon 3A V* Zelllinie. Die eingetragene Abweichung stellt die maximale Abweichung von +/- 0,4 log₁₀ Stufen dar.

4.1.4 Generierung einer Suspensionszelle

Mit den an verschiedene Medien adaptierten Zellen (siehe. 4.1.1) und der etablierten *BK Klon 3A* Zelllinie wurde versucht, eine Suspensionszelle zu generieren. Die dazu verwendeten Kultivierungssysteme, Inokulationsdichten und zusätzlich verwendete Supplemente sind in Tabelle 4-2 aufgeführt. Pluronic F68 wurde zur Protektion vor hydrodynamischer Beanspruchung eingesetzt. Es wurden sowohl gerührte, als auch geschüttelte Kultivierungssysteme eingesetzt.

In nahezu allen Fällen waren kurzfristig lebende Aggregate sichtbar. Insbesondere bei Inokulation mit hohen Zelldichten waren große Zellaggregate vorhanden. Nach 24 – 36 h sank die Vitalität in allen Fällen unter 30% und es war kein Wachstum feststellbar. Nach 48 bis 72 h war die Vitalität in allen Fällen unter 10 % gesunken. Eine Suspensionszelle konnte somit nicht generiert werden.

Tabelle 4-2: Tabellarische Darstellung der eingesetzten Zellen, verwendeten Kultivierungssysteme, Inokulationsdichten und zusätzlich verwendeten Supplemente.

	BK Klon 3A in C7PMF3.2294A	BK KL 3A V in C7PMF3.2295V	BK Klon 3A in SMIF® 8	BK Klon 3A in OptiPro® SFM
Zellen aus Überstand	+	+	+	+
Adhärente Zellen	+	+	+	+
Inokulationsdichte	2-6 e05/ml	2-6 e05/ml	2-6 e05/ml	2-6 e05/ml
Zusatz von Pluronic F68 (1 g/L)	-	+	+	+
Spinnerflasche mit:				
Pendelrührer (V=25 ml)	+	+	+	+
Kreuzbalkenrührer (V=50 ml)	+	+	+	+
6 – Well-Platten (bewegt)	+	-	+	+
Erlenmeyerkolben (V=70 ml)	+	+	+	+
Rollerflaschen (V=200 ml)	+	+	+	+

4.2 Raten der Zelllinie

4.2.1 Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate der Zelllinie

Die Sauerstoffverbrauchsrate wurde über eine Bilanzierung des zeitlichen Verlaufs der gelösten Sauerstoffkonzentration während der Fermentation bestimmt. Der pH-Wert blieb während dieser Zeit nahezu konstant (pH = 7,2 +/- 0,2). Die Sauerstoffverbrauchsrate für eine Zellzahl $X = 1 \text{ e}06 \text{ Zellen/ml}$ ergibt sich unter der Annahme von Luftsättigung ($c_L = 100\%$) entsprechen etwa $6,5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ aus der Änderung des pO_2 zu:

$$r_X = \frac{(pO_{2 \text{ Start}} - pO_{2 \text{ Ende}})[\%]}{100 \%} \cdot 6,5 \frac{\text{mg O}_2}{\text{L}} \frac{1}{t [\text{h}]} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Für die Phase des Zellwachstums wurden die Respirationsraten aus 6 Fermentationen bestimmt. Die aufgenommenen Parameter und die daraus berechnete Respirationsrate für eine Zellzahl $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$ ist in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 4-3: Bestimmung der Respirationsrate während der Vorkultur in 6 Fermentation. Die Respirationsrate r_X ist für $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$ angegeben.

Parameter	1	2	3	4	5	6
pO₂ Start [%]	100	75	90	55	80	70
pO₂ Ende [%]	84	60	73	34	57	51
t [min]	16	16	18	22,5	25	15
X [1 e06/ml]	1,1	0,8	1,2	1,05	1,1	1,3
Respirationsrate r_X [mgO₂/(Lh)]	3,55	4,06	3,07	3,47	3,59	3,80

Im Mittel ergab sich eine Respirationsrate von $r_X = 3,59 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$ für eine Zellkonzentration von $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$. Die Standardabweichung betrug $0,33 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$, woraus ein relativer Fehler von $\sim 9,3\%$ resultierte.

Um einen Vergleich des Sauerstoffverbrauchs zwischen uninfizierten und infizierten Zellen durchzuführen, wurde die Respirationsrate der infizierten Zellen bestimmt. Die Bestimmung wurde 15 – 36 h nach Infektion ($\text{MOI} = 1$) durchgeführt. Die Zellzahl X betrug zwischen 2 und $3 \text{ e}06/\text{ml}$. Die Angabe der berechneten Respirationsrate r_X bezieht sich auf $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$.

Tabelle 4-4: Bestimmung der Respirationsrate 15 - 36 h nach Infektion der Kultur. Die Respirationsrate des infizierten Systems r_X ist für $X=1 \text{ e}06/\text{ml}$ angegeben.

Parameter	1	2	3	4	5	6
pO₂ Start [%]	76	83	95	65	80	95
pO₂ Ende [%]	49	68	16	23	39	53
T [min]	10	5	30	20	15	15
X [1e 06/ml]	2,7	2,9	2,5	2,1	2,7	2,8
Respirationsrate r_X [mgO₂/(Lh)]	3,90	4,03	4,11	3,90	3,81	4,04

Im Mittel ergab sich eine Respirationsrate nach Infektion von $r_X = 3,97 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$ für eine Zellkonzentration $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$. Die Standardabweichung betrug $0,11 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$, woraus ein relativer Fehler von $\sim 2,9 \%$ resultierte.

Durch die Infektion des Virus steigt die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen r_X um etwa 10%. Dieser Wert liegt geringfügig über der bestimmten Standardabweichung der Verbrauchsrate nicht infizierter Zellen. Die Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate spielt für die Auslegung der Bioreaktoren bezüglich des notwendigen Stoffstroms G/V eine wesentliche Rolle.

4.2.2 Bestimmung der spezifischen Raten der Zelle im Bioreaktor

Aus den Fermentationsdaten wurden die spezifischen Verbrauchs-, Bildungsrate und die Wachstumsrate im Bioreaktor während der ersten Phase der Fermentation ermittelt. Die unmittelbar mit der Bestimmung der spezifischen Raten zusammenhängende Zellzahl wies eine Abweichung +/- 15% auf.

Während der Viruspropagationsphase waren die Raten auf Grund der erschwerten Bestimmung der Zellzahlen und der kaum möglichen Unterscheidung infizierter und uninfizierter Zellen nicht möglich. Für die Wachstumsrate μ_{\max} ist die während der Fermentationen im Durchschnitt maximal erreichte Änderung der Zellzahl bis zum zweiten Medienwechsel angegeben. Für die gesamte Dauer der Vorkultur ergab sich inklusive lag-Phase und stationärer Phase eine Wachstumsrate von $0,3 \text{ d}^{-1} \pm 27\%$, welche aber von untergeordneter Bedeutung ist. In Tabelle 4.5 sind die ermittelten Daten dargestellt

Tabelle 4-5: Ermittelte zellspezifische Raten der Kultur im Bioreaktor vor Infektion.

	μ_{\max} [d ⁻¹]	q_{Glucose} [mg/d]	q_{Lactat} [mg/d]	q_{Glutamin} [mg/d]	q_{Glutamat} [mg/d]	q_{Ammonium} [mM/d]
n	10	20	20	5	5	5
Mittelwert	0,60	7,5E-07	5,2E-07	2,0E-07	2,0E-08	1,2E-09
Standardabw.	0,09	2,1E-10	1,3E-10	3,6E-08	3,9E-09	2,0E-10
Rel. Fehler [%]	15	28,0	25,0	18,6	19,5	16,8

Die ermittelten Raten der Zellen zeigen zwischen der *BK KL 3A* und der neu generierten *BK KL 3A V* Zelle innerhalb der Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede.

4.2.3 Migration der Zellen und Testlauf im 50 L Bioreaktor

Ein Ablösen und erneutes Besiedeln der an die Microcarrier adhärennten Zellen auf neu hinzugegebene und unbewachsene Microcarrier war nicht nur für eine möglichst homogene Verteilung der Zellen auf den Microcarriern von Bedeutung, sondern spielte insbesondere bei der Zellexpansion in größere Maßstäbe eine wesentliche Rolle für die Prozessführung und die Effizienz des Verfahrens. Um die Zelle auf ihre sogenannte „Migrationsfähigkeit“ zu überprüfen, wurden Kultivierungsexperimente mit direkter Verdünnung in verschiedenen Stufen durchgeführt. Dazu wurde entweder im Reaktor selbst 1:2 bis 1:7 verdünnt oder größere Volumina mit einem Teil der Kultur inokuliert. Eine Sedimentation mit alternierendem Rühren der Microcarrier für 30 – 60 min erwies sich als vorteilhaft.

Exemplarisch ist eine direkte Zellexpansion aus einem aus der Vorkultur mit $X = 2 \cdot 10^5/\text{ml}$ inokulierten 3,5 L Bioreaktor in einen 10 L Bioreaktor und abschließend in einen 50 L Bioreaktor dargestellt. Im 50 L Pilotmaßstab wurde die Kultur wie im etablierten Prozess I nach Erreichen der stationären Phase infiziert ($\text{MOI} = 0,01$) und die Virusvermehrung bei einer $\text{CPE} > 90\%$ abgebrochen. Der erreichte Virustiter wurde ebenfalls zur Bewertung herangezogen. Abbildung 4-14 zeigt den für insgesamt drei Fermentationen im Batch Verfahren repräsentativen Verlauf der Zellzahl und des Virustiters nach Infektion in den verschiedenen Reaktoren.

Die direkte Zellexpansion hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Die im 50 L Maßstab durchgeführte Infektion zeigte nach „2 Passagen“ in verschieden großen Bioreaktoren keinen negativen Einfluss auf den Virustiter oder die Kinetik der Virusvermehrung. Der über TCID_{50} bestimmte Virustiter war absolut vergleichbar mit den nach Prozess I durchgeführten Fermentationen ohne direkte Zellexpansion. Gleichzeitig wurde die Fermentation im Pilotmaßstab getestet. Die Maßstabsvergrößerung hatte keinen Einfluss auf die Produktivität des Systems.

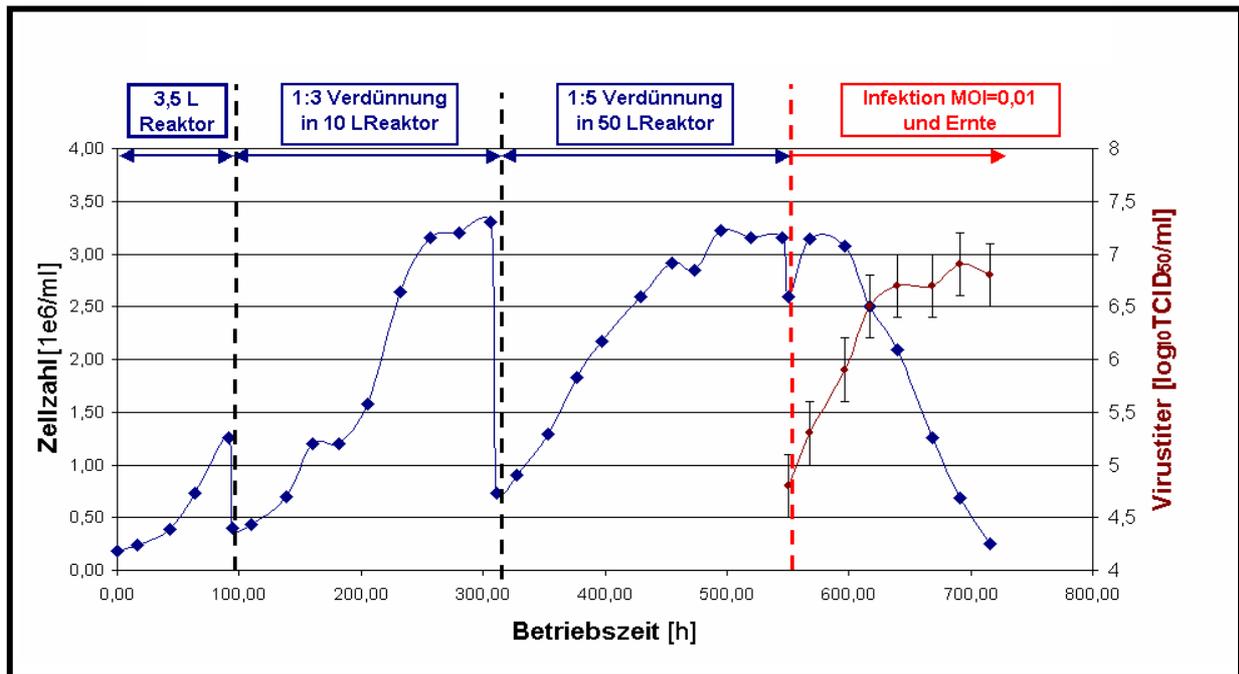


Abbildung 4-14: Repräsentative Darstellung der direkten Zellexpansion im Bioreaktor bis in den auf diese Weise getesteten Pilotmaßstab (Zellzahl ◆, Virustiter ●).

4.3 Analyse des etablierten Prozesses

4.3.1 Analyse der Fermentationsdaten

Um eine Optimierung des unter 1.2 beschriebenen biphasischen Batch-Prozess durchführen zu können, musste dieser mit besonderem Augenmerk auf die Phase der Virusvermehrung analysiert werden. In der Vorkultur wurden Medienwechsel bei einer Glukosekonzentration kleiner 0,2 g/L durchgeführt. Limitationen während der Zellvermehrung konnten so umgangen und ausgeschlossen werden.

Während der Virusvermehrung wurde kein Medienwechsel durchgeführt. Die Analyse der In-Prozess-Kontrollen (IPK) nach Infektion zeigten mögliche Limitationen während der Virusvermehrung. Abbildung 4-15 zeigt einen repräsentativen Verlauf einer Fermentation nach Prozess I. Dargestellt sind die Lebendzellzahl, die Glukosekonzentration, die Laktatkonzentration und der Virustiter ($\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$).

In den durchgeführten und analysierten Läufen war die Glukose während der Vorkultur bedingt durch die Medienwechsel nicht limitierend. Die Aminosäureanalytik zeigte ebenfalls keine limitierenden Konzentrationen. Die maximale Zellzahl lag im Mittel bei $X = 2,9 \cdot 10^6/\text{ml}$ $\pm 25\%$.

Nach der Infektion mit *PPVO NZ-2* zeigten die Zellen kurzzeitig Wachstum, bevor sie dann bedingt durch die Infektion lysiert wurden. Die Glukose war im Mittel nach etwa 40 –60 h verbraucht. Im Anschluss begannen die Zellen das gebildete Laktat zu verstoffwechseln. Zu diesem Zeitpunkt waren durchschnittlich lediglich 20 - 40 % der Zellen lysiert. Der ermittelte Virustiter stieg nicht mehr und zeigte ein Plateau. Die durchgeführte Aminosäureanalytik wies ebenfalls einen Verbrauch einiger nicht essentieller Aminosäuren im selben Zeitfenster auf. Abbildung 4-16 zeigt die als kritisch bewerteten Aminosäuren, sowie Ammonium und Harnstoff und deren zeitlichen Konzentrationsverlauf nach Infektion.

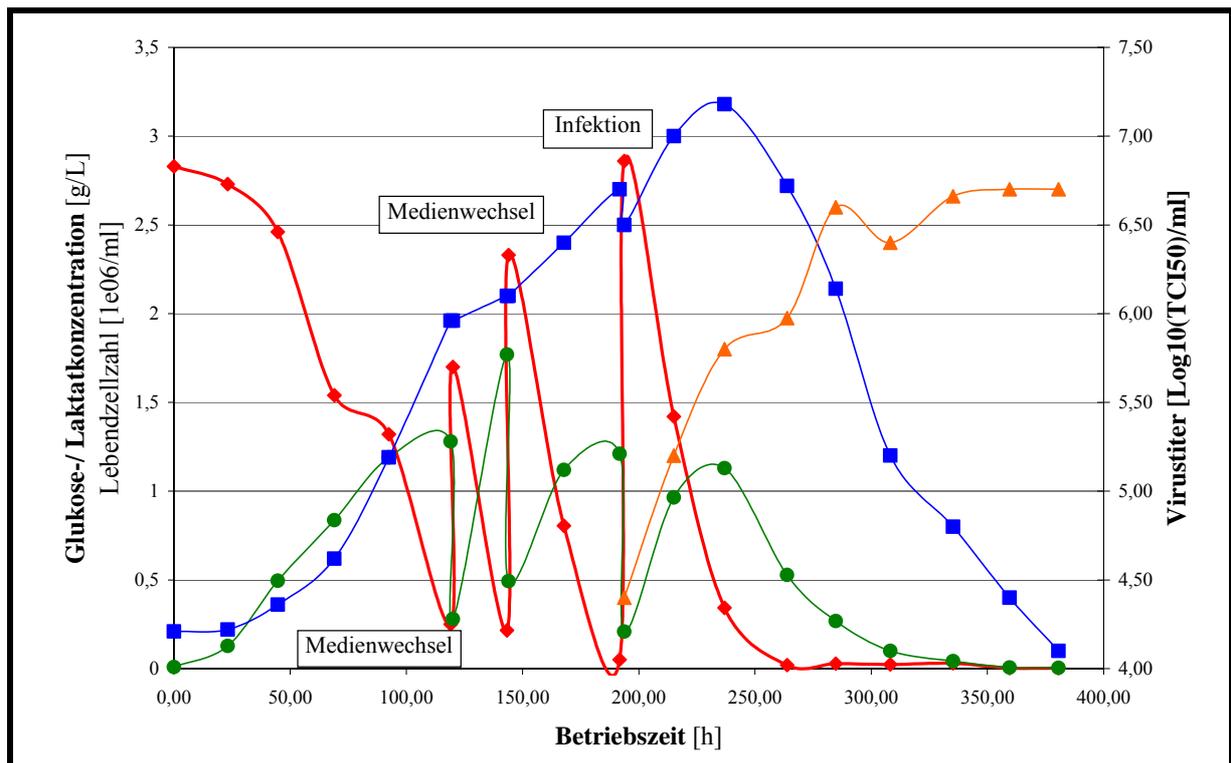


Abbildung 4-15: Repräsentativer Verlauf der Fermentation nach Prozess I. (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ (Verdünnungsfehler).

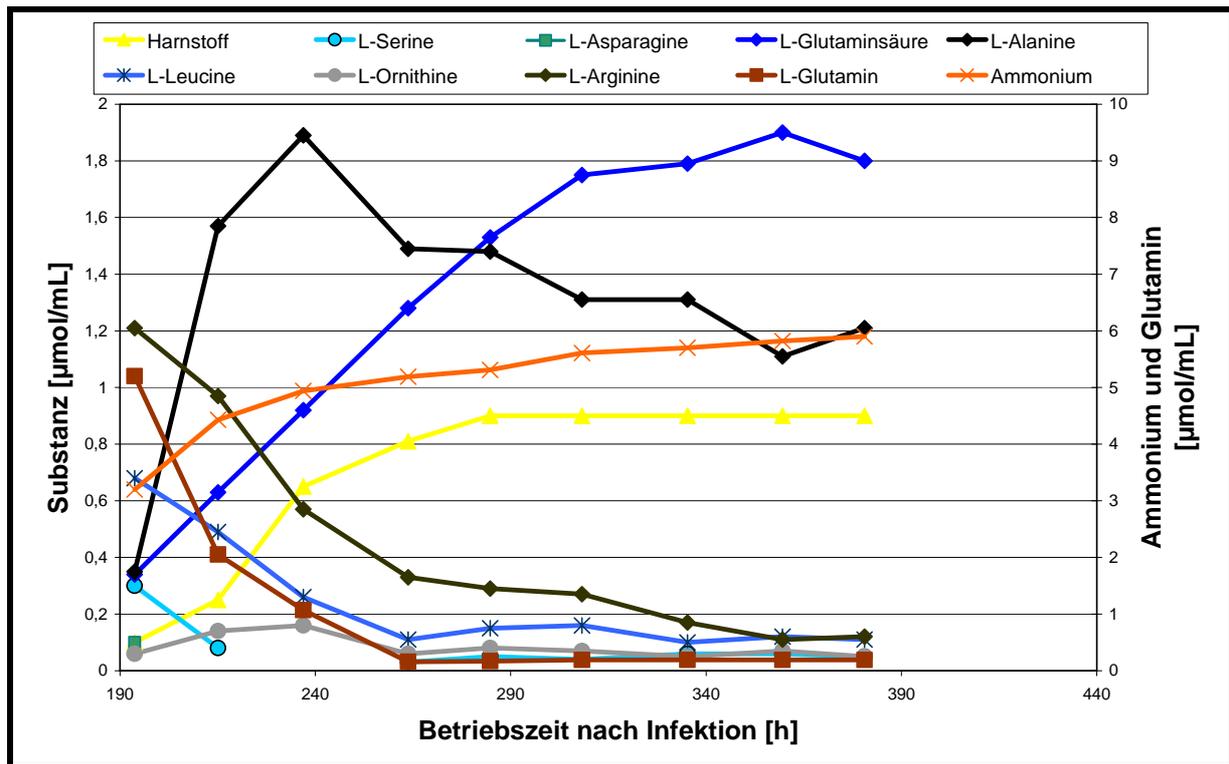


Abbildung 4-16: Repräsentativer Verlauf auffälliger Aminosäuren, sowie Ammonium und Harnstoff nach Infektion im Prozess I. Die Glukose war nach etwa 48 h verbraucht (siehe Abb. 4-15)

Aus dem Vergleich der Daten war zu folgern, dass sich die Glukose repräsentativ als Marker für die anderen kritischen Medienbestandteile, wie insbesondere Glutamin, verwenden lässt. Die starken Zunahmen von Alanin und L-Glutaminsäure sind als nicht kritisch zu bewerten. Die Auswirkungen der Bildung von Ammonium und dem vermutlich aus dem Abbau von Ammonium resultierenden Harnstoff sind nicht bekannt. Eine Bestimmung inhibitorischer Konzentrationen war nur schwer möglich.

Um Limitationen zu umgehen, müssen der Kultur Glukose und Aminosäuren zugegeben werden. Dies kann über eine „Fütterung“ eines Aminosäuregemisches und von Glukose im sogenannten Fed-Batch Verfahren erfolgen. Weitere Maßnahmen wie eine Erniedrigung der Zellzahl oder die Abtrennung niedermolekularer Inhibitoren über die Dialyse wurden ebenfalls getestet. Deren Umsetzung und Resultate sind in Kapitel 4.5 dargestellt.

4.4 Ergebnisse der mathematischen Modellierung des Prozesses

4.4.1 Phase I: Generierung von Biomasse

Zur Simulation des in Kapitel 2 erstellten Modells, mussten zunächst Parameter aus den Fermentationsdaten abgeschätzt oder über Transformation bestimmt werden (nicht dargestellt). Im Anschluss wurden diese, wie bereits beschrieben nach dem „Nelder-Mead“ Simplex Algorithmus optimiert. Die Startparameter und die optimierten Parameter sind in folgender Tabelle dargestellt. Als charakteristisches Substrat wurde auf Grund der In-Prozess-Kontrollen die Glukose verwendet. Die Laktatkonzentration wurde vernachlässigt.

Tabelle 4-6: Modellparameter vor und nach Optimierung. Die Parameter wurden aus den Fermentationsdaten abgeschätzt. Die maximale Zellzahl X_{Max} und die Sterberate k_D wurden nicht optimiert.

Symbol	Bezeichnung	Dimension	Geschätzt	Optimiert
μ_{Max}	Max. Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$	0,014	0,027
k_S	Michaelis-Menten Konstante für Glukose	$[\text{g/L}]$	0,13	0,113
k_D	Natürliche Sterberate	$[\text{h}^{-1}]$	0,001	*
X_{Max}	Max. Zellzahl	$[\text{ml}^{-1}]$	3,5	*
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient	$[(\text{ml}^{-1})/(\text{g/L})]$	8 e05	6,2 e05

* nicht optimiert

Mit den optimierten Parametern wurde eine Simulation mit MatLab 6.5 durchgeführt. Um die Medienwechsel abbilden zu können, wurde eine Runge-Kutta Integration mit Abfrage der Glukosekonzentration modelliert. Bei einer Glukosekonzentration $< 0,2 \text{ g/L}$ wurde fiktiv ein Medienwechsel von 80% angenommen. Dadurch stieg die Glukosekonzentration um $2,4 \text{ g/L}$. Da in der Praxis ein Medienwechsel teilweise schon früher durchgeführt wurde, nicht immer 80% des Mediums ausgetauscht wurden und auch nachts kein Medienwechsel realisiert werden konnte, konnte die Glukosekonzentration nur sinnvoll bis zum ersten Medienwechsel korreliert werden.

In der folgenden Abbildung werden die experimentell ermittelten Daten mit der Simulation des erstellten Modells verglichen.

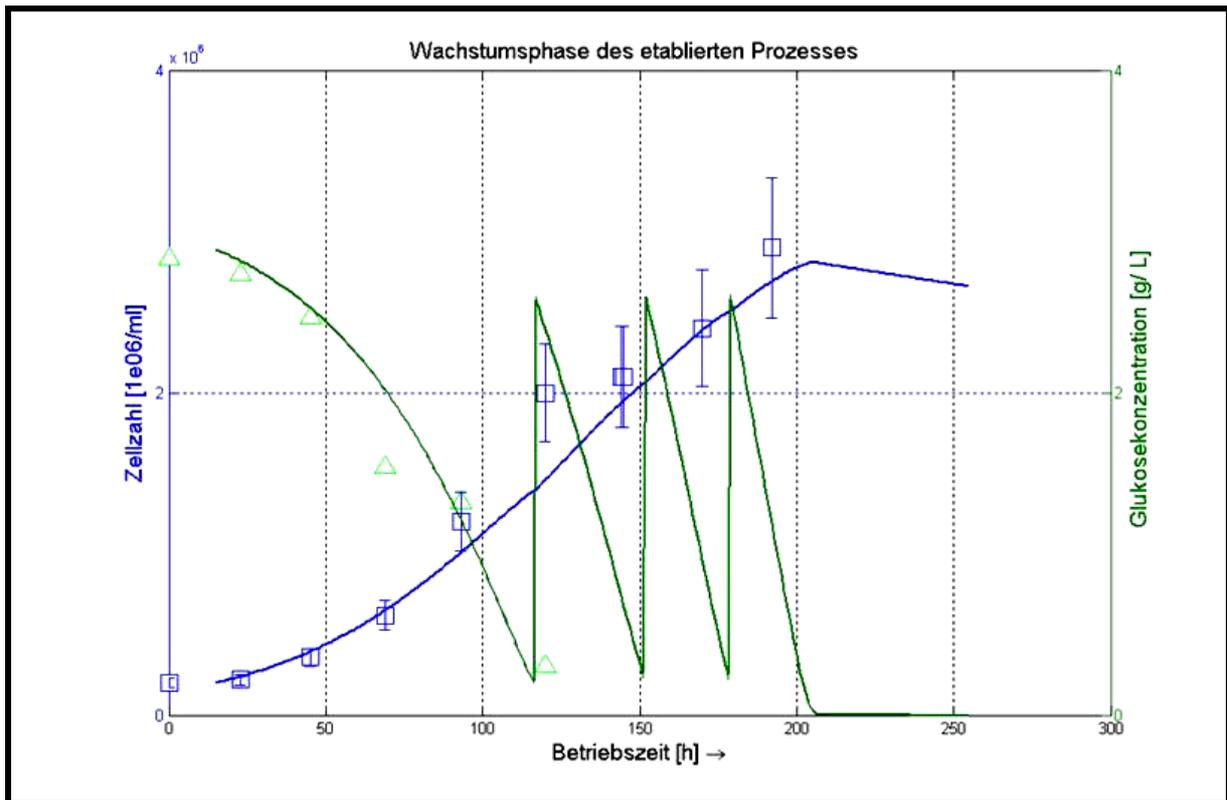


Abbildung 4-17: Vergleich der Simulation mit den experimentell ermittelten Fermentationsdaten für den etablierten Microcarrierprozess. Die Simulation ist als Linie dargestellt (Experimentelle Daten: Glukose \triangle , Zellzahl \square). Die experimentellen Glukosedaten wurden nur bis zum ersten Medienwechsel dargestellt.

Das erstellte Modell wies unter Verwendung der optimierten Parameter eine zufriedenstellende Korrelation zu den experimentell ermittelten Daten bezüglich der Glukosekonzentration bis zum ersten Medienwechsel und Zellzahl auf. Die Abweichungen des Modells lagen in nahezu allen Fällen innerhalb der Standardabweichung der Zellzahlbestimmung von etwa $\pm 15\%$. In diesem Beispiel wurden insgesamt drei Medienwechsel durchgeführt. Die Anzahl der Medienwechsel konnte im Modell variiert werden und eine zeitliche Simulation des Medienwechsels war an Hand des Modells möglich. Eine Simulation für höhere Zellzahlen wurde ebenfalls durchgeführt und illustrierte ebenfalls eine gute Korrelation zu den experimentell ermittelten Daten (nicht dargestellt).

4.4.2 Phase II: Modellierung der Viruspropagation

Die Modellierung der Viruspropagation gestaltete sich schwierig, da in der Literatur keine der unter 2.1.3 beschriebenen Parameter beschrieben waren. Daher mussten diese aus den Fermentationsdaten abgeschätzt oder angenommen werden. Auf Grund der komplexen

Replikation des Virus im Cytoplasma, der hohen Anzahl viraler Proteine und der vermuteten Substratlimitation, wurde für die Virusvermehrung in den Zellen eine Annäherung der Limitationen über eine Monod - Kinetik durchgeführt. Nach Optimierung der abgeschätzten Parameter mussten diese dann teilweise nochmals von Hand angepasst werden.

Tabelle 4-7: Für die Phase der Virusvermehrung ermittelte Parameter.

Symbol	Bezeichnung	Dimension	Geschätzt	Optimiert	Manuelle Anpassung
k_{VI}	Spez. Infektionsrate	$[ml\ h^{-1}]$	0,0022	0,0017	0,001
k_{VA}	Spez. Anhaftungsrate	$[ml\ h^{-1}]$	0,006	0,56	0,006
μ_V	Spez. Produktionsrate des Virus in Zellen	$[h^{-1}]$	10	9,5	10
k_{CDV}	Sterberate der Zellen durch Virus	$[h^{-1}]$	0,01	0,012	0,0085
k_{CDV}	Sterberate der Zellen durch Virus	$[h^{-1}]$	0,01	0,012	0,012
k_{DV}	Abbaurrate des Virus	$[h^{-1}]$	0,002	0,0022	*
K_{MV}	Michaelis-Menten Konstante zur Virusvermehrung	$[g/L]$	0,0001	0,00011	*
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient für Zellwachstum	$[ml^{-1}/(g/L)]$	5.58 e05	5,61 e05	5,58 e05
$Y_{V/S}$	Ausbeutekoeffizient zur Bildung viraler Partikel	$[ml^{-1}/(g/L)]$	3.5 e08	3,7 e08	*

* Parameter nicht manuell angepasst

Die aus der Vorkultur generierten Parameter konnten für das Zellwachstum während der Virusvermehrung mit geringfügigen Anpassungen ebenfalls verwendet werden (Tabelle 4-6). Für die viralen Partikel wurde ein Ausbeutekoeffizient angenommen, so dass sich das verbrauchte Substrat aus dem Substrat für die Zellerhaltung und für die von den Zellen zur Virusvermehrung benötigten Energie zusammensetzt. Der Wert für die infektionsbedingte Sterberate der Zellen wurde in zwei Bereiche unterteilt:

Der Wert vor Verbrauch der Glukose musste nach der Optimierung nochmals geringfügig auf $0,0085 \text{ h}^{-1}$ korrigiert werden. Nach Verbrauch des Substrates stieg die Sterberate bedingt durch die Limitation auf $0,012 \text{ h}^{-1}$. Eine Unterscheidung in infizierte Zellen und uninfizierte Zellen war auf Grund einer fehlenden Analytik nicht möglich, so dass in der Simulation nur zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden konnte. Dargestellt wurde nur die Lebendzellzahl. Mit den optimierten und teilweise korrigierten Parametern wurde für den etablierten Prozess I eine Simulation durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten bezüglich Zellwachstum, Glukoseverbrauch und Virusvermehrung zufriedenstellende Übereinstimmungen zwischen Simulation und experimentellen Daten. Für die Phase des Zellwachstums wurde eine Zeitverzögerung von 15 h und für die Virusvermehrung eine Zeitverzögerung von 5 h angenommen.

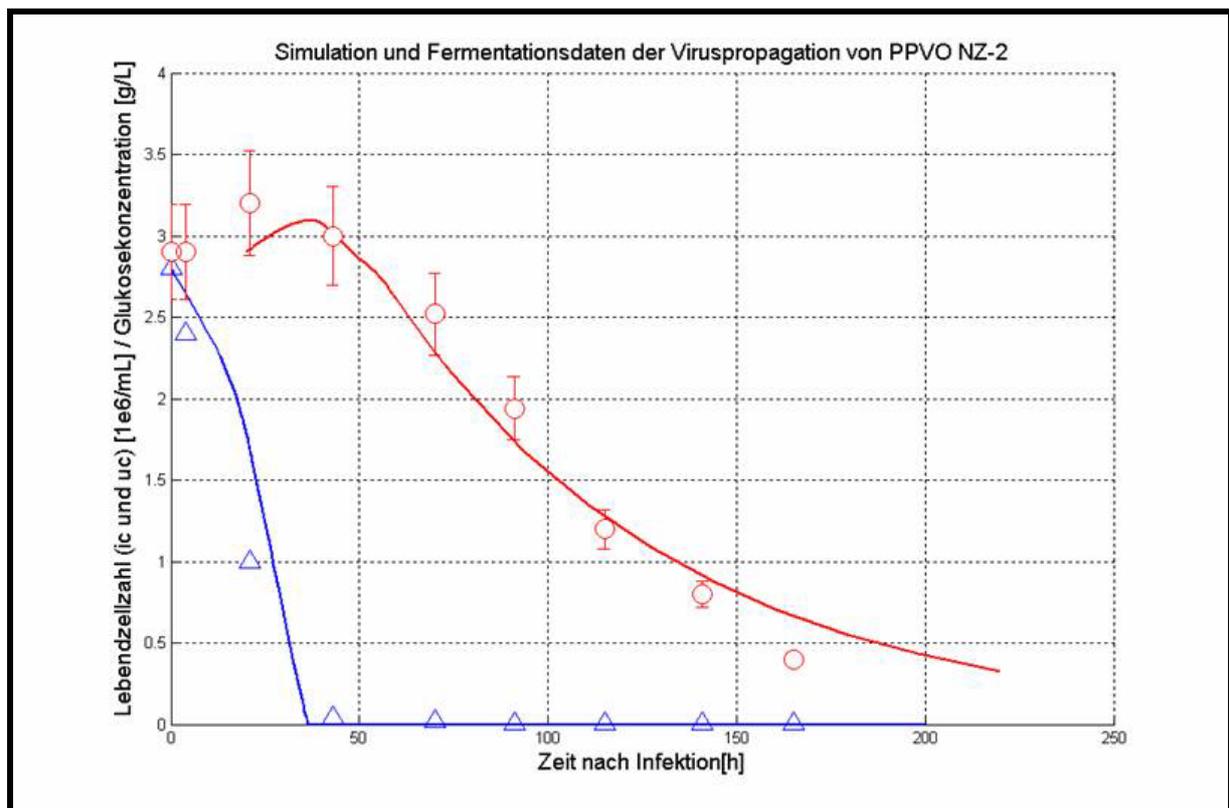


Abbildung 4-18: Verlauf der Simulation (blau Glukose, rot Zellzahl) im Vergleich zu den experimentellen Daten während der Virusvermehrung (Glukose Δ , Zellzahl \circ). Die ermittelte Abweichung von $\pm 15\%$ für die Zellzahlbestimmung ist ebenfalls dargestellt.

