

Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit von Zelllinien mit Kassettenaustauschsystem

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Elisabeth Bludau

aus Riesa

1. Referent:	apl. Professor Dr. Udo Rau
2. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	28.11.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.03.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Bludau, E.; Veith, N.; Baydoun, L.; Geiszkopf, A.; Paulsen, J.; Duvar S.; Hecht, V.; Ziehr, H.: Development of a Standardized Platform for Production of Antibodies on Basis of CHO Cells. (Poster) 5th Conference on Protein and Antibody Engineering Summit (PEGS) Vienna, Austria (2012)

Bludau, E.; Veith, N.; Beuerle, B.; Schwager, C.; Hecht, V.; Ziehr, H.: Shortened timeline for cell line development – adaptation of recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) to suspension CHO cells. (Poster) 13th meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Lille, France (2013)

Bludau, E.; Veith, N.; Beuerle, B.; Schwager, C.; Hecht, V.; Ziehr, H.: Shortened timeline for cell line development – adaptation of recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) to suspension CHO cells. (Poster) 11th Conference on Protein Expression in Animal Cells (PEACE) Kananaskis, Canada (2013)

Bludau, E.; Hecht, V.; Ziehr, H.: RMCE-based Cell Line Development – Towards Predictable and Reproducible Transgen Expression?. (Poster) 14th Conference on Cell Culture Engineering (CCE) Quebec, Canada (2014)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Abstract	9
1. Einleitung	10
1.1 Konventionelle Generation von Produktionszelllinien	11
1.2 Ortsspezifische Rekombinationssysteme in der Zelllinienentwicklung	14
1.2.1 Rekombinase-vermitteltes Kassettenaustauschsystem.....	15
1.3 Zellkulturprozesse für die Produktion rekombinanter Proteine	17
1.4 Statistische Versuchsplanung	19
2. Zielsetzung	23
3. Ergebnisse und Diskussion	24
3.1 Identifizierung stabiler chromosomaler Loci für die Generation von CHO-Masterzelllinien	24
3.1.1 Virusproduktion zur Markierung chromosomaler Loci.....	24
3.1.2 Lentivirale Transduktion von CHO-S Zellen	25
3.1.3 Austauschbarkeit markierter chromosomaler Loci.....	26
3.1.4 Langzeitstabilität markierter Masterzelllinien	29
3.2 Expression rekombinanter Proteine an definierten chromosomalen Loci	30
3.2.1 Ortsspezifische Rekombination führt zu vorhersagbarer Antikörperexpression	32
3.2.2 Homogene Proteinexpression der Targetingpools und -subklone	38
3.2.3 Langzeitstabilität von mit Kassettenaustausch generierten Zellklonen	41
3.3 Etablierung von Hochproduzentenzelllinien unter Verwendung des GS Expressions-Systems	42
3.3.1 Isolierung und Genamplifikation Antikörper-exprimierender GS-Klone	42
3.3.2 Langzeitstabilität der generierten GS-Klone	48
3.3.3 Die wiederholte Nukleofektion einer GS-Zelllinie generiert Hochproduzentenzelllinien	52
3.3.4 Leistungsfähigkeit des GS6 Klon 132 in Fed-Batch Kultivierungen	54
3.4 Charakterisierung Antikörper-produzierender CHO Zelllinien in Fed-Batch Versuchen	58

3.4.1	Identifizierung signifikanter Einflussgrößen unter Verwendung statistischer Versuchsplanung	59
3.4.1.1	Vergleich der Fed-Batch Kultivierungen verschiedener GS-Klone	59
3.4.1.2	Vergleich der Fed-Batch Kultivierungen verschiedener RMCE-Klone	69
3.5	Ausblick	78
4.	Material und Methoden.....	80
4.1	Material.....	80
4.1.1	Antibiotika	80
4.1.2	Antikörper	80
4.1.3	Bakterienstämme	80
4.1.4	Chemikalien und Reagenzien	81
4.1.5	Enzyme und Reaktionspuffer	82
4.1.6	Geräte.....	83
4.1.7	Medien und Zusätze	84
4.1.8	Oligonukleotide	84
4.1.9	Reaktionskits	85
4.1.10	Software	85
4.1.11	Vektoren	85
4.1.12	Zelllinien	86
4.2	Methoden	87
4.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	87
4.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	87
4.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	87
4.2.1.3	DNA-Spaltung mittels Restriktionsenzymen.....	88
4.2.1.4	Glätten überhängender Enden an DNA-Fragmenten.....	89
4.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	90
4.2.1.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	90
4.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	90
4.2.1.8	Transformation	91
4.2.1.9	Plasmidpräparation.....	91

4.2.1.10	Isolierung genomischer DNA	92
4.2.1.11	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	92
4.2.1.12	Sequenzierung von DNA	92
4.2.1.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	93
4.2.2	Zellkulturmethoden	94
4.2.2.1	Revitalisierung kryokonservierter Zellen	94
4.2.2.2	Kultivierung von CHO Suspensionszellen.....	94
4.2.2.3	Kultivierung adhärenter HEK293T Zellen.....	95
4.2.2.4	Zellzahlbestimmung.....	95
4.2.2.5	Kryokonservierung von Zellen	96
4.2.2.6	Durchflusszytometrie	96
4.2.2.7	Zellsortierung (FACS).....	96
4.2.2.8	Einzelzellklonierung mittels semi-solidem Medium	96
4.2.2.9	Gentransfermethoden.....	97
4.2.2.10	Single Cell Secretion Assay.....	99
4.2.2.11	Bestimmung der spezifischen Produktivität von Suspensionszellen	100
4.2.2.12	Titerbestimmung.....	100
4.2.2.13	Batch und Fed-Batch Kultivierung von CHO-Zellen im Schüttelkolben ...	101
4.2.3	Analytische Methoden.....	101
4.2.3.1	Konzentrationsbestimmung von D-Glukose und L-Laktat	101
4.2.3.2	Messung von pH, pO ₂ , pCO ₂	102
4.2.3.3	Quantifizierung der Proteinexpression mittels ELISA.....	102
4.2.3.4	Quantifizierung der Antikörperexpression mittels ProA HPLC.....	103
Literaturverzeichnis		105
Abkürzungsverzeichnis		116
Abbildungsverzeichnis		119
Tabellenverzeichnis		121

Zusammenfassung

Die kommerzielle Entwicklung von Produzentenzelllinien basiert meist auf der zufälligen Integration vieler Transgenkopien in das Wirtsgenom und der anschließenden aufwändigen Selektion zur Identifizierung stabiler Hochproduzenten. Das Rekombinase-vermittelte Kassettenaustauschsystem (RMCE) ist bereits in früheren Arbeiten als aussichtsreiche Alternative für die vorhersagbare Entwicklung von Zelllinien beschrieben worden (Rose et al. 2013; Rehberger et al. 2013; Turan et al. 2013; Noh et al. 2013). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung inwieweit RMCE-basierte Zelllinien im Vergleich zu konventionell entwickelten auch in Kultivierungsprozessen vorhersagbare und homogene Wachstums- und Produktionseigenschaften aufweisen. Aus diesem Grund war zunächst die parallele Entwicklung des RMCE-Systems sowie einer Modellzelllinie erforderlich. Die RMCE-kompatiblen Masterzelllinien wurden basierend auf CHO-Suspensionszellen mit eGFP-transduzierenden Lentiviren markiert. Nach der Identifikation austauschbarer und transkriptionell aktiver chromosomaler Loci wurden RMCE-Versuche mit drei vollständigen Antikörpern, einem Antikörper-Fragment und tPA durchgeführt. Die Selektion von RMCE-Subklonen erfolgte mittels zweifacher FACS-Anreicherung ohne Einsatz selektiver Agentien. Die Subklone wiesen eine homogene Expression auf, welche mit dem jeweiligen Targetingpool korrespondierte. Die Ergebnisse deuten jedoch nicht auf die universelle Einsetzbarkeit eines definierten Locus für die Expression verschiedener Proteine hin. Da für die vollständigen Antikörper sehr vergleichbare Expressionsstärken erzielt wurden, scheint es vielmehr, dass bestimmte Loci für die Expression bestimmter Proteine geeignet sind. Die GS-basierten Modellzelllinien, welche mittels zweifacher Nukleoporation generiert wurden, erzielten finale Titer von $3,5 \text{ g L}^{-1}$ in Fed-Batch Versuchen. Die untersuchten Klone waren in Abwesenheit von MSX jedoch nicht langzeitstabil. Ferner konnte kein positiver Zusammenhang zwischen der MSX-Konzentration und der spezifischen Produktivität der GS-Klone erkannt werden. Bei den im Versuchsraum untersuchten Einflussfaktoren während der Fed-Batch Kultivierung zeigte sich, dass die drei von einem Transfektionspool stammenden GS6 Klone unterschiedlich signifikant beeinflusst werden. Dies korreliert mit den während der Klonselktion beobachteten heterogenen Produktivitäten der GS-Klone. Die drei RMCE-Klone, welche aus zwei unterschiedlichen Targetingpools hervorgegangen sind und zwei verschiedene vollständige Antikörper exprimierten, zeigten in Fed-Batch Kultivierungen innerhalb des Versuchsraumes vergleichbare Wachstums- und Produktionseigenschaften. Damit zeigte sich erstmalig, dass RMCE-basierte Zelllinien im Vergleich zu konventionell entwickelten vorhersagbare und homogene Wachstums- und Produktionseigenschaften in einem Kultivierungsprozess aufweisen.

Abstract

Conventional cell line development is mostly based on random multicopy transgene integration followed by a time and labor consuming screening procedure to identify stable high-producer. Previous publications characterized the recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) as a promising alternative for the development of cell lines in a predictable manner (Rose et al. 2013; Rehberger et al. 2013; Turan et al. 2013; Noh et al. 2013). Aim of this thesis was to investigate whether RMCE-based cell lines reveal comparable and predictable growth and production characteristics in culture processes as well in comparison to conventional cell lines. For this reason the parallel development of the RMCE-system as well as a GS-based model cell lines was required.

RMCE master cell lines based on CHO suspension cells were tagged with eGFP transducing lentiviruses. After having identified exchangeable and transcriptionally active chromosomal loci, RMCE experiments with three fullsize antibodies, one antibody fragment and tPA have been performed. The selection of positive RMCE-events was conducted via FACS without any selective agents (antibiotics). The transgene expression among the subclones was homogenous and moreover corresponding to the respective targetingpool. However, the results do not indicate the universal applicability of a certain chromosomal locus for recombinant protein expression. The results rather support the theory that some loci are appropriate for the expression of certain proteins, since the expression level among the full size antibodies was quite similar.

The GS-based model cell lines were established after dual nucleofection and subsequent selection by means of a single cell secretion assay. In fed-batch processes the GS-model cell lines reached peak titers of 3.5 g L^{-1} . However, in absence of MSX the clones were not stable. Moreover no positive correlation was observed between MSX-concentration (for gene amplification) and specific productivity of the respective GS-clones.

Investigation of GS-clones within a defined design-space in fed-batch processes revealed different significantly influencing parameters among the clones deriving from a common pool. This result correlated with the heterogeneous productivities among the GS-clones during the clonal screening procedure. Three antibody producing RMCE-derived clones have been investigated exemplarily as well in fed-batch processes within a defined design space. All of them demonstrated comparable growth and production characteristics. The results have shown, for the first time, that RMCE-based cell lines reveal homogeneous growth and production characteristics in a culture process in comparison to conventionally generated cell lines.

1. Einleitung

Im Jahr 2013 wurden sieben der zehn meistverkauften biologischen Medikamente in CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen produziert. Dies resultierte in einem weltweiten Absatz von fast 42 Mrd. US Dollar. Sechs der zehn meistverkauften Medikamente waren ferner monoklonale Antikörper (Noh et al. 2013; Huggett 2013). Seit der Zulassung des gewebespezifischen Plasminogenaktivators 1987 als erstes in Säugerzellen produziertes rekombinantes therapeutisches Protein, stellt die CHO Zelllinie ein bevorzugt verwendetes Expressionssystem dar. Weitere industriell genutzte Säugerzelllinien sind BHK (Baby Hamster Kidney), HEK (Human Embryonic Kidney) sowie SP2/0. Obgleich bakterielle Expressionssysteme, wie *Escherichia coli*, im Vergleich zu Säugerzellen ein deutlich robusteres und schnelleres Wachstum bei geringeren Produktionskosten und besseren Ausbeuten aufweisen, ist ihr Unvermögen, posttranslationale Proteinmodifikationen, durchzuführen ein entscheidender Nachteil (Agrawal & Bal 2012; Butler 2005). Rekombinante Proteine, produziert in CHO-Zellen, weisen hingegen eine vergleichbare Qualität wie humane Proteine sowie posttranslationale Modifikationen wie die Glykosylierung auf. Obwohl es eine Vielzahl von alternativen Säugerzellen für die rekombinante Proteinproduktion gibt, werden 70 % der rekombinanten Therapeutika in CHO Zellen generiert (Jayapal 2007). Ferner konnten die Produktionsprozesse in den vergangenen 25 Jahren im Hinblick auf die Produkttiter, die maximalen Zellkonzentrationen und zellspezifische Produktivität deutlich verbessert werden. Dies wurde vornehmlich durch die Optimierung der Kultivierungsmedien, der Kultivierungsprozesse sowie auch die Entwicklung von Produktionszelllinien realisiert (Noh et al. 2013). Die Etablierung einer stabilen Produktionszelllinie mit hohen zellspezifischen Produktivitäten ist dabei ein sehr langwieriger und arbeitsintensiver Prozess, welcher einen entscheidenden Engpass bis zur Vermarktung des therapeutischen Produkts darstellen kann (Agrawal & Bal 2012). Die kommerzielle Zelllinienentwicklung erfolgt meist auf konventionellem Weg unter Verwendung des DHFR (Dihydrofolatreduktase)- oder GS (Glutaminsynthetase)-Systems. Beide Systeme beruhen auf der zufälligen Integration vieler Transgenkopien in das chromosomale Wirtsgenom und der anschließenden Gen-Amplifikation durch ein selektives Reagenz. Dieser Ansatz bedingt jedoch, dass weder die Anzahl noch die Integrationsstelle der Expressionskassette und somit auch nicht die Expressionsstärke des Transgens vorhergesagt werden können. Aus diesem Grund muss eine Vielzahl ($n > 1000$) von Einzelzellklonen hinsichtlich ihrer Expressionsstärke sowie ihrer Stabilität untersucht werden (L. Barnes et al. 2003).

1.1 Konventionelle Generation von Produktionszelllinien

Bei der industriellen Herstellung rekombinanter Proteine ist der erste Schritt die Etablierung einer stabilen Produktionszelllinie. Die konventionelle Zelllinienentwicklung ist schematisch in Abbildung 1-1 dargestellt. Nach der Klonierung des Expressionsvektors, welcher neben dem rekombinanten Gen auch ein Selektionsmarkergen enthält, wird dieser mittels Transfektion in die Zellen eingebracht. Anschließend erfolgt die Selektion, um Zellen, welche das Expressionsplasmid und damit auch das Selektionsmarkergen in ihr Genom integriert haben, zu identifizieren. Die mittels Verdünnungsklonierung generierten klonalen Zelllinien werden anschließend hinsichtlich ihrer Proliferation, Produktivität und Stabilität untersucht. Um eine zusätzliche Steigerung der Produktivität der Zellen zu induzieren, können weitere Selektionen mit erhöhten Konzentrationen an selektivem Agens durchgeführt werden. Für die Identifizierung stabiler Hochproduzentenklone ist eine umfangreiche Untersuchung einer Vielzahl von Klonen erforderlich. Nach der Expansion und Kryokonservierung der Hochproduzenten erfolgt die Entwicklung eines optimalen Bioprozesses für die Produktion des rekombinanten Zielproteins (Wurm 2004; Lai et al. 2013).

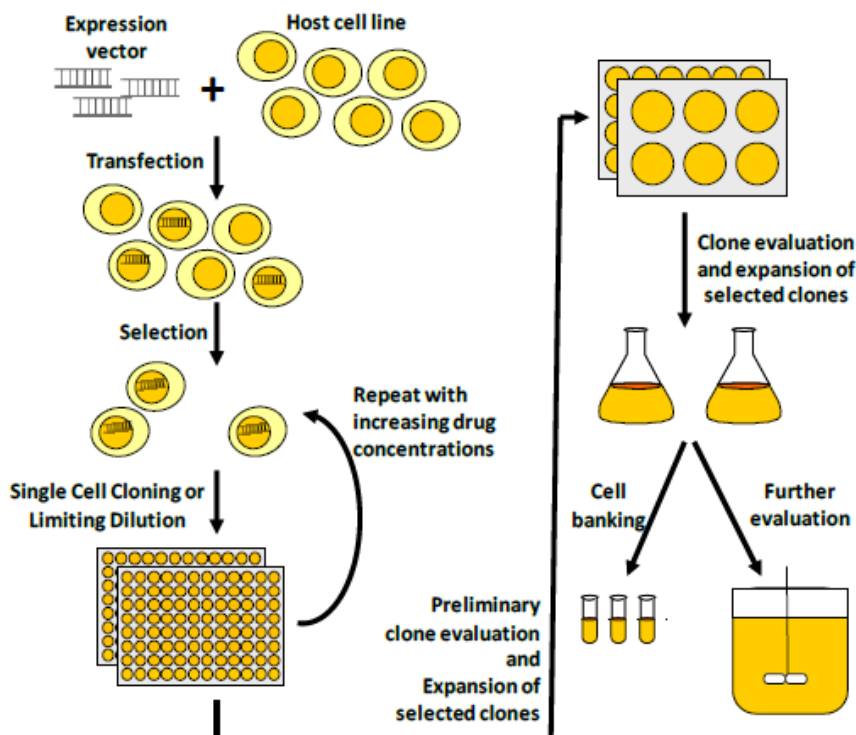


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung konventioneller Zelllinienentwicklung für die Produktion rekombinanter Proteine (Lai et al. 2013)

Nach der Klonierung des Expressionsvektors erfolgt die Transfektion in die Wirtszelle sowie die Selektion (MTX, MSX, Antibiotika). Mittels Verdünnungsklonierung werden klonale Zelllinien generiert, die hinsichtlich Proliferation, Produktivität sowie Stabilität untersucht und selektiert werden. Ausgewählte Zellklone werden zunächst kryokonserviert und anschließend für die weitere Evaluierung expandiert.

Die kommerzielle Zelllinienentwicklung erfolgt dabei insbesondere unter Verwendung des DHFR (Dihydrofolatreduktase)- Systems. Das Enzym Dihydrofolatreduktase katalysiert die Umsetzung von Dihydrofolat in Tetrahydrofolat, welches für die *de novo* Synthese von Thymin und Purin benötigt wird. Durch die Transfektion von DHFR-defizienten (DUXB11 und DG44) CHO Zellen (Urlaub & Chasin 1980) mit einem Expressionsvektor, welcher neben dem Gen für das rekombinante therapeutische Protein auch für das DHFR-Gen kodiert, kann die anschließende Selektion in Hypoxanthin/ Thymidin (HT)- Mangelmedium erfolgen. Da das Mangelmedium ohne HT keine essentiellen Nucleotidvorstufen enthält, können nur Zellen, welche den Expressionsvektor und damit das DHFR-Gen integriert haben, überleben. Die transfizierte heterogene Zellpopulation nach erfolgter Selektion ist charakterisiert durch verschiedene Integrationsorte sowie die Anzahl an Transgen-Kopien (Cacciatore et al. 2010; Lai et al. 2013; Noh et al. 2013). Mit Hilfe des Folsäure-Analogons Methotrexat (MTX) kann die Amplifikation des Dihydrofolatreduktasegens induziert werden. Dies bewirkt eine Steigerung der Kopienzahl im Zellgenom (Christman et al. 1982; Kaufman & Sharp 1982; Schimke 1984; Ringold et al. 1981). MTX inhibiert das DHFR Enzym kompetitiv und reversibel (Woodbury 2011). Dabei wird die MTX-Konzentration schrittweise erhöht, wodurch eine Überproduktion des inhibierten DHFR-Proteins induziert wird (Schimke 1984). Da der Expressionsvektor neben dem DHFR-Gen auch das Gen für das rekombinante therapeutische Protein trägt, resultiert die Gen-Amplifikation ebenso in einer Überproduktion des Transgens (Kaufman & Sharp 1982). Um hinreichend hohe Proteintiter zu erzielen, sind meist eine Vielzahl von zeitaufwändigen Selektionsrunden erforderlich. Dabei ist das Expressionslevel meist mit dem Grad der Gen-Amplifikation verknüpft. Jedoch führt eine hohe Anzahl an Transgenkopien nicht zwangsläufig in hohen Produktivitäten (Cacciatore et al. 2010).

Das für die Etablierung von Produzentenzelllinien ebenso häufig genutzte GS (Glutamin-Synthetase)-Expressionssystem basiert, wie das DHFR-System, auf der Selektion mit Hilfe eines metabolischen Markers (Cockett et al. 1990). Das GS-Expressionssystem kann sowohl bei GS-auxotrophen (NS0) als auch bei GS-endogenen (CHO) Zelllinien angewendet werden. Das Enzym Glutaminsynthetase katalysiert dabei unter Verbrauch von Ammonium die Umsetzung von Glutamat in Glutamin. Durch die Transfektion mit einem Expressionsvektor, welcher sowohl das GS-Gen als auch das Gen für das rekombinante therapeutische Zielprotein trägt, können die transfizierten Zellen anschließend mit Hilfe eines Glutamin-Mangelmediums selektiert werden. Bei Zellen mit endogener GS-Aktivität wird zusätzlich der GS-Inhibitor Methioninsulfoximin (MSX) in geringen Konzentrationen (25 µM) eingesetzt (Noh et al. 2013). Darüber hinaus kann durch den Einsatz steigender MSX-Konzentrationen analog zum DHFR-System die Amplifikation des in das Wirtsgenom integrierte GS-Gens sowie den rekombinanten Transgens erfolgen. Durch die Etablierung

einer CHO-K1 basierenden GS-knockout Zelllinie konnte die Selektionseffizienz verbessert und die erzielten Titer erhöht werden (Fan et al. 2012).

Die Etablierung und Identifizierung von stabilen Hochproduzentenzelllinien ist bei beiden Expressionssystemen jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Insbesondere die Untersuchung einer Vielzahl von Einzelzellklonen hinsichtlich ihrer Produktivität und Stabilität ist sehr aufwändig. Dies ist erforderlich, da die Integration der Transgene zufällig erfolgt. Der chromosomale Integrationsort der Transgenkassette bestimmt jedoch maßgeblich die Expressionsstärke des rekombinanten Proteins (Kim et al. 2004). Diese Positionseffekte beruhen maßgeblich auf der Wirkung flankierender endogener regulatorischer Elemente wie Enhancer, Silencer, der Chromatinstruktur sowie der transkriptionellen Aktivität des chromosomalen Locus (Emery et al. 2003; Wilson et al. 1990; Recillas-Targa 2004). Die Gen-Amplifikation begünstigt darüber hinaus die Umordnung von Chromatinstrukturen, was die Reduktion der Produktivität der Zelllinien und folglich Instabilität hervorrufen kann (Bailey et al. 2012; Chusainow et al. 2009). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Chromatinstruktur der Integrationsstelle durch epigenetische Prozesse, wie DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen, verändert werden kann, wodurch die Stilllegung von Genen (Gen-Silencing) induziert wird (Yang et al. 2010). Eine Möglichkeit zur Steigerung von Produzentenklonen sowie deren Produktivität innerhalb einer transfizierten Zellkultur ist die Verwendung genetischer Elemente, welche unabhängig vom Integrationsort einen transkriptionell aktiven Locus generierten. Die Ko-Expression von S/MAR (scaffold/ matrix attachment regions), UCOE (ubiquitous chromatin opening elements) Elementen oder Insulatoren konnte die Anzahl von Hochproduzentenklonen steigern sowie Transgene vor dem Gen-Silencing bewahren (Bandaranayake & Almo 2014). Durch das Erzeugen offener Chromatin-Schlaufen generieren S/MARs transkriptionell aktive Chromatinstrukturen. Darüber hinaus können S/MARs indirekt eine DNA-Demethylierung durch Histon-Acetylierung induzieren und beugen daher dem Gen-Silencing vor. UCOE-Elemente sind unmethylierte CpG-Inseln und erzeugen ebenso transkriptionell aktive Chromatin-Konfigurationen (Lai et al. 2013). Dennoch kann der Einsatz von Insulatoren die Positionseffekte und damit die Wirkung flankierender endogener regulatorischer Elemente nur abschwächen. Die Nichtvorhersagbarkeit der Transgenexpression der zufälligen Integration des Expressionsvektors ist ein entscheidender Nachteil bei der konventionellen Zelllinienentwicklung. Dies resultiert ferner in einem sehr zeit- und arbeitsaufwändigen Entwicklungs- und Selektionsprozess von Zelllinien.

1.2 Ortsspezifische Rekombinationssysteme in der Zelllinienentwicklung

Ein alternativer Ansatz für die reproduzierbare und vorhersagbare Etablierung stabiler Produzentenklone bietet die ortsspezifische Integration des Expressionsvektors in eine transkriptionell aktive chromosomale Region. Dabei katalysiert das Enzym Rekombinase unter Erkennung einer definierten Sequenz die Umordnung bestimmter Gen-Abschnitte. Die populärsten ortsspezifischen Rekombinationssysteme sind dabei das Cre/LoxP, das Flp/FRT und das Φ C31/attB/attP (Wirth et al. 2007; Gama-Norton et al. 2009). Das Φ C31/attB/attP System ist den Serin-Rekombinasen zugehörig, da Serin die aktive Aminosäure innerhalb der katalytischen Domäne des Enzyms ist. Die jeweiligen Erkennungssequenzen attB (attachment site bacteria) und attP (attachment site phase) sind nicht identisch und resultieren nach erfolgter Reaktion durch die Rekombinase in die hybriden Sequenzen attL und attR. Die durch die Φ C31 Rekombinase katalysierte Reaktion ist irreversibel. Die Umkehrung der Reaktion ist nur unter Verwendung eines zweiten Enzyms (Excisionase) möglich (Wang et al. 2011).

Die vom Bacteriophagen P1 stammende Cre (Cuases recombination)- Rekombinase sowie die Flp (Flippase)- Rekombinase, welche vom 2 μ Plasmid aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, gehören zu den bedeutendsten bi-direktionalen Tyrosin-Rekombinasen. Ihre aktive Aminosäure innerhalb der katalytischen Domäne ist Tyrosin. Ferner zeichnen sich beide Systeme durch identische Erkennungssequenzen aus (LoxP und FRT). Die von den Rekombinasen Cre und Flp katalysierten Reaktionen sind darüber hinaus reversibel. Die LoxP-Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase bestehen aus zwei 13 bp langen umgekehrten Wiederholungssequenzen (inverted repeats), welche eine 8 bp Abstandsregion (Spacer) flankieren. Die Flp-Rekombinase ist durch deutlich längere Erkennungssequenzen charakterisiert. Die FRTs bestehen, analog zu den LoxP Stellen, aus zwei 13 bp langen umgekehrten Wiederholungssequenzen, welche ebenso eine 8 bp Abstandsregion umschließen. Darüber hinaus existiert eine zusätzliche 13 bp lange Flp-Rekombinase bindende Domäne. In Abhängigkeit der Orientierung der Erkennungssequenzen katalysieren sowohl das Cre/LoxP als auch das Flp/FRT System Inversions-, Exzisions- und Integrationsreaktionen (Turan et al. 2011; Baer & Bode 2001). Diese sind schematisch in Abbildung 1-2 dargestellt. In Abbildung 1-2 A ist die Inversionsreaktion bei entgegengesetzt orientierten identischen Erkennungssequenzen aufgezeigt, bei welcher die Gen-Kassette anschließend invers orientiert vorliegt. Die Integration- und Exzisionsreaktion bei gleichartig orientierten Erkennungssequenzen ist in Abbildung 1-2 B gezeigt. Die Exzision, die Reversionsreaktion der Integration, ist dabei die thermodynamisch und kinetisch favorisierte Reaktion (Oumard et al. 2006; Bode et al. 2000; Baer & Bode 2001).

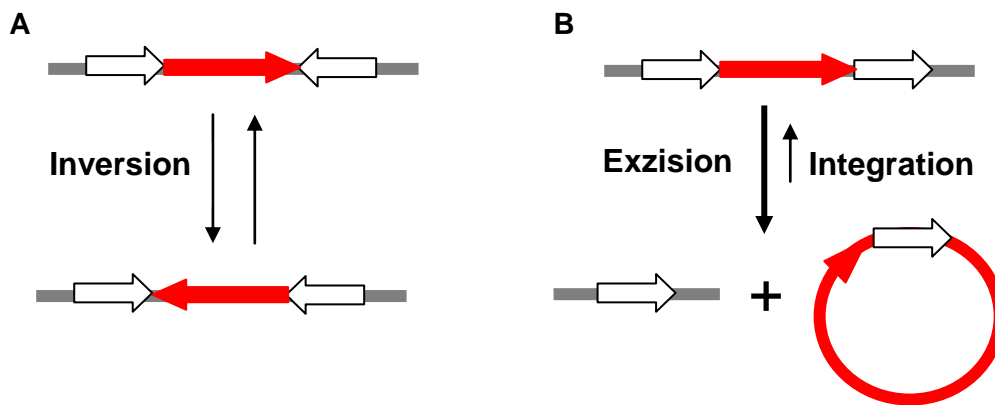


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der durch Tyrosin-Rekombinasen katalysierten Reaktionen

Die weißen Pfeile symbolisieren die Erkennungssequenz der Rekombinase. Der rote Pfeil markiert den durch die Erkennungssequenzen flankierten Gen-Abschnitt (Kassette).

A: Inversion eines Gen-Abschnittes, welcher durch die Erkennungssequenzen flankiert ist. Die Rekombinase wirkt dabei als Invertase. **B:** Exzision und Integration eines Gen-Abschnittes, katalysiert durch Integrase und Resolvase-Aktivität einer Tyrosin-Rekombinase. Die Exzision ist dabei thermodynamisch begünstigt.

Die ersten Ansätze zur Generation von rekombinanten Zelllinien mittels ortsspezifischer Rekombination (Gen-Targeting) basierten auf der Integration einer einzelnen Erkennungssequenz in das Genom der Zelllinie. Anschließend erfolgte die Transfektion mit einem Targeting-Vektor, welcher eine übereinstimmende Erkennungssequenz trägt, in Anwesenheit der Rekombinase. Dies führt zu der Integration der gesamten Vektor-Sequenz. Aufgrund der thermodynamischen Begünstigung der Exzisions- gegenüber der Integrationsreaktion, ist eine stringente Selektion notwendig, um korrekt integrierte Subklone zu identifizieren (Schübeler et al. 1998; O’Gorman et al. 1991; Wirth et al. 2007). Bei dem kommerziell erhältlichen Flp-In™ System von Life Technologies erfolgt dies über eine Hygromycin-Selektionsfalle. Nach erfolgter Rekombinationsreaktion wird das unvollständige Hygromycinresistenzgen des Austauschvektors durch einen Promotor und ein Startcodon (ATG) komplettiert. Nach der Integration können die Subklone entsprechend ihrer Hygromycinresistenz selektiert werden. Neben der potentiellen Reversibilität der Reaktion aufgrund der begünstigten Exzision ist ferner die Ko-Integration prokaryotischer Sequenzen ein Nachteil dieser Methode (Wirth et al. 2007; Baer & Bode 2001).

1.2.1 Rekombinase-vermitteltes Kassettenaustauschsystem

Das Rekombinase-vermittelte Kassettenaustauschsystem basiert auf dem Austausch von Gen-Kassetten, welche durch zwei heterospezifische Rekombinase-Erkennungssequenzen flankiert werden. Hierzu wurden Mutationen in der Abstandsregion (Spacer) der Erkennungssequenzen induziert, sodass diese miteinander rekombinieren können, jedoch nicht mit der Wildtyp-Sequenz. Dadurch wird die Exzision der Gen-Kassette verhindert.

Ferner wird ausschließlich die durch die Erkennungssequenzen flankierte Gen-Kassette integriert und keine prokaryotischen Sequenzen (Schlake & Bode 1994). Das Prinzip des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausches mittels Flp-Rekombinase unter Verwendung einer Δ neo-Selektionsfalle ist schematisch in Abbildung 1-3 dargestellt.

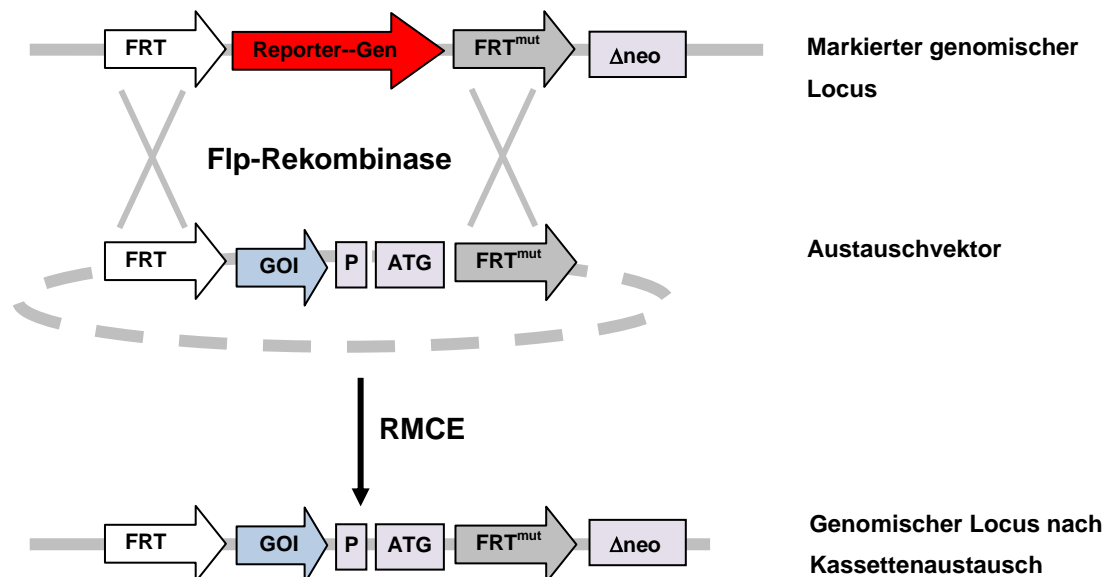


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Flp-Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch (RMCE)

Der genomische Locus einer Zelllinie ist markiert durch ein Reporter-gen, welches von zwei heterospezifischen Rekombinase Erkennungssequenzen (FRT/FRT^{mut}) flankiert ist. Eine Wechselwirkung zwischen Wildtyp und mutierter FRT-Sequenz ist nicht möglich. Durch die Ko-Transfektion mit einem Austauschvektor, welcher die gleichen Erkennungssequenzen nebst dem GOI (gene of interest) trägt, sowie der Rekombinase (Flp) wird der sequenzspezifische Austausch der GOI-Sequenz gegen die Reportergensequenz in dem definierter-markierten genomischen Locus katalysiert.

Zunächst wird ein genomischer Locus durch Einführung heterospezifischer Rekombinase-Erkennungssequenzen sowie eines Selektionsmarker- oder Reportergens markiert (Tagging). Die Integration des Markierungsvektors kann über homologe Rekombination, zufällige Integration ebenso wie mittels retroviralem Gentransfer erfolgen (Wirth et al. 2007; Verhoeven et al. 2001a). Die Verwendung von Retroviren bietet neben der Fähigkeit, statistisch Einzelkopien in das Wirtsgenom zu integrieren, den Vorteil, dass die Integration des Provirus bevorzugt in transkriptionell aktive Regionen erfolgt (Johnson & Levy 2005; Turan et al. 2013). Bei dem in Abbildung 1-3 dargestellten markierten genomischen Locus befindet sich ferner hinter der mutierten FRT-Sequenz ein nicht funktionelles Neomycinresistenzgen (Δ neo), dessen 11 Basenpaare sowie das Startcodon ATG fehlt. Die markierten Zellen sind demnach Neomycin sensitiv. Zur Durchführung des Kassettenaustausches (Targeting) erfolgt die Ko-Transfektion eines Rekombinase-

kodierenden Vektors und des Austauschvektors. Die Erkennungssequenzen, welche die Expressionskassette des Austauschvektors flankieren, müssen dabei mit denen der Markierungskassette übereinstimmen. Der sequenzspezifische Austausch der GOI-Sequenz gegen die Reportergensequenz wird durch die Rekombinase katalysiert. Durch den Kassettenaustausch wird das unvollständige Neomycinresistenzgen um ein ATG komplettiert, wodurch die entstehenden Targeting-Subklone resistent gegen Neomycin sind (Verhoeven et al. 2001a; Coroadinha et al. 2006; Nehlsen et al. 2009).

Neben der vorgestellten Selektionsfalle, basierend auf einem unvollständigen Selektionsmarkergen, konnten Schübeler et al. und Qiao et al. ebenso zeigen, dass die Lokalisierung des Promotors außerhalb der Kassette eine effektive Methode zur Selektion erfolgreicher RMCE Reaktionen darstellt (Qiao et al. 2009; Schübeler et al. 1998). Eine weitere Möglichkeit zur effizienten Selektion von Subklonen nach dem RMCE bietet die Verwendung des Hygromycin-Phosphotransferase/Thymidinkinase (hygk) Fusionsproteins. Die parentalen markierten Zellen sind resistent gegen Hygromycin, jedoch sensitiv gegenüber Ganciclovir, da dieses in Anwesenheit der Thymidinkinase in ein Zellgift umgewandelt wird. Nach erfolgreichem Kassettenaustausch verlieren die Zellen die hygk-Kassette und somit ihre Resistenz gegenüber Hygromycin. Gleichzeitig werden sie jedoch resistent gegen Ganciclovir, da dieses in Abwesenheit der Thymidinkinase nicht in ein zytotoxisches Produkt umgewandelt werden kann (Coroadinha et al. 2006; Schucht et al. 2006).

Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass das RMCE-System erfolgreich für die Expression von Antikörpern (Huang et al. 2007; Nehlsen et al. 2009), Retroviren (Schucht et al. 2006) sowie Erythropoetin (Min Soo & Gyun Min 2008) eingesetzt werden kann. Dies konnte ferner in verschiedenen Zelllinien wie Sf9 (Fernandes et al. 2012), HEK293 (Coroadinha et al. 2006), BHK (Schlake & Bode 1994) sowie CHO (Zhou et al. 2010; Wilke et al. 2011) gezeigt werden. Die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen erfolgte jedoch mit adhärennten Zelllinien unter Optimierung des Vektor-Designs zur Verbesserung der Effizienz des RMCE-Prozesses. Ferner gibt es bisher keine Untersuchungen, ob es einen universellen Locus für die Expression von Proteinen gibt. Inwieweit RMCE-basierte Zelllinien auch in Kultivierungsprozessen vorhersagbare und homogene Wachstums- und Produktionseigenschaften aufweisen, ist bisher ebenso nicht untersucht.

1.3 Zellkulturprozesse für die Produktion rekombinanter Proteine

Monoklonale Antikörper können für eine Vielzahl klinischer Indikationen eingesetzt werden und zählen zu den absatzstärksten Medikamenten (Noh et al. 2013; Huggett 2013). Da für viele Antikörper-basierte Therapien hohe Dosen über einen langen Zeitraum erforderlich sind, werden große Mengen aufgereinigter rekombinanter Antikörper benötigt (Li et al. 2005).

