

**Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
(TERM)**

**des Universitätsklinikums Würzburg
Kommissarische Leitung: Professor Dr. Jürgen Groll**

**Entwicklung und Validierung eines quantitativen Verfahrens zur
Beurteilung der Viabilität von entsprechend der GMP-Richtlinien
hergestellter Knorpelimplantate für das Knie**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Gabriel Bleuel
aus Petersberg**

Würzburg, Februar 2021

Referent: Priv.-Doz. Dr. Oliver Pullig
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Groll,
i.V. Prof. Dr. med. Matthias Eyrich
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Störk

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2021

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gelenknorpel	2
1.2 Aktuelle Behandlungsmethoden	4
1.2.1 Zellfreie Behandlungsmethoden	4
1.2.2 Zellbasierte Behandlungsmethoden	5
1.3 Tissue Engineering von Knorpelimplantaten	7
1.4 Regulatorische Rahmenbedingungen	8
1.5 Aktueller Stand: Viabilitätstests für Zellen und Gewebe	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothese	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Biologisches Material	12
Tabelle 1 listet jegliches im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete biologische Material inklusive des Herstellers und der Codierung auf.....	13
2.1.2 Medien und Supplemente	13
Tabelle 2 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Chemikalien und Lösungen inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.	14
2.1.3 Laborbedarf	14
Tabelle 3 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Labormaterial inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.	15
2.1.4 Kits	15
Tabelle 4 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Kits inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.	15
2.1.5 Laborgeräte und -software	15
Tabelle 5 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Laborgeräte und Software inklusive des Herstellers auf.	16
2.2 Methoden	16

2.2.1	CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit	16
2.2.2	Simulierte Herstellung von N-TEC Mini-Knorpelimplantaten	19
2.2.3	Statistische Auswertung	23
3.	Ergebnisse	24
3.1	Robustheit der Methode: Stabilität des Analyten	24
3.2	Linearität der Absorptionsmessung	25
3.3	Potenzielle Auswirkungen auf die Absorptionsmessung	27
3.4	Nachweisbarkeit der LDH aus einer Knorpelmatrix im Nährmedium	29
3.5	Lysefähigkeit des Lysepuffers für dreidimensionale Gewebe	33
3.6	Erstellung einer Eichkurve	46
3.7	Validierung der entwickelten Methode nach GMP-Richtlinien	50
3.7.1	Risikoanalyse	51
3.7.2	Validierungsparameter	52
3.7.2.1	Robustheit	52
3.7.2.2	Linearität	53
3.7.2.3	Genauigkeit	53
3.7.2.4	Präzision	53
3.7.2.5	Spezifität	54
3.7.2.6	Der Arbeitsbereich	54
3.7.2.7	Referenz- und Kalibrierungsstandard	54
3.7.3	Durchführung der Validierung	55
3.7.4	Ergebnisse der Methodvalidierung	58
4.	Diskussion	62
4.1	Einfluss des Herstellungsprozesses auf LDH und Nachweisbarkeit im Nährmedium	62
4.2	Erstellung der Eichgerade für die Beurteilung des Freigabeproduktes	65
4.3	Validierung der Methode	66
5.	Zusammenfassung	68
6.	Summary	69

7. Literaturverzeichnis	70
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
IV Danksagung.....	
V Lebenslauf.....	

1. Einleitung

Die rasche Evolution der Medizin innerhalb des 20. und 21. Jahrhunderts hat zu einer deutlichen Steigerung der weltweiten Lebenserwartung geführt. Die meisten Entwicklungen beziehen sich auf moderne technische Gerätschaften, neuartige Operationsmethoden sowie intensivmedizinische Versorgungsmöglichkeiten. Aktuell müssen die meisten Therapien als Reparatur betrachtet werden. Der ursprüngliche Gesundheitszustand kann hierbei nur in den seltensten Fällen wiederhergestellt werden. Großes Potenzial wird der sich jüngst entwickelten regenerativen Medizin zugesprochen. Diese beschäftigt sich, mithilfe aktueller Erkenntnisse im Bereich molekularbiologischer Prozesse, mit der funktionellen Wiederherstellung von geschädigten Organen und Geweben (Riedel et al. 2008).

Einen hohen Stellenwert in der regenerativen Medizin nimmt das sogenannte Tissue Engineering (TE) ein. Die wesentlichen Bestandteile des TE sind lebende Zellen und deren Kultivierung, der Einsatz biokompatibler Gerüste sowie die Verwendung bioaktiver Substanzen. Die Zellen werden meist durch eine Biopsie gewonnen, im Rahmen der Zellkultivierung vermehrt und je nach Herstellungsprozess auf Gerüsten zu dreidimensionalen Gewebestrukturen kultiviert (Kai et al. 2013). Neben aktuellen Forschungen zur Herstellung vollständiger Organe, befasst sich die regenerative Medizin mit dem Ersatz von vergleichsweise einfach aufgebautem Gewebe, beispielsweise von Knorpel.

Laut den Diagnosedaten der Krankenhäuser (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2020) wurden im Berichtsjahr 2018 über 400.000 Fälle von Arthrosen und Chondropathien in Deutschland diagnostiziert. Ursache hierfür können Sportverletzungen, Unfälle, Überbelastungen und Verschleißerscheinungen sein. Die Zahlen verdeutlichen die Relevanz der Thematik und den Forschungsbedarf nach funktionellen und regenerativen Behandlungsmethoden. Die gestiegene Lebenserwartung sowie die stetige Zunahme des Körpergewichtes, hat deutlich zu dieser Entwicklung beigetragen.

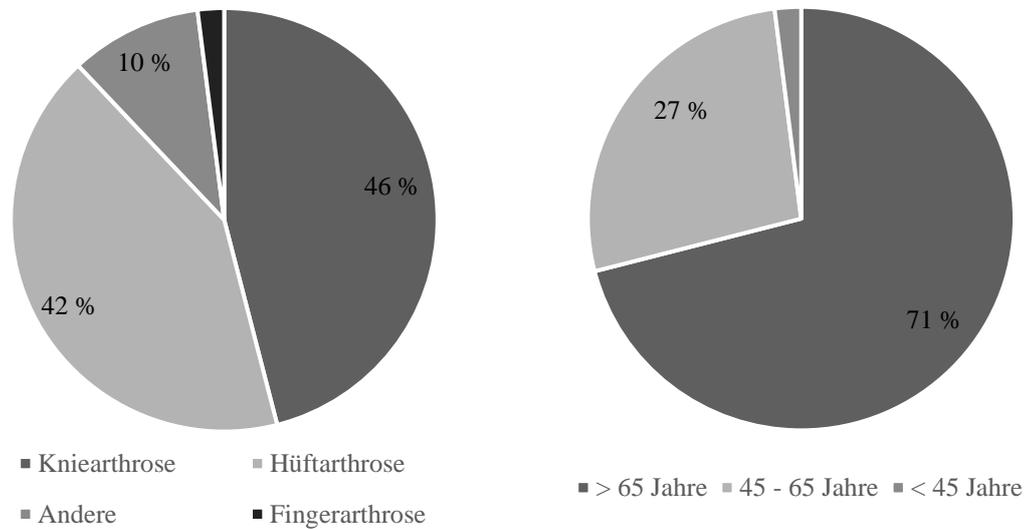


Abbildung 1 Arthroseerkrankungen in Deutschland. Verteilung nach betroffenem Gelenk (links). Verteilung der Kniearthrosen nach Alter (rechts). Abbildung eigens erstellt auf Basis von (GBE-Bund 2019).