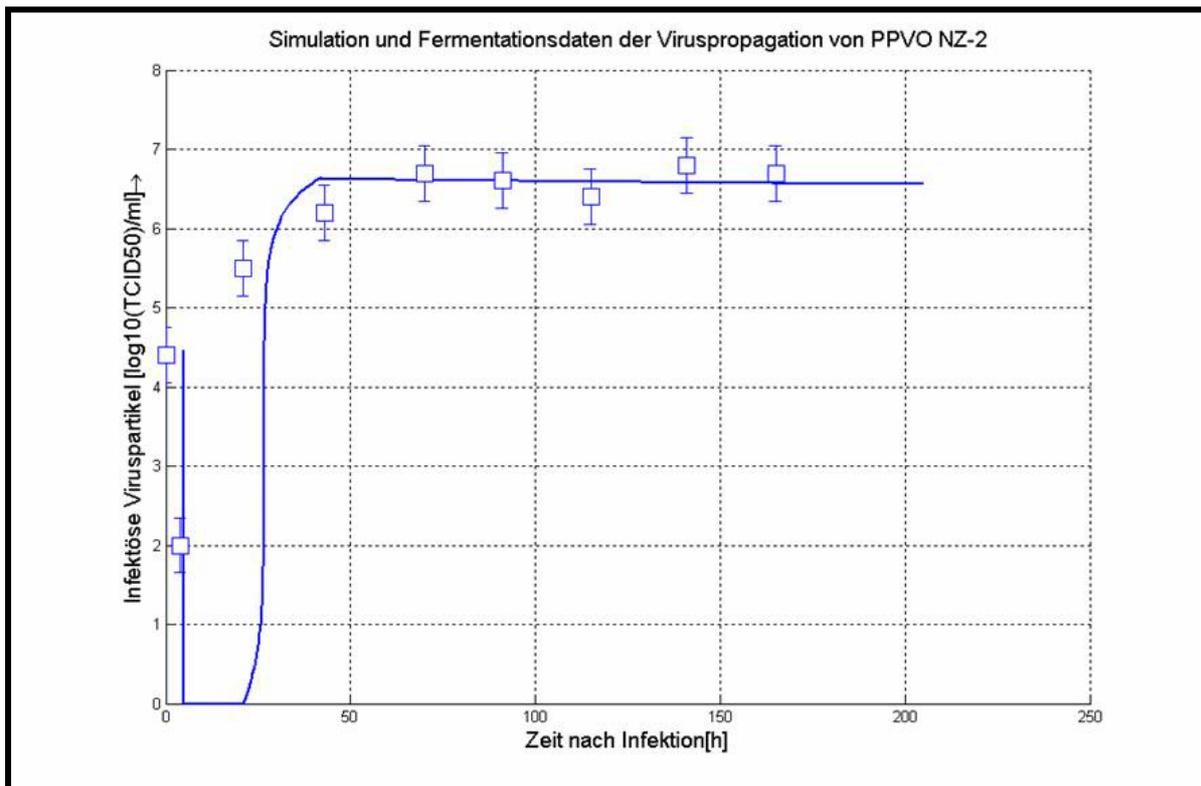


Abbildung 4-19: Verlauf der Viruspropagation nach Infektion. Die Simulation wurde mit den experimentell bestimmten Daten verglichen. Der Verdünnungsfehler der Bestimmungsmethode von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde eingezeichnet. Die Simulation ist als Linie dargestellt (Virustiter \square)

4.5 Virusvermehrung mit veränderten Fermentationsbedingungen

4.5.1 Batch Fermentation mit erniedrigter Zellzahl

Eine Erniedrigung der Zellzahl wurde über eine Verringerung der Microcarrierkonzentration auf 1,3 g/L realisiert. Zur schnellen Einstellung eines unterstützenden Milieus betrug die Inokulationsdichte $X = 2 \cdot 10^5/\text{ml}$. Die Prozessbedingungen bezüglich Drehzahl, Leistungseintrag, pH und $p\text{O}_2$ wurden nicht verändert. Die MOI betrug 0,01. Abbildung 4-20 zeigt den Verlauf der Fermentation bei geringerer Microcarrierkonzentration.

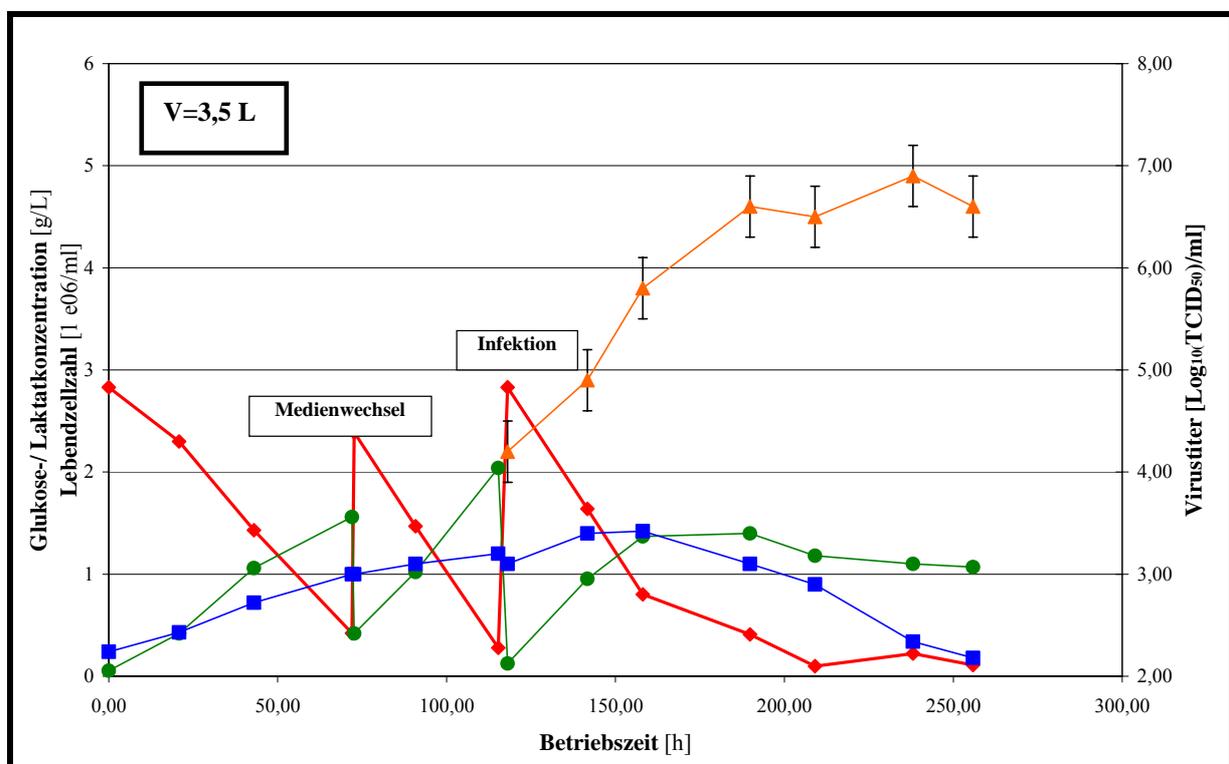


Abbildung 4-20: Repräsentativer Verlauf im Batch-Verfahren mit erniedrigter Zellzahl.

(Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$)

In der Vorkultur wurden Limitationen durch Medienwechsel verhindert. Die erreichte Zellzahl betrug etwa $X = 1,1 \cdot 10^6/\text{ml}$ zum Zeitpunkt der Infektion. Bedingt durch erkennbares weiteres Wachstum nach der Infektion mit einer MOI von 0,01 wurde eine maximale Zellzahl von $X = 1,4 \cdot 10^6/\text{ml}$. Die CPE $> 90\%$ war bereits nach etwa 250 h erreicht, was eine Verkürzung der Laufzeit bedeutete. Die Glukose war im Gegensatz zu Prozess I erst kurz vor Ende der Virusvermehrung verbraucht. Da Glukose als charakteristisches Substrat identifiziert wurde, ist eine Limitierung anderer Aminosäuren nicht zu erwarten.

Das akkumulierte Laktat wurde nicht verstoffwechselt. Obwohl keine Limitierung vorlag, konnte kein signifikanter Anstieg des Virustiters festgestellt werden. Ein signifikanter Fortschritt bzw. eine Produktivitätssteigerung gegenüber dem etablierten Prozess I ergibt sich somit nur bezüglich geringerer Carriermengen und Medienvolumina.

4.5.2 Batch Fermentation mit erhöhter Zellzahl

Eine Erhöhung der Zellzahl resultierte aus einer höheren Carrierkonzentration von 5 g/L, welche zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl auf $X = 6 \text{ e}06/\text{ml} \pm 20\%$ führte. Die Prozessbedingungen bezüglich pH und pO_2 wurden nicht verändert. Die Inokulationsdichte betrug entsprechend der Erhöhung der Carrierkonzentration etwa $X = 3\text{-}4 \text{ e}05/\text{ml}$. Der Leistungseintrag wurde von $2\text{-}4 \text{ W}/\text{m}^3$ auf etwa $6 \text{ W}/\text{m}^3$ erhöht. Im 10 L Fermenter entsprach dies einer Drehzahl von 40 U/min (+10 U/min) und im 3,5 L Reaktor von 55 U/min (+15 U/min). Ein repräsentativer Verlauf ist in Abbildung 4-21 dargestellt.

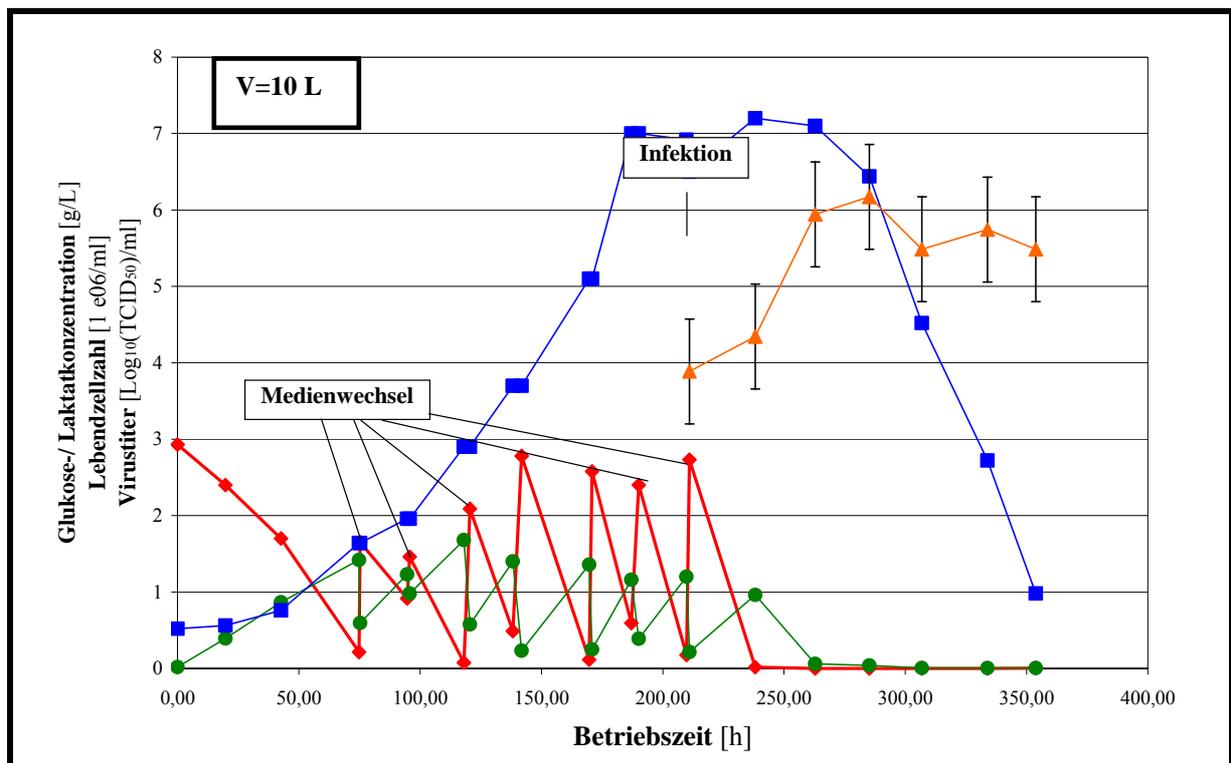


Abbildung 4-21: Repräsentativer Verlauf im Batch-Verfahren mit erhöhter Zellzahl.

(Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$)

Die Erhöhung der Zellzahl führte zu einem Anstieg der Medienwechsel während der ersten Phase der Fermentation. Die maximale Zellzahl betrug in diesem Fall $X = 7,2 \cdot 10^6/\text{ml}$, welche im Hochzelldichtebetrieb anzusiedeln ist. Die Erhöhung des Leistungseintrages auf $\sim 6 \text{ W}/\text{m}^3$ hatte keinen Einfluss auf die Kultur. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl war nicht zu empfehlen, da sonst mehr als ein Medienwechsel pro Tag während der Fermentationsphase vor Infektion notwendig und eine Umstellung auf eine kontinuierliche Prozessführung mit komplexer peripherer Einrichtung unumgänglich gewesen wäre. Nach der Infektion mit einer MOI von 0,01 war die Glukose bedingt durch die signifikant erhöhte Zellzahl deutlich schneller verbraucht (innerhalb von 24 - 36 h). Im Anschluss wurde das akkumulierte Laktat vollständig verstoffwechselt. Es ist anzunehmen, dass einige der als kritisch eingestuften Aminosäuren, insbesondere Glutamin, ebenfalls zu diesem Zeitpunkt verbraucht waren. Die verstärkte Substratlimitation spiegelte sich in einem signifikant niedrigeren Virustiter im Vergleich zu Prozess I wider ($\sim 1 \log_{10}$ Stufe). Die postulierte Limitation wurde im Fall erhöhter Zellzahlen verstärkt.

Um die analysierten Limitationen zu umgehen, wurden Änderungen der Prozessführung getestet, welche im Folgenden dargestellt sind.

4.5.3 Vermeidung von Substratlimitationen durch mehrfache Ernten nach Infektion

Eine einfache Möglichkeit der Umgehung von Limitationen nach der Infektion ohne Einrichtung einer komplexen Peripherie stellt das Verfahren der mehrfachen Ernte und anschließendem Auffüllen des Reaktors mit Frischmedium dar. Dieses Vorgehen war vergleichbar mit einem „Medienwechsel“ nach Infektion. Die erhöhte Carrierkonzentration von 5 g/L führte zu einer Anpassung des Leistungseintrags im 3,5 L Reaktor auf etwa $6 \text{ W}/\text{m}^3$ ($\sim 55 \text{ U}/\text{min}$). Der pH-Wert wurde unverändert bei 7,2 und der $p\text{O}_2$ bei 40% Luftsättigung geregelt. Die Fermentation zeigte den in Abbildung 4-22 dargestellten Verlauf.

Der Vorkulturverlauf zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den vorangegangenen Batch Verfahren mit erhöhter Carrierkonzentration. Bedingt durch die Erhöhung der Zellzahl, waren während der Vorkultur ebenfalls mehrfache Medienwechsel notwendig.

Nach der Infektion mit einer MOI von 0,01 stieg die Zellzahl geringfügig an. 24 - 36 h nach Infektion wurde die erste Ernte durchgeführt. Es wurde vermutet, dass der Großteil der Viren etwa 24 h nach Infektion intrazellulär vorlag.

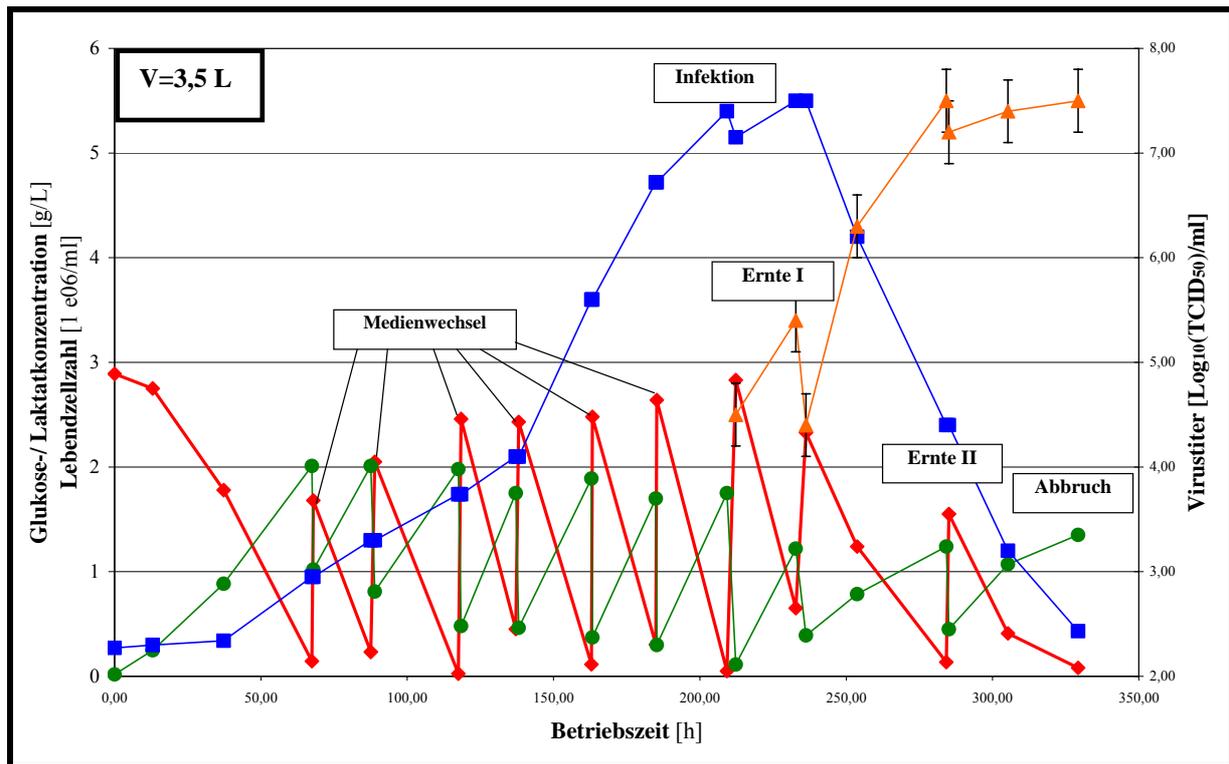


Abbildung 4-22: Verlauf der Fermentation mit mehrfacher Ernte nach Infektion und anschließendem Auffüllen des Reaktors mit Frischmedium. (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml)

Die Ernten wurden durch Sedimentation und anschließender 20 µm Filtration durchgeführt. Der Titer in der ersten Ernte (Ernte I), die etwa 80% des Reaktorvolumens entsprach, von 4,1 log₁₀(TCID₅₀)/ml nach Filtration entspricht dieser Theorie. Im Anschluss wurde der Reaktor auf das Arbeitsvolumen aufgefüllt, wodurch die Glukosekonzentration erhöht und die niedermolekularen Inhibitoren verdünnt wurden. Die Virusreplikation wurde fortgesetzt und der Virustiter stieg bis zur Ernte II auf einen Titer von 7,6 log₁₀(TCID₅₀)/ml nach Filtration. Ernte II entsprach in etwa 50% des Reaktorvolumens. Der Reaktor wurde wieder auf das Arbeitsvolumen aufgefüllt und die Virusvermehrung beim definierten Abbruchkriterium (CPE > 90%) durch die letzte Ernte III (Abbruch) beendet. Der Titer zum Zeitpunkt der dritten Ernte betrug 7,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml nach Filtration.

In der gesamten Ernte wurde ein Titer von 7,1 log₁₀(TCID₅₀)/ml ermittelt. Das Volumen entsprach in etwa dem 2,2-fachen Volumen im Vergleich zum Batch-Verfahren. Die gesamte Ausbeute konnte somit signifikant gesteigert werden. Die Theorie der Limitation konnte ebenfalls durch diese Ergebnisse bestätigt werden.

4.5.4 Fed-Batch

Im Fed-Batch-Verfahren wurden Substrate in Form von Konzentrat zugefüttert und die Experimente in verschiedenen Maßstäben bis in den Pilotmaßstab durchgeführt (n = 12 in verschiedenen Maßstäben). Die Microcarrierkonzentration betrug 5 g/L. Die Parameter pH, pO₂, Drehzahl und MOI wurden wie zuvor beschrieben geregelt beziehungsweise gewählt. Exemplarisch wird ein Lauf im 10 L Reaktor dargestellt, dessen zugefütterte Substanzen in den angegebenen Volumina je Fütterung in Tabelle 4-8 zusammengestellt sind.

Tabelle 4-8: Gefütterte Substanzen und Volumina während des Fed-Batch Verfahrens.

Substanz	Konzentration	Volumen pro Fütterung
Glukoselösung	400 mg/ml	20 ml
Glutamin-Lösung 100x	29,2 mg/ ml	5 ml
Non essential AA Mix 100x	100x	5 ml

Da sich während der Vorkulturführung keine Änderungen bezüglich Wachstumsverhalten zeigten, beschränken sich die folgenden Darstellung lediglich auf den Verlauf nach Infektion.

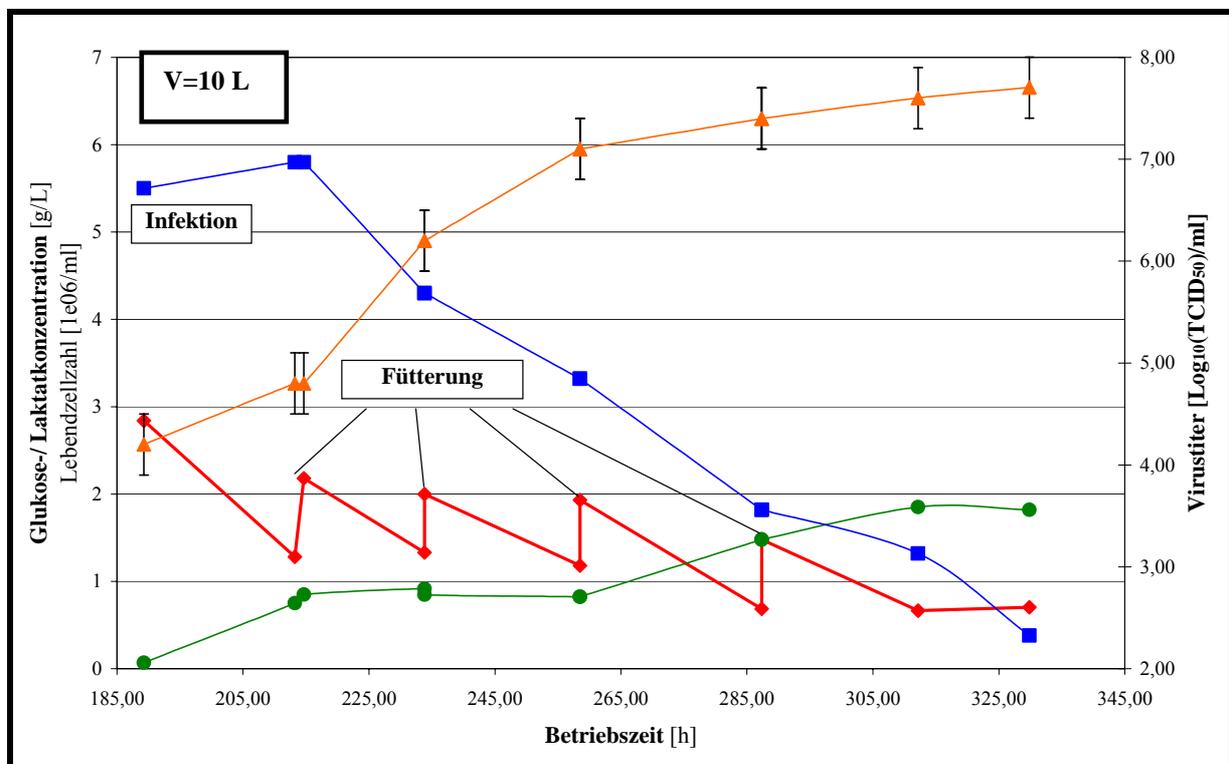


Abbildung 4-23: Verlauf des Fed-Batch Verfahrens nach Infektion im 10 L Reaktor.

(Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml)

Die Steigerung der Substratkonzentrationen war an Hand des Markers Glukose deutlich zu erkennen und somit konnten Limitationen verhindert werden. Neben der Glukosekonzentration waren die als kritisch identifizierten Aminosäuren ebenfalls nicht in limitierenden Konzentrationen zu erwarten. Die Konzentration niedermolekularer Inhibitoren, wie beispielsweise Laktat, lag in diesem Fall in vergleichbarer Größenordnung zum Verfahren nach Prozess I. Im dargestellten Fall konnte der Virustiter signifikant gesteigert werden ($7,7 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml.}$)

Eine Reproduktion dieses hohen Titers konnte jedoch nicht in allen Fällen erreicht werden. Durchgeführte Variationen in der Fütterungsrate und eine dynamische Zufütterung (stetige Zufütterung geringster Mengen über eine Pumpe) konnten die Schwankungen der Ergebnisse nicht verbessern. In den durchgeführten Fed-Batch Fermentationen schwankte der Titer zwischen $7,0$ und $7,8 \log_{10}(\text{TCID})_{50}/\text{ml.}$ Das Verfahren war somit nicht als robust zu bewerten.

4.5.5 Dialyse

Um die inhibitorische Wirkung niedermolekularer Stoffwechselprodukte, wie beispielsweise Ammonium oder Laktat, auszuschließen, wurde eine Dialysefermentation durchgeführt. Das verwendete externe Dialysem modul, Typ LD-02, Fa. Mycrodyn, Wuppertal, Deutschland, besaß eine molekulare Ausschlussgrenze („Cut-Off“) von 20 kDa. Die notwendige Abscheidung der Carrier wurde erfolgreich über ein einfaches Steigrohr im 10 L Reaktor $H/D = 1$ erreicht. Das Frischmedium wurde im Gegenstromverfahren über das Dialysem modul, in diesem Fall über die inneren Hohlfasern, geführt und anschließend verworfen. Der Volumenstrom des Frischmediums entsprach dem zweifachen Volumenstrom des aus dem Reaktor ausgetragenen Volumens.

Die Einstellung des benötigten Volumenstroms wurde qualitativ über die Glukosekonzentration bestimmt und über kalibrierte Pumpen der Fa. Wattson und Marlow eingestellt. Zu Beginn der Virusvermehrung betrug die Perfusionsrate etwa 75% des Reaktorvolumens. Abbildung 4-24 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage.

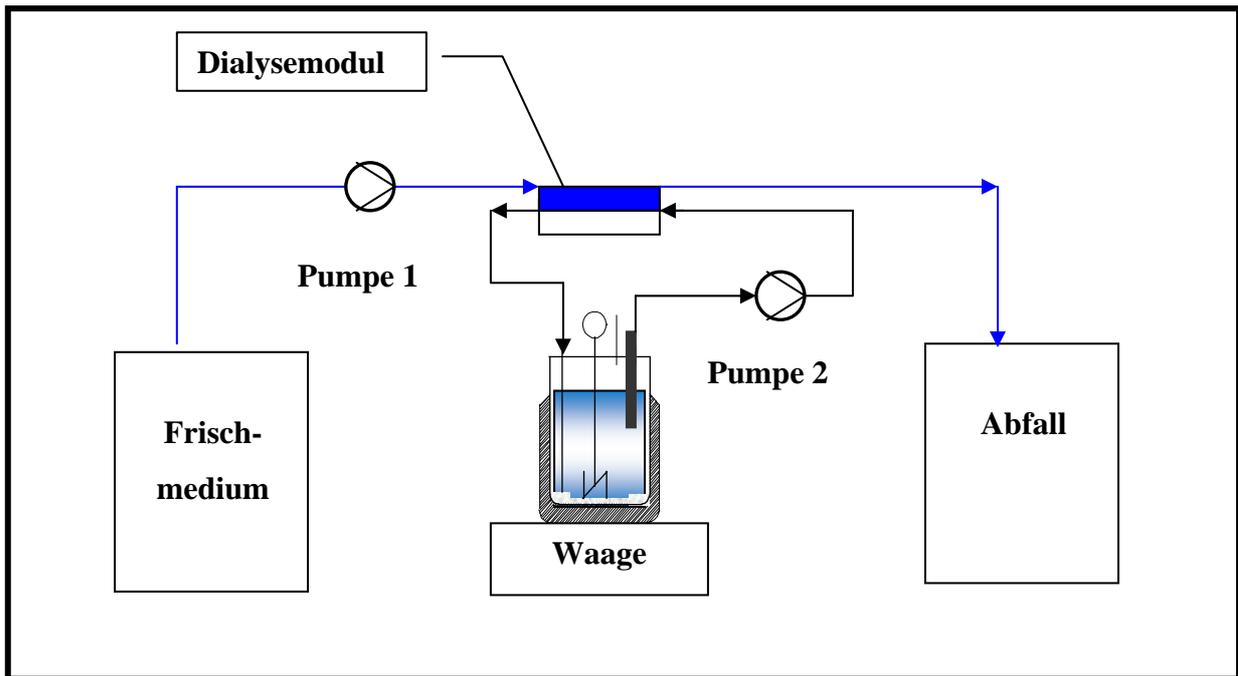


Abbildung 4-24: Schematischer Aufbau des Dialyseverfahrens.

Die Carrierkonzentration betrug wie in den anderen Fermentationen 5 g/L. Die Parameter Drehzahl, pH-Wert, pO_2 und MOI wurden nicht verändert. Die Vorkultur zeigte bezüglich Medienwechsel keine Unterschiede zu den anderen Verfahren mit erhöhter Zellzahl (nicht dargestellt). Der Verlauf der Dialysefermentation nach Infektion mit einer MOI von 0,01 ist in Abbildung 4-25 dargestellt.

Die maximal erreichte Zellzahl betrug $X = 4,8 \cdot 10^6/\text{ml}$ und ist somit geringer als die im Batch oder Fed-Batch Verfahren erreichten Zellzahlen mit gleicher Carrierkonzentrationen. Dies könnte durch einen geringen Austrag bewachsener Microcarrier bedingt sein. Nach Infektion mit einer MOI von 0,01 wurden die Zellen im Verlauf der Virusinfektion lysiert. Die Glukosekonzentration war in allen Fällen größer als 0,15 g/L. Die Laktatkonzentration lag unter 1,1 g/L. Der mit diesem Verfahren erreichte Titer von $7,8 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ war im Vergleich zu Prozess I signifikant erhöht.

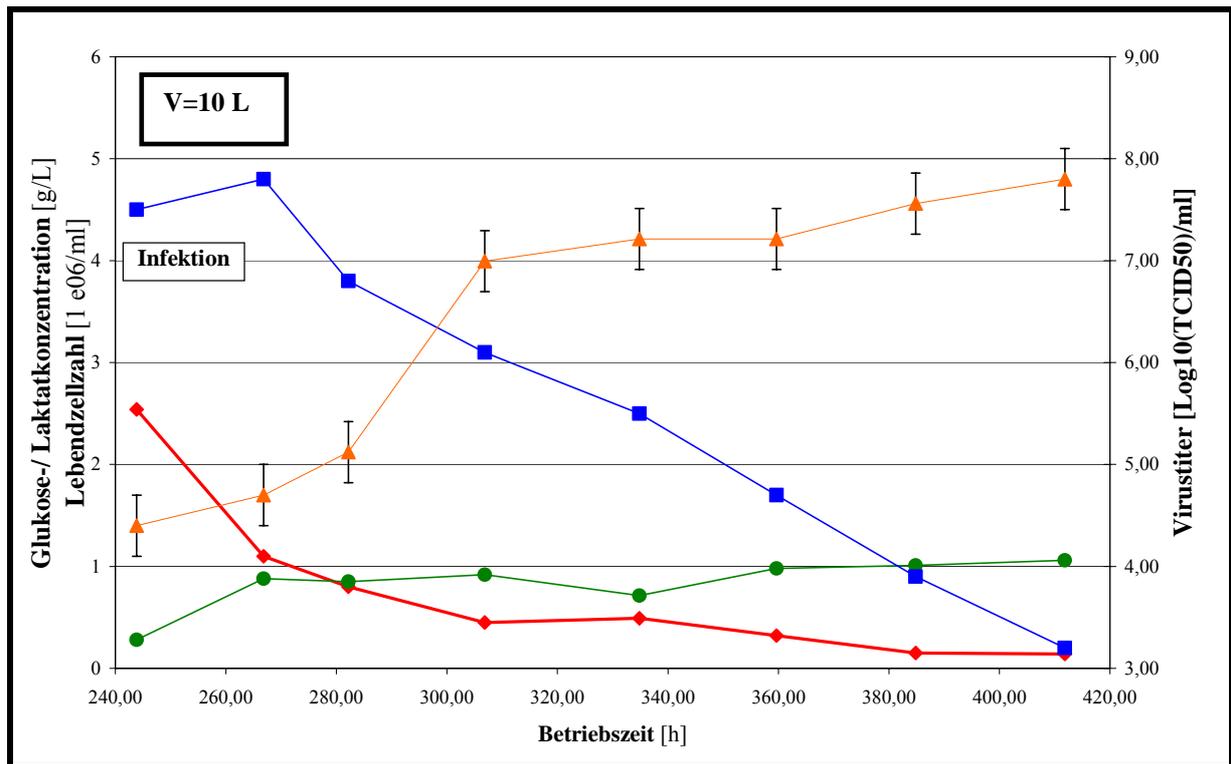


Abbildung 4-25: Verlauf der externen Dialysefermentation nach Infektion im 10 L Reaktor H/D = 1. (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml)

Eine mögliche Erklärung für den auf Anstieg erhöhten Virustiter könnte eine zum Eintrag von Substraten parallel stattfindende Abtrennung niedermolekularer Inhibitoren sein. Eine Inhibition im Fed-Batch Verfahren z. B. durch niedermolekulare Inhibitoren (resultierend in starken Schwankungen) kann an dieser Stelle vermutet werden. Eine Identifikation der Inhibitoren war jedoch nicht möglich. Eine signifikante Steigerung des Virustiters im Vergleich zu Prozess I wurde mit dem Dialyseverfahren erreicht.

Nachteilig war die äußerst komplexe Prozessführung der Dialyse. Sie erforderte einen hohen Aufwand an peripherer Einrichtung und eine für die Produktion essentielle robuste und einfache Prozessführung konnte der Dialyse in diesem Stadium der Entwicklung nicht attestiert werden. Bedingt durch gegen Ende der Fermentation auftretende geringe Volumenströme (etwa 80 ml/min) lagerten sich im Dialysem modul Zelltrümmer ab, die zu „Biofowling“ der Membran führten.

4.5.6 Etablierung einer neuen Prozessführung: „Volume-Expanded-Fed“ Batch

Bis dato wurde bei den verschiedenen Fermentationsbedingungen und Arten der Prozessführungen die Frage nach Limitationen und möglichen Inhibitionen aufgeworfen. Die Bestimmung des Einfluss toxischer Konzentrationen für niedermolekulare Inhibitoren gestaltet sich bei der Verwendung adhärenter Zelllinien auf Grund der bereits geschilderten Problematik schwierig (Zellzahlbestimmung während der Infektion, keine Methode zur Unterscheidung infizierter und nicht infizierter Zellen, spezifische Umstellung des Stoffwechsel infizierter Zellen, Nutzung von Analysemethoden, etc.).

Die geforderte ökonomisch effiziente Fermentationsstrategie musste als logische Konsequenz der zuvor geschilderten Experimente folgende Eigenschaften besitzen:

- Umgehung von Limitationen möglichst aller Medienkomponenten
- Vermeidung erhöhter Konzentrationen von Stoffwechselendprodukten
- Steigerung der Produktivität bei einfacher und robuster Prozessführung
- Einfache Skalierbarkeit

Eine aus diesen Anforderungen gefolgerte Prozessführung, die die genannten Kriterien in sich vereinigt, war das entwickelte „Volume-Expanded-Fed“ Batch (VEF-Batch) Verfahren.

Die geschilderten Vorgaben und Ziele konnten über sequentielle Verdünnung der infizierten Kultur in den nächsten Prozessmaßstab mit dem ursprünglichen Frischmedium erreicht werden. Es wurden alle Medienkomponenten in ausreichendem Maße zur Verfügung gestellt und gleichzeitig die Konzentration der Stoffwechselendprodukte durch Verdünnung signifikant erniedrigt. Eine Endverdünnung von 1:3 bis 1:4 stellte das Optimum dar. Das charakteristische Substrat war ebenfalls Glukose. Abbildung 4-26 zeigt den schematischen Verlauf des Verfahrens mit erhöhter Zellzahl (5 g/L Carrier) beginnend im 3,5 L Reaktor mit Expansion in einen 15 L Bioreaktor nach Infektion. In den durchgeführten Versuchen wurden dieselben Kultivierungsbedingungen wie in den zuvor geschilderten Verfahren gewählt.