Aufgrund der leichteren Skalierbarkeit wird die Mehrzahl rekombinanter Proteine mittels Suspensionszellen durchgeführt. Dabei resultierte insbesondere die Optimierung der Kulturmedien in signifikant höheren Produkttitern von weniger als $0,1 \text{ g L}^{-1}$ auf bis zu 13 g L^{-1} (Reinhart et al. 2013; Huang et al. 2010; Zhu 2012). Während früher Zellkulturmedium für die Proliferation der Zellen mit 1-20 % fetalem Kälberserum supplementiert wurden, erfolgen heutzutage die Mehrzahl der Kultivierungsprozesse von Säugerzellen in serumfreien Medien. Vornehmliche Ursache ist der undefinierte Charakter von Serum und damit die potentielle Gefahr, Fremdagentien wie TSE (*Transmissible Spongiforme Enzephalopathie*) zu übertragen. In Abhängigkeit des zu exprimierenden rekombinanten Proteins bestehen chemisch-definierte Zellkulturmedien heutzutage meist aus Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen, anorganischen Salzen, Lipiden sowie Insulin oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Für manche Zelllinien kann zum Erzielen hoher Titer überdies die Supplementierung mit Hydrolysaten (frei von tierischen Komponenten oder nichttierischen Ursprungs) vorteilhaft sein. Die Verwendung von Hydrolysaten kann aufgrund der komplexen Zusammensetzung sowie Lot-zu-Lot Variationen zur Medienvariabilität beitragen (Li et al. 2010; Wurm 2004). Ziel bei der Entwicklung von Zellkulturmedien, welche über die Titration einzelner Medienkomponenten, Medium Blending oder Analyse des verbrauchten Mediums erfolgen kann, ist die Bereitstellung einer optimalen Menge essentieller Komponenten wie z.B. Glukose oder Glutamin. Auf diese Weise kann die Produktion toxischer Nebenprodukte wie Laktat oder Ammonium minimiert werden, und die Proliferation und Produktivität der Zellen wird nicht inhibiert (Jain & Kumar 2008). Neben dem Zellkulturmedium nimmt auch die Art der Prozessführung einen entscheidenden Einfluss auf die erzielten Zelldichten und Proteintiter. Konventionelle Prozessmodi bei der Kultivierung von Säugerzellen sind Batch, Fed-Batch sowie Perfusion. Beim Batch-Modus wird nur zu Beginn der Kultivierung ein definiertes Volumen Nährmedium vorgelegt. Da keine weitere Zufütterung von Nährstoffen erfolgt, sind die erzielten Produkttiter und Zelldichten relativ gering. Dieser vergleichsweise einfache Kulturmodus wird vornehmlich im Inokulum- oder Seedtrain, in Vorbereitung auf die Produktionsfermentation, eingesetzt (Abu-Absi et al. 2014). Der Fed-Batch ist charakterisiert durch die Zufütterung (Intervall oder kontinuierlich) von notwendigen Nährstoffen in Form einer konzentrierten Nährlösung zur Unterstützung der Proliferation sowie der Produktbildung der Zellen im Verlauf der Kultivierung. Die zusätzliche Nährstoffzufuhr hat zum Ziel, die finale Produktkonzentration zu maximieren, was aus der Erhöhung des Integrals der viablen Zelldichte und/oder einer erhöhten spezifischen Produktivität resultiert (Sauer et al. 2000). In einer Perfusionskultivierung erfolgt analog zum Chemostaten eine kontinuierliche Mediumzugabe gekoppelt mit der Ernte des verbrauchten Mediums; allerdings werden bei dem Perfusionsmodus die Zellen im Reaktor zurückgehalten. Dabei können sehr hohe vitale Zelldichten (bis zu 10^8 c mL^{-1}) über eine lange Prozesszeit aufrecht

erhalten werden. Für die industrielle Produktion rekombinanter Proteine wird jedoch insbesondere der Fed-Batch Modus aufgrund der einfachen Betriebsweise gewählt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bereits einfache Feed-Protokolle zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität führen (Whitford 2006). Ein weiterer Vorteil des Fed-Batch Prozesses besteht in der Akkumulation höherer Proteinkonzentrationen im Medium (Jain & Kumar 2008). Aufgrund des bevorzugten Einsatzes des Fed-Batch Modus in Produktionsfermentationen, erfolgt bereits im Rahmen der Zelllinienentwicklung eine Analyse der Kandidatenklone in Fed-Batch Kultivierungen (Li et al. 2010).

1.4 Statistische Versuchsplanung

Ein Prozess ist in der Regel charakterisiert durch Eingangsgrößen (Einflussfaktoren), die gezielt verändert werden können, sowie Störgrößen und Zielgrößen. Um die Zusammenhänge zwischen Einflussfaktoren und Zielgrößen zu identifizieren und den Prozess zu optimieren, sind meist eine Vielzahl von Einzelversuchen erforderlich. Ein weit verbreiteter Ansatz zur Versuchsplanung ist die OFAT- Methode (one factor at a time). Diese basiert auf dem Grundsatz der sukzessiven Änderung von nur einem einzigen Faktor innerhalb des zu untersuchenden Bereiches, während die übrigen Faktoren konstant bleiben. Um entsprechend der OFAT-Methode bestmögliche Faktorvariationen für eine Prozessoptimierung zu identifizieren, sind eine Vielzahl von Versuchen durchzuführen. Darüber hinaus werden potentielle Faktorwechselwirkungen unter Verwendung des OFAT-Ansatzes nur indirekt erfasst. Die statistische Versuchsplanung (engl. Design of Experiment, DoE) bietet als Hilfsmittel die Möglichkeit, bei Prozessen den Zusammenhang zwischen Einflussfaktoren (Regel- und Störgrößen) und Zielgrößen statistisch zu beschreiben. Die Verwendung des DoE-Ansatzes erlaubt neben der Identifikation relevanter Einflussfaktoren auch die Festlegung optimaler Faktoreinstellungen. Entscheidender Vorteil ist dabei, dass hier im Vergleich zur OFAT-Methode ein signifikant reduzierter Versuchsumfang erforderlich ist. Um im Rahmen von Screening-Versuchen signifikante Einflussfaktoren zu identifizieren, werden meist voll-faktorierte Versuchspläne genutzt (Siebertz et al. 2010; Meran et al. 2013; Wälder & Wälder 2013). Die Summe der Einzelversuche ist dabei abhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Einflussfaktoren (p) sowie der Anzahl der Einstellungsstufen (k):

$$\text{Anzahl Versuche} = k^p$$

Demnach sind bei der Untersuchung von 3 Faktoren auf 2 Stufen 8 Einzelversuche erforderlich. Mit steigender Anzahl an Faktoren nimmt die Anzahl der Versuche entsprechend exponentiell zu. Aufgrund ihrer Orthogonalität ermöglichen diese

Versuchspläne die unkorrelierte und unabhängige Bestimmung der Haupteffekte sowie Faktorwechselwirkungen. Dies ist vor allem bei Screening-Versuchen, bei welchen zunächst signifikante Faktoren identifiziert werden, von Vorteil, da eine separate Bestimmung unabhängig von anderen Faktoren im Modell möglich ist. Aufgrund ihrer Orthogonalität nehmen voll-faktorierte Versuchspläne cuboidale Designs an. Ferner erfolgt eine Normierung der Stufen der jeweiligen Faktoren, häufig bezeichnet als +1/-1, um unterschiedliche absolute Größenunterschiede auszugleichen. Dies ist am Beispiel eines 2^3 Versuchsplanes in Abbildung 1-4 dargestellt.

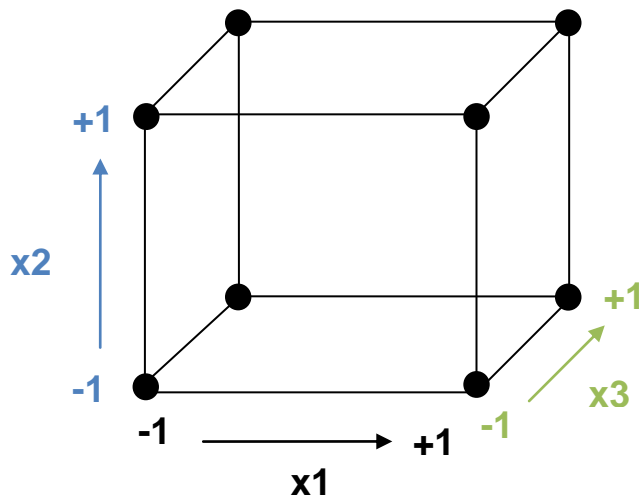


Abbildung 1-4: Cuboidales Design eines 2^3 voll-faktorierten Versuchsplans

Die Richtung der Pfeile weist zu steigenden Faktorwerten. Die Eckpunkte beschreiben die Versuche unter Variation der Faktoren auf hoher (+1) oder niedriger (-1) Stufe.

Die Eckpunkte des cuboidalen Designs beschreiben die Einzelversuche des Versuchsplans in Abhängigkeit der Variation der Faktoren auf hoher (+1) oder niedriger (-1) Stufe. Das cuboidale Design beschreibt ferner den untersuchten Versuchsraum. Da bei einem voll-faktorierten Versuchsplan alle Faktorstufen aller Faktoren miteinander kombiniert werden, werden alle Wechselwirkungen berücksichtigt. Basierend auf der Versuchsmatrix ergibt sich die Wechselwirkung der Faktoren über Multiplikation der an der Wechselwirkung beteiligten Faktoren. Dies ist in Tabelle 1-1 veranschaulicht, wobei jede Zeile einen Einzelversuch repräsentiert.

Tabelle 1-1: Tabellarische Darstellung der Versuchsmatrix, der Matrix der Faktorwechselwirkungen und der Antwortmatrix (Ergebnis)

Versuchsmatrix			Faktorwechselwirkungen				Antwort
x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3	y
-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	y1
+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	y2
-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	y3
+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	y4
-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	y5
+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	y6
-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	y7
+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	y8

Basierend auf der Versuchsmatrix, der Matrix der Faktorwechselwirkungen sowie den erzielten Ergebnissen für die jeweiligen Versuche (Antwortmatrix) können die Haupt- und Wechselwirkungseffekte berechnet werden. Der Effekt ist die Differenz der Mittelwerte der Antwortgrößen der hohen (+1) und niedrigen (-1) Stufe. Die Berechnung kann mittels folgender Formel erfolgen:

$$Effekt = \frac{1}{n} \left(\sum y_{(+1)} - \sum y_{(-1)} \right)$$

n Anzahl der Summanden beider Summen

y Antwortgröße

Bei mehrfacher Durchführung von Einzelversuchen kann des Weiteren eine Beurteilung der statistischen Signifikanz eines Effekts erfolgen. Insofern Mehrfachmessungen aus Zeit- sowie Kostengründen nicht möglich sind, kann die Prozessvarianz ebenso durch die Faktorinteraktion höherer Ordnung ($n > 3$) abgeschätzt werden. Diese Annahme kann basierend auf dem *Sparsity of Effects* Prinzip getroffen werden. Dabei haben vornehmlich eine begrenzte Anzahl an Hauptfaktoren sowie die Faktorinteraktionen niedriger Ordnung signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der meisten Systeme (Wu & Hamada 2000; Montgomery 2008).

Die Verwendung voll-faktorisierter Versuchspläne ist insbesondere dann von Vorteil, wenn eine geringe Anzahl von Faktoren gescreent werden soll, deren Einfluss auf den Prozess unbekannt ist, da alle Effekte unabhängig bestimmt werden können. Da bei der

Untersuchung von mehr als 5 Faktoren eine sehr hohe Anzahl an Einzelversuchen ($2^6=64$ Einzelversuche) durchgeführt werden muss, werden für diesen Zweck meist fraktioniert-faktorierte Versuchspläne verwendet. Darüber hinaus lassen sich mit voll-faktorierten Versuchsplänen auf 2 Stufen nur lineare Zusammenhänge erfassen.

2. Zielsetzung

Die CHO (Chinese Hamster Ovary) Zelle gilt seit der Zulassung des CHO-basierten tPA im Jahr 1986 als die bevorzugte Zelllinie für die Expression von rekombinanten Glykoproteinen (Lai et al. 2013). Die kommerzielle Entwicklung von Produzentenzelllinien basiert dabei meist auf der zufälligen Integration vieler Transgenkopien in das Wirtsgenom. Daran anschließend erfolgt ein aufwändiger Selektionsprozess zur Identifizierung stabiler Hochproduzenten. Da der Locus der Transgenintegration maßgeblich die Stabilität und Expressionsstärke beeinflusst, mangelt es klassischen Zelllinienentwicklungsprozessen an Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit. Das Rekombinase-vermittelte Kassettenaustauschsystem (RMCE) ist bereits in früheren Arbeiten als aussichtsreiche Alternative für die vorhersagbare Entwicklung von Zelllinien beschrieben worden (Rose et al. 2013; Rehberger et al. 2013; Turan et al. 2013; Noh et al. 2013). Inwieweit RMCE-basierte Zelllinien auch in Kultivierungsprozessen vorhersagbare und homogene Wachstums- und Produktionseigenschaften aufweisen, ist bisher nicht untersucht. Um die Leistungsfähigkeit und Eignung von Zelllinien mit Kassettenaustauschsystem für die kommerzielle plattformbasierte Prozessentwicklung besser einschätzen zu können, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit der Vergleich von RMCE-basierten mit konventionell entwickelten Zelllinien in Fed-Batch Kultivierungen erfolgen.

Aus diesem Grund war zunächst die parallele Entwicklung des RMCE-Systems sowie einer Modellzelllinie basierend auf suspendierten CHO-Zellen erforderlich. Die Etablierung des RMCE-Systems sollte dabei unter Verwendung lentiviraler Vektoren zur Markierung chromosomaler Loci erfolgen. Nach der Identifizierung von CHO-Klonen, deren markierter Locus transkriptionell aktiv sowie austauschbar ist, sollten Kassettenaustauschversuche mit pharmazeutisch relevanten Proteinen durchgeführt und Subklone generiert werden.

Die Entwicklung der Modellzelllinie, basierend auf konventionellen Methoden der Zelllinienentwicklung, sollte unter Optimierung der Selektionsstrategie erfolgen. Die generierten Hochproduzentenklone sollten anschließend in Batch und Fed-Batch Kultivierungen hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit untersucht werden.

Die Ergebnisse sollen der besseren Beurteilung von Zelllinien mit Kassettenaustauschsystem im Vergleich zu klassisch etablierten Zelllinien hinsichtlich ihrer Eignung in plattformbasierten Zellkulturprozessen dienen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifizierung stabiler chromosomaler Loci für die Generation von CHO-Masterzelllinien

Die Generation von Masterzelllinien für einen gezielten Austausch von Genkassetten erfordert zunächst die Markierung eines chromosomalen Locus. Unter Verwendung replikations-defizienter Lentiviren konnten bereits in früheren Arbeiten stabile Zelllinien generiert werden (Coroadinha et al. 2006; Schucht et al. 2006; Nehlsen et al. 2009; Liu et al. 2000). Neben der Fähigkeit, statistisch Einzelkopien in das Wirtsgenom zu integrieren, bietet die Verwendung von Retroviren für die Generation RMCE-kompatibler Masterzelllinien den Vorteil, dass die Integration des Provirus bevorzugt in transkriptionell aktive Regionen erfolgt (Johnson & Levy 2005; Turan et al. 2013).

3.1.1 Virusproduktion zur Markierung chromosomaler Loci

Für die Produktion der Lentiviren, welche auf dem HIV Typ 1 basieren, wurde das Vier-Plasmid-System verwendet. Dabei werden das Genom des Transfervektors, virale Strukturkomponenten und das heterologe Hüllprotein separat und transient exprimiert. Ferner wurde ein SIN-Vektor (*self-inactivating*) genutzt, wodurch nach reverser Transkription und Integration des Provirus der 5' LTR Promotor inaktiviert wird (Blesch 2004). Dies minimiert die Generation replikationskompetenter Viren durch Rekombination (Logan et al. 2002). Die für das FRT/Flp-Rekombinationssystem notwendigen heterologen Erkennungssequenzen flankieren auf dem Transfervektor den humanen EF1 α -Promotor sowie das Reportergen eGFP (Abbildung 3-1).



Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Provirus des lentiviralen Transfervektors pZLE-57

Die Transkription des Transgens (GFP) wird durch einen humanen EF1 α Promotor gesteuert. Die heterologen Erkennungssequenzen FRT-wt/F5 dienen dem Flp-katalysierten Kassettenaustausch. Das nicht vollständige Neomycin-Resistenzgen (Δ neo), dessen ATG und 11 Basenpaare fehlen, ermöglicht eine Selektion der Subklone nach dem Kassettenaustausch.

Die lentiviralen Partikel wurden durch eine Ca₃(PO₄)₂ Ko-Transfektion in HEK293T Zellen generiert. Der Virustiter wurde anschließend auf CHO-S Zellen bestimmt. Hierfür wurden 1,5x10⁵ Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch-Platte ausgesät und für 4-6 h inkubiert. Nach

Entfernung des Mediums wurde der Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Der Virustiter wurde 48 h nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Auf CHO-S Zellen betrug der Virustiter $3,4 \times 10^5$ TU mL⁻¹.

3.1.2 Lentivirale Transduktion von CHO-S Zellen

Um zu gewährleisten dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine CHO-S Zelle mit nur einem infektiösen Partikel infiziert wird, erfolgte die Transduktion mit einer MOI von 0,005. Entsprechend der Poisson-Verteilung werden somit 99,5 % aller Zellen nicht und 0,5 % mit einem Viruspartikel infiziert. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle mit mehr als zwei infektiösen Partikeln transduziert wird, liegt bei 0,001 % (Vgl. 4.2.2.9).

$2,5 \times 10^6$ CHO-S Zellen wurden 6 h vor der Transduktion in eine 10 cm Schale ausgesät. Die Transduktion der CHO-S-Zellen erfolgte entsprechend mit 37 µL Virusüberstand je 10-cm Schale (Vgl. 4.2.2.9). Die infizierte GFP-positive Zellpopulation (0,8 %) wurde 48 h nach Transduktion im FACS angereichert (Abbildung 3-2).

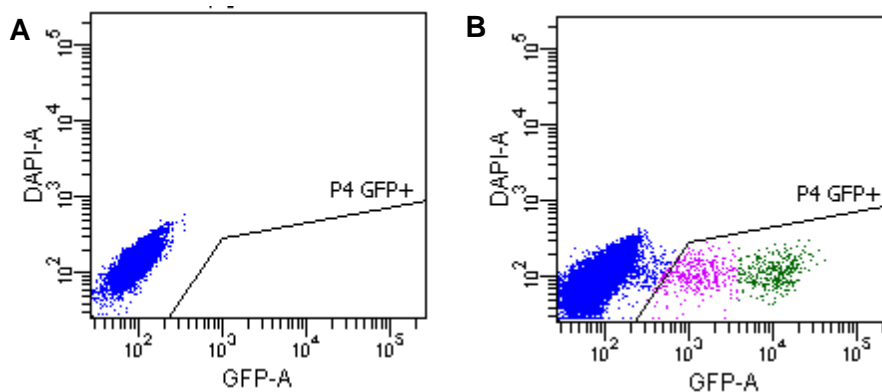


Abbildung 3-2: FACS Analyse der mit pZLE57 lentiviral markierten CHO-S Zellen

A: Nicht transduzierte CHO-S Kontrollzellen. **B:** DAPI/GFP Dotplot der transduzierten CHO-S Zellen. Die als P4 markierte GFP-positive Population wurde mittels FACS angereichert.

Die konzentrierte GFP-positive Population wurde unmittelbar nach dem Sortieren für die Generation von Einzelzellklonen in semi-solides Medium eingesät. Von 120 isolierten Zellkolonien konnten 63 Klone selektiert werden, welche im Durchflusszytometer einen einzelnen Peak einer GFP-exprimierenden Population im Histogramm aufwiesen. Die mittleren GFP-Fluoreszenzintensitäten der Klone lagen zwischen 250 -1600, wobei 70 % eine Fluoreszenz von 500-1000 aufwiesen. Aus diesem Pool an Einzelzellklonen wurden 13 Klone für initiale Kassettenaustauschversuche ausgewählt, welche über einen Zeitraum von 4 Wochen eine stabile GFP-Expression aufwiesen.

3.1.3 Austauschbarkeit markierter chromosomaler Loci

Die lentivirale Markierung genomischer Loci mit einer hinreichend geringen MOI begünstigt die Integration einer Einzelkopie (Nehlsen et al. 2009). Inwiefern die markierten Loci austauschbar sind, wurde durch initiale Kassettenaustauschversuche mit einem RFP-kodierenden Targetingvektor untersucht (Abbildung 3-3).

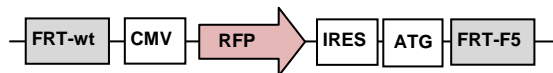


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Austausch-kassette pTAR-FL-RFP

Die Transkription des Transgens (RFP) wird durch einen CMV Promotor gesteuert. Die heterologen Erkennungssequenzen FRT-wt/F5 dienen dem Flp-katalysierten Kassettenaustausch. Das Startcodon ATG komplettiert bei korrekter Integration der Austausch-kassette das Neomycin-Resistenzgen des Markierungsvektors.

Dies erlaubt eine schnelle Analyse und Selektion der transfizierten Zellpools via FACS. Der Austauschvektor enthält ebenso wie der lentivirale Transfervektor die Flp-Erkennungssequenzen FRT-wt und FRT-F5, diese flankieren das Transgen (RFP), welches durch den CMV Promotor gesteuert wird. Durch den Austausch des lentiviralen Vektors gegen die Targeting-kassette wird das Neomycinresistenzgen um das Startcodon ATG komplettiert. Die Überprüfung der Austauschbarkeit der markierten Loci wird exemplarisch für die Masterzelllinie 1 gezeigt.

48h nach der Ko-Transfektion von 12 Kavitäten einer 24-Loch Platte mit jeweils 2×10^5 Zellen der Masterzelllinie 1 mit dem RFP-kodierenden Austauschvektor und dem Plasmid für das Enzym Flp-Rekombinase wurden die Zellen auf zwei 10-cm Schalen vereinigt. Auf die Selektion der Zellen mit G418 wurde verzichtet, da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass nach retroviraler Integration von Transgenen eine Anreicherung der infizierten Zellen mittels FACS stabile Zellpools generierte (Bleck 2005; Liu et al. 2000; Oberbek et al. 2011).

Da ein Kriterium für den erfolgreichen Kassettenaustausch die Expression von RFP und der Verlust der GFP Fluoreszenz ist, wurden die Zellen 96 h nach der Transfektion mittels FACS entsprechend sortiert (Abbildung 3-2).

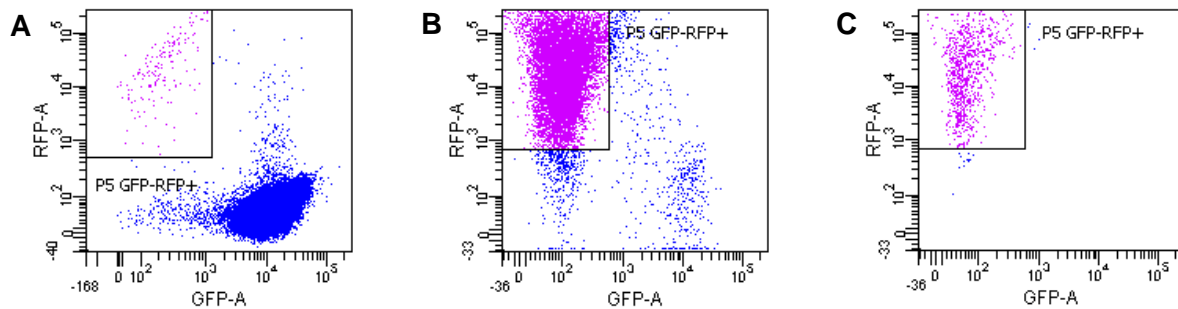


Abbildung 3-4: FACS Analyse der transfizierten Masterzelllinie mit RFP Austauschvektor

A: RFP/GFP Dotplot des transfizierten Zellpools nach dem Kassettenaustausch mit pTAR FL RFP. Die GFP-negativen und RFP-positiven Zellen (P5=0,2 %) wurden als Pool sortiert. **B:** RFP/GFP Dotplot des sortierten Zellpools. Die RFP exprimierende Population konnte auf 90 % angereichert werden und wurde einem zweiten Sortierschritt unterzogen. **C:** Der RFP/GFP Dotplot der resortierten Zellen wiesen mehr als 99 % RFP-positiv/ GFP-negative Zellen auf.

Die erste Zellsortierung führte zu einer Anreicherung der transfizierten Zellen von 0,2 % auf 90 % GFP-negative und RFP-positive Zellen. Nach einem FACS konnte die Population auf 99 % vergrößert werden, aus welcher anschließend Einzelzellklone in semi-solidem Medium generiert wurden. Eine über vier Wochen stabile RFP Expression konnte bei sieben von acht isolierten Klonen beobachtet werden. Die mittleren RFP Fluoreszenzintensitäten der Subklone sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

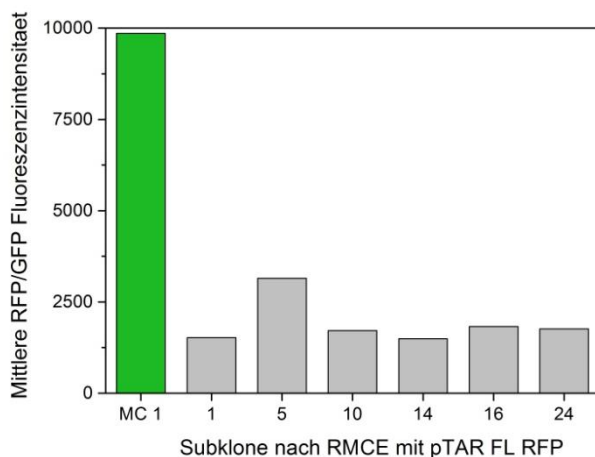


Abbildung 3-5: Mittlere Fluoreszenzintensität der Subklone nach Kassettenaustausch mit RFP Kasette

Nach der Einzelzellklonierung wurden die Subklone auf ihre Fluoreszenzintensitäten untersucht. Die Messung wurde mit Hilfe des FACSAria bei einer Anregungswellenlänge von 561 nm durchgeführt.

Die isolierten und untersuchten Subklone nach dem Kassettenaustausch wiesen eine homogene mittlere Fluoreszenzintensität von durchschnittlich 1600 auf. Die konforme Transgenexpression der Subklone konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (Wilke 2011). Mit 3149 ist bei Subklon 5 hingegen eine annähernd doppelt so starke

Fluoreszenzintensität zu beobachten. Ursache hierfür könnte die zusätzliche zufällige Integration des Austauschvektors sein. Ferner ist die Fluoreszenzintensität der Subklone im Vergleich zur GFP-Expression der Masterzelllinie 6-fach geringer. Dies lässt vermuten, dass die RFP-Expression nicht ausschließlich von der transkriptionellen Aktivität des genomischen Locus abhängig ist. Ferner konnten Nehlsen et al. zeigen, dass die finale Promotorstärke vom chromosomalen Locus abhängig ist (Nehlsen et al. 2009). Der im Markierungsvektor genutzte EF1 α Promotor scheint am definierten Locus der Masterzelllinie somit eine stärkere Transgenexpression zu induzieren als der CMV-Promotor. Die veränderte Fluoreszenzintensität von Reporter- zu ausgetauschtem Transgen wurde auch bei RMCE Versuchen mit CHO Lec3.2.8.1 Zellen beobachtet (Wilke et al. 2011).

Die genomische DNA der nach dem Kassettenaustausch erzeugten Einzelzellklone wurde ferner mittels PCR hinsichtlich der korrekten Integration der Targetingkassette überprüft (Abbildung 3-6). Durch die Bindung eines Vorwärtsprimers (EMCV2) in der Nukleotidsequenz des CMV-Promotors des Austauschvektors und eines Rückwärtsprimers (Neorev2) in dem unvollständigen Neomycinresistenzgen des proviralen Integrats ist bei der Integration der Austausch-kassette in der richtigen Orientierung ein 380 bp großes PCR-Fragment zu erwarten. In dem transfizierten Zellpool, welcher zweifach sortiert wurde, sowie in allen sechs untersuchten Subklonen wurde die Austausch-kassette korrekt integriert. Als Negativkontrolle diente die genomische DNA der Masterzelllinie 1, in welcher ausschließlich der Provirus integriert ist.

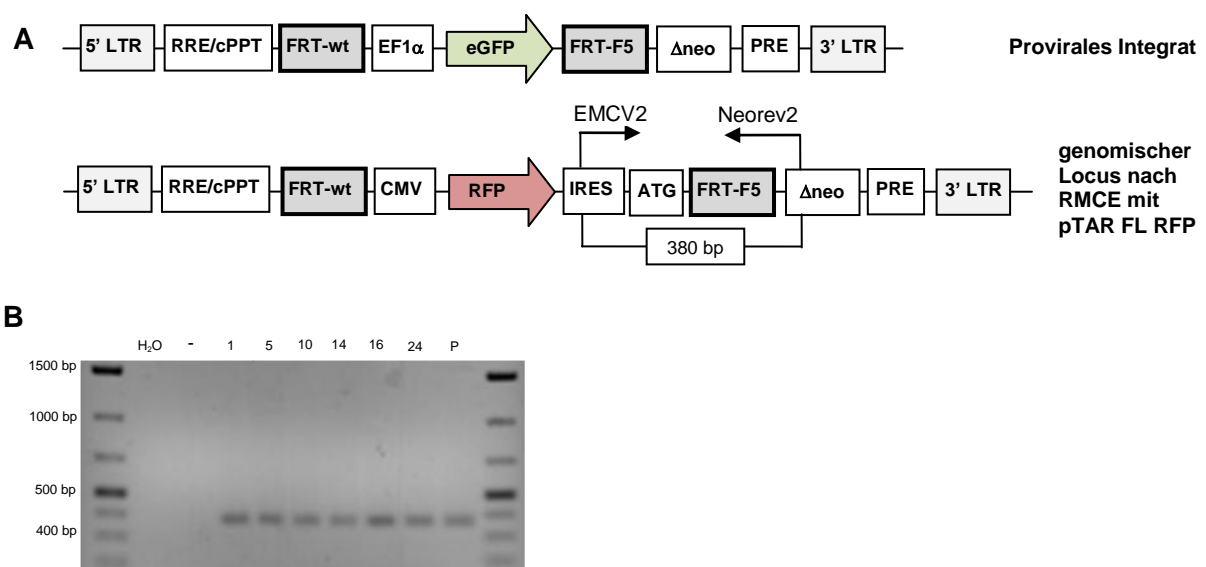


Abbildung 3-6: Strategie zur Analyse der Subklone nach dem Kassettenaustausch mittels PCR

A: Darstellung des proviralen Integrats der markierten Masterzelllinie. Durch den Flp-katalysierten Kassettenaustausch über die heterologen FRT-Sequenzen wird die GFP Kassette gegen den RFP Targetingvektor ersetzt. Die dabei integrierte IRES-Sequenz dient der Bindung des Vorwärtsprimers. **B:** Agarose Gelelektrophorese der PCR. Bei allen Subklonen (1, 5, 10, 14, 16, 24) sowie dem Targetingpool (P) nach der zweiten FACS-Analyse konnte die Zielbande von 380 bp detektiert werden. (H₂O) PCR Kontrolle, (-) Negativkontrolle, (P) Targetingpool nach zweiter FACS Analyse

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der initialen RMCE-Versuche mit einem RFP-kodierenden Targetingvektor vier Masterzelllinien identifiziert werden, deren chromosomaler Locus austauschbar war. Durch die initiale Selektion der transfizierten Zellen mittels FACS auf den Verlust der GFP-Expression konnte innerhalb von zwei Wochen eine RFP-exprimierende Zellpopulation generiert werden, bei welcher auch auf genomischer Ebene der korrekte Kassettenaustausch nachgewiesen werden konnte. Alle aus der Population generierten und untersuchten Subklone zeigten ebenso die richtige Integration der Targetingkassette. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von G418 für die Selektion von Klonen nach dem Kassettenaustausch mit den viral-markierten Masterzelllinien nicht notwendig ist. Durch das robuste und schnelle Wachstum der CHO-S Zellen wurden innerhalb von vier Wochen nach dem Kassettenaustausch Subklone generiert, welche anschließend ohne Adaption in Suspension expandiert werden konnten. Da jedoch davon ausgegangen werden musste, dass die verringerte RFP-Expression nach dem Kassettenaustausch auf die unterschiedliche Stärke des EF1 α und des CMV-Promotors an einem definierten chromosomalen Locus zurückzuführen ist, wurde für alle folgenden Austauschvektoren der EF1 α Promotor für die Expression der Transgene genutzt.

3.1.4 Langzeitstabilität markierter Masterzelllinien

Nach der Identifizierung von vier Masterzelllinien mit austauschbarem Locus wurden diese hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität überprüft. Die Zelllinien wurden dabei über einen Zeitraum von 70 Tagen in serumfreiem, chemisch-definiertem Medium (CD-CHO, vgl. 4.2.2.2) ohne Selektionsdruck in 50 mL Minibioreaktoren kultiviert. Alle vier Passagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien hinsichtlich des Anteils der GFP-exprimierenden Zellen sowie der mittleren Fluoreszenzintensität (Abbildung 3-7).

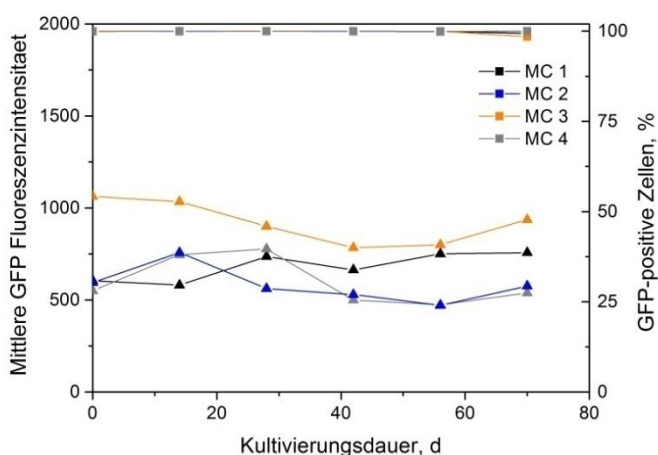


Abbildung 3-7: Langzeitstabilität viral markierter CHO-Masterzelllinien

Darstellung der mittleren GFP-Fluoreszenzintensität (Dreiecke) sowie des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen (Quadrate) der vier Masterzelllinien über einen Zeitraum von 70 d. Beide überprüften Parameter waren über den untersuchten Zeitraum ohne den Einsatz von Selektionsdruck stabil. (schwarz) – MC 1, (blau) – MC 2, (orange) – MC 3, (grau) – MC 4

Von den vier untersuchten Masterzelllinien wies MC 3 die höchste mittlere GFP-Intensität auf. Die übrigen drei Zelllinien exprimierten GFP etwas schwächer. Über den untersuchten Zeitraum von 70 Tagen konnte bei allen Masterzellen eine stabile mittlere Fluoreszenzintensität des Reporters GFP beobachtet werden. Auch der Anteil GFP-positiver Zellen lag zum Ende des Langzeitstabilitätsversuches für alle markierten Zellklone bei über 98 %.

Die Verwendung lentiviraler Vektoren für die Markierung chromosomaler Loci generiert stabile Zelllinien. Im Gegensatz zur plasmidalen Integration von Transgenen ist der Einsatz von Selektionsdruck nicht notwendig. Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen früherer Arbeiten, bei welchen die Verwendung lentiviraler Vektoren ebenso zu stabilen Zelllinien führte (Nehlsen et al. 2009; Oberbek et al. 2011; Schucht et al. 2006).

3.2 Expression rekombinanter Proteine an definierten chromosomalen Loci

Nach der Identifikation von vier lentiviral-markierten Masterzelllinien, die über einen Zeitraum von 70 d stabil GFP exprimierten und deren chromosomaler Locus austauschbar war, wurde anschließend die Proteinexpression untersucht. Dabei sollte ferner überprüft werden, inwieweit eine universelle Nutzung eines chromosomalen Locus für die Produktion verschiedener Proteine möglich ist. Hierfür wurden verschiedene biopharmazeutisch relevante Proteine an einem definierten Locus unter Verwendung des Kassettenaustauschverfahrens in suspendierten CHO-Zellen exprimiert.

Für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Zelllinien mit RMCE System wurden daher drei vollständige Antikörper, ein Antikörperfragment sowie das Enzym tPA mit Hilfe der generierten Masterzelllinien exprimiert (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Rekombinant exprimierte Proteine unter Verwendung von RMCE

Symbol	Beschreibung	Spezies
IgG2a	Murine G8.8 (anti-EpCAM) VH/VL, murine CL (kappa)/CH (IgG2a)	Mus Musculus
IgG2a copt	Murine G8.8 (anti-EpCAM) VH/VL, murine CL (kappa)/CH (IgG2a) CDR codon-optimiert für CHO	Mus Musculus
IgG1 lambda	Chimärer IgG1, murine G8.8 (anti-EpCAM) VH/VL, humane CL (lambda)/CH (IgG1) CDR codon-optimiert für CHO	Homo sapiens

IgG1 kappa	Chimärer IgG1, murine G8.8 (anti-EpCAM) VH/VL, humane CL (kappa)/CH (IgG1) CDR codon-optimiert für CHO	Homo sapiens
scFv-Fc	Antikörperfragment, humans IgG1 Fc, anti-MUC1 scFv (HT186-D11) (Thie et al. 2011)	Homo sapiens
tPA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator	Homo sapiens

Der Austauschvektor (Targetingvektor), dargestellt in Abbildung 3-8, basiert auf dem Plasmid pTARPGK (erhalten von Dr. Dagmar Wirth, AG Modellsysteme für Infektion und Immunität, HZI Braunschweig). Die heterologen Flp-Rekombinase Erkennungssequenzen (FRT-wt/FRT-F5) flankieren die Expressionskassette. Die Einführung von Mutationen in der Spacer-Region der FRT Sequenz ermöglicht nur eine Rekombination von Erkennungsstellen mit sich selbst, jedoch nicht mit anderen mutierten und der Wildtyp-FRT-Sequenz (Schlake & Bode 1994). Dies gewährleistet einen effizienten Austausch der Markierungskassette gegen die Austausch-kassette. Der unmittelbar vor der FRT-F5 Erkennungsstelle befindliche PGK-Promotor sowie das Startcodon ATG dienen der Komplettierung des unvollständigen Neomycinresistenzgens. Dies ermöglicht mittels G418 die Selektion von Zellen, bei welchen die Austausch-kassette korrekt integriert wurde (Verhoeven et al. 1998). Die Expression von Proteinen, bestehend aus zwei Untereinheiten, erfolgt über zwei separate Gene, welche jeweils unter der Kontrolle des humanen EF1 α Promotors stehen. Für die Transkription von nur einer cDNA wird der in Abbildung 3-8 grau hinterlegte Abbildungsbereich (pA, EF1 α , GOI) molekularbiologisch entfernt. Am 3'-Ende der insertierten Gene befindet sich ferner ein Polyadenylierungssignal (polyA) zur Terminierung der Transkription.



Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der Targetingkassette für die Expression der in Tabelle 3-1 gelisteten rekombinanten Proteine

Die FRT-Erkennungsstellen (FRT-wt/F5) flankieren die Expressionskassette. Die Transkription der Transgene steht unter der Kontrolle zweier humaner EF1 α Promotoren. Der Komplettierung des unvollständigen Neomycinresistenzgens auf dem im Wirtsgenom integrierten Markierungsvektor dient der PGK Promotor sowie der Transkriptionsinitiation durch das Startcodon ATG. Für die Transkription von nur einer cDNA wird der grau hinterlegte Abbildungsbereich (pA, EF1 α , GOI) molekularbiologisch entfernt.