Abbildung 1 veranschaulicht, dass der Großteil der diagnostizierten Kniearthrosen der Alterskohorte von über 65-Jährigen zuzuordnen ist. Als hauptsächlich betroffene Gelenke können mit knapp 90 % das Hüft- und Kniegelenk genannt werden.

Die Schwierigkeit einer funktionellen und langfristig erfolgreichen Therapie ist der physiologischen Komplexität des Kniegelenks geschuldet. Knochen, Sehnen, Bänder, Menisken und Muskeln müssen perfekt aufeinander abgestimmt sein. Der Knorpel fungiert hierbei als Schutzfunktion der Epiphyse. Er gewährleistet in gesundem Zustand ein reibungsreduziertes Gleiten der Gelenkflächen sowie eine Dämpfung und Verteilung einwirkender Kräfte bei Bewegungen. Diese Kräfte erreichen hohe Belastungswerte und betragen durchschnittlich das 3,5-fache des Gesamtkörpergewichtes (Darling et al. 2003).

1.1 Gelenkknorpel

Menschlicher Knorpel ist ein Stützgewebe, welches durch seine Eigenschaften vielfältige Aufgaben im Körper erfüllt. Die von den Chondrozyten gebildete Knorpelmatrix unterscheidet sich je nach Knorpelart und ist maßgeblich an der Funktion des

Knorpelgewebes beteiligt. Die Hauptkomponenten des Knorpels sind Kollagen, Proteoglykane, Wasser und Ionen (Mow et al. 1999). Je nach physiologischer Anforderung an den Knorpel können durch eine variierende Zusammensetzung dieser Komponenten unterschiedliche Verformbarkeits-, Reiß- und Druckelastizitätswerte erreicht werden. Der im menschlichen Körper vorkommende Knorpel kann in drei Untergruppen eingeteilt werden. In den Gelenken, der Nase, den Rippen und der Trachea befindet sich vorwiegend hyaliner Knorpel. Elastischer Knorpel ist hauptsächlich an der Ohrmuschel, im Kehlkopf sowie in den kleinen Bronchien vorzufinden. Die Gelenkscheiben, -menisken und -lippen bestehen aus Faserknorpel (Benninghoff et al. 2008). Die vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich hyalinen Nasen- und Gelenkknorpel, sodass der Faserknorpel und der elastische Knorpel nicht weiter berücksichtigt werden.

Aus den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks entwickelt sich hyaliner Knorpel. Während in der Entwicklungsphase zahlreiche Blutgefäße das Knorpelgewebe versorgen, ist ausdifferenzierter Knorpel frei von Gefäßen und Nerven. Das Hauptvolumen des Gewebes besteht aus Knorpelmatrix, der zelluläre Anteil beträgt lediglich 1-2 % des Gesamtvolumens. Die in die Matrix eingebetteten Chondrozyten ermöglichen eine belastungs- und reizbedingte Adaption des Knorpels. Der Knorpelstoffwechsel ist anaerob und erfolgt über Diffusion aus den subchondralen Kapillaren und der Synovialflüssigkeit (Hunziker et al. 2002). Die gefäßfreie und dadurch eingeschränkte Versorgung sowie der geringe zelluläre Anteil, erklären die stark limitierte körpereigene Regenerationsfähigkeit untergegangenen Knorpelgewebes. Keine, oder eine nur unzureichende, Regeneration und Therapie von Knorpeldefekten verursacht mit einer hohen Wahrscheinlichkeit chronische Schmerzen, kann zu Bewegungslimitation führen und verdoppelt das Risiko zur Ausbildung degenerativer Gelenkerkrankungen (Imhoff et al. 2007).

Nicht nur für den Körper selbst, sondern auch für die Medizin ist die Wiederherstellung funktionstüchtigen Knorpels eine große Herausforderung. Gewebeschäden, bedingt durch mechanische Einwirkungen sowie durch entzündliche und degenerative Prozesse, können durch konventionelle Methoden häufig nur unzureichend therapiert werden. Die

Folgen sind eine lange Rehabilitationsdauer, postoperative Komplikationen sowie hohe Kosten für die Krankenkassen (Jiang et al. 2011).

1.2 Aktuelle Behandlungsmethoden

Zur Behandlung von Knorpelschäden kann sich die Medizin aktuell verschiedener Therapiekonzepte bedienen. Durch eine orale Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten, kann in akuten Phasen vorübergehend eine Schmerzlinderung sowie eine Verringerung der Entzündungsreaktion erzielt werden. Diese rein symptomatische Behandlung führt weder zu einer Regeneration vorhandener Knorpeldefekte, noch kann es die Progredienz der Erkrankung verhindern. Alternativen stellen verschiedene (minimal-)invasive, kausale Therapiekonzepte dar (Makris et al. 2015).

Die Entscheidung für eine operative Methode erfolgt abhängig von Lokalisation und Größe der Läsion. Zur Auswahl stehen sowohl zellfreie als auch zellbasierte Techniken. Zu Beginn des Eingriffs wird ein KnorpelDébridement durchgeführt. Dieses schafft die Grundlage für eine definierte und formstabile Läsionsgrenze. Zu den zellfreien Behandlungen werden die Knochenmarkstimulation sowie der vollständige Ersatz des Gelenks durch synthetische Materialien gezählt. Die zellbasierten Ansätze werden in autologe Chondrozytenimplantationen (ACI) und matrixgestützte autologe Chondrozytenimplantationen (MACI) eingeteilt (Shah et al. 2007).

Neben Größe und Lokalisation des Defektes stellt der Patient selbst einen wichtigen Faktor bei der Entscheidung für oder gegen eine entsprechende Behandlungsalternative dar. So wirken sich das individuelle Bewegungsverhalten sowie bereits erfolgte Eingriffe auf den Regenerationsprozess und somit auf den langfristigen Behandlungserfolg aus (Steadman et al. 2003).