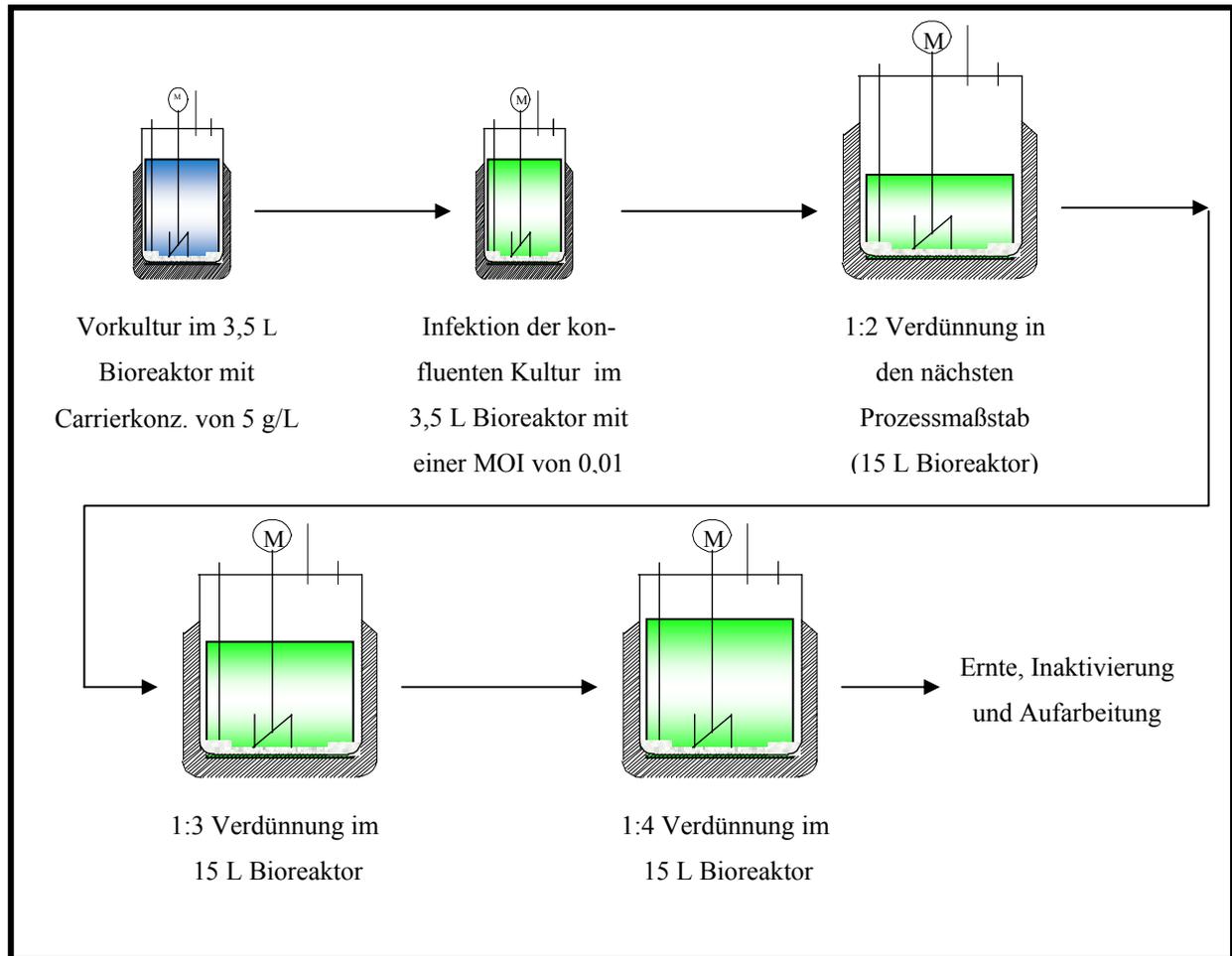


Abbildung 4-26: Schematische Darstellung des „Volume-Expanded-Fed“ Batch. Die angegebenen Verdünnungsstufen beziehen sich auf das Volumen der Vorkultur (M = Motor).

Nach der ersten Phase der Fermentation (Generierung von Biomasse) wurde die Infektion mit einer MOI von 0,01 im 3,5 L Reaktor durchgeführt. Nach 24 - 36 h betrug die Glukosekonzentration dann etwa 0,5 bis 0,8 g/L. Zu diesem Zeitpunkt fand der erste Verdünnungsschritt der Kultur in den nächsten Prozessmaßstab statt (~ 1:2, V = 7 L). Nach etwa 48 - 60 h erfolgte die nächste Verdünnung auf 10,5 L – 11 L Gesamtvolumen. Nach etwa 100 – 120 h der Virusvermehrung wurden cirka 2,5 bis 3,5 L Frischmedium supplementiert. Bezogen auf das Ausgangsvolumen entspricht dies einer Verdünnung von 1:3 bis 1:4. Abbildung 4-27 zeigt den Verlauf der Kultur nach Infektion.

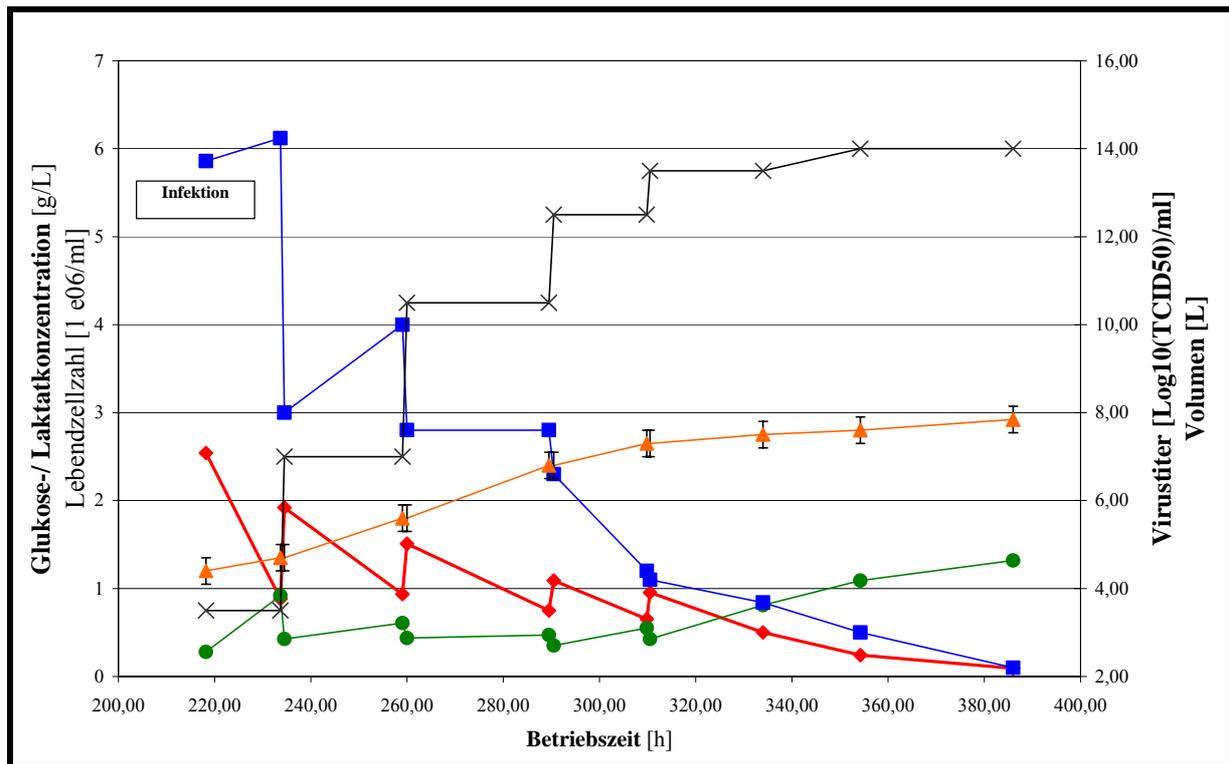


Abbildung 4-27: Repräsentativer Verlauf des "Volume-Expanded-Fed" Batch nach Infektion (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml, Volumen X).

Die Zellen zeigten wie in den anderen Verfahren nach der Infektion kurzfristig weiteres Wachstum. 24 h nach Infektion wurde die erste Verdünnung durchgeführt. Die Zellzahl sank bedingt durch die Verdünnung. Die Glukosekonzentration wurde erhöht. Sie war repräsentativ für die gesamte Konzentration aller Substrate. Die Laktatkonzentration, repräsentativ für die Stoffwechselprodukte, sank signifikant. Limitationen oder Inhibitionen waren während der gesamten Fermentation nicht zu erwarten.

Diese Betriebsweise resultierte trotz 4-facher Erhöhung des Produktionsvolumens in einem signifikant erhöhten Virustiter, der um mehr als 1 log₁₀ Stufe (bezogen auf Prozess I) auf einen Wert von 7,8 log₁₀(TCID)₅₀/ml gesteigert werden konnte. Die in diversen Maßstäben bis 50 L auf diese Weise durchgeführten Fermentationen (n = 14) erreichten im Durchschnitt einen Virustiter von 7,6 log₁₀(TCID)₅₀/ml. Dabei erwies sich das Verfahren als besonders robust und zeigte maximale Abweichungen von +/- 0,2 log₁₀(TCID)₅₀/ml.

Technisch wies sich das Verfahren durch einfache Handhabbarkeit aus. Die Verdünnung der Kulturbrühe ist vorteilhaft bei der Routineanwendung in der Produktion und benötigt keinen komplexen peripheren Aufbau.

4.5.7 Direkte Verdünnung als Variation des „Volume-Expanded-Fed“ Batch

Zur Überprüfung der Auswirkungen einer direkten 1:4 Verdünnung der Kultur nach Infektion, wurde eine wie in Kapitel 4.4.6 beschriebene Fermentation 24 h nach Infektion direkt auf das Endvolumen, in diesem Fall 14 L, verdünnt. Die Kultur zeigte bei sonst konstanten Parametern (MOI, Drehzahl, pH, pO₂, etc.) folgenden Verlauf nach Infektion.

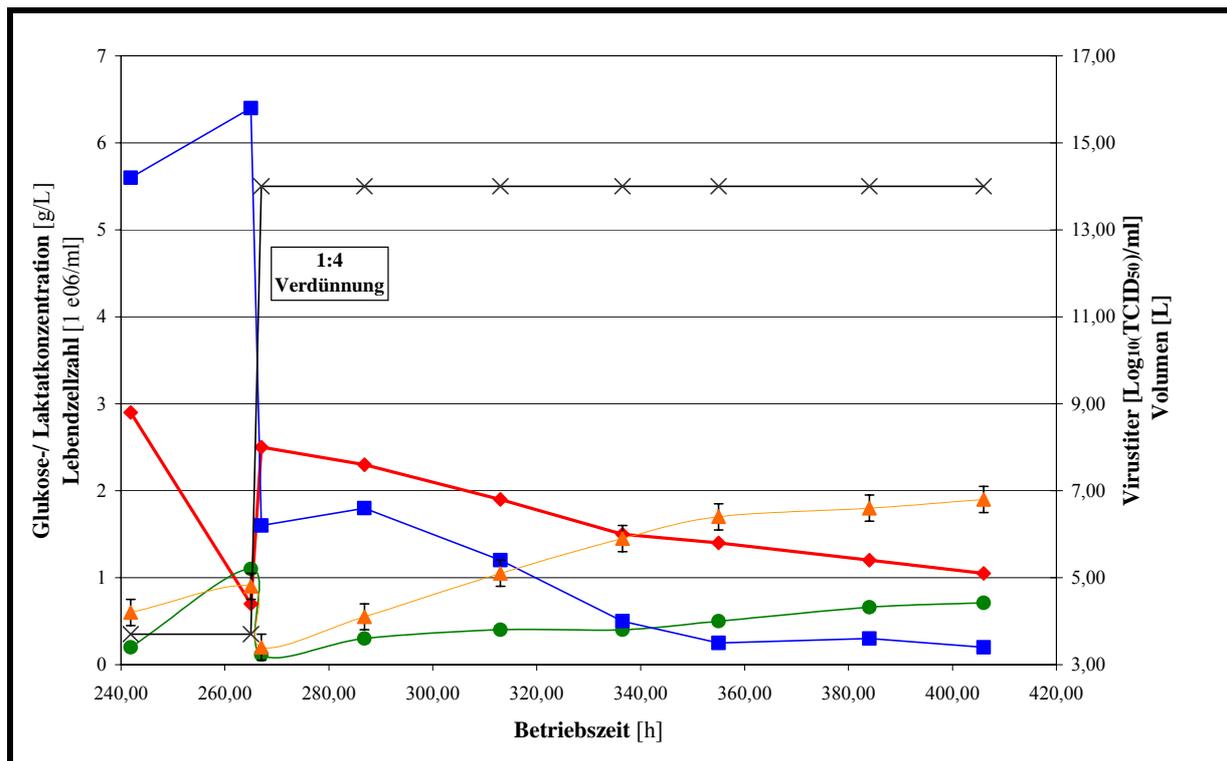


Abbildung 4-28: Variation des VEF-Batch durch direkte 1:4 Verdünnung nach Infektion (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml, Volumen X).

Etwa 24 h nach Infektion wurde eine 1:4 Verdünnung durchgeführt. Bedingt durch diese Verdünnung sank die Zellzahl auf $X \sim 1,6 \text{ e}06/\text{ml}$. Die Glukosekonzentration fiel während der Fermentation nicht unter 1 g/L.

Obwohl keine Limitation oder Inhibition vorlag, stieg der Virustiter nicht über einen Wert von $6,8 \text{ log}_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Der Lauf konnte mit der Batch Fermentation bei erniedrigter Zellzahl verglichen werden und zeigte vergleichbare Ergebnisse. Eine Steigerung im Vergleich zu Prozess I konnte zwar erzielt werden, jedoch zeigte der „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit sequentieller Erhöhung des Volumens deutlich bessere Ergebnisse.

4.5.8 Reduktion der MOI im „Volume-Expanded-Fed“ Batch

Ein weiterer Optimierungsansatz im neu entwickelten Verfahren, lag in der Erniedrigung der MOI. Dazu wurde das unter Kapitel 4.5.6 geschilderte Verfahren des „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit sequentieller Erhöhung des Volumens verwendet und die MOI auf 0.001 reduziert. Die Fermentation wurde mit den beschriebenen Parametern bezüglich pH, Drehzahl und pO₂ durchgeführt. Abbildung 4-29 zeigt den Verlauf der Fermentation nach Infektion.

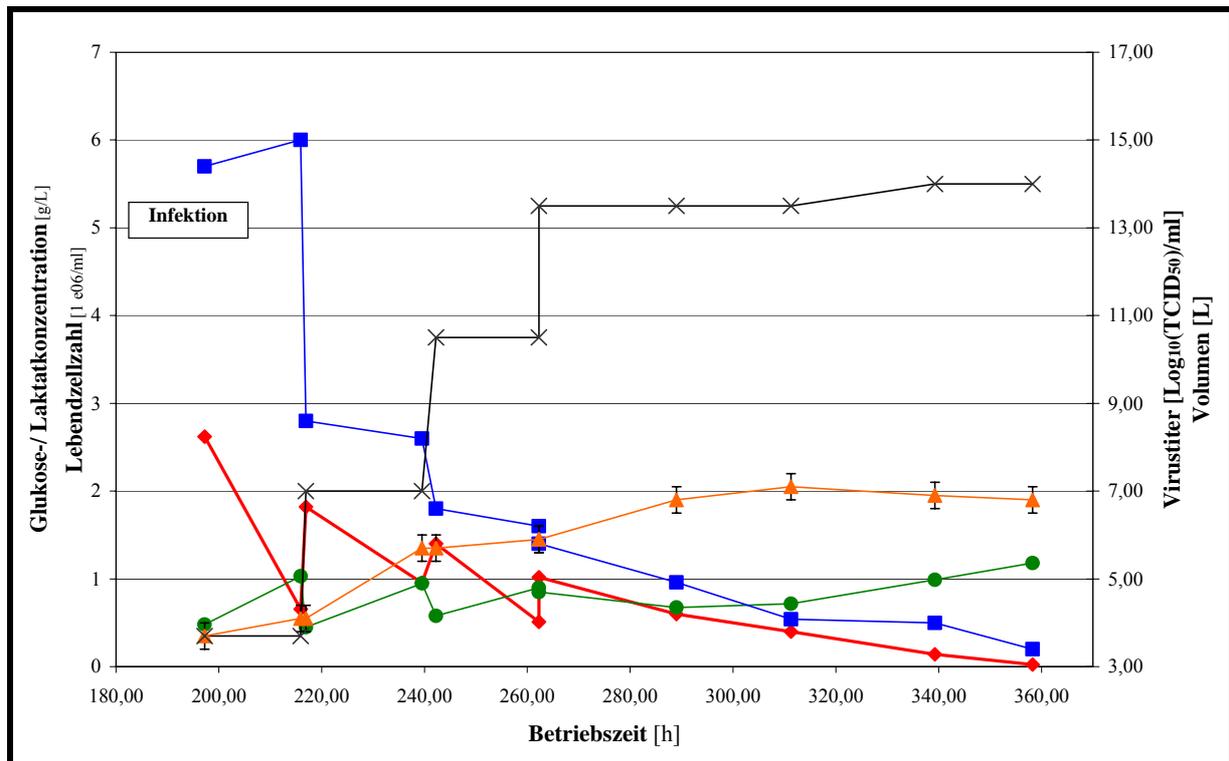


Abbildung 4-29: Verlauf der Virusvermehrung im „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit verringerter MOI = 0,001 (Zellzahl ■ , Glukose ◆ , Laktat ● , Virustiter ▲ +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml, Volumen X).

Prinzipiell zeigte sich bei der Reduktion der MOI ein vergleichbarer Verlauf der Fermentation. Der erreichte Virustiter lag mit etwa 6,9 +/- 0,3 log₁₀(TCID₅₀)/ml deutlich niedriger Vergleich zum „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit einer MOI von 0,01. Bezogen auf den biphasischen Batch Prozess hingegen stellt der erreichte Titer unter Berücksichtigung der Erhöhung des Produktionsvolumens um den Faktor vier eine deutliche Verbesserung bei Reduktion des einzusetzenden Volumens aus dem „Working Seed“ des Virus dar.

4.6 Vergleich der verschiedenen Verfahren

4.6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zunächst soll die folgende Tabelle einen zusammenfassenden Überblick der zuvor geschilderten Verfahren illustrieren.

Tabelle 4-9: Vergleich der durchgeführten Verfahren bezogen auf Prozess I.

Verfahren	Mittlerer Titer in der Ernte [log ₁₀ (TCID ₅₀)/ml]	Relatives Volumen der Ernte bezogen auf Batch-Volumen nach Prozess I	Rel. Produktivität im Vergleich zu Prozess I in vergleichbarer Betriebszeit [-]
Prozess I (n=16)	6,6 +/- 0,4	1	1
Prozess I mit niedriger Zellzahl (n=1)	6,8**	1	1
Prozess I mit erhöhter Zellzahl (n=12)	5,8 +/- 0,4	1	0,1
Mehrfache Ernte nach Infektion (n=1)	7,1**	2,5	8
Fed-Batch (n=12)	7,4 +/- 0,4*	1	7*
Dialyse (n=1)	7,7**	1	12
VEF-Batch (seq. 1:4) (n=14)	7,7 +/- 0,2	3-4	~ 40
VEF-Batch (dir. 1:4) (n=1)	6,6**	3-4	~ 4
VEF-Batch (seq. 1:4) mit reduzierter MOI (n=1)	6,9**	3-4	~ 8

* Signifikante Schwankungen des erreichten Titers.

** Keine Angabe des Verdünnungsfehlers der Bestimmungsmethode in der Tabelle

Wie aus Tabelle 4-9 deutlich zu erkennen ist, waren VEF-Batch und Dialyse die produktivsten Verfahren. Das mit Abstand robusteste Verfahren war dabei das neu entwickelte „Volume-Expanded-Fed“ Batch Verfahren.

Um einen vollständigen Vergleich der beiden produktivsten Verfahren Dialyse und VEF-Batch zum etablierten Prozess I und die Auswirkungen der Adaptation an serum- und proteinfreie Bedingungen zu bewerten, mussten ausgewählte Fermentationen bis zur Formulierung aufgearbeitet werden. Weitere Vergleichskriterien waren Wirtszellproteingehalt, DNA-Konzentration und biologische Aktivität im Tiermodell (HBV Modell in transgenen Mäusen).

4.6.2 DNA- und Wirtszellproteinanreicherung

Das Verfahren der Aufarbeitung wurde unter 3.4 detailliert beschrieben. In verschiedenen Stufen der Aufarbeitung wurden Proben entnommen und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Proben wurden unbehandelt, mit Benzonase (Abbau freier DNA) und mit Proteinase K behandelt gemessen. Exemplarisch zeigt Abbildung 4-30 die DNA-Anreicherung einer Fermentation mit der generierten *BK KL 3A V* Zelllinie im „Volume-Expanded-Fed“ Batch Verfahren.

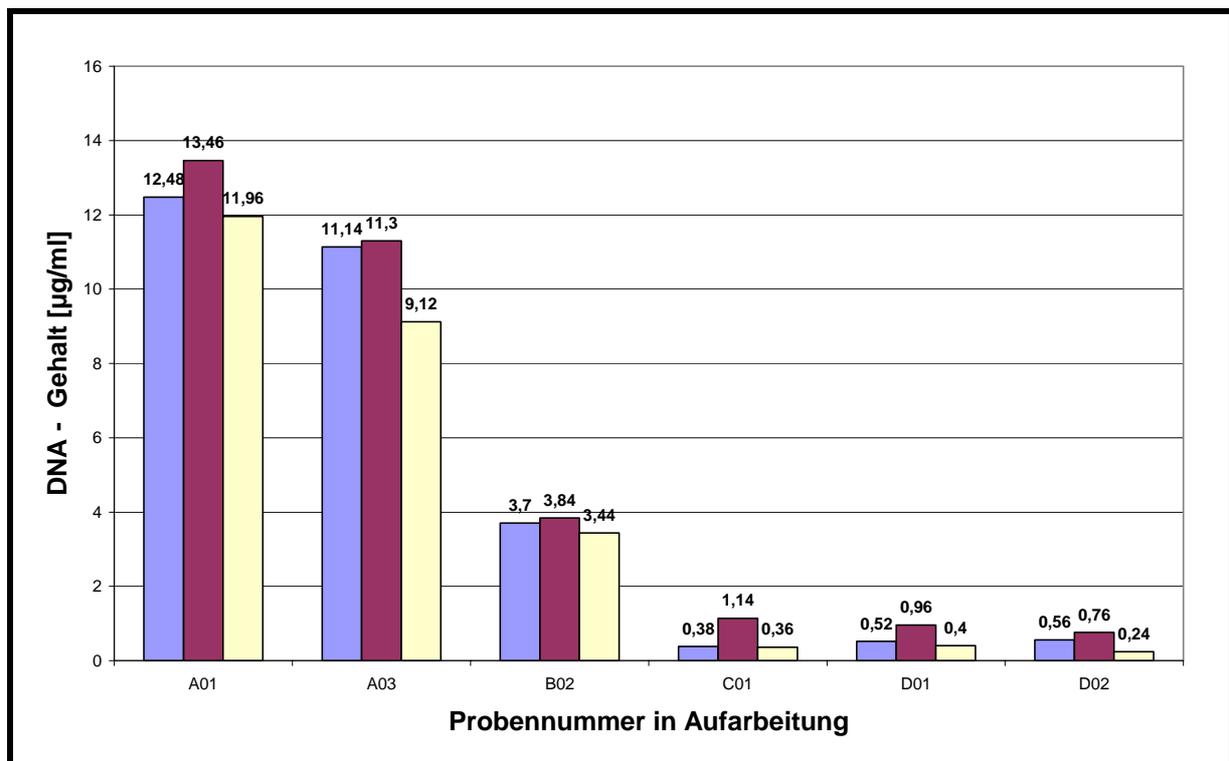


Abbildung 4-30: Exemplarische DNA-Anreicherung während der Aufarbeitung bis zur formulierten Suspension (D 02). A01: Nach Inaktivierung, A03: Nach Zentrifugation und 3/ 0,8 µm Filtration, B02: Nach zweiter Zentrifugation, C01: Nach Membranadsorber, D01: Nach Diafiltration, D02: Nach Tiefen- und Sterilfiltration (Unbehandelt ■, Proteinase K ■, Benzonase ■).

Auf die unwesentliche Abreicherung der DNA zwischen A01 (unmittelbar nach Inaktivierung) und A03 (nach Klärzentrifugation 1 und 3/0,8 µm Filtration) folgt eine signifikante Abreicherung durch den längeren zweiten Zentrifugationsschritt (resuspendierte Virussuspension B02). Eine weitere signifikante Abreicherung der DNA war nach Verwendung des Membranadsorbers in Stufe C01 festzustellen. In den weiteren Aufarbeitungsschritten bis hin zur Formulierung D02 wurde keine weitere DNA-Abreicherung festgestellt. Die Probe besitzt nur noch eine geringe Konzentration freier DNA (unbehandelte Probe im Vergleich zu Benzonase behandelte Probe). Der Anstieg der Proteinase K behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe war durch den relativ hohen DNA – Gehalt der viralen Partikel zu erklären. Die DNA-Abreicherung war erfolgreich.

Der Wirtszellproteingehalt (HCP-Gehalt) wurde ebenfalls in verschiedenen Stufen der Aufarbeitung quantifiziert. Exemplarisch ist der Verlauf der bereits bei der DNA-Gehaltsbestimmung dargestellten Fermentation nach dem „Volume-Expanded-Fed“ Batch Verfahren mit der adaptierten *BK KL 3A V* Zelllinie illustriert.

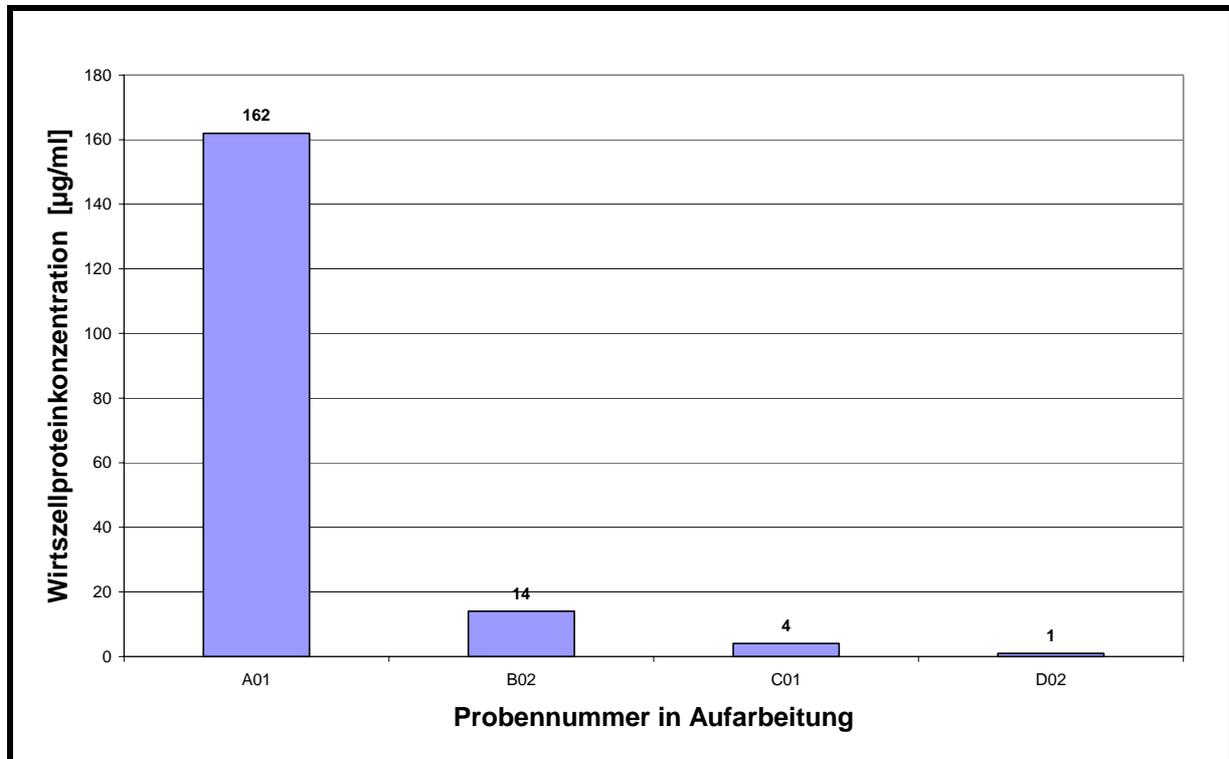


Abbildung 4-31: Exemplarische Abreicherung der Wirtszellproteine während der Aufarbeitung. A01: Nach Inaktivierung, B02: Nach zweiter Zentrifugation, C01: Nach Membranadsorber, D02: Nach Tiefen- und Sterilfiltration.

Abbildung 4-31 zeigt eine deutliche Abreicherung der Wirtszellproteine während der Aufarbeitung. Die Abreicherung war erfolgreich. In der formulierten Suspension betrug die Konzentration 1 µg/ ml (V~180 ml in Stufe D02).

Um die verschiedenen Verfahren miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, einen Vergleich auf Basis einer Wirkdosis von 1 e09 viraler Partikel pro Dosis vorzunehmen. Dazu wurde die Konzentration viraler Partikel in der Formulierung (D02) mittels quantitativer Elektronenmikroskopie bestimmt. Die Analyse wurde am „Zentrum für ultrastrukturelle Diagnostik“ (ZUD), Bielefeld, Deutschland, durchgeführt. Abbildung 4-32 zeigt exemplarisch eine elektronenmikroskopische Aufnahme der am ZUD durchgeführten Quantifizierung.

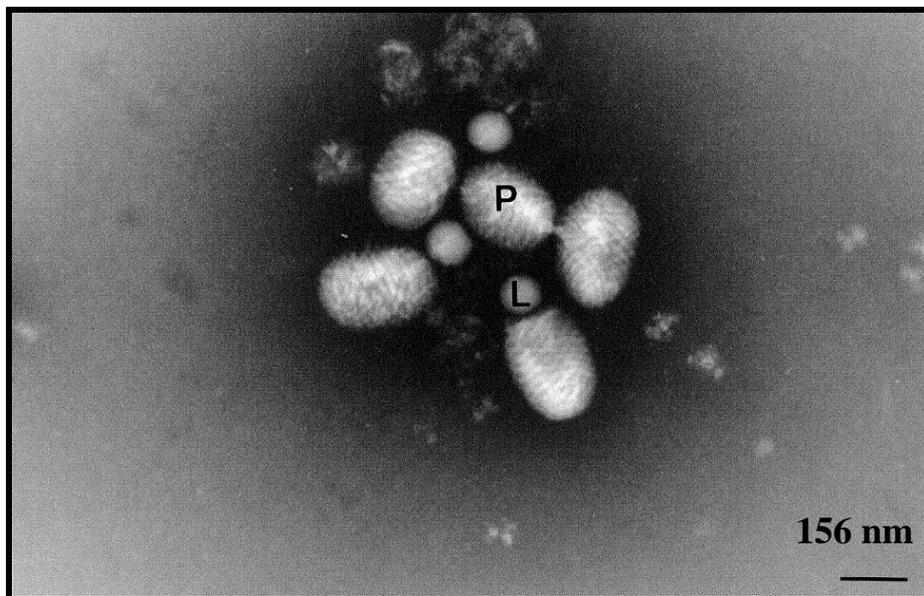


Abbildung 4-32: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach dem "negative staining" Verfahren. Die Quantifizierung wurde am ZUD durchgeführt. Das Viruspartikel ist mit P markiert und die verwendeten Latexbeads sind mit L gekennzeichnet. Die unter 1.1 beschriebene Oberflächenstruktur der Viruspartikel ist deutlich zu erkennen.

Die Ergebnisse der Zählung sind in Tabelle 4-10 dargestellt. Aus Kostengründen wurde diese Analyse nur für die deutlich verbesserten Verfahren Dialyse, VEF-Batch und den Prozess I mit der adaptierten *BK KL 3A V*-Zelllinie durchgeführt.

Tabelle 4-10: Darstellung der ermittelten Gesamtkonzentration viraler Partikel laut qEM.

Parameter	Prozess I	Dialyse	VEF – Batch
Konzentration viraler Partikel nach qEM [1 e010/ml]	0,134	1,77	2,42
Volumen der Formulierung [ml]	180	180	180
Anzahl der Dosen aus ~ 8 L aufgearbeitetem Fermentationsüberstand	242	3186	4320

Aus Tabelle 4-10 wird ebenfalls das Potential des VEF-Batch deutlich: Die Anzahl der Dosen ist im „Volume-Expanded-Fed“ Batch im Vergleich zu Prozess I etwa um den Faktor 20 erhöht. Anhand dieser Daten lassen sich die Wirtzellproteinkonzentration und der DNA-Gehalt pro Dosis der verschiedenen Verfahren vergleichen. Sie sind in der folgenden Darstellung abgebildet.

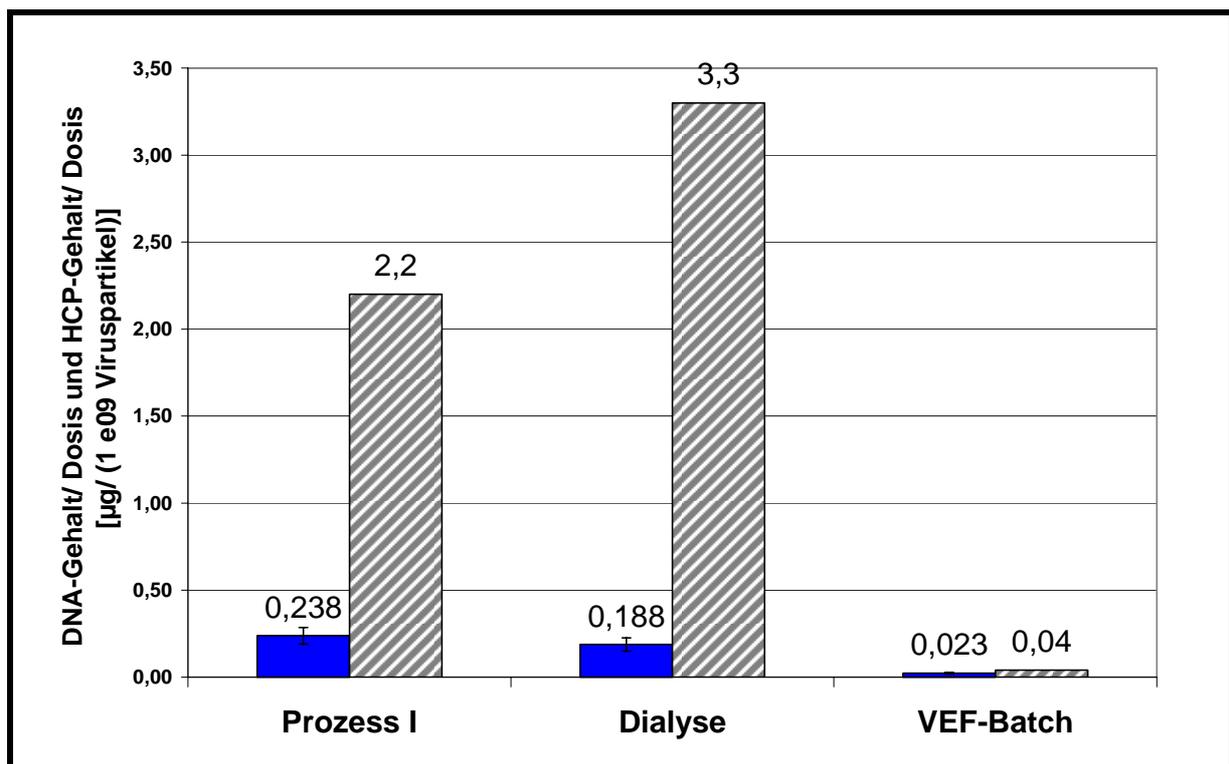


Abbildung 4-33: Vergleich der verschiedenen Verfahren bezüglich Wirtzellprotein- und DNA-Gehalt pro Dosis (VEF-Batch = „Volume-Expanded-Fed“ Batch, DNA- Gehalt ■ , Wirtzellproteine (HCP-Gehalt) ▨).

Die Gehalte pro Dosis von Dialyse und Prozess I lagen in derselben Größenordnung. Im VEF-Batch konnte eine deutliche Verringerung erreicht werden.

4.6.3 Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit im Tiermodell

Die therapeutische Wirksamkeit wurde im Labor Dr. Paulsen, Virologie, Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Deutschland durchgeführt. Es handelte sich um ein Hepatitis-B-Virus (HBV) Modell in transgenen Mäusen. Zunächst wurden die formulierten Dosen lyophilisiert, resuspendiert und anschließend appliziert. Als Kontrolle diente ein mit der *BK KL 3A* Zelle im Prozess I hergestelltes Virus. Die Ergebnisse der Verringerung des HBV Titers im Plasma der Maus sind in Abbildung 4-34 dargestellt und sind Maß für die therapeutische Wirksamkeit des formulierten Virusmaterials.