3.2.1 Ortsspezifische Rekombination führt zu vorhersagbarer Antikörperexpression

Zunächst wurde die cDNA der in Tabelle 3-1 aufgeführten, zu untersuchenden Proteine in Austauschvektoren kloniert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte zunächst mit der viral-markierten CHO-Suspensionsmasterzelllinie 1. Dazu wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen der MC 1 mit pFlpe sowie dem proteinkodierenden Austauschvektor kotransfiziert und somit die Markierungskassette des Provirus gegen die Targetingkassette ausgetauscht. Durch den erfolgten Kassettenaustausch verlieren die Zellen ihre Fähigkeit GFP zu exprimieren. Entsprechend wurden die GFP-negativen Zellen ($\sim 0,1\%$) des transfizierten Pools nach drei Tagen mittels FACS angereichert. Nach einer wiederholten Anreicherung des sortierten Pools auf 99 % GFP-negative Zellen, werden diese innerhalb einer Woche für die Kultivierung in einem 50 mL Bioreaktor (TPP TubeSpin 50) expandiert. Da bereits die initialen Kassettenaustauschversuche mit der RFP-Kassette ohne Verwendung von G418 erfolgreich verliefen, wurde auf den Einsatz von Selektionsdruck auch bei allen nachfolgenden RMCE Versuchen verzichtet. Zwei Wochen nachdem der Kassettenaustausch erfolgte, wurde nach Isolierung der genomischen DNA überprüft, ob auf genomischer Ebene ein korrekter Kassettenaustausch durchgeführt wurde. Analog zur PCR Strategie beim Kassettenaustausch mit der RFP-kodierenden Kassette bindet ein Rückwärtsprimer (Neorev2) in dem unvollständigen Neomycinresistenzgen des im CHO Genom integrierten Markierungsvektors. Wurde die Targetingkassette korrekt integriert, so bindet ein Vorwärtsprimer (PGK2fwd) im PGK-Promotor der Austausch-kassette und ein 380 bp großes Fragment kann mit Hilfe der PCR detektiert werden (Abbildung 3-9).

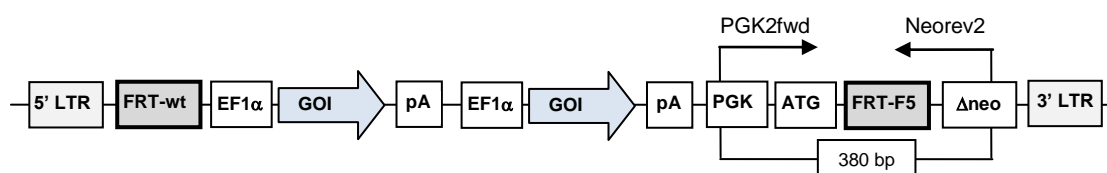


Abbildung 3-9: Strategie zur Überprüfung des Kassettenaustausches auf genomischer Ebene

Durch die Bindung eines Vorwärtsprimers im PGK-Promotor der Austausch-kassette und eines Rückwärtsprimers im unvollständigen Neomycinresistenzgen des Markierungsvektors kann bei erfolgreichem Kassettenaustausch mittels PCR ein 380 bp großes Fragment detektiert werden.

Die Untersuchung der re-sortierten Zellpools nach dem RMCE ergab, dass für alle Austauschvektoren der Kassettenaustausch korrekt durchgeführt wurde (Abbildung 3-10). Analog zu den RMCE Versuchen mit RFP konnte gezeigt werden, dass die Selektion mittels

FACS ohne Verwendung von G418 zum richtigen Austausch der Markierungskassette gegen die Targetingkassette führte.

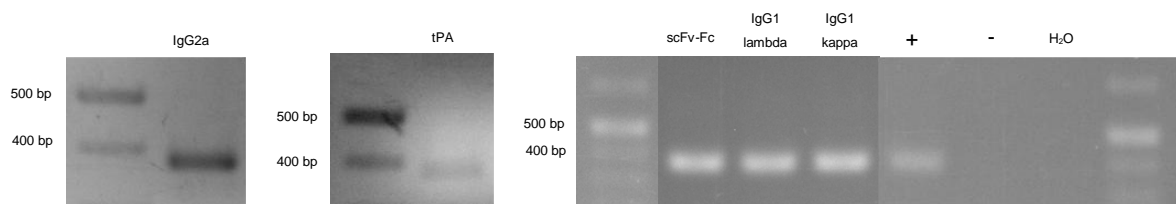


Abbildung 3-10: Agarose Gelelektrophorese der PCR genomischer DNA re-sortierter RMCE Poole.

Bei Kassettenaustauschreaktionen konnte nach der zweiten FACS-Analyse die Zielbande von 380 bp detektiert werden.

(H₂O) PCR Kontrolle, (-) Negativkontrolle – genomische DNA der viral-markierten Masterzelllinie, (+) Positivkontrolle – genomische DNA von Zellen, die bereits in früheren Versuchen den Kassettenaustausch korrekt durchführten.

Von den GFP-negativen Targetingpools, bei welchen mittels PCR der Kassettenaustausch nachgewiesen werden konnte, erfolgte anschließend die Bestimmung der spezifischen Produktivität für die Expression des jeweiligen rekombinanten Proteins. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf $3 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ passagiert und im 50 mL Bioreaktor bei 180 rpm, 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h und 72 bzw. 96 h wurde die Zellzahl mittels CASY und der Proteintiter mittels ELISA bestimmt und die spezifische Produktivität in Pikogramm pro Zelle und Tag berechnet (Vgl. 4.2.2.11). Die ermittelten spezifischen Produktivitäten der generierten re-sortierten Zellpoole nach dem Kassettenaustausch mit der Masterzelllinie 1 sind in Abbildung 3-11 dargestellt.

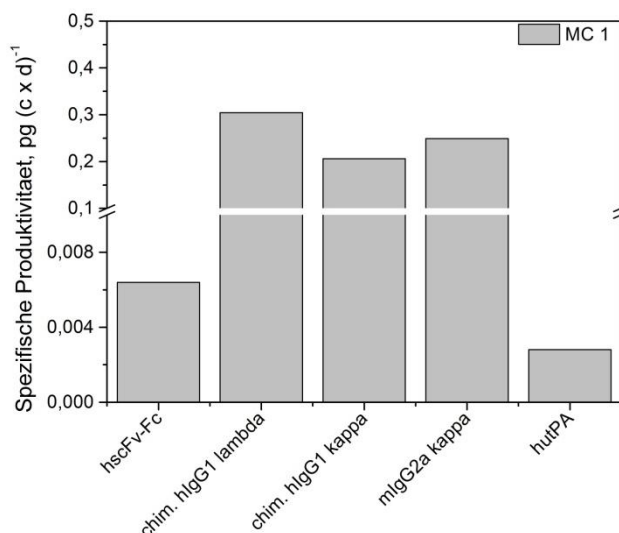


Abbildung 3-11: Expression verschiedener rekombinanter Proteine von einem definierten Locus der Masterzelllinie 1

Darstellung der spezifischen Produktivität der re-sortierten GFP-negativen Zellpoole nach RMCE mit den GOI exprimierenden Austauschvektoren.

Für die drei untersuchten vollständigen Antikörper konnten vergleichbare spezifische Produktivitäten von 0,2 – 0,3 pcd ermittelt werden. Die Nukleotidsequenzen beider chimären anti-EpCAM IgG1 Antikörper, die sich in dem Isotyp ihrer leichten Kette unterscheiden, wurden für *Cricetulus griseus* entsprechend dem GeneOptimizer Algorithmus optimiert (Raab et al. 2010). Da bekannt ist, dass die Wahl häufig genutzter Codons die Expression in Säugerzellen verbessern kann, erfolgte die Optimierung der Nukleotidsequenz hinsichtlich dieses Aspekts (Fath et al. 2011; Graf et al. 2009; Gustafsson et al. 2004). Ferner wurde die cDNA in Hinblick auf die Eliminierung kryptischer Splice-Stellen sowie stabiler RNA Sekundärstrukturen optimiert. Die Nukleotidsequenz des murinen anti-EpCAM IgG2a Antikörpers (erhalten von Micromet AG, 2009) hingegen wurde zunächst nicht codon-optimiert eingesetzt. Dennoch konnte eine vergleichbare Produktivität wie bei den chimären Antikörpern erzielt werden. Ferner scheint die Expressionstärke der chimären Antikörper von dem definierten Locus der Masterzelllinie 1 nicht von dem Isotyp der leichten Kette beeinflusst zu werden. Die Expression des Antikörperfragmentes (erhalten von PD Dr. Hust, Prof. Dr. Dübel, Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, TU Braunschweig) sowie des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (tPA) hingegen waren um Faktor 50 bzw. 100 erniedrigt. Beide Nukleotidsequenzen waren nicht codon-optimiert für die Expression in einem bestimmten Wirtsorganismus. Altamirano et al. konnten einen tPA Titer von bis zu 1,8 mg L⁻¹, mit vorheriger Supplementierung von Serin, Prolin und Asparagin, in serumfreien Batch-Kultivierungen (CHO) nach einer Kulturdauer von 145 h erzielen (Altamirano et al. 2006). Berrios et al. kultivierten tPA-exprimierende CHO-Zellen bei 31 °C und mit 40 mM Mannose anstelle von Glukose und erreichten nach 144 h einen tPA-Titer von 1,5 mg L⁻¹ (Berrios et al. 2009). In einem zweistufigen Fed-Batch Prozess, bei welchem die CHO-Zellen zunächst in Glutamin- haltigem Medium wuchsen, welches anschließend in einem Feed durch Glutamin-Substituenten, wie Pyruvat oder Glutamat, ersetzt wurde, konnte der tPA Titer von 33 mg L⁻¹ (Batch) auf 452 mg L⁻¹ erhöht werden. Neben den Glutamin Substituenten wurde die auf einem kommerziellen Feed basierende Nährlösung zusätzlich mit Hydrolysaten sowie Aminosäuren (Asparagin, Cystein, Tyrosin und Asparaginsäure) supplementiert (Kim et al. 2012). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass für die Produktion hinreichend großer tPA-Titer neben dem Kultivierungsprozess vor allem die hinreichende Zufütterung verbrauchter Aminosäuren notwendig ist.

Da bei den Kassettenaustauschversuchen mit der MC 1 der nicht codon-optimierte murine IgG2a eine vergleichbare Expression lieferte, wie die codon-optimierten chimären IgG1 Antikörper, wurde die Nukleotidsequenz des murinen IgG2a nochmals synthetisiert und hinsichtlich der oben genannten Parameter optimiert. Die verbesserten Sequenzen wurden in den Austauschvektor kloniert und in den Masterzelllinien 2 und 4 in RMCE Versuchen getestet, da das RMCE mit dem sequenzoptimierten Vektor unter Verwendung der

Masterzelllinie 1 vielfach nicht funktionierte. Der korrekte Kassettenaustausch konnte bei den zweifach sortierten GFP-negativen Targetingpools mittels PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die Überprüfung der Subklone ($3 < n < 7$) hinsichtlich ihrer spezifischen Produktivität (Abbildung 3-12).

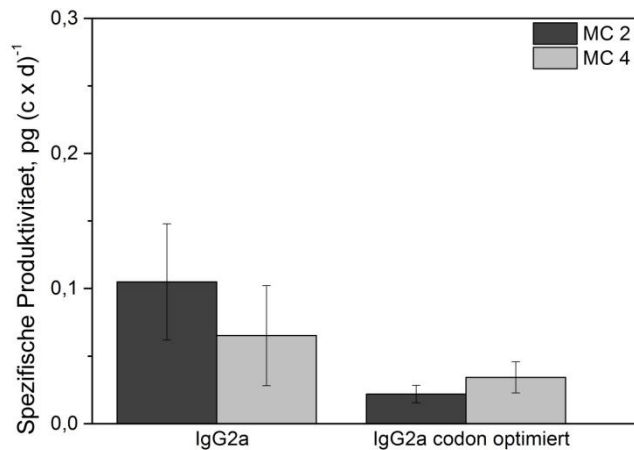


Abbildung 3-12: Vergleich der Expressionstärke der codon-optimierten mIgG2a Sequenz gegenüber der nicht optimierten Sequenz von definierten Loci der Masterzelllinien 2 und 4

Die Nukleotidsequenz der leichten und schweren Kette des murinen IgG2a Modellantikörpers wurde codon-optimiert und in den Austauschvektor kloniert. Mittels RMCE wurden sowohl der codon-optimierte, als auch der nicht optimierte Austauschvektor in den genomischen Locus der Zellen integriert und die Expression der Subklone ($3 < n < 7$) überprüft. Eine Codon-Optimierung führt in den untersuchten Zelllinien zu einer 2-5 fach verringerten mIgG2a Expression.

Die Optimierung der Nukleotidsequenz des exprimierenden murinen IgG2a Antikörpers führte nach dem Kassettenaustausch mit den Masterzelllinien 2 und 4 zu einer 5 bzw. 2-fach verringerten spezifischen Produktivität. Diese Ergebnisse konnten mit transienten Transfektionen der Wirtszelle CHO-S sowie der DHFR-defizienten DG44 Zelllinie reproduziert werden. Der codon-optimierte Vektor lieferte eine um den Faktor 3 verringerte Expression (Daten nicht gezeigt). Dies ist abweichend von den Ergebnissen von Fath et al., die bei der Untersuchung von 50 verschiedenen Proteinen nach der Codon-Optimierung bei 43 Proteinen eine erhöhte Expression beobachteten (Fath et al. 2011). Ferner scheinen Positionseffekte, also der Einfluss der unmittelbaren chromosomalen Umgebung eines Gens auf dessen Expression, nicht ursächlich für die verminderte Expression zu sein, da die Expression des Transgens von dem gleichen chromosomalen Locus erfolgt.

Nachdem bei Masterzelllinie 1 beobachtet werden konnte, dass unabhängig vom Isotyp der leichten Kette eine vergleichbare Expressionsstärke der chimären Antikörper erzielt wird, wurde überprüft, ob dies bei den Masterzelllinien 2-4 ebenso festgestellt werden kann. Darüber hinaus wurde auch das Antikörperfragment (scFv-Fc) in Kassettenaustauschversuchen mit den Masterzelllinien 2-4 untersucht. Nach der Ko-

Transfektion der Masterzelllinien mit den jeweiligen Austauschvektoren erfolgte eine zweimalige Anreicherung der GFP-negativen Zellen mittels FACS und die Expansion der Zellen auf einen 50 mL Bioreaktor. Mittels PCR konnte bei allen re-sortierten Pools der korrekte Austausch der Markierungskassette gegen die Targetingkassette nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die spezifischen Produktivitäten der generierten Zellpools sind in Abbildung 3-13 dargestellt.

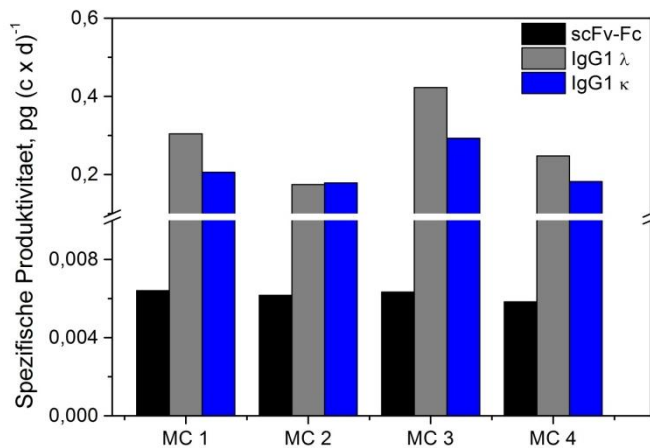


Abbildung 3-13: Expression zweier chimärer Antikörper sowie eines Antikörper-Fragments von definierten Loci der Masterzelllinien 1-4

Darstellung der spezifischen Produktivität der re-sortierten GFP-negativen Zellpools nach RMCE mit den GOI exprimierenden Austauschvektoren.

Bei RMCE mit dem chimären IgG1 mit einer λ leichten Kette wurden spezifische Produktivitäten von 0,17 – 0,42 pcd, mit einer κ leichten Kette von 0,17 – 0,29 pcd erreicht. Dabei ist auffallend, dass bei allen Masterzelllinien zum Einen die Varianz der Produktivität zwischen den Antikörpern unterschiedlicher Isotypen der leichten Kette gering ist. Zum Anderen ist die Expressionsstärke der vollständigen Antikörper ebenso zwischen den Zelllinien vergleichbar. Eine Ursache könnten ähnliche Integrationsorte des Markierungsvektors bei den vier Masterzelllinien sein. So wiesen bei der retroviralen Markierung von CHO-K1 Zellen die Mehrzahl der isolierten Klone identische Bandenmuster bei der Detektion von Randfragmenten in der Southern Blot Analyse auf. Daraus ließe sich schließen, dass nur wenige unabhängige Integrationsorte isoliert wurden (Schucht 2006). Ob die generierten Masterzelllinien tatsächlich an ähnlichen Stellen markiert wurden, kann nur mittels Sequenzierung der Integrationsstellen beantwortet werden.

Auch die spezifische Produktivität des scFv-Fc Antikörperfragmentes ist zwischen den Masterzelllinien vergleichbar. Darüber hinaus reproduziert sich auch die um etwa Faktor 50 verminderte Expressionsstärke im Vergleich zu den vollständigen Antikörpern für alle

Masterzelllinien. Eine Optimierung der Nukleotidsequenz des Antikörperfragments erfolgte im Gegensatz zu den Sequenzen der chimären Antikörper nicht. Die Ergebnisse des direkten Vergleichs optimierter und nicht-optimierter Nukleotidsequenz mit dem IgG2a lassen jedoch die Schlussfolgerung zu, dass die um Faktor 50 verminderte Expression nicht ausschließlich in der Codon-Optimierung begründet liegt. Ferner konnten in adhärennten HEK293T Zellen nach transienter Transfektion scFv-Fc Titer von 1- 20 mg L⁻¹ erzielt werden (Schirrmann et al. 2008). Unter Verwendung serumfreier HEK293-6E Zellen konnte ein scFv-Fc Proteintiter von mehr als 100 mg L⁻¹ nach 5-tägiger Kultivierung erzielt werden (Schirrmann & Büsow 2010). Die chromosomalen Loci scheinen demnach für die Expression des Fusionsproteins ungeeignet zu sein.

Unter den überprüften Masterzelllinien wies die MC-3 mit etwa 1000 die höchste mittlere Fluoreszenzintensität auf, wohingegen die Masterzelllinien 1, 2 und 4 Fluoreszenzen von 500-700 zeigten (vgl. Abbildung 3-7). Die erhöhte GFP-Expression der Masterzelllinie 3 spiegelt sich nach dem Kassettenaustausch jedoch nicht in einer erhöhten Transgenexpression im Vergleich zu den anderen Zelllinien wider. Daher stellt sich die Frage, ob die GFP-Fluoreszenzintensität als direktes Maß für die zu erwartende Expressionsstärke eines glykosylierten sekretierten Proteins zu nutzen ist. Wilke et al. exprimierten mittels Flp-basiertem Kassettenaustausch in der serumfreien CHO-Glykosylierungsmutante Lec3.2.8.1 die luminalen Domänen lysosomal-assoziiertes Membranproteine (hLAMP3-prox, mLAMP2-dist). Die mittels GFP markierten Masterzelllinien wiesen nach 5-tägiger Kultivierung GFP-Titer von 10-30 mg L⁻¹ auf (Wilke 2011). Nach dem RMCE konnten in Perfusionskultivierungen 27 mg hLAMP3-prox und 15 mg mLAMP2-dist in 22,5 L konditioniertem Medium produziert werden (Wilke et al. 2011). Dies lässt keinen Schluss zu, dass die GFP-Expression mit anderen sekretierten Proteinen vergleichbar ist. Rose et al. wählten einen alternativen Ansatz, bei dem CHO-DG44 Zellen initial mit GFP markiert wurden und anschließend einem ersten RMCE unterzogen werden. Dabei wird ein glykosyliertes Modellprotein (A1AT - Alpha 1 Antitrypsin) sekretiert. Die so isolierten Klone besitzen demnach einen transkriptionell aktiven Locus, der ferner bereits Prozessierungs- und Sekretionseigenschaften aufweist. Nach dem RMCE, bei welchem der für das Zielprotein kodierende Targetingvektor integriert wurde, konnten in Fed-Batch Kultivierungen Antikörpertiter von 0,5 g L⁻¹ und für ein Rezeptor-Fc Fusionsprotein 1,2 g L⁻¹ erzielt werden (Rose et al. 2013).

Zusammenfassend deuten die bisherigen Ergebnisse nicht auf die universelle Einsetzbarkeit eines definierten chromosomalen Locus für die Expression verschiedener Proteine hin. Vielmehr scheint es, dass bestimmte Loci für die Expression bestimmter Proteine geeignet sind. So konnte eine vergleichbare Expressionsstärke vollständiger Antikörper beobachtet

werden. Dies sollte jedoch mit weiteren vollständigen Antikörpern sowie anderen therapeutisch relevanten Proteinen näher untersucht werden.

3.2.2 Homogene Proteinexpression der Targetingpools und -subklone

Für die industrielle Produktion rekombinanter Proteine ist die Verwendung klonaler Säugerzelllinien obligatorisch. Um sicherzustellen, dass eine Zelllinie aus genau einer einzelnen Zelle hervorgegangen ist, erfolgt die Aussaat der Zellen in einer sehr geringen Konzentration. Die häufigste Methode zur Generation von Einzelzellklonen ist dabei die Verdünnungsklonierung (*Limiting Dilution Cloning – LDC*), bei welcher die Einsaat in eine Mikrotiterplatte mit einer Zelldichte von 2,5-5 Zellen mL⁻¹ erfolgt (Barnes et al. 2006). Basierend auf der Poisson-Verteilung kann angenommen werden, dass 95 % der wachsenden Zellen monoklonal sind, wenn 10 % aller Vertiefungen der Mikrotiterplatte bei der Aussaat von 0,1 Zellen pro Vertiefung ein Wachstum zeigen (Coller & Coller 1986). Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf der Immobilisierung einzelner Zellen in sehr viskosem, sogenanntem semi-solidem Medium. Die Anzahl zu immobilisierender Zellen wird hinreichend klein gewählt, so dass eine ausreichende Vereinzelnung in der Zellkulturplatte gewährleistet werden kann. Einzelne Zellen wachsen in Form separater Kolonien heran und können anschließend isoliert werden (Bagasra et al. 1985).

Nachdem die re-sortierten GFP-negativen Zellpools hinsichtlich des korrekten Kassettenaustausches mittels PCR sowie ihrer spezifischen Produktivität überprüft wurden, erfolgte die Generation von Einzelzellklonen über semi-solides Medium. Hierzu wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 3000 - 5000 Zellen in 2 mL semi-solides Medium eingesät. Nach 7-10 Tagen konnten separate Kolonien manuell isoliert und in eine 96-Loch-Platte überführt werden. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Einzelzellklone hinsichtlich ihrer GFP-Expression überprüft. Dabei wiesen 93 % aller isolierten Klone einen einzelnen Peak einer GFP-negativen Population im Histogramm auf. Diese Klone wurden nachfolgend für die Kultivierung in einem 50 mL Bioreaktor expandiert und nach Isolierung der genomischen DNA hinsichtlich der korrekten Integration des Austauschvektors mittels PCR analog zu re-sortierten Zellpools untersucht. Exemplarisch werden in Abbildung 3-14 die Ergebnisse der PCR der genomischen DNA der Einzelzellklone von Masterzelllinie 2 nach RMCE mit den Austauschvektoren, welche für IgG1 λ , IgG1 κ und scFv-Fc kodieren, dargestellt. Das Zielfragment von 380 bp konnte für alle untersuchten Subklone nachgewiesen werden. Somit erfolgte bei den Subklonen der korrekte Austausch der Taggingkassette gegen die Targetingkassette. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RMCE-Versuchen konnte beobachtet werden, dass bei Nachweis eines korrekten Kassettenaustausches auf re-sortierter Poolebene in der Regel auch die isolierten Subklone diese Eigenschaft zeigten.

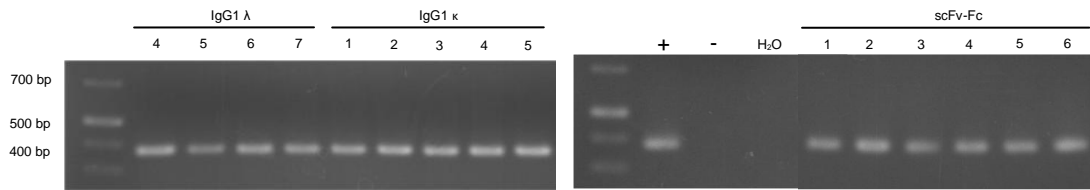


Abbildung 3-14: Agarose Gelelektrophorese der PCR genomischer DNA der Subklone nach RMCE mit Masterzelllinie 2 und drei Austauschvektoren.

Bei Kassettenaustauschreaktionen mit der Masterzelllinie 2 konnte bei allen generierten Subklonen die Zielbande von 380 bp detektiert werden.

(H₂O) PCR Kontrolle, (-) Negativkontrolle – genomische DNA der viral-markierten Masterzelllinie, (+) Positivkontrolle – genomische DNA von Zellen, die bereits in früheren Versuchen den Kassettenaustausch korrekt durchführten.

Unter allen Kassettenaustauschversuchen wiesen nur zwei re-sortierte Targetingpools mit korrektem PCR-Bandenmuster je einen Klon aller isolierter Subklone ($3 < n < 6$) auf, bei welchem der Kassettenaustausch nicht durchgeführt wurde. Die generierten Subklone wurden ferner hinsichtlich ihrer Expressionsstärke überprüft. Der Vergleich der spezifischen Produktivität der Subklone mit dem korrespondierenden Targetingpool ist exemplarisch für die RMCE Versuche der Masterzelllinie 2 und 4 mit Austauschvektoren, welche für IgG1 λ , IgG1 κ und das Antikörperfragment kodieren, in Abbildung 3-15 und Abbildung 3-16 dargestellt.

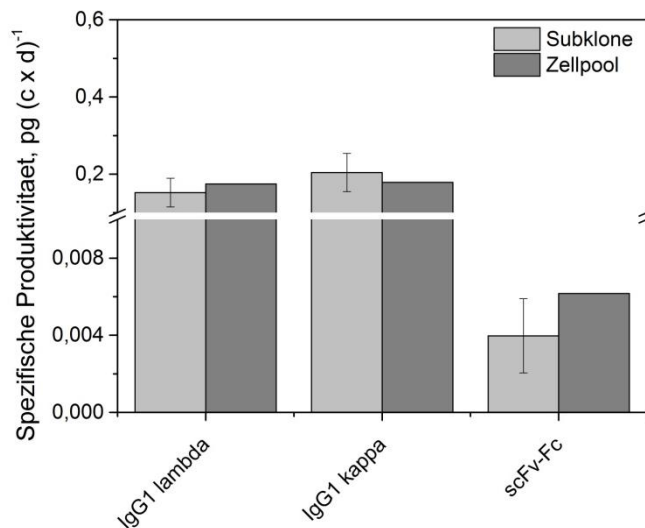


Abbildung 3-15: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der re-sortierten Targetingpools und der korrespondierenden Subklone nach dem RMCE mit Masterzelllinie 2

Der Mittelwert der spezifischen Produktivitäten der untersuchten Subklone ($3 < n < 6$) sowie der Standardabweichung ist vergleichend mit der Produktivität des re-sortierten Targetingpools aufgetragen. Die Subklone wiesen homogene Produktivitäten auf, welche mit dem Pool vergleichbar sind.

Die Mittelwerte der spezifischen Produktivitäten der untersuchten Subklone waren vergleichbar mit den ermittelten Werten für die korrespondierenden re-sortierten Targetingpools. Die Subklone untereinander wiesen eine homogene Expression auf, was durch die geringe Standardabweichung in Abbildung 3-15 verdeutlicht wird.

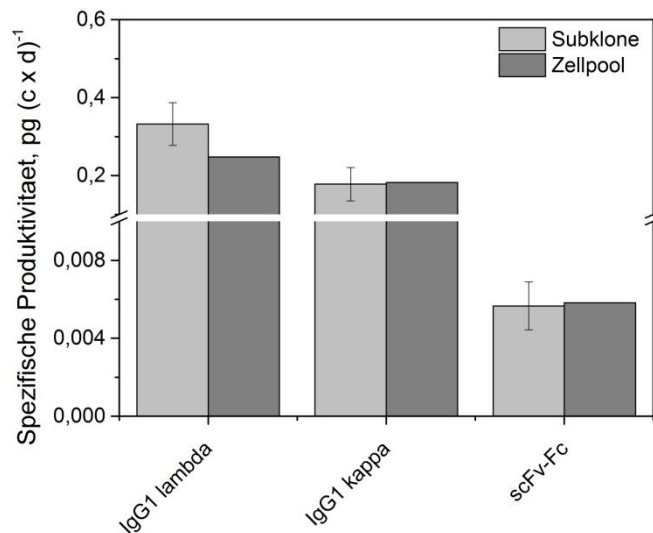


Abbildung 3-16: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der re-sortierten Targetingpools und der korrespondierenden Subklone nach dem RMCE mit Masterzelllinie 4

Der Mittelwert der spezifischen Produktivitäten der untersuchten Subklone ($3 < n < 6$) sowie der Standardabweichung ist vergleichend mit der Produktivität des re-sortierten Targetingpools aufgetragen. Die Subklone wiesen homogene Produktivitäten auf, welche mit dem Pool vergleichbar sind.

Diese Beobachtungen konnten auch bei den Kassettenaustauschversuchen mit der Masterzelllinie 4 mit den oben genannten Vektoren gemacht werden (Abbildung 3-16). Die Bestimmung der spezifischen Produktivität des re-sortierten Targetingpools bietet somit eine gute Vorhersage für die Expressionslevel der Subklone. Die Homogenität der Subklone in Bezug auf die Produktivität konnte bei allen Masterzelllinien, unabhängig vom exprimierten rekombinanten Protein, beobachtet werden. Ferner zeigte sich bei der Untersuchung der Expressionslevel in RMCE Versuchen mit allen vier Masterzelllinien, dass der Isotyp der leichten Kette scheinbar keinen Einfluss auf die Expressionsstärke der chimären Antikörper von einem definierten Locus hat. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die initiale Selektion der Zellen nach dem RMCE mittels FACS, basierend auf dem Verlust der GFP Expression, zielführend ist. Der Einsatz von G418 ist mit den generierten Masterzelllinien für einen erfolgreichen Kassettenaustausch nicht notwendig.

Die homogene Proteinexpression der Subklone nach dem Kassettenaustausch korreliert mit Ergebnissen früherer Arbeiten. Unter Verwendung der heterologen FRT-wt/ FRT-F5 Erkennungssequenzen konnten Verhoeven et al. mit viral-markierten Mausfibroblastenzellen

(NIH3T3) nach dem Kassettenaustausch isogene Subklone mit vergleichbaren Expressionslevel (lacZ, Luciferase) generieren (Verhoeyen et al. 2001b). Die vergleichbare Proteinexpression des Targetingpools und der jeweiligen Klone, basierend auf serumfreien CHO-DG44 Zellen, zeigten Rose et al. für die Expression vollständiger Antikörper sowie eines Fusionsproteins (Rose et al. 2013). Rehberger et al. untersuchten ferner mittels Southern Blot mögliche zusätzliche Integrationen des Austauschvektors. In 90 % aller RMCE Versuche zeigten die generierten Subklone den korrekten Austausch des Targetingsvektors ohne zusätzliche zufällige Integration (Rehberger et al. 2013).

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass die generierten Subklone eine homogene Expression aufwiesen, und diese vergleichbar mit dem korrespondierenden Targetingpool waren. Dies reduziert nach der zweifachen FACS-Anreicherung die Anzahl der zu untersuchenden Subklone stark ($n < 10$).

3.2.3 Langzeitstabilität von mit Kassettenaustausch generierten Zellklonen

Nachdem die Stabilität der Masterzelllinien über einen Zeitraum von 70 d ohne Selektionsdruck gezeigt werden konnte, wurden exemplarisch die vier Subklone der Masterzelllinie 1 nach dem Kassettenaustausch mit dem murinen IgG2a Antikörper hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität nach dem RMCE überprüft. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 80 d ohne Selektionsdruck in einem 50 mL Bioreaktor. Die Bestimmung der spezifischen Produktivität wurde in Duplikaten durchgeführt und ist in Abbildung 3-17 dargestellt (Vgl. 4.2.2.11).

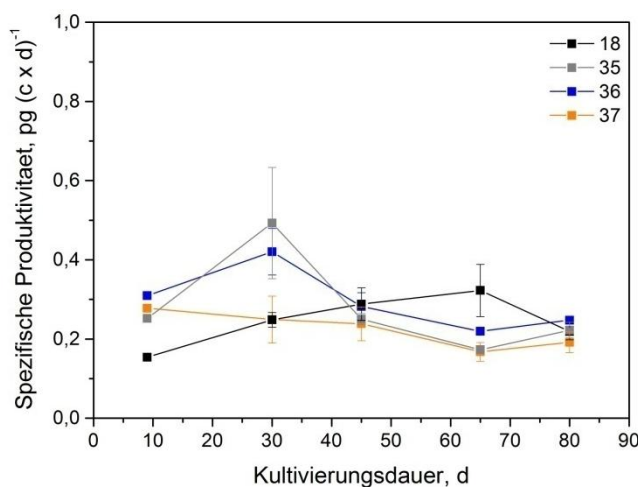


Abbildung 3-17: Langzeitstabilitätstest der Subklone des Kassettenaustausches von Masterzelllinie 1 mit dem murinen IgG2a Antikörper

Die ohne Selektionsdruck in einem 50 mL Bioreaktor kultivierten Subklone (18, 35, 36, 37) wiesen über einen Zeitraum von 80 d eine stabile Transgenexpression nach dem Kassettenaustausch auf.

Die Transgenexpression nach dem Kassettenaustausch erfolgte ebenso stabil über 80 d ohne Selektionsdruck wie bereits die Reportergenexpression der entsprechenden Masterzelllinie. Eine stabile Virus-Produktion nach dem Kassettenaustausch unter Verwendung einer lentiviral markierten HEK293 Zelllinie konnten auch Schucht et al. beobachten (Schucht et al. 2006).

Die Stabilitätsuntersuchung der Masterzelllinie scheint, basierend auf den dargelegten Ergebnissen, somit als gutes Indiz bezüglich der Langzeitstabilität der Subklone nach dem RMCE zu dienen. Obgleich zur Verifizierung dieser Ergebnisse weitere Masterzelllinien sowie zugehörige Subklone nach dem Kassettenaustausch untersucht werden müssen, deuten die Resultate darauf hin, dass ein zeitintensives Untersuchen einer Vielzahl von Klonen hinsichtlich ihrer Stabilität nicht mehr erforderlich ist.

3.3 Etablierung von Hochproduzentenzelllinien unter Verwendung des GS Expressions-Systems

Die Generation von Säugerzelllinien für die biopharmazeutische Produktion erfolgt vornehmlich über die metabolischen Selektionsmarker DHFR (Dihydrofolatreduktase) und GS (Glutaminsynthetase). In einer ersten Selektion werden die transfizierten Zellen in HT- (Hypoxanthin und Thymidin) bzw. Glutamin-Mangelmedium kultiviert. Durch den Einsatz der spezifischen Inhibitoren MTX (Methotrexat) für das DHFR System und MSX (Methioninsulfoximin) für das GS-System erfolgt in einer zweiten Selektion die Genamplifikation, um die Produktivität zu steigern.

Eine DHFR-defiziente CHO-Zelllinie ist bereits seit 1980 verfügbar (Urlaub & Chasin 1980). Bis zur Einführung der GS-Knockout Zelllinie 2010 wurde das GS-System mit der endogen exprimierenden CHOK1SV angewandt (Liu et al. 2010; Fan et al. 2012). Diese konventionellen Methoden zu Entwicklung von Zelllinien generieren im Hinblick auf den Integrationsort des Transgens im Wirtsgenom sowie auf die Anzahl der Integrate eine heterogene Zellpopulation (Lai et al. 2013).

Um die Leistungsfähigkeit von Zelllinien mit dem Kassettenaustauschsystem im Vergleich zu etablierten, in der pharmazeutischen Industrie genutzten Expressionssystemen beurteilen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Modellzelllinie unter Verwendung des GS-Systems etabliert und charakterisiert.

3.3.1 Isolierung und Genamplifikation Antikörper-exprimierender GS-Klone

Für die Etablierung der GS-Modellzelllinie wurde, wie beim Kassettenaustauschsystem, die CHO-S Zelle aufgrund ihres robusten und guten Wachstums in Suspension gewählt. Der kommerzielle GS-Vektor pEE12.4 kodiert für das GS-Gen unter der Kontrolle eines

schwachen SV40E Promotors. Die nicht-optimierten Nukleotidsequenzen der leichten sowie schweren Kette des murinen Modellantikörpers anti-EpCAM IgG2a wurden in den Vektor kloniert, deren Expression von zwei separaten humanen CMV-Promotoren gesteuert wird. In Vorversuchen wurde getestet, ob die Orientierung der leichten und schweren Kette einen Einfluss auf die Expression des Antikörpers hat. Hierzu wurden die Vektoren pEE12.4 LC-HC und pEE12.4 HC-LC transient in CHO-S transfiziert. Dabei zeigte sich, dass vergleichbare Expressionslevel unabhängig von der Anordnung der Ketten erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die stabile Transfektion der CHO-S Zellen mit dem Vektor pEE12.4 LC-HC erfolgte mittels Nukleofektion unter Verwendung der AMAXA Nucleofector Technologie. Hierzu wurden $6 \times 1,5 \times 10^6$ CHO-S Zellen mit je 12,65 μg Plasmid-DNA mit dem Programm U-24 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h bei 37°C kultiviert und anschließend eine Einzelzellsekretions-Analyse (Single Cell Secretion Assay – Vgl. 4.2.2.10) durchgeführt. Die zu sekretierenden Proteine werden in Vesikeln vom Golgi-Apparat zur Plasma-Membran transportiert, mit welcher sie anschließend fusionieren. Da dieser Prozess durch niedrige Temperaturen verlangsamt wird, ist eine Färbung der an der Zelloberfläche assoziierten Proteine mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper möglich (Pichler et al. 2009). Ein weiterer Grund für die verzögerte Sekretion ist die mögliche Bindung der sekretierenden Proteine an die Glykokalyx. Da vermutet werden kann, dass die an der Zelloberfläche assoziierte Proteinmenge mit der Produktivität der Zelle korreliert, ermöglicht diese Analyse eine schnelle Anreicherung hochproduktiver Zellen (Brezinsky et al. 2003).

Für die Einzelzellsekretions-Analyse wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche mit 3% BSA in PBS gesättigt, und die Zellen anschließend mit einem Anti-Maus IgG (H+L) FITC-konjugierten Antikörper gefärbt. Mittels FACS wurden nachfolgend 5 % der Zellpopulation sortiert, welche die höchste FITC Expression aufwies. Ausgehend von der sortierten Zellpopulation wurden Einzelzellklone mit Hilfe von semi-solidem Medium, ohne Zusatz von Glutamin sowie bei 25 μM MSX, generiert. Die Untersuchung der Expression der Klone nach drei Wochen mittels ELISA zeigte, dass 45 % der isolierten Einzelzellen Antikörper produzierten, wobei die Klone 5 und 9 die höchsten Produktivitäten aller Klone aufwiesen. Um die Produktexpression durch Genamplifikation zu erhöhen, wurden die Klone steigenden MSX Konzentrationen von 50 μM , 500 μM und 1000 μM MSX ausgesetzt. Am Ende einer jeden Selektionsstufe wurde eine Batch-Kultivierung des amplifizierten Klons (GS5 Klon 5, GS5 Klon 9) in Abwesenheit von MSX im Schüttelkolben durchgeführt, um das Wachstum sowie die Produktbildung zu überprüfen (Abbildung 3-18, Abbildung 3-19).