1.2.1 Zellfreie Behandlungsmethoden

Die Knochenmarkstimulation, auch Mikrofrakturierung genannt, findet bei Läsionsgrößen von weniger als 3 cm² Anwendung. Es handelt sich um eine Ein-Schritt-Methode. Zur Blutungsanregung werden im Bereich des Defektes 4 mm tiefe Löcher mit

geringem Durchmesser in den subchondralen Knochen gebohrt. Durch die Einblutung bildet sich neuer hyaliner Knorpel und Narbengewebe. Die Mikrofrakturierung kann, zumindest kurzfristig, zu einer deutlichen Reduzierung der Schmerzen und einem Rückgang der entzündungsbedingten Schwellung führen. Die Patientenzufriedenheit, bezogen auf Funktion und Beweglichkeit, suggeriert zunächst eine vielversprechende Behandlungsmethode. Bereits 18 Monate postoperativ treten jedoch erste Anzeichen einer Verschlechterung des Zustandes auf. Dies ist auf die Bildung fibrösen Ersatzgewebes zurückzuführen. Es überwiegt den neu gebildeten hyalinen Knorpelanteil und kann langfristig den ausgesetzten Belastungen nicht standhalten (Kreuz et al. 2006).

Die Knochenmarkstimulation kann durch den Abbauprozess des fibrösen Gewebes langfristig als nicht zufriedenstellend betrachtet werden. Bessere Ergebnisse werden durch eine matrixgestützte Mikrofrakturierung erzielt. Hierbei wird der Defekt nach der Blutungsanregung durch eine Kollagenmembran abgedeckt. Diese Membran soll das Einwachsen von Fibroblasten aus der Gelenkkapsel verhindern und verringert so den fibrösen Anteil des Ersatzgewebes zugunsten des hyalinen Knorpelanteils (Steinwachs 2009). Der Langzeiterfolg der Methode gilt als noch nicht ausreichend bestätigt (Viganò et al. 2019).

1.2.2 Zellbasierte Behandlungsmethoden

Autologe zellbasierte Therapien benötigen, im Gegensatz zu zellfreien Alternativen, mindestens zwei operative Eingriffe. Der erste Eingriff dient der Gewinnung eines Knorpelbiopsats aus nicht belasteten oder benötigten Gewebebereichen. Enzymatisch werden die Zellen isoliert und anschließend kultiviert. Ist eine ausreichende Zellzahl vorhanden, können die Knorpelzellen in einem zweiten Eingriff auf den Defekt transplantiert und mit einem Periostallappen abgedeckt werden (Ossendorf et al. 2011). Ein bedeutender Nachteil dieser Methode ist die Entstehung hypertrophen Gewebes im Bereich der Läsionsdeckung, sodass auch diese Behandlungsalternative nicht als optimal betrachtet werden kann (McCarthy et al. 2013).

Die zweite Generation zellbasierter Therapiekonzepte kombiniert die autologe Chondrozytentransplantation mit einer biokompatiblen Matrix. Hieraus entwickelte sich

das Konzept der matrixgestützten autologen Chondrozytentransplantation. Die aus dem Biopsat gewonnenen Zellen werden nicht mehr frei im Medium, sondern für wenige Tage in einem Gerüst kultiviert. Das entstehende dreidimensionale Gewebe kann defektorientiert zugeschnitten und anschließend transplantiert werden (Zeifang et al. 2010). Bei zellbasierten Therapiekonzepten der dritten Generation werden die Zellen deutlich länger kultiviert. Das entstandene Knorpelspheroid aus autologen Chondrozyten ist nach neun Wochen Kultivierungszeit implantierfertig (Jeuken et al. 2016). In einer Pressemitteilung (2017) hat das Unternehmen CO.DON die EU-Marktzulassung ihres Chondrozytenspheroids für Defektgrößen von bis zu 10 cm² bekanntgegeben. Als Kritikpunkt ist die limitierte Einsatzfähigkeit durch die Beschränkung der Defektgröße auf maximal 10 cm² zu nennen.

Die beschriebenen Behandlungsalternativen weisen eine positive Entwicklung der Therapieresultate auf, als optimal können die aktuellen Methoden jedoch nicht angesehen werden. Kritisch zu bewerten sind die teils nur kurzfristig anhaltenden Behandlungserfolge, die Ausbildung hypertrophen Gewebes sowie die limitierte Anwendung auf kleine Knorpelläsionen.

Die Forschung nach langfristig suffizienten Therapien auch größerer Knorpeldefekte stellt daher noch immer ein zentrales Forschungsgebiet der Medizin dar. So befindet sich auch der Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin aus Würzburg in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Translationszentrum für Regenerative Therapien TLZ-RT und den klinischen Partnern in Würzburg, Basel, Mailand und Zagreb in einer Phase-II-Studie zur Entwicklung eines funktionellen Knieknorpelimplantates (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02673905). Das von der Europäischen Union geförderte Forschungsprojekt Bio-Chip zielt auf die Verringerung bisheriger Komplikationen sowie auf bessere Langzeiterfolge ab (<https://biochip-h2020.eu/the-project/>). Hierbei sollen zudem die bisherigen Limitationen der Läsionsgröße überwunden werden. Das Projekt hat eine Laufzeit von 2016-2020.

1.3 Tissue Engineering von Knorpelimplantaten

Die Idee der aktuellen Studie ist eine Kombination aus autologen Chondrozyten und biokompatiblen Gerüsten. Drei wesentliche Neuerungen sollen die bisherigen Therapieresultate optimieren:

- Die Biopsie erfolgt nicht im Knie, sondern in der Nase

Nasenknorpelzellen bilden wie Knieknorpelzellen den benötigten hyalinen Knorpel und sind daher als Zellquelle geeignet. Da Gewebeschäden mit entzündlichen Prozessen und einer Schwächung umliegenden Gewebes einhergehen, besteht bei den bisherigen Methoden die Gefahr, dass das Biopsat bereits geschwächt sein, oder Entzündungsmediatoren enthalten könnte. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Nasenknorpelzellen ist die lebenslange gute Proliferationsrate, von welcher auch ältere Patienten profitieren können. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Nasenknorpelzellen eine hochwertigere Quelle für die zellbasierte Implantatherstellung aufweisen als Knieknorpelzellen (Lehoczky et al. 2020; Pelttari et al. 2014).

- Im Bio-Chip-Projekt ist die Größe des Implantates nur durch die Fläche der verwendeten Kollagenmatrix limitiert

In der aktuellen Studie wird eine 30 x 40 mm große Kollagenmatrix verwendet. Alternativ steht eine 40 x 50 mm Variante zur Auswahl. Hieraus würde ein Knorpelimplantat mit einer Fläche von bis zu 20 cm² entstehen. Es könnten deutlich größere Läsionen als bisher versorgt werden.