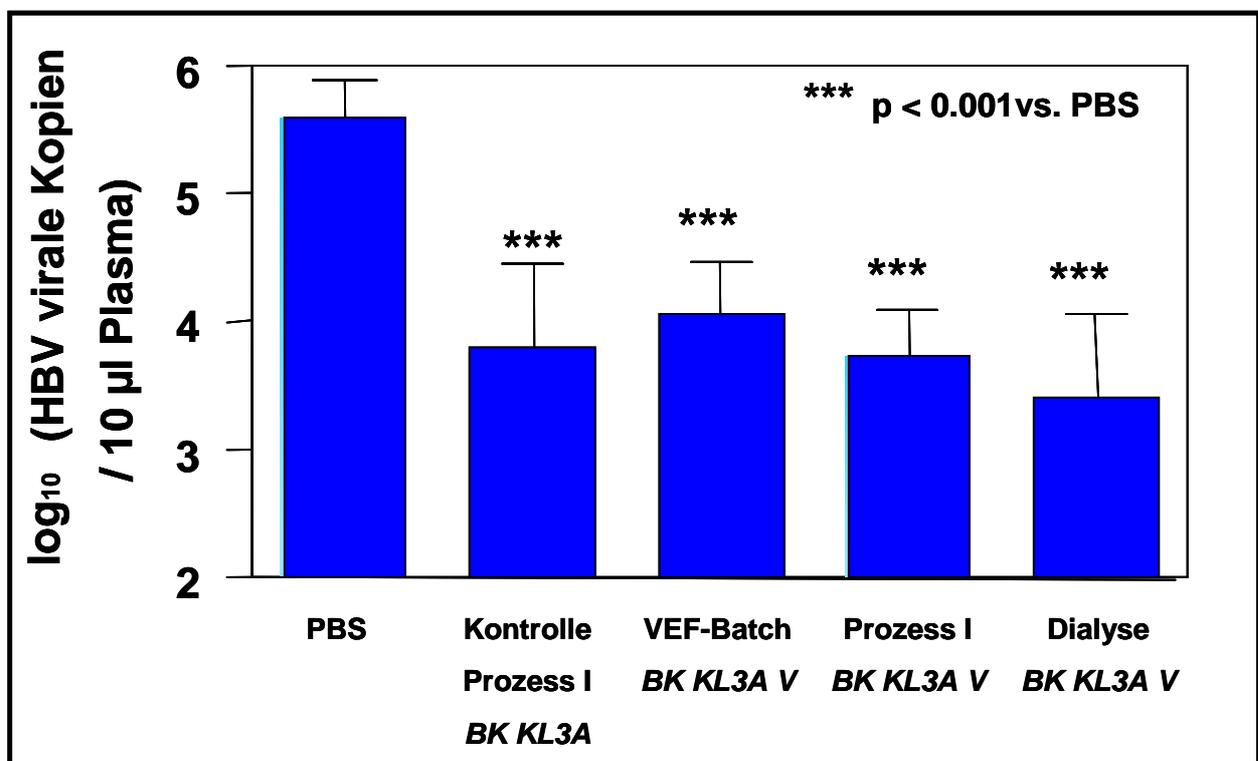


Abbildung 4-34: Vergleich der *in-vivo* Wirksamkeit von *PPVO* hergestellt mit der adaptierten Zelllinie und nach verschiedenen Verfahren. (transgenes HBV-Maus-Modell, Labor Dr. Paulsen, Virologie, Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Deutschland).

Zwischen den verschiedenen Verfahren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch die Adaptation der Zelllinie an Kultivierungsbedingungen frei von Materialien tierischen, humanen oder pflanzlichen Ursprungs (*BK KL 3A V* Zelllinie) hatte keinen Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit im Modell.

4.7 Physikalische Beschreibung der Reaktoren

4.7.1 Bestimmung der Leistungscharakteristik

Wie unter 3.6.2 beschrieben wurde über das Drehmoment der Leistungseintrag bestimmt und die Newtonzahl berechnet (2.4.1). Die Newtonzahl wurde zur Kontrolle nach einer von HENZLER entwickelten Korrelationsbeziehung (Gleichung 4-2) für Fermenter mit Statoren abgeschätzt und mit den Messergebnissen verglichen (Tabelle 4-11).

$$Ne = 4,356 \left(1 - \frac{d}{d_s}\right)^{0,195} \left(\frac{b}{d}\right)^{-0,167} \left(\frac{h}{d}\right)^{0,809} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Abbildung 4-35 zeigt die in den verschiedenen Maßstäben und Geometrien ermittelten Newtonzahlen über der Reynoldszahl. Um die Wahrung der geometrischen Ähnlichkeit zu verdeutlichen, ist die Newtonzahl in Abbildung 4-36 auf das Verhältnis Blatthöhe zu Rührerdurchmesser $(h/d)^{0,809}$ bezogen.

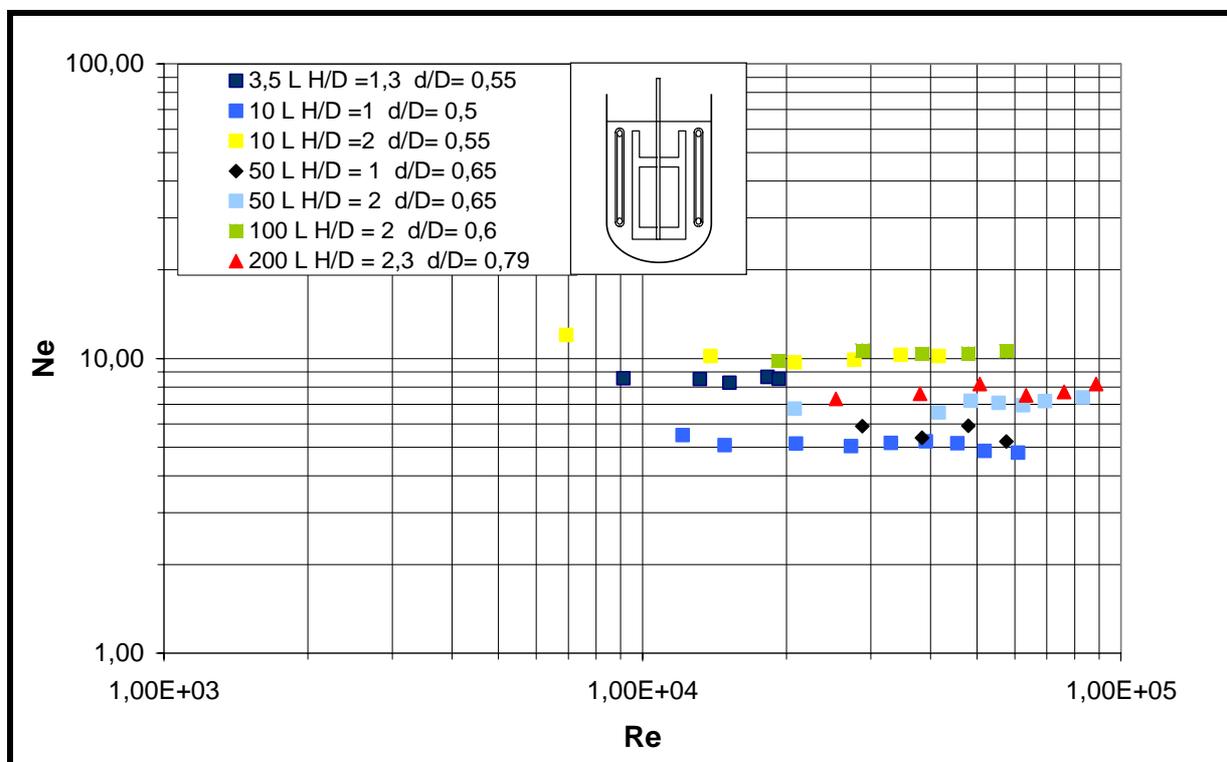


Abbildung 4-35: Darstellung der Leistungscharakteristik der verschiedenen Reaktoren.

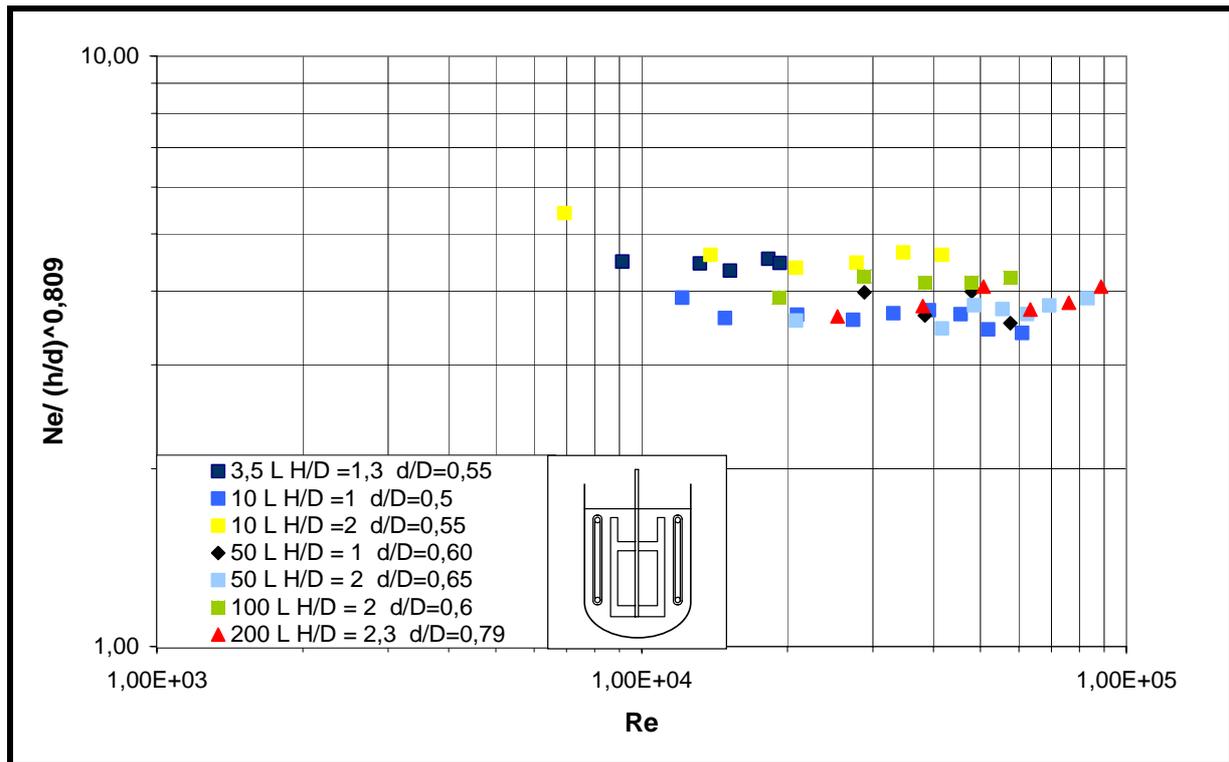


Abbildung 4-36: Newtonzahl bezogen auf die Rührergeometrie $(h/d)^{0,809}$.

Tabelle 4-11: Vergleich der experimentell ermittelten Newtonzahl zur Abschätzung nach HENZLER.

Maßstab	Ne abgeschätzt nach HENZLER	Ne bestimmt
3,5 L $H/D = 1,3$	8,3	8,4
10 L $H/D = 1$	5,8	5,2
10 L $H/D = 2$	9,2	10,2
50 L $H/D = 1$	5,1	5,3
50 L $H/D = 2$	7,3	7,2
100 L $H/D = 2$	9,1	10,2
200 L $H/D = 2,3$	7,7	7,7

Die Newtonzahlen der verschiedenen Maßstäbe waren unabhängig von der Reynoldszahl. Die experimentell ermittelten Newtonzahlen zeigen bezogen auf die Rührergeometrie $(h/d)^{0,809}$ keine signifikanten Abweichungen. Die von HENZLER entwickelte Formel zur näherungsweise Bestimmung der Newtonzahl korrelierte gut mit den experimentell ermittelten Newtonzahlen. Die bestimmten Newtonzahlen wurden zur Berechnung des Leistungseintrages verwendet.

4.7.2 Suspendierung der Microcarrier und Homogenisierung der Kultur

Die Bewertung der Suspendierungseigenschaft wurde im 50 L, $H/D = 2$ Reaktor durch Bestimmung des Sedimentvolumens der aus verschiedenen Höhen des Reaktors genommenen Proben in einem 50 ml Messzylinder vorgenommen. Die Microcarrier waren zu diesem Zeitpunkt konfluent bewachsen. Der Leistungseintrag betrug 6 W/m^3 ($n = 30 \text{ U/min}$). Die Carrierkonzentration betrug 5 g/L . Abbildung 4-37 zeigt die Verteilung der Carrier über der Reaktorhöhe.

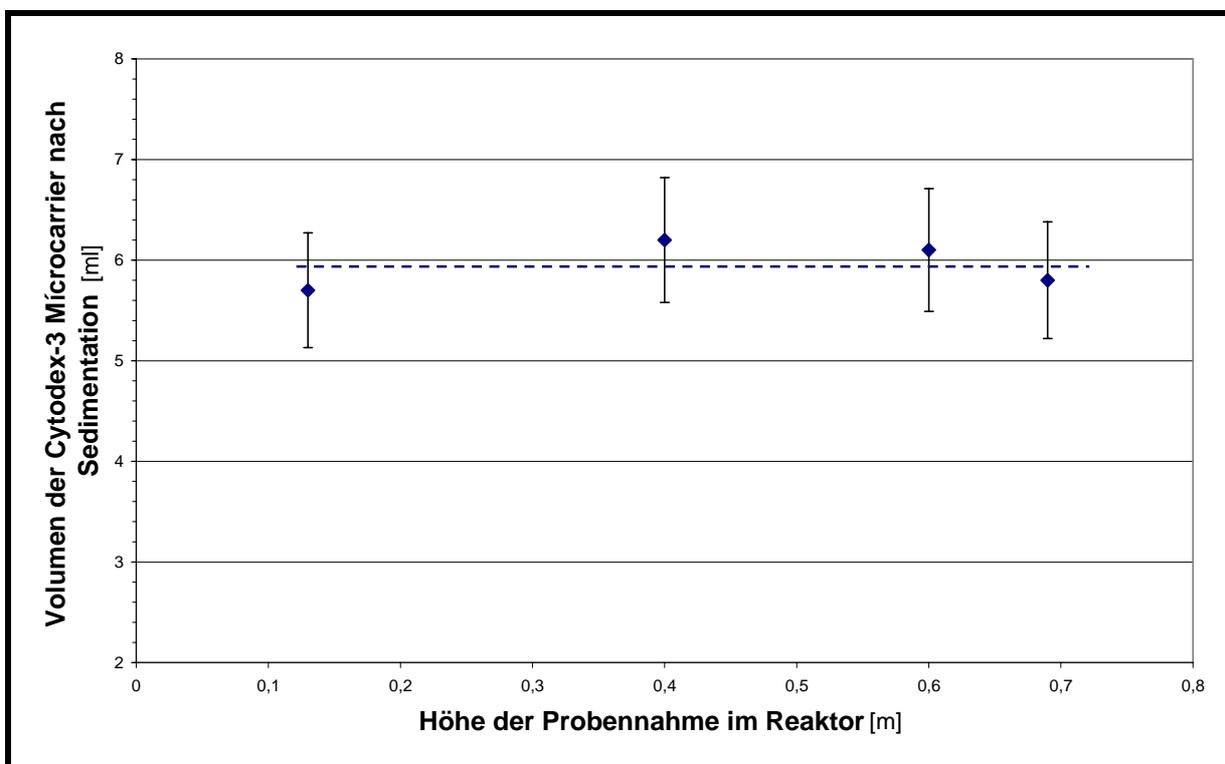


Abbildung 4-37: Verteilung der konfluent bewachsenen Microcarrier im 50 L Bioreaktor, $H/D = 2$.

Über der Reaktorhöhe konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Carrierverteilung festgestellt werden. Ein spezifischer Leistungseintrag von $\sim 6 \text{ W/m}^3$ ist für die Suspendierung der Microcarrier ausreichend.

In den Glasreaktoren (3,5 und 10 L, $H/D = 1,3$ beziehungsweise 1) konnte im Betrieb keine Phasenbildung beobachtet werden. Im Klöpperboden lagerten sich keine Partikel ab, so dass das sogenannte „1 s – Kriterium“ (Verweilzeit eines Partikels am Behälterboden nicht länger als 1 s) eingehalten wurde.

Um die Homogenisierungseigenschaften der Reaktoren zu vergleichen, wurde die unter 2.4.2 beschriebene Durchmischungskennzahl c_H nach der Farbumschlagmethode (3.6.3) bestimmt. Abbildung 4-38 zeigt die für einige Reaktoren bestimmte Durchmischungskennzahl c_H über der Reynoldszahl.

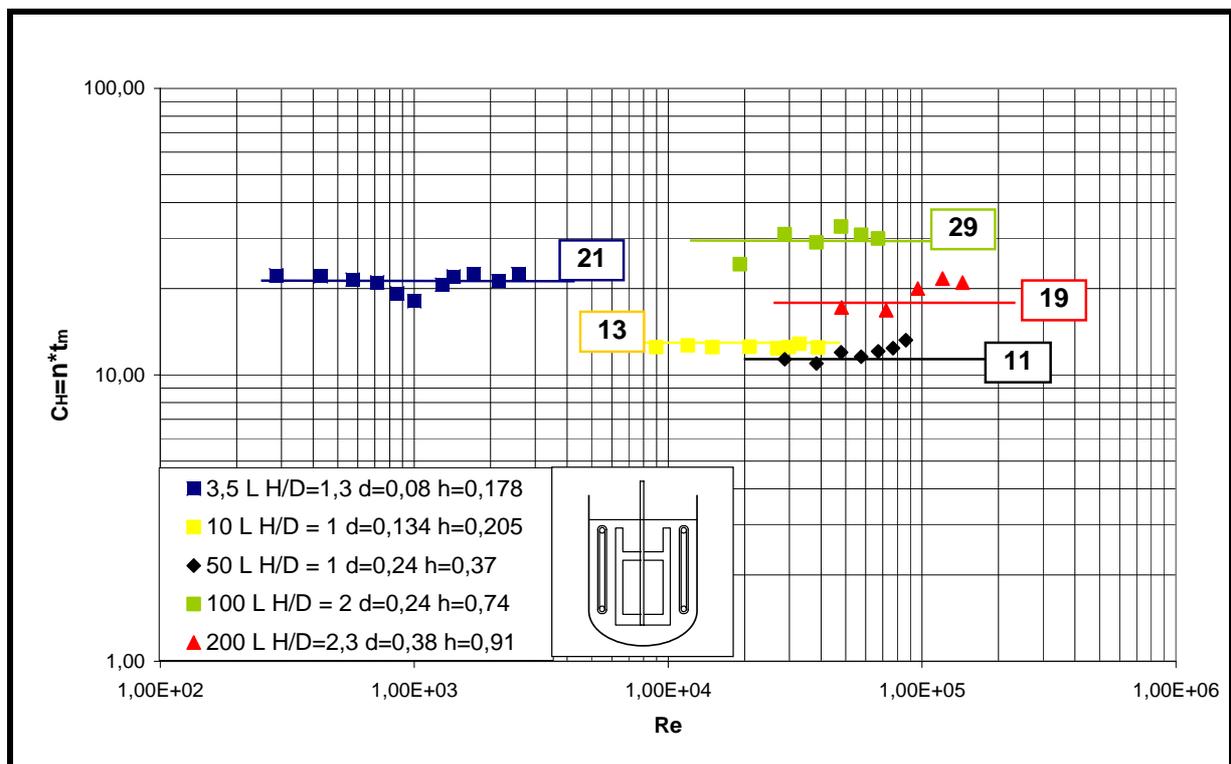


Abbildung 4-38: Darstellung der Mischzeitcharakteristik verschiedener Reaktoren. Der Homogenisierungsgrad M beträgt 95%. Die ermittelten Durchmischungskennzahlen sind für den jeweiligen Reaktor in der Abbildung dargestellt.

Die Durchmischungskennzahl war, wie unter 2.4.2 postuliert, über der Reynoldszahl konstant. Unterschiede lassen sich durch die verschiedenen Geometrien, wie beispielsweise H/D oder h/d , erklären (Makrovermischung). Die Geschwindigkeit der Makrovermischung muss im Verhältnis zur determinierenden Reaktionsgeschwindigkeit klein sein. Die determinierende Reaktionsgeschwindigkeit im Fall von Zellkulturen ist die spezifische Wachstumsrate μ [d^{-1}], die in allen Fällen deutlich größer war, als die für eine Homogenisierung von 95% benötigte Zeit.

4.7.3 Scherbeanspruchung

Die Charakterisierung der Scherbeanspruchung wurde in allen Maßstäben mit Hilfe des unter 3.6.4 beschriebenen Blauton/ Polymer Flockensystems durchgeführt. Der über die Newtonzahl bestimmte volumenspezifische Leistungseintrag P/V [W/m^3] lag im Bereich von 10 bis 300 W/m^3 . Die Darstellung des Vergleichsflockendurchmessers d_{VF} [μm] über dem volumenspezifischen Leistungseintrag P/V [W/m^3] erlaubt den Vergleich der hydrodynamischen Beanspruchung in den verschiedenen Maßstäben und Geometrien (Abbildung 4-39).

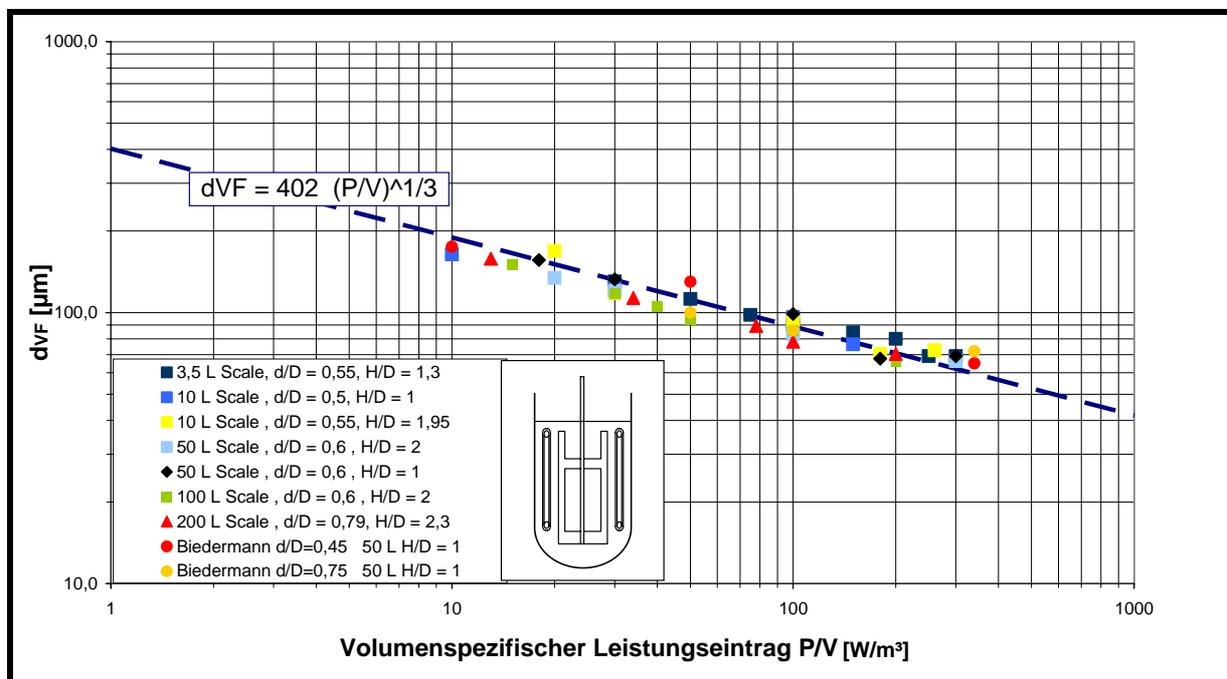


Abbildung 4-39: Darstellung des Vergleichsflockendurchmessers d_{VF} über dem volumenspezifischen Leistungseintrag P/V für die verschiedenen Reaktoren.

Die ermittelten Vergleichsflockendurchmesser zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktoren. Es ist daher zu erwarten, dass die hydrodynamische Beanspruchung in den verschiedenen Maßstäben bis 200 L vergleichbar ist. Die Einflüsse der Geometrie (d/D , H/D , etc.) waren nicht signifikant. Die von BIEDERMANN und HENZLER (1996) beschriebene $1/3$ -Abhängigkeit des Vergleichsflockendurchmessers vom volumenspezifischen Leistungseintrag konnte verifiziert werden. Die von A. BIEDERMANN (1994) ermittelten Vergleichsflockendurchmesser für ein vergleichbares System (s. Abb. 4-39) konnten bestätigt werden.

Aus der Literatur ergibt sich bei einem Vergleichsflockendurchmesser von $\sim 200 \mu\text{m}$ (in dieser Arbeit bestimmter Vergleichsflockendurchmesser bei einem Leistungseintrag von 6 W/m^3 , Abb. 4-39 abzulesen) eine maximale Energiedissipation ε_M von $\sim 0,08 \text{ m}^2/\text{s}^3$ [siehe H. J. HENZLER 1999, Figure 17, S.66]. Mit diesem Wert berechnet sich die turbulente Spannung zu

$$\tau_T = 0,0676 \rho d_p^2 \left(\frac{\varepsilon_M}{\varepsilon}\right) \frac{\bar{\varepsilon}}{\nu} = 0,216 \frac{N}{\text{m}^2} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

Die Fermentationen zeigten, dass die berechnete Spannung für die Zellen auf den Carriern unkritisch waren.

4.7.4 Stofftransport

4.7.4.1 Charakteristika der Membran

Bedingt durch die Dehnung der Membranen beim Aufwickeln auf den Korb und durch den herrschenden Druck in den Membranen mussten die theoretischen Durchmesser der Membranen zunächst korrigiert werden (d_2' und d_1').

Der Außendurchmesser der Membranen ist hauptsächlich eine Funktion des Druckes p . Aus Werten der Bayer Technology Services GmbH konnte folgender Zusammenhang gefolgert werden.

$$d_2' = d_2 + d_2 \cdot 0,014 p/p_0 \quad \text{Gleichung 4-4}$$

Diesem Zusammenhang liegen Daten einer 3,2 mm zu 2 mm Silikonmembran zu Grunde, die im Anhang dargestellt sind (7.3). Eine Extrapolation auf die in dieser Arbeit verwendeten Membranen wurde als unkritisch bewertet. Die notwendige Korrektur des Innendurchmessers der Membran ergibt sich nach N. Q. HANSHI et al. (2003) aus der volumetrischen Massenbilanz der Membran zu:

$$d_1' = \sqrt{(d_2')^2 - \frac{L_0}{L} (d_2^2 - d_1^2)} \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Die über Gleichung 4-4 und 4-5 korrigierten Außendurchmesser haben auf verschiedene Daten der Membran, wie z.B. die volumenspezifische Fläche a , Auswirkungen. Die aus 4-4 und 4-5 berechneten Korrekturen der Durchmesser, sowie die Betriebsbedingungen und resultierenden Charakteristika der Membran wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die Bezeichnungen wurden zur besseren Übersicht auch in den im Anschluss präsentierten Diagrammen übernommen.

Tabelle 4-12: Berechnete Korrekturen der Durchmesser, Betriebsbedingungen in den Reaktoren und resultierende Charakteristika der Membranen (q , Δp , L/L_0 , f , k_M^{-1} , a').

Reaktorbezeichnung	q [L/min]	Δp [bar]	L/L_0 [-]	d'_2 [mm]	d'_1 [mm]	f [-]	K_m^{-1} [m/s]	a' [1/m]
3,5 L, H/D = 1,3, q1	0,22	0,39	1,03	2,04	1,16	1,21	4,87e04	27,5
3,5 L, H/D = 1,3, q2	0,25	0,41	1,03	2,04	1,16	1,21	4,87e04	27,5
10 L, H/D = 1, q1	0,63	0,58	1,03	2,05	1,13	1,14	5,14e04	24,2
10 L, H/D = 1, q2	0,68	0,6	1,03	2,05	1,13	1,14	5,14e04	24,2
50 L, H/D = 1, q1	3,15	0,69	1,04	2,06	1,14	1,13	5,2e04	16,0
50 L, H/D = 1, q2	3,60	0,73	1,04	2,06	1,14	1,13	5,2e04	16,0
10 L, H/D = 2, q1	0,75	0,53	1,04	2,05	1,14	1,13	5,09e04	36,9
10 L, H/D = 2, q2	0,80	0,56	1,04	2,05	1,14	1,13	5,09e04	36,9
50 L, H/D = 2, q1	3,15	0,1	1,02	3,05	2,09	1,06	4,87e04	28,6
50 L, H/D = 2, q2	3,60	0,14	1,02	3,05	2,09	1,06	4,87e04	28,6
100 L, H/D = 2, q1	6,28	0,68	1,06	2,05	1,16	1,19	4,93e04	16,3
100 L, H/D = 2, q2	6,8	0,73	1,06	2,05	1,16	1,19	4,93e04	16,3
200 L, H/D = 2,3, q2	12,2	0,61	1,05	2,04	1,15	1,18	4,64e04	19,1

Diese Daten wurden für die Berechnungen der folgenden Darstellungen verwendet. Die Reaktorbezeichnungen wurden in den jeweiligen Legenden verwendet.

4.7.4.2 Stoffübergangskoeffizient k_a

Die Bestimmung des Stofftransportkoeffizienten erfolgte wie unter 3.6.5 beschrieben. Die Experimente wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Als Membranen dienten Silikonschläuche mit einem theoretischen Außendurchmesser von $d_2 = 2$ mm und einem Innendurchmesser $d_1 = 1$ mm. Im 50 L H/D = 2 Reaktor wurden Membranen mit $d_2 = 3$ mm und einem Innendurchmesser $d_1 = 2$ mm verwendet (Routinebetrieb bei der Herstellung von Antikörpern bei der Bayer HealthCare AG). Neben der Gelöstsauerstoffkonzentration c_L wurde zur Berechnung der Schmidtzahl ebenfalls die Temperatur des im Reaktor befindlichen VE-Wassers bestimmt. Bedingt durch verschiedene Drücke auf den Membranen und der daraus resultierenden unterschiedlichen Sättigungskonzentration c_L^* war es notwendig, die Begasungsexperimente bis zur vollständigen Aufsättigung der Flüssigkeit durchzuführen. Die Berechnungen des möglichen Stoffstroms G/V aus dem ermittelten k_a -Wert erfolgte unter der Annahme reiner Sauerstoffbegasung und einer Gelöstsauerstoff c_L von 40% Luftsättigung. Um Einflüsse der Oberflächenbegasung zu korrigieren, wurde der $k_L a$ -Wert für die einzelnen Messpunkte in den verschiedenen Reaktoren bestimmt und die Membranen durch Paketband (Vermeidung von Diffusionseffekten aus oder in die Membranen) mit vergleichbarem Außendurchmesser ($d_2 = 2$ mm) ersetzt. Der für die Membranbegasung ermittelte $k_{a_{\text{Gemessen}}}$ - Wert konnte im Anschluss durch einfache Subtraktion des $k_L a$ -Wertes der Oberflächenbegasung korrigiert werden:

$$k_a = k_{a_{\text{Gemessen}}} - k_L a_{\text{Oberflächenbegasung}}$$

Gleichung 4-6

Diese Korrektur ist als Näherung an den theoretisch möglichen k_a -Wert aus der Membranbegasung ausreichend, wenn $k_L a / k_a \ll 1$ ist, was im Bereich der Betriebsbedingungen der einzelnen Maßstäbe mit $k_L a / k_a < 0,08$ erfüllt war. Im Bereich höherer Drehzahlen nahm dieser Einfluss bedingt durch teilweise beginnende Eigenbegasung in einigen Maßstäben deutlich zu. Die Werte für die gemessenen Stofftransportkoeffizienten der Oberflächenbegasung sind im Anhang dargestellt. Die um die Oberflächenbegasung korrigierten k_a -Werte und der unter den geschilderten Annahmen berechnete Stoffstrom G/V wurden für die verschiedenen Maßstäbe in Abbildung 4-40 dargestellt.

Der k_a -Wert stieg für alle Maßstäbe über der Drehzahl. Signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Gasdurchsätzen q_1 und q_2 waren in keinem Fall zu erkennen, so dass für den 200 L Reaktor lediglich ein Volumenstrom gemessen wurde. Der aus der Bestimmung der Respirationsrate kalkulierte Sauerstoffbedarf von $X = 6 \cdot 10^6/\text{ml}$ gleichzeitig infizierten Zellen stellt ein Extrem dar und wurde durch die gestrichelte Linie in Abbildung 4-40 dargestellt.

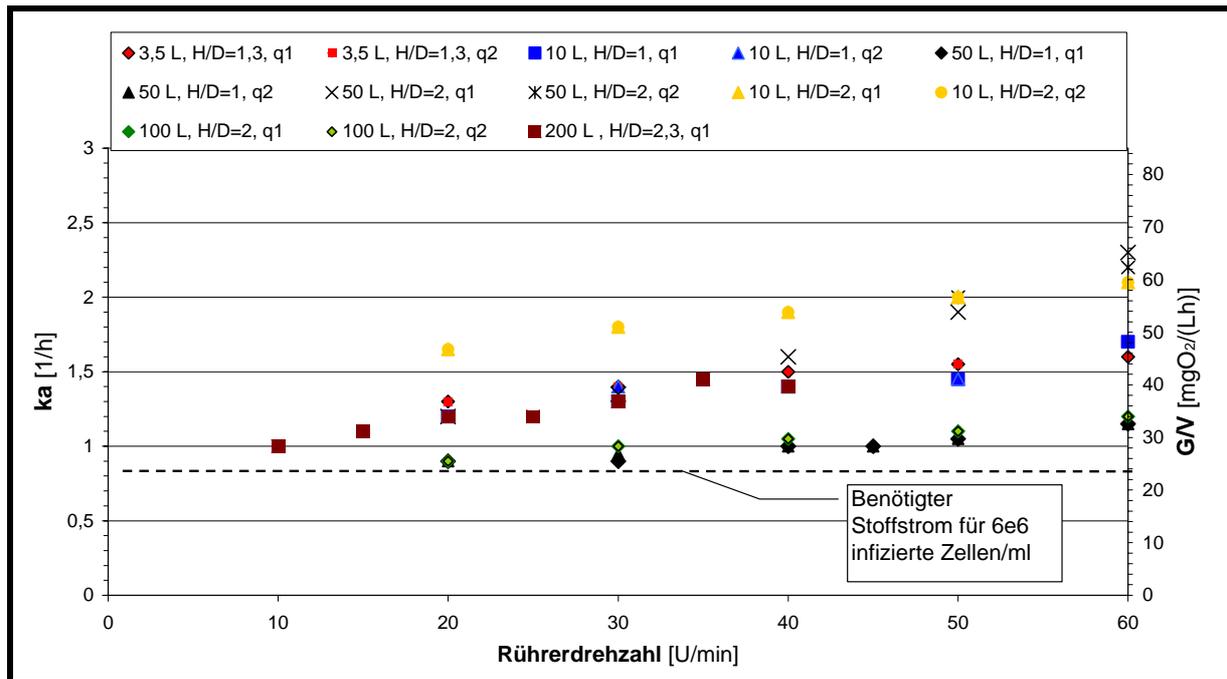


Abbildung 4-40: Korrigierter k_a Wert und möglicher Stoffstrom G/V für die getesteten Maßstäbe (reine Sauerstoffbegasung, $c_L = 2,6 \text{ mg/L}$).

Es ist erkennbar, dass der mögliche Sauerstoffeintrag in den verschiedenen Maßstäben ausreichend für die Versorgung von $X = 6 \cdot 10^6/\text{ml}$ parallel infizierter Zellen ist. Da für die volumenspezifische Fläche

$$a = \frac{A_S}{D} \propto \frac{4}{D}$$

Gleichung 4-7

gilt, musste zur Beurteilung der Maßstabsvergrößerung eine Betrachtung des um die volumenspezifische Fläche korrigierten integralen Stofftransportkoeffizienten k betrachtet werden. Zur Gewährleistung vergleichbarer Scherbeanspruchung in den Reaktoren wurde als Maßstabskriterium $P/V = \text{const.}$ gewählt. Abbildung 4-41 zeigt die Darstellung des integralen Stofftransportkoeffizienten über dem volumenspezifischen Leistungseintrag P/V .

Der in dieser Arbeit getestete Arbeitsbereich ist durch die roten gestrichelten Linien dargestellt. Die von J. G. AUNIS und H. J. HENZLER (1993) veröffentlichten Stofftransportkoeffizienten eines vergleichbaren Systems sind ebenfalls abgebildet (hellblaue Dreiecke).