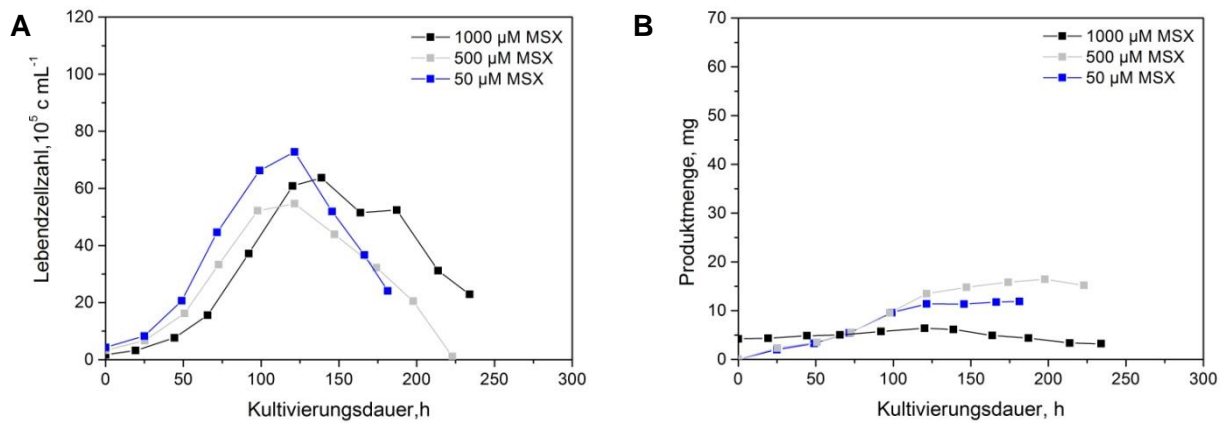


Abbildung 3-18: Batch-Kultivierung des GS5 Klons 5

Der Klon 5 wurde zuvor an MSX Konzentrationen von 50 µM (blau), 500 µM (grau), 1000 µM (schwarz) adaptiert. Die Batch-Kultivierung wurde in Abwesenheit von MSX durchgeführt.

A: Darstellung der Lebendzellzahl über die Kultivierungsdauer **B:** Darstellung der Masse an produziertem IgG2a Antikörper über die Kultivierungsdauer.

Im Verlauf der Batch-Kultivierungen im Schüttelkolben bei einem Kulturvolumen von 200 mL mit dem GS5 Klon 5 konnten maximale vitale Zelldichten von $55 - 70 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ erzielt werden, die Gesamtkultivierungsdauer betrug 180 - 240 h. Mit steigender, zuvor adaptierter MSX-Konzentration war eine längere Verzögerungsphase zu beobachten. Die spezifische Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ist mit etwa $0,032 \text{ h}^{-1} - 0,035 \text{ h}^{-1}$ unabhängig von der zuvor adaptierten MSX-Konzentration ähnlich. Es zeigte sich, dass mit der Erhöhung der MSX Konzentration von 50 µM auf 500 µM nur eine mäßige Steigerung der Antikörpermasse zum Ende der Kultivierung von 11 mg (67 mg L^{-1}) auf 16 mg (93 mg L^{-1}) erreicht werden konnte. Bei der Selektion mit 1000 µM wurden maximal 5 mg Protein, 50 % weniger als vor der Amplifikation, sekretiert. Vergleichbare Beobachtungen machten auch Jun et al., die Steigerung der MSX-Konzentration wirkte sich erniedrigend auf die spezifische Wachstumsrate aus, jedoch zeigte nicht jeder Klon nach Selektion mit hohen MSX-Konzentrationen eine erhöhte Produktivität (Jun et al. 2006).

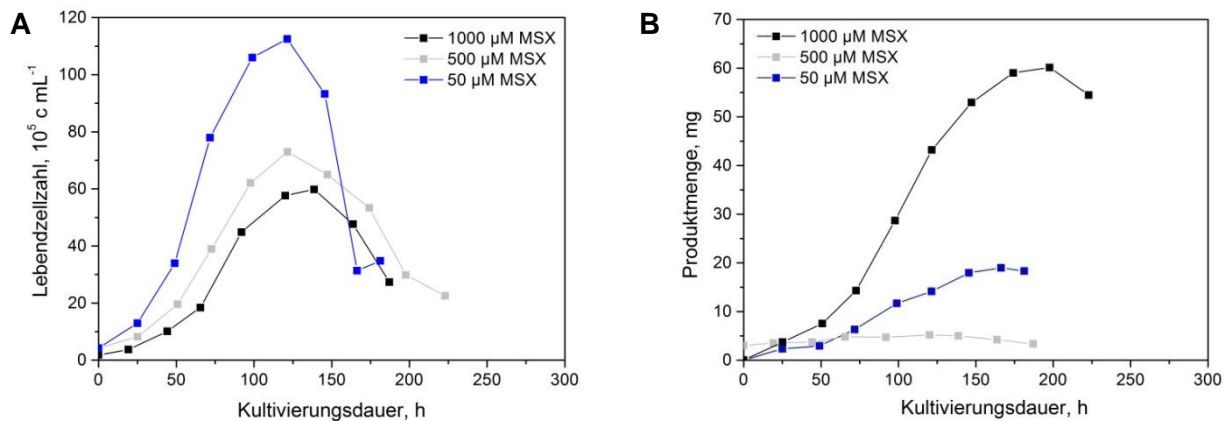


Abbildung 3-19: Batch-Kultivierung des GS5 Klon 9

Der Klon 9 wurde zuvor an MSX Konzentrationen von 50 µM (blau), 500 µM (grau), 1000 µM (schwarz) adaptiert. Die Batch-Kultivierung wurde in Abwesenheit von MSX durchgeführt.

A: Darstellung der Lebendzellzahl über die Kultivierungsdauer **B:** Darstellung der Masse an produziertem mlgG2a Antikörper über die Kultivierungsdauer.

Bei Batch-Kultivierungen mit Klon 9 konnten maximale vitale Zelldichten von 50–115x10⁵ c mL⁻¹ erzielt und ebenso wie bei Klon 5 eine verlängerte Verzögerungsphase sowie verringerte Wachstumsraten bei steigenden MSX-Konzentrationen beobachtet werden. Der Unterschied in der erreichten Maximalzellichte war bei Klon 9 jedoch deutlicher ausgeprägt. So war diese bei 500 µM um 45x10⁵ c mL⁻¹ geringer, als bei 50 µM MSX. Die Genamplifikation bei Klon 9 von 50 µM auf 500 µM MSX bewirkte ferner eine Steigerung der Antikörpermasse von 19 mg (105 mg L⁻¹) auf 60 mg (341 mg L⁻¹) am Ende der Kultivierung. Die weitere Erhöhung der MSX-Konzentration auf 1000 µM zeigte analog zu Klon 5 einen starken Abfall der Produktmasse auf 5 mg. Ferner akkumulierte Klon 9 mit 2,03 g L⁻¹ (nach 163 h) bei vorheriger Adaption an 1000 mM MSX doppelt so viel Laktat, als bei der Kultivierung bei Amplifikation mit 500 µM MSX. Da Laktatkonzentrationen von bis zu 1,8 g L⁻¹ als unbedenklich für die Produktbildung sowie Proliferation bei Hybridoma und BHK Zellen gelten (Wagner et al. 1988; Miller et al. 1988), ist ein negativer Effekt der Laktatkonzentration bei Klon 9 auf die Produktivität denkbar. Ferner konnte mit dem Anstieg der Laktatkonzentration ein Absinken des pH-Wertes auf 6,4 beobachtet werden. Der optimale pH-Bereich für die Kultivierung tierischer Zellen ist dabei von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich, wobei der Bereich von pH 6,8 – 7,2 generell als optimal für Wachstum und Produktbildung mit Säugerzellen angesehen werden kann (Schmid et al. 1990; Leelavatcharamas et al. 1995; Gottesman 1985). Hwang et al. beobachteten bei der Batch Kultivierung FCA-1 exprimierender CHO-Zellen bei pH 6,7 neben einer reduzierten Viabilität auch eine verringerte Produktivität im Vergleich zu pH-Werten von 6,9 – 7,5 (Hwang et al. 2011). Somit scheint der verhältnismäßig saure pH-Wert auch einflussgebend für die geringe Produktivität zu sein. Bei Klon 5 hingegen lag die Laktatakkumulation bei 1,85 g L⁻¹ (500 mM MSX) bzw. 1,56 g L⁻¹ (1000 mM MSX) beide Werte können basierend auf früheren Arbeiten

als nicht ursächlich für die reduzierte Produktivität erachtet werden. Jedoch fiel bei der Batch-Kultivierung mit vorheriger Adaption an 1000 mM MSX der pH vergleichbar auf 6,6. Den signifikanten Einfluss des pH-Wertes in Abhängigkeit der Kulturtemperatur auf die Produktbildung zeigten auch Yoon et al. bei der Produktion von EPO mit CHO Zellen. Ferner beobachteten sie mit sinkendem pH-Wert eine verbesserte Langlebigkeit in Bezug auf die Viabilität der Zellen (Yoon et al. 2005). Eine Akkumulation toxischer Mengen Ammonium ist bei den Batch Kultivierungen mit Klon 5 und Klon 9 nicht zu erwarten, da dieses für die Bildung von Glutamin, katalysiert durch die Glutaminsynthetase, aufgebraucht wird (Barnes et al. 2000).

Anhand der Produktmasse sowie dem Integral der viablen Zellen wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum die spezifische Produktivität aus der Steigung bestimmt (Vgl. 4.2.2.11). Die spezifische Produktivität der Batch-Kultivierungen der Klone 5 und 9, bei vorheriger Adaption an 50 μ M MSX, ist vergleichend in Abbildung 3-20 A gezeigt. Beide Klone wiesen über den Kultivierungsverlauf eine Erniedrigung der spezifischen Produktivität auf, zu erkennen an der Änderung des Anstieges. Bis zu einer Kulturdauer von 99 h zeigten die Klone vergleichbare Werte von 3,8 bzw. 2,9 pcd. Die maximale Zelldichte wurde 24 h später erreicht, wobei ferner ein Absinken der Viabilität der Zellen zu beobachten war. Im restlichen Kulturverlauf waren reduzierte Produktivitäten von 1,7 pcd für Klon 9 und 0,26 pcd für Klon 5 zu beobachten. Für die um 50 % für Klon 9 bzw. 94 % für Klon 5 verringerten spezifischen Produktivitäten ist die Akkumulation von maximal 1,85 g L⁻¹ Laktat vermutlich nicht ursächlich. Die Metabolisierung von Glukose erfolgte ebenso bei beiden Klonen vergleichbar. Bei der Untersuchung von stark und schwach IgG4 exprimierenden GS-CHO Zellklonen beobachteten Carinhas et al. eine signifikant erhöhte Akkumulation der Metabolite Isobutyrat, Isovalerat sowie Formiat und Glycin der Niedrigproduzentenzelllinie (Carinhas et al. 2013). Die Verringerung der Produktivität könnte ferner durch den Mangel bestimmter Aminosäuren für die Proteinproduktion induziert worden sein. Eine Analyse des Mediums zur Identifizierung verbrauchter Aminosäuren würde hierüber Aufschluss geben können. Duarte et al. zeigten, dass ein Mangel der hauptsächlichen Stickstoffquellen für GS-CHO Zellen, Asparagin und Serin, vornehmlich das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst (Duarte et al. 2014). Die Ursache könnte darüber hinaus auf molekularer Ebene liegen. Barnes et al. konnten eine starke Relation zwischen dem mRNA Gehalt und der rekombinanten Proteinproduktion in niedrig-produzierenden Zelllinien aufzeigen. Wobei dieser Zusammenhang nur bis zu einem definierten Schwellenwert mRNA zu beobachten ist. Nach Überschreiten des Schwellenwertes waren vielmehr die translatorische sowie sekretorische Maschinerie mehrheitlich für die Antikörperproduktion determinierend (L. M. Barnes et al. 2003). Um diesbezüglich jedoch genauere Aussagen treffen zu können, wäre die Untersuchung der mRNA Level wie auch des intrazellulären Proteingehalts nötig.

Ferner ist auffallend, dass die Differenz der totalen Zelldichte zum Zeitpunkt maximaler Zellkonzentration und dem Ende der Kultivierung bei Klon 5 $10 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ bzw. bei Klon 9 $26 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ beträgt. Die Reduktion der totalen Zelldichte könnte ferner durch die Verkleinerung des Zelldurchmessers infolge von Apoptose, welche unter anderem durch die Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung sowie Caspase-Aktivität nachgewiesen werden kann, verursacht worden sein (Elmore 2007). Aufgrund der stark verminderten Zellgröße könnte daher die automatisierte Zelldetektion des CedexHires fehlerbehaftet sein. Darüber hinaus scheint die Lyse der Zellen durch Nekrose ebenso möglich. Bei der Untersuchung des Zelltodes von CHO-Zellen während einer Batch-Kultivierung in serumfreiem Medium, identifizierten Goswami et al., dass 80 % der Zellen aufgrund von Apoptose starben (Goswami et al. 1999). Während im Verlauf der Apoptose das Cytoplasma in apoptotischen Vesikeln gespeichert wird, ist Nekrose gekennzeichnet durch die Permeabilisierung der Zellmembran und der Freisetzung des Cytoplasma (Elmore 2007). Der erhöhte Antikörpertiter bei Klon 9 am Ende der Kultivierung könnte demnach auf einen höheren Anteil lysierter Zellen zurückzuführen sein, wodurch deren intrazellulärer Proteingehalt in den Zellkulturüberstand abgegeben wird. Ferner zeigten Al-Rubeai et al., dass die apparente spezifische Produktivität im Verlauf der Kultivierung von dem intrazellulären Antikörpergehalt abhängig ist (Al-Rubeai et al. 1992). Untersuchungen von Singh et al. verdeutlichten ferner, dass insbesondere die Limitierung von Glutamin und Glukose Apoptose induziert (Singh et al. 1994). Die Analyse von Klon 5 und Klon 9 hinsichtlich apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltods könnte daher Aufschluss über die veränderte Produktivität in der Absterbephase der Batch-Kultivierung geben.

In Abbildung 3-20 B ist vergleichend die spezifische Produktivität der Batch-Kultivierungen der Klone 5 und 9 bei vorheriger Adaption an $500 \mu\text{M}$ MSX dargestellt. Im Gegensatz zur Abbildung 3-20 A unterscheiden sich die spezifischen Produktivitäten bis zum Erreichen der stationären Phase signifikant. Während Klon 5 mit $4,8 \text{ pcd}$ nur eine geringfügig erhöhte Produktivität in Vergleich zur Batch-Kultivierung mit $50 \mu\text{M}$ MSX aufwies, konnte für Klon 9 im gleichen Zeitraum ein Wert von $13,9 \text{ pcd}$ ermittelt werden. Die Genamplifikation bei Klon 9 führte demnach zu einer Steigerung der spezifischen Produktivität um Faktor 4,7 in der ersten Hälfte der Batch Kultivierung. Mit Erreichen der maximalen Zelldichte nach 121 h konnte bei beiden Klonen erneut eine Reduktion der spezifischen Produktivität beobachtet werden. Klon 5 reduzierte die Produktivität in der verbleibenden Kulturzeit um 70 %, Klon 9 um 50 %.

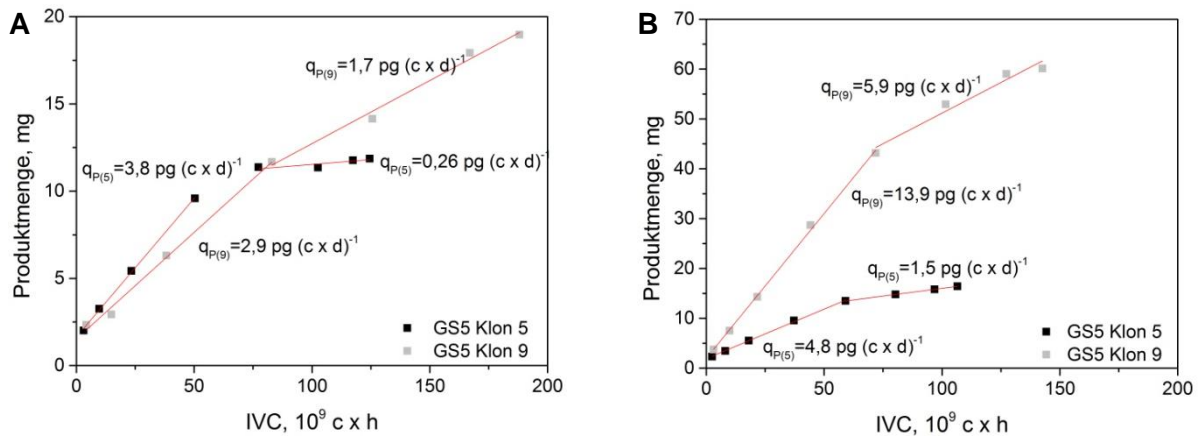


Abbildung 3-20: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der GS5 Klone 5 und 9 für die Batch-Kultivierungen bei verschiedenen adaptierten MSX-Konzentration.

Über den Kultivierungszeitraum wurde das Integral der viablen Zellen (IVC) bestimmt und gegen die akkumulierte Produktmasse aufgetragen. Über die Steigung der linearen Regression wurde die spezifische Produktivität bestimmt. Klon 5 (schwarz), Klon 9 (grau)

A: Darstellung der IVC über die Produktmasse der Batch-Kultivierung von Klon 5 und Klon 9 bei vorheriger Adaption an 50 µM MSX. Bis zu einer Kulturzeit von 99 h wiesen Klon 9 und 5 eine vergleichbare spezifische Produktivität von 2,9 bzw. 3,8 pcd auf. Im restlichen Kulturverlauf ist bei Klon 5 eine Erniedrigung auf 0,26 pcd zu beobachten. **B:** Darstellung der IVC über die Produktmasse der Batch-Kultivierung von Klon 5 und Klon 9 bei vorheriger Adaption an 500 µM MSX. Bei Klon 9 ist eine deutliche Erhöhung der spezifischen Produktivität auf 13,9 pcd bis 164 h zu erkennen. Die Genamplifikation bei Klon 5 steigerte die Produktivität nur geringfügig auf 4,8 pcd bis 121 h.

Die Abbildung 3-20 verdeutlicht, dass der Einsatz steigender MSX-Konzentrationen zur Genamplifikation nicht zwangsläufig zu steigender Produktivität des Produktionsklons führt. Die Erhöhung der Expressionsstärke durch Genamplifikation ist darüber hinaus abhängig von dem Klon und somit dem genomischen Locus. Während bei Klon 9 eine Erhöhung der Produktivität um Faktor 4,7 (bis 121 h der Kultivierung) bei Steigerung der MSX-Konzentration auf 500 µM erzielt werden konnte, wurde bei Klon 5 nur eine geringfügig verbesserte Produktivität von 3,8 auf 4,8 pcd beobachtet. Die weitere Erhöhung der MSX-Konzentration auf 1000 µM führte bei beiden Klonen zu einer signifikanten Reduktion der Produktmasse auf 5 mg am Ende der Batch Kultivierung. Es konnte kein positiver Zusammenhang zwischen der MSX-Konzentration und der spezifischen Produktivität der GS-Klone erkannt werden. Ferner zeigte sich, dass im Verlauf der Kultivierung bei beiden Klonen ein Engpass auftrat, was in einer reduzierten spezifischen Produktivität resultierte.

3.3.2 Langzeitstabilität der generierten GS-Klone

Neben einem hohen Produkttiter ist die Langzeitstabilität der Zellklone für die kommerzielle Produktion von rekombinanten Proteinen ein kritischer Parameter. Die Erhöhung selektiver Reagenzien (MSX) führt zunächst zur Amplifikation der Transgene im Genom. Bei Kultivierung in Abwesenheit des Selektionsdruckes ist bei manchen Klonen anschließend eine verminderte Produktivität zu beobachten, die meist mit der Reduktion der Kopienzahl

der Transgene im Genom einhergeht (Butler 2005; Fann et al. 2000; Chusainow et al. 2009).

Die an unterschiedliche Konzentrationen des selektiven Reagenz MSX adaptierten GS5-Klone 5 und 9 wurden über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen ohne Selektionsdruck (MSX) im Schüttelkolben kultiviert. Dabei wurde regelmäßig die spezifische Produktivität der Klone überprüft (vgl. 4.2.2.11) und die spezifische Wachstumsrate bestimmt. Die Langzeitstabilität der Produktivität der Klone 5 und 9 ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

Die Bestimmung der spezifischen Produktivität im Rahmen der Langzeitstabilität erfolgte ausschließlich über Zweipunktmessungen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen. Dadurch können sich aufgrund der Datenstreuung unterschiedliche Steigungen zwischen den Punkten ergeben. Bei den Batch-Versuchen hingegen erfolgte die Bestimmung integral über die gesamte Kultivierungsdauer, was eine bessere Abschätzung der spezifischen Produktivität zulässt. Ferner konnte in Abbildung 3-20 A gezeigt werden, dass Unterschiede in der Produktivität der Klone oftmals nach Erreichen der maximalen Zelldichte zu beobachten sind. Aus diesem Grund sind die ermittelten Produktivitätswerte aus Zweipunktmessungen als Richtwerte zu sehen, mit deren Hilfe Tendenzen ermittelt werden können.

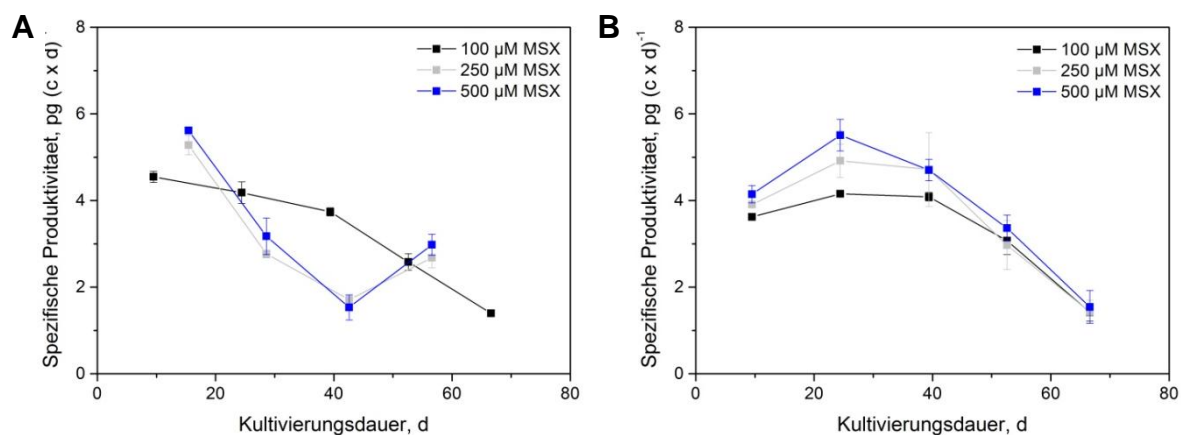


Abbildung 3-21: Langzeitstabilität von GS5 Klonen in Abwesenheit von MSX bei vorheriger Adaption an verschiedene MSX-Konzentrationen

MSX-Konzentrationen, an welche die Klone zuvor adaptiert wurden: (schwarz) – 100 µM, (grau) – 250 µM, (blau) – 500 µM

A: Unabhängig von der MSX-Konzentration wies GS5 Klon 5 keine stabile Proteinproduktion auf, die Produktivität nach 60 d sank mindestens um die Hälfte im Vergleich zum Startwert. **B:** GS5 Klon 9 zeigte über den Untersuchungszeitraum von 60 d keine stabile Produktivität.

Unabhängig von der zuvor adaptierten MSX-Konzentration zeigte der Klon 5 keine stabile Antikörperproduktion in Abwesenheit von MSX, wobei bei vorheriger Amplifikation mit 250 µM und 500 µM MSX in den ersten 40 d ein deutlich steilerer Abfall zu beobachten war

als bei 100 μM . Eine um bis zu 50 % verringerte spezifische Produktivität konnte bei Klon 5 beobachtet werden. Klon 9 hingegen zeigte eine relativ konstante Produktexpression über einen Zeitraum von 40 d. Anschließend ist wie bei Klon 5 eine Reduktion der Produktivität um 50 % zu beobachten. Eine bis zu 67 % verminderte Antikörperproduktivität konnten auch Jun et al. bei CHO-Klonen, welche unter Verwendung des GS-Systems generiert wurden, nachweisen. Jedoch wurde die Reduktion in der Produktivität in den ersten 6 Wochen erzielt, anschließend stabilisierte sich der Wert auf niedrigem Niveau (Jun et al. 2006). Chusainow et al. untersuchten CHO-Produktionszelllinien, welche mittels DHFR-System generiert wurden, hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und konnten über 36 Passagen eine um 35 – 92 % verringerte volumetrische Produktivität beobachten. Dies wurde vornehmlich durch die signifikante Verminderung der mRNA Level von leichter und schwerer Kette verursacht. Die Anzahl der Kopien des Transgens im Genom hingegen war kaum verändert (Chusainow et al. 2009). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die Selektion basierend auf dem GS-Enzym auf dem Expressionsvektor durch die endogene GS beeinträchtigt wird. Daher generierten Fan et al. GS-Knockout Mutanten (Estes & Melville 2014). Unter Verwendung der mittels Zinkfinger Nuklease erzeugten GS Knockout Mutanten konnte die Stringenz der Selektion sowie die Frequenz der Isolation von Hochproduzentenzelllinien mit dem GS-System gesteigert werden (Fan et al. 2012). Osterlehner et al. identifizierten darüber hinaus zwei Marker, welche der Vorhersage instabiler Proteinproduktion in CHO Zellen dienen. Durch die Untersuchung der Methylierung des CMV-Promotors an Position C-179 sowie der Kopienzahl des Transgens im CHO-Genom konnte für 75 % aller untersuchten Klone, deren Stabilität vorhergesagt werden (Osterlehner et al. 2011). Dass die Instabilität von Produktionsklonen hauptsächlich auf der Methylierung des Promotors, wodurch ein transkriptionelles Gen-silencing induziert wird, sowie der Reduktion der mRNA Level beruht, konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen (Yang et al. 2010; Kim et al. 2011). Dabei scheinen Tandemwiederholungen von integrierten Transgenen besonders anfällig hierfür zu sein (McBurney et al. 2002; Garrick et al. 1998). Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, die Selektion nach Hochproduzentenzelllinien effizienter zu gestalten, so dass eine Genamplifikation obsolet wird. Dadurch könnte die Anfälligkeit für Promotormethylierung vermindert werden. Yoshikawa et al. konnten hingegen zeigen, dass der chromosmale Locus der amplifizierten Gene einflussgebend für die Expressionsstabilität ist. Eine erhöhte Produktivität sowie Stabilität konnten beobachtet werden, wenn die amplifizierten Gene in der Nähe der Telomere lokalisiert waren (Yoshikawa et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Vorhersage von Expressionsinstabilität publizierten Dorai et al.. Dabei zeigten sie, dass instabile Zelllinien anfälliger für Apoptose waren, und die Instabilität einer Zelllinie positiv mit der Caspase- 3 Aktivität verknüpft war (Dorai et al. 2012). Bailey et al. hingegen konnten bei der Untersuchung einer instabilen GS-CHO Zelllinie weder reduzierte mRNA Level der

leichten und schweren Kette noch den Verlust von Transgenkopien beobachten. Vielmehr war die mRNA Expression des stressinduzierbaren Gens GADD 153 erhöht. In Batch Kultivierungen wurden mit GS-CHO Zellen hoher Passage reduzierte Werte für das Integral der viablen Zelldichte erzielt und metabolische Änderungen, wie eine erhöhte Alaninakkumulation sowie erhöhte Glukose- (exponentielle Phase) und Laktatverbrauchsraten (Absterbephase) beobachtet (Bailey et al. 2012). Dies lässt den Schluss zu, dass die Instabilität von Zelllinien nicht ausschließlich mit Änderungen auf molekularer Ebene assoziiert ist. Da neben den bereits diskutierten Ursachen für die Instabilität von Produktionsklonen auch der Locus des integrierten Transgens eine wesentliche Rolle spielt, kann mit Expressionssystemen, welche auf der zufälligen Integration beruhen, die Instabilität von Klonen nicht gänzlich verhindert werden. Ferner ist bekannt, dass CHO-Zellen besonders infolge von Genamplifikationen zu einem instabilen Karyotyp aufgrund chromosomaler Umordnung neigen. Um Positionseffekte infolge zufälliger Transgenintegration abzuschwächen, können UCOEs (Ubiquitous chromatin opening elements) oder Insulatoren verwendet werden (L. Barnes et al. 2003). UCOEs verhindern dabei das Silencing von Transgenen (Pfaff et al. 2013), teilweise durch die Resistenz gegen Methylierung (Zhang et al. 2010).

Die spezifischen Wachstumsraten der Klone 5 und 9 im Verlauf des Langzeitstabilitätstests in Abwesenheit von MSX sind in Abbildung 3-22 dargestellt.

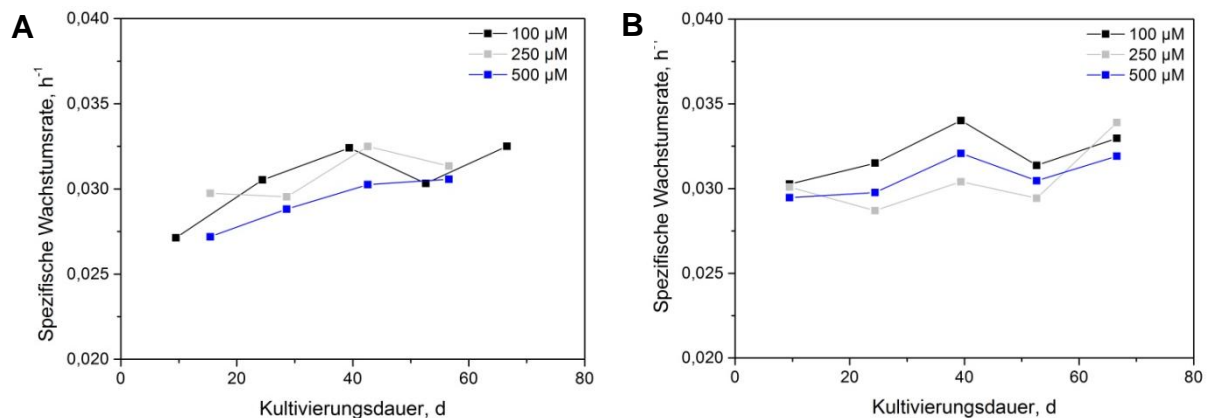


Abbildung 3-22: Veränderung der spezifischen Wachstumsrate im Verlauf des Stabilitätstests von GS5 Klonen

MSX-Konzentrationen, an welche die Klone zuvor adaptiert wurden: (schwarz) – 100 µM, (grau) – 250 µM, (blau) – 500 µM

A: GS5 Klon 5 zeigte über den Untersuchungszeitraum eine Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate um etwa maximal 0,004 h⁻¹. **B:** GS5 Klon 9 wies ebenso eine maximale Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate um 0,004 h⁻¹ auf.

In Abwesenheit von MSX ist sowohl bei GS5-Klon 5 als auch bei Klon 9 mit zunehmender Kultivierungsdauer ein leichter Anstieg der spezifischen Wachstumsrate um 0,0024 –

0,0038 h⁻¹ zu beobachten. Diese Beobachtung könnte mit der verminderten Produktivität korrelieren, da die Zellen mit verminderter Produktexpression einen Wachstumsvorteil haben könnten. Eine Erhöhung der spezifischen Wachstumsrate über einen längeren Kultivierungszeitraum konnten Jun et al. ebenfalls nachweisen, jedoch unabhängig davon, ob mit oder ohne MSX kultiviert wurde, da die isolierten Klone auch unter Einfluss des Selektionsdruckes instabil produzierten (Jun et al. 2006).

3.3.3 Die wiederholte Nukleofektion einer GS-Zelllinie generiert Hochproduzentenzelllinien

Für die industrielle Produktion von monoklonalen Antikörpern sind Hochproduzentenzelllinien mit spezifischen Produktivitäten von mindestens 20 pcd erforderlich (Wurm 2004). Unter Verwendung der hocheffizienten Nukleofektion für das Einbringen von Plasmid-DNA direkt in den Zellkern, in Verbindung mit der durch Brezinsky et al. beschriebenen Sekretionsanalyse, exprimierten nach der ersten Nukleofektion nur 45 % der transfizierten Zellpopulation den Modellantikörper anti-EpCAM IgG2a (Distler et al. 2005; Brezinsky et al. 2003). Die besten Klone erzielten in Batch-Kultivierungen finale Produkttiter von 67 bzw. 105 mg L⁻¹. Die nachfolgenden Genamplifikation mit 500 µM führte nur bei Klon 9 zu einer Erhöhung auf 341 mg L⁻¹. Da die weitere Steigerung der MSX-Konzentration zur Genamplifikation keine weitere Erhöhung der Produktivität erbrachte, wurde der Klon 9 wiederholt transfiziert (GS6), um eine Hochproduzentenzelllinie zu generieren.

Die wiederholte Nukleofektion erfolgte analog zur Generation der GS5 Klone (vgl. 3.3.1). Da bei der Genamplifikation der GS5 Klone zu beobachten war, dass mit steigender MSX Konzentration die Proliferationsrate der Klone leicht reduziert wurde, erfolgte die Kultivierung der GS6 Zellpopulation nur bei 50 µM MSX in Abwesenheit von Glutamin. Nach der Einzelzellklonierung wurden 144 Klone manuell aus dem semi-soliden Medium isoliert, von denen 141 anwachsen. Die Zellkulturüberstände konfluent gewachsener Einzelzellklone in 96-Loch-Platten wurden nach 5-10 Tagen Wachstum mittels ELISA auf deren Proteinkonzentration überprüft. Dabei exprimierten 90 % der transfizierten Zellpopulation den murinen Modellantikörper anti-EpCAM IgG2a. Von den isolierten Klonen wurden 43 für die Kultivierung im 50 mL Bioreaktor expandiert und hinsichtlich deren spezifischer Produktivität untersucht (Abbildung 3-23).

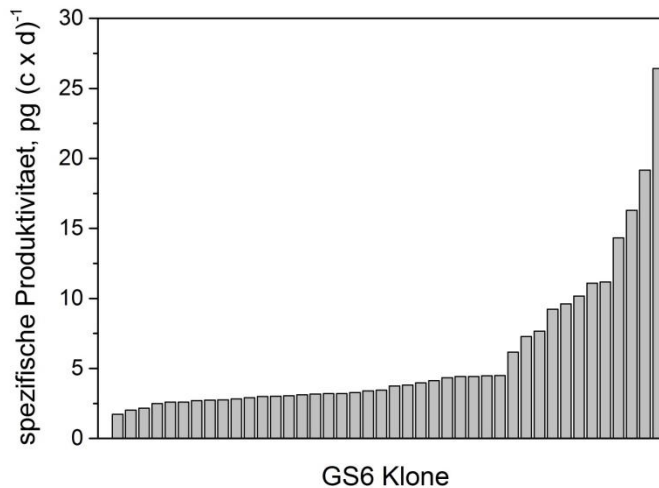


Abbildung 3-23: Spezifische Produktivität der GS6-Einzelzellklone

Von 144 isolierten Einzelzellklonen wurden 43 für die Kultivierung im 50 mL Bioreaktor expandiert und auf ihre spezifische Produktivität untersucht.

Durch die wiederholte Nukleofektion wurde der Anteil exprimierender GS-Klone erhöht, wobei mehr als 72 % der untersuchten Klone bei der Produktivitätsanalyse im Falcon weniger als 5 pcd aufwiesen. Fünf Klone, welche eine sehr gute Produktivität sowie Proliferation aufwiesen, wurden in einer Batch-Kultivierung im Schüttelkolben untersucht (Abbildung 3-24). Die Inokulation erfolgte mit exponentiell wachsenden Zellkulturen auf eine Zelldichte von $3 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ bei einem Kulturvolumen von 200 mL. Die Kultivierung wurde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 125 rpm durchgeführt. Mit einer täglichen Probenahme von 6 mL wurden neben der viablen und totalen Zelldichte, der pH-Wert, die Gelöstkonzentrationen von O_2 und CO_2 sowie die Laktat- und Glukosekonzentrationen bestimmt.

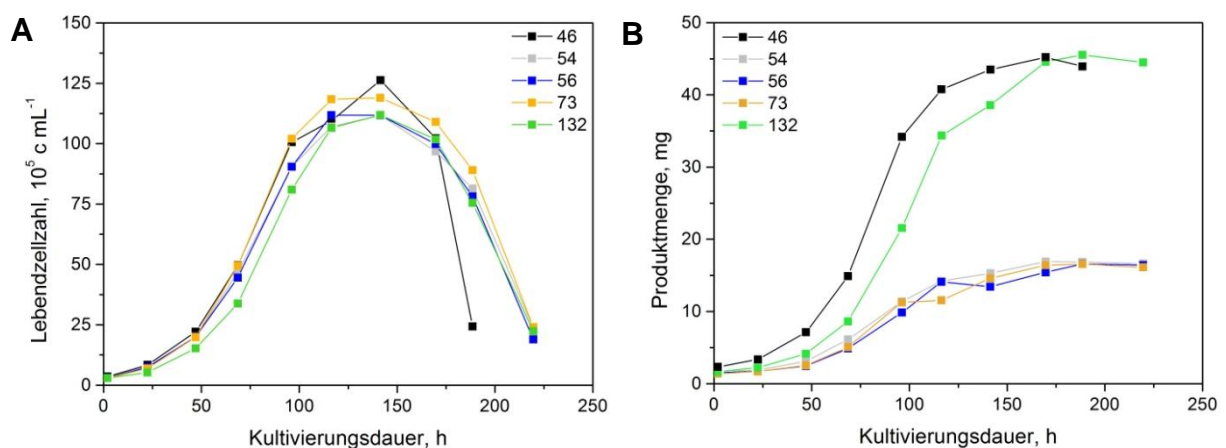


Abbildung 3-24: Batch-Kultivierung von fünf Klonen des re-transfizierten GS6 Pools.

Die Klone wurden in der Vorkultur mit $50 \mu\text{M}$ MSX geführt, der Batch-Versuch wurde in Abwesenheit von MSX durchgeführt.

(schwarz) – Klon 46, (grau) – Klon 54, (blau) – Klon 56, (orange) – Klon 73, (grün) – Klon 132

A: Darstellung der Lebendzellzahl über die Kultivierungsdauer. Die untersuchten Klone weisen ein sehr vergleichbares Wachstum auf. **B:** Darstellung der Masse an produzierten mgG2a Antikörper über die Kultivierungsdauer. Klone 46 und 132 exprimierten um Faktor 3 mehr Antikörper als Klone 54, 56 und 73.

Die untersuchten Klone zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten im Batch, wobei maximale Zelldichten von $110\text{--}126 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ erzielt wurden. Die Zelldichten korrelieren ferner mit den erreichten Werten der Batch Kultivierung des GS5 Klon 9 bei $50 \mu\text{M MSX}$ (Abbildung 3-19 A), jener Zelllinie, aus welchem die GS6 Klone generiert wurden. Im Hinblick auf die Antikörperproduktion betrug der Titer im Zellkulturüberstand zum Ende der Kultivierung bei etwa 100 mg L^{-1} bei den Klonen 54, 56 und 73. Dies entspricht der Produktivität des GS5 Klons 9. Die Klone 132 und 46 wiederum akkumulierten zum Ende der Kultivierung hingegen 300 mg L^{-1} Antikörper. Im Vergleich zum Ursprungsklon GS5 Klon 9, konnte der finale Titer durch die wiederholte Nukleofektion somit um Faktor drei gesteigert werden. Mit der Auftragung des Integrals der viablen Zelldichte gegen die akkumulierte Produktmasse konnte ferner beobachtet werden, dass auch die aus dem GS5 Klon 9 generierten GS6 Klone in der Batch Kultivierung mit Erreichen der maximalen Zelldichte (116 h) reduzierte spezifische Produktivitäten aufweisen.