- Bei dem Endprodukt handelt es sich bereits um gereiften Knorpel, sodass nicht mit der Ausbildung hypertrophen Gewebes gerechnet werden muss

Da die Entwicklung eines solchen Arzneimittels national und international strengen Regularien unterliegt, müssen diverse regulatorische Rahmenbedingungen bis zur Markteinführung eingehalten werden.

1.4 Regulatorische Rahmenbedingungen

Für die Kommerzialisierung eines Arzneimittels in Europa gelten die 2001 von der EMA veröffentlichten Regularien (2001/83/EG). 2007 erfolgte aufgrund voranschreitender wissenschaftlicher Erkenntnisse im Bereich des Tissue Engineerings eine Anpassung der Richtlinien (Regulation (EC) No. 1394/2007). Diese beinhalten Rahmenbedingungen für die Entwicklung und Herstellung von Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP). Hierbei gilt es zwischen verschiedenen Untergruppen zu differenzieren:

- Gentherapeutika sind biologische Arzneimittel, die rekombinante Nukleinsäuren enthalten oder aus ihnen bestehen. Sie werden mit der Absicht verabreicht, bestimmte Nukleinsäuresequenzen des Patienten zu entfernen, zu ersetzen, zu reparieren oder zu regulieren. Gentherapeutika können zur Therapie, Prophylaxe oder Diagnose eingesetzt werden, dabei stehen sie in direktem Zusammenhang zu bestimmten Nukleinsäuresequenzen.
- Somatische Zelltherapeutika bestehen aus substanziiell bearbeiteten Zellen oder Gewebe mit veränderten Merkmalen, Eigenschaften oder Funktionen. Auch unbearbeitetes Spendergewebe, welches im Empfängerbereich eine andersartige Funktion erfüllt, wird den somatischen Zelltherapeutika zugeordnet. Somatische Zelltherapeutika wirken durch metabolische, immunologische oder pharmakologische Prozesse. Sie werden zur Prophylaxe, Diagnose oder Behandlung von Krankheiten eingesetzt.
- Biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte sind Arzneimittel, welche biotechnologisch bearbeitete Zellen besitzen oder vollständig aus ihnen bestehen und zum Ersatz, der Wiederherstellung oder der Regeneration menschlichen Gewebes eingesetzt werden. Das Gewebeprodukt wurde entweder substanziiell bearbeitet oder erfüllt im Empfängerbereich eine neue Funktion.

- Kombinierte Arzneimittel für neuartige Therapien enthalten ein Medizinprodukt und zusätzlich viables Gewebe oder Zellen. Nicht lebensfähige Zell- und Gewebeanteile müssen eine Hauptwirkung auf den Patienten erzielen (Paul-Ehrlich-Institut 2012).

Die Zulassung von ATMPs im zentralisierten Zulassungsverfahren erfolgt durch die European Medicines Agency (EMA). Auf Bundesebene ist für die Genehmigung einer klinischen Prüfung und einer Krankenhausausnahme nach § 4b des Arzneimittelgesetzes (AMG) für ATMPs das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) zuständig. Die Beurteilung enthaltener Medizinprodukte erfolgt dagegen durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) (Walter et al. 2011). Wird ein Arzneimittel für Patienten hergestellt wird außerdem eine Herstellungserlaubnis nach § 13 AMG benötigt. Diese wird durch die zuständigen Landesbehörden erteilt und hierfür müssen die Richtlinien der Guten Herstellungspraxis (European Commission 2017) eingehalten werden.

Nach der Herstellung und vor der Freigabe eines ATMP werden aufgrund der Richtlinien und Gesetze eine Vielzahl von Tests zur Sicherstellung der Qualität, Sicherheit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels gefordert. Einen wichtigen Bestandteil stellt im Rahmen dieser Qualitätskontrolle der Viabilitätsnachweis der im Arzneimittel enthaltenen Zellen dar. Dieser Nachweis muss entsprechend der GMP-Vorgaben mit einer validierten Methode durchgeführt werden. Unter Validierung wird der dokumentierte Beweis verstanden, dass ein Prozess definierte Anforderungen, die sogenannten Akzeptanzkriterien, reproduzierbar erfüllen kann (European Commission 2017).

1.5 Aktueller Stand: Viabilitätstests für Zellen und Gewebe

Zur Viabilitätstestung von Zellen und Geweben stehen diverse Methoden zur Verfügung. Diese basieren auf Färbungen, Kolorimetrie und Fluorometrie sowie auf Lumineszenz.

Eine einfache und oft verwendete Methode ist die Bestimmung viabler Zellen durch Färbungen. Der Farbstoff kann nicht durch die intakte Zellmembran viabler Zellen diffundieren. Stark geschädigte oder tote Zellen hingegen stellen keine Barriere für den

Farbstoff dar, sie werden gefärbt. Als Farbstoff können Eosin, Kongorot, Erythrosin B sowie Trypanblau verwendet werden (Weisenthal et al. 1983). Nach der Färbung werden die viablen und toten Zellen in einem repräsentativen Volumen mit Hilfe eines Mikroskops manuell oder durch einen automatisierten Zellzähler gezählt und daraus eine Gesamtviabilität berechnet (Coligan et al. 2001). Auf Färbungen basierende Viabilitätstests sind nur für Zellsuspensionen geeignet. Die Viabilitätsbeurteilung eines dreidimensionalen Knorpelgewebes durch Färbungen ist mit vertretbarem Aufwand und ohne die (Teil-)Zerstörung des Produktes nicht repräsentativ durchführbar.

Die kolorimetrischen Methoden basieren auf der Messung biochemischer Marker. Bei Anwesenheit bestimmter Stoffwechselprodukte findet bei diesen Testverfahren eine Farbreaktion statt. Die Farbstoffkonzentration kann mit einem Kolorimeter gemessen werden. Exemplarisch sind für die am meisten gemessenen Stoffwechselprodukte die Succinatdehydrogenase (MTT-Assay), mitochondriale Enzyme (MTS, XTT, WST-Assay), die Lactatdehydrogenase (LDH-Assay) sowie ATP (NRU-Assay) zu nennen. Als vorteilhaft ist die objektive Messung durch ein Kolorimeter zu nennen, manuelle Zählfehler sind hierdurch ausgeschlossen. Problematisch ist auch bei diesen Testverfahren die Beschränkung auf eine Suspension, sodass direkt keine Zellen innerhalb dreidimensionaler Strukturen auf Viabilität beurteilt werden können (Aslantürk 2018).