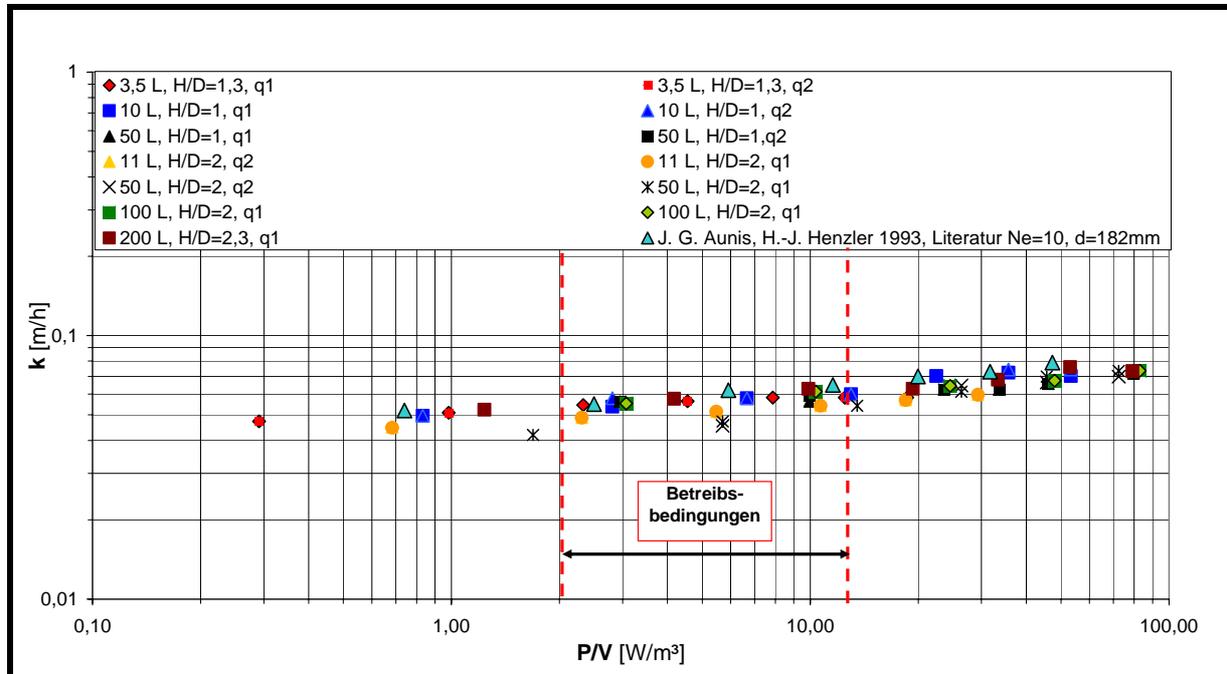


Abbildung 4-41: Darstellung des integralen Stofftransportkoeffizienten k über P/V . Der in dieser Arbeit getestete Arbeitsbereich ist durch die roten gestrichelten Linien dargestellt. Die von J. G. AUNIS und H. J. HENZLER (1993) publizierten Daten sind ebenfalls dargestellt.

Der Stofftransportkoeffizient k stieg mit höherem Leistungseintrag. In den verschiedenen Maßstäben und zu den dargestellten Literaturwerten konnten keine signifikanten Differenzen des integralen Stofftransportkoeffizienten festgestellt werden. Der mögliche Stoffstrom in den verschiedenen Maßstäben ist somit von der volumenspezifischen Fläche a , also von der im Reaktor untergebrachten Membranfläche A_S , abhängig. Ein Einfluss der Microcarrier war bis zu einer Konzentration von 5g/L nicht festzustellen (Bornsches Modell).

4.7.4.3 Abschätzung der erforderlichen Membranfläche bei der Maßstabsvergrößerung

Resultierend aus dem ermittelten Stofftransportkoeffizienten $k = 0,06$ m/h (siehe Abb. 4-41) bei einem etablierten Leistungseintrag $P/V = 6$ W/m³ ergibt sich aus einem benötigten Stoffstrom von ~ 24 mgO₂/(Lh) für das Extrem von $X = 6 \cdot 10^6$ /ml infizierten Zellen unter Annahme reiner Sauerstoffbegasung und einer Gelöstsauerstoffkonzentration c_L von

40% Luftsättigung die mindestens benötigte volumenspezifische Fläche zu:

$$\frac{G}{V} = 24 \frac{mgO_2}{(Lh)} = ka(c^* - c_L) \rightarrow a_{\min} \sim 14/m \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Diese volumenspezifische Fläche muss in allen Reaktorgrößen für eine ausreichende Versorgung der Zellen realisiert werden.

4.7.4.4 Flüssigseitiger Stofftransportkoeffizient und dimensionslose Betrachtung

Zur dimensionslosen Betrachtung musste aus den ermittelten integralen Stofftransportkoeffizienten k der flüssigseitige Stofftransportkoeffizient k_L berechnet werden. Dazu wurden die korrigierten Membrandurchmesser verwendet. Mit Hilfe der korrigierten Durchmesser und k_L konnte die folgende dimensionslose Beziehung berechnet werden:

$$Sh = f(Re_T, Sc) \text{ mit } Sc = 215 \quad (\vartheta = 37^\circ C)$$

Der von H. J. HENZLER und D. J. KAULING (1993) publizierte Zusammenhang für Rohrmembranen ist ebenfalls dargestellt.

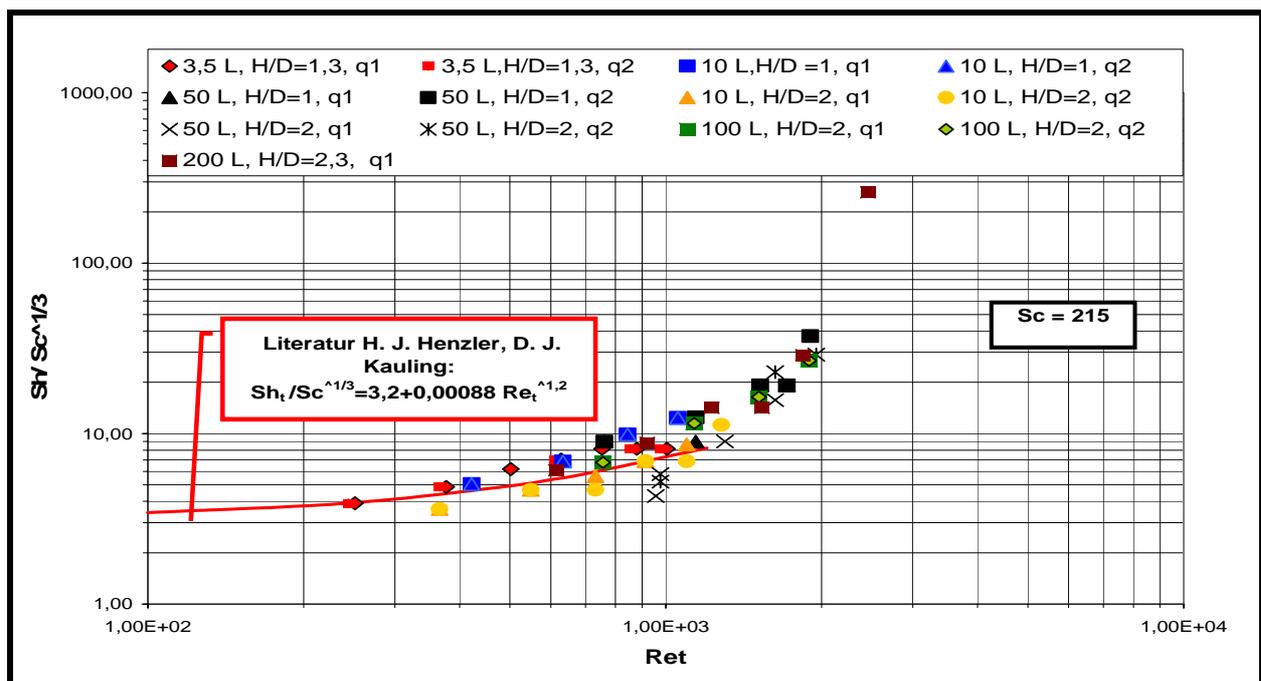


Abbildung 4-42: Darstellung der dimensionslosen Beziehung $Sh/Sc^{1/3}$ über Re_T . Die Berechnungen wurden für $37^\circ C$ durchgeführt ($Sc=215$).

Die getesteten Maßstäbe zeigten unter Annahme der durchgeführten Korrekturen keine signifikanten Unterschiede und eine gute Übereinstimmung zu den veröffentlichten Werten. In hohen Drehzahlbereichen kam es beispielsweise im 10 L Reaktor, $H/D = 1$, $n = 80$ U/min, und im 50 L Reaktor, $H/D = 1$, $n = 60$ U/min, zu unrealistischen negativen Werten für k_L . Dies ist zum einen durch den steigenden Einfluss der Oberflächenbegasung zu erklären. Zum anderen nähert sich das Verhältnis von k/k_L dem Wert 1, so dass geringe Abweichungen der Membrandurchmesser, die in der Berechnung von k_M eine wesentliche Rolle spielen, einen höheren Einfluss gewinnen.

Festzustellen bleibt, dass bei der Maßstabsvergrößerung keine Probleme bezüglich des Stofftransports bis in den 200 L Maßstab zu erwarten sind.

4.7.5 Testlauf mit verändertem Begasungsverfahren

Um höhere Zelldichten kultivieren zu können, um die personalintensive Wicklung der Membranen zu vermeiden und um höhere Stofftransportraten für Maßstäbe größer 200 L zu realisieren, wurde ebenfalls das Verfahren der Blasenbegasung getestet. Der Stator verblieb zur Gewährleistung gleicher Strömungsbedingungen im Reaktor, wurde jedoch nicht mit Gas durchströmt. Zum Einsatz kam ein Sparger mit einer Lochgröße von 0,5 mm dessen schematischer Aufbau und Anbringung im Reaktor in Abbildung 4-43 dargestellt ist. Der Testlauf wurde im 3,5 L H/D = 1,3 Bioreaktor im beschriebenen Prozess I durchgeführt.

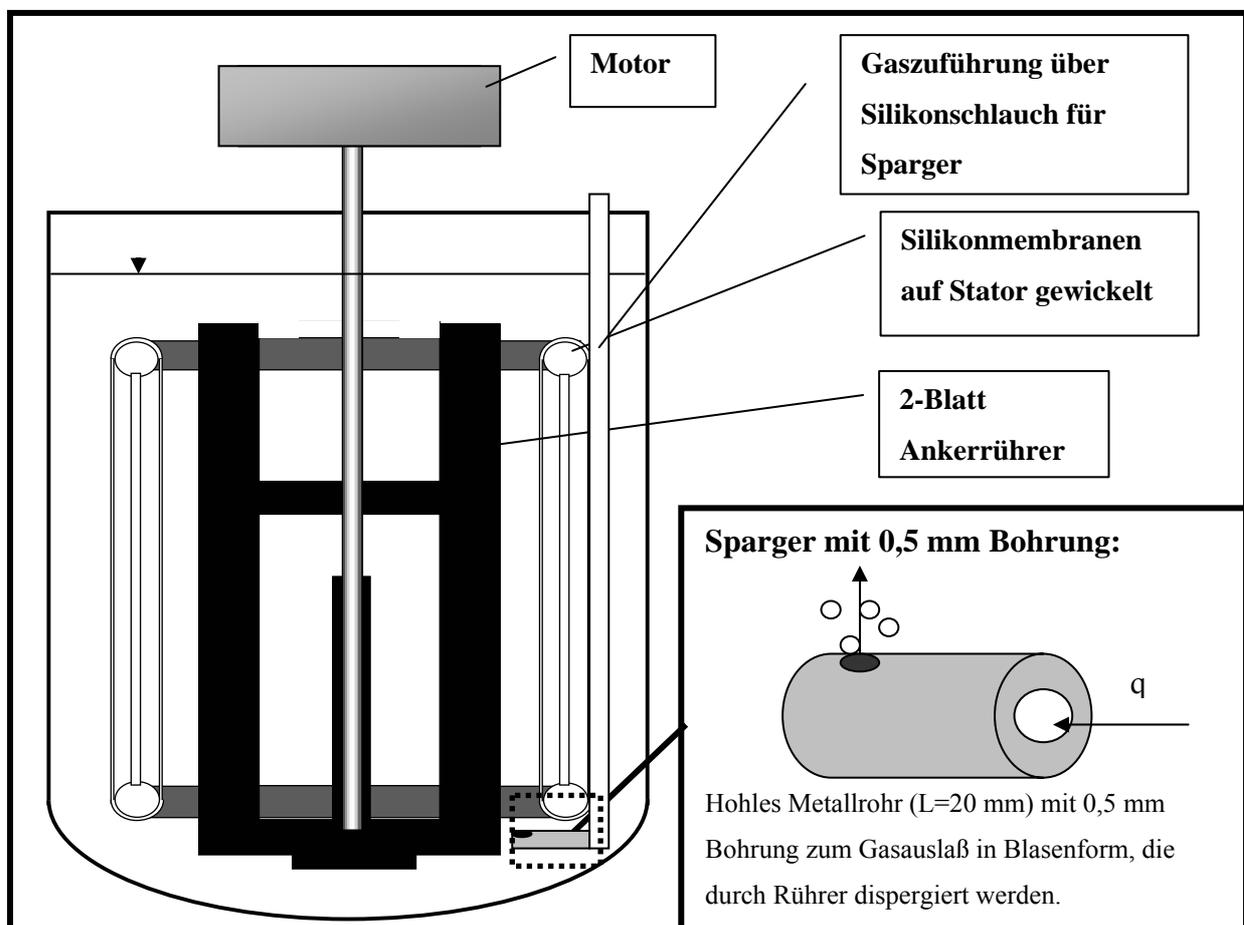


Abbildung 4-43: Schematischer Aufbau des Reaktors im Testlauf mit Sparging.

Bedingt durch das Puffersystem - Einstellung des pH-Wertes über Natriumhydrogencarbonat und CO_2 - welches in dieser Phase der Entwicklung nicht mehr geändert werden konnte, war zur Gewährleistung einer stabilen Regelung des Reaktors ein stetiger Gasstrom an CO_2 und N_2 notwendig. Kurz nach Inokulation des Reaktors zeigte sich die in den folgenden Abbildungen dargestellte Problematik.



Abbildung 4-44: Fotografische Aufnahme des 3,5 L Bioreaktors im Testlauf mit Sparging unmittelbar nach Inokulation. Dargestellt ist eine Nahaufnahme des oberen Teils des Reaktors.

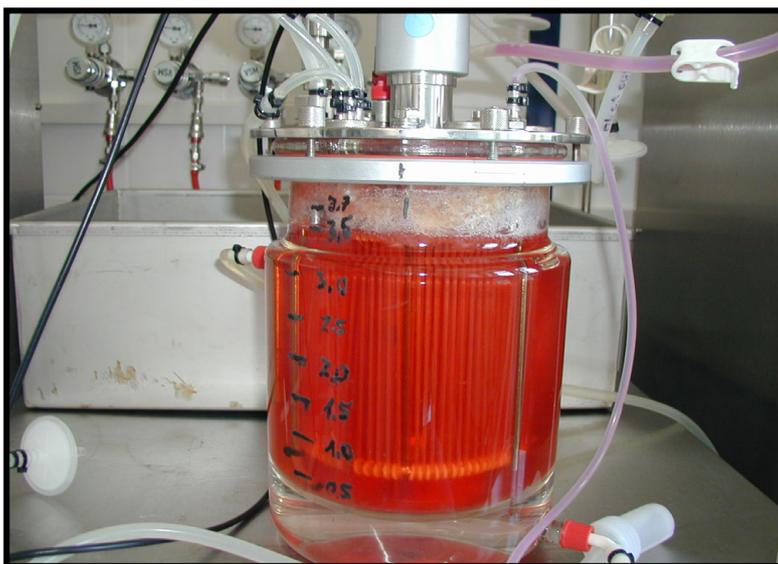


Abbildung 4-45: Fotografische Aufnahme des 3,5 L Bioreaktors im Testlauf mit Sparging unmittelbar nach Inokulation. Abbildung des gesamten Reaktors.

Wie in Abbildung 4-44 und Abbildung 4-45 zu erkennen ist, befand sich der Großteil der Carrier-Zellsuspension im erst kurz nach Inokulation gebildeten Schaum. Der stabile Schaum schien zum Großteil aus Carriern und Zellen zu bestehen. Eine homogene Verteilung konnte somit im Reaktor nicht vorliegen und es ist zu vermuten, dass starke Limitationen vorlagen. Der Versuch wurde nach zwei Tagen auf Grund des massiven Verlustes an Vitalität ($< 20\%$) abgebrochen. Sparging war unter diesen Kultivierungsbedingungen nicht möglich.

5 DISKUSSION

Übergeordnetes Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Viruspropagation von *PPVO NZ-2* mit einer adhären *BK KL 3A* Zelle im zu erwartenden Produktionsmaßstab von 200 L. Die Arbeit befasste sich mit drei Schwerpunkten, deren Ergebnisse in Kapitel 4 eingehend dargestellt wurden und im Anschluss diskutiert werden.

5.1 Adaptation und physiologische Charakterisierung der Zelllinie

5.1.1 Adaptation der *Bovine Kidney Kl 3A* Zelle

Die adhären *Bovine Kidney KL 3A* Zelllinie sollte im ersten Schritt an serum- und proteinfreie Bedingungen adaptiert werden. In dieser Arbeit wurde sowohl die bei der GBF entwickelte Adaptationsstrategie [K. SCHARFENBERG, R. WAGNER 1995], als auch eine intern entwickelte Adaptationsstrategie getestet. Als potentielle Adaptationsmedien wurden zwei kommerziell erhältliche Medien, SMIF[®]8 und OptiPro[®] SFM, mit einer Bayer internen Formulierung (C7PMF 3.2295 A V) verglichen. Die kommerziell erhältlichen Medien wurden mit und ohne Insulin Supplementierung getestet. Während die Zellen, die nach der bei der GBF entwickelten Adaptationsstrategie bereits unmittelbar nach Abschluss des Adaptationszyklus kein Wachstum zeigten, war die Strategie der sequentiellen Reduzierung des Anteils des proteinhaltigen Mediums nach jeder Passage erfolgreich für alle Medien mit Insulin. Die ermittelte Wachstumsrate ($\mu = dX/dt$) war in allen Fällen vergleichbar und lag zwischen 0,51 – 0,58 d⁻¹. Die Vitalität und die Morphologie der Zellen zeigten in allen Medien keine signifikanten Unterschiede zur etablierten *BK KL 3A* Zelle (Abb. 4-1 bis 4-3, Seite 66 ff). Der Erfolg einer ähnlichen Adaptationsstrategie nach dem „Weaning-Algorithmus“ wurde für *HEK 293* Zellen zur Produktion von Adenoviren in Suspension beschrieben [G. VAN SLYKE 2004].

Die Medien ohne Zugabe von Insulin (570 IU/ L bis 1040 IU/ L) zeigten bereits während des Adaptationszyklus deutlich geringeres oder gar kein Wachstum. Die essentielle Rolle von Supplementen, wie z.B. Insulin, „Insulin-Like Growth Factor“ (IGF), Transferrin oder HyPep Zusätzen, wurde für verschiedene Zelllinien untersucht und deren Effekte auf Produktbildung und Zellwachstum beschrieben.

Insbesondere bei der Adaptation von Zellen an serum- oder proteinfreie Bedingungen ist häufig eine weitere Medienentwicklung notwendig. Beispielsweise bei *CHO*- und *BHK* Zellen wurden unter anderem Insulin und Transferrin supplementiert [D. BARNES, G. SATO 1980, E. R. FROESCH et al. 1985, V. JÄGER et al. 1988, K. SCHARFENBERG, R. WAGNER 1995, M. GIULIANO et al. 1996, T. OKAMOTO et al. 1996, S. M. N. HUNT et al. 1997, K. SCHARFENBERG 1997, D. W. JAYME, S. R. SMITH 2000, N. A. S. SUNSTROM et al. 2000, P. PRICE et al. 2002, A. SIEMENSMA 2002]. Wie in dieser Arbeit lag die Insulinkonzentration zum Teil im nicht physiologischen Bereich [D. BARNES, G. SATO 1980, C. YANDELL et al. 2004].

Der Erfolg der Adaptation bezüglich Wachstumsrate, Morphologie und Vitalität war zu erwarten, da verschiedenste Zelllinien bereits an diese Medien adaptiert wurden (Tabelle 5-1 und Tabelle 5-2) [K. SCHARFENBERG 1997, P. PRICE et al. 2002].

Tabelle 5-1: Erfolgreich an SMIF® - Medien adaptierten Zellen [SCHARFENBERG et al. 1997].

Abkürzung	Zelllinie	Medium
<i>CHO K1</i>	<i>Chinese Hamster Ovary</i> - Wildtyp	SMIF 1, SMIF 6
<i>CHO pMIIIGPTR</i>	Rekombinante <i>CHO</i> Zelle	SMIF 6:MEM α (1:1)
<i>CHO Dukx</i>	<i>CHO K1</i> differenzierte DHFR Zelllinie	SMIF 1, SMIF 6
<i>CHO AT III</i>	Rekombinante (Rek.) <i>CHO</i> Zelle	SMIF 6
<i>BHK 21 C13</i>	<i>Baby Hamster Kidney</i> Wildtyp	SMIF 1
<i>BHK pSVIL2</i>	Rek. <i>BHK</i> Zelle zur IL-2 Produktion	SMIF 7
<i>BHK pBEHSVIL2</i>	Rek. <i>BHK</i> Zelle zur IL-2 Produktion	SMIF 1, SMIF 7
<i>BHK Mu38</i>	Rek. <i>BHK</i> Zelle zur IL-2 Produktion	SMIF 7
<i>HeLa</i>	Humane Epitheloide Cervix Krebszelllinie	SMIF 6
<i>MDCK</i>	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> Zelle	SMIF 6
<i>P19</i>	Murine Embryonic Krebszelllinie	SMIF 6

Tabelle 5-2: Erfolgreich an OptiPro® SFM - Medium adaptierte Zellen, die zur Virusvermehrung eingesetzt werden [P. PRICE et al. 2002].

Abkürzung	Zelllinie	Virus
<i>MDCK</i>	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>	Canine Adenovirus (CAV)
<i>MDBK</i>	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>	Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)
<i>PK 15</i>	<i>Porcine Kidney</i>	Pseudorabies Virus (PRV)
<i>Vero</i>	<i>African Green Monkey Kidney</i>	REO 3
<i>BHK-21</i>	<i>Baby Hamster Kidney</i>	Blue Tongue Virus (BTV)

Insbesondere OptiPro® SFM, welches speziell für die Propagation von Viren entwickelt und an das bereits verschiedene Zelllinien und Viren adaptiert wurden, schien ein viel versprechender Kandidat für die Viruspropagation zu sein [P. PRICE et al. 2002].

Die Viruspropagationsfähigkeit von *PPVO – NZ 2* der Zelllinien zeigten in stationären Kulturen deutliche Unterschiede. Während die interne Formulierung *C7PMF 3.2295A V* keine Unterschiede bezüglich des Virustiters und der Infektionskinetik aufwies, zeigten die beiden kommerziell erhältlichen Medien einen deutlich verringerten Virustiter ($\sim 1 \log_{10}$ Stufe, Abbildung 4-7, Seite 71). Weitere Selektionszyklen zur Steigerung der Produktivität für das Virus und/ oder eine weitere zeitintensive Medienentwicklung zur Steigerung der Virusproduktivität wären notwendig gewesen. Ein Medium, das zur Zellproliferation geeignet ist, ist nicht zwangsläufig ein gutes Expressionsmedium [R. WAGNER 2005]. Zudem enthielt OptiPro® SFM ein pflanzliches Hydrolysat, welches Chargenschwankungen aufweisen kann. Die interne Formulierung war frei von Komponenten tierischen, humanen oder pflanzlichen Ursprungs, so dass der Focus für weitere Entwicklungen auf die an *C7PMF 3.2295A V* adaptierte Zelllinie, im folgenden *BK KL 3A V* genannt, gelegt wurde.

Ausgehend von einer angelegten Forschungszellbank wurden erste Testläufe im Bioreaktor durchgeführt ($V=10$ L). In diesen Fermentationen war deutlich zu erkennen, dass die Zelle ihre Fähigkeit zur Anhaftung auf Oberflächen nicht verlor, wie es für gewöhnlich bei der Reduktion des Protein- oder Serumgehaltes in der Literatur als Vorstufe zur Generierung einer Suspensionszelle beschrieben wurde (Seite 73, ff) [K. SCHARFENBERG 1997, F. HESSE, R. WAGNER 2000]. Der Zusatz von sogenannten „Adhäsionsfaktoren“ war nicht notwendig [AMERSHAM 2000].

Die durchgeführten Fermentationen mit der neuen *BK KL 3A V* Zelllinie illustrierten bezüglich Adhäsion der Zellen, Besiedlung der Microcarrier, Wachstumskinetik und Virusproduktivität keine Unterschiede zur etablierten Zelle. Ein Zusatz von Pluronic oder ähnlichen vor Scherkräften schützenden Substanzen, wie es teilweise in der Literatur beschrieben wurde, war nicht notwendig [K. SCHARFENBERG 1997, F. HESSE, R. WAGNER 2000].

Unterschiede bezüglich zellspezifischer Raten waren innerhalb der Standardabweichung zwischen der generierten *BK KL 3A V* Zelle und der etablierten Zelle nicht zu erkennen. Eine Produktion von *Parapoxvirus ovis* in einem Microcarrierprozess mit einem Medium frei von tierischen, humanen oder pflanzlichen Komponenten ist in der Literatur nicht beschrieben und bedeutet einen wesentlichen Fortschritt der Arbeit bezüglich der biologischen Sicherheit (BSE, TSE, Prione, Viren, etc.).

Nach der Adaptation an serumfreie Bedingungen beschrieb K. SCHARFENBERG (1997) die Möglichkeit zur Generierung einer Suspensionszelle durch den Transfer größerer Zellaggregate aus dem Überstand konfluenter stationärer Kulturen in gerührte Kulturen. In dieser Arbeit konnte unter Verwendung aller beschriebener Zelllinien keine Suspensionszelle generiert werden. Die Zellen zeigten zwar insbesondere bei hohen Inokuli kurzfristig stabile Vitalität und vereinzelt geringes Wachstum, starben jedoch innerhalb der ersten beiden Tage. Variationen des Kultivierungssystems und der Zusatz von Pluronic F68 (Scherprotektion) hatten keinen positiven Einfluss. Ein Verlust der Oberflächenadhäsion war wie bereits erwähnt nicht festzustellen. In der Literatur wurde bis dato keine *Bovine Kidney* Zelle beschrieben, welche unter Suspensionsbedingungen kultiviert werden konnte. Eine in Suspension kultivierbare *MDCK*- Zelle wurde von A. GRÖNER und J. VORLOP (2003) zur Herstellung von Influenza Viren patentiert. Insbesondere für die weit verbreiteten *CHO*- und *BHK*- Zellen, welche ursprünglich adhärent wuchsen, konnten Suspensionsklone generiert und serumfreie Prozesse etabliert werden [V. JÄGER et al. 1988, R. WAGNER et al. 1989, R. WAGNER, M. LUCKI-LANGE 1993, O. W. MERTEN et al. 1994].

5.1.2 Raten der Kultur

Um eine Optimierung des Microcarrierprozesses durchführen zu können, mussten die Raten der Zelllinie bestimmt werden.

Die **Sauerstoffverbrauchsrate** r_X wurde über eine Bilanzierung der Gelöstsauerstoffkonzentration realisiert. Diese Methode der Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr und anschließender Auswertung des Sauerstoffprofils wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben [R. J. FLEISCHAKER, A. J. SINSKEY 1981, M. W. GLACKEN et. al. 1983]. Ansätze mit einer Abgasanalyse sind ebenfalls beschrieben [L. WU et al. 2003]. Für die uninfizierte Zellkultur ergab sich eine Sauerstoffverbrauchsrate von durchschnittlich $r_X = 3,59 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$ (entspricht $\sim 0,11 \text{ mmol}/(\text{Lh})$) bei einer Zellzahl $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$. Die ermittelte Sauerstoffverbrauchsrate liegt in der Größenordnung anderer in der Literatur veröffentlichter Verbrauchsdaten tierischer Zellen, wie z. B. *BHK*- oder *Vero*- Zellen [R. J. FLEISCHAKER, A. J. SINSKEY 1981, G. DAUN 1990, H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993, J. G. AUNIS, H.-J. HENZLER 1993]. Auswirkungen durch die Adaptation an serumfreie Bedingungen wurden in diesem Fall nicht festgestellt, wie dies in der Literatur beschrieben wird [K. YAMADA et al. 1990]. Für die mit Virus infizierte Kultur ergab sich eine um etwa 10 % erhöhte Sauerstoffverbrauchsrate mit $r_X = 3,97 \text{ mgO}_2/(\text{Lh})$ ($X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$). Auf Grund des erkennbaren Fortschritts der Viruspropagation war davon auszugehen, dass ein Grossteil der Zellen infiziert war. Eine Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate wurde bei der Infektion von *MDCK* Zellen unmittelbar nach Infektion ebenfalls festgestellt [U. REICHL 2004].

Die während der Adaptation in T-Flaschen ermittelte „integrale“ Wachstumsrate von $0,58 \text{ d}^{-1}$ wurde in den Fermentationen durch die ermittelte maximale Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,6 \text{ d}^{-1}$ bestätigt. Aus der Modellierung des Prozesses, welche zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert wird, wurde eine maximale Wachstumsrate von $0,63 \text{ d}^{-1}$ ermittelt, woraus sich eine Verdopplungszeit von etwa 1 Tag ergab. Diese Verdopplungsrate lässt sich in den Fermentationen bis zum zweiten Medienwechsel in nahezu allen Fermentationen wiederfinden. Die Wachstumsrate ist vergleichbar zu in der Literatur publizierten Wachstumsraten für *MDCK* Zellen [L. MÖHLER et al. 2005] und bestätigten ermittelte Wachstumsraten aus dem Lab. Dr. Langer, Bayer HealthCare AG, Wuppertal [A. LANGE 2000]. Die in der Literatur beschriebenen negativen Einflüsse der in dynamischen Kulturen auftretenden hydrodynamischen Beanspruchung waren bei einem in dieser Arbeit verwendeten Leistungseintrag von $\sim 6 \text{ W}/\text{m}^3$ nicht zu ermitteln [A. BIEDERMANN, H. J. HENZLER 1996, H. J. HENZLER 1999].

Die Bestimmung der spezifischen Substratverbrauchsrate und spezifischen Bildungsrate zeigte deutlich höhere Fehler von bis zu 28%. Eine Ursache war die hohe Standardabweichung der Zellzahlbestimmung von etwa $\pm 15\%$. Die Ermittlung der Verbrauchsrate infizierter Zellen im Reaktor war auf Grund einer mangelnden Methode zur Differenzierung von infizierten und uninfizierten Zellen nicht möglich. Die ermittelten Verbrauchs- und Bildungsrate konnten für die Phase der Viruspropagation nur für qualitative Betrachtungen verwendet werden. Eine quantitative Berechnung exakter Fütterungsmengen, wie es beispielsweise in der Literatur für ein Fed-Batch Verfahren beschrieben wurde, war mit diesen fehlerbehafteten Werten nicht möglich. Prinzipiell lagen die ermittelten Verbrauchs- bzw. Bildungsrate in der gleichen Größenordnung von *CHO*-Zellen.

5.1.3 Direkte Expansion der Zelllinie

Die Möglichkeit der direkten Expansion ohne aktive Eingriffe in den Prozess war erfolgreich. Eine Subkultivierung beziehungsweise „Passage“ im Bioreaktor war ohne signifikante Verlängerung der Betriebszeit bis zu einem Verhältnis von 1:5 durch Zugabe von frischen Microcarriern möglich. Eine Behandlung mit proteolytischen Enzymen oder ähnlichen Techniken war dazu nicht notwendig. Eine alternierende Sedimentation der Microcarrier erwies sich dabei als vorteilhaft. In der Literatur sind ähnliche Beobachtungen für statische Kulturen oder Fließbettreaktoren beschrieben [AMERSHAM 2000, M. P. DÜRRSCHMID et al. 2003]. Ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum der Zellen und die Produktivität war nach 2 Passagen bis in den Pilotmaßstab von 50 L nicht zu erkennen (Abbildung 4-14, S. 81). Dies wurde in der Literatur mit einer maximalen Verdünnung von 1:6 für den Einsatz einer *CHO* Zelle in einem Fließbettreaktor von DÜRRSCHMID et al. 2003 ebenfalls gezeigt, wobei *CHO* Zellen in der Lage sind, partiell in Suspension zu wachsen.

Die erwiesene direkte Zellexpansion in gerührten Carrierkulturen eröffnet die Möglichkeit, die adhärenzte Zelle wie eine Suspensionszelle zu kultivieren. Da der Prozess auch in größeren Maßstäben kein Trypsin oder ähnliche proteolytische Enzyme und die damit verbundenen Inhibitoren benötigte, gewann der gesamte Prozess an ökonomischer Effizienz und Robustheit.

5.2 Optimierung des Microcarrierprozesses

5.2.1 Analyse des etablierten Prozesses

Um eine Optimierung des biphasischen Prozesses hinsichtlich Ausbeute, Sicherheit und Skalierbarkeit durchführen zu können, musste zunächst eine Analyse des Prozesses im Labormaßstab mit besonderem Augenmerk auf die Phase der Virusvermehrung durchgeführt werden. Während der Viruspropagation wurden im Prozess I starke Substratlimitationen festgestellt. Vornehmlich Glukose und Glutamin waren limitierend. Glukose erwies sich in der Analytik als charakteristisches Substrat. Nach Verbrauch der Substrate wurde das gebildete Laktat verstoffwechselt. Die Limitierung resultierte in einem Plateau des über $TCID_{50}$ ermittelten Virustiters. Zu diesem Zeitpunkt betrug die CPE jedoch lediglich 30 bis 40%. Die Virusvermehrung verlief für mehr als 100 Stunden unproduktiv!

Da neben den viralen Enzymen und viralen Proteinen zur Vermehrung dieses großen dsDNA Virus Nukleotide generiert werden müssen, spielt der Energiestoffwechsel der Zelle eine besondere Rolle (siehe 2.1). Glukose stellt neben Energie vor allem Ribosen als Vorstufe der Nukleotide über den Pentosephosphatweg zur Verfügung. Die Annahme einer Limitierung scheint auf Grund der Größe des *PPVO-NZ 2* und der Tatsache, dass die Replikation im Cytoplasma der infizierten Zellen stattfindet, durchaus plausibel. Eine Maß für diese Limitierung könnte die Wurfzahl („burst-size“) oder eine exakte Beobachtung der zellinternen Kinetik der Virusvermehrung, beispielsweise über Immunofluoreszenz oder Markierungsexperimente, darstellen. Dies war auf Grund fehlender Antikörper gegen das Virus und der exakten Berechnung der Wurfzahl pro Zelle (mangelnde Identifizierung infizierter Zellen und durch Lyse bedingte erschwerte Auszählbarkeit in der Neubauerkammer zur Bestimmung der Zellzahl) problematisch. Eine Abschätzung der Tendenz der pro Zelle gebildeten Viruspartikel konnte jedoch durch den Bezug der im Prozess I gebildeten Viruspartikel auf die maximale Zellzahl im Prozess durchgeführt werden.

5.2.2 Mathematisches Modell

Basierend auf dem Postulat der Limitierung wurde ein einfaches mathematisches Modell für Prozess I erstellt. Dieses Modell wurde ebenfalls in zwei Phasen unterteilt. Phase I bezog sich auf die Generierung von Biomasse und Phase II beschrieb die Virusvermehrung.

Die Ergebnisse des nicht segregierten und unstrukturierten Modells der ersten Phase des Prozesses (Zellwachstum), wies nach Parameteroptimierung eine zufriedenstellende Korrelation der experimentellen Daten zur Simulation auf (Abbildung 4-17, S. 85).

Die Wachstumsrate μ_{\max} von $0,63 \text{ d}^{-1}$ vergleichbar zur von MÖHLER et al. (2005) publizierten Wachstumsrate für *MDCK* Zellen. Der Vergleich der experimentell ermittelten Glukosekinetik zur Simulation zeigte ebenfalls keine signifikanten Abweichungen. Mit Hilfe der Simulation konnte in diesem Projekt erstmals der Zeitpunkt der Medienwechsel bestimmt werden.

Der zeitliche Bedarf der Zellen zur Anhaftung und der folgenden lag-Phase wurde über eine zeitliche Verschiebung der Simulation im Vergleich zu den experimentellen Werten um 15 h realisiert. Die Abbildung über eine Zeitverschiebung wurde sowohl für Zellwachstum, als auch für die Virusvermehrung in der Literatur publiziert [L. MÖHLER et al. 2005].

Für die Modellierung der Phase der Virusvermehrung wurde ein System aus vier Differentialgleichungen in Anlehnung an das von MÖHLER et al. (2005) publizierte Modell verwendet. Nach Infektion konnte ebenfalls über eine zeitliche Verschiebung von 15 h für das Zellwachstum und der Verwendung der zuvor ermittelten Parameter aus Phase I eine gute Übereinstimmung der experimentell ermittelten Daten und der Simulation bezüglich Zellzahl und Glukoseverbrauch erreicht werden. Die Abbildung der substratlimitierten Virusvermehrung mit Hilfe einer Monod-Kinetik erwies sich als praktikabel und zeigte ebenfalls zufriedenstellende Korrelation zu den experimentell ermittelten Daten. Die Monod-Kinetik war auf Grund des komplexen Aufbaus des Virus und des im Cytosol stattfindenden Replikationszyklus, wozu zunächst viral codierte Proteine gebildet werden müssen, angenommen worden. Die Zelle muss zur Produktion des komplexen Virus die notwendige Energie zur Vermehrung und zur Selbsterhaltung bereitstellen, ohne dass Enzyme oder Cofaktoren aus dem Nukleus verwendet werden können. Insbesondere die Generierung von Nukleotiden spielt eine wesentliche Rolle.