Um im Verlauf der Selektion insbesondere schwach sowie durchschnittlich exprimierende Zellen zu eliminieren, nutzten Fan et al. einen abgeschwächten SV40 Promotor, welcher die GS-Expression auf dem Expressionsplasmid steuert. Dies resultierte in einer Reduktion der transkriptionellen GS-Aktivität um bis zu 61 %. Ferner bewirkte dies eine Steigerung der Titer der Hochproduzentenklone von $1,5 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,5 \text{ g L}^{-1}$ in einer 14-tägigen Fed-Batch Kultivierung (Fan et al. 2013).

3.3.4 Leistungsfähigkeit des GS6 Klon 132 in Fed-Batch Kultivierungen

Die meisten industriellen Prozesse zur Herstellung rekombinanter Proteine beruhen auf Fed-Batch Kultivierungen (Birch & Racher 2006). Mit dem Ziel hohe Zelldichten bei langanhaltend hoher Viabilität der Zellpopulation zu erreichen, wird Nährlösung kontinuierlich oder in Intervallen zugeführt (Shukla & Thömmes 2010). Dabei können mit Hochproduzentenzelllinien Antikörpertiter von bis zu 10 g L^{-1} bei Zelldichten von $20 \times 10^6 \text{ c mL}^{-1}$ erreicht werden (Li et al. 2010).

In Fed-Batch Kultivierungen mit dem GS6 Klon 132 wurde exemplarisch untersucht, in welchem Maß sich der Antikörpertiter noch steigern lässt. Hierfür wurde die für das Grundmedium CD-CHO erhältliche, Nährlösung Efficient Feed B eingesetzt. Im Rahmen der Fed-Batch Versuche wurde in Intervallen ein definiertes Volumen als Bolus-Feed zugefüttert. Dies wird aufgrund der einfachen Anwendung sowie der guten Skalierbarkeit mehrheitlich auch in der pharmazeutischen Industrie angewandt (Li et al. 2005). Die Zelldichte, die Glukose- und die Laktatkonzentration, der pH-Wert und die Gelöstkonzentrationen von CO_2 und O_2 wurden täglich bestimmt. Hierfür wurden $1,5 \text{ mL}$ Probe entnommen. Alle zwei Tage wurden zusätzlich Rückstellproben für die Antikörperquantifizierung mittels HPLC angefertigt,

wodurch sich das Probenvolumen auf 5 mL erhöhte. In Vorversuchen mit der Nährlösung Efficient Feed B wurden zunächst vier verschiedene Feed-Strategien getestet, bei welchen der Einfluss des Feed-Zeitpunktes und der Feed-Menge (bei konstantem Gesamtfeedvolumen) auf den Kulturverlauf sowie die Produktbildung untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass der Zeitpunkt (bei vergleichbarer Feedmenge) sowie die Feedmenge zum jeweiligen Zeitpunkt der Zufütterung (bei konstantem Gesamtfeedvolumen) nicht einflussgebend waren. Die erzielten Zelldichten, finalen Titer sowie spezifischen Produktivitäten waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 3-25 sind vergleichend Batch und Fed-Batch Kultivierungen des GS6 Klon 132, welche im Schüttelkolben im Maßstab 100 mL bzw. 200 mL durchgeführt wurden, dargestellt. Die Batch sowie eine Fed-Batch Kultivierung wurden dabei in CD-CHO Medium durchgeführt. An Tag 1 wurden 15 %, an den Tagen 4, 7 und 10 dann 10 % der Nährlösung Efficient Feed B zugefüttert. Dies ist in Abbildung 3-25 A mit schwarzen Pfeilen verdeutlicht. Ein zusätzlicher Glukose-Feed war nicht erforderlich, da die Glukose Konzentration im Verlauf der Kultivierung nicht unter den Schwellenwert von 2 g L^{-1} fiel.

Darüber hinaus wurde ein zweites kommerzielles Medium (ActiCHO), speziell für die Produktion rekombinanter Proteine mit CHO-Zellen und die zugehörigen Nährlösungen ActiCHO Feed A und ActiCHO Feed B getestet. Die Zellen wurden zuvor mit dem speziell für die Adaption geeigneten Medium ActiCHO SM adaptiert. Die Kultivierung erfolgte in dem Medium ActiCHO P. Aufgrund der stärkeren Konzentrierung der Feed-Lösungen erfolgte die Zugabe von 3 % ActiCHO Feed A und 0,3 % ActiCHO Feed B an den Tagen 2 und 3 der Kultivierung. Infolge der starken Proliferation der Zellen wurde an allen folgenden Tagen der Kultivierung 4 % Feed A sowie 0,4 % Feed B zugegeben. Ferner erfolgte bei Unterschreiten der Glukose-Konzentration von 2 g L^{-1} die Zufütterung einer 250 g L^{-1} konzentrierten Glukose Lösung auf eine Glukose-Konzentration von $4,5 \text{ g L}^{-1}$ im Zellkulturüberstand.

Die Schüttelkolben wurden mit exponentiell wachsenden Zellen auf eine Zelldichte von $3 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ inokuliert und im Verlauf der Versuche bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 6 % CO_2 und 125 rpm kultiviert.

In Abbildung 3-25 A ist der Verlauf der Lebendzellzahl sowie der Viabilität über die Kultivierungsdauer der drei Versuche dargestellt. Der Batch-Versuch weist dabei die kürzeste Kultivierungsdauer von knapp 200 h auf. Die Fed-Batch Versuche zeigten eine um 100 bzw. 120 h verlängerte Prozesszeit. Die erzielte maximale Zelldichte lag beim Batch-Versuch bei $111 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$, der Fed-Batch im CD-CHO Medium erreichte mit $127 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ nur eine geringfügig höhere Zelldichte. Die Verwendung des chemisch-definierten Mediums Acti-CHO mit den zugehörigen Nährlösungen bewirkte eine Steigerung der Maximalzellendichte auf $293 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$. Beim Vergleich der Verläufe der Viabilität der Zellen ist zu erkennen, dass im Vergleich zur Batch-Kultivierung die Abnahme der viablen

Zellen im Fed-Batch später erfolgte und weniger steil verlief. Der Fed-Batch in ActiCHO-Medium konnte die hohe erzielte Zelldichte etwa 225 h bei einer Viabilität größer 95 % erhalten, bevor eine sichtbare Reduktion der Viabilität einsetzte. Obgleich sich die Zelldichte nach 333 h im Vergleich zur Maximalzelldichte halbiert hatte, betrug die Viabilität noch etwa 75 %, was vermuten lässt, dass eine Vielzahl der Zellen lysiert waren und somit über eine Trypanblaufärbung nicht mehr detektiert werden konnten. Der Antikörpertiter im Zellkulturüberstand über den Verlauf der Kultivierungen ist in Abbildung 3-25 B dargestellt, da dieser im Zuge der Medientestung sowie der Prozessentwicklung für Hochproduzentenzelllinien und für die daran anschließende Aufarbeitung des rekombinanten Produktes von Bedeutung ist.

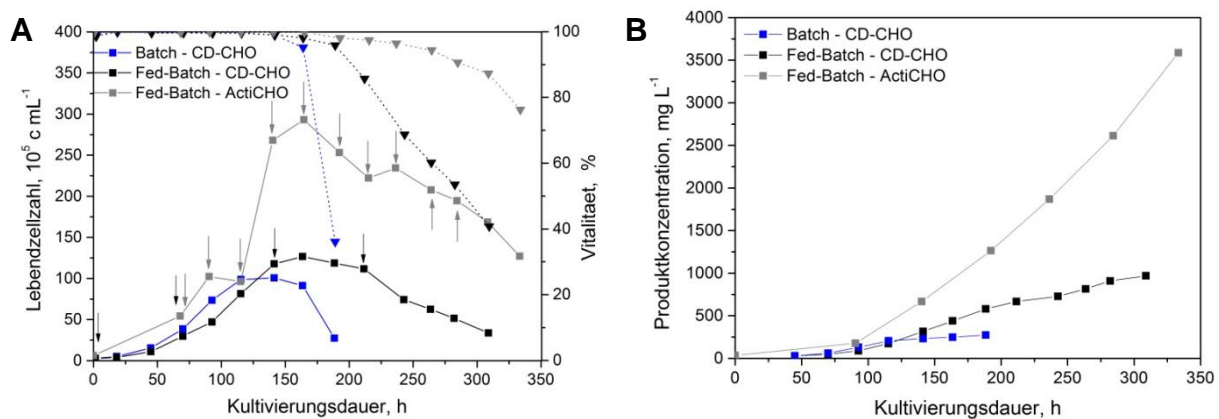


Abbildung 3-25: Batch und Fed-Batch Kultivierungen des GS6 Klon 132 in verschiedenen chemisch-definierten Medien

(blau) – Batch Kultivierung in CD-CHO Medium, (schwarz) – Fed-Batch Kultivierung in CD-CHO Medium und Efficient Feed B, (grau) – Fed-Batch Kultivierung in ActiCHO P Medium und ActiCHO Feed A und B

Die Pfeile in Abbildung A stellen die Feed-Zeitpunkte dar.

A: Darstellung der Lebendzellzahl und Viabilität (gepunktete Linie) über die Kultivierungsdauer. Die definierte Zufütterung einer konzentrierten Nährlösung verlängerte die Kultivierungsdauer im Vergleich zum Batch um bis zu 120 h. Im Batch wurde eine maximale Zelldichte von $111 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ erzielt, die veränderte Kulturführung bei gleichem Grundmedium führte zu einer Maximalzelldichte von $126 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ bei Verlängerung der Plateauphase. Die Verwendung der ActiCHO Medium nebst Feed erhöhte die Zelldichte im Maximum auf $293 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$. **B:** Darstellung der mIgG2a Antikörperkonzentration im Zellkulturüberstand über die Kultivierungsdauer. Die veränderte Kulturführung bei gleichem Grundmedium (CD CHO) erhöhte den Titer um Faktor 3,2 auf 970 mg L^{-1} . Im ActiCHO Medium konnte ein finaler Titer von 3590 mg L^{-1} erzielt werden.

In der Batch-Kultivierung konnte mit dem GS6 Klon 132 ein finaler Titer von 300 mg L^{-1} erzielt werden. Der Einsatz der zugehörigen Feedlösung für das Grundmedium CD-CHO führte zu einer Steigerung des Titers um den Faktor 3,2 auf 970 mg L^{-1} . Die Verwendung eines veränderten Grundmediums nebst Nährlösungen steigerte den Titer im Vergleich zur Batch Kultivierung um Faktor 12 auf 3590 mg L^{-1} . Um zu analysieren ob die erhöhten Produkttiter durch die reine Steigerung des Integrals der viablen Zellen über den

Kultivierungszeitraum erzielt wurde, oder durch die Verwendung der Nährlösungen eine Steigerung der spezifischen Produktivität induziert wurde, ist in Abbildung 3-26 Produktmasse und IVC gegeneinander aufgetragen. Diese Darstellung berücksichtigt ferner die stärkere Verdünnung der Zellsuspension bei den Fed-Batch Kultivierungen und insbesondere bei dem Fed-Batch mit Efficient Feed B aufgrund der schwächeren Konzentrierung dieses Feeds.

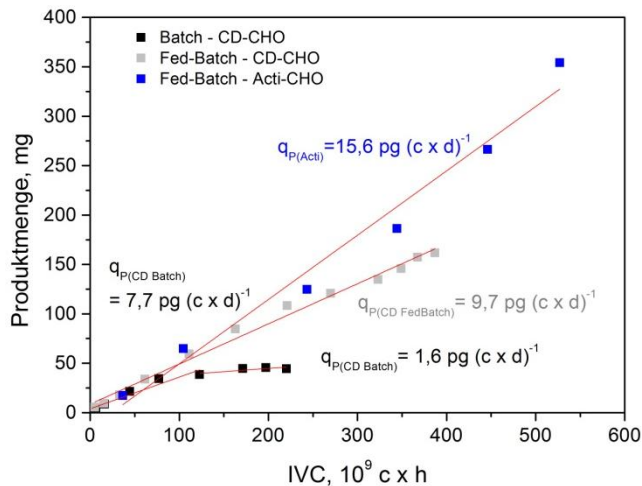


Abbildung 3-26: Darstellung der spezifischen Produktivitäten des GS6 Klon 132 für die Batch- und Fed-Batch Kultivierungen in verschiedenen chemisch-definierten Medien.

Über den Kultivierungszeitraum wurde das Integral der viablen Zellen (IVC) bestimmt und gegen die akkumulierte Produktmasse aufgetragen. Über die Steigung der linearen Regression wurde die spezifische Produktivität bestimmt.

(schwarz) – Batch Kultivierung in CD-CHO Medium, (grau) – Fed-Batch Kultivierung in CD-CHO Medium und Efficient Feed B, (blau) – Fed-Batch Kultivierung in ActiCHO P Medium und ActiCHO Feed A und B

Auftragung der IVC über die Produktmasse der Batch und Fed-Batch Kultivierungen von GS6 Klon 132. Bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte wies der Batch eine Produktivität von 7,7 pcd auf, welche sich nachfolgend auf 1,6 pcd reduzierte. Bei gleichem Grundmedium (CD-CHO) führte die Zufütterung zu einer Steigerung der spezifischen Produktivität auf 9,7 pcd, die über den gesamten Kultivierungsverlauf nahezu konstant blieb. Unter Verwendung des ActiCHO Medium lag die Produktivität über den gesamten Kultivierungsverlauf bei 15,6 pcd.

Die vergleichende Darstellung der spezifischen Produktivität über den Kultivierungszeitraum in Abbildung 3-26 verdeutlicht den Einfluss der Kulturmodi (Batch/ Fed-Batch) sowie des gewählten Kulturmediums. Bei der Batch Kultivierung des GS6 Klon 132 lag die spezifische Produktivität bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte nach 100 h bei 7,7 pcd. Anschließend konnte eine Reduktion der Produktivität auf 1,6 pcd, vermutlich infolge verbrauchter Nährstoffe und der Akkumulation von Abbauprodukten, festgestellt werden. So wurde nach 116 h Laktat verstoffwechselt, welches zuvor akkumuliert wurde. Ferner war im Batch die Glukose als essentielles Substrat nach 169 h vollständig metabolisiert. Die Zufütterung einer konzentrierten Nährlösung als Bolus-Feed zeigte, dass die spezifische

Produktivität auf 9,7 pcd gesteigert und bis zum Abbruch der Kultivierung, nach Unterschreiten der Viabilität von 50 %, beibehalten werden konnte. Der erhöhte finale Produkttiter von nahezu 1 g L⁻¹ wurde demnach durch eine erhöhte spezifische Produktivität der Zellen im Fed-Batch infolge der Zufütterung notwendiger Nährstoffe für die Proliferation sowie die Produktbildung und durch eine verlängerte Kultivierungszeit erzielt. Die Fed-Batch Kultivierung mit dem chemisch-definierten Medium ActiCHO erbrachte im Vergleich zum Fed-Batch in CD-CHO eine Erhöhung des finalen Titers um Faktor 3,5 sowie eine Steigerung der maximalen Zelldichte um Faktor 2,3. Anhand der Auftragung der Produktmasse gegen IVC ist zu erkennen, dass analog zum Fed-Batch in CD-CHO eine annähernd konstante spezifische Produktivität von 15,6 pcd im Verlauf der Kultivierung zu beobachten war. Ursache für die deutlich erhöhte spezifische Produktivität könnte ein sehr hoher intrazellulärer Gehalt an rekombinanten Antikörper sein, welcher infolge nekrotischer und damit lysierender Zellen freigesetzt wurde (Al-Rubeai et al. 1992). Mit einer Zellzyklusanalyse der GS6 Klon 132 Population im Verlauf der Kultivierungen könnte ferner untersucht werden, ob der Kulturmodus sowie die verschiedenen Medien den Anteil der viablen Population in der G1 Phase variiert. Dass ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der Proteinproduktion und dem IVC der G1 Phase besteht, konnten Dutton et al. für eine tPA-produzierende CHO-Zelllinie nachweisen (Dutton et al. 2006). Meleady et al. zeigten ferner, dass eine konstante Produktivität im Verlauf eines 10-tägigen Fed-Batch im Zusammenhang mit der Überexpression von Proteinen steht, welche in der Proteintranslation sowie -faltung involviert sind (Meleady et al. 2011). Inwieweit der Einsatz verschiedener chemisch-definierter Medien sowie der zugehörigen Nährlösungen bei dem GS6 Klon 132 im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung eine differentielle Expression bestimmter Proteine induziert, müsste mittels Proteom Analyse untersucht werden. Zusammenfassend konnte unter Verwendung des GS-Systems mittels zweifacher Nukleoporation von CHO-S Zellen und der anschließenden Selektion von 144 Zellklonen eine Hochproduzentenzelllinie generiert werden. Mit Hilfe eines einfachen Feed-Schemas (3-tägiger Bolus Feed) konnte ein finaler Antikörpertiter von etwa 1 g L⁻¹ erzielt werden. Die Verwendung eines zweiten kommerziell erhältlichen chemisch-definierten Mediums resultierte in finalen Titern von 3,5 g L⁻¹, was den in der Industrie erzielten Titern entspricht (Kelley 2009).

3.4 Charakterisierung Antikörper-produzierender CHO Zelllinien in Fed-Batch Versuchen

Nach der Identifikation einer geeigneten Hochproduzentenzelllinie erfolgt in der Regel die Ablage von Master- sowie Arbeitszellbänken (MCB und WCB). Die Entwicklung eines geeigneten Bioprozesses für die kommerzielle Produktion wird im Anschluss daran initiiert (Li

et al. 2005). Vielfach werden standardisierte Plattformen für die Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt. Neben einer beschleunigten Prozessentwicklung und vergleichbarer Leistungsfähigkeit im Scale-up ermöglicht dieser Ansatz ferner die Integration der Aufarbeitungsprozesse (Li et al. 2010; Kelley 2009). Die genauen Konstanten solcher Plattformen variieren, meist wird jedoch eine definierte Wirtszelllinie mit zugehörigem Expressionsvektor und Transfektions- sowie Selektionsstrategien für die Zelllinienentwicklung genutzt. Im Zuge der Prozessoptimierung kommen ferner ein Standard Zellkulturmedium, eine definierte Prozesskontrolle und Scale-Up Methoden zum Einsatz. Die unter 3.2 (Expression rekombinanter Proteine an definierten chromosomalen Loci) vorgestellten Ergebnisse deuteten auf eine vergleichbare Produktivität bei der Expression von vollständigen Antikörpern in einem definierten Locus bei Zelllinien mit Kassettenaustauschsystem. Inwieweit sich dies auch in einer vergleichbaren Leistungsfähigkeit in Kultivierungsprozessen widerspiegelt und das RMCE somit eine ideale Eignung für Plattformprozesse aufweisen würde, ist bisher nicht untersucht worden.

3.4.1 Identifizierung signifikanter Einflussgrößen unter Verwendung statistischer Versuchsplanung

Die Vergleichbarkeit der Leistungsfähigkeit von Produktionsklonen wurde unter Verwendung statistischer Versuchsplanung untersucht. Im Gegensatz zur Einfaktormethode, bei welcher nur ein Faktor variiert wird, während die übrigen Faktoren unverändert bleiben, werden bei der statistischen Versuchsplanung je Versuch mehrere Faktoren gleichzeitig verändert. Aufgrund des definierten Aufbaus des Versuchsplans ermöglicht dieser Ansatz die Untersuchung vieler Faktoren bei reduzierter Versuchsanzahl. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten voll-faktorierten Versuchspläne eignen sich insbesondere für Screening-Versuche, da die Effekte aller Faktoren und Wechselwirkungen bestimmt werden können (Kleppmann 2013; Montgomery 2008).

3.4.1.1 Vergleich der Fed-Batch Kultivierungen verschiedener GS-Klone

Für die Untersuchung verschiedener GS-Klone in Fed-Batch Kultivierungen wurden drei der in Kapitel 3.3.3 (Die wiederholte Nukleofektion einer GS-Zelllinie generiert Hochproduzentenzelllinien) vorgestellten GS6 Klone, welche aus einem gemeinsamen Transfektionspool isoliert wurden, ausgewählt. Neben den Hochproduzenten GS6 Klon 132 und GS6 Klon 46, welche in der Batch Kultivierung finale Titer von etwa 300 mg L⁻¹ erzielten, wurde GS6 Klon 73, welcher einen finalen Batch Titer von 100 mg L⁻¹ erreichte, gewählt. Die Fed-Batch Versuche wurden in Anlehnung an die vorgestellte Kultivierung des GS6 Klon 132 in CD-CHO Medium mit der Feed-Lösung Efficient Feed B durchgeführt (vgl. 3.3.4).

Um zu überprüfen in welchen einflussgebenden definierten Faktoren sich die drei GS6 Klone bei der Fed-Batch Kultivierung signifikant unterscheiden, wurde ein voll-faktorisierte 2^3 Versuchsplan durchgeführt. Die Auswahl der Faktoren nebst Stufen erfolgte auf Erfahrungswerten, unter anderem auch mit anderen Zelllinien. Ferner ist insbesondere die milde Hypothermie (Temperaturreduktion) in der Literatur vielfach als positiver Einflussfaktor für die Steigerung der Produktexpression beschrieben (Sunley et al. 2008; Becerra et al. 2012; Yoon et al. 2004). Es wurden insgesamt drei Faktoren ausgewählt, die auf zwei Stufen untersucht wurden. Damit ergaben sich acht Versuche innerhalb welcher die Faktoren variiert wurden. Die Leistungsfähigkeit der GS6 Klone wurde bei Variation der drei Faktoren Zeitpunkt der Temperaturänderung nach Inokulation, Inokulationszelldichte sowie Gesamtfeedvolumen untersucht. Der Bolus-Feed wurde analog zu den bereits durchgeführten Fed-Batches, beginnend mit 15 % Feedzugabe an Tag 1 sowie 10 % Feedzugabe an Tag 4, 7 und 10, durchgeführt. Im Zuge des Versuchsplanes wurden die Stufen -1 und 1 für das Gesamtfeedvolumen als -15 % bzw. + 15 % des standardmäßig zugefütterten Volumens an Nährlösung definiert. Der Zeitpunkt der Feedzugabe wurde dabei nicht variiert. Der nicht-kodierte Versuchsplan mit den Stufen +1 und -1 der drei Faktoren ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2: Voll-faktorisierte Versuchsplan mit 3 Faktoren und 2 Stufen

Versuchs-Nr.	Zeitpunkt der Temperaturänderung	Inokulationszell-dichte	Gesamtfeed-volumen
	T-Shift	C_{XV0}	V_{feed}
	[h]	[10^5 c mL ⁻¹]	[mL]
1	72	5,4	38,3
2	144	5,4	38,3
3	72	12,6	38,3
4	144	12,6	38,3
5	72	5,4	51,8
6	144	5,4	51,8
7	72	12,6	51,8
8	144	12,6	51,8

Die Versuche wurden bei einem Kulturvolumen von 100 mL im 500 mL Schüttelkolben bei 37 °C, 140 rpm und 5 % CO₂ durchgeführt. Die Temperaturänderung auf 32 °C erfolgte 72 h bzw. 144 h nach Inkulation.

Die Ergebnisse der Versuche des voll-faktorierten Versuchsplans für die GS6 Klone 46, 73 und 132 sind nachfolgend in Tabelle 3-3 bis Tabelle 3-7 dargestellt. Die Wachstumskurven der drei untersuchten GS6 Klone für die Versuchsnummer 7 (vgl. Tabelle 3-2), Produktbildungskurven sowie die Auftragung der kumulierten Zellstunden gegen die Produktmasse zur Bestimmung der spezifischen Produktivität sind exemplarisch in Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28 dargestellt. Die Versuchsdauer aller durchgeführten Versuche variierte dabei von 263 h bis maximal 431 h. Um eine Vergleichbarkeit aller Ergebnisse untereinander zu gewährleisten, erfolgte die Auswertung der Versuche zum Zeitpunkt $t=263$ h, dies ist in Abbildung 3-27 A mit Hilfe der vertikalen grauen Linie dargestellt. Die Inokulationsdichte aller drei Klone betrug bei Versuchsnummer 7 $12,6 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$.

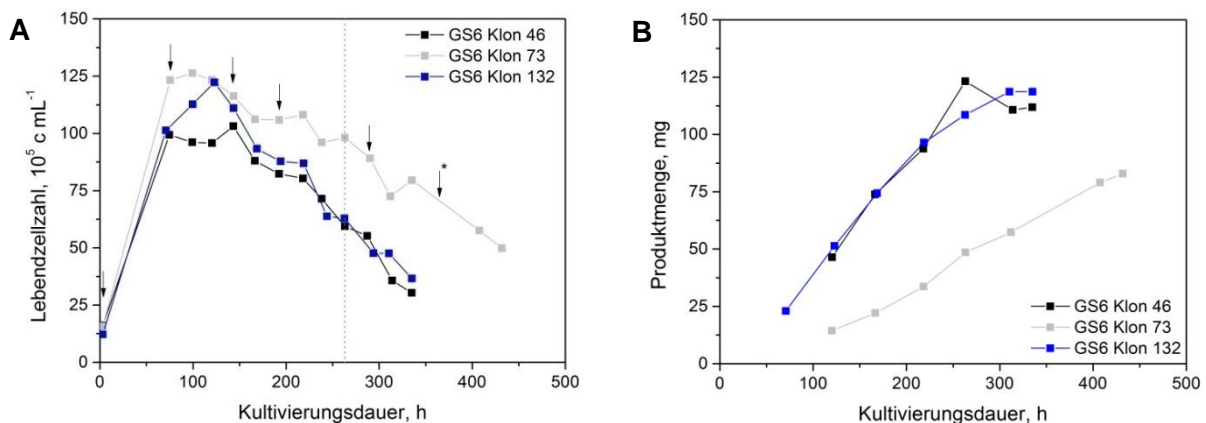


Abbildung 3-27: Fed-Batch Kultivierung der GS6 Klone 46, 73 und 132 entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 7 (vgl. Tabelle 3-2) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.

(schwarz) –GS6 Klon 46, (grau) – GS6 Klon 73, (blau) – GS6 Klon 132

Die schwarzen Pfeile in Abbildung A stellen die Feed-Zeitpunkte für alle GS6 Klone dar. GS6 Klon 132 erhielt nur drei Feeds (bis 263 h), GS6 Klon 46 und 73 erhielten nach 290 h einen weiteren Feed. Nach etwa 350 h wurde nur Klon 73 ein Feed zugesetzt, jedoch ohne den Kolben zu beproben (markiert durch den Asterisk).

A: Darstellung der Lebendzellzahl über die Kultivierungsdauer. GS6 Klon 73 erzielte nach 75 h $123 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$, eine vergleichbar hohe Zelldichte erreichte GS 6 Klon 132 nach 122 h. GS6 Klon 46 wuchs nur bis etwa $100 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$. In der Absterbephase konnte GS6 Klon 73 im Vergleich zu Klon 46 und 132 einen hohen Anteil viabler Zellen über einen langen Zeitraum erhalten. **B:** Darstellung der mIgG2a Antikörpermasse im Zellkulturüberstand über die Kultivierungsdauer. Mit etwa 110 mg erzielten GS6 Klon 46 und 132 eine vergleichbare Masse an akkumulierten Antikörper. Nach mehr als 400 h Kultivierungsdauer sekretierte GS6 Klon 73 83 mg.

GS6 Klon 73 erzielte bereits nach 73 h eine Zelldichte von $123 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ und konnte eine hohe viable Zelldichte über einen langen Kultivierungszeitraum erhalten. GS6 Klon 46 erreichte maximal $100 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ nach 100 h und Klon 132 $122 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ nach 122 h. Die viable Zelldichte reduzierte sich bei beiden Klonen nach der stationären Phase zum Einen vergleichbar und zum Anderen deutlich schneller als GS6 Klon 73. Über den Kulturverlauf

akkumulierten die Zellen aller GS6 Klone ferner im Maximum 1 g L^{-1} Laktat, was für die Proliferation sowie Produktbildung unkritisch ist. Ein Absinken des pH-Wertes unter 6,8 konnte vorwiegend bei Viabilitäten kleiner 60 % beobachtet werden. Die offline analysierten pO_2 Werte zeigten ferner keine Limitationen im Hinblick auf die Gelöstkonzentration an Sauerstoff im Medium (Daten nicht dargestellt). In Abbildung 3-27 B sind die im Verlauf der Fed-Batch Kultivierung akkumulierten Antikörpermassen dargestellt. GS6 Klon 46 und 132 sekretierten mit 110 mg bzw. 118 mg Antikörper nach 330 h Kulturdauer ähnlich viel Produkt. Im Vergleich zur Batch-Kultivierung erfolgte bei beiden Klonen eine Steigerung der finalen Antikörpermasse um Faktor 2,5. Bei GS 6 Klon 73 hingegen wurden nach 431 h Kultivierungsdauer mit 82 mg Antikörper 5,5-fach mehr Protein sekretiert als im Batch.

Die vergleichende Darstellung der Produktivität über den Kultivierungszeitraum in Abbildung 3-28 verdeutlicht die Unterschiede in der spezifischen Produktivität zwischen den GS6 Klonen bei gleichen Kulturparametern. Bei einem frühen Temperaturshift, einer hohen Inokulationszellendichte sowie einem hohen Gesamtfeedvolumen erzielten die Klone 46 und 132 spezifische Produktivitäten von 11,3 pcd bzw. 9,8 pcd. GS6 Klon 73 wies eine reduzierte Produktivität von 5,3 pcd auf. Obgleich Klon 73 in dem Fed-Batch Versuch eine um Faktor 5,5 erhöhte akkumulierte Antikörpermasse aufwies, ist der Versuch durch eine sehr lange Kultivierungsdauer charakterisiert. Für die kommerzielle Produktion würde daher die Wahl auf Klon 46 oder 132 mit höheren Produktivitäten fallen, um bei kürzerer Kultivierungsdauer hohe Titer zu erzielen. Ferner zeigte sich, dass die Klone in dem Fed-Batch Versuch nur eine Produktionsphase mit einer definierten spezifischen Produktivität aufweisen, die über den Prozess in etwa konstant bleibt. Die Batch-Versuche im CD-CHO Medium (vgl. Abbildung 3-24 und Abbildung 3-26) hingegen waren durch zwei Produktionsphasen gekennzeichnet, wobei nach Erreichen der maximalen Zelldichte die spezifische Produktivität abnahm. Die Zufütterung der konzentrierten Nährlösung beeinflusste demnach bei allen untersuchten GS6 Klonen die Produktion des rekombinanten Antikörpers, insbesondere in der Absterbephase der Zellen, positiv.

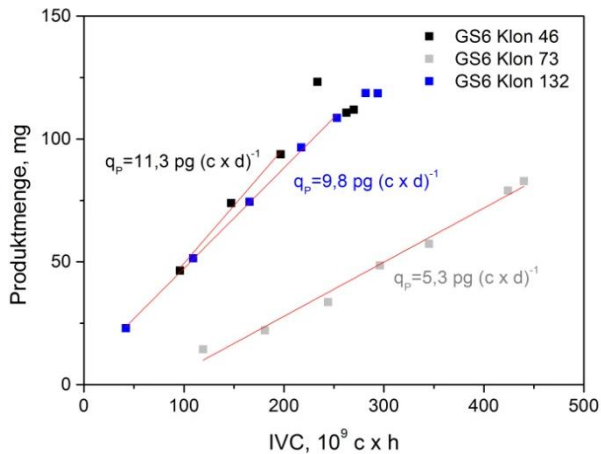


Abbildung 3-28: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der GS6 Klone 46, 73 und 132 entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 7 (vgl. Tabelle 3-2) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.

Über den Kultivierungszeitraum wurde das Integral der viablen Zellen (IVC) bestimmt und gegen die akkumulierte Produktmasse aufgetragen. Über die Steigung der linearen Regression wurde die spezifische Produktivität bestimmt.

(schwarz) –GS6 Klon 46, (grau) – GS6 Klon 73, (blau) – GS6 Klon 132

Auftragung der IVC über die Produktmasse der Fed-Batch Kultivierungen der GS6 Klone 46, 73 und 132. Mit 12,9 7,7 pcd wies Klon 46 die höchste spezifische Produktivität für den Versuch auf. GS6 Klon 132 sekretierte 9,8 pg pro Zelle und Tag. Die geringste Produktivität von 5,3 pcd erzielte Klon 73.

Anhand der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (Tabelle 3-2) soll nun untersucht werden, welche der überprüften Faktoren wahrscheinlich einen signifikanten Einfluss auf die Antwortgrößen kumulierte Zellstunden, akkumulierte Antikörpermasse sowie spezifische Produktivität haben. Für GS6 Klon 46 sind die Ergebnisse in Tabelle 3-3 dargestellt. Die Variationen der oben genannten Parameter resultierten bei GS6 Klon 46 in kumulierten Zellstunden (IVC) von $173 - 222 \times 10^9$ c h. Dabei wurde der niedrigste Wert erzielt als alle untersuchten Faktoren auf die Stufe -1 gesetzt waren und entsprechend der höchste IVC Wert bei Variation der Faktoren auf Stufe 1. Mit einer höheren Inokulationszellendichte ($12,6 \times 10^6$ c mL⁻¹) wird in gleicher Zeit mehr Zellmasse generiert, als bei niedriger Animpfdichte ($5,4 \times 10^6$ c mL⁻¹). Das Absenken der Kultivierungstemperatur setzte die Proliferation herab und arretierte die Zellen vermutlich in der G1/G0-Phase (Furukawa & Ohsuye 1999; Becerra et al. 2012; Hendrick et al. 2001; Yoon et al. 2003). Somit führte eine niedrige Inokulationszellendichte in Verbindung mit einer frühen Temperaturabsenkung auf 32 °C zu vergleichsweise niedrigen kumulierten Zellstunden (IVC). Bezug nehmend auf die akkumulierte Antikörpermasse wurde mit 127 mg der höchste Wert bei früher Temperaturänderung, niedriger Inokulationszellendichte sowie hohem Gesamtfeedvolumen erzielt. Bei gleicher Parametervariation wurde ebenso die maximale spezifische Produktivität von 13,2 pcd erreicht. Die Änderung der Faktoren auf eine späte Temperaturabsenkung (144 h), eine niedrige Inokulationszellendichte sowie ein geringes

Gesamtfeedvolumen führte zu einer Erniedrigung der Antikörpermasse auf 61,3 mg sowie einer spezifischen Produktivität von 6,9 pcd.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 46. Die grau hinterlegten Daten des Versuches 2 wurden zum Zeitpunkt t=221h generiert. Nach 241 h wurde bei diesem Versuch eine Kontamination festgestellt.

T	c _{XV}	V _{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	x3	IVC [10 ⁹ c h]	mAK [mg]	q _P [pg (c x d) ⁻¹]
-1	-1	-1	172,7	104,9	10,7
1	-1	-1	190,2	61,3	6,9
-1	1	-1	202,1	102,2	10,0
1	1	-1	193,7	75,6	6,8
-1	-1	1	196,1	127,1	13,2
1	-1	1	207,9	83,0	7,5
-1	1	1	214,3	111,9	12,9
1	1	1	222,3	85,8	7,4

Anhand der in Tabelle 3-3 vorgestellten Ergebnisse erfolgte die Berechnung der Kontraste für die jeweiligen Hauptfaktoren sowie deren Interaktionen (Tabelle 3-4). Kontraste oder Effekte sind dabei die Differenz der Mittelwerte der Antwortgrößen der hohen (+1) und niedrigen (-1) Stufe. Basierend auf dem *Sparsity of Effects* Prinzip haben vornehmlich eine begrenzte Anzahl an Hauptfaktoren sowie die Faktorinteraktionen niedriger Ordnung signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der meisten Systeme (Wu & Hamada 2000; Montgomery 2008). Faktorinteraktionen höherer Ordnung ($n > 3$) sind verhältnismäßig selten einflussgebend. Daher wurde für die Auswertung des einfach durchgeführten Versuchsplans die Annahme getroffen, dass die Wechselwirkung der drei untersuchten Faktoren vernachlässigbar ist und mit deren Hilfe die Prozessvarianz abgeschätzt werden kann (Eye & Mair 2010; Montgomery 2008). In Tabelle 3-4 sind die Kontraste der drei Hauptfaktoren, der Zweifaktorinteraktionen sowie der Dreifaktorinteraktionen für die drei Antwortgrößen IVC, mAK und q_P (in Anlehnung an Tabelle 3-3) für den GS6 Klon 46 dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass die Ergebnisse des Versuches 2 (in Tabelle 3-3 grau hinterlegt) nicht für die Kontrastberechnung herangezogen worden sind, da bei diesem Kolben nach einer Kultivierungszeit von 241 h eine Kontamination festgestellt wurde. Da eine Vergleichbarkeit mit den verbliebenen Daten somit nicht mehr gewährleistet war, wurden diese Ergebnisse nicht für die Kontrastberechnung genutzt. Anhand der berechneten Kontraste konnte gezeigt

werden, dass eine späte Temperaturänderung, eine hohe Inokulationszellichte sowie ein hohes Gesamtfeedvolumen die kumulierten Zellstunden erhöhen. Anhand des Kontrastwertes für die Dreifaktorinteraktion konnte gemutmaßt werden, dass sich die Faktoren x2 (Inokulationszellichte) und x3 (Gesamtfeedvolumen) wahrscheinlich signifikant auf die Antwortgröße IVC bei Kultivierungen mit dem GS6 Klon 46 im untersuchten Design-Raum auswirken. Als wahrscheinlich nicht-signifikant einflussgebend konnten die Faktorinteraktionen x1x3 und x2x3 für die Antwortgröße IVC identifiziert werden. Für die Responsegröße der kumulierten Antikörpermasse (t=263 h) wurde nur der Zeitpunkt der Temperaturänderung als wahrscheinlich signifikanter Faktor ermittelt. Dabei führte ein später Zeitpunkt des Temperaturshifts zu einer Erniedrigung der Antikörpermasse. Dieser Faktor (x1) wirkte sich ebenso wahrscheinlich signifikant auf die spezifische Produktivität aus. Der Temperaturshift 144 h nach Inokulation führte demnach zu einer im Mittel um 4,5 pcd reduzierten spezifischen Produktivität im Vergleich zur Änderung der Temperatur nach 72 h.

Tabelle 3-4: Kontrastergebnistabelle des 2³ Versuchsplans mit GS6 Klon 46

Response	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3
IVC	11,7	15,9	20,7	-11,9	-0,1	3,2	9,7
mAK	-30,0	-11,1	7,7	-0,7	-10,9	3,9	11,2
q_P	-4,5	-1,2	1,1	-0,6	-2,1	1,0	0,7

In Tabelle 3-5 sind die Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans des GS6 Klon 73 dargestellt. Im untersuchten Versuchsraum konnten dabei nach 263 h kumulierte Zellstunden von 215 – 297x10⁹ c h erreicht werden. Bei einem Temperaturshift nach 144 h, einer hohen Animpfdichte sowie einem reduzierten Gesamtfeedvolumen wurde der geringste IVC erzielt. Bei hohem Gesamtfeedvolumen konnte der höchste IVC unabhängig von x1 und x2 erreicht werden. Ferner war zu beobachten, dass die erzielten IVC im Versuchsraum bei GS6 Klon 73 im Mittel um 22 % höher waren als bei GS6 Klon 46. Die bei GS6 Klon 73 sekretierte Antikörpermasse hingegen entsprach mit maximal 48,5 mg nach 263 h ungefähr einem Drittel der maximal produzierten Proteinmasse von GS6 Klon 46. Diese wurde ferner bei GS6 Klon 73 bei hoher Inokulationszellichte, hohem Gesamtfeedvolumen und früher Temperaturänderung erzielt. Diese Faktorvariation führte jedoch nicht zu der maximal erreichten spezifischen Produktivität von 7 pcd innerhalb des untersuchten Versuchsraums. Dieser Wert konnte bei erhöhter Stufe aller untersuchten Faktoren beobachtet werden.