Die fluorometrischen und luminometrischen Methoden entsprechen von der Grundidee den kolorimetrischen Testverfahren. Gemessen wird jedoch nicht die Farbintensität, sondern die Fluoreszenz oder Lumineszenz eines Markers. Als bekannteste Vertreter können der alamarBlue-Assay (Fluorometrie) und der ATP-Assay (Lumineszenz) genannt werden. Zwar bieten beide Assays bezüglich der Sensitivität Vorteile gegenüber den kolorimetrischen Assays, jedoch können auch mit diesen Testverfahren keine dreidimensionalen Gewebe hinsichtlich der Viabilität beurteilt werden (O'Brien et al. 2000).

Der Überblick über die verfügbaren Viabilitätstests macht deutlich, dass zwar eine Vielzahl an Methoden zur Auswahl stehen, keines dieser Verfahren jedoch dem Anspruch genügt, ein dreidimensionales Gewebe auf Viabilität beurteilen zu können.

1.6 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitshypothese

Aus den beschriebenen Unzulänglichkeiten der verfügbaren Testmethoden leitet sich das Ziel der vorliegenden Arbeit ab. Im Vordergrund stehen die Entwicklung und Validierung eines Verfahrens zur objektiven quantitativen Beurteilung der Viabilität eines dreidimensionalen Knorpelimplantates. Da dieses per Definition den kombinierten Arzneimitteln für neuartige Therapien zugeordnet wird, unterliegt die Entwicklung eines solchen Verfahrens strengen regulatorischen Rahmenbedingungen. Die Beurteilung der Viabilität in der Phase-II Studie erfolgt aktuell durch die histologische Bewertung eines Gewebeschnittes. Obwohl diese durch einen qualifizierten Pathologen durchgeführt wird, ergeben sich diverse Kritikpunkte. Die Beurteilung eines winzigen Ausschnittes, in einem subjektiven Beurteilungsverfahren, erfordert die dringende Entwicklung eines geeigneten und von den Prüfbehörden anerkannten alternativen Viabilitätstests (Walter et. al. 2011).

Es wurde eruiert, welche quantitativen und zugleich standardisierten Untersuchungsmethoden aktuell für Viabilitätstests angewendet werden. Zwar sind bisherige kommerziell erwerbliche Assays größtenteils nur für Zellsuspensionen oder für sehr kleine dreidimensionale Gewebe freigegeben, doch bieten sie einen ersten Anhaltspunkt für die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens.

Die folgenden Experimente beruhen auf der Hypothese, dass ein kolorimetrischer Assay, freigegeben für Zellsuspensionen, durch eine Modifikation der Durchführung auch für die Beurteilung der Viabilität dreidimensionalen Gewebes geeignet ist. Hierfür müssen einige Limitationen des Assays überwunden und die Anwendbarkeit bewiesen werden.

2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die Materialien aufgelistet, welche zur Durchführung der Versuche benötigt wurden. Im Anschluss erfolgt eine Beschreibung der durchgeführten Experimente.

2.1 Material

Zur Durchführung der Versuche wurden biologische Materialien, verschiedene Nährmedien und Supplemente für die Zellkultur, allgemeiner Laborbedarf, kommerziell erhältliche Test-Kits sowie Laborgeräte und -software verwendet.

2.1.1 Biologisches Material

Die verwendeten und analysierten humanen Chondrozyten entstammen aus verschiedenen Nasenknorpelbiopsien. Diese wurden durch die am Bio-Chip Projekt beteiligten Institutionen entnommen. Die Patientendaten wurden nicht an den Hersteller übermittelt, sondern mit Kürzeln codiert.

Tabelle 1 Verwendetes biologisches Material

Produkt	Hersteller	Codierung	Freigabedatum
N-TEC	TERM/Fraunhofer	30	13.05.2019
N-TEC	TERM/Fraunhofer	31	01.07.2019
N-TEC	TERM/Fraunhofer	32	01.07.2019
N-TEC	TERM/Fraunhofer	33	26.08.2019
N-TEC	TERM/Fraunhofer	36	07.10.2019
N-CAM	TERM/Fraunhofer	32	11.07.2019
N-CAM	TERM/Fraunhofer	33	11.07.2019
PFOA	TERM/Fraunhofer	A03	14.02.2020
PFOA	TERM/Fraunhofer	B03	14.02.2020
PFOA	TERM/Fraunhofer	A04	14.02.2020
PFOA	TERM/Fraunhofer	B04	14.02.2020

Tabelle 1 listet jegliches im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete biologische Material inklusive des Herstellers und der Codierung auf.

2.1.2 Medien und Supplemente

Bevor die Zellen auf der Kollagenmatrix ausgesiedelt werden konnten, musste zunächst eine ausreichende Zellzahl erreicht werden. Hierzu waren verschiedenen Nährmedien sowie Supplemente nötig. Nachdem die benötigte Zellzahl erreicht wurde, konnte die Kollagenmatrix besiedelt werden. Nach der Besiedelung waren andere Nährmedien nötig. Im Vordergrund stand nach der Besiedelung nicht mehr die Zellvermehrung, sondern die Anregung der Chondrozyten zur Synthese der Knorpelmatrix.

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Produkt	Hersteller	Katalognummer	Lot
AB-Serum	Blutspendedienst des BRK	600009	VA17087858 (Auftrags-Nr.)
Serumersatzpräparat		vertraulich	
Chondro-Gide	Geistlich Biomaterials	30939.9 / 500139	81900287
DMEM (1X) (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	gibco	10938-025	2067732
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile-filtered	Sigma-Aldrich	D8537-500ML	RNBH5601
FGF-2	R&D Systems	233-GMP-025	GAAH0617081
Glutamax	Thermofisher	35050-061	2037045 2042339
HEPES Buffer 1M	gibco	15630 056	2009419 2026999
Humanalbumin (HSA 20 %)	UKW Apotheke/ Kedrion	n.A.	173016
Humanes Insulin 100 I.E./ml	UKW Apotheke/ Actrapid	PZN 00536433	G37D79 GR7B700

L-Ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-Aldrich	A8960	SLBC7699
L-Lactate Dehydrogenase (L-LDH)	Roche	10107085001	14100844
Sodium Pyruvate MEM 100 mM	Thermofisher	10938-025	2028919 2088876
TGFβ-1	Promocell	C63500	445P088
Trypan Blue Solution	gibco	15250061	1829084
TrypLE Select (10X)	gibco	A12177-01	2001382

Tabelle 2 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Chemikalien und Lösungen inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.

2.1.3 Laborbedarf

Die Labormaterialien waren bis auf wenige Ausnahmen Einwegartikel und wurden hauptsächlich zur Zellkultur benötigt.

