

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Danksagung.....	II
Abstract	III
Zusammenfassung.....	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Publikationen und Konferenzteilnahmen	XI
Glossar.....	XIII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung.....	3
3 Theoretischer Hintergrund.....	5
3.1 Extrazelluläre Vesikel	5
3.2 Die therapeutische Wirkung extrazellulärer Vesikel von MSCs	7
3.3 Herausforderungen der klinischen Translation von EV-Therapeutika	9
3.4 Einfluss des Mikroumfelds: MSCs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	11
3.5 Prozessüberlegungen für die Produktion von MSC-EV	15
3.5.1 Einfluss zellulärer Parameter auf MSC-EV	16
3.5.2 Einfluss von Zellkultur-Parametern auf MSC-EV	17
3.5.3 Einfluss der Produktionsplattformen auf MSC-EV	20
3.5.4 Einfluss von Scherung auf MSC-EV in dynamischen Systemen.....	22
3.6 Grundlegende Charakterisierung von Rührkesselreaktoren.....	23
4 Material und Methoden.....	27
4.1 Materialien, Chemikalien und Geräte.....	27
4.1.1 Zellen	27
4.1.2 Zellkulturrelevante Materialien	27
4.2 Kultivierungen.....	28
4.2.1 Kulturmedien und Stammhaltung	28
4.2.2 Statische Kultivierungen.....	29
4.2.2.1 Entwicklung eines Wachstumsmediums	29
4.2.2.2 Versuchsreihe zum Nachweis funktionaler MSC-EP	30
4.2.2.3 Einfluss verschiedener Prozessparameter.....	31
4.2.2.4 Statische Wachstums- und Partikelproduktionskinetik	33
4.2.3 Dynamische Kultivierung in Spinnerflaschen.....	33
4.2.3.1 Mikroträger-Untersuchung	33
4.2.3.2 Sphäroid-Bildung	34
4.2.3.3 Erhöhte Rührerdrehzahlen in Spinnerflaschen	35

4.2.4	Dynamische Kultivierung im 1 L Rührkesselreaktor.....	35
4.2.4.1	Normbedingungen	35
4.2.4.2	Hypoxie	36
4.2.4.3	Machbarkeitsstudie.....	36
4.2.4.4	Erhöhte Rührerdrehzahl	36
4.3	Entwicklung des <i>Scratch</i> -Moduls	37
4.4	Charakterisierung des Rührkesselreaktors	38
4.4.1	Minimale Rührerdrehzahl	38
4.4.2	Volumetrischer Leistungseintrag	39
4.5	Analytische Methoden	40
4.5.1	MSC-Charakterisierung.....	40
4.5.1.1	Wachstumseigenschaften.....	40
4.5.1.2	Morphologische Charakterisierung	41
4.5.1.3	Metabolismus	41
4.5.1.4	MSC-Oberflächenmarker.....	42
4.5.1.5	Lebend-/Totfärbung	42
4.5.1.6	Hypoxie-Färbung.....	42
4.5.2	Partikel-Charakterisierung.....	43
4.5.2.1	Konzentrations- und Größenbestimmung mittels NTA	43
4.5.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels Durchflusszytometrie	44
4.5.2.3	EV-Oberflächenmarker	44
4.5.2.4	Migrations-Assay	45
4.6	Statistik.....	45
5	Ergebnisse und Diskussion.....	47
5.1	Screening eines Basal- und Wachstumsmediums für MSCs und MSC-EP	48
5.2	Entwicklung von MSC-EV-Analysemethoden	52
5.2.1	Nachweis von MSC-EV	52
5.2.2	Nachweis einer Funktionalität – Entwicklung eines Migrations-Assays.....	54
5.3	Prozessentwicklung im statischen System – Einfluss kritischer Prozessparameter	63
5.3.1	Wachstumsoberfläche.....	63
5.3.2	Wachstumsmedium.....	65
5.3.3	Animpfzelldichte	67
5.3.4	MSC-Wachstumsphase und finale Zelldichte	69
5.3.5	Kultivierungstemperatur	71
5.3.6	Hypoxie.....	73
5.3.7	Wachstums- und Partikelproduktionskinetik	77
5.4	Prozessentwicklung in dynamischen Systemen.....	80

Inhaltsverzeichnis	IX
5.4.1 Screening einer Produktionsplattform für funktionale MSC-EP	80
5.4.1.1 Expansion von MSCs	80
5.4.1.2 Produktion von MSC-EP	82
5.4.1.3 Analyse von MSC- und MSC-EV-spezifischen Markern	85
5.4.1.4 Funktionalität von MSC-EP	87
5.4.2 Evaluierung eines 1 L Rührkesselreaktors zur Produktion von funktionalen MSC-EP	88
5.4.3 Hypoxische Bedingungen im Rührkesselreaktor	92
5.4.4 Produktion von funktionalen MSC-EP bei unterschiedlichen Scherbedingungen	96
5.4.4.1 Kurzzeit-Experiment: Spinnerflaschen als Screening-Plattform ...	96
5.4.4.2 Langzeit-Experiment: Spinnerflasche	98
5.4.4.3 Prozesstransfer von Spinnerflasche in Rührkesselreaktor	102
5.4.4.4 Machbarkeitsstudie in Rührkesselreaktor	106
5.4.4.5 Langzeit-Experiment: Rührkesselreaktor	108
5.4.5 Gesamtausbeute des STR-Prozesses an funktionalen MSC-EP	112
5.5 Fazit und Zusammenfassung	112
6 Generelle Überlegungen und Ausblick	115
Literaturverzeichnis	119
Abbildungsverzeichnis	148
Tabellenverzeichnis	155
Anhang.....	157