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 73

T	c _{XV}	V _{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	x3	IVC [10 ⁹ c h]	mAK [mg]	q _P [pg (c x d) ⁻¹]
-1	-1	-1	218,4	13,5	1,7
1	-1	-1	254,4	27,9	3,8
-1	1	-1	259,1	40,1	5,4
1	1	-1	214,8	28,2	5,2
-1	-1	1	252,2	20,1	2,4
1	-1	1	296,7	32,3	3,8
-1	1	1	295,6	48,5	5,3
1	1	1	242,6	33,9	7,0

Analog zum GS6 Klon 46 wurden auch für die Ergebnisse des Versuchsplans mit dem GS6 Klon 73 die Kontraste berechnet (Tabelle 3-6). Für die Antwortgröße IVC konnten dabei als wahrscheinlich signifikante Einflussgrößen das Gesamtfeedvolumen sowie die Interaktion der Faktoren x1x2 identifiziert werden. Einen wahrscheinlich signifikanten Einfluss auf die akkumulierte Antikörpermasse nach 263 h hatten der Faktor x2 (Animpfdichte), x3 (Gesamtfeedvolumen) sowie die Faktorinteraktion x1x2. Der Zeitpunkt des Temperaturshifts, welcher insbesondere bei GS6 Klon 46 einflussgebend für die Antikörpermasse war, wirkte sich bei GS6 Klon 73 nur unwesentlich auf diese aus. Auf die spezifische Produktivität wirkte sich wahrscheinlich signifikant die Inokulationsdichte aus, welche bei Erhöhung auf $12,6 \times 10^5$ c mL⁻¹ zu einer im Durchschnitt um 2,9 pcd gesteigerten Produktivität bei GS6 Klon 73 führte.

Tabelle 3-6: Kontrastergebnistabelle des 2³ Versuchsplans mit GS6 Klon 73

Response	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3
IVC	-4,2	-2,4	35,2	-44,5	-0,1	-3,0	-4,3
mAK	0,02	14,3	6,3	-13,3	-1,2	0,8	-0,3
q _P	1,2	2,9	0,7	-0,6	0,2	0,4	0,6

Für GS6 Klon 132 sind die Ergebnisse des 2³ Versuchsplans in Tabelle 3-7 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die im Versuchsraum erzielten akkumulierten Zellstunden nach 263 h mit $182\text{--}253 \times 10^9$ c h im Vergleich mit GS6 Klon 46, welcher im Batch Versuch einen ähnlichen Titer erreichte, im Mittel vergleichbar waren. Jedoch wurde mit GS6 Klon 132 das höchste IVC bei hoher Inokulationszelldichte, hohem Gesamtfeedvolumen sowie einer frühen Änderung der Kultivierungstemperatur erzielt. Die maximale akkumulierte

Antikörpermasse von 108,6 mg wurde bei dieser Faktorvariation ebenso erzielt. Abweichend zum GS6 Klon 46 wurde bei dem Klon 132 die maximale spezifische Produktivität von 11,6 pcd bei einer frühen Temperaturänderung, niedriger Animpfdichte sowie hohem Gesamtfeedvolumen erzielt.

Tabelle 3-7: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 132

T	c_{XV}	V_{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	x3	IVC [10⁹ c h]	mAK [mg]	q_P [pg (c x d)⁻¹]
-1	-1	-1	182,0	92,7	10,0
1	-1	-1	186,3	59,0	4,5
-1	1	-1	222,5	88,2	8,6
1	1	-1	212,8	57,7	4,5
-1	-1	1	184,2	91,4	11,6
1	-1	1	206,7	75,8	6,3
-1	1	1	252,9	108,6	9,8
1	1	1	236,6	76,1	5,8

Die berechneten Kontraste basierend auf Tabelle 3-7 für den voll-faktorierten Versuchsplan mit dem GS6 Klon 132 sind nachfolgend in Tabelle 3-8 dargestellt. Die Faktoren x2 und x3 sowie die Faktorinteraktionen x1x2 und x2x3 konnten als wahrscheinlich signifikant auf die Antwortgröße IVC identifiziert werden. Eine hohe Inokulationszelldichte bewirkte demnach eine mittlere Steigerung der kumulierten Zellstunden um 41×10^9 c h. Ferner führte ein hohes Gesamtfeedvolumen zu einer Steigerung des IVC um etwa 19×10^9 c h. Auf die kumulierte Antikörpermasse nach 263 h hingegen wirkte sich x1 ähnlich wie bei GS6 Klon 46 wahrscheinlich signifikant negativ aus. Zur Steigerung der finalen Antikörpermasse wäre folglich eine frühe Temperaturabsenkung förderlich. Zusätzlich schien das erhöhte Gesamtfeedvolumen bei GS6 Klon 132 in einer durchschnittlichen Erhöhung der akkumulierten Antikörpermasse nach 263 h um 13,6 mg zu resultieren. Der Einfluss einer frühen Temperaturabsenkung wirkte sich bei GS6 Klon 132 in ähnlichem Maße auf die spezifische Produktivität aus wie bei GS6 Klon 46. Eine Änderung der Temperatur nach 144 h auf 32 °C führte zu einer im Durchschnitt um 4,7 pcd reduzierten spezifischen Produktivität. Ein gesteigertes Gesamtfeedvolumen wirkte sich leicht positiv auf die spezifische Produktivität aus.

Tabelle 3-8: Kontrastergebnistabelle des 2³ Versuchsplans mit GS6 Klon 132

Response	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3
IVC	0,2	41,4	19,2	-13,2	2,9	7,9	-6,2
mAK	-28,1	2,9	13,6	-3,4	4,1	5,8	-5,0
q _P	-4,7	-0,9	1,5	0,6	0,1	-0,2	-0,04

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass für die drei untersuchten GS6 Klone, welche aus dem gleichen Transfektionspool entstammen, unterschiedlich signifikante Faktoren identifiziert werden konnten. Für die Klone 46 und 132, welche im Batch einen finalen Titer von 300 mg L⁻¹ erzielten, verbesserte insbesondere die frühe Temperaturabsenkung die spezifische Produktivität. Möglicherweise führte die Erniedrigung der Temperatur zu einer erhöhten Akkumulation von Zellen in der G1 Phase, in welcher viele Zellen eine erhöhte Produktivität zeigen (Hendrick et al. 2001; Dutton et al. 2006). Einen erhöhten Anteil von Zellen in der G1-Phase bei Reduktion der Temperatur sowie eine um Faktor 2,1 erhöhte Produktivität einer hGM-CSF exprimierenden CHO-K1 Zelllinie konnten Fogolin et al. ebenso beobachten (Fogolín et al. 2004). Neben einer erhöhten Produktivität bei Absenkung der Kultivierungstemperatur, konnten frühere Arbeiten ferner zeigen, dass der Eintritt der Zellen in die Apoptose verzögert wird (Slikker et al. 2001; Kumar et al. 2008). Bei GS6 Klon 73 hingegen bewirkte ein früher Zeitpunkt der Temperaturänderung eine leichte Reduktion in der Produktivität. Einen signifikanteren positiven Einfluss auf die spezifische Produktivität zeigte hingegen die erhöhte Inokulationszelldichte. Dass eine Absenkung der Kultivierungstemperatur zu einer Erniedrigung der spezifischen Produktivität führen kann, beobachteten auch Yoon et al. bei EPO und FSH exprimierenden CHO Zelllinien. Nach der Adaptation der Zelllinien an eine Kultivierungstemperatur von 32 °C reduzierten sich deren Produktivitäten um 49 % (EPO) bzw. 22 % (FSH) (Yoon et al. 2006). Ferner verdeutlichten Yoon et al., dass die beobachteten Effekte, welche aus der Absenkung der Kultivierungstemperatur resultierten, abhängig von den Zelllinien sind. Bei der Untersuchung 12 parental Antikörper-exprimierender CHO-Dukx-B11 Zelllinien, deren Subklone wiederum genamplifiziert wurden, variierte die Steigerung der Produktivität von 4- bis 25-fach. Ebenso wurden zwei Klone identifiziert, deren Produktivität infolge der Temperaturreduktion nicht stieg (Yoon et al. 2004). Die Absenkung der Kultivierungstemperatur bewirkte auch bei einer Antikörper exprimierenden CHO-Zelllinie keine Steigerung der Produktivität (Yoon et al. 2003). Auffallend bei jenen Untersuchungen, die keine erhöhte Produktivität infolge der Absenkung der Temperatur dokumentierten, war die verhältnismäßig geringe Produktivität der untersuchten Klone. So exprimierten diese im Batch-Versuch nur etwa 100 mg L⁻¹. Untersuchungen am Fraunhofer ITEM (nicht publiziert)

zeigten ebenfalls die Tendenz, dass eine Erhöhung der Produktivität von Zellen infolge der Reduktion der Temperatur insbesondere bei Hochproduzenten zu beobachten war.

Auch bei Betrachtung der erzielten akkumulierten Antikörpermassen nach 263 h konnten unterschiedliche Einflussfaktoren bei allen drei Klonen beobachtet werden. Dabei war erneut auffallend, dass die sekretierten Antikörpermassen bei Klon 46 und 132 negativ durch eine späte Temperaturabsenkung beeinflusst wird. Zusätzlich wirkte sich bei Klon 132 das Gesamtfeedvolumen positiv aus. Bei GS6 Klon 73 hingegen waren vornehmlich die Inokulationszellendichte sowie die Faktorinteraktion x_1x_2 einflussgebend.

Bei den im Versuchsraum untersuchten Einflussfaktoren während der Fed-Batch Kultivierung zeigte sich, dass die drei GS6 Klone unterschiedlich signifikant beeinflusst werden. Ferner konnten gelegentlich gleiche Einflussfaktoren bei den Klonen 46 und 132, welche im Batch-Versuch ähnliche Titer erzielten, identifiziert werden. Inwieweit sich jedoch Klone einer definierten hohen spezifischen Produktivität in ihrer Leistungsfähigkeit während einer Fed-Batch Kultivierung entsprechen, müsste mit einem höheren Stichprobenumfang an Klonen untersucht werden. Dass sich der schwächer exprimierende Klon 73 hingegen deutlich in seinen einflussgebenden Faktoren von den anderen beiden Klonen unterscheidet, konnte demonstriert werden. Ferner zeigten alle Klone unter Verwendung eines einfachen Feed-Schemas bei den Fed-Batch Kultivierungen sehr gute Steigerungen der finalen Titer auf bis zu 1 g L^{-1} bei Klon 46 und 132 und bis zu 700 mg L^{-1} bei Klon 73. Aufgrund der dargelegten, unterschiedlich signifikanten Einflussfaktoren während der Kultivierung, wird die effektive Anwendbarkeit einer Kultivierungsplattform erschwert. Insbesondere die Wirtschaftlichkeit des Prozesses spielt eine erhebliche Rolle. Dabei ist abzuwägen, welche Steigerung des finalen Titers bei einer Prozessoptimierung eines definierten Klons zu erwarten ist, wieviel Zeit eine solche Optimierung der Kultivierungsparameter in Anspruch nimmt und welchen wirtschaftlichen Mehrgewinn der erhöhte Titer mit sich bringt.

3.4.1.2 Vergleich der Fed-Batch Kultivierungen verschiedener RMCE-Klone

In Anlehnung an die Untersuchung signifikanter Einflussfaktoren bei Fed-Batch Kultivierungen der GS6 Klone erfolgten die Versuche zur Leistungsfähigkeit einer Auswahl von in 3.2 (Expression rekombinanter Proteine an definierten chromosomalen Loci) generierten Targeting-Subklonen, nachfolgend RMCE-Klone genannt. Da frühere Untersuchungen und die bisherigen Erfahrungen in Bezug auf die Erniedrigung der Kultivierungstemperatur darauf hindeuteten, dass dies bei schwächer produzierenden Klonen nicht in einer erhöhten Produktivität resultiert, wurde dieser Faktor bei der Untersuchung der RMCE-Klone nicht berücksichtigt.

Für die Untersuchung der Leistungsfähigkeit der RMCE Klone in Fed-Batch Versuchen wurden insgesamt drei Klone ausgewählt, welche auf der viral-markierten Masterzelllinie 2

basieren. Dabei wurden zwei Klone gewählt, welche aus demselben Targetingpool stammen, und den chimären Antikörper mit der lambda leichten Kette exprimierten. Ein weiterer Klon stammt von einem Kassettenaustauschversuch mit dem murinen IgG2a Antikörper. Diese drei Klone wurden in Anlehnung an die Versuche mit den GS6 Klonen bei Variation der zwei Faktoren Inokulationszell-dichte sowie Gesamtfeedvolumen überprüft. Basierend auf zwei zu untersuchenden Faktoren, welche auf zwei Stufen variiert wurden, erfolgte die Aufstellung des nicht-kodierten 2^2 voll-faktorierten Versuchsplans (Tabelle 3-9). Der Bolus-Feed wurde analog zu den bereits durchgeführten Fed-Batches, beginnend mit 15 % Feedzugabe an Tag 1 sowie 10 % Feedzugabe an Tag 4, 7 und 10, durchgeführt. Im Zuge des Versuchsplanes wurden die Stufen -1 und 1 für das Gesamtfeedvolumen als -15 % bzw. + 15 % des standardmäßig zugefütterten Volumens an Nährlösung definiert. Der Zeitpunkt der Feedzugabe wurde dabei nicht variiert.

Tabelle 3-9: Voll-faktorierte Versuchsplan mit 2 Faktoren und 2 Stufen

Versuchs-Nr.	Inokulationszell-dichte	Gesamtfeedvolumen
	c_{xv0}	V_{feed}
	$[10^5 \text{ c mL}^{-1}]$	$[\text{mL}]$
1	5,4	38,3
2	12,6	38,3
3	5,4	51,8
4	12,6	51,8

Die Versuche wurden bei einem Kulturvolumen von 100 mL im 500 mL Schüttelkolben bei 37 °C, 140 rpm und 5 % CO₂ durchgeführt.

Die Wachstumskurven und Produktbildungskurven der drei untersuchten RMCE Klone für die Versuchsnummer 4 sind in Abbildung 3-29 dargestellt. Die beiden RMCE IgG1 λ Klone erreichten nach 100 h Kultivierungszeit ihre maximale Zelldichte von etwa $180 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$. In der Absterbephase war der Abfall der viablen Zelldichte von Klon 2 geringfügig stärker als bei Klon 1. Bei RMCE IgG2a Klon 1 war zunächst eine leichte Lag-Phase zu beobachten, nach 125 h erzielte der Klon jedoch ebenso maximale Zelldichten von etwa $180 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$. Die beobachteten Wachstumskurven aller drei untersuchten Klone waren im Hinblick auf den Verlauf sowie die erzielten maximalen Zelldichten vergleichbar. Die akkumulierte Antikörpermasse über den Kultivierungszeitraum ist in Abbildung 3-29 B dargestellt. Dabei zeigte sich bei allen drei RMCE Klonen, unabhängig von den sekretierten rekombinanten Antikörpern, bis zu einer Kultivierungszeit von 225 h eine ebenso homogene Produktbildung

von 2,2 – 3 mg. Aufgrund des stärkeren Abfalls der viablen Zelldichte erreichte RMCE IgG1 λ Klon 2 nach dieser Prozesszeit bereits das Abbruchkriterium (Viabilität < 50 %). Bei RMCE IgG1 λ Klon 1 hingegen wurde mit Erreichen einer Viabilität von kleiner 50 % nach etwa 260 h ein Plateau bei der akkumulierten Antikörpermasse beobachtet. Die längste Kultivierungsdauer von etwa 280 h wies RMCE IgG2a Klon 1 auf, welcher im Maximum 3,25 mg Antikörper sekretierte. Im Hinblick auf die absoluten akkumulierten Produktmassen unterscheiden sich die Klone insbesondere zum Zeitpunkt der späten Absterbephase geringfügig.

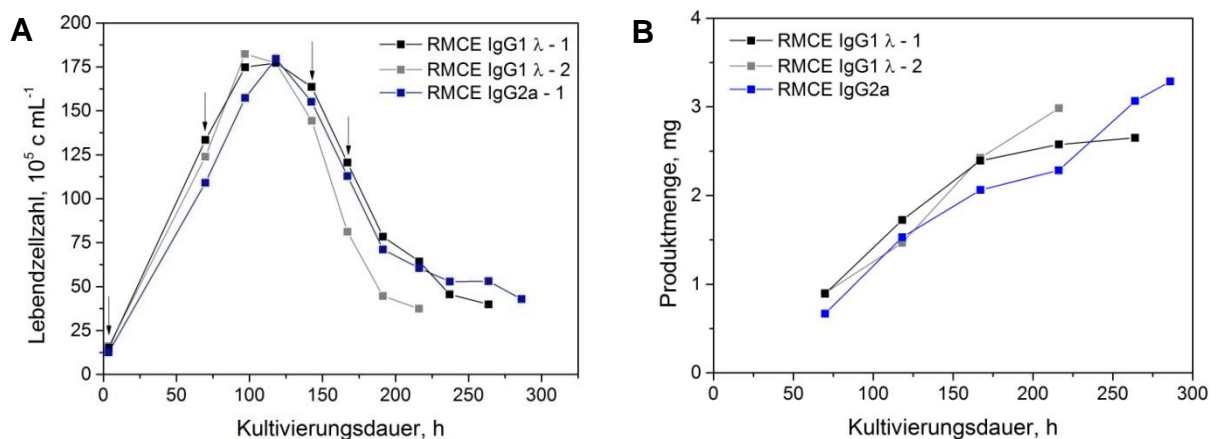


Abbildung 3-29: Fed-Batch Kultivierung Antikörper exprimierender RMCE-Klone entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 4 (vgl. Tabelle 3-9) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.

(schwarz) – RMCE IgG1 λ Klon 1, (grau) – RMCE IgG1 λ Klon 2, (blau) – RMCE IgG2 λ Klon 1

Die schwarzen Pfeile in Abbildung A stellen die Feed-Zeitpunkte für alle RMCE Klone dar.

A: Darstellung der Lebendzellzahl über die Kultivierungsdauer. Alle untersuchten RMCE Klone erzielten ihre maximale Zelldichte von 180×10^5 Zellen mL⁻¹ nach etwa 125 h. Die Wachstumsverläufe der Klone sind sehr ähnlich. **B:** Darstellung der mIgG2a Antikörpermasse im Zellkulturüberstand über die Kultivierungsdauer. Die nach 200 h erzielten Produktmassen lagen bei 2,2 – 3 mg. Die Produktbildungsverläufe verhielten sich ebenso vergleichbar.

Da die Versuchsdauer aller durchgeführten Versuche mit den RMCE Klone von 216 h – 310 h variierte, erfolgte die Auswertung der Versuche zum Zeitpunkt $t=216$ h, um eine Vergleichbarkeit aller Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Anhand der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans soll nun untersucht werden, in welchem Maß die überprüften Faktoren einen Einfluss auf die Antwortgrößen kumulierte Zellstunden, akkumulierte Antikörpermasse sowie spezifische Produktivität nahmen. Für RMCE IgG1 λ Klon 1 sind die Ergebnisse in Tabelle 3-10 dargestellt. Dabei wurden bei hoher Animpfzellendichte und hohem Gesamtfeedvolumen im Maximum 288×10^9 c h erreicht. Bei Variation der Faktoren auf Stufe -1 wurde ein Wert von 228×10^9 c h erzielt. Die im Versuchsraum nach 216 h akkumulierten Proteinmassen betragen 2,2 – 2,8 mg bei spezifischen Produktivitäten von 0,144 – 0,192 pcd.

Tabelle 3-10: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 216 h) für RMCE IgG1 λ Klon 1

c_{xv}	V_{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	IVC [10^9 c h]	mAK [mg]	q_p [pg (c x d) $^{-1}$]
-1	-1	228	2,2	0,192
1	-1	253	2,8	0,216
-1	1	257	2,3	0,144
1	1	288	2,6	0,168

Anhand der in Tabelle 3-10 vorgestellten Ergebnisse erfolgte die Berechnung der Kontraste für die jeweiligen Hauptfaktoren sowie deren Interaktionen (Tabelle 3-11). Da die durchgeführten Fed-Batch Kultivierungen mit den RMCE Klonen jeweils einmalig durchgeführt wurden, ist eine Abschätzung der Prozessvarianz nicht möglich. Da ferner nur zwei Faktoren untersucht wurden, ergibt sich bei der Kontrastergebnistabelle keine Dreifaktorinteraktion die näherungsweise als Prozessvarianz dienen kann. Es kann daher keine Aussage bezüglich der Signifikanz der beobachteten Kontraste und Faktoren getroffen werden.

Eine hohe Inokulationszelldichte sowie ein hohes Gesamtfeedvolumen bewirkten bei dem RMCE IgG1 λ Klon 1 einen um 28 bzw. 32 $\times 10^9$ c h erhöhten Wert akkumulierter Zellstunden. Die Antikörpermasse konnte bei hoher Inokulationszelldichte um 0,4 mg gesteigert werden, Faktor x2 sowie die Faktorinteraktion (x1x2) wirkten sich geringfügig negativ aus. Ein hohes Gesamtfeedvolumen wirkte sich negativ auf die erzielte spezifische Produktivität aus (um 0,048 pcd), während eine hohe Animpfdichte eine leichte Steigerung (um 0,024 pcd) induzierte.

Tabelle 3-11: Kontrastergebnistabelle des 2² Versuchsplans mit RMCE IgG1 λ Klon 1

Response	x1	x2	x1x2
IVC	28	32	3
mAK	0,4	-0,1	-0,1
q_p	0,024	-0,048	0,000

Für RMCE IgG1 λ Klon 2 sind die Ergebnisse in Tabelle 3-12 dargestellt. Ebenso wie bei Klon 1 wurde der maximale Wert kumulierter Zellstunden (254×10^9 c h) bei hoher

Animpfdichte sowie hohem Gesamtfeedvolumen erzielt. Dabei ist auffallend, dass die Werte von Klon 2 im Vergleich zu Klon 1 nach 216 h Kultivierungsdauer unter diesen Bedingungen um etwa 30×10^9 c h reduziert waren. Die im Versuchsraum nach 216 h akkumulierten Proteinmengen betragen 2,3 – 3,0 mg bei spezifischen Produktivitäten von 0,192 – 0,264 pcd. Im Vergleich zu RMCE IgG1 λ Klon 1 erzielte Klon 2 demnach vergleichbar hohe Antikörpermassen bei geringfügig erhöhter spezifischer Produktivität.

Tabelle 3-12: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 216 h) für RMCE IgG1 λ Klon 2

C_{XV}	V_{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	IVC [10^9 c h]	mAK [mg]	q_P [$pg (c \times d)^{-1}$]
-1	-1	191	2,3	0,264
1	-1	226	2,9	0,264
-1	1	225	2,3	0,192
1	1	254	3,0	0,240

Anhand der in Tabelle 3-12 vorgestellten Ergebnisse erfolgte die Berechnung der Kontraste für die jeweiligen Hauptfaktoren sowie deren Interaktionen (Tabelle 3-13). Dabei zeigte sich, wie bei RMCE IgG1 λ Klon 1, dass eine hohe Inokulationszelldichte sowie ein hohes Gesamtfeedvolumen eine Steigerung der kumulierten Zellstunden (32 bzw. 31×10^9 c h) induzieren. Eine ähnliche Übereinstimmung einflussgebender Faktoren ließ sich auch bei der akkumulierten Antikörpermasse nach 216 h beobachten. Wesentlichen positiven Einfluss auf die Proteinmasse nahm dabei insbesondere eine hohe Inokulationszelldichte. Bei Klon 2 führte diese zu einer um etwa 0,7 mg erhöhten Antikörpermasse. Auch bei Betrachtung des Einflusses der untersuchten Faktoren auf die spezifische Produktivität zeigten sich bei den Hauptfaktoren Übereinstimmungen zwischen den Klonen, auch im Hinblick auf die Größenordnung.

Zusammenfassend kann man bezüglich der wahrscheinlich einflussgebenden Faktoren der RMCE IgG1 λ Klone 1 und 2, welche aus einem gemeinsamen Targetingpool stammen und das Transgen von einem definierten Locus exprimieren, eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten beobachten. Auch die Größenordnung der durch die Faktoren induzierten Änderung der untersuchten Antwortgrößen (IVC, mAK, q_P) war vergleichbar.

Tabelle 3-13: Kontrastergebnistabelle des 2² Versuchsplans mit RMCE IgG1 λ Klon 2

Response	x1	x2	x1x2
IVC	32	31	-3
mAK	0,7	0,0	0,0
q _P	0,024	-0,048	0,024

RMCE IgG2 Klon 1 wurde unter Verwendung der selben Masterzelllinie wie die RMCE IgG1 λ Klone generiert, stammt jedoch aus einem unabhängigen Targetingexperiment und exprimiert einen murinen IgG2a Antikörper. Die Ergebnisse des voll-faktorierten Versuches sind in Tabelle 3-14 dargestellt. Die erreichten kumulierten Zellstunden liegen zwischen 222 - 263x10⁹ c h, wobei der Maximalwert bei der Variation der Faktoren auf Stufe +1 erzielt wurde. Nach 216 h konnten zwischen 2,1 -2,3 mg Antikörper bei spezifischen Produktivitäten von 0,168 – 0,216 pg/(c x d)⁻¹ akkumuliert werden. Die beobachteten Ergebnisse des mIgG2a exprimierenden RMCE Klons entsprechen den IgG1 λ Klonen 1 und 2.

Tabelle 3-14: Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 216 h) für RMCE mIgG12a Klon 1

c _{XV}	V _{feed}	Ergebnisse		
x1	x2	IVC [10 ⁹ c h]	mAK [mg]	q _P [pg (c x d) ⁻¹]
-1	-1	222	2,1	0,192
1	-1	227	2,2	0,216
-1	1	221	2,1	0,168
1	1	263	2,3	0,216

Anhand der in Tabelle 3-14 vorgestellten Ergebnisse erfolgte die Berechnung der Kontraste für die jeweiligen Hauptfaktoren sowie deren Interaktionen (Tabelle 3-15). Auf die Antwortgröße kumulierte Zellstunden hatten alle Hauptfaktoren sowie die Faktorinteraktion einen vergleichbaren positiven Einfluss und führten zu einer durchschnittlichen Erhöhung des IVC um etwa 20x10⁹ c h. Im Vergleich zu den zuvor betrachteten RMCE Klonen ist auffallend, dass auch die Faktorinteraktion einen ähnlich hohen Einfluss hat. Da zur Vergleichbarkeit der Klone die Auswertung zum Zeitpunkt t=216 h vorgenommen wurde, und RMCE IgG2 Klon 1 in allen Kultivierungen im Vergleich zu den anderen Klonen eine leichte

Verzögerungsphase zeigte, könnte dies die Kontraste verfälscht haben. Auf die akkumulierte Antikörpermasse hatten alle Faktoren und Faktorinteraktion einen vergleichbar geringfügig positiven Einfluss. Eine hohe Inokulationsdichte bewirkte bei RMCE IgG2a Klon 1 ebenso wie bei den zuvor betrachteten RMCE Klonen eine leichte Steigerung der spezifischen Produktivität um etwa $0,036 \text{ pg}/(\text{c} \times \text{d})^{-1}$. Darüber hinaus wirkte sich ein hohes Gesamtfeedvolumen geringfügig negativ auf die spezifische Produktivität aus. Dies konnte auch bei den RMCE IgG1 λ Klonen beobachtet werden.

Tabelle 3-15: Kontrastergebnistabelle des 2² Versuchsplans mit RMCE mIgG2a Klon 1

Response	x1	x2	x1x2
IVC	24	18	19
mAK	0,2	0,1	0,1
q_P	0,036	-0,012	0,012

Da bei der Darstellung der IVC nach 216 h, in der späten Absterbephase der Zellen, zwischen den Stufen +1 und -1 des Faktors Inokulationszelldichte nur geringfügige Unterschiede zu beobachten waren, ist dieser Faktor nochmals nach 118 h vergleichend für die Klone in Abbildung 3-30 A dargestellt. In Anlehnung an die in Tabelle 3-9 dargestellten Versuchsnummern beschreibt Abbildung 3-30 A die IVC zum Zeitpunkt der maximalen Zelldichte (118 h) für jeden RMCE Klon und die jeweiligen Versuchsnummern. Bei Versuchsnummer 1 und 2 erfolgte die Inokulation mit $5,4 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ (-1) und bei 3 und 4 mit einer Zelldichte von $12,6 \times 10^5 \text{ c mL}^{-1}$ (+1). Anhand der Darstellung ist zu erkennen, dass eine höhere Inokulationszelldichte bei allen RMCE Klonen zu höheren kumulierten Zellstunden in kürzerer Kultivierungsdauer führte. Die erhöhte Animpfdichte resultierte in um durchschnittlich $50 \times 10^9 \text{ c h}$ gesteigerten IVCs. Dies ist insbesondere bei Vorkulturen von Produktionskultivierungen von Vorteil, bei welchen in Seed-Trains Zellmasse generiert wird. Über eine höhere Inokulationszelldichte kann demnach die benötigte Zeit für den Seed-Train reduziert werden (Read et al. 2010). In Abbildung 3-30 B sind die spezifischen Produktivitäten der untersuchten RMCE Klone für die jeweiligen Versuchsnummern vergleichend dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die RMCE Klone unabhängig von dem jeweilig sekretierten Antikörper, bei gleichen Faktorvariationen, vergleichbare spezifische Produktivitäten aufweisen. Ferner zeigte sich, dass innerhalb des überprüften Versuchsraums die spezifische Produktivität nur geringfügig variiert. Bei Versuchsnummer 3 und 4 ist eine leichte Tendenz zu geringeren spezifischen Produktivitäten zu erkennen. Um

jedoch signifikante Unterschiede identifizieren zu können, sollte der Versuchsplan wiederholt werden, um die Prozessvarianz bestimmen zu können.

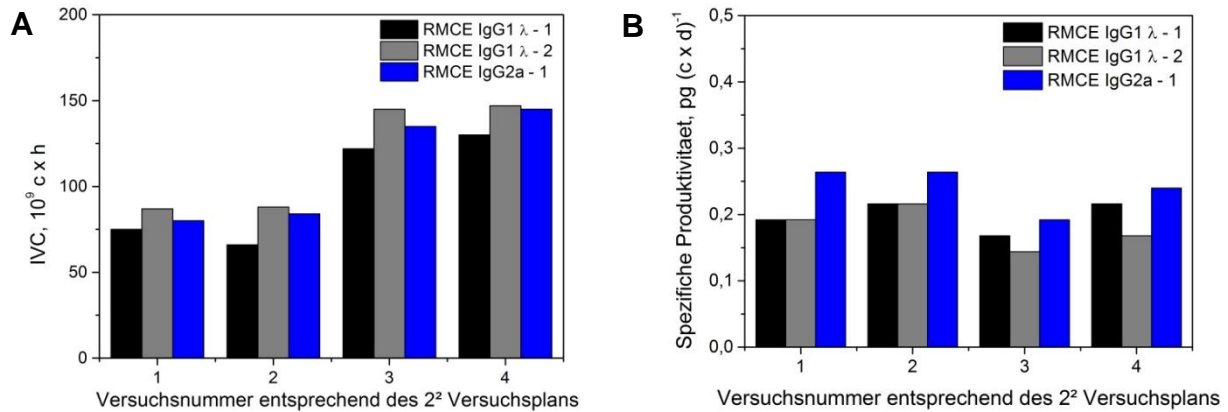


Abbildung 3-30: Vergleichende Darstellung der IVC und der spezifischen Produktivität aller untersuchten RMCE Klone für die laut Tabelle 3-9 jeweiligen Versuchsnummern

(schwarz) – RMCE IgG1 λ Klon 1, (grau) - RMCE IgG1 λ Klon 2, (blau) – RMCE IgG2 Klon1

A: Vergleichende Darstellung des IVC der RMCE Klone nach 118 h für die jeweiligen Versuchsnummern. Eine erhöhte Inokulationszellkonzentration führte bei allen Klone zum Erreichen höherer IVC-Werte bei gleicher Kultivierungsdauer im Vergleich zur niedrigen Animpfdichte. **B:** Vergleichende Darstellung der spezifischen Produktivität der RMCE Klone nach 118 h für die jeweiligen Versuchsnummern. Bei gleicher Faktorvariation konnten für die Klone sehr vergleichbare Werte beobachtet werden. Innerhalb des überprüften Versuchsraumes variiert die spezifische Produktivität nur geringfügig.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass RMCE-Klone, welche von der gleichen parental Masterzelllinie stammen, jedoch in unterschiedlichen RMCE-Versuchen generiert wurden und verschiedene vollständige Antikörper exprimieren, vergleichbare Wachstums- und Produktionseigenschaften aufweisen. Es konnten vergleichbare positive und negative Faktoreinflüsse für die RMCE-Subklone nachgewiesen werden. Mit diesen Voraussetzungen ließe sich eine Zelllinien-Plattform erfolgreich optimieren. Jedoch konnten mit den dargestellten RMCE Klone im Fed-Batch maximal 25 mg L⁻¹ Antikörper im Zellkulturüberstand akkumuliert werden. Um diese Klone für die kommerzielle Antikörperproduktion nutzbar zu machen, müsste der Titer wenigstens 40-fach gesteigert werden. Rehberger et al. konnten mit einer RMCE-basierten Zelllinie, welche einen IgG1 Modellantikörper exprimierte, im Verlauf einer mehr als 20-tägigen Fed-Batch Kultivierung Antikörpertiter von bis zu 800-900 mg L⁻¹ erzielen. Ferner wies die Zelllinie in zwei unabhängigen Fed-Batch Kultivierungen im Schüttelkolben eine geringe Variabilität hinsichtlich ihrer Wachstums- und Produktionseigenschaften auf (Rehberger et al. 2013). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu bestätigen, dass sich Zelllinien, deren Transgen von einem definierten chromosomalen Locus exprimiert wird, deutlich vergleichbarer in einem abgegrenzten Versuchsraum verhalten. Bestätigen weiterführende

Versuche die bisherigen Ergebnisse, wäre es von erheblichem Vorteil solche Zelllinien in Plattformprozessen einzusetzen.

3.5 Ausblick

Die Verwendung lentiviraler Vektoren generierte stabile RMCE-kompatible Masterzelllinien, welche ohne Einsatz selektiver Agentien mittels FACS angereichert werden konnten. Auch für den nachfolgenden Kassettenaustausch war kein Selektionsdruck erforderlich. Ferner verhielten sich die Masterzelllinien über 10 Wochen stabil hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität sowie ihrer Wachstumsrate/Verdopplungszeit. Um jedoch die vergleichsweise geringen Antikörpertiter von maximal 25 mg L^{-1} in Fed-Batch Versuchen zu steigern, wäre es sinnvoll eine höhere Anzahl von Masterzelllinien hinsichtlich ihrer Expressionsstärke zu screenen. Ferner zeigte die vorliegende Arbeit, dass die Fluoreszenzintensität des Reporterproteins GFP nicht mit der Expressionsstärke der sekretierten Zielproteine korreliert. Daher sollte der Einsatz alternativer Reporterproteine (sekretierte glykosylierte Modellproteine) für die Generation der Masterzelllinien geprüft werden, um höhere Titer zu generieren.

Um darüber hinaus die erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Eignung bestimmter Loci für die Expression bestimmter Proteine zu verifizieren, sollten weitere Kassettenaustauschversuche mit verschiedenen rekombinanten Proteinen durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die Charakterisierung der RMCE-Subklone in Fed-Batch Kultivierungen wäre es ferner zunächst sinnvoll die Anzahl der zu untersuchenden Klone zu erhöhen. Durch einen höheren Versuchsumfang ließe sich die Prozessvarianz bestimmen, wodurch auch bessere Aussagen zur statistischen Signifikanz der beobachteten Effekte gemacht werden können. Ebenso sollten neben der Erhöhung des Stichprobenumfangs weitere Targetingsubklone unabhängiger RMCE-Versuche untersucht werden, um zu prüfen, inwiefern sich die erzielten Ergebnisse reproduzieren lassen. Weiterhin ist nachzuweisen, ob diese Resultate auch mit der Expression anderer rekombinanter Proteine zu verifizieren sind. Grundsätzlich stellt sich überdies die Frage, ob sich die hier vorgestellten Ergebnisse auch auf einen RMCE-Hochproduzentenklon übertragen lassen.

Die vergleichende Untersuchung der Wachstums- und Produktionseigenschaften von Zelllinien in Fed-Batch Kultivierungen, welche unter Verwendung des Kassettenaustauschsystems generiert wurden und verschiedene vollständige Antikörper exprimieren, ist gegenwärtig nicht in der Literatur beschrieben. Der Vergleich von RMCE Zelllinien untereinander wie auch mit anderen Produktionssystemen ist jedoch von außerordentlichem Nutzen, da die Voraussagbarkeit eines Kultivierungsprozesses eine signifikante Kosten- und Zeitersparnis bei der Produktion von therapeutisch nutzbaren Proteinen erzielen kann.