Tabelle 3 Verwendetes Labormaterial

Einwegmaterial	Hersteller/ Lieferant	Katalognummer	Lot
0,2 µm Sterilfilter	Sartorius	No.83.1826.001	81997102
Kunststoff-Spritzen	BD Plastipak	BD 300 629	1802252
Cellstar Pipette 5 ml	greiner bio-one	606 180	F190633K
Cellstar Pipette 10 ml	greiner bio-one	607 180	F190536K
Cellstar Pipette 25 ml	greiner bio-one	760 180	F190433L
Cellstar Pipette 50 ml	greiner bio-one	768 180	F1810344
Cellstar Tubes 15 ml	greiner bio-one	188 271	E19053M7
Cellstar Tubes 50 ml	greiner bio-one	227 261	E19073BQ
Cryo.s 2 ml (blau)	greiner bio-one	126279	E18083R7
Cryo.s 2 ml (grün)	greiner bio-one	126277	E18073GP
Cryo.s 2 ml (rot)	greiner bio-one	126280	E18083HK
Cryo.s 2 ml (weiß)	greiner bio-one	126263	E190136S
Kanülen	B Braun	4665791	16C19GA841
SafeSeal Tubes 1,5 ml	Sarstedt	72.706	9082712

Stanzen 6 mm	pfm medical	48601	18E21
Sterile Pinzetten	UKW	-	-
Teflonblock	UKW	-	-
Zellkultur 24-well-Platten	TPP	Z707791	20180420
Zellkultur 96-well-Platten	TPP	Z707902	20170301
Zellkulturflasche 150	TPP	90151	20190234

Tabelle 3 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Labormaterial inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.

2.1.4 Kits

Die Messung des LDH-Gehaltes erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erwerblichen Test-Kits.

Tabelle 4 Verwendete Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer	Lot
CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay	Invitrogen	C20301	2056193
			2185019
			2141962A

Tabelle 4 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Kits inklusive des Herstellers und der Katalognummer auf.

2.1.5 Laborgeräte und -software

Zur Durchführung der Zellkultur, der Lagerung von Material sowie der benötigten Messungen wurden diverse Laborgeräte sowie -software benötigt.

Tabelle 5 Verwendete Laborgeräte und -software

Gerät / Software	Hersteller / Lieferant
10 µl, 100 µl, 1000 µl Pipette	Eppendorf
Accu-jet	Brand
Cell incubator: 37 °C, 5 % CO ² BBD 6220	Heraeus

Gefrierschrank Comfort	Liebherr
Handzähler	IVO
i-control	Tecan
Infinite M200 plate reader	Tecan
Kühlraum 4 °C	Genheimer, Kälte-Klima-Technik GmbH
Microsoft Office 365	Microsoft
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss
Multifuge X1R	Heraeus
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad yellow line	Et basic
Werkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein GmbH

Tabelle 5 listet jegliche im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Laborgeräte und Software inklusive des Herstellers auf.

2.2 Methoden

Ob der kolorimetrische CyQuant LDH Cytotoxicity Assay zur Viabilitätsbeurteilung von dreidimensionalem Gewebe verwendet werden kann, erforderte die Untersuchung verschiedener Aspekte. Für einige Experimente wurden gereifte Knorpelimplantate sowie ein geeigneter LDH-Standard, benötigt. Hiermit konnten Versuche zur Absorptionslinearität durchgeführt werden. Der im Kit enthaltene Lysepuffer, freigegeben für Zellsuspensionen, wurde auf Eignung für eine dreidimensionale Gewebelyse getestet. Da es sich bei dem Arzneimittel um gereiften Knorpel mit einer Knorpelmatrix handelt, musste zudem untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die LDH aus der Knorpelmatrix in das gemessene Nährmedium diffundiert und dort nachweisbar ist.

2.2.1 CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit

Das kommerziell erwerbliche Kit beinhaltet alle Substanzen, die für die kolorimetrische Bestimmung der LDH Konzentration in einer Lösung benötigt werden. Es ist für verschiedene Säugetierzellen anwendbar. Die LDH Konzentration im Medium ist ein

Indikator für die Anzahl irreversibel geschädigter Zellen. Die Zellmembran stellt für die intrazelluläre LDH dann keine Barriere mehr da, es diffundiert ins Medium und kann durch eine gekoppelt enzymatische Reaktion im Rahmen der Absorptionsbestimmung gemessen werden.

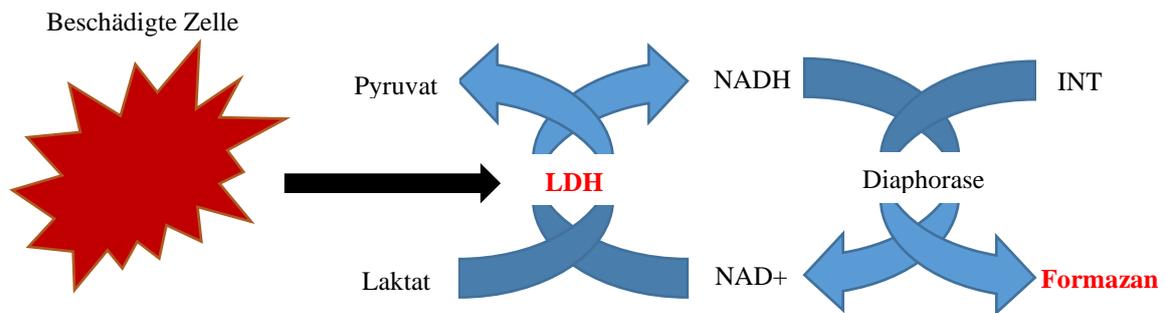


Abbildung 2 Gekoppelte Enzymreaktion zur Messung der LDH Konzentration (Eigene Darstellung)

Abbildung 2 veranschaulicht die Enzymreaktion, welche bei der Messung der LDH Konzentration mit dem LDH-Assay Kit stattfindet. Die von den beschädigten Zellen freigegebene LDH katalysiert die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat. Das hierbei abgegebene Wasserstoffatom reduziert NAD^+ zu NADH. Durch die Anwesenheit der Diaphorase wird NADH wieder zu NAD^+ oxidiert. Das abgegebene Wasserstoffatom reduziert farbloses Tetrazoliumsalz (INT) zu rotem Formazan. Bei einer Wellenlänge von 490 Nanometern kann die Konzentration des Farbstoffs durch die Absorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt werden. Die Farbstoffkonzentration ist abhängig von der LDH Konzentration, welche wiederum direkt proportional zur Anzahl der beschädigten Zellen ist (Invitrogen 2019).