Aus dieser Überlegung ergab sich eine Unterteilung der Ausbeutekoeffizienten für Zellwachstum $Y_{X/S}$ und einem fiktiv angenommenen Ausbeutekoeffizienten, der für die Produktion viraler Partikel und zur Erhaltung der zellulären Aktivität von der Zelle aufzuwendenden Energie in Form von Glukose ($Y_{V/S}$). Somit setzt sich der Glukoseverbrauch aus verschiedenen Komponenten zusammen und bildet die Basis für das Monod Modell.

Die angenommene zeitliche Verzögerung von etwa 5 h der „latent Phase“ im Modell zur Virusvermehrung beschreibt die Phasen Anlagerung, Endocytose und Replikation des Virus nach Infektion des Reaktors mit einer MOI von 0,01.

In der Literatur wurde erste virale DNA während der Infektion von PPVO nach 4 bis 6 h gefunden (s. 1.2), so dass diese zeitliche Verschiebung nach diesen Angaben realistisch erscheint. Erste infektiöse Partikel wurden in der Literatur nach 10 bis 20 h gefunden [T. C. BALASSAU, A. J. ROBINSON 1987]. Experimentelle Daten und das Modell korrelieren gut mit diesen Angaben. Eine zeitliche Verschiebung des publizierten Modells zur Vermehrung von *Influenza* auf MDCK Zellen beträgt 4,5 h und ist somit vergleichbar [L. MÖHLER et al. 2005]. Zur Bestimmung der spezifischen Produktionsrate der Viren in den Zellen wurde aus den Fermentationsdaten 10 Partikel pro Stunde geschätzt und während der Optimierung nur unwesentlich korrigiert.

Die notwendige Michaelis - Menten Konstante wurde fiktiv zur Erstellung des Modells angenommen. Während der Fermentation und in T-Flaschen konnte kein signifikanter Abfall infektiöser Viruspartikel über der Zeit durch Proteasen oder thermische Inaktivierung festgestellt werden, so dass die Abbaurrate des Virus k_{DV} mit 0,0022 sehr gering war. Vergleichbare Daten waren in der Literatur nicht publiziert. Dies galt ebenfalls für die Sterberate der Zellen bedingt durch die Infektion und Virusvermehrung. Die Rate wurde mit $0,0085 \text{ h}^{-1}$ angenommen und nach Glukoseverbrauch auf $0,013 \text{ h}^{-1}$ erhöht. Die spezifische Anhaftungsrate $k_{VA} = 0,06 \text{ ml/h}$ und die spezifische Infektionsrate $k_{VI} = 0,0010 \text{ ml/h}$ konnten ebenfalls nur geschätzt werden. In der Literatur waren keine Angaben verfügbar. Das Verhältnis Anhaftungsrate zu Infektionsrate von etwa 60 ist deutlich geringer als das von MÖHLER et al. (2005) publizierte Verhältnis für die Vermehrung von *Influenza* auf MDCK Zellen (~570). Mit dem ermittelten Parametersatz konnte eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen Daten und Simulation erzielt werden (Abb. 4-18 und 4-19, S. 87 f).

Mit Hilfe des Modells konnte ein vertieftes Verständnis des Prozesses erzeugt werden. Der größte Optimierungsbedarf liegt in der Ermittlung der spezifischen Raten an Hand experimenteller Ergebnisse, die nur mit der Etablierung neuer Bestimmungsmethoden zu realisieren wären (Laser Scanning Mikroskopie, Immunofluoreszensassay, etc.). Dies war nicht Aufgabe dieser Arbeit. Durch das Modell wurde die nach der „Versuch und Irrtum“ Methode postulierte Limitation der Virusvermehrung bestätigt und kann eine Grundlage für weiterführende Modellierung in einem komplexeren Umfang (Einbeziehen von Glutamin, Laktat und Ammonium) darstellen.

5.2.3 Änderungen der Prozessführung

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden verschiedene Änderungen durchgeführt, die im Folgenden kurz diskutiert werden sollen.

Eine **Erniedrigung der Zellzahl** resultierte in einer Verkürzung der Betriebszeit um etwa 100 - 130 h im Vergleich zu Prozess I. Nach Infektion wurde kein vollständiger Verbrauch des charakteristischen Substrats festgestellt und somit war keine Limitierung zu erwarten. Obwohl bei dieser Variation des Prozesses deutlich weniger Zellen lysiert wurden (~50% im Vergleich zu Prozess I), wurde ein vergleichbarer Titer erreicht. Dies lässt auf eine Erhöhung der Wurfzahl der infizierten Zellen schließen und bestätigt die postulierte Limitation. Eine deutliche Verbesserung zu Prozess I konnte jedoch mit dieser Betriebsweise nicht erreicht werden.

Eine **Erhöhung der Zellzahl** auf $X \sim 6 \cdot 10^6/\text{ml} \pm 20\%$ führte zu einem schnelleren Verbrauch der Substrate. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl war ohne Umstellung auf den kontinuierlichen Betrieb nicht empfehlenswert. Das Substrat war 24 - 36 h nach Infektion verbraucht und kurz darauf das gebildete Laktat verstoffwechselt. Der Verlauf des Virustiters zeigte kurz danach sein Maximum, welches mit $5,6 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ signifikant niedriger im Vergleich zu Prozess I war. An dieser Stelle muss eine deutlich geringere Wurfzahl („burst-size“) der Zellen gefolgert werden.

Auf Grund der höheren Microcarrierkonzentration wurde der volumenspezifische Leistungseintrag von $2-4 \text{ W}/\text{m}^3$ auf etwa $6 \text{ W}/\text{m}^3$ erhöht. Diese Änderung hatte keine negativen Auswirkungen auf das Verhalten der Kultur und wurde an dieser Stelle auf Grund des sehr niedrigen Leistungseintrages auch nicht erwartet. In der Zellkultur wurden Leistungseinträge zwischen 10 und $100 \text{ W}/\text{m}^3$ in der Literatur beschrieben [A. BIEDERMANN, H. J. HENZLER 1996, H. J. HENZLER 1999].

Vermutlich war die Virusvermehrung substratlimitiert. Die angestrebte Optimierung konnte über eine simple Erniedrigung oder Erhöhung der Zellzahl nicht erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde die Art der Betriebsweise variiert. Zunächst wurde eine Umgehung der Substratlimitierung über das einfache Prinzip der **mehrfachen Ernte** realisiert. Dieses und prinzipiell ähnliche Verfahren sind in der Literatur beschrieben [Amersham 2000].

Komplexe periphere Einrichtungen werden nicht benötigt. Die erhöhte Zellzahl führte auch in diesem Fall zu einem schnellen Verbrauch der Substrate und somit zur notwendigen Durchführung der ersten Ernte etwa 24 h nach Infektion. Entsprechend des kurzen Verlaufs der Infektion bis zur ersten Ernte von etwa 80% des Füllvolumens von 3,5 L betrug der Titer in dieser Ernte nur $4,1 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Der Großteil der Viren schien intrazellulär vorzuliegen. Nach Auffüllen des Reaktors auf das Ursprungsvolumen von 3,5 L wurde die Substratkonzentration wieder deutlich erhöht und parallel die Konzentration der Stoffwechselendprodukte erniedrigt. Eine Limitierung konnte somit umgangen werden. In der nach etwa 72 h Stunden durchgeführten zweiten Ernte (etwa 50 % des Reaktorvolumens) war entsprechend der Theorie auch ein signifikant erhöhter Virustiter mit $7,6 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ festzustellen. Im Folgenden wurde der Reaktor wieder mit frischem Medium aufgefüllt und der bei Abbruch des Reaktors (Ernte III) anfallende Überstand erreichte einen Titer von $7,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Die Betrachtung der gesamten Ernte (aus 1,2 und 3) zeigte insgesamt einen Titer von $7,1 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ bei einem im Vergleich zu Prozess I 2,2-fach erhöhtem Produktionsvolumen.

Die Wurffzahl mit diesem Verfahren konnte vermutlich deutlich gesteigert werden. Eine gesteigerte Virusvermehrung durch mehrfache Ernte liefert also einen deutlich erhöhten Virustiter und bestätigte ebenfalls die Theorie des limitierten Prozesses I. Zwar konnte eine signifikante Optimierung im Vergleich zu Prozess I erreicht werden, jedoch schien das Potenzial des Prozesses noch nicht vollständig ausgereizt zu sein.

Um eine weitere Erhöhung des Virustiters zu erreichen, wurde ein **Fed-Batch** Verfahren getestet. Die unter 4.4.4 dargestellten Ergebnisse im 10 L Bioreaktor und die zugehörigen Mengen der Fütterung wurden qualitativ aus dem Verlauf des Glukoseverbrauchs abgeschätzt. Wie bereits zuvor beschrieben, konnten die fehlerbehafteten spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten nicht zur Kalkulation exakter Fütterungsraten verwendet werden. Zudem konnte Glutamin und der Inhibitor Ammonium nicht zeitnah bestimmt werden. Dennoch konnte mit diesem Fed-Batch Verfahren mit durch insgesamt 4 Fütterungen der Virustiter signifikante gesteigert werden ($7,0$ bis $7,8 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$). Das akkumulierte Laktat als Marker für die Stoffwechselendprodukte wurde in diesem Fall nicht verstoffwechselt. Eine deutliche Steigerung der Laktatkonzentration im Vergleich zur maximal erreichten Konzentration im Prozess I konnte nicht festgestellt werden.

Das Fed-Batch Verfahren zeigte deutliche Schwankungen des erreichten Titers zwischen 7,0 und 7,8 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Gründe für diese Schwankungen könnten nicht identifizierte Inhibitoren oder eine Veränderung der Osmolalität gewesen sein, wobei letztere im Sicherheitsbereich S2 nicht bestimmt werden konnte. Die essentiellen Komponenten Glutamin und Ammonium konnten ebenfalls nicht zeitnah bestimmt werden, so dass eine notwendige Anpassung der Fütterung an diese Komponenten nicht möglich war. Variationen der Fütterungsmengen und auch eine dynamische Zufütterung (stetige Fütterung über eine Pumpe) wurden zwar getestet, resultierten jedoch nicht in einer erhöhten Robustheit des Verfahrens oder einer weiteren Steigerung des Virustiters (nicht dargestellt). Eine Anpassung der Fütterung an die Parameter Glutamin und Ammonium durch eine zeitnahe Messung unter Berücksichtigung der Osmolalität, hätten vermutlich eine Stabilisierung des Verfahrens bewirken können.

Generell wurden in der Literatur Vorschläge zur Entwicklung von Fed-Batch Verfahren beschrieben, deren Variation und Durchführung insbesondere zur Kultivierung von tierischen Zellen zur Herstellung von Antikörpern dienen [R. FIKE et al. 1983, M. W. GLACKEN et al. 1986, T. OMASE et al. 1992, J. LJUNGGREN, L. HÄGGSTRÖM 1994, R. PÖRTNER et al. 1996, W. C ZHOU et al. 1997, L. XIE, I. C. W. DANIEL 1997, P. W. SAUER et al. 2000, S. F. GORFIEN et al. 2003].

In diesen Publikationen wurde deutlich, dass ein exaktes stöchiometrische Modell und gute Analysemethoden zur Charakterisierung des Produktes einen essentiellen Bestandteil der Entwicklung eines fundierten Fed-Batch Verfahrens darstellen. Diese Modelle wurden beispielsweise für die Herstellung monoklonaler Antikörper in Hybridomazellen beschrieben [M. A. BREE et al. 1988, M. DALILI et al. 1990, E. TZIAMPAZIS, A. SAMBANIS 1996].

Ein solches Modell konnte auf Grund fehlender Analysemethoden, insbesondere einer Charakterisierung infizierter Zellen, nicht erstellt werden. Parameter für die Vermehrung von *PPVO NZ-2* waren nicht publiziert.

Ein Einfluss diverser Substanzen auf die Virusproduktivität, wie beispielsweise niedermolekularer Inhibitoren, konnte auf Grund der Problematik der Zellzahlbestimmung in stationären Kulturen nicht bestimmt werden. In der Literatur wurden diese Einflüsse für andere Zellen und Viren beschrieben [A. H. KOYAMA, T. UCHIDA 1989, T. HASSEL et al. 1991, H. A. HANSEN, C. EMBOGG 1994, M. SCHNEIDER et al. 1996].

Um Inhibitionen durch Laktat, Ammonium oder einen anderen unbekanntem niedermolekularen Inhibitor auszuschließen, wurde das Verfahren der externen **Dialyse** im 10 L Maßstab getestet. Ein sofort augenscheinlicher Nachteil des Verfahrens war die Zunahme der peripheren Einrichtungen (Zellabscheidung, Dialysem modul, etc.).

Die maximal erreichte Zelldichte im Reaktor war geringer als bei den vorangegangenen Verfahren, welche vermutlich durch einen geringen Austrag bewachsener Carrier über das einfache Abscheidesystem (Steigrohr) begründet war. Die Glukosekonzentration war zwar gering, führte aber nicht zwingend zu einer Limitierung. Die Dialyse ermöglichte eine deutliche Steigerung des Virustiters auf $7,7 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ in der Ernte. Dies bedeutete tendenziell ebenfalls eine signifikante Steigerung der Wurfzahl der Viren pro Zelle.

Das Verfahren der Dialyse und Kombinationen mit Fed-Batch Verfahren wurden in der Literatur beschrieben [D. Y. HSIANG et al. 1995, R. PÖRTNER, H. MÄRKL 1998, J. O. SCHWABE et al. 1999]. Hier handelte es sich um interne Dialysemembranen. Ein häufiges Problem stellte das sogenannte „biofowling“ und die damit verbundenen Minderung des Stofftransportes dar. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Ablagerung von Zelltrümmern auf der Membran beobachtet, welche mit Anstieg der virusbedingten Lyse der Zellen zunahm.

Neben der komplexen peripheren Einrichtung stellt sich die Frage der Skalierbarkeit des Systems. Das Verfahren der internen Dialyse (Dialysemembranen befinden sich im Gegensatz zur externen Dialyse im Reaktor selbst) wurde zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet [M. J. COMER et al. 1990] und wurde in der Vakzinherstellung bei Onderstepoort Biological Products, Südafrika beschrieben [R. PÖRTNER, H. MÄRKL 1998]. PÖRTNER und MÄRKL (1998) geben einen maximalen Maßstab von 1000 L für die interne Dialyse an. Dieser Maßstab hängt jedoch stark von den mit der benötigten Oberfläche der Membran korrelierenden physiologischen Charakteristika der kultivierten Zelle zusammen. Die externe Dialyse steigerte zwar den Titer, illustrierte jedoch bezüglich Robustheit, Handling und Skalierbarkeit deutliche Nachteile.

Auf Grund besserer Ergebnisse in parallelen Experimenten und des hohen Zeitdrucks während der Entwicklung, wurden die Entwicklungen im Fed-Batch Verfahren und der Dialyse eingestellt. Eine Optimierung des Fed-Batch durch Erweiterung der Analysemethoden scheint jedoch möglich und wurde durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse partiell bestätigt.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren des „**Volume-Expanded-Fed**“ **Batch** vereinigt mehrere Anforderungen und Vorteile der anderen Verfahren auf sich. Prinzip ist eine Erhöhung der Substratkonzentration und Verringerung möglicher Inhibitoren durch sequentielle Erhöhung des Produktionsvolumens nach Infektion.

Bedingt durch die Verdünnung konnte im Vergleich zu Prozess I keine erhöhte Konzentration der Stoffwechselprodukte oder der Osmolalität erwartet werden. Bei der dargestellten Verdünnung von 1:4 in den finalen Prozessmaßstab konnte trotz vierfachem Produktionsvolumen ein signifikant erhöhter Virustiter erreicht werden. Dabei war keine Verlängerung der Betriebszeit notwendig und es konnte eine signifikante Einsparung der teuren Microcarrier erzielt werden (50 g statt 200 g für eine 40 L Fermentation). Das Verfahren erwies sich als äußerst robust und ist für den Routineeinsatz in der Produktion einfach realisierbar. Im Vergleich zu Prozess I konnte die Produktivität im Schnitt um den Faktor 40 gesteigert werden. Es muss gefolgert werden, dass die Wurfzahl der Zellen signifikant erhöht wurde.

Variationen dieses Verfahrens wurden ebenfalls experimentell evaluiert. Eine direkte Verdünnung in das Endvolumen (direkte 1:4 Verdünnung) entspricht der Kultivierung geringerer Zellzahlen und führte im Vergleich zur zuvor beschriebenen sequentiellen Erhöhung des Produktionsvolumens zu einer signifikanten Verringerung des Virustiters ($\sim 6,8 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$). Im Vergleich zu Prozess I entsprach dies jedoch einer signifikanten Erhöhung der produzierten Viruspartikel und war vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem Fed-Batch Verfahren.

Die Reduktion der MOI auf 0.001 in diesem Verfahren mit sequentieller Erhöhung führte ebenfalls zu niedrigeren Virustitern ($\sim 6,8 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$). Wahrscheinlich stellt die MOI von 0.01 ein Optimum für die Virusvermehrung dar. Dennoch konnte im Vergleich zu Prozess I eine deutliche Erhöhung des Virustiters bei paralleler Reduktion der MOI auf 0,001 und somit eine Schonung des „Working Seeds“ erreicht werden.

Die folgende Abbildung stellt nochmals die Gesamtproduktivität der einzelnen Verfahren im Vergleich zu Prozess I dar.

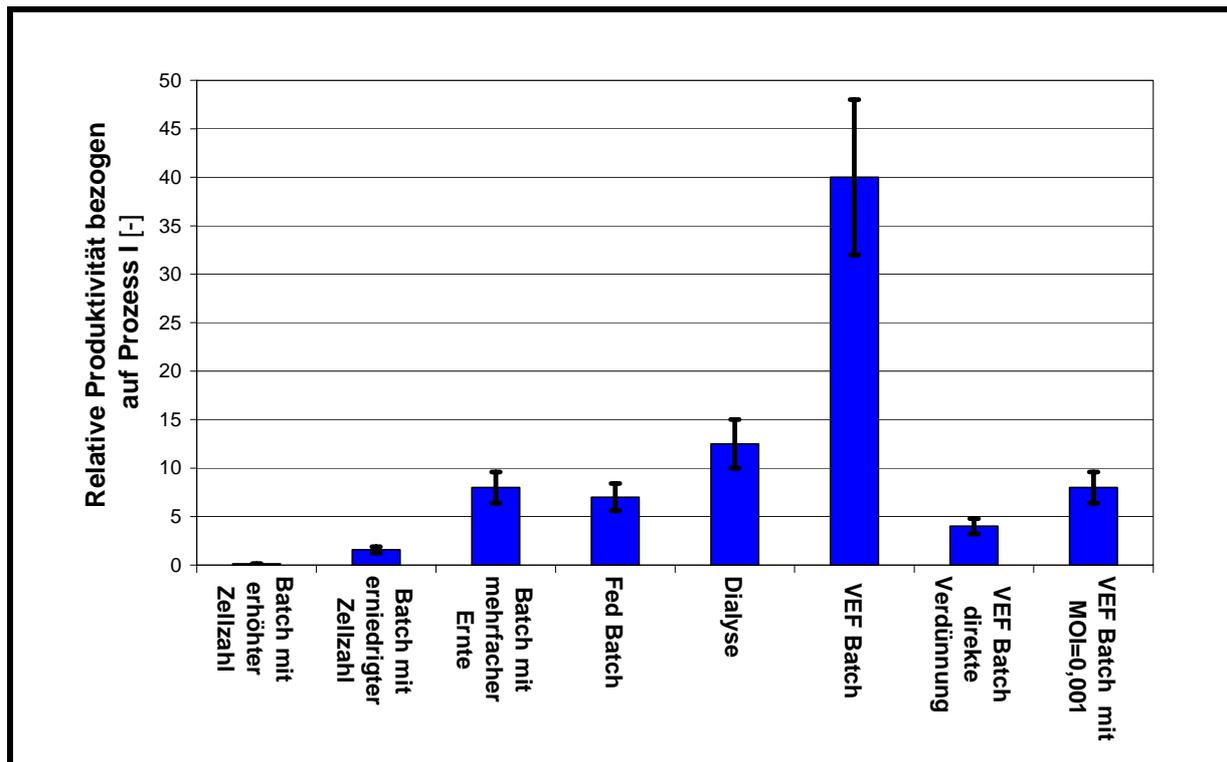


Abbildung 5-1: Relative Ausbeuten der Produktionsverfahren bezogen auf den biphasischen Batch Prozess im direkten Vergleich.

Die für die Dialyse und das „Volume-Expanded-Fed“ Batch Verfahren getestete DNA-Abreicherung in der Aufarbeitung war erfolgreich. Das größte Abreicherungspotenzial zeigten die Langzeitzentrifugation und die Stufe der Membranadsorption. Bedingt durch geringe Unterschiede im DNA-Gehalt nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen (Proteinase K, Benzonase) war zu folgern, dass nur ein geringer Teil freier DNA in der formulierten Suspension vorlag. Da es sich um ein Virus mit dsDNA (138 kbp) handelt, ist ein Verlust jeglicher DNA nicht zu realisieren.

Die Abreicherung der Wirtszellproteine war ebenfalls erfolgreich. Die größte Abreicherung wurde durch die Langzeitzentrifugation erreicht. In der formulierten Suspension der nach „Volume-Expanded-Fed“ Batch Verfahren mit der *BK KL 3A V* Zelle hergestellten Virussuspension betrug die Wirtszellproteinkonzentration 1 µg/ml. Daraus ergab sich ein HCP-Gehalt pro Dosis von 0,04 µg. Im Vergleich zu den nach Prozess I und Dialyse mit der *BK KL 3A V* Zelle hergestellten und formulierten Virussuspensionen illustrierte das Verfahren des „Volume-Expanded-Fed“ Batch ein um eine \log_{10} Stufe reduzierten DNA-Gehalt pro Dosis und ein um etwa zwei \log_{10} Stufen reduzierten Wirtszellproteinkonzentration pro Dosis (Abb. 4.33, S. 106).

Unter der Annahme, dass pro infektiösem Partikel etwa 100 nicht infektiöse Partikel gebildet wurden (unveröffentlichte Daten der Bayer HealthCare AG) wurden im dargestellten repräsentativen Lauf des „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit einem aufgearbeiteten Volumen von 8 L insgesamt etwa $5 \cdot 10^{13}$ Viruspartikel in die Aufarbeitung überführt. Nach der Diafiltration wurden nur noch $2 \cdot 10^{13}$ Viruspartikel nach der Berechnung über den $TCID_{50}$ ($7,9 \log_{10}(TCID_{50})/ml * 100 * 2500 \text{ ml}$) gefunden. Der Anzahl viraler Partikel in der letztlich formulierten Suspension betrug insgesamt $4 \cdot 10^{12}$. Dies entspricht einer Ausbeute von etwa 10%. Obwohl die Bilanzierung an Hand des fehlerbehafteten $TCID_{50}$ schwierig ist, deckt sich die Gesamtausbeute ~10% mit Erfahrungswerten der Bayer HealthCare AG (unveröffentlichte Daten). Eine Optimierung der Aufarbeitung könnte also eine weitere Erhöhung der Produktivität bedeuten, ist jedoch nicht Thema dieser Arbeit gewesen.

Die auf den Dosisgehalt eingestellten Suspensionen wurden nach Lyophilisation auf ihre therapeutische Wirksamkeit im transgenen HBV-Mausmodell getestet. Sowohl zwischen den Verfahren, als auch zwischen der etablierten *BK KL 3A* Zelle und der *BK KL 3A V* Zelle waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der therapeutischen Wirksamkeit erkennbar (Abbildung 4-34, S. 107).

5.3 Physikalische Beschreibung der Reaktoren

Um eine fundierte Maßstabsvergrößerung bis in den Produktionsmaßstab durchführen zu können, wurden verschiedene Reaktoren bezüglich Durchmischung, Scherbeanspruchung und Stofftransport in verschiedenen Geometrien bis in den 200 L Maßstab untersucht.

5.3.1 Leistungskennzahl und Durchmischung

Die über eine Drehmomentmessung bestimmte Leistungskennzahl nach Newton war über der Reynoldszahl im turbulenten Strömungsbereich konstant, wie es in der Literatur beschrieben wurde [H. J. HENZLER 1978]. Bezogen auf die jeweilige Rührergeometrie h/d , die maßgeblichen Einfluss auf die Newtonzahl besitzt, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Reaktoren zu erkennen (Abb. 4-36, S. 108f). Die experimentell ermittelten Newtonzahlen wurden über eine von Henzler entwickelten Beziehung überprüft und korrelierten zufriedenstellend. Die ermittelten Newtonzahlen korrelierten gut mit Literaturdaten [H. J. HENZLER 1978, A. BIEDERMANN 1994].

Um die Homogenisierungseigenschaften der Reaktoren zu überprüfen wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Während einer Fermentation im Pilotmaßstab mit erhöhter Carrierkonzentration (50 L, $H/D = 2$, 5g/L Microcarrier) wurde bei einem Leistungseintrag von 6 W/m^3 die Carrierverteilung durch Probennahme in verschiedenen Höhen des Reaktors ermittelt. Dabei konnte über der Reaktorhöhe keine Inhomogenität der konfluent bewachsenen Microcarrier festgestellt werden.

In den kleineren Maßstäben (3,5 und 10 L) erlaubte die Verwendung von Glasreaktoren eine visuelle Überprüfung der Reaktoren bezüglich Phasenbildung und „1s-Kriterium“. Dabei konnte für einen Leistungseintrag von 6 W/m^3 keine Phasenbildung und keine längere Verweilzeit einzelner Partikel im Klöpperboden der Reaktoren festgestellt werden. (Abb. 4-37, S 110).

Die mit Hilfe der Farbumschlagmethode ermittelte dimensionslose Mischzeitcharakteristik war für die einzelnen Reaktoren über der Reynoldszahl konstant. Dies wurde in der Literatur in turbulenten Systemen beschrieben [H. J. HENZLER 1978].

Die Variationen der Durchmischungskennzahlen (11 bis 29, Abb. 4-38, S. 111) sind durch die verschiedenen Geometrien der Reaktoren erklärbar. Generell muss die Durchmischungskennzahl auf die Geschwindigkeit der Reaktion bezogen werden, die in diesem Fall die Wachstumsrate μ der Zellen ist. Im Vergleich zur Wachstumsrate sind alle bestimmten Durchmischungskennzahlen klein.

5.3.2 Scherbeanspruchung

Die in den verschiedenen Reaktoren ermittelten Vergleichsflockendurchmesser zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktoren. Ein Einfluss der Rührergeometrie d/D und der Reaktorgeometrie H/D konnte nicht festgestellt werden. Die ermittelten Werte wiesen eine gute Korrelation zu in der Literatur publizierten Werten auf [A. BIEDERMANN 1994, A. BIEDERMANN, H. J. HENZLER 1996]. Die von Henzler und Biedermann postulierte Abhängigkeit des Vergleichsflockendurchmessers vom volumenspezifischen Leistungseintrag ($d_{VF} \sim (P/V)^{1/3}$) konnte ebenfalls bestätigt werden. Auf Grund der Sedimentation der Flocken konnten keine Experimente im Bereich von Leistungseinträgen kleiner 10 W/m^3 durchgeführt werden. Die Grenze der minimal benötigten Leistungseinträge lag generell im Bereich von 10 bis 20 W/m^3 . Der Betriebsbereich der Reaktoren lag deutlich unter diesem Bereich.

Eine Extrapolation der bei höheren Leistungseinträgen ermittelten Korrelation zwischen Leistungseintrag und Vergleichsflockendurchmesser in turbulenten Strömungsverhältnissen in den Betriebsbereich ist zulässig. Die turbulente Strömung war bei $Re > 10^4$ ab dem 10 L Reaktor vollständig ausgebildet. Im 3,5 L Reaktor wurden im Betriebsbereich Reynoldszahlen von 4200 bis 8300 berechnet, die sich im Übergangsbereich befinden. Ein Einfluss auf die Scherbeanspruchung wurde hier ebenfalls nicht erwartet und an Hand der praktisch durchgeführten Fermentationen ausgeschlossen.

Auf Grund der Ergebnisse war folglich eine vergleichbare Beanspruchung bis in den 200 L Maßstab zu erwarten. Bezüglich der Maßstabsvergrößerung sind keine weiteren Probleme zu erwarten (Abb. 4-39, S. 112). Das freie Volumen zwischen Rührblatt und Membranen, welches zur Energiedissipation zur Verfügung stand, war auf Grund der Theorie entscheidend für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Daher war es notwendig sowohl den Abstand des Rührblattes zur Membran nahezu (hier 10 mm +/- 1 mm), als auch die Wicklungsdichte der Membran in etwa vergleichbar zu halten. In dieser Arbeit betrug die Wicklungsdichte, gesteuert über die verwendeten Abstandshalter zwischen den Membranen etwa 55 – 60 % im Vergleich zur theoretisch möglichen Wicklungsdichte. Ein Wechsel auf eine deutlich höhere Wicklungsdichte zur Gewinnung von Membranfläche im Reaktor würde vermutlich zu einer Erhöhung der Scherbeanspruchung durch eine Verkleinerung des zur Energiedissipation zur Verfügung stehenden Volumens führen. Diese Theorie wird durch die ermittelte maximale Dissipationsenergie $\varepsilon_M = 0,08 \text{ m}^2/\text{s}^3$ bei vergleichbaren Vergleichsflockendurchmessern bestätigt (entspricht $P/V \sim 80 \text{ W}/\text{m}^3$). Vergleiche mit der Literatur [siehe H. J. HENZLER 1999, Figure 25, S. 76] zeigen unter Berücksichtigung des größeren Durchmessers der Zellen auf den Carriern eine vergleichbare Toleranz gegenüber der turbulenten Spannung wie Hybridomazellen. Daraus kann aus der Literatur eine Sterberate k_D von $\sim 0,001$ gefolgert werden [H. J. HENZLER 1999, Figure 25, S. 76], welche zur im Modell ermittelten natürlichen Sterberate k_D vergleichbar ist.

Die Fermentationen haben gezeigt, dass die ermittelte Spannung unkritisch für die verwendete *BK KL 3A V* Zelle im Reaktor ist.

5.3.3 Stofftransport

Im Rahmen der physikalischen Beschreibung wurde der Stofftransport der verwendeten Reaktoren bestimmt. Die Berechnungen wurden unter der Annahme reiner Sauerstoffbegasung und einer Gelöstsauerstoffkonzentration c_L von 40% Luftsättigung durchgeführt (2,6 mg O₂/ L).

Problematisch war eine genaue Charakterisierung der den Stofftransport maßgeblich determinierenden Membrandurchmesser im aufgewickelten Zustand. Die Annahme der vom Hersteller angegebenen Durchmesser war nicht zulässig und führte bereits bei geringen Drehzahlen zu unrealistischen negativen Werten. Die Abmaße der Membranen sind Funktionen des Druckes p und des Längenverhältnisses L/L_0 . Eine online Messung war nicht möglich. Diese Problematik wurde bereits in der Literatur beschrieben [H. J. HENZLER, J. KAULING 1996, H. J. HENZLER 1999, N. Q. HANSHI et al. 2003]. Mittels zum Teil publizierter Werte und einer Massenbilanz konnte eine Modellierung der Membrandurchmesser durchgeführt werden, mit denen eine plausible Charakterisierung der Membranbegasung möglich war [N. Q. HANSHI et al. 2003].

Die um die Oberflächenbegasung korrigierten k_a -Werte wiesen über der Drehzahl erwartete Steigerung des möglichen Stofftransportkoeffizienten auf. Der mögliche Stoffstrom G/V , der unter der geschilderten Annahme berechnet wurde, war in allen Fällen ausreichend, um eine Zellzahl von $X = 6 \text{ e}06/\text{ml}$ infizierter Zellen zu versorgen (Abb. 4-40, S. 116).

Die Unterschiede der k_a Werte zwischen den verschiedenen Maßstäben waren auf die volumenspezifischen Flächen a zurückzuführen. Der integrale Stofftransportkoeffizient k zeigte über dem volumenspezifischen Leistungseintrag keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4-40, S. 117) und bestätigten die in der Literatur beschriebenen Werte [H. J. HENZLER 1999].

Die im Reaktor unterzubringende volumenspezifische Fläche a ergab sich aus den Ergebnissen zu $a \sim 14/\text{m}$, um $X = 6 \text{ e}06/\text{ml}$ ausreichend zu versorgen. Eine leichte Erhöhung dieser Fläche ist zu empfehlen (CO₂ Austrag, stabilere Regelung, Erhöhung der Kapazität des Reaktors, etc.).

Die essentielle maßstäbliche Betrachtung wurde über den flüssigseitigen Stofftransportkoeffizienten k_L durch die Bestimmung der dimensionslosen Relation $Sh/Sc^{1/3}$ über der Reynoldszahl der Membran Re_T mit $Sc=215$ (für 37°C) durchgeführt.

Unter Annahme der berechneten Membrandurchmesser illustrierten die verschiedenen Reaktoren keine signifikanten Unterschiede untereinander. Die in der Literatur publizierten Werte korrelierten gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit [H. J. HENZLER, D. J. KAULING 1993, H. J. HENZLER 1999].

Mit zunehmender Drehzahl fand eine Annäherung von k zu k_L (Intensivierung des Stofftransportes durch Verringerung der Phasengrenzfläche) statt, wodurch sich teilweise unrealistische negative Werte in hohen Drehzahlbereichen ergaben.

Die Potenzierung geringster Abweichungen der Membrandurchmesser, ein erhöhter Einfluss der Oberflächenbegasung und ein möglicher Einfluss der Schwingungen der Membranen in Folge einer intensiveren Anströmung könnten mögliche Ursachen sein. Im Betriebsbereich der Reaktoren waren nur geringe Einflüsse der genannten Faktoren zu erwarten. Eine genauere Bestimmung der Membrandurchmesser war nicht möglich. Zudem war die bereits erwähnte Korrelation zu den in der Literatur publizierten Werten ausreichend. Ein Maßstabeffekt konnte aus der dimensionslosen Darstellung (Sh über Re_T) ebenfalls nicht gefolgert werden.

Die physikalische Beschreibung ergab keine Maßstabeffekte und somit keine Probleme im Rahmen der Maßstabsvergrößerung bis 200 L bezüglich Homogenisierung, Scherbeanspruchung und Stofftransport. Die durchgeführten Testläufe im 50 L Pilotmaßstab mit erhöhten Zellzahlen bestätigten die Experimente. Es wurde eine stabile Regelung erreicht.

5.3.4 Direkte Blasenbegasung („Sparging“)

Trotz der Verwendung von serumfreiem Medium war bereits unmittelbar nach Inokulation des Reaktors mit der Microcarrier-Zellsuspension eine starke Schaumbildung zu erkennen. Der größte Teil der Microcarrier befand sich im gebildeten Schaum und waren somit dem Prozess nicht mehr zugänglich. Dies wurde ebenfalls bei der Kultivierung von *FS-4* Zellen in serumhaltigem Medium beschrieben [R. J. FLEISCHAKER, A. J. SINSKEY 1981]. Medien mit erhöhtem Proteingehalt neigen zur Schaumbildung, worin sich Partikel, wie Microcarrier, absetzen („Floating“) [J. VORLOP, J. LEHMANN 1988].

In der Literatur rieten die Autoren teilweise von Sparging in Microcarriern ab. [J. AUNIS, H. J. HENZLER 1993, AMERSHAM 2000]. Negative Auswirkungen durch Adsorption und Desorption an der Phasengrenzfläche und dem Platzen der Blasen an der Oberfläche im Fall von Sparging wurden ebenfalls bei der Kultivierung von Suspensionszellen beschrieben [F. BAVARIAN et al 1991, A. BIEDERMANN 1994, H. J. HENZLER 1999]. Dennoch wurde das Verfahren der Blasenbegasung insbesondere bei der Kultivierung von Suspensionszellen etabliert. In der Vakzineherstellung und bei einigen Microcarrierprozessen wurden Verfahren teilweise mit Blasenbegasung und dessen Anwendung bis in den Pilot- oder Produktionsmaßstab beschrieben.

In zwei Fällen wird deutlich, dass zur Regelung kein konstanter Gasstrom verwendet wird, sondern entweder durch ein anderes Puffersystem als NaHCO_3 und CO_2 der pH-Wert geregelt wurde oder die Begasung über die Oberfläche realisiert und nur bei hohen Verbräuchen Gas zugetaktet wurde [B. BAIJOT et al. 1987, H. KALLEL et al. 2002].

Eine Implementierung der Blasenbegasung in dieser Arbeit wäre vermutlich mit einer Umstellung des Puffersystems und einer getakteten Begasung realisierbar gewesen. Einflüsse des Puffersystems und der bedingt durch Blasenbegasung auftretenden zusätzlichen Scherbeanspruchung hätten eine deutliche Verlängerung der Entwicklungszeit bedeutet und waren kurz vor der klinischen Phase I nicht zu realisieren. Einflüsse erhöhter Scherbeanspruchung während der Infektion von Insektenzellen mit dem *Baculovirus* wurden in der Literatur beschrieben [L. MARANGA et al. 2004]. Da eine ausreichende Versorgung der Zellen bis in den 200 L Maßstab mit dem verwendeten Membransystem realisiert werden konnte, wurde dementsprechend auf eine Umstellung des Verfahrens verzichtet. Weiterhin war eine Intensivierung des Membranbegasungsverfahrens durch verschiedene Maßnahmen, wie einer Erhöhung des Membrandruckes oder der Verwendung von „Multi-Statoren“, (Mehrfachanordnung von Statoren) möglich.