Um innovative Zelllinienentwicklungssysteme jedoch hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit für eine mögliche kommerzielle Verwendung hinreichend zu charakterisieren, ist es notwendig diese Klone in herunter-skalierten Produktionssystemen zu prüfen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Antibiotika

Tabelle 4-1: Antibiotika

Antibiotika	Stockkonzentration	Hersteller
Ampicillin	50 mg mL ⁻¹	Roth
Gentamycin	50 mg mL ⁻¹	Calbiochem

4.1.2 Antikörper

Tabelle 4-2: Antikörper

Antikörper	Konjugat	Hersteller
Rabbit-anti-mouse IgG	FITC	Jackson ImmunoResearch
Goat-anti-mouse IgG (Fc)	HRP	Genway
Goat-anti-mouse IgG (Fc)	HRP	Southern Biotech
Donkey-anti-human IgG (H+L)	HRP	Jackson ImmunoResearch
Goat-anti-mouse IgG (H+L)		Antikörper-online
Goat-anti-mouse IgG (Fc)		GeneTex
Mouse-anti-human IgG1		Life Technologies
Mouse IgG2a, κ, purified Protein		BioLegend
Human IgG1 κ, purified Protein		Sigma-Aldrich

4.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 4-3: Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
<i>E.coli</i> TOP10	Invitrogen

4.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4-4: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
2-Hydroxyethyl Agarose	A9414	Sigma-Aldrich
Agarose	11404	Serva
Agar	214010	Difco/ Bacto
Calciumchlorid Dihydrat	1.02382.1000	Merck
CASYBlue	05651760001	Innovatis
CASYClean	05651786001	Innovatis
CASYTon	05651808001	Innovatis
Dimethylsulfoxid	D2650-5X10ML	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	1.06580.1000	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	1.06575.1000	Merck
Ethanol 99,8%	9065.5	Roth
Ethanol, 96%, vergällt	T171.3	Roth
Ethidiumbromid	21251.01	Serva
EDTA	8418	Merck
Glucose	G8270-5KG	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	212750	Difco/ Bacto
HEPES	H4034-1KG	Sigma-Aldrich
Isopropanol	8067	Baker
Kaliumacetat	P1190	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	HN02.3	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.1	Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	2189.1	Roth
Methionin Sulfoximin	M5379-1g	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	A135.2	Roth
Natriumchlorid	3957.1	Roth
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	1.06346.0500	Merck
Natriumhydrogencarbonat	6885.1	Roth
Natriumhydroxid	6771.2	Roth
o-Phenyldiamindihydrochlorid	P1526-10G	Sigma-Aldrich
Phosphat-gepufferte Saline	L1820, H15-002	Biochrom, PAA
Polyethylenimin (linear)	23966-2	Polysciences Europe
Rinderserumalbumin (BSA)	K35-002, A7030	GE Healthcare,

		PAA, Sigma- Aldrich
Salzsäure, 37%-ig	4625.1	Roth
Schwefelsäure	1.00731.1000	Merck
T4 Ligase Puffer		Fermentas
TRIS-Acetat-EDTA Puffer (50x)	CL86.1	Roth
Trinatrium-Citrat-Dihydrat	3580.1	Roth
Tris Base	055K5426	Sigma-Aldrich
Trypton	211705	Difco/ Bacto
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	95302	Sigma-Aldrich

4.1.5 Enzyme und Reaktionspuffer

Tabelle 4-5: Enzyme und Reaktionspuffer

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
Agel	FD1464	Fermentas
Alkalische Phosphatase	EF0651	Fermentas
BamHI	FD0055	Fermentas
BglII	FD0083	Fermentas
BstXI	FD1024	Fermentas
EcoRV	FD0304	Fermentas
FD Buffer	-	Fermentas
FD green Buffer	-	Fermentas
KpnI	FD0524	Fermentas
NaeI	FD1524	Fermentas
NcoI	FD0574	Fermentas
NotI	FD0594	Fermentas
PacI	FD2204	Fermentas
PmeI	FD1344	Fermentas
PmlI	FD0364	Fermentas
Proteinase K	7528.2	Roth
RNase	EN 0531	Fermentas
SbfI	FD1194	Fermentas
ScaI	FD0434	Fermentas
SexAI	FD2114	Fermentas
SfiI	FD1824	Fermentas

Smal	FD0664	Fermentas
Swal	FD1244	Fermentas
T4 DNA Polymerase	EP0062	Fermentas
T4 Ligase	EL0011	Fermentas
Xbal	FD0684	Fermentas
Xhol	FD0694	Fermentas

4.1.6 Geräte

Tabelle 4-6: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Biochemischer Analysator	YSI Analysator Modell 2700 SELECT	YSI Life Sciences
Dispenser	Multipetter Plus	Eppendorf
Durchflusszytometer	Guava EasyCyte Flow Cytometry System	Millipore
FACS	FACS Aria II SORP MoFlo Optical Bench	BD Biosciences Cytomation
Elektrophorese- Netzteil	PS300-B	Hoefer
Elektrophorese- kammern	Blue Marine 100	Serva
Geldokumentation	Gel iX Imager	Intas
Heizblöcke	Thermomixer 5436 TMIX	Eppendorf analytic Jena
HPLC-System	Agilent HPLC Series 1100/1200	Agilent
Inkubator	Cytoperm 2	Heraeus
Inkubationsschüttler	ISF1-X Multitron 50	Adolf Kühner AG Infors HT
Mikroskop	Nikon TMS Axiovert 200S	Nikon Carl Zeiss
Mikrotiterplattenleser	SpektraMax 190	Molecular Devices
Nukleoporator	Nucleofector II DEvice	LONZA
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research Plus Eppendorf Xplorer Plus	Eppendorf

Pipettierhilfe	PipetBoy	IBS integra bioscience
Sicherheitswerkbank	Heraeus-Plus HS12	Heraeus
	Heraeus-Plus HS 15	
	Maxisafe 2020	Thermo Scientific
Thermozykler	C 1000 Thermal Cyclers	Bio-Rad
Zellzählgerät	Cedex HiRes	Roche Innovatis
	CASY Cell Counter and Analyzer	
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus
	MIKRO 200R	Andreas Hettich GmbH
	5415D/5810R	Eppendorf

4.1.7 Medien und Zusätze

Tabelle 4-7: Medien und Zusätze

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
CD-CHO	10743-029	Life Technologies
FCS	A15-511	PAA
Glutmax	A 12860-01	Life Technologies
Ham's F12	F0815, E15-016	Biochrom, PAA
HT Supplement	11067-030	Life Technologies
DMEM	FG0415	Biochrom

4.1.8 Oligonukleotide

Tabelle 4-8: Oligonukleotide

Nr.	Name	Länge, bp	Sequenz (5' → 3')
1	CMV-TOPO fwd	21	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
2	EF1for2	20	GTTTCATTCTCAAGCCTCAGA
3	EMCV2	20	GCCACGTTGTGAGTTGGATA
4	LC copt fwd_1	20	CTTCTCTGGGCGAGACAGTG
5	M13 fwd	16	GTAAAACGACGGCCAG
6	Neorev2	22	GTCATAGCCGAATAGCCTCTCC
7	pCleanseqfwd	20	CCGAAGTTCCTATTCTCTAG
8	pEE12.4seq1fwd	21	CCACCAGACATAATAGCTGAC
9	PGK2fwd	20	CTAGTCTCGTGACAGATGGAC
10	TOPO-Control-rev-2	21	GAACTTCACTTCAGGGTCCTC

4.1.9 Reaktionskits

Tabelle 4-9: Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
AxyPrep DNA Gel Extraction Kit	Axygen
peqGold Gel Extraction Kit	PEQLAB
peqGold Tissue DNA Mini Kit	Peqlab
Nucleofector Kit R	Amaxa
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Phoenix MaxiPrep Kit	MP Biomedicals
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen

4.1.10 Software

- Guava Express Software
- Clone Manager Professional 9
- Cytosoft 3.6.1
- Chromas
- Origin 8.1 SR1

4.1.11 Vektoren

Tabelle 4-10: Vektoren

Vektor	Charakterisierung	Ursprung
pFlpe	CMV-Promotor, verbesserte, thermostabile Flp von <i>S.cerevisiae</i>	HZI D.Wirth
pLP1	CMV-Promotor, Intron, HIV-gag, HIV-pol, RRE, pA, pUC ori, ampR	HZI D.Wirth
pLP2	RSV-Promotor, HIV-rev, ampR	HZI D.Wirth
pVSV-G	CMV-Promotor, Intron, VSV-G, pA, ampR	HZI D. Wirth
pEE12.4-LC-HC	hCMV-MIE, 5'UTR, Intron A, Ig leader, G8.8 VL, m κ CR, SV40 pA, hCMV-MIE, 5'UTR, Intron A, Ig leader, G8.8 VH, m IgG2a CR, ampR, SV40E, GS cDNA, SV40 Intron, SV40 pA	pEE12.4 LONZA GS Vektor Klonierung durch J. Dietrich
pZLE57	RSV, 5'-LTR (mit HIV-1 R und U5 Region), RRE, cPpt, FRT-wt, EF1α,	Fraunhofer ITEM, Klonierung

	eGFP, FRT-F5, Dneo, PRE (Hepatitis B PRE), 3'LTR (mit HIV-1 R und U5 Region, U3 deletiert → SIN/LTR), ampR	E.Bludau
pEGFP	CMV, eGFP, kanaR	HZI D.Wirth
pTAR-FL-RFP		
pTARPGK-EF1 α -LC-EF1 α -HC	FRT-wt, EF1 α , Ig leader, G8.8 VL, m κ CR, pA, EF1 α , Ig leader, G8.8 VH, m IgG2a CR, pA, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung C.Schwager
pTAR-7	FRT-wt, EF1 α , Ig leader, SS, PP, hutPA, 6xHis, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung P.Biechele
pTAR-9	FRT-wt, EF1 α , Ig leader, G8.8 VL, m κ CR (codon optimiert auf CHO), pA, EF1 α , Ig leader, G8.8 VH, m IgG2a CR (codon optimiert auf CHO), pA, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung E. Bludau
pTAR-10	FRT-wt, EF1 α , scFv-Fc, pA, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung L.Peprah
pTAR-11	FRT-wt, EF1 α , Ig leader, m VL hu λ CL, pA, EF1 α , Ig leader, m VH hu IgG1 CH, pA, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung L.Peprah
pTAR-12	FRT-wt, EF1 α , Ig leader, m VL hu κ CL, pA, EF1 α , Ig leader, m VH hu IgG1 CH, pA, PGK, ATG, FRT-F5, ampR, pUC ori	Fraunhofer ITEM, Klonierung L.Peprah

4.1.12 Zelllinien

Tabelle 4-11: Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
CHO-S	Invitrogen
HEK293T	

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wird ein Schüttelkolben mit 500 mL LB-Medium mit 50 μL einer *E.coli* TOP10 Übernacht-Kultur inokuliert. Nach ein- bis zweistündiger Inkubation bei 37°C und 120 rpm erfolgt die Bestimmung der OD bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Zellen werden bei 3220xg für 15 min bei 4 °C pelletiert, wenn eine OD von 0,5 – 0,6 erreicht ist. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 100 mL gekühlter 100 mM MgCl_2 Lösung durch Pipettieren resuspendiert. Nach 20-30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 3220xg. Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgt mit 10 mL gekühlter 100 mM CaCl_2 Lösung mit 15 % Glycerin. Je 50 μL Bakteriensuspension werden in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten entsprechend ihrer Größe wird das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Anhand der Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld zum positiven Pol können Rückschlüsse hinsichtlich Größe und Struktur gezogen werden.

<i>1%-iges Agarosegel</i>	4 g Agarose, 400 mL 1 x TAE Puffer, Lösen durch Aufkochen in der Mikrowelle
<i>Ethidiumbromid-Bad</i>	200 μL Ethidiumbromid (10 mg mL^{-1}) in 2 L MilliQ H_2O
<i>TAE-Puffer</i>	40 mL 50 x TAE-Puffer in 2 L MilliQ H_2O

Das durch Aufkochen verflüssigte Agarosegel wird nach Polymerisation in eine Elektrophoresekammer, welche mit TAE-Puffer gefüllt ist, überführt. Bei Verwendung des grünen FD-Puffer, welcher bereits Ladepuffer enthält, können die Proben direkt auf das Gel aufgetragen werden. Alle übrigen Proben werden mit 6x Ladepuffer (Loading Dye) vermischt und neben einen Größenmarker (DNA-Ladder) in die Geltaschen pipettiert, welcher der Größenabschätzung der Fragmente dient. Nach etwa 40 min bei 120 V wird das Agarosegel für 15-30 min im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden anschließend mit Hilfe des Intas Gel iX Imagers unter UV-Licht (312 nm) visualisiert und digital abgespeichert.

Analytisches Agarosegel

Für die Konzentrationsbestimmung werden 5 µL Plasmid DNA mit 1 µL Ladebuffer (Loading Buffer) vermischt und mit einem DNA-Marker (DNA-Ladder) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgt anhand des Vergleichs mit der Bandenstärke der DNA-Marker.

Präparatives Agarosegel

Der präparative Restriktionsverdau wird auf zwei separate Geltaschen (5 µL und 45 µL) verteilt und mit dem DNA-Marker auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Anschließend wird nur jener Teil vom Agarosegel, auf welchem der Marker sowie die 5 µL des Restriktionsansatzes aufgetragen sind, im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Zielbande wird im gefärbten Gel ausgeschnitten und als Vorlage für das ungefärbte Agarosegel genutzt, auf welchem der restliche Verdau elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die isolierten Zielbanden werden anschließend mittels Gelextraktion aufgereinigt.

4.2.1.3 DNA-Spaltung mittels Restriktionsenzymen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA in definierte Fragmente erfolgt mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 bp und schneiden die DNA meist innerhalb dieser. Dabei entstehen DNA-Fragmente mit glatten (blunt) oder 3' / 5' überhängenden (sticky) Enden.

Analytische DNA-Restriktion

Zur Überprüfung rekombinanter Plasmide erfolgt ein Kontrollverdau mit definierten Restriktionsenzymen, um bestimmte Fragmentgrößen zu generieren. Die Plasmid DNA wird zuvor mit Hilfe einer Mini-Plasmidpräparation gewonnen.

Die Reaktion wird laut folgendem Ansatz durchgeführt:

Tabelle 4-12: Reaktionsansatz für die analytische DNA-Restriktion

Reagenz	Volumen [µL]
Plasmid DNA	5 µL
10 x FD-Puffer grün	1 µL
Enzym	0,5 µL
H ₂ O	3,5 µL
Total	10 µL

Der Reaktionsansatz wird für 40 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

Präparative DNA-Restriktion

Um größere Mengen definierter DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte zu generieren, erfolgt der präparative DNA-Verdau gemäß folgendem Ansatz:

Tabelle 4-13: Reaktionsansatz für die präparative DNA-Restriktion

Reagenz	Volumen [μL]
Plasmid DNA	5 μg
10 x FD-Puffer grün	5 μL
Enzym	2,5-5 μL
H ₂ O	x μL
Total	50 μL

Der Reaktionsansatz wird für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.2.1.4 Glätten überhängender Enden an DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase können 3' oder 5' überhängende Enden von DNA-Fragmenten, welche nach dem Verdau mit Restriktionsendonukleasen generiert wurden, geglättet (blunten) werden. Neben der Polymerase-Aktivität, welche die 5' - 3' Synthese von DNA katalysiert, besitzt die T4-DNA-Polymerase ferner eine 3' – 5' Exonuklease-Aktivität, welche dem Abbau von 3'- Überhängen dient.

Das Glätten überhängender Enden erfolgt nach der Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel. Das Blunten wird nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Tabelle 4-14: Reaktionsansatz für das Glätten überhängender Ende an DNA-Fragmenten

Reagenz	Volumen [μL]
DNA (aus Gelelution)	60 μL
10 x FD-Puffer	10 μL
10 mM dNTPs	1 μL
T4-DNA-Polymerase	2 μL
H ₂ O	27 μL
Total	100 μL

Nach 30 min Inkubation bei RT wird die Reaktion bei 75°C für 10 min abgestoppt.

4.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation die Rezirkulierung des Vektors zu vermeiden, werden die 5'-Phosphat-Enden mittels Alkalischer Phosphatase entfernt. Die Dephosphorylierung des Vektors wird entsprechend folgendem Ansatz durchgeführt:

Tabelle 4-15: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Reagenz	Volumen [μL]
DNA (von Blunten)	100 μL
10 x FastAP-Puffer	14 μL
FastAP	10 μL
H ₂ O	16 μL
Total	140 μL

Der Reaktionsansatz wird für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 75°C für 5 min hitzeinaktiviert.

4.2.1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel erfolgt mittels AxyPrep DNA Gel Extraction Kit oder peqGold Gel Extraction Kit laut Anleitung. Die Elution erfolgte jeweils in 30 μL MiliQ H₂O.

4.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden die Enden des Vektorrückgrats und des zu insertierenden DNA-Fragments zuvor geglättet. Die Reaktion wird mit einem molaren Verhältnis von 10:1 (Insert: Vektor) durchgeführt. Die benötigte Menge an Insert wird laut folgender Formel kalkuliert:

$$\text{Insert}[\text{ng}] = \frac{\text{Vektor}[\text{ng}] \times \text{Insert}[\text{bp}] \times 10}{\text{Vektor}[\text{bp}]}$$

Für die Ligation wird folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tabelle 4-16: Reaktionsansatz für die Ligation

Reagenz	Volumen [μL]
Vektor DNA	10 ng
Insert DNA	s.o.
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
H ₂ O	x μL
Total	20 μL

Der Reaktionsansatz wird bei RT über Nacht inkubiert.

4.2.1.8 Transformation

Für die Transformation von *E.coli* werden entweder 5 μL eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA in 50 μL chemo-kompetenten TOP10 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30-50 s bei 42 °C erfolgt eine nochmalige Inkubation für 2 min auf Eis. Anschließend wird der Transformationsansatz mit 950 μL LB-Medium ohne Antibiotika vermischt und bei 37°C (oder 30°C um Rekombination zu vermindern) 500 rpm für eine Stunde auf dem Thermomixer kultiviert. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf LB-Agarplatten mit 0,1 mg mL⁻¹ Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C (30°C) inkubiert.

4.2.1.9 Plasmidpräparation

<i>TE-Puffer</i>	20 mM EDTA, 50 mM Tris, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNase A, pH 8
<i>NaOH/SDS-Lösung</i>	0,2 M NaOH, 1% SDS
<i>Acetatpuffer</i>	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Analytische-Plasmidpräparation

Für die analytische Plasmidpräparation werden 2 mL LB-Medium versetzt mit 1:500 Ampicillin, mit den zu analysierenden Bakterienklonen inokuliert und über Nacht bei 150 rpm und 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wird am folgenden Tag für 1 min bei 15000xg pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 100 μL gekühltem TE-Puffer resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μL NaOH/SDS-Lösung, 3-4-maligem Invertieren des Reaktionsgefäßes und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min wird das Lysat mit 150 μL gekühltem Acetatpuffer neutralisiert und für 5 min inkubiert. Anschließend werden die präzipitierten Proteine für 5 min bei 15000xg und 4°C pelletiert, die im Überstand befindliche DNA mit 1 ml 70% Ethanol gefällt und erneut zentrifugiert. Das

DNA-Pellet wird bei RT getrocknet, in 50 μL MiliQ H₂O resuspendiert und für 10 min bei 50°C auf dem Thermomixer gelöst.

Präparative Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation im präparativen Maßstab erfolgt mittels Phoenix MaxiPrepKit. Hierfür werden 200 mL LB-Medium versetzt mit 400 μL Ampicillin, mit Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37°C und 125 rpm kultiviert. Die Bakteriensuspension wird am folgenden Tag bei 3220xg für 20 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die weitere Isolierung der Plasmid-DNA wird anschließend laut Anleitung durchgeführt. Die Elution erfolgt in 300 – 500 μL MiliQ H₂O.

4.2.1.10 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgt mittels peqGold Tissue DNA Mini Kit laut Anleitung für eukaryotische Zellen. Die DNA wird mit 100 μL MiliQ H₂O eluiert.

4.2.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration sowie Reinheit von DNA erfolgt mit Hilfe eines Photometers, basierend auf der Annahme, dass die Absorption doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ $A_{260\text{nm}} = 1$ ist. Die Probe wird bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, vermessen und die Konzentration entsprechend folgender Formel bestimmt:

$$c[\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}] = A_{260} \times VF \times 0,05 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$$

A_{260}	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
VF	Verdünnungsfaktor

Ferner kann über die Vermessung der Probe bei 280 nm die Kontamination mit Proteinen abgeschätzt werden. Ein Quotient aus $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} < 1,8$ deutet auf Proteinkontamination hin.

4.2.1.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA Proben erfolgte in der Arbeitsgruppe Genomanalytik des HZI nach der Dye Terminator Methode, bei welcher die ddNTPs fluoreszenzmarkiert werden. Die dabei erhaltenen ABI Chromatogramme werden mit Hilfe der Programme CloneManager sowie Chromas analysiert und mit der Zielsequenz abgeglichen.

4.2.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für den Nachweis des korrekten Kassettenaustausches auf DNA Ebene wird eine PCR durchgeführt. Dabei bindet der verwendete Rückwärts-Primer hinter der FRT-F5 Sequenz innerhalb des Tagging-Vektors und der Vorwärts-Primer innerhalb der Targeting-Kassette. Bei korrektem Kassettenaustausch wird mit Hilfe der PCR ein 380 bp großes Fragment generiert. Die PCR wird mit isolierter genomischer DNA aus Säugerzellen und laut folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

Tabelle 4-17: Reaktionsansatz für PCR

Reagenz	Volumen [μL]
2x PCR MasterMix	25
Vorwärts-Primer	1
Rückwärts-Primer	1
50 mM MgCl_2	3
gDNA	2
H_2O	18
Total	50

Bei Kassettenaustauschreaktionen mit Vektor pTAR FL RFP werden das folgende PCR-Programm und entsprechende Primer genutzt:

Vorwärts-Primer	EMCV2
Rückwärts-Primer	Neorev2

Tabelle 4-18: PCR-Program bei Verwendung der Primer EMCV2 und Neorev2

Bezeichnung	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10 min	
Denaturierung	95	40 s	
Hybridisierung	58	40 s	35
Verlängerung	72	30 s	
Finale Verlängerung	72	5 min	

Bei Kassettenaustauschreaktionen mit pTAR Vektoren für die Antikörper und tPA Expression werden das folgende PCR-Programm und entsprechende Primer genutzt:

Vorwärts-Primer	PGK2fwd
Rückwärts-Primer	Neorev2

Tabelle 4-19: PCR Programm bei Verwendung der Primer PGK2fwd und Neorev2

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	40 s	
Hybridisierung	61	30 s	35
Verlängerung	72	50 s	
Finale Verlängerung	72	5 min	

4.2.2 Zellkulturmethoden

4.2.2.1 Revitalisierung kryokonservierter Zellen

Das Auftauen der Zellen im Kryovial erfolgt bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wird die Zellsuspension in Kulturmedium überführt und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit vorinkubiertem Kulturmedium resuspendiert und in entsprechende Kulturgefäße überführt.

4.2.2.2 Kultivierung von CHO Suspensionszellen

Kulturmedium CD-CHO, 8 mM Glutamax, 1x HT, 1x Fe-Citrat

Über die Subklonierung der parentalen CHO-Zelllinie, welche aus der Eierstock-Biopsy eines adulten chinesischen Hamsters hervorgeht, wurde die CHO-K1 Zelllinie generiert. Die CHO-S Zelllinie wurde über die erneute Subklonierung und Selektion nach den Parametern Wachstum in Suspension und serumfreiem Medium sowie Transfektionseffizienz isoliert.

Die Suspensionszelllinie wird routinemäßig aller 3-4 Tage auf $2-3 \times 10^5$ c mL⁻¹ passagiert. Die Kultivierung in 50 mL Mikrobioreaktoren erfolgt bei 150 rpm, in Schüttelkolben bei 125 rpm, bei 37°C und 5% CO₂.

4.2.2.3 Kultivierung adhärenter HEK293T Zellen

Kulturmedium DMEM, 8 mM Glutamax

Die Zelllinie HEK293T stammt von der HEK293 Zelllinie, eine humane embryonale Nierenzelllinie, welche durch die Transduktion mit Adenovirus Typ 5 generiert wurde. HEK293T Zellen exprimieren zusätzlich das SV40 T-Antigen.

Die adhärenente Zelllinie wird routinemäßig in geeigneten Kulturgefäßen kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Dabei wird zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Nach 5 min Inkubation mit TrypZean werden die abgelösten Zellen mit Kulturmedium resuspendiert. Das entsprechende Volumen an Zellsuspension zum Passagieren wird mit Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellen werden statisch im CO₂-Inkubator bei 37°C und 8% CO₂ kultiviert.

4.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt entweder mit dem CASY Modell TCC oder mittels Cedex HiRes.

CASY

Die automatisierte Zellzahlbestimmung mittels CASY TTC beruht auf dem Stromausschlussverfahren, welches die Permeabilität der Zellmembran misst.

Hierzu werden 50 µL Zellsuspension in 10 mL CASY-Ton Elektrolytlösung verdünnt und anschließend bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare, an welcher eine Spannung angelegt wird, gesaugt. Die dabei auftretende Widerstandserhöhung, aufgrund der nicht-leitenden Eigenschaften von Zellen, ist proportional zur Fläche der Zellen. Während vitale Zellen mit intakter Zellmembran elektrische Isolatoren sind, ist bei toten Zellen mit permeabilisierter Membran der zytoplasmatische Raum leitfähig. Lebende Zellen werden somit mit ihrer tatsächlichen Größe detektiert. Bei toten Zellen wird dagegen das Zellmatrixvolumen, welches etwa der Größe des Zellkerns entspricht, gemessen.

Cedex HiRes

Das Cedex HiRes dient der quantitativen, optischen Detektion lebender und toter Zellen in Einzelzell-Suspensionskulturen. Der Verlust der Viabilität von Zellen ist meist mit der Permeabilität der Zellmembran verbunden. Bei der Vermischung der Zellsuspension mit einer trypanblauhaltigen, isotonischen Lösung kann der Farbstoff bei toten Zellen in das Zytoplasma eindringen und diese blau anfärben. Lebende Zellen sind hingegen in der Lage diesen Farbstoff aktiv wieder auszuschleusen. Die mit der Färbelösung gemischte Zellsuspension wird automatisiert mit Hilfe eines Scanners ausgezählt.

Für die Messung von Zellsuspensionen wird ein Probevolumen von 300 µL benötigt, bei Zelldichten größer 1×10^7 c mL⁻¹ wird die Probe in PBS Puffer vorverdünnt. Die automatisierte Zellzählung wird unter Verwendung des Standard-Zelltyps (12 µm Zelldurchmesser) durchgeführt, dabei werden sechs Bilder für die Auswertung genutzt.

4.2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium 92,5% Kulturmedium, 7,5% DMSO

Zur Kryokonservierung werden Zellen, welche sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, genutzt. Je Kryovial werden 1×10^7 Zellen in 1 mL Einfriermedium konserviert. Hierfür werden die Zellen bei 200xg für 5 min pelletiert und in der entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert. Die Kryovials werden über Nacht in einem Einfrierbehälter, welcher ein Abkühlen der Zellen von 1°C pro Minute gewährleistet, bei -70°C inkubiert, bevor sie dauerhaft in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs gelagert werden.

4.2.2.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des Durchflusszytometers Guava EasyCyte erfolgt die Titerbestimmung GFP transduzierender Lentiviren sowie die Analyse von Zellpoolen und -klonen hinsichtlich ihrer GFP-Fluoreszenz. Für die durchflusszytometrische Analyse werden adhärente Zellen zuvor trypsiniert, in PBS gewaschen und für die Messung auf etwa 5×10^5 c mL⁻¹ verdünnt. Während das Vorwärtsstreulicht Auskunft über die Partikelgröße gibt, kann anhand des Seitwärtsstreulichtes die Granularität der Partikel detektiert werden. Über die graphische Darstellung des Vorwärtsstreulichtes gegen das Seitwärtsstreulicht wird die vitale Zellpopulation bestimmt, von welcher die Fluoreszenz detektiert wird.

4.2.2.7 Zellsortierung (FACS)

Die Zellsortierer FACS Aria II SORP und MoFlo Optical Bench werden zur Anreicherung von Zellpopulation entsprechend ihrer Fluoreszenz genutzt. Die Zellproben werden bei 200xg für 5 min zentrifugiert und in 2 mL Kulturmedium versetzt mit 1:100 Gentamycin resuspendiert. Die Zellen werden als Pool in ein Zentrifugenröhrchen, in welchem 2 mL Kulturmedium (+1:100 Gentamycin) vorgelegt ist, sortiert und anschließend in ein geeignetes Kulturgefäß für die weitere Kultivierung überführt.

4.2.2.8 Einzelzellklonierung mittels semi-solidem Medium

3,6% *Low-melting Agarose* 3,6 g low-melting Agarose in 100 mL MiliqH₂O

Semi-solides Medium 10,7 mL Kulturmedium, 1,3 mL 3,6% low-melting Agarose (für eine 6-Loch-Platte)

Um aus einer heterogenen transfizierten Zellpopulation klonale Zelllinien zu generieren, werden die Zellen stark verdünnt in semi-soliden Medium ausgesät, für die CHO-S Zelllinien hat sich eine Zelldichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen mL^{-1} als optimal erwiesen. Hierfür wird das Kulturmedium für 1 h im Brutschrank vorinkubiert und anschließend mit 3×10^4 Zellen inokuliert. Die 3,6%-ige Low-melting Agarose kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend im Wasserbad abgekühlt. Der verdünnten Zellsuspension werden 1,3 mL Low-melting Agarose hinzugefügt, durch kurzes Auf- und Abpipettieren grünlich vermischt und je 2 mL in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte gegeben. Nach 15 min Inkubation im Kühlschrank ist das semi-soliden Medium verfestigt und kann in den CO_2 -Inkubator überführt werden. Einzelne Zellkolonien können nach etwa 7-10 d aus dem semi-soliden Medium in eine 96-Loch-Platte gepickt werden.

4.2.2.9 Gentransfermethoden

AMAXA Nukleofektion

Die zu transfizierenden CHO-S Zellen werden 24 h vor der Transfektion auf 5×10^5 c mL^{-1} passagiert. Für die Reaktionslösung werden 82 μL Nukleofektionslösung mit 18 μL Supplement in ein steriles Reaktionsgefäß vorgelegt und vorgewärmt. Nach Zentrifugation von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Reaktion für 5 min bei 200 g, wird das Pellet in der Reaktionslösung resuspendiert und mit maximal 10 μL Plasmid-DNA in einem sterilen Reaktionsgefäß vermischt. Die Zellsuspension wird blasenfrei in die Küvette überführt und die Zellen mit Programm U-24 transfiziert. Nach erfolgter Nukleofektion werden die Zellen mit 500 μL Medium vermischt und anschließend in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte mit 2 mL vorinkubiertem Medium pipettiert.

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Transfektion/ Produktion lentiviraler Vektoren

2x HEBS-Puffer 280 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4

CaCl_2 -Lösung 2,5 M CaCl_2 in H_2O

Kulturmedium HEK293T DMEM, 8 mM Glutamax

$3,6 \times 10^6$ HEK293T-Zellen werden 24 h vor dem Gentransfer in eine 10 cm Schale ausgesät. Für die Transfektion werden in ein 15 mL Zentrifugationsröhrchen 400 μL steriles H_2O , 100 μL CaCl_2 -Lösung, 16 μg Transgen-DNA sowie die Verpackungsplasmide pVSV-G (6 μg), pLP1 (11 μg) und pLP2 (4 μg) gegeben. Die DNA-Lösung wird tropfenweise in ein zweites Röhrchen, in welchem 500 μL 2x HEBS-Puffer vorgelegt ist, gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Zugabe der DNA/HEBS-Lösung zu den Zellen erfolgt tropfenweise. Ein Mediumwechsel wird 16 h nach der Transfektion durchgeführt. Die Ernte der lentiviralen

Vektoren findet nach weiteren 48 h statt. Hierfür wird der Zellkulturüberstand für 5 min bei 2000xg zentrifugiert und anschließend filtriert (0,22 µm). Die Lagerung des filtrierten Virusüberstandes erfolgt bei -80°C.

LinPEI Transfektion

<i>Transfektionsmedium</i>	Ham's F12, 8 mM Glutamax
<i>LinPEI Lösung</i>	2,5 µL LinPEI (1 mg mL ⁻¹), 25 µL 150 mM NaCl
<i>DNA-Lösung</i>	1,2 µg DNA, 25 µL 150 mM NaCl

24 h vor dem Gentransfer werden die Zellen auf 5x10⁵ c mL⁻¹ passagiert. Für die Transfektionsreaktion werden 2x10⁵ Zellen in 450 µL Transfektionsmedium resuspendiert und in eine 24-Loch-Platte pipettiert. Die LinPEI-Lösung wird tropfenweise in die DNA-Lösung pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die tropfenweise Zugabe des Reaktionsansatzes zu den Zellen. Nach 4-6 h Inkubation bei 37°C werden die transfizierten Zellen mit 500 µL Kulturmedium verdünnt.

Lentivirale Transduktion

Die Transduktion von CHO-S Zellen dient der Generation von Masterzelllinien mit dem Ziel der Integration von nur einer Kopie in das Genom. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle mit einem lentiviralen Vektor transduziert wird, unterliegt der Poisson-Verteilung:

$$P(n) = \frac{MOI^n \times e^{-MOI}}{n!}$$

P	Wahrscheinlichkeit
n	infektiöse Viruspartikel
MOI	Multiplizität der Infektion

Bei einer MOI von 0,005 beträgt somit die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle nicht transfiziert wird P(0) = 99,5 %. Mit einer Wahrscheinlichkeit von P(1) = 0,5 % wird eine Zelle mit genau einem infektiösen Partikel transfiziert. 0,001 % aller Zellen werden mit mehr als einem lentiviralen Vektor transfiziert. Die Integration von einer Kopie des lentiviralen Vektors in das Genom ist bei Verwendung einer sehr geringen MOI somit sehr wahrscheinlich.

Die Aussaat von 2,5x10⁶ CHO-S Zellen in eine 10-cm Schale erfolgt 6 h vor der Transduktion. Die Zellen werden mit einer MOI von 0,005 transduziert, das benötigte Volumen Virusüberstand wird mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Inokulum [mL]} = \frac{\text{MOI} \times N}{\text{Titer}}$$

MOI	Multiplizität der Infektion
N	Anzahl zu infizierender Zellen
Titer	Virustiter (bestimmt auf CHO-S)

Nach 16 h erfolgt ein Mediumwechsel und nach weiteren 48 h werden die transduzierten Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenz sortiert.

Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch

Die Kassettenaustauschreaktion mit markierten CHO Masterzelllinien wird mittels LinPEI Transfektion durchgeführt (siehe 4.2.2.9 Gentransfermethoden LinPEI-Transfektion).

Der Flp-kodierende Vektor wird mit dem Targetingvektor ko-transfiziert, es werden pro Kassettenaustauschreaktion je 0,6 µg Plasmid DNA eingesetzt. Nach 48 h werden die transfizierten Zellen auf 10 cm Schalen expandiert.

4.2.2.10 Single Cell Secretion Assay

<i>Blockierungspuffer</i>	3% BSA in PBS
<i>Antikörperlösung</i>	rabbit-anti-mouse IgG (H+L)-FITC konjugiert 1:50 in Kulturmedium

Während der Sekretion sind die auszuschleusenden Proteine transient mit der Zelloberfläche assoziiert. Folglich kann angenommen werden, dass die rekombinante Proteinmenge auf der Zelloberfläche mit der produzierten Proteinmenge innerhalb der Zelle korreliert.

Diese Eigenschaft wird bei der Selektion exprimierender Zellen aus einem heterogenen Zellpool angewandt. Hierfür werden etwa 1×10^6 transfizierte Zellen bei 200 g für 5 min zentrifugiert, mit 200 mL PBS resuspendiert und in eine Kavität einer 96-Loch-Platte mit V-Boden überführt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 3 min bei 50 g und erneutem Waschen der Zellen mit 200 µL PBS. Das Waschen der Zellen wird dreimal wiederholt. Mit 200 µL Blockierungspuffer wird das Zellpellet resuspendiert und bei 4°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen dreimal gewaschen, das Pellet in 200 µL Antikörperlösung gelöst und bei 37°C im CO₂-Inkubator für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Zellen mit Medium auf 1 mL aufgefüllt und mittels FACS nach FITC-positiven Zellen sortiert.

4.2.2.11 Bestimmung der spezifischen Produktivität von Suspensionszellen

Die spezifische Produktivität beschreibt die rekombinante Proteinmenge (in pg), welche pro Zelle und Tag exprimiert wird. Für die Bestimmung der spezifischen Produktivität im Rahmen der Zellpool- und –klonuntersuchung werden die Zellen auf 3×10^5 c mL⁻¹ passagiert. Nach 24 h und 72 h wird jeweils die Zelldichte und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt und unter Verwendung der nachfolgenden Formeln die spezifische Produktivität berechnet:

$$IVCD [10^9 c \times h \times L^{-1}] = \frac{(c_{XV1} + c_{XV-1})}{2} \times (t_1 - t_{-1})$$

$$q_p [pg(c \times d)^{-1}] = \frac{(c_{p1} - c_{p0})}{(IVCD)} \times 24$$

c_{XV}	viable Zelldichte, 10^9 c L ⁻¹
t	Zeitpunkt der Probenahme, h
c_p	Produktkonzentration, mg L ⁻¹

Bei Batch und Fed-Batch Kultivierungen wird die spezifische Produktivität über den gesamten Kulturverlauf bestimmt. Über die graphische Auftragung des Integral der viablen Zellen (IVC, 10^9 c x h) gegen die absolute Produktmasse zu den jeweiligen Probezeitpunkten, kann aus der Steigung der linearen Regression die spezifische Produktivität bestimmt werden.

$$IVC [10^9 c \times h] = \frac{(c_{XV1} + c_{XV-1})}{2} \times (t_1 - t_{-1}) \times V_1 + IVC_{t-1}$$

c_{XV}	viable Zelldichte, 10^9 c L ⁻¹
t	Zeitpunkt der Probenahme, h
V	Kulturvolumen zum Zeitpunkt der Probenahme t_1 , L

4.2.2.12 Titerbestimmung

Die Titerbestimmung GFP transduzierender Lentiviren erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierfür werden $1,5 \times 10^5$ CHO-S Zellen pro Vertiefung in eine 12-Loch-Platte ausgesät. 24 h nach Aussaat erfolgt die Infektion der Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Virusüberstandes. 48 h nach Infektion der Zellen erfolgt die durchflusszytometrische Analyse

hinsichtlich des Anteils GFP-exprimierender Zellen. Die Berechnung des Virustiter erfolgte basierend auf folgender Formel:

$$\text{Titer}[TU \text{ mL}^{-1}] = \left(\frac{\text{GFP}^+ \times N}{V} \right) \times \text{VF}$$

GFP+	Anteil GFP-positiver Zellen
N	Anzahl infizierter Zellen
V	Inokulumvolumen, mL
VF	Verdünnungsfaktor

4.2.2.13 Batch und Fed-Batch Kultivierung von CHO-Zellen im Schüttelkolben

Die Versuche werden bei einem Kulturvolumen von 100 - 200 mL in 500 mL Glasschüttelkolben bei 37 °C, 140 rpm und 4-6 % CO₂ durchgeführt. Die Kultivierung erfolgt in CHO Kulturmedium (vgl. 4.2.2.2). In Abhängigkeit des pH-Verlaufes während der Kultivierung wird die CO₂-Spannung im Verlauf der Kultivierung (~ 72 – 100 h) auf 4 % CO₂ verändert, um einem absinkenden pH-Wert entgegenzuwirken. Die Probenahme von 1,5 mL zur Bestimmung der Lebendzellzahl, Viabilität, pH-Wert, Gelöstkonzentration von O₂ und CO₂ sowie der Glukose- und Laktatkonzentration erfolgt täglich. Darüber hinaus werden alle zwei Tage Rückstellproben für die Produktquantifizierung mittels ELISA angefertigt, so dass sich das Probevolumen auf 6 mL erhöht. Abbruchkriterium der Kultivierung ist das Unterschreiten einer Viabilität von 50 %.

Für Fed-Batch Kultivierungen wird bei Verwendung des Grundmediums CD-CHO die Nährlösung Efficient Feed B eingesetzt.

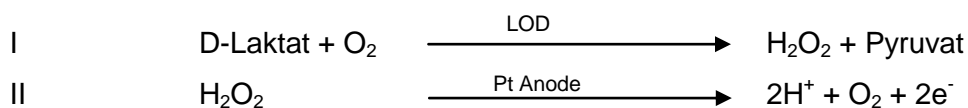
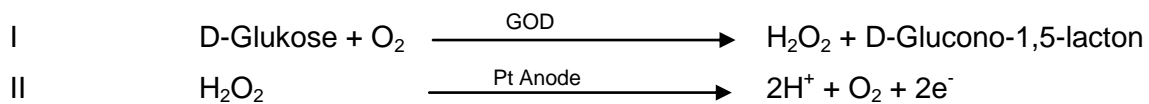
4.2.3 Analytische Methoden

4.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von D-Glukose und L-Laktat

Für die quantitative Bestimmung von D-Glukose sowie L-Laktat aus Zellkulturüberständen wird der biochemische Analysator YSI Analysator Modell 2700 SELECT genutzt. Die auf den Sonden installierte Dreischichtmembran enthält, umgeben von einer Zellulose-Acetat- und einer Polycarbonatmembran, in der mittleren Schicht immobilisierte Glukoseoxidase- bzw. L-Laktatoxidase-Enzyme (GOD bzw. LOD). Die Probe wird bei der Messung in die puffergefüllte Probenkammer, in welcher sich die von den Membranen bedeckten Sonden befinden, injiziert. Das Substrat (D-Glukose, L-Laktat) diffundiert durch die Polycarbonatmembran und wird unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid oxidiert.

Das Wasserstoffperoxid diffundiert in Richtung der Platin-Anode, wo es oxidiert wird. Die dabei freigesetzten Elektronen bewirken einen Signalstrom in der Sonde, welcher linear proportional zur Substratkonzentration ist.

Für die Substrate Glukose und Laktat finden folgende Reaktionen statt:



Die Messung am YSI erfolgt mit zellfreien Überstände, hierfür werden die Zellkulturproben bei 200xg für 5 min zentrifugiert.

4.2.3.2 Messung von pH, pO₂, pCO₂

Für die Bestimmung des pH-Wertes sowie des Gelöstpartialdrucks von Sauerstoff (pO₂) und Kohlenstoffdioxid (pCO₂) wird der BioProfile pHox Analyzer von Nova Biomedical genutzt. Dabei erfolgt die pO₂ Messung amperometrisch, pH und pCO₂ werden hingegen potentiometrisch bestimmt.