Tabelle 6 Vorversuche für die Methodenentwicklung

Vorversuch	Versuchsaufbau
Stabilität des Analyten	<p>Für die Untersuchung der Stabilität des Analyten wurden 4 Überstände aus dem Herstellungsprozess im Reinraum verwendet. Die Absorption wurde am Freigabetag sowie an den darauffolgenden 4 Tagen gemessen. Zwischen den Messzeitpunkten wurden die Überstände analog zum Herstellungsprozess bei 37 °C im Brutschrank gelagert.</p>
Linearität zwischen Konzentration und Absorption	<p>Die Linearität wurde in 2 Durchläufen untersucht. Hierfür wurde ein kommerzieller LDH-Standard in unterschiedlichen Konzentrationen im Nährmedium verdünnt und anschließend mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen.</p>
Auswirkungen auf die Absorption	<p>Um potenzielle Fehlerquellen zu untersuchen, wurden Absorptionmessungen mit verschiedenen Kombinationen aus Kulturmedium, Wasser, Lysepuffer und Kollagenstanzen durchgeführt.</p>
Nachweisbarkeit und Wiederfindungswert des Analyten	<p>Der Herstellungsprozess wurde an Tag 23, im Rahmen des Mediumwechsels, manipuliert. Das Nährmedium wurde abgesaugt, auf die besiedelten Kollagenstanzen wurde eine definierte Menge LDH pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank wurden die nun mit LDH gespickten Stanzen mit ChM aufgefüllt. Die besiedelten Kollagenstanzen wurden bis zu Tag 26, dem Freigabetag, im Brutschrank kultiviert. Am Freigabetag wurde die LDH Konzentration im Medium mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen.</p>
Lysefähigkeit des Arzneimittels	<p>Am Freigabetag wurden die Knorpelimplantate für unterschiedliche Zeiträume mit dem Lysepuffer aus dem Assay Kit lysiert und anschließend die Absorption gemessen. Nach</p>

der angegebenen Lysedauer im Brutschrank wurde die LDH Konzentration im Medium mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen. Da zu erwarten war, dass durch die Lyse große Mengen LDH freigesetzt werden, wurde das Medium für die Messung verdünnt.

Tabelle 6 listet die durchgeführten Vorversuche der Methodenentwicklung auf. Der Versuchsaufbau wird in einer Kurzfassung dargelegt.

2.2.2 Simulierte Herstellung von N-TEC Mini-Knorpelimplantaten

Für einige Versuche wurden gereifte Knorpelimplantate benötigt. Diese wurden in einem simulierten Herstellungsprozess, mit verringerten Größenverhältnissen, hergestellt.

Tabelle 7 Umrechnung von Bio-Chip zu simulierter Herstellung

	Bio-Chip	6 mm Stanze in 24-well-Platte
Wachstumsfläche Scaffold [mm ²]	1200	28,274
Volumen Medium [ml]	40	0,942
Fläche Well [mm ²]	7580	186
Besiedelte Zellen [Mio.]	50	1,178
Besiedlungsvolumen [µl]	600	15

Tabelle 7 stellt die Umrechnung der Verhältnisse vom realen Herstellungsprozess im Reinraum zur simulierten Herstellung im Rahmen der Promotionsarbeit dar. Die Verhältnisse konnten realitätsgetreu umgerechnet und umgesetzt werden. Es ist daher keine Verzerrung der Ergebnisse zu erwarten. Die verwendeten Nährmedien wurden gemäß den Herstellungs-SOPs hergestellt.

Tabelle 8 Herstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen

Substrat	Bestandteil	Volumen
Serum Free Medium (SFM)	DMEM	500 ml
	Glutamax	5 ml
	Sodium Pyruvat	5 ml
	HEPES	5 ml
Culture Medium (CM)	SFM	500 ml
	AB-Serum	25 ml
Humanes Serumalbumin (HSA) 100x	DMEM	3,125 ml
	HSA 20 %	1,875 ml
HSA 1x	DMEM	49,5 ml
	HSA 100x	0,5 ml
TGF- β 1 working solution (TGF-ws)	HSA 1x	9,9 ml
	TGF- β 1	0,1 ml
FGF-2 working solution (FGF-ws)	HSA 1x	0,9 ml
	FGF-2	0,1 ml
Expansion Medium (EM)	CM	40 ml
	TGF-ws	0,4 ml
	FGF-ws	0,2 ml
Ascorbic acid 2-phosphate (AA)	DMEM	11,4 ml
	Ascorbic acid	33 mg
Chondrogenic Medium (ChM)	CM	38,5 ml
	AA	0,4 ml
	Insulin	0,1 ml

Tabelle 8 stellt die Umrechnung der Verhältnisse vom realen Herstellungsprozess im Reinraum zur simulierten Herstellung im Rahmen der Promotionsarbeit dar. Der simulierte Herstellungsprozess an der Werkbank wurde zeitlich analog zum Herstellungsprozess im Bio-Chip-Projekt durchgeführt. An Tag 0 wurden kryokonservierte Chondrozyten aufgetaut. Hierin unterschied sich die simulierte Herstellung vom realen Herstellungsprozess, in welchem keine kryokonservierten Zellen verwendet wurden. Die Zellen wurden mit 20 ml EM resuspendiert und in T150 Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert. An Tag 1 erfolgte der erste Mediumwechsel.

An Tag 5 wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurden vorab zwei 50 ml Tubes mit je 10 ml CM vorbereitet. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Kulturflaschen jeweils

mit 9 ml PBS gespült und die Überstände erneut abgesaugt. Das Ablösen der adhärenen Knorpelzellen erfolgte je Flasche mit 9 ml TrypLE 10x bei 37 °C und einer Dauer von 8 Minuten im Brutschrank. Die Kontrolle des Flaschenbodens erfolgte unter dem Mikroskop. Nicht gelöste Zellen wurden durch Klopfen an den Flaschenrand gelöst. Die Zellsuspension wurde in die vorbereiteten 50 ml Tubes pipettiert. Die Flaschen wurden mit CM gespült, sodass die verbliebenen Zellen ebenfalls in die Tubes pipettiert werden konnten. Die Tubes wurden bei 392 g vier Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebenen Zellpellets mit je 10 ml CM resuspendiert und anschließend gepoolt. 25 µl der gepoolten Zellsuspension wurden in einer 96-well-Platte mit 25 µl Trypanblau gemischt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