5.4 Abschließende Auslegung des möglichen Produktionsprozesses

In der Literatur wurden Microcarrierprozesse zur Vakzine- oder Virusherstellung bis in den Produktionsmaßstab beschrieben [B. J. MONTAGNON 1984, B. J. MONTAGNON 1984A, A. WIDELL et al. 1984, B. BAIJOT et al. 1987, W. MUNDT et al. 1998, F. S. LEU et al. 2001]. Der gewählte integrierte Ansatz von prozesstechnischen, verfahrenstechnischen und zellbiologischen Aspekten, unterstützt von einer mathematischen Modellierung des Microcarrierprozesses, hatten das Ziel, einen bezüglich Ausbeute, Robustheit und Sicherheit verbesserten Prozess im Produktionsmaßstab zu entwickeln.

Der erste Schritt, der sowohl die biologische Sicherheit erhöhte, als auch die Produktionskosten senken konnte, wurde durch die Adaptation der verwendeten *BK KL 3A* Zelle an serum- und proteinfreie (bis auf rekombinantes Insulin) realisiert.

Die generierte *BK KL 3A V* Zelle konnte in einem Medium frei von tierischen, pflanzlichen oder humanen Supplementen kultiviert werden. Da keine Suspensionszelle generiert werden konnte, wurde der Microcarrierprozess optimiert. Resultierend aus der Analyse des im Labormaßstab etablierten biphasischen Batch Prozesses, in welchem Limitationen während der Virusvermehrung festgestellt wurden, führten verschiedene Variationen der Prozessführung (Fed-Batch, Dialyse, etc.) zu einer robusten Prozessführung, die ohne komplexe periphere Einrichtungen zu einer signifikant erhöhten Gesamtausbeute des Prozesses führte, dem sogenannten „Volume-Expanded-Fed“ Batch. Eine direkte Expansion ohne Trypsinierung der Zellen durch Zugabe frischer Microcarrier zur Inokulation größerer Bioreaktoren in Verdünnungsstufen von 1:2 bis 1:5 erhöhte die Robustheit des Verfahrens und die ökonomische Effizienz des Prozesses.

Die physikalische Beschreibung der Reaktoren mit speziellem Augenmerk auf Stofftransport, Homogenisierung und Scherbeanspruchung der Reaktoren bis in den zuvor veranschlagten Produktionsmaßstab von 200 L zeigte bezüglich der Maßstabsvergrößerung keine signifikanten Probleme. Mit den ermittelten Stofftransportkoeffizienten und der auch in größeren Maßstäben bei $P/V = \text{const.}$ nicht zu erwartenden Erhöhung der hydrodynamischen Beanspruchung konnte unter Wahrung der geometrischen Ähnlichkeit zum 200 L Reaktor der Produktionsmaßstab auf 800 L im „Volume-Expanded-Fed“ Batch erhöht werden (Daten: $V=800$ L, $k = 0,055$, $a \sim 11/\text{m}$ im 1 m^3 Reaktor). Dies wäre in allen anderen Verfahren bei erhöhter Zellzahl nicht möglich gewesen. Die folgende Abbildung zeigt einen möglichen Produktionsprozess im industriellen Maßstab.

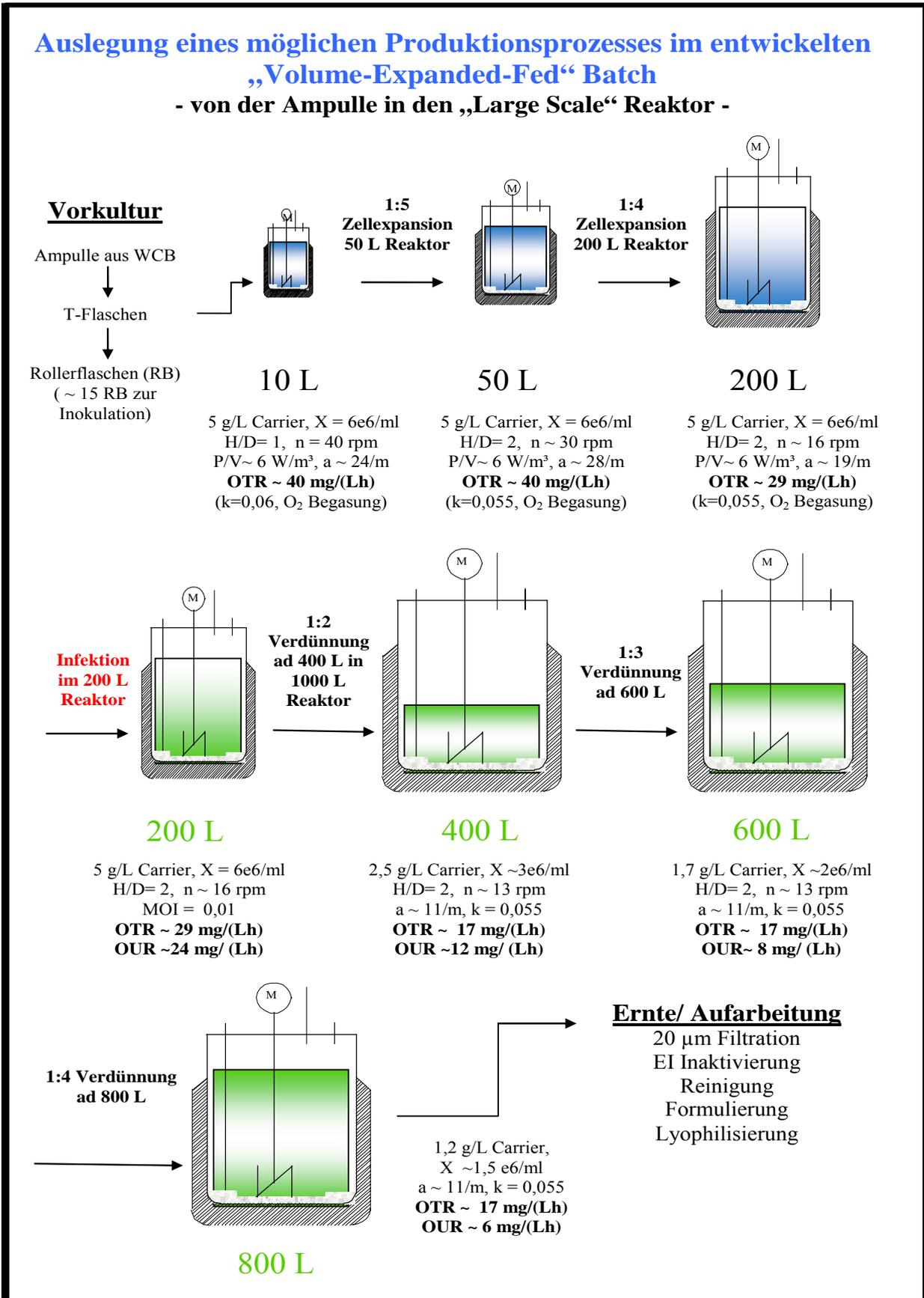


Abbildung 5-2: Auslegung des möglichen Produktionsprozesses. Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich auf den 200 L Maßstab.

Bis dato wurde *Parapoxvirus ovis* bei der Bayer HealthCare AG, Division Animal Health, Köln, Deutschland, als aktiver Bestandteil des Produktes Baypamune® im industriellen Maßstab in Wannenstapeln hergestellt. Aus GMP-Gesichtspunkten, steriltechnischen Gründen, der signifikanten Steigerung der Ausbeute und der Vergrößerung des maximalen Produktionsvolumens, stellt der entwickelte „Volume-Expanded-Fed“ Batch eine signifikante Verbesserung des etablierten Prozesses I dar. Das Verfahren wurde theoretisch bis in den Maßstab von 800 L ausgelegt, jedoch nicht praktisch durchgeführt.

Ein Verfahren zur Herstellung von *Parapockenviren* mit tierischen Zellen auf Microcarriern in Medium frei von tierischen, humanen oder pflanzlichen Bestandteilen, wurde bis dato nicht beschrieben. Ein Vergleich des ausgelegten Prozesses mit der anfänglichen Zielstellung dieser Arbeit illustriert das Erreichen der Ziele dieser Arbeit.

6 VERZEICHNISSE

6.1 Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau des Pockenviruspartikels. A: intracellular mature virus (IMV), B: extracellular enveloped virus (EEV) [S. Modrow, D. Falke 1997]. 7
- Abbildung 1-2: Schematischer Ablauf der Infektion und der Replikation der Pockenviren am Beispiel des Vacciniavirus [B. Moss 1990]. 9
- Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des etablierten Batch Prozesses (Prozess I). 14
- Abbildung 1-4: Schematischer Aufbau des Bioreaktors. Der Reaktor ist mit einem Statorkorb ausgestattet, auf dem die verwendeten Silikonmembranen mit Abstandhaltern gewickelt sind (vergrößerter Ausschnitt). Ein zentral angebrachter 2-Blatt Ankerrührer sorgt für eine ausreichende Homogenisierung und die notwendige Anströmung der Schläuche. 16

Theorie

- Abbildung 2-1: Vereinfachte schematische Darstellung des Energiestoffwechsels der Zelle. 18
- Abbildung 2-2: Darstellung der vier Modellansätze in der Biologie. 22
- Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Virusvermehrung im Modell. 27
- Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Adhäsion von Zellen an Oberflächen [AMERSHAM 2000]. 28
- Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der entwickelten Adaptationsstrategie beispielhaft in T-75 cm² Zellkulturflaschen. Ausgehend von einer serum-/ proteinhaltigen Kultur wird nach jeder Passage der Anteil an serum-/ proteinfreiem Medium sequentiell erhöht. Um die Selbstkonditionierung der Zellen auszunutzen, werden in den Passagen etwa 10% konditioniertes Medium aus der vorherigen Passage verwendet. 31
- Abbildung 2-6: Exemplarische Darstellung der verschiedenen Betriebsweisen Batch, Fed-Batch und Perfusion mit Zellrückhaltung (Prinzipieller Aufbau und zeitlicher Verlauf). 32
- Abbildung 2-7 : Schematischer Verlauf des Sauerstofftransportes von der Gasphase im Membranschlauch über die Membran in die Flüssigkeit [H. J. BRÄUTIGAM 1985]. 40

Materialien & Methoden

- Abbildung 3-1: Fließschema zum prinzipiellen Ablauf der Aufarbeitung. Bezeichnungen und Bedeutung der gezogenen Proben sind ebenfalls dargestellt. 53
- Abbildung 3-2: Prinzipieller Aufbau der zur physikalischen Beschreibung verwendeten Reaktoren. Details zu den Abmessungen der Reaktoren sind im Anhang aufgeführt. 59
- Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Messprinzips der Laser-Scanning-Sonde. 63
- Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung des k_a -Wertes. Zunächst wird das aus dem Hausanschluss bezogene Gas (N_2 oder Pressluft) über einen Druckminderer geführt, um Druckschwankungen in der Hausleitung abzufangen (nicht dargestellt). Über ein Nadelventil wird der Durchfluß, welcher am Rotameter angezeigt wird, eingestellt. Der entstehende Druckverlust in Zuleitung und Membrankorb wird über ein kalibriertes Manometer gemessen. Um eine ausreichende Anströmung der Sauerstoffsonde zu gewährleisten, wird diese rührernah eingebaut. 65

Ergebnisse

- Abbildung 4-1: Verlauf der Zellzahl während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V. Für die Passagen 205 bis 207 ist der jeweilige Anteil (V/V) C7PMF 3.2295A V in Klammern angegeben. Für die Passagen 208 bis 219 ist die Gesamtzahl der ausschließlich in C7PMF 3.2295A V kultivierten Passagen angegeben. 67
- Abbildung 4-2: Verlauf der Vitalität während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V. 68
- Abbildung 4-3: Verlauf des mittleren Durchmessers der Zellen während und nach der Adaptation der *BK Klon 3A* Zelllinie an C7PMF 3.2295A V. 68
- Abbildung 4-4: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion im Kontrollmedium (50-fach vergrößert). Einige Plaques sind markiert. 69
- Abbildung 4-5: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion in OptiPro[®] SFM (50-fach vergrößert). 70
- Abbildung 4-6: Lichtmikroskopische Aufnahme der Virusvermehrung vier Tage nach Infektion in SMIF[®] 8 (200-fach vergrößert). 70

- Abbildung 4-7: Darstellung des während der Virusvermehrung erreichten maximalen Virustiters $\log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$. Der Verdünnungsfehler der Bestimmungsmethode von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde ebenfalls eingezeichnet (n=5, MOI = 0,01). 71
- Abbildung 4-8: Vergleich der Infektionskinetik zwischen der an C7PMF 3.2295A V (▲) adaptierten Zelllinie und der in C7PMF 3.2292 C (◆) kultivierten *BK Kl 3 A* Zelllinie (Kontrolle). Der Verdünnungsfehler von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde ebenfalls eingezeichnet. 72
- Abbildung 4-9: Repräsentativer Vergleich der beiden Zelllinien im 10 L Bioreaktor kultiviert nach Prozess I (*BK KL 3A*: Zellzahl◆, Virustiter●; *BK KL 3A V*: Zellzahl■, Virustiter▲). Der Verdünnungsfehler von $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ ist eingezeichnet. 73
- Abbildung 4-10: Lichtmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen Fermenterprobe 48 h nach Inokulation des Reaktors. 74
- Abbildung 4-11: Lichtmikroskopische Aufnahme vollständig konfluent bewachsener Microcarrier nach 8 bis 10 Tagen Kultivierung (teilweise Multilayer Bildung). 75
- Abbildung 4-12: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Fermenterprobe kurz vor Ernte. 75
- Abbildung 4-13: Vergleich der Virustiter im biphasischen Batchprozess zwischen der etablierten *BK Klon 3A* Zelllinie und der neu generierten *BK Klon 3A V* Zelllinie. Die eingetragene Abweichung stellt die maximale Abweichung von $\pm 0,4 \log_{10}$ Stufen dar. 76
- Abbildung 4-14: Repräsentative Darstellung der direkten Zellexpansion im Bioreaktor bis in den auf diese Weise getesteten Pilotmaßstab (Zellzahl◆, Virustiter●). 81
- Abbildung 4-15: Repräsentativer Verlauf der Fermentation nach Prozess I. (Zellzahl■, Glukose◆, Laktat●, Virustiter▲ $\pm 0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ (Verdünnungsfehler). 82
- Abbildung 4-16: Repräsentativer Verlauf auffälliger Aminosäuren, sowie Ammonium und Harnstoff nach Infektion im Prozess I. Die Glukose war nach etwa 48 h verbraucht (siehe Abb. 4-15) 83
- Abbildung 4-17: Vergleich der Simulation mit den experimentell ermittelten Fermentationsdaten für den etablierten Microcarrierprozess. Die Simulation ist als Linie dargestellt (Experimentelle Daten: Glukose△, Zellzahl□). Die experimentellen Glukosedaten wurden nur bis zum ersten Medienwechsel dargestellt. 85

- Abbildung 4-18: Verlauf der Simulation (blau Glukose, rot Zellzahl) im Vergleich zu den experimentellen Daten während der Virusvermehrung (Glukose Δ , Zellzahl \circ). Die ermittelte Abweichung von +/- 15% für die Zellzahlbestimmung ist ebenfalls dargestellt. 87
- Abbildung 4-19: Verlauf der Viruspropagation nach Infektion. Die Simulation wurde mit den experimentell bestimmten Daten verglichen. Der Verdünnungsfehler der Bestimmungsmethode von +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$ wurde eingezeichnet. Die Simulation ist als Linie dargestellt (Virustiter \square) 88
- Abbildung 4-20: Repräsentativer Verlauf im Batch-Verfahren mit erniedrigter Zellzahl. (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) 89
- Abbildung 4-21: Repräsentativer Verlauf im Batch-Verfahren mit erhöhter Zellzahl. (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) 90
- Abbildung 4-22: Verlauf der Fermentation mit mehrfacher Ernte nach Infektion und anschließendem Auffüllen des Reaktors mit Frischmedium. (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) 92
- Abbildung 4-23: Verlauf des Fed-Batch Verfahrens nach Infektion im 10 L Reaktor. (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) 93
- Abbildung 4-24: Schematischer Aufbau des Dialyseverfahrens. 95
- Abbildung 4-25: Verlauf der externen Dialysefermentation nach Infektion im 10 L Reaktor H/D = 1. (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$) 96
- Abbildung 4-26: Schematische Darstellung des „Volume-Expanded-Fed“ Batch. Die angegebenen Verdünnungsstufen beziehen sich auf das Volumen der Vorkultur ($M = \text{Motor}$). 98
- Abbildung 4-27: Repräsentativer Verlauf des „Volume-Expanded-Fed“- Batch nach Infektion (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$, Volumen X). 99
- Abbildung 4-28: Variation des VEF-Batch durch direkte 1:4 Verdünnung nach Infektion (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$, Volumen X). 100
- Abbildung 4-29: Verlauf der Virusvermehrung im „Volume-Expanded-Fed“ Batch mit verringerter $\text{MOI} = 0,001$ (Zellzahl \blacksquare , Glukose \blacklozenge , Laktat \bullet , Virustiter \blacktriangle +/- $0,3 \log_{10}(\text{TCID}_{50})/\text{ml}$, Volumen X). 101

- Abbildung 4-30: Exemplarische DNA-Abreicherung während der Aufarbeitung bis zur formulierten Suspension (D 02). A01: Nach Inaktivierung, A03: Nach Zentrifugation und 3/0,8 µm Filtration, B02: Nach zweiter Zentrifugation, C01: Nach Membranadsorber, D01: Nach Diafiltration, D02: Nach Tiefen- und Sterilfiltration (Unbehandelt ■, Proteinase K ■, Benzonase □). 103
- Abbildung 4-31: Exemplarische Abreicherung der Wirtszellproteine während der Aufarbeitung. A01: Nach Inaktivierung, B02: Nach zweiter Zentrifugation, C01: Nach Membranadsorber, D02: Nach Tiefen- und Sterilfiltration. 104
- Abbildung 4-32: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach dem “negative staining” Verfahren. Die Quantifizierung wurde am ZUD durchgeführt. Das Viruspartikel ist mit P markiert und die verwendeten Latexbeads sind mit L gekennzeichnet. Die unter 1.1 beschriebene Oberflächenstruktur der Viruspartikel ist deutlich zu erkennen. 105
- Abbildung 4-33: Vergleich der verschiedenen Verfahren bezüglich Wirtszellprotein- und DNA-Gehalt pro Dosis (VEF-Batch = “Volume-Expanded-Fed” Batch, DNA- Gehalt ■, Wirtszellproteine (HCP-Gehalt) ▨). 106
- Abbildung 4-34: Vergleich der *in-vivo* Wirksamkeit von PPVO hergestellt mit der adaptierten Zelllinie und nach verschiedenen Verfahren. (transgenes HBV-Maus-Modell, Labor Dr. Paulsen, Virologie, Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Deutschland). 107
- Abbildung 4-35: Darstellung der Leistungscharakteristik der verschiedenen Reaktoren. 108
- Abbildung 4-36: Newtonzahl bezogen auf die Rührergeometrie $(h/d)^{0,809}$. 109
- Abbildung 4-37: Verteilung der konfluent bewachsenen Microcarrier im 50 L Bioreaktor, H/D = 2. 110
- Abbildung 4-38: Darstellung der Mischzeitcharakteristik verschiedener Reaktoren. Der Homogenisierungsgrad M beträgt 95%. Die ermittelten Durchmischungskennzahlen sind für den jeweiligen Reaktor in der Abbildung dargestellt. 111
- Abbildung 4-39: Darstellung des Vergleichsflockendurchmessers d_{VF} über dem volumenspezifischen Leistungseintrag P/V für die verschiedenen Reaktoren. 112
- Abbildung 4-40: Korrigierter k_a Wert und möglicher Stoffstrom G/V für die getesteten Maßstäbe (reine Sauerstoffbegasung, $c_L = 2,6$ mg/L). 116
- Abbildung 4-41: Darstellung des integralen Stofftransportkoeffizienten k über P/V. Der in dieser Arbeit getestete Arbeitsbereich ist durch die roten gestrichelten Linien dargestellt. Die von J. G. Aunis und H. J. Henzler (1993) publizierten Daten sind ebenfalls dargestellt. 117

- Abbildung 4-42: Darstellung der dimensionslosen Beziehung $Sh/Sc^{1/3}$ über Re_T . Die Berechnungen wurden für 37°C durchgeführt ($Sc=215$). 118
- Abbildung 4-43: Schematischer Aufbau des Reaktors im Testlauf mit Sparging. 120
- Abbildung 4-44: Fotografische Aufnahme des 3,5 L Bioreaktors im Testlauf mit Sparging unmittelbar nach Inokulation. Dargestellt ist eine Nahaufnahme des oberen Teils des Reaktors. 121
- Abbildung 4-45: Fotografische Aufnahme des 3,5 L Bioreaktors im Testlauf mit Sparging unmittelbar nach Inokulation. Abbildung des gesamten Reaktors. 121

Diskussion

- Abbildung 5-1: Relative Ausbeuten der Produktionsverfahren bezogen auf den biphasischen Batch Prozess im direkten Vergleich. 136
- Abbildung 5-2: Auslegung des möglichen Produktionsprozesses. Die angegebenen Verdünnung beziehen sich auf den 200 L Maßstab. 144

6.2 Tabellenverzeichnis

Theorie

Tabelle 2-1: Parameter des Prozessmodells für die Generierung von Biomasse.	25
Tabelle 2-2: Parameter des Prozessmodells für die Virusvermehrung.	26
Tabelle 2-3: Variablen des Prozessmodells.	26

Materialien & Methoden

Tabelle 3-1: Physikalische Charakteristika der verwendeten Cytodex-3 Microcarrier [Amersham 2000].	51
--	----

Ergebnisse

Tabelle 4-1: Ermittelte Wachstumsraten (dX/dt) der <i>BK Klon 3A</i> Zelllinie nach Adaptation an verschiedene Medien. Dargestellt ist der aus fünf T-Flaschen bestimmte Mittelwert.	66
Tabelle 4-2: Tabellarische Darstellung der eingesetzten Zellen, verwendeten Kultivierungssysteme, Inokulationsdichten und zusätzlich verwendeten Supplemente.	77
Tabelle 4-3: Bestimmung der Respirationsrate während der Vorkultur in 6 Fermentation. Die Respirationsrate r_X ist für $X = 1 \text{ e}06/\text{ml}$ angegeben.	78
Tabelle 4-4: Bestimmung der Respirationsrate 15 - 36 h nach Infektion der Kultur. Die Respirationsrate des infizierten Systems r_X ist für $X=1 \text{ e}06/\text{ml}$ angegeben.	78
Tabelle 4-5: Ermittelte zellspezifische Raten der Kultur im Bioreaktor vor Infektion.	79
Tabelle 4-6: Modellparameter vor und nach Optimierung. Die Parameter wurden aus den Fermentationsdaten abgeschätzt. Die maximale Zellzahl X_{Max} und die Sterberate k_D wurden nicht optimiert.	84
Tabelle 4-7: Für die Phase der Virusvermehrung ermittelte Parameter.	86
Tabelle 4-8: Gefütterte Substanzen und Volumina während des Fed-Batch Verfahrens.	93

Tabelle 4-9: Vergleich der durchgeführten Verfahren bezogen auf Prozess I.	102
Tabelle 4-10: Darstellung der ermittelten Gesamtkonzentration viraler Partikel laut qEM.	106
Tabelle 4-11: Vergleich der experimentell ermittelten Newtonzahl zur Abschätzung nach HENZLER.	109
Tabelle 4-12: Berechnete Korrekturen der Durchmesser, Betriebsbedingungen in den Reaktoren und resultierende Charakteristika der Membranen (q , Δp , L/L' , f , k_M^{-1} , a').	114

Diskussion

Tabelle 5-1: Erfolgreich an SMIF [®] - Medien adaptierten Zellen [SCHARFENBERG et al. 1997].	123
Tabelle 5-2: Erfolgreich an OptiPro [®] SFM - Medium adaptierte Zellen, die zur Virusvermehrung eingesetzt werden [P. PRICE et. al. 2002].	124

6.3 Literaturverzeichnis

1. **ADAMSON S.R., FITZPATRICK S.L., BEHIE L.A., GAUCHER G.M., LESSER B. H.**, „In vitro production of high titre monoclonal antibody y hybridoma cells in dialysis culture“
Biotechnol. Letters, 5, No. 9, 573-578, 1983
2. **AMERSHAM BIOSCIENCES** „Microcarrier Cell Culture- Principles and Methods“,
Handbook, Edition AA, 18-1140-62, 2000
3. **AUNIS J. G., HENZLER H.-J.**, “Aeration in Cell Culture”, in Biotechnology, Vol. 3 VCH,
1993
4. **BAIJOT B., DUCHENE M., STEPHENNE J.**, „Production of Aujeszky Vaccine by
Microcarrier Technology“, Develop. Biol. Standard, 66, 523-530, 1987
5. **BAILEY J. A., OLLIS D.F.**, „Biochemical Engineering Fundamentals“, Mc Graw Hill,
1977
6. **BALASSAU T. C., ROBINSON A. J.**, „Orf virus replication in bovine testis cells: kinetic of
viral DNA, polypeptides, and infectious virus production and analysis of virion
polypeptides“, Arch. Virol., 97, 267 – 287, 1987
7. **BARNES D., SATO G.**, “Serum free cell culture: A unifying approach”, Cell, 22, 649-655,
1980
8. **BAVARIAN F., FAN L. S., CHALMERS J. J.**, „Microscopic visualisation of insect cell
bubble interactions. I: Rising bubbles, air medium interface, and the foam layer“,
Biotechnol. Prog., 7, 140, 1991
9. **BIBLIA T.A., ROBINSON D.K.**, “In pursuit of the optimal fed-batch process for
monoclonal antibody production“, Biotechnol. Progr., 11, 1-13, 1995
10. **BIEDERMANN A.**, “Scherbeanspruchung in Bioreaktoren”, Dissertation, Universität Köln,
1994

11. **BLÜSCHER K.**, „Scherbeanspruchung in Bioreaktoren“, Diplomarbeit Universität Paderborn, 1993
12. **BÖDEKER B. G. D.**, „The Manufacturing of the Recombinant Factor VIII, Kogenate“, *Transfusion Medicine Reviews*, 6, No. 4, 256-260, 1992
13. **BÖDEKER B. G. D.**, „Production Processes of Licensed Recombinant Factor VIII Preparations“, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 27, No. 4, 2001
14. **BÖTTCHER E.**, Extract of Symposium about Immunomodulators of the W.A.V.M.I., Perugia, Italy, 1994
15. **BRÄUTIGAM H.-J.**, „Untersuchungen zum Einsatz von nichtporösen Kunststoffmembranen als Sauerstoffeintragssystem“, Dissertation, TH Hamburg-Haburg, 1985
16. **BREE M. A., DHURJATI P., GEOGHEGAN R. F., ROBNETT B.**, „Kinetic modelling of hybridoma cell growth and immunoglobulin production in a large scale suspension culture“, *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 1067 – 1072, 1988
17. **BÜNTEMEYER H., BÖDEKER B. G. D., LEHMANN J.**, „Membrane-stirrer-reactor for bubble free aeration and perfusion“, in Spier RE, Griffiths JB *Modern Approaches to Animal Cell Technology* Butterworth & Co, Ltd., 411 – 419, 1987
18. **BÜTTNER M., CZERNY C. P., LEHNER K. H., WERTZ K.**, „Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs“, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46, 237 – 250, 1995
19. **CHEN Z., CHEN Y., SHI K.**, „Microcarrier culture of fish cells and viruses in cell culture bioreactor“ *Can. J. Microbiol.*, 38, 222-225, 1992

20. **CHALMERS J. J.**, „The effect of hydrodynamic forces on insect cells“, Insect Cell Cultures: Production of Viral Biopesticides and Protein from Recombinant DNA, Hanser, 1993
21. **CHANG Y. H., GRODZINSKY A., WANG D. I. C.**, „In-Situ Removal of Ammonium and Lactate through Electrical Means for Hybridoma Cultures“, Biotechnol Bioeng., 47, 308 – 318, 1995
22. **COMER M. J., KEARNS M. J., WAHL J., MUNSTER M., LORENZ T., SZPERALSKI B., KOCH S., BEHRENDT U., BRUNNER H.**, „Industrial production of monoclonal antibodies and therapeutic protein by dialysis fermentation“, Cytotechnology, 3, 295 – 299, 1990
23. **COTÉ P., BERSILLON J. L., HUYARD A.**, „Bubble free aeration using membranes: mass transfer analysis“, Journal of Membrane Science, 47, 91 – 106, 1989
24. **CRESPI C. L., THILLY W. G.**, „Continuous Cell Propagation Using Low Charge Microcarriers“, Biotechnol. Bioeng., 23, 983-993, 1981
25. **CZERNY C. P., WALDMANN R., SCHEUBECK T.**, „Identification of three distinct antigenic sites in parapoxvirus“, Archives of Virology, 142, 807 - 821, 1997
26. **DAUN G.**, „Sauerstoffversorgung bei der Kultivierung tierischer Zellen“, Praxissemester Bayer Technology Services GmbH, Wuppertal, 1990
27. **DALILI M., SAYLES G. D., OLLIS D. F.**, „Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: Experiment and model“, Biotechnol. Bioeng., 36, 74 – 82, 1990
28. **DUNN I.J., HEINZLE E., INGHAM J., PRENOSIL J. E.**, „Biological Reaction Engineering“, Wiley-VCH, ISBN 3-527-29776-6, 2000
29. **DUCOMMUN P., RUFFIEUX P.-A., FURTER M.-P., MARISON I., VON STOCKAR U.**, „A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures“, J. of Biotechnol., 78, 139-147, 2000

30. **DÜRRSCHMID M. P., LANDAUER K. H., SIMIC G., KLUG H., KEIJZER T., TRAMPLER F., OUDSHOORN A., GÖSCHL M., MÜLLER D., DOBLHOFF-DIER O.**, „Comparison of Fluidized Bed and Ultrasonic Cell Retention Systems for High Cell Density Mammalian Cell Culture“, *Biotechnol. Prog.* 19, 1045-1048, 2003
31. **DÜRRSCHMID M. P., LANDAUER K., SIMIC G., BLÜML G., DOBLHOFF-DIER O.**, „Scalable Inoculation Strategies for Microcarrier-Based Animal Cell Bioprocesses“, *Biotechnol. Bioeng.*, 83, 6, 2003
32. **EAGLE H.**, “The Salt Requirements of Mammalian Cells in Tissue Culture”, *Arch. Biochem. Biophys.* 61: 356-366, 1956
33. **EAGLE H., BARBAN, S., LEVY, M., SCHULZE, H.O.**, “The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures ”, *J. Biol. Chem.* 233: 551-558 61: 356-366, 1958
34. **EAGLE H., 1959**, “Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures ”, *Science* 130: 432-437, 1959
35. **EISENKRÄTZER D.**, “Scherbeanspruchung in Bioreaktoren”, Diplomarbeit an der Otto-von-Guericke Universität, 1995
36. **ENGASSER J. M.**, „Bioreactor Engineering: The Design and Optimization of Reactors with living Cells“, *Chem. Eng. Science*, 43, 8, 1739-1748, 1988
37. **FIKE R., KUBIAK J., PRICE P., JAYME D.**, „Feeding Strategies for Enhanced Hybridoma Productivity: Automated Concentrate Supplementation“, *BioPharm*, 49-54, Oct. 1983
38. **FLEISCHAKER R. J., SINSKEY A. J.**, „Oxygen Demand and Supply in Cell Culture “, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 12, 193-197, 1981
39. **FROESCH E.R., SCHMID C., SCHWANDER J., ZAPF J.**, „Actions of insulin-like growth factors“, *Ann. Rev. Physiol.*, 443 – 467, 1985

40. **GAWLITZEK M., VALLEY U., NIMTZ M., WAGNER R., CONRADT H.S.**, „Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions“, *J. of Biotechnol.*, 42, 117-137, 1995
41. **GAWLITZEK M., CONRADT H. S., WAGNER R.**, „Effect of Different Cell Culture Conditions on the Polypeptide Integrity and N-Glycosylation of a Recombinant Model Glycoprotein“, *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 536-544, 1995
42. **GLACKEN M. W., FLEISCHAKER R. J., SINSKEY A. J.**, „Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up“, *Trends in Biotechnol.*, 1, No. 4, 1983
43. **GLACKEN M. W., FLEISCHAKER R. J., SINSKEY A. J.**, „Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells“, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1376 - 1389, 1986
44. **GORFIEN S. F., PAUL W., JUDD D., TESCIONE L., JAYME D. W.**, „Optimized Nutrient Additives for Fed-Batch Cultures“, *BioPharm Intern.*, 34-40, April 2003
45. **GRIFFITHS J. B., CAMERON D. R., LOOBY D.**, „A Comparison of Unit Process Systems For Anchorage Dependent Cells“, *Develop. Biol. Standard*, 66, 331-338, 1987
46. **GIULIANO M., VENTO R., LAURICELLA M., CALVARUSO G., CARABILLO M., TESORIERE G.**, „Role of insulin-like growth factors in autocrine growth of human retinoblastoma Y79 cells“, *Eur. J. Biochem.*, 236, 523 – 532, 1996
47. **GUIDOTTI L. G., BORROW P., HOBBS M. V., MAZKE B., GRESSER E., OLDSTONE M. B. A., CHISARI F. V.**, „Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver“, *Proc. Natl. Acad. Science*, 93, 4589 – 4594, 1996
48. **GRÖNER A., VORLOP J.**, „Animal Cells and Processes for the Replication of Influenza Viruses“, United States Patent, US 6,455,298 B1, 2002

49. **HAIG D. M., MERCER A.**, „Orf“, Vet. Res., 29, 311-326, 1998
50. **HAIG D. M., MCINNIS C. J., MOSS B.**, „Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus“, Virus Research, 88, 3-16, 2002
51. **HASSELL T., GLEAVE S., BUTLER M.**, „Growth Inhibition in Animal Cell Culture“, Applied Biochemistry and Biotechnol., 31, 29-41, 1991
52. **HANSEN H. A., EMBORG C.**, „Influence of Ammonia on Growth, Metabolism, and Productivity of a Continuous Suspension Chinese Hamster Ovaria Cell Culture“, Biotechnol. Prog., 10, 121-124, 1994
53. **HANSHI N. Q., GOUDAR C. T., MICHAELS J. D., HENZLER H. J., JOVANOVIĆ G. N., KONSTANTINOV K. B.**, “Experimental and Theoretical Analysis of tubular membrane”, Biotechnol. Progress, April 2003
54. **HEENEMANN S., DEUTZ N.E.P., BURMAN W.A.**, „The concentrations of glutamine and ammonia in commercially available cell culture media“, J. of Imm. Methods, 166, 85-91, 1993
55. **HENZLER H.-J., KAULING D. J.**, “Oxygenation of Cell Culture”, Bioprocess Engineering, 9, 61-75, 1993
56. **HENZLER H.-J.**, “Untersuchungen zum Homogenisieren von Flüssigkeiten oder Gasen”, VDI Forschungsbericht 587, 1978
57. **HENZLER H.-J.**, “Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter”, Chem.-Ing. Tech., 54, No. 5, 461 – 476, 1982
58. **HENZLER H.-J.**, “Particle Stress in Bioreactors”, in Influences of Stress on Cell Growth and Product Formation, in Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 1999

59. **HENZLER H.-J., BIEDERMANN A.**, “Modelluntersuchungen zur Partikelbeanspruchung in Reaktoren”, Chem. Ing. Technol, 68, 1546-1561, 1996
60. **HESSE F., WAGNER R.**, “Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures ”, Biotechnol. Progress, April 2000
61. **HSIANG Y., CHANG D., GRODZINSKY A. J., WANG D. I. C.**, „In situ removal of ammonium and lactate through electrical means for hybridoma cultures“, Biotechnol. Bioeng., 47, 308-318, 1995
62. **HU W. S., AUNIS J. G.**, “Large-scale mammalian cell culture”, Current Opinion in Biotechnol., 8, 148 – 153, 1997
63. **HUNT S. M. N., PAK S. C. O., BRIDGES M. W., GRAY P. P., SLEIGH M. J.**, „Chinese hamster ovary cells produce sufficient recombinant insulin-like growth factor I to support growth in serum free medium“, Cytotechnol., 24, 55-64, 1997
64. **IKONOUOMO L., DRUGMAND J.-C., BASTIN G., SCHNEIDER Y.-J., AGATHOS S. N.**, „Microcarrier Culture of Lepidopteran Cell Lines: Implications for Growth and Recombinant Protein Production“, Biotechnol. Prog., 18, 1345-1355, 2002
65. **JÄGER V., LEHMANN J., FRIEDEL P.**, “Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors”, Cytotechnology, 1, 319-329, 1988
66. **JAYME D. W., SMITH S. R.**, “Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminations in animal cell culture“, Cytotechnology 33, 27- 36, 2000
67. **KALLEL H., ROUROU S., MAJOU 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., 61,441-446, 2002