Die Messung am pHox Analyzer wird mit zellhaltigem Kulturüberstand (500 µL) direkt nach der Probenahme durchgeführt.

4.2.3.3 Quantifizierung der Proteinexpression mittels ELISA

<i>Blockierungspuffer</i>	3% BSA, 0,05% Tween, 1x PBS
<i>Carbonatpuffer</i>	64 mM Na ₂ CO ₃ , 136 mM NaHCO ₃ , pH 9,6
<i>Substratpuffer</i>	100 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2 H ₂ O, 230 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 5
<i>Waschpuffer (10x)</i>	1,4 M NaCl, 20 mM KH ₂ PO ₄ , 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 1% Tween 20, pH 7,4
<i>Verdünnungspuffer</i>	1:12 Blockierungspuffer in H ₂ O

Antikörperverdünnungen

<i>mIgG2a ELISA</i>	Erstantikörper:	goat-anti-mouse IgG (F _c) 1:5000
	Zweitantikörper:	goat-anti-mouse IgG (F _c)-HRP 1:3000

<i>hulG1 ELISA</i>	Erstantikörper:	mouse-anti-human IgG (F _c) 1:2000
	Zweitantikörper:	donkey-anti-human IgG (F _c)-HRP 1:3000
<i>tPA ELISA</i>	Erstantikörper:	mouse-anti-human tPA 1:3000
	Zweitantikörper:	sheep-anti-human tPA 1:6000

Zur Bestimmung der Konzentration der exprimierten Proteine werden die Zellkulturproben für 2 min bei 15000xg zentrifugiert und die Überstände entweder bei -20°C gelagert oder sofort für die Analyse mittels ELISA genutzt.

Die Mikrotiterplatten werden mit dem in Carbonatpuffer verdünnten Erstantikörper beschichtet (100 µL pro Vertiefung) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der beschichteten Platte mit Waschpuffer erfolgt für 30 min bei RT die Inkubation mit Blockierungspuffer (100 µL pro Vertiefung). Im Anschluss wird die Platte erneut gewaschen und die Proben, der Standard sowie die Negativkontrolle (Verdünnungspuffer) aufgetragen. Der Standard wird hierfür in Verdünnungspuffer auf 50 ng mL⁻¹ vorverdünnt. In die erste Reihe der Mikrotiterplatte werden je 200 µL des verdünnten Standards, der Negativkontrolle sowie der Proben in Duplikaten aufgetragen. In den übrigen Reihen der Platte werden 100 µL Verdünnungspuffer vorgelegt und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette eine schrittweise 1:2 Verdünnung von Reihe A bis H durchgeführt. Nach der Inkubation der Platte bei 4°C über Nacht oder für 4 h bei RT wird diese erneut dreimalig mit Waschpuffer gewaschen. Der in Verdünnungspuffer verdünnte Zweitantikörper (100 µL pro Kavität) wird anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte dreimalig gewaschen. Für die Entwicklung des ELISA werden 50 mL Substratpuffer mit 10 µL H₂O₂ sowie 20 mg o-Phenyldiamindihydrochlorid vermischt und je 100 µL pro Vertiefung pipettiert. Die Farbreaktion wird nach 2-3 min durch Zugabe von 100 µL 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption der einzelnen Kavitäten bei 490 nm wird mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesers bestimmt.

4.2.3.4 Quantifizierung der Antikörperexpression mittels ProA HPLC

Laufpuffer 6 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,2

Elutionspuffer 150 mM NaCl, pH 2,5

Zur Abtrennung der Zellmasse werden die Zellsuspensionen nach Abbruch der Kultivierung für 5 min bei 200xg zentrifugiert, der Überstand wird anschließend für die weitere Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Vor der Aufreinigung wird der Zellkulturüberstand nochmals bei 13,2x1000 g für 2 min zentrifugiert. Die Äquilibration erfolgt indem die Säule (POROS® 20 micron Protein A ID Cartridge, von Applied Biosystems) mit Laufpuffer für 10 min bei

2,5 mL min⁻¹ gespült wird. Für die Antikörperquantifizierung aus dem Zellkulturüberstand werden 100 µL Probe injiziert und anschließend mit Laufpuffer bei 2,5 mL min⁻¹ gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgt unter Verwendung des Elutionspuffers (1,5 min/ 2 mL min⁻¹). Die eluierten Proteine werden über einen Diodenarray-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Die Regeneration der Säule erfolgt durch Spülen mit Laufpuffer für 5 min bei 2,5 mL min⁻¹.

Literaturverzeichnis

- Abu-Absi, S. et al., 2014. Cell Culture Process Operations for REcombinant Protein Production. In A. Kantardjieff & W. Zhou, eds. *Mammalian cell cultures for biologics manufacturing*. pp. 1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258145>.
- Agrawal, V. & Bal, M., 2012. Strategies for Rapid Production of Therapeutic Proteins in Mammalian Cells. *BioProcess International*, 10(4).
- Al-Rubeai, M. et al., 1992. Specific monoclonal antibody productivity and the cell cycle-comparisons of batch, continuous and perfusion cultures. *Cytotechnology*, 9(1-3), pp.85–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369185>.
- Altamirano, C. et al., 2006. Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), pp.61–68.
- Baer, a & Bode, J., 2001. Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Current opinion in biotechnology*, 12(5), pp.473–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11604323>.
- Bagasra, O. et al., 1985. In vitro cloning of tumor stem cells in semi-solid media containing agar and agarose. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 20, pp.55–60.
- Bailey, L. a et al., 2012. Determination of Chinese hamster ovary cell line stability and recombinant antibody expression during long-term culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), pp.2093–2103. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24485> [Accessed July 15, 2014].
- Bandaranayake, A.D. & Almo, S.C., 2014. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*, 588(2), pp.253–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316512> [Accessed July 18, 2014].
- Barnes, L., Bentley, C. & Dickson, A., 2003. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering*, 81(6), pp.631–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529877> [Accessed July 15, 2014].
- Barnes, L.M., Bentley, C.M. & Dickson, a J., 2000. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology*, 32(2), pp.109–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3449689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Barnes, L.M., Bentley, C.M. & Dickson, A.J., 2003. Molecular Definition of Predictive Indicators of Stable Protein Expression in Recombinant NS0 Myeloma Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(2), pp.115–121.
- Barnes, L.M., Moy, N. & Dickson, A.J., 2006. Phenotypic Variation During Cloning Procedures : Analysis of the Growth Behavior of Clonal Cell Lines. *Biotechnology and bioengineering*, 94(3), pp.530–537.

- Becerra, S. et al., 2012. Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochemical Engineering Journal*, 60, pp.1–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X11002804> [Accessed August 5, 2014].
- Berrios, J. et al., 2009. Relationship between tissue plasminogen activator production and specific growth rate in Chinese hamster ovary cells cultured in mannose at low temperature. *Biotechnology Letters*, 31(10), pp.1493–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547928> [Accessed July 16, 2014].
- Birch, J.R. & Racher, A.J., 2006. Antibody production. *Advanced drug delivery reviews*, 58(5-6), pp.671–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822577> [Accessed July 10, 2014].
- Bleck, G., 2005. An Alternative Method for the Rapid Generation of Stable . . *BioProcess J*, 5(4), pp.36–42.
- Blesch, A., 2004. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Transfection of Mammalian Cells*, 33(2), pp.164–172.
- Bode, J. et al., 2000. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biological chemistry*, 381(9-10), pp.801–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076013>.
- Brezinsky, S.C.. et al., 2003. A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *Journal of Immunological Methods*, 277(1-2), pp.141–155. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002217590300108X> [Accessed July 10, 2014].
- Butler, M., 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(3), pp.283–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15834715> [Accessed July 12, 2014].
- Cacciatore, J.J., Chasin, L. a & Leonard, E.F., 2010. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology advances*, 28(6), pp.673–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416368> [Accessed September 15, 2014].
- Carinhas, N. et al., 2013. Metabolic signatures of GS-CHO cell clones associated with butyrate treatment and culture phase transition. *Biotechnology and bioengineering*, 110(12), pp.3244–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794452> [Accessed July 15, 2014].
- Christman, J.K. et al., 1982. Amplification of expression of hepatitis B surface antigen in 3T3 cells cotransfected with a dominant-acting gene and cloned viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), pp.1815–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=346071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Chusainow, J. et al., 2009. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnology and bioengineering*, 102(4), pp.1182–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18979540> [Accessed July 12, 2014].
- Cockett, M.I., Bebbington, C.R. & Yarranton, G.T., 1990. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 8(7), pp.662–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369995> [Accessed September 21, 2014].
- Coller, H. a & Coller, B.S., 1986. Poisson Statistical Analysis of Repetitive Subcloning by the Limiting Dilution Technique as a Way of Assessing Hybridoma Monoclonality. *Methods in enzymology*, 121(1983), pp.412–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3724479>.
- Coroadinha, a S. et al., 2006. The use of recombinase mediated cassette exchange in retroviral vector producer cell lines: predictability and efficiency by transgene exchange. *Journal of biotechnology*, 124(2), pp.457–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529836> [Accessed June 21, 2014].
- Distler, J.H.W. et al., 2005. Nucleofection: a new, highly efficient transfection method for primary human keratinocytes*. *Experimental dermatology*, 14(4), pp.315–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15810891>.
- Dorai, H. et al., 2012. Early prediction of instability of Chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), pp.1016–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068683> [Accessed July 15, 2014].
- Duarte, T.M. et al., 2014. Metabolic responses of CHO cells to limitation of key amino acids. *Biotechnology and bioengineering*, 9999(xxx), pp.1–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24771076> [Accessed July 14, 2014].
- Dutton, R.L., Scharer, J. & Moo-Young, M., 2006. Cell cycle phase dependent productivity of a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology*, 52(1), pp.55–69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3449425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 26, 2014].
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2117903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 10, 2014].
- Emery, D., Aker, M. & Stamatoyannopoulos, G., 2003. Chromatin insulators and position effects. In G. Bernardi, ed. *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Gulf Professional Publishing, p. 680. Available at: <http://books.google.com/books?id=PzPkk8ehPUAC&pgis=1> [Accessed September 22, 2014].
- Estes, S. & Melville, M., 2014. Mammalian Cell Line Developments in Speed and Efficiency. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 139, pp.11–33. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2013_260 [Accessed July 27, 2014].

- Eye, A. von & Mair, P., 2010. *Advances in Configural Frequency Analysis*, Guilford Press. Available at: http://books.google.com/books?id=D-buNI_IsokC&pgis=1 [Accessed August 6, 2014].
- Fan, L. et al., 2013. Development of a highly-efficient CHO cell line generation system with engineered SV40E promoter. *Journal of biotechnology*, 168(4), pp.652–8. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165613003660> [Accessed July 10, 2014].
- Fan, L. et al., 2012. Improving the Efficiency of CHO Cell Line Generation Using Glutamine Synthetase Gene Knockout Cells. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), pp.1007–1015.
- Fann, C.H. et al., 2000. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 69(2), pp.204–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861399>.
- Fath, S. et al., 2011. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PloS one*, 6(3), p.e17596. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3048298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].
- Fernandes, F. et al., 2012. Flipase-mediated cassette exchange in Sf9 insect cells for stable gene expression. *Biotechnology and bioengineering*, 109(11), pp.2836–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565981> [Accessed October 11, 2014].
- Fogolin, M.B. et al., 2004. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of biotechnology*, 109(1-2), pp.179–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15063626> [Accessed August 12, 2014].
- Furukawa, K. & Ohsuye, K., 1999. Enhancement of productivity of recombinant alpha-amidating enzyme by low temperature culture. *Cytotechnology*, 31(1-2), pp.85–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3449780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gama-Norton, L. et al., 2009. Defeating Randomness - Targeted Integration as a Boost for Biotechnology. In M. Al-Rubeai, ed. *Cell Line Development*. Springer Science & Business Media, pp. 53–82. Available at: <http://books.google.com/books?id=kpF6xx5nIIEC&pgis=1> [Accessed September 24, 2014].
- Garrick, D. et al., 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nature Genetics*, 18, pp.56–59.
- Goswami, J. et al., 1999. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and bioengineering*, 62(6), pp.632–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951521>.
- Gottesman, M., 1985. *Molecular Cell Genetics*, Wiley. Available at: <http://books.google.com/books?id=4huEQgAACAAJ&pgis=1> [Accessed August 2, 2014].

- Graf, M., Schoedl, T. & Wagner, R., 2009. Rationales of Gene Design and De Novo Gene Construction. In *Systems Biology and Synthetic Biology*. pp. 411–438.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology*, 22(7), pp.346–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15245907> [Accessed July 9, 2014].
- Hendrick, V. et al., 2001. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*, 36(1-3), pp.71–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3449664&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huang, Y. et al., 2007. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *Journal of immunological methods*, 322(1-2), pp.28–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350648> [Accessed October 11, 2014].
- Huang, Y.-M. et al., 2010. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology progress*, 26(5), pp.1400–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945494> [Accessed August 8, 2014].
- Huggett, B., 2013. Public biotech 2012--the numbers. *Nature biotechnology*, 31(8), pp.697–703. Available at: http://www.nature.com/nbt/journal/v31/n8/fig_tab/nbt.2653_T7.html [Accessed September 2, 2014].
- Hwang, S.-J. et al., 2011. Effects of culture temperature and pH on flag-tagged COMP angiopoietin-1 (FCA1) production from recombinant CHO cells: FCA1 aggregation. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(2), pp.305–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509567> [Accessed August 2, 2014].
- Jain, E. & Kumar, A., 2008. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnology advances*, 26(1), pp.46–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920803> [Accessed September 24, 2014].
- Jayapal, K.P., 2007. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting. *Chemical Engineering Progress*, 103(10), pp.40–47.
- Johnson, C.N. & Levy, L.S., 2005. Matrix attachment regions as targets for retroviral integration. *Virology journal*, 2, p.68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1198263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 21, 2014].
- Jun, S.C. et al., 2006. Limitations to the development of humanized antibody producing Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification. *Biotechnology progress*, 22(3), pp.770–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16739961>.
- Kaufman, R.J. & Sharp, P., 1982. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary dna gene. *Journal of molecular biology*, 159(4), pp.601–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6292436>.
- Kelley, B., 2009. Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at. *MAbs*, 1(5), pp.443–52.

- Kim, D.Y. et al., 2012. Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnology progress*, 29(1), pp.165–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125190> [Accessed July 16, 2014].
- Kim, J.-M. et al., 2004. Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *Journal of Biotechnology*, 107(2), pp.95–105. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165603002670> [Accessed September 22, 2014].
- Kim, M. et al., 2011. A mechanistic understanding of production instability in CHO cell lines expressing recombinant monoclonal antibodies. *Biotechnology and bioengineering*, 108(10), pp.2434–2446. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21538334> [Accessed August 3, 2014].
- Kleppmann, W., 2013. *Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren*, Carl Hanser Verlag GmbH & Company KG. Available at: <http://books.google.com/books?id=cLZPAgAAQBAJ&pgis=1> [Accessed July 27, 2014].
- Kumar, N. et al., 2008. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells. *BMC biotechnology*, 8, p.42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2386802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 11, 2014].
- Lai, T., Yang, Y. & Ng, S.K., 2013. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies. *Pharmaceuticals*, 6, pp.579–603.
- Leelavatcharamas, V., Emery, A.N. & Al-Rubeai, M., 1995. The Effects of Initial Serum Concentration, pH and Agitation Rate on Cell Aggregation During Batch Culture of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. In E. C. Beuvery, J. B. Griffiths, & W. P. Zeijlemaker, eds. *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21 st Century*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 217–221. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-0437-1> [Accessed August 2, 2014].
- Li, F. et al., 2010. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5), pp.466–479. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/article/12720/> [Accessed July 10, 2014].
- Li, F. et al., 2005. Current Therapeutic Antibody Production and Process Optimization. *BioProcess J*, 4(5), pp.1–8.
- Liu, P.Q. et al., 2010. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases. *Biotechnol. Bioeng.*, 106, pp.97–105.
- Liu, X. et al., 2000. Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. *Analytical biochemistry*, 280(1), pp.20–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805516> [Accessed June 20, 2014].
- Logan, A.C., Lutzko, C. & Kohn, D., 2002. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Current opinion in biotechnology*, 13(5), pp.429–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459333>.
- McBurney, M.W. et al., 2002. Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured Mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes. *Experimental cell*

- research, 274(1), pp.1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11855851> [Accessed August 3, 2014].
- Meleady, P. et al., 2011. Sustained productivity in recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell lines: proteome analysis of the molecular basis for a process-related phenotype. *BMC biotechnology*, 11(1), p.78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 12, 2014].
- Meran, R. et al., 2013. *Six Sigma+Lean Toolset: Mindset zur erfolgreichen Umsetzung von Verbesserungsprojekten*, Springer-Verlag. Available at: <http://books.google.com/books?id=Rto0BAAQBAJ&pgis=1> [Accessed October 15, 2014].
- Miller, W.M., Wilke, C.R. & Blanch, H.W., 1988. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioprocess Engineering*, 3, pp.113–122.
- Min Soo, K. & Gyun Min, L., 2008. Use of Flp-Mediated Cassette Exchange in the Development of a CHO Cell Line Stably Producing Erythropoietin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), pp.1342–1351.
- Montgomery, D.C., 2008. *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons. Available at: <http://books.google.com/books?id=kMMJAm5bD34C&pgis=1> [Accessed July 27, 2014].
- Nehlsen, K. et al., 2009. Recombinant protein expression by targeting pre-selected chromosomal loci. *BMC biotechnology*, 9, p.100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2804664&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 20, 2014].
- Noh, S.M., Sathyamurthy, M. & Lee, G.M., 2013. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2(4), pp.391–397. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211339813000749> [Accessed September 2, 2014].
- O’Gorman, S., Fox, D.T. & Wahl, G.M., 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science (New York, N. Y.)*, 251(4999), pp.1351–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900642>.
- Oberbek, A. et al., 2011. Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture. *Biotechnology and bioengineering*, 108(3), pp.600–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967750> [Accessed June 28, 2014].
- Osterlehner, A., Simmeth, S. & Göpfert, U., 2011. Promoter methylation and transgene copy numbers predict unstable protein production in recombinant Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnology and bioengineering*, 108(11), pp.2670–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618470> [Accessed July 15, 2014].
- Oumard, A. et al., 2006. Recommended Method for Chromosome Exploitation: RMCE-based Cassette-exchange Systems in Animal Cell Biotechnology. *Cytotechnology*, 50(1-3), pp.93–108. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3476001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2014].
- Pfaff, N. et al., 2013. A ubiquitous chromatin opening element prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(3), pp.488–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307570> [Accessed August 3, 2014].
- Pichler, J. et al., 2009. A study on the temperature dependency and time course of the cold capture antibody secretion assay. *Journal of biotechnology*, 141(1-2), pp.80–3. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165609001035> [Accessed July 10, 2014].
- Qiao, J. et al., 2009. Novel Tag-and-Exchange (RMCE) Strategies Generate Master Cell Clones with Predictable and Stable Transgene Expression Properties. *Journal of Molecular Biology*, 390(4), pp.579–594. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.012>.
- Raab, D. et al., 2010. The GeneOptimizer Algorithm : using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Synth Biol*, 4, pp.215–225.
- Read, E.K. et al., 2010. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products: Part I. concepts and applications. *Biotechnology and bioengineering*, 105(2), pp.276–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19731252> [Accessed September 29, 2014].
- Recillas-Targa, F., 2004. Mammalian Cell Lines. In P. Balbás & A. Lorence, eds. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. Springer Science & Business Media. Available at: <http://books.google.com/books?id=72AGbwPNyFMC&pgis=1> [Accessed September 22, 2014].
- Rehberger, B. et al., 2013. Accelerating stable recombinant cell line development by targeted integration. In *BMC Proceedings*. BioMed Central Ltd, p. P111. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/7/S6/P111> [Accessed July 16, 2014].
- Reinhart, D. et al., 2013. Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. In *BMC Proceedings*. BioMed Central Ltd, p. P13. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/7/S6/P13> [Accessed September 20, 2014].
- Ringold, G., Dieckmann, B. & Lee, F., 1981. Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells. *Journal of molecular and applied genetics*, 1(3), pp.165–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6180118> [Accessed September 17, 2014].
- Rose, T. et al., 2013. A robust RMCE system based on a CHO-DG44 platform enables efficient evaluation of complex biological drug candidates. In *BMC Proceedings*. BioMed Central Ltd, p. P66. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/7/S6/P66> [Accessed July 16, 2014].
- Sauer, P.W. et al., 2000. A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5), pp.585–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649233>.

- Schimke, R.T., 1984. Gene amplification in cultured animal cells. *Cell*, 37(3), pp.705–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378386>.
- Schirrmann, T. et al., 2008. Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), pp.4576–4594.
- Schirrmann, T. & Büssow, K., 2010. Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells. In *Antibody Engineering*. pp. 387–398.
- Schlake, T. & Bode, J., 1994. Use of Mutated FLP Recognition Target (FRT) Sites for the Exchange of Expression Cassettes at Defined Chromosomal Loci. *Biochemistry*, 33(43), pp.12746–12751.
- Schmid, G., Blanch, H.W. & Wilke, C.R., 1990. Hybridoma Growth, Metabolism and Product Formation in HEPES-buffered Medium: II Effect of pH. *Biotechnology letters*, 12(9), pp.633–638.
- Schübeler, D., Maass, K. & Bode, J., 1998. Retargeting of retroviral integration sites for the predictable expression of transgenes and the analysis of cis-acting sequences. *Biochemistry*, 37(34), pp.11907–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9718314>.
- Schucht, R. et al., 2006. A new generation of retroviral producer cells: predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(2), pp.285–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697259> [Accessed June 20, 2014].
- Schucht, R., 2006. *Entwicklung von flexiblen Zelllinien für die Produktion rekombinanter Proteine und Retroviren*.
- Shukla, A. a & Thömmes, J., 2010. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in biotechnology*, 28(5), pp.253–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304511> [Accessed July 10, 2014].
- Siebertz, K., Bebbler, D.T. van & Hochkirchen, T., 2010. *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE)*, Springer-Verlag. Available at: http://books.google.com/books?id=_6kkBAAQBAJ&pgis=1 [Accessed October 15, 2014].
- Singh, R.P. et al., 1994. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnology and bioengineering*, 44(6), pp.720–6.
- Slikker, W. et al., 2001. Hypothermia enhances bcl expression and protects against oxidative stress induced cell death in chinese hamster ovary cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(3), pp.405–411.
- Sunley, K., Tharmalingam, T. & Butler, M., 2008. CHO Cells Adapted to Hypothermic Growth Produce High Yields of Recombinant b -Interferon. *Biotechnol. Prog.*, 24, pp.898–906.
- Thie, H. et al., 2011. Rise and Fall of an Anti-MUC1 Specific Antibody. *PLoS one*, 6(1), pp.1–19.
- Turan, S. et al., 2013. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene*, 515(1), pp.1–27.

- Turan, S. et al., 2011. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *Journal of Molecular Biology*, 407(2), pp.193–221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21241707> [Accessed July 10, 2014].
- Urlaub, G. & Chasin, L.A., 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, pp.4216–4220.
- Verhoeyen, E., Hauser, H. & Wirth, D., 1998. Efficient targeting of retrovirally FRT-tagged chromosomal loci. *Technical Tips Online*, 3, pp.122–125.
- Verhoeyen, E., Hauser, H. & Wirth, D., 2001a. Evaluation of Retroviral Vector Design in Defined Chromosomal Loci by Flp-Mediated Cassette Replacement. *Human gene therapy*, 12, pp.933–944.
- Verhoeyen, E., Hauser, H. & Wirth, D., 2001b. Evaluation of Retroviral Vector Design in Defined Chromosomal Loci by Flp-Mediated Cassette Replacement. *Human gene therapy*, 12, pp.933–944.
- Wagner, R. et al., 1988. Variation of amino acid concentrations in the medium of HU β -IFN and HU IL-2 producing cell lines. *Cytotechnology*, 1(2), pp.145–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358566> [Accessed August 2, 2014].
- Walder, K. & Walder, O., 2013. *Statistische Methoden der Qualitatssicherung: Praktische Anwendung mit MINITAB und JMP*, Carl Hanser Verlag GmbH & Company KG. Available at: <http://books.google.com/books?id=zLxPAgAAQBAJ&pgis=1> [Accessed October 15, 2014].
- Wang, Y. et al., 2011. Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant cell reports*, 30(3), pp.267–85. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3036822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 24, 2014].
- Whitford, W.G., 2006. Fed-Batch Mammalian Cell Culture in Bioproduction. *BioProcess International*, pp.30–40.
- Wilke, S., 2011. *Production of mammalian glycoproteins for structural analysis: site-specific recombination systems in CHO cells*. TU Braunschweig.
- Wilke, S. et al., 2011. Streamlining homogeneous glycoprotein production for biophysical and structural applications by targeted cell line development. *PloS one*, 6(12), p.e27829.
- Wilson, C., Bellen, H.J. & Gehring, W.J., 1990. Position Effects in eukaryotic gene expression. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6, pp.679–714.
- Wirth, D. et al., 2007. Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Current opinion in biotechnology*, 18(5), pp.411–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17904350> [Accessed August 30, 2014].
- Woodbury, C.P., 2011. *Biochemistry for the Pharmaceutical Sciences*, Jones & Bartlett Publishers. Available at: <http://books.google.com/books?id=40Phuq2tw8UC&pgis=1> [Accessed September 18, 2014].

- Wu, C.F.J. & Hamada, M.S., 2000. *Experiments: Planning, Analysis, and Optimization* 2nd ed., Available at: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471699462.html> [Accessed October 14, 2014].
- Wurm, F.M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), pp.1393–8.
- Yang, Y. et al., 2010. DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *Journal of biotechnology*, 147(3-4), pp.180–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430058> [Accessed July 18, 2014].
- Yoon, S.K. et al., 2006. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *Journal of biotechnology*, 122(4), pp.463–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253368> [Accessed August 14, 2014].
- Yoon, S.K. et al., 2005. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 °C. *Biotechnology and bioengineering*, 89(3), pp.345–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15625678> [Accessed August 2, 2014].
- Yoon, S.K., Hwang, S.O. & Lee, G.M., 2004. Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnology progress*, 20(6), pp.1683–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15575699>.
- Yoon, S.K., Kim, S.H. & Lee, G.M., 2003. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology progress*, 19(4), pp.1383–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892507>.
- Yoshikawa, T. et al., 2000. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnology progress*, 16(5), pp.710–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027161>.
- Zhang, F. et al., 2010. A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(9), pp.1640–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2956914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 27, 2014].
- Zhou, H. et al., 2010. Generation of stable cell lines by site-specific integration of transgenes into engineered Chinese hamster ovary strains using an FLP-FRT system. *Journal of biotechnology*, 147(2), pp.122–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371256> [Accessed October 11, 2014].
- Zhu, J., 2012. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, 30(5), pp.1158–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968146> [Accessed July 16, 2014].

Abkürzungsverzeichnis

3'LTR	<i>3' long terminal repeat</i> , HIV-1 LTR mit R und U5 Region
5'LTR	<i>5' long terminal repeat</i> , HIV-1 LTR mit R und U5 Region
6xHis	His-Tag
A ₂₆₀	Absorption einer Probe bei 260 nM
ampR	β -Lactamase, Ampicillin-Resistenz-Gen
ATG	Translationsstartcodon
bp	<i>Base pairs</i> , Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
c	<i>cells</i> , Zellen
CH	<i>constant domain heavy chain</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CL	<i>constant domain light chain</i>
CMV	Cytomegalovirus
cPPt	<i>central polypurine tract</i> , verbessert nukleären Import des viralen Genoms
Cre	<i>Causes recombination</i> , Cre-Rekombinase
d	day, Tag
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
Dneo	Neomycin-Gen ohne Startcodon ATG
ddNTP	<i>Di- Deoxyribonucleosid-triphosphate</i> , Di-Desoxyribonucleotidtriphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	<i>Elongation factor 1 α</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Erythropoetin
F5	mutierte FRT Sequenz
FACS	<i>Fluorescence- activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Flp	Flippase, Flp-Rekombinase

FRT	<i>Flp recognition target</i> , Erkennungssequenz der Flp-Rekombinase
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m s ²
G418	Aminoglycosid, Geneticin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GOD	Glukoseoxidase
GOI	<i>gene of interest</i>
GS	Glutaminsynthetase
h	<i>hours</i> , Stunden
HC	<i>heavy chain</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEBS	<i>HEPES buffered saline</i> , HEPES-gepufferte Salzlösung
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HZI	Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i> , interne ribosomale Eintrittsstelle
IVC	<i>Integrated viable cells</i> , Zell-Zeit-Integral
kanar	Kanamycin-Resistenz-Gen
L	Liter
LB	Luria Betroni
LC	<i>light chain</i> , leichte Kette
LOD	Laktoseoxidase
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>Multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
MW	<i>Molecular weight</i> , Molekulargewicht
Neo	Neomycinphosphotransferase
OD	optische Dichte
ori	<i>Origin of replication</i> , Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophoresis
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
pcd	<i>Picogram per cell per day</i> , spezifische Produktivität, pg/(c x d) ⁻¹
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PP	Propeptid

PRE	<i>Posttranscriptional regulatory element</i> , Element zur Expressionsverstärkung
Pt	Platin
q _P	spezifische Produktivität
RMCE	<i>Recombinase-mediated cassette exchange</i> , rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch
RNA	<i>Ribonucleid acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolution per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>rev response element</i> , RNA Element notwendig für virale Replikation
RSV	Rous Sarcoma Virus Promotor/ Enhancer
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SCSA	<i>Single Cell Secretion Assay</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SIN	<i>self-inactivating</i> , retroviraler Vektor mit U3 Deletion im 3'LTR
SS	Signalsequenz
SSC	<i>Side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
SV	Säulenvolumen
TU	<i>transducing unit</i> , transduzierende Partikel
UCOE	<i>ubiquitous chromatin opening elements</i> , verhindert Transgen-Silencing
VF	Verdünnungsfaktor
VH	<i>variable domain heavy chain</i>
VL	<i>variable domain light chain</i>
VSV-G	vesikuläres Stomatitis Virus-Glykoprotein
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Schematische Darstellung konventioneller Zelllinienentwicklung für die Produktion rekombinanter Proteine (Lai et al. 2013).....	11
Abbildung 1-2:	Schematische Darstellung der durch Tyrosin-Rekombinasen katalysierten Reaktionen.....	15
Abbildung 1-3:	Schematische Darstellung des Flp-Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch (RMCE)	16
Abbildung 1-4:	Cuboidales Design eines 2 ³ voll-faktorierten Versuchsplans.....	20
Abbildung 3-1:	Schematische Darstellung des Provirus des lentiviralen Transfervektors pZLE-57	24
Abbildung 3-2:	FACS Analyse der mit pZLE57 lentiviral markierten CHO-S Zellen	25
Abbildung 3-3:	Schematische Darstellung der Austauschkassette pTAR-FL-RFP	26
Abbildung 3-4:	FACS Analyse der transfizierten Masterzelllinie mit RFP Austauschvektor	27
Abbildung 3-5:	Mittlere Fluoreszenzintensität der Subklone nach Kassettenaustausch mit RFP Kassette.....	27
Abbildung 3-6:	Strategie zur Analyse der Subklone nach dem Kassettenaustausch mittels PCR	28
Abbildung 3-7:	Langzeitstabilität viral markierter CHO-Masterzelllinien.....	29
Abbildung 3-8:	Schematische Darstellung der Targetingkassette für die Expression der in Tabelle 3-1 gelisteten rekombinanten Proteine	31
Abbildung 3-9:	Strategie zur Überprüfung des Kassettenaustausches auf genomischer Ebene	32
Abbildung 3-10:	Agarose Gelelektrophorese der PCR genomischer DNA re-sortierter RMCE Poole.....	33
Abbildung 3-11:	Expression verschiedener rekombinanter Proteine von einem definierten Locus der Masterzelllinie 1	33
Abbildung 3-12:	Vergleich der Expressionstärke der codon-optimierten mIgG2a Sequenz gegenüber der nicht optimierten Sequenz von definierten Loci der Masterzelllinien 2 und 4.....	35
Abbildung 3-13:	Expression zweier chimärer Antikörper sowie eines Antikörper-Fragments von definierten Loci der Masterzelllinien 1-4.....	36
Abbildung 3-14:	Agarose Gelelektrophorese der PCR genomischer DNA der Subklone nach RMCE mit Masterzelllinie 2 und drei Austauschvektoren.....	39

Abbildung 3-15: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der re-sortierten Targetingpools und der korrespondierenden Subklone nach dem RMCE mit Masterzelllinie 2	39
Abbildung 3-16: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der re-sortierten Targetingpools und der korrespondierenden Subklone nach dem RMCE mit Masterzelllinie 4	40
Abbildung 3-17: Langzeitstabilitätstest der Subklone des Kassettenaustausches von Masterzelllinie 1 mit dem murinen IgG2a Antikörper	41
Abbildung 3-18: Batch-Kultivierung des GS5 Klon 5.....	44
Abbildung 3-19: Batch-Kultivierung des GS5 Klon 9.....	45
Abbildung 3-20: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der GS5 Klone 5 und 9 für die Batch-Kultivierungen bei verschiedenen adaptierten MSX-Konzentration. 48	
Abbildung 3-21: Langzeitstabilität von GS5 Klonen in Abwesenheit von MSX bei vorheriger Adaption an verschiedene MSX-Konzentrationen	49
Abbildung 3-22: Veränderung der spezifischen Wachstumsrate im Verlauf des Stabilitätstests von GS5 Klonen	51
Abbildung 3-23: Spezifische Produktivität der GS6-Einzelzellklone.....	53
Abbildung 3-24: Batch-Kultivierung von fünf Klonen des re-transfizierten GS6 Pools.....	53
Abbildung 3-25: Batch und Fed-Batch Kultivierungen des GS6 Klon 132 in verschiedenen chemisch-definierten Medien	56
Abbildung 3-26: Darstellung der spezifischen Produktivitäten des GS6 Klon 132 für die Batch- und Fed-Batch Kultivierungen in verschiedenen chemisch-definierten Medien.....	57
Abbildung 3-27: Fed-Batch Kultivierung der GS6 Klone 46, 73 und 132 entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 7 (vgl. Tabelle 3-2) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.	61
Abbildung 3-28: Darstellung der spezifischen Produktivitäten der GS6 Klone 46, 73 und 132 entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 7 (vgl. Tabelle 3-2) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.....	63
Abbildung 3-29: Fed-Batch Kultivierung Antikörper exprimierender RMCE-Klone entsprechend der Faktorvariation laut Versuchsnummer 4 (vgl. Tabelle 3-9) in CD-CHO Medium mit Efficient Feed B.....	71
Abbildung 3-30: Vergleichende Darstellung der IVC und der spezifischen Produktivität aller untersuchten RMCE Klone für die laut Tabelle 3-9 jeweiligen Versuchsnummern	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Tabellarische Darstellung der Versuchsmatrix, der Matrix der Faktorwechselwirkungen und der Antwortmatrix (Ergebnis)	21
Tabelle 3-2:	Voll-faktorisierter Versuchsplan mit 3 Faktoren und 2 Stufen	60
Tabelle 3-3:	Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 46. Die grau hinterlegten Daten des Versuches 2 wurden zum Zeitpunkt t=221h generiert. Nach 241 h wurde bei diesem Versuch eine Kontamination festgestellt.....	64
Tabelle 3-4:	Kontrastergebnistabelle des 2 ³ Versuchsplans mit GS6 Klon 46	65
Tabelle 3-5:	Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 73	66
Tabelle 3-6:	Kontrastergebnistabelle des 2 ³ Versuchsplans mit GS6 Klon 73.....	66
Tabelle 3-7:	Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 263 h) für GS6 Klon 132	67
Tabelle 3-8:	Kontrastergebnistabelle des 2 ³ Versuchsplans mit GS6 Klon 132	68
Tabelle 3-9:	Voll-faktorisierter Versuchsplan mit 2 Faktoren und 2 Stufen	70
Tabelle 3-10:	Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 216 h) für RMCE IgG1 λ Klon 1	72
Tabelle 3-11:	Kontrastergebnistabelle des 2 ² Versuchsplans mit RMCE IgG1 λ Klon 1 ..	72
Tabelle 3-13:	Kontrastergebnistabelle des 2 ² Versuchsplans mit RMCE IgG1 λ Klon 2 ..	74
Tabelle 3-14:	Zusammenfassung der Ergebnisse des voll-faktorierten Versuchsplans (t= 216 h) für RMCE mIgG12a Klon 1	74
Tabelle 3-15:	Kontrastergebnistabelle des 2 ² Versuchsplans mit RMCE mIgG2a Klon 1	75
Tabelle 4-1:	Antibiotika	80
Tabelle 4-2:	Antikörper	80
Tabelle 4-3:	Bakterienstämme	80
Tabelle 4-4:	Chemikalien und Reagenzien.....	81
Tabelle 4-5:	Enzyme und Reaktionspuffer	82
Tabelle 4-6:	Geräte.....	83
Tabelle 4-7:	Medien und Zusätze.....	84
Tabelle 4-8:	Oligonukleotide	84
Tabelle 4-9:	Reaktionskits.....	85
Tabelle 4-10:	Vektoren	85
Tabelle 4-11:	Zelllinien.....	86

Tabelle 4-12:	Reaktionsansatz für die analytische DNA-Restriktion.....	88
Tabelle 4-14:	Reaktionsansatz für das Glätten überhängender Ende an DNA-Fragmenten	89
Tabelle 4-15:	Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	90
Tabelle 4-16:	Reaktionsansatz für die Ligation	91
Tabelle 4-17:	Reaktionsansatz für PCR	93
Tabelle 4-18:	PCR-Programme bei Verwendung der Primer EMCV2 und Neorev2	93
Tabelle 4-19:	PCR Programme bei Verwendung der Primer PGK2fwd und Neorev2.....	94

Danksagung

Wissenschaft: Es ist nicht ihr Ziel, der unendlichen Weisheit eine Tür zu öffnen, sondern eine Grenze zu setzen dem unendlichen Irrtum.

Bertolt Brecht (1898-1956), dt. Dramatiker u. Dichter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Dr. Nathalie Veith, Dr. Volker Hecht sowie Dr. Sevim Duvar in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik in der Abteilung Pharmazeutische Biotechnologie des Fraunhofer ITEM angefertigt. Mein besonderer Dank für die außerordentliche fachliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit im Bereich der Zelllinienentwicklung gilt Nathalie. Volker und Sevim möchte ich für die angeregten und kritischen Diskussionen danken. Insbesondere danke ich Volker für die engagierte Unterstützung bei den Kultivierungen und Versuchsplanungen.

Herrn Prof. Dr. Udo Rau und Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel danke ich herzlich dafür, dass sie diese Arbeit vor der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten. Herrn PD Dr. Hust danke ich für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Den Zelllinienentwicklern der PhB danke ich vornehmlich für die engagierte Hilfe und Einarbeitung. Den Kollegen der AG Zellkulturtechnik danke ich besonders für ihre technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt ferner allen Kollegen der Pharmazeutischen Biotechnologie in Braunschweig.

Dr. Kathrin Bohle und Dr. Corinna Lür danke ich besonders für die zahlreichen Diskussionen, dem steten Interesse an meiner Arbeit und den innovativen Anregungen. Für sein außerordentliches Vertrauen sowie seine uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit gilt mein besonderer Dank Dr. Holger Ziehr.

Für die zahlreichen Zellsortierungen sowie auch kreativen Diskussionen gilt Dr. Lothar Gröbe mein besonderer Dank.

Meiner Familie möchte ich insbesondere für die unbegrenzte und fortwährende Unterstützung und Ermutigung während meiner Ausbildung danken.

Ganz besonders danke ich Michael für sein Verständnis, seine ausnahmslose Geduld und Unterstützung.