-
68. **KARLSON P., DOENECKE D., KOOLMAN J.**, "Biochemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994
69. **KILLINGER A.**, „Zellzucht im industriellen Maßstab“, Biotech Forum 5, 260-264, 1988
70. **KOYAMA A. H., UCHIDA T.**, „The effect of ammonium chloride on the multiplication of herpes simplex virus type 1 in Vero cells“, Virus Research, 13, 271-282, 1989
71. **KRAUME M.**, „Homogenisieren in Rührbehältern“, in Mischen und Rühren, VDI, 1998
72. **KRUSE N., WEBER O.**, „Selective Induction of Apoptosis in Antigen-Presenting Cells in Mice by *Parapoxvirus ovis*“, J. of Virology 75, No. 10, 4699 - 4704, 2001
73. **LAMPING S. R., ZHANG H., ALLAN B., AYAZI SHAMLOU P. A.**, „Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing“, Chem. Eng. Science, 58, 747 – 758, 2003
74. **LIAGZHI X., DANIEL I. C. W.**, „Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed batch cultures of animal cells“ TibTech, 15, 109-113, 1997
75. **LANGE A.**, „Entwicklung eines Verfahrens zur Kultivierung von Zellen auf Microcarriern“, Diplomarbeit an der FH Mannheim, 2000
76. **LANGER U.**, Persönliche Mitteilung, Bayer HealthCare AG, PH-OP-BT, Wuppertal, 2004
77. **LINDNER E., ARVIDSSON A.-C., WERGELAND I., BILLIG D.**, „Subpassaging Cells on Microcarriers: The Importance for Scaling-up to Production“, Develop. Biol. Standard, 66, 299-305, 1987
78. **LEE Y. Y., YAP M. G. S., HU W. S., WONG K. T. K.**, „Low Glutamine Fed-Batch Cultures of 293-HEK Serum-Free Suspension Cells for Adenovirus Production“, Biotechnol.Prog., 19, 501-509, 2003

-
79. **LEU F. S., SEIFERT D. B.**, „Hepatitis A Virus Culture Process“, United States Patent, US 6,194, 210 B1, 2001
80. **LJUNGREN J., HÄGGSTRÖM L.**, „Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed Batch Cultures“ *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 808-818, 1994
81. **MARANGA L., CUNHA A., CLEMENTE J., CRUZ P., CARRONDO M. J. T.**, „Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity“, *J. of Biotechnol.*, 107, 55-64, 2004
82. **MAYR A., BÜTTNER B., WOLF G., MEYER H., CZERNY C.**, „Experimenteller Nachweis paraspezifischer Wirkungen von gereinigten und inaktivierten Pockenviren“, *Methods in Enzymology*, 185, 567-577, 1990
83. **MATHER J. P.**, „Optimizing Cell and Culture Environment for Production of Recombinant Proteins“, *Methods in Enzymology*, Vol. 185, 567-577, 1990
84. **MERTEN O.-W., KIERULFF J. V., CASTIGNOLLES N., PERRIN P.**, „Evaluation of the serum free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: Use of various cell lines“, *Cytotechnology*, 14, 47-59, 1994
85. **MOCARSKI E. S.**, „Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion“, *Trends Microbiol.*, 10, 332 – 339, 2002
86. **MODROW S., FALKE D.**, „Molekulare Virologie“, Spektrum Akademischer Verlag, 1997
87. **MONTAGNON B.J., FANGET B., VINCENT-FALQUET J. C.**, „Industrial-Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of Vero Cells on Microcarrier“, *Rev. of Inf. Diseases*, 6, Supplement 2, 1984a
88. **MONTAGNON B. J., VINCENT-FALQUET J. C., FANGET B.**, „Thousand Litre Scale Microcarrier Culture of Vero Cells for Killed Polio Virus Vaccine. Promising Results“, *Develop. Biol. Standard*, 55, 37-42, 1984

89. **MOSER A.**, „Bioprozesstechnik“, Springer Verlag, Wien, 1981
90. **MOSS B.**, „Poxviridae and Their Replication“, Virology, second edition, Chapter 74, 1990
91. **MOSS B., WARD B. M.**, „High-speed mass transit for poxvirus on microtubules“, Nature Cell Biology, 3, 245 – 246, 2001
92. **MOSSMANN K. L.**, „Activation and inhibition of virus and interferon: the herpes virus story“, Viral Immunol., 15, 3-15, 2002
93. **MÖHLER L., FLOCKERZI D., SANN H., REICHL U.**, „A Mathematical Model of Influenza A Virus Production in Large-Scale Microcarrier Culture“, Biotechnol Bioeng., 90(1), 46-58, 2005
94. **MUNDT W., BARRET N., DORNER F., EIBL J.**, „Perfusion System and a Method for Large Scale Production of Virus Antigen“, United States Patent, US 5,719,051, 1998
95. **OKAMOTO T., TANI R., YABUMOTO M., SAKAMATO A., TAKADA K., SATO G. H., SATO J. D.**, “Effects of insulin and transferrin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium“, J. of Immunological Methods, 195, 7-14, 1996
96. **OMASE T., HIGASHIYAMA K. I., SHIOYA S., SUGA K. I.**, „Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate controlled fed-batch operation“, Biotechnol. Bioeng., 39, 556 – 564, 1992
97. **POHLSCHIEDT M.**, “Procedure for production of Baculovirus suspensions with high titre”, Diplomarbeit FH Aachen, Juli 2002
98. **PÖRTNER R., SCHILLING A., LÜDEMANN I., MÄRKEL H.**, „High density fed-batch cultures for hybridoma cells performed with aid of kinetic model“, Bioprocess Eng., 15, 117-124, 1996

99. **PÖRTNER R., MÄRKL H.**, „Dialysis cultures“, Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 403-414, 1998
100. **PRICE P., ETHEL E. , NESTLER L., GREFRATH P., NAUMOVIC B., FATNUMBI F., JAYME D.**, “A Versatile Serum-Free Medium For Kidney Epithelial Cell Growth and Virus Production”, Focus 24 - 28, 2002
101. **REICHL, U. 2004**, Perönliche Mitteilung, Prof. Dr. U. Reichl, MPI Magdberg
102. **REITER M., WEIGANG F., ERNST W., KATINGER H. W. D.**, „High density microcarrier cell culture with new device which allows oxygenation and perfusion of microcarrier cultures“, Cytotechnology, 3, 39-42, 1990
103. **SAUER P. W., BURKY J. E., WESSON M. C., STERNARD H. D., QU L.**, „A High Yielding, Generic Fed-Batch Cell Culture Process for Production of Recombinant Antibodies“, Biotechnol. Bioeng. 67, No.5, 585-597, 2000
104. **SCHARFENBERG K., WAGNER R.**, „A Reliable Strategy for the Achievement of Cell lines Growing in Protein-Free Medium“, Animal Cell technology, 619-623, 1995
105. **SCHARFENBERG K.**, “Die Kultivierung von Säugerzelllinien in definierten proteinfreien Medien”, Bioscope, 17 –24, February, 1997
106. **SCHLEE D., KLEBER H. P.**, „Wörterbuch der Biotechnologie“, Gustav Fischer Verlag, 1990
107. **SCHMIDT D.**, „Edward Jenner: Pionier der Schutzimpfung“, mta Spektrum, 4, 182 – 184, 2001
108. **SCHNEIDER M., MARISON I. W., VON STOCKAR U.**, „The importance of ammonia in mammalian cell culture“, J. of Biotechnol., 46, 161-185, 1996

109. **SCHWABE J. O., PÖRTNER R., MÄRKL H.**, „Improving an on line feeding strategy for fed-batch cultures of hybridoma cells by dialysis and „Nutrient-Split“-feeding“, *Bioprocess Eng.*, 20, 475-484, 1999
110. **SIEMENSMA A.**, “Bioprocess Tutorial: Eliminating Animal-Derived Media”, *Gen. Engineering* 22, No. 12, Juni 2002
111. **SIKYTA B., NOVAK M., DOBERSKY P.**, “Modelling of microbiological processes“, *Biotechnology and Fungal Differentiation*, Academic Press, London, 119 – 136, 1977
112. **SINCLAIR C. G., KRISTIANSEN B., BU LOCK J. D.**, “Fermentationsprozesse“, Springer-Verlag, 1993
113. **VAN SLYKE G., VALLE M. A., F. WU**, „Adaptation to Suspension and Serum-free Culture for Virus Production“, *BioReliance*[®], The Reliable Source, invitrogen bioservices, 5, No. 3, 2004 (www.bioreliance.com)
114. **SMITH G. L., VANDERPLASSCHEN A.**, „Extracellular enveloped vaccinia virus“, in *Coronavirus and Arterivirus*, Plenum Press, New York, No. 51, 395 -414, 1998
115. **SUNSTROM N. A. S., GAY R. D., WONG D. C., KITCHEN N. A., DEBOER L., GRAY P. P.**, “Insulin-Like Growth Factor-I and Transferrin Mediate Growth and Survival of Chinese Hamster Ovary Cells”, *Biotechnol. Prog.*, 16, 698 –702, 2000
116. **STIENS L. R.**, “Entwicklung eines Produktionsprozesses für den rekombinanten humanen TSH-Rezeptor“, Dissertation an der Universität Bielefeld, 2001
117. **TZIAMPAZIS E., SAMBANIS A.**, „Modelling cell culture processes“, *Cytotechnol.*, 14, 119 – 204, 1996
118. **VORLOP J., LEHMANN J.**, „Scale-up of Bioreactors for Fermentation Mammalian Cell Cultures, with Special Reference to Oxygen Supply and Microcarrier Mixing“, *Chem. Eng. Technol.*, 11, 171-178, 1988

119. **WAGNER R., KRAFT H., LEHMANN J.**, “The Production of Human Interleukin 2 by Recombinant Mammalian Cells”, *Adv. Anim. Cell and Biol. Tech. Bioprocesses*, Butterworth Pub, 374 –377, 1989

120. **WAGNER R., LUCKI-LANGE M.**, “Conditions For The Production of Recombinant IL-2 in a stirred Suspension Culture using a Protein-Free Medium”, *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture*, Butterworth-Heinemann, Oxford Pub, 180 – 186, 1993

121. **WAGNER R.**, „Der Weg zu chemisch definierten Medien“, *Transkript*, 4, 11. Jahrgang, ISSN 1435-5272, 39, 2005

122. **WEBER O., SIEGLING A., FRIEBE A., LIMMER A., SCHLAPP T., KNOLLE P., MERCER A., SCHALLER H., VOLK H. D.**, “Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus“, *J. of Gen. Virology*, 84, 1843 –1852, 2003

123. **WIDELL A., HANSON B. G., NORDFELT E.**, „A Microcarrier Cell Culture System for Large Scale Production of Hepatitis A Virus“, *J. of Virol. Methods*, 8, 63-71, 1984

124. **WU L., LANGE H. C., VAN GULIK W. M., HEIJNEN J. J.**, „Determination of in Vivo Oxygen Uptake and Carbon Dioxide Evolution Rates from Off-gas Measurements Under Highly Dynamic Conditions“, *Biotechnol Bioeng.*, 81, No. 4, 2003

125. **WURM F. M.**, „Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells“, *Nature Biotechnology*, 22, 1393 – 1398, 2004

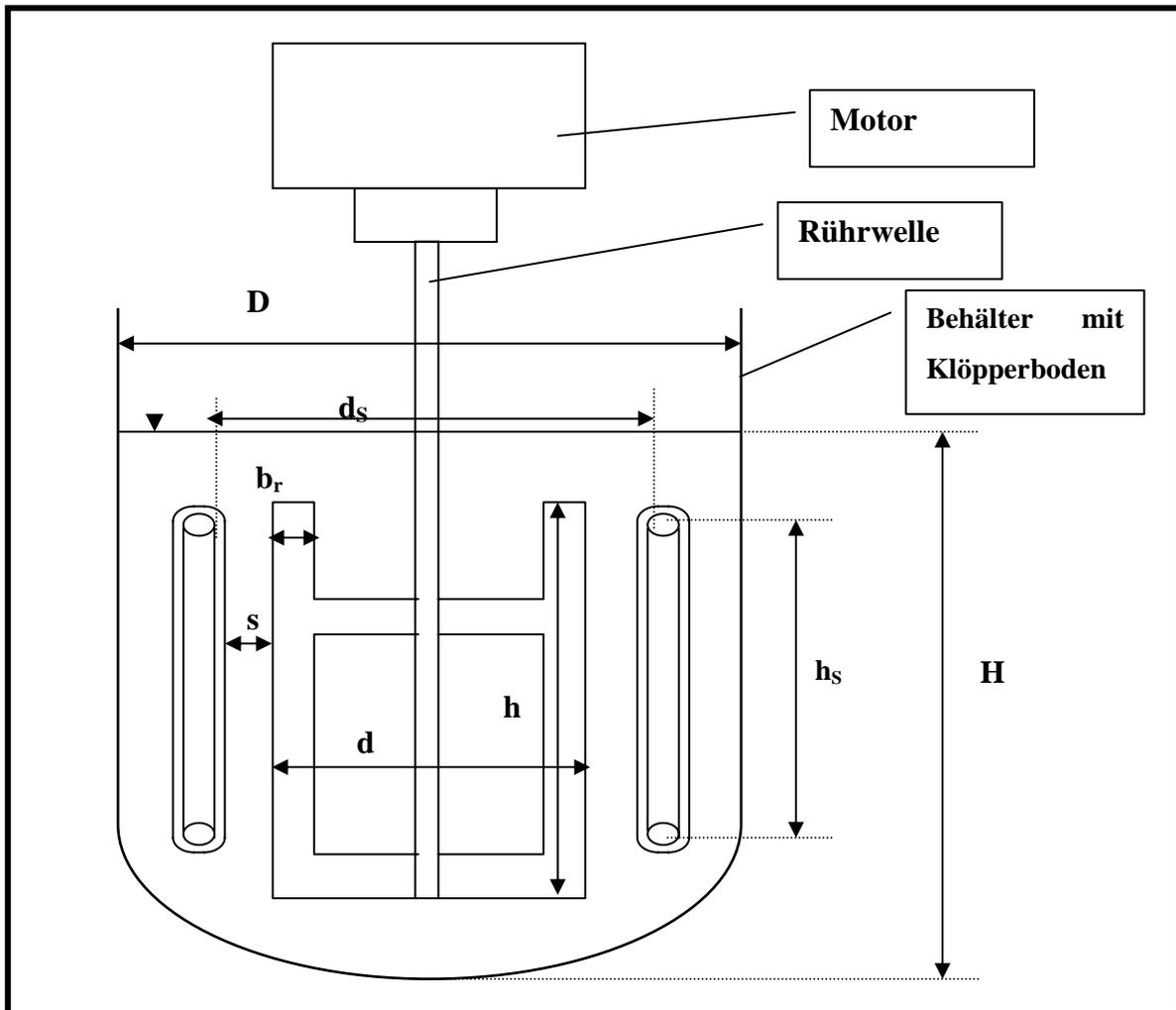
126. **XIE L., DANIEL I. C. W.**, „Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells“, *Trends in Biotechnology*, 15, 109 – 113, 1997

-
127. **YAMADA K., FURUSHOU S., SUGAHARA T., SHIRAHATA S., MURAKAMI H.,**
„Relationship between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells
cultured in serum free media“, *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 759 – 762, 1990
128. **YANDELL C., LAWSON J., BUTLER I., WADE B., SHEEHAN A., GROSVENOR S.,**
GODDARD C., SIMULA T., „An Analogue of IGF-I“, *BioProcess International*, 2, No.3, 56
– 64, 2004
129. **ZHANG Q., CLUSSLER E. L.,** „Microporous hollow fibers for gas absorption“, *Journal*
of Membrane Science, 23, 321 – 332, 1985
130. **ZHOU W., REHM J., EUROPA A., HU W. S.,** „Alteration of mammalian cell
metabolism by dynamic nutrient feeding“, *Cytotechnology*, 24, 99-108, 1997

7 ANHANG

7.1 Maße der verschiedenen Reaktoren

Zur besseren Darstellung nochmals der prinzipielle Aufbau der Reaktoren.



3,5 L H/D = 1,3				
Rührer	d [m]	0,08	d/ hr	0,45
	h [m]	0,178	d/ br	5,33
	br [m]	0,015	d/ D	0,50
Stator und Membran	hs [m]	0,16	hs/H	0,78
	ds innen [m]	0,105	ds/D	0,66
	d2 [m]	0,002	H/D	1,29
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,159	Ne ber.	8,32
	H [m]	0,205	Ne best.	8,40

10 L Bioreaktor H/D = 1				
Rührer	d [m]	0,134	d/ hr	0,65
	h [m]	0,205	d/ br	5,83
	br [m]	0,023	d/ D	0,56
Stator und Membran	hs [m]	0,178	hs/H	0,74
	ds innen [m]	0,16	ds/D	0,67
	d2 [m]	0,002	H/D	1,00
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,24	Ne ber.	5,79
	H [m]	0,24	Ne best.	5,20

50 L Bioreaktor H/D = 1				
Rührer	d [m]	0,24	d/ hr	0,65
	h [m]	0,37	d/ br	5,22
	br [m]	0,046	d/ D	0,60
Stator und Membran	hs [m]	0,3	hs/H	0,75
	ds innen [m]	0,264	ds/D	0,66
	d2 [m]	0,002	H/D	1,00
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,4	Ne ber.	5,10
	H [m]	0,4	Ne best.	5,30

10 L Bioreaktor H/D = 2				
Rührer	d [m]	0,116	d/ hr	0,39
	h [m]	0,3	d/ br	6,11
	br [m]	0,019	d/ D	0,55
Stator und Membran	hs [m]	0,28	hs/H	0,70
	ds innen [m]	0,142	ds/D	0,67
	d2 [m]	0,002	H/D	1,89
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,212	Ne ber.	9,18
	H [m]	0,4	Ne best.	10,20

50 L Bioreaktor H/D = 2				
Rührer	d [m]	0,204	d/ hr	0,45
	h [m]	0,45	d/ br	5,83
	br [m]	0,035	d/ D	0,65
Stator und Membran	hs [m]	0,445	hs/H	0,70
	ds innen [m]	0,23	ds/D	0,73
	d2 [m]	0,003	H/D	2,00
	d1 [m]	0,002	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,316	Ne ber.	7,25
	H [m]	0,632	Ne best.	7,10

100 L Bioreaktor H/D = 2				
Rührer	d [m]	0,24	d/ hr	0,33
	h [m]	0,73	d/ br	5,22
	br [m]	0,046	d/ D	0,60
Stator und Membran	hs [m]	0,61	hs/H	0,76
	ds innen [m]	0,268	ds/D	0,67
	d2 [m]	0,002	H/D	2,00
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,4	Ne ber.	9,09
	H [m]	0,8	Ne best.	10,20

200 L Bioreaktor H/D = 2 maximale Auslegung				
Rührer	d [m]	0,37	d/ hr	0,41
	h [m]	0,91	d/ br	5,69
	br [m]	0,065	d/ D	0,76
Stator und Membran	hs [m]	0,9	hs/H	0,90
	ds innen [m]	0,41	ds/D	0,84
	d2 [m]	0,002	H/D	2,05
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,4875	Ne ber.	7,66
	H [m]	1	Ne best.	7,70

Ausgelegter 800 L Bioreaktor H/D = 2 maximale Auslegung				
Rührer	d [m]	0,6	d/ hr	0,40
	hr [m]	1,5	d/ br	5,45
	br [m]	0,11	d/ D	0,75
Stator und Membran	hs [m]	1,5	hs/H	0,91
	ds innen [m]	0,63	ds/D	0,79
	d2 [m]	0,002	H/D	2,06
	d1 [m]	0,001	Spalt [m]	0,01
Reaktor	D [m]	0,8	Ne ber.	6,7
	H [m]	1,65	Ne best.	-
Berechnungen	As [m ²]	9,32		
	Vr [m ³]	0,801		
	a=As/V [1/m]	11,529684		

7.2 Oberflächenbegasung und ka-Werte der verschiedenen Reaktoren

3,5 L Reaktor H/D = 1,3							
n [1/min]	P/V [W/m ³]	q = 0,22 L/ min			q = 0,25 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	0,29	1,3	0	1,3	1,3	0	1,3
30	0,98	1,4	0	1,4	1,4	0	1,4
40	2,33	1,6	0,1	1,5			
50	4,55	1,7	0,15	1,55	1,7	0,15	1,55
60	7,86	1,8	0,2	1,6			
70	12,49	1,9	0,3	1,6	1,9	0,3	1,6
80	18,64	2	0,4	1,6	2	0,4	1,6

10 L Reaktor H/D = 1							
n [1/min]	P/V [W/m ³]	q = 0,63 L/ min			q = 0,68 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	0,83	1,2	0	1,2	1,2	0	1,2
30	2,81	1,3	0	1,3	1,4	0	1,4
40	6,66	1,5	0,1	1,4	1,5	0,1	1,4
50	13,00	1,7	0,25	1,45	1,7	0,25	1,45
60	22,47	2,1	0,4	1,7	nicht bestimmt		
70	35,68	2,2	0,45	1,75	2,3	0,5	1,8
80	53,25	2,3	0,6	1,7	2,4	0,6	1,8

50 L Reaktor H/D = 1							
n [1/min]	P/V [W/m ³]	q = 3,15 L/ min			q = 3,60 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	2,95	0,9	0	0,9	0,9	0	0,9
30	9,95	0,9	0	0,9	0,95	0	0,95
40	23,59	1,1	0,1	1	1,1	0,1	1
45	33,59	1,2	0,2	1	1,2	0,2	1
50	46,08	1,4	0,35	1,05	1,4	0,35	1,05
60	79,63	1,7	0,55	1,15	1,7	0,55	1,15

10 L Reaktor H/D = 2							
n [1/min]	P/V [W/m³]	q = 0,75 L/ min			q = 0,80 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	1,48	1,65	0	1,65	1,65	0	1,65
30	5,01	1,8	0	1,8	1,8	0	1,8
40	11,87	1,9	0,1	1,8	2	0,1	1,9
50	23,18	2,2	0,2	2	2,2	0,2	2
60	40,06	2,3	0,3	2	2,4	0,3	2,1
70	63,62	2,6	0,4	2,2	2,6	0,4	2,2

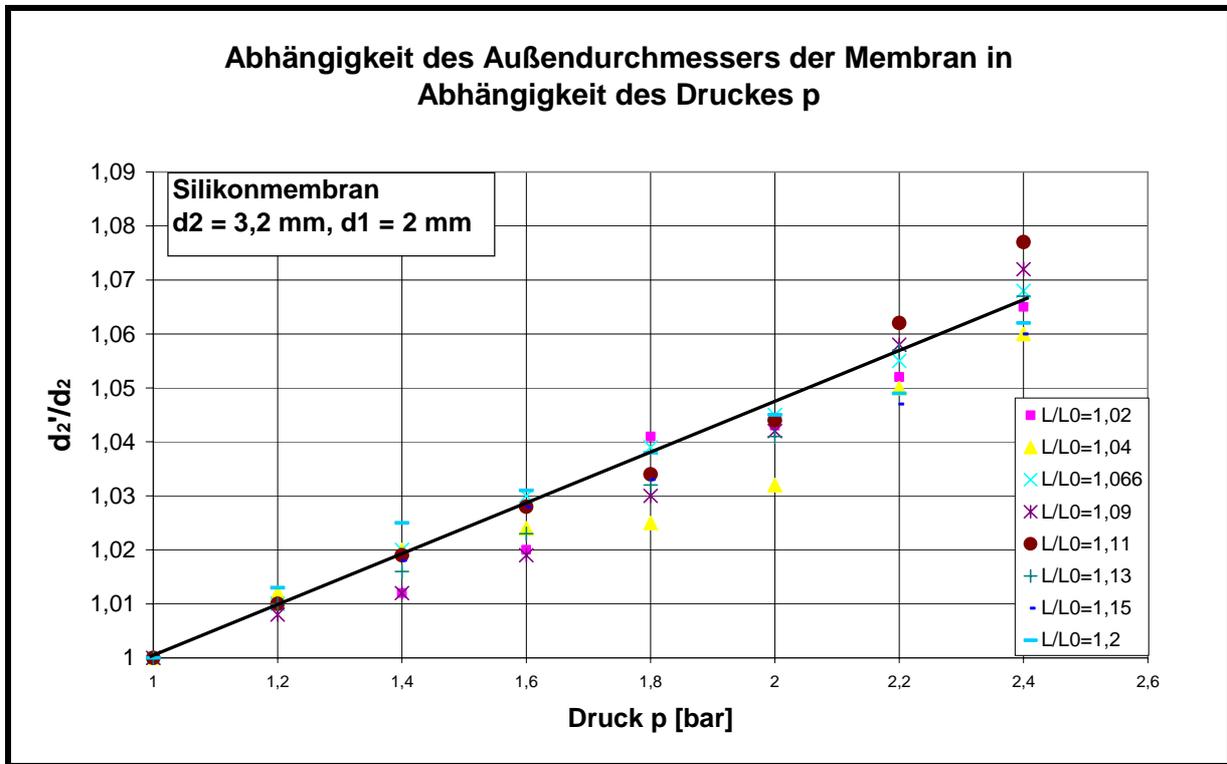
* war bei den Experimenten mit 11,3 L befüllt

50 L Reaktor H/D = 2							
n [1/min]	P/V [W/m³]	q = 3,15 L/ min			q = 3,60 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	1,71	1,2	0	1,2	nicht bestimmt		
30	5,78	1,35	0	1,35	1,3	0	1,3
40	13,70	1,6	0,05	1,55	nicht bestimmt		
50	26,77	1,9	0,15	1,75	2	0,15	1,85
60	46,25	2,3	0,3	2	2,2	0,3	1,9
70	73,44	2,5	0,4	2,1	2,4	0,4	2

100 L Reaktor H/D = 2							
n [1/min]	P/V [W/m³]	q = 6,28 L/ min			q = 6,8 L/ min		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
20	3,07	0,9	0	0,9	0,9	0	0,9
30	10,36	1	0	1	1	0	1
40	24,56	1,2	0,15	1,05	1,2	0,15	1,05
50	47,96	1,4	0,3	1,1	1,4	0,3	1,1
60	82,88	1,6	0,4	1,2	1,6	0,4	1,2

200 L Reaktor H/D = 2,3							
n [1/min]	P/V [W/m³]	q = 12,2 L/ min			q2		
		Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]	Ka _{gemessen} [1/h]	Kla _{Oberfläche} [1/h]	Ka [1/h]
10	1,61	1	0	1	Nicht bestimmt		
15	5,43	1,2	0,1	1,1			
20	12,87	1,4	0,2	1,2			
25	25,13	1,5	0,3	1,2			
30	43,42	1,7	0,4	1,3			
35	68,95	2	0,55	1,45			
40	102,92	2,2	0,8	1,4			

7.3 Abhängigkeit der Membrandurchmesser



7.4 Relevante Fermentationsdaten zur Modellierung

Die Fermentation wurde in einem 10 L Fermenter, H/D = 1, n=30 U/min, im biphasischen Batch Prozess durchgeführt (siehe 1.2, S. 14 ff). Die MOI betrug 0,01.

Biphasischer Batch Prozess 3g/L Carrier im 10 L Reaktor										
Probennummer	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10
Betriebszeit [h]	0	23	45	69	93	120	144	145	170	192
Glukose (Ferm) [g/L]	2,83	2,73	2,46	1,52	0,3	Nicht in Modell dargestellt: Keine Korrelation möglich im Modell				
Laktat (Ferm) [g/L]	0,021	0,116	0,436	1,13	1,91					
Zellzahl (Ferm.) lebend [E6/ml]	0,20	0,22	0,36	0,62	1,20	2,00	2,10	2,10	2,40	2,90
Zellzahl (Ferm.) tod [E6/ml]	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	0,10	0,10
Vitalität [%]	100	100	100	97	97	98	98	95	96	97
Infektion MOI = 0.01										
Probennummer	P 11 I	P 12 I	P 13 I	P 14 I	P 15 I	P 16 I	P 17 I	P 18 I	P 19 I	
Betriebszeit [h]	194	196	213	235	262	283	307	333	357	
Glukose (Ferm) [g/L]	2,81	2,42	1	0,04	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	
Laktat (Ferm) [g/L]	0,214	0,93	1,1	0,52	0,08	0,01	0,04	0,01	0,01	
Zellzahl (Ferm.) lebend [E6/ml]	2,90	2,90	3,20	3,00	2,52	1,94	1,22	0,80	0,20	
Zellzahl (Ferm.) tod [E6/ml]	0,04	0,30	1,04	1,22	1,10	1,50	1,93	2,24	2,52	
Vitalität [%]	99	91	75	71	70	56	39	26	7	
Virustiter Log10 (TCID 50)/ml	4,40	2,00	5,50	6,20	6,70	6,60	6,40	6,80	6,70	

7.5 Liste der analysierten Aminosäuren

D,L-O-Phosphoserine	L-Leucine
Taurine	L-Norleucine
O-Phosphoethanolamin	L-Tyrosine
Harnstoff	L-Phenylalanine
L-Aspartic acid	b-Alanine
L-Hydroxyproline	D,L-b-Amino-i-butyric acid
L-Threonine	D,L-Homocystine
L-Serine	g-Amino butyric acid
L-Asparagine	L-Tryptophane
L-Glutamic acid	Ethanolamine
L-Glutamin	D,L allo-Hydroxyllysine
Sarcosine	Ammonia
D,L-a-Aminoadipic acid	Creatinine
L-Proline	L-Ornithine
Glycine	L-Lysine
L-Alanine	L-Histidine
Citrulline	L-3-ethylhistidine
L-a-Amino-n-butyric acid	L-1-Methylhistidine
L-Valine	L-Carnosine
L-Cystine	Anserine
L-Methionine	L-a-Amino-b-guanidinopropionic acid
L-Cystathionine	L-Arginine
L-Isoleucine	

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	25. August 1977
Geburtsort	Troisdorf
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulbildung

07/ 1984 – 06/ 1988	Grundschule, Sieglar
07/ 1988 – 06/ 1993	Städtisches Gymnasium, Sieglar
07/ 1993 – 06/ 1997	Gymnasium „Zum Altenforst“, Troisdorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

09/ 1998 – 07/ 2002	Studiengang Bioingenieurwesen, Schwerpunkt biotechnologische Verfahren an FH Aachen, Abteilung Jülich Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)
09/ 2002 – dato	Im Rahmen des Promotionsverfahrens Studiengang Verfahrenstechnik an der Otto von Guericke Universität, Magdeburg. Angestrebter Abschluss: Dr.-Ing.

Promotion

07/ 2002 – dato	„Entwicklung und Optimierung eines Verfahrens zur Viruspropagation von Parapoxvirus Ovis NZ-2 ” Kooperation der Bayer HealthCare AG, Pharma-Operations, Biotechnology, Wuppertal, dem Max-Planck-Institut Magdeburg und der Bayer Technology Services GmbH, Wuppertal Betreuer: Prof. Dr. U. Reichl, Universität Magdeburg Aufgabenstellung: <ul style="list-style-type: none"> • Adaptation einer adhärenen Zelllinie an serum-/proteinfreie Bedingungen und Generierung einer Suspensionszelle (Dr. Apeler, Dr. Bödeker, Bayer HealthCare AG) • Optimierung eines etablierten Prozesses und Scale-Up in technischen Maßstab (Dr. Bödeker, Bayer HealthCare AG) • Physikalische Beschreibung der Reaktoren bezüglich Stofftransport, Homogenisierung und Scherbeanspruchung bis in den Produktionsmaßstab als Basis einer Maßstabsvergrößerung (Dr. Henzler, Bayer Technology Services GmbH)
-----------------	---

Praktika

05/ 1997 – 09/ 1997	SRT – Schalt – und Regeltechnik GmbH, Oberpleis Aufgabe: Durchführung diverser Projektarbeiten im Bereich Meß- Steuer- und Regeltechnik zur Gebäudeautomation.
08/ 1999 – 09/ 1999	Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, Institut 6, Biologie des Stoffaustauschs. Aufgabe: Bestimmung des RNA – Gehaltes von Zellen, Fluoreszenzmikroskopie und allgemeine mikrobielle Tätigkeiten.
03/ 2000 – 09/ 2000	Tutor für Mathematik an der FH Aachen, Abteilung Jülich.
07/ 2000 – 12/ 2000	Wfk – Forschungsinstitut für Reinigungstechnologie e.V., Krefeld. Aufgabe: Validierung der ATP – Meßmethode.
03/ 2001 – 05/ 2001	University of Strathclyde, Bioengineering Unit, Glasgow, UK Aufgabe: Toxikologie und Zellkulturtechnik, Untersuchung der Wirkung von Chrom VI auf Leberzellen nach Enzyminduktion.
07/ 2001	Werksstudent bei der Tropon GmbH, Qualitätskontrolle. Aufgabe: Eingangskontrolle verschiedener Substanzen mittels nass-chemischen, spektrometrischer und chromatographischer Methoden nach GMP.
08/ 2001 – 07/ 2002	Praxissemester und Diplomarbeit bei der Bayer AG, Division Pharma-Operations, Biotechnology Titel: „Herstellung hochtitriger Baculovirus suspensionen“ Aufgabe: Verfahrensentwicklung im small scale Bioreaktor und Überprüfung der genetischen Stabilität von Baculoviren

Berufserfahrung

07/2002 – 12/2004	Promotion bei der Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Deutschland
01/ 2005 – dato	Fermentation Manager, Roche Diagnostics GmbH Pharmaceutical Biotech Production, Penzberg, Deutschland Funktion: Betriebsleiter

Stipendium

11/ 1999 – 07/ 2002	Stipendiat der „Stiftung der Deutschen Wirtschaft für Qualifizierung und Kooperation e.V.“, Berlin. Teilnahme an verschiedenen Seminaren zur Schulung fachlicher, außerfachlicher und betriebswirtschaftlicher Kompetenzen.
---------------------	--

Wehrdienst

11/ 1997– 09/ 1998	Sanitätssoldat im Sanitätszentrum, Bonn.
--------------------	--

Ehrenamt

03/ 2000 – 10/ 2001

08/ 2001 – dato

2. Vorsitzender eines örtlichen Traditionsvereins.

Initiative „Go 4 Jobs e.V.“ zur Unterstützung von Migranten im Berufseinstieg. Initiative des Landes NRW.

Publikationen/ Patente

08/ 2002

Paper,: “Pretreatment of rats with inducing agents, Phenobarbiton and 3-Methylcholanthrene ameliorates the toxicity of Chromium (VI) in Hepatocytes”, Toxicology in Vitro, Vol. 16, 2002, 509 – 516

06/ 2005

Poster,: “Strategies for Large Scale Production of Parapoxvirus Ovis NZ-2 by Microcarrier Cell Culture”, ESACT 2005, Harrogate, UK

Publikationen und Patentanmeldungen zur Promotion in Vorbereitung

Besondere Kenntnisse

Fremdsprachen

Englisch, sehr gut in Wort und Schrift

Sprachkurs „Cambridge Certificate of Proficiency English“ an der HELLIWELL SPRACHSCHULE GmbH, Siegburg.

Latein, Grundkenntnisse, Latinum

EDV

Modellierung von Bioprocessen mittels Matlab und Simulink

Statistische Versuchsplanung mit Jump 5.0,

C und C++ Programmierverfahren

MS-DOS und Windows Betriebssysteme

Windows und Microsoft Office Gruppe

digitale Bildverarbeitung

Sonstiges

Seminare zur Schulung von GMP-Kenntnissen

Bayer Certificate of General Management

Interessen/ Hobbys

Entwicklungen in der Wissenschaft, Fußball im Verein

Troisdorf, den 24.05.2005

 Michael Pohlscheidt

REFERENZEN

BAYER HEALTHCARE AG

Dr. H. Apeler, Dr. H.–J. Henzler, Dr. B. Bödeker
PH-OP-BT
Friedrich-Ebert-Str. 217
D-42096 Wuppertal
Tel.: +49 (0)202 36 7546
E-Mail: heiner.apeler@bayerhealthcare.com

UNIVERSITÄT ZU MAGDEBURG, LEHRSTUHL FÜR BIOPROZESSTECHNIK
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR „DYNAMIC KOMPLEXER TECHNISCHER SYSTEME“

Prof. Dr. Udo Reichl
Sandtorstraße 1
D-39106 Magdeburg
Tel.: +49 (0)391 6110 200
E-Mail: ureichl@mpi-magdeburg.mpg.de

FACHHOCHSCHULE AACHEN, ABTEILUNG JÜLICH

Prof. Dr. Manfred Biselli
Ginsterweg 1
52428 Jülich
Tel.: +49 (0) 2461 99 3141
Biselli@fh-aachen.de

UNIVERSITY OF STRATHCLYDE, GLASGOW, UK

Dr. Helen Grant
Bioengineering Unit
Wolfson Centre
106 Rottenrow, Glasgow G4 ONW
UK
Tel.: +44 (0)141 552 4400