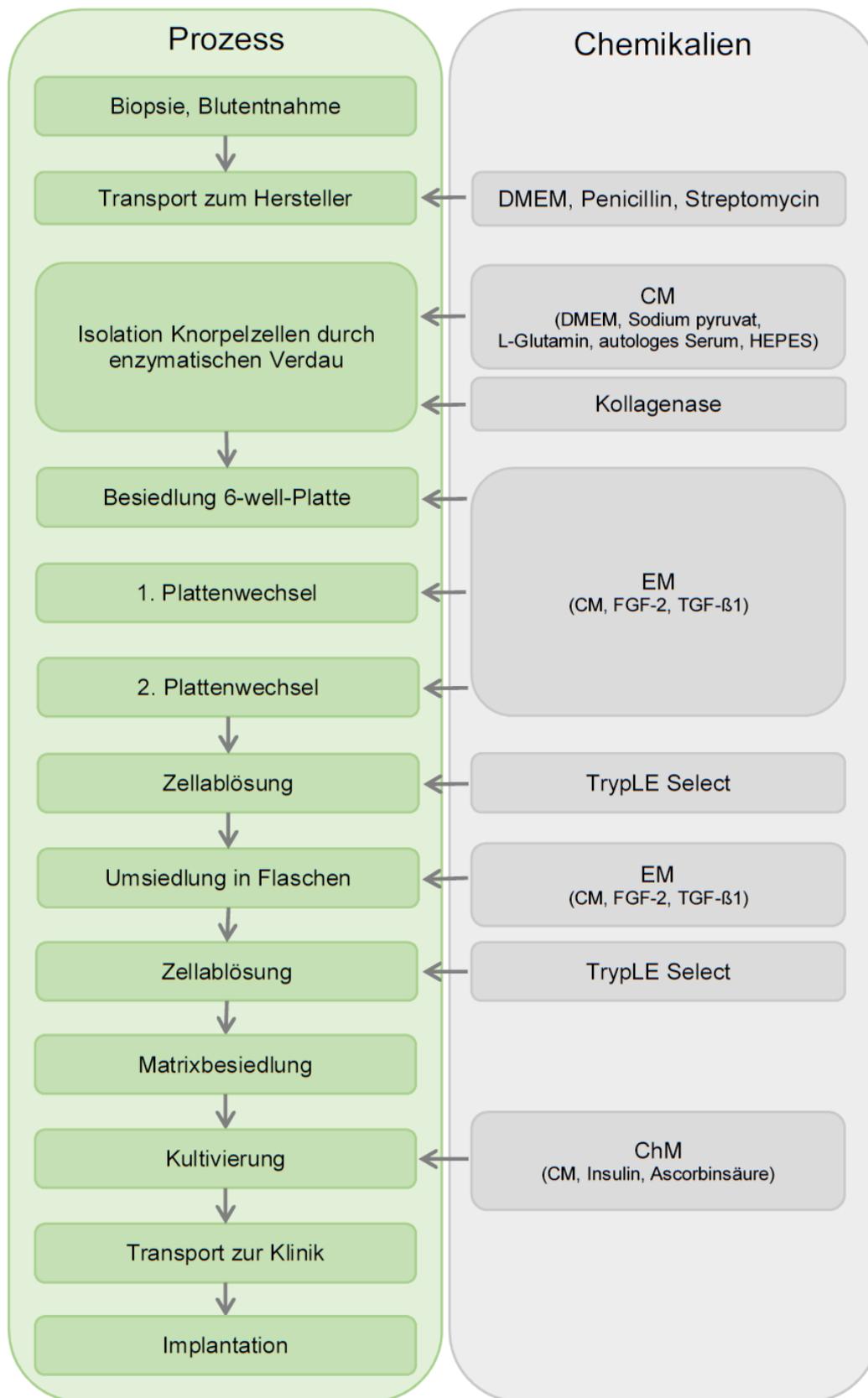


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses im Reinraum. Links: Prozessablauf. Rechts: Verwendete Chemikalien für den jeweiligen Prozess

Abbildung 3 stellt den Herstellungsprozess schematisch dar. Hierbei werden den Prozessabläufen die jeweils verwendeten Chemikalien zugeordnet. Sechs T150 Kulturfalschen wurden mit je 20 ml EM befüllt. Jede Flasche wurde mit 0,6 Millionen Zellen zur weiteren Kultivierung besiedelt. Am 9. Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Am Tag 13 wurden die Zellen erneut wie bereits beschrieben abgelöst, gezählt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zu einer Zellkonzentration von 1,178 Millionen Zellen/15 µl mit ChM resuspendiert. Anschließend erfolgte die Besiedlung der 6 mm Chondro-Gide Kollagenstanzen. Um ein Abschwämmen der Zellen zu verhindern, wurden die Stanzen in 24-well-Platten zunächst 90 Minuten im Brutschrank inkubiert und dann mit ChM aufgefüllt. Die 24-well-Platten wurden im Brutschrank gelagert. An den Tagen 16, 20 und 23 erfolgte ein Mediumwechsel. Am Tag 23 wurde für einige besiedelte Stanzen der Herstellungsprozess für den LDH-Nachweisbarkeitsversuch manipuliert.

2.2.3 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der durchgeführten Experimente wurde Microsoft Excel verwendet. Dieses beinhaltet die formelgestützte Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen, Bestimmtheitsmaßen sowie von Konfidenzintervallen.

3. Ergebnisse

Nach den in Tabelle 6 beschriebenen Vorversuchen wurde die Nachweisbarkeit der LDH aus beschädigten Zellen innerhalb einer 3D Knorpelmatrix untersucht. Anschließend wurde die Fähigkeit des Lysepuffers, dreidimensionale Knorpelstrukturen lysieren zu können, getestet. Auf Basis der Ergebnisse aus den Lyseversuchen konnte eine Eichkurve für eine quantitative Beurteilung der Viabilität hergestellter Knorpelimplantate generiert werden.

3.1 Robustheit der Methode: Stabilität des Analyten

Die Absorptionsmessung beruht auf dem Farbumschlag, welcher durch das Enzym LDH katalysiert wird. Es war daher notwendig, zunächst die Stabilität des Analyten zu untersuchen. Ist dieser im verwendeten Nährmedium bei 37 °C Kultivierungstemperatur nicht ausreichend stabil, so kann der LDH-Assay nicht als Freigabeinstrument verwendet werden.

Für die Untersuchung der Stabilität wurden 4 Überstände aus dem Herstellungsprozess im Reinraum verwendet. Die Absorption wurde am Freigabetag sowie an den darauffolgenden 4 Tagen gemessen. Zwischen den Messzeitpunkten wurden die Überstände analog zum Herstellungsprozess bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

Tabelle 9 Absorptionswerte Stabilitätsversuch

Überstand (n=3)	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
N-CAM 32	1,5566	1,4968	1,4262	1,4306	1,5566
N-CAM 33	1,4808	1,4642	1,3952	1,3137	1,4808
N-TEC 32	0,7517	0,7340	0,7014	0,6518	0,7517
N-TEC 33	0,8808	0,8591	0,7892	0,7618	0,8808

Tabelle 9 stellt die gemessenen Absorptionswerte nach 0 bis 4 Tagen dar. Aus den Werten ließ sich eine durchschnittliche Zerfallsrate von 2,64 % pro Tag bei 37 °C ermitteln. Nach

3 Tagen konnten noch 92,08 % der ursprünglichen LDH-Menge nachgewiesen werden. Der Analyt besitzt eine ausreichende Stabilität zur Anwendung des LDH-Assays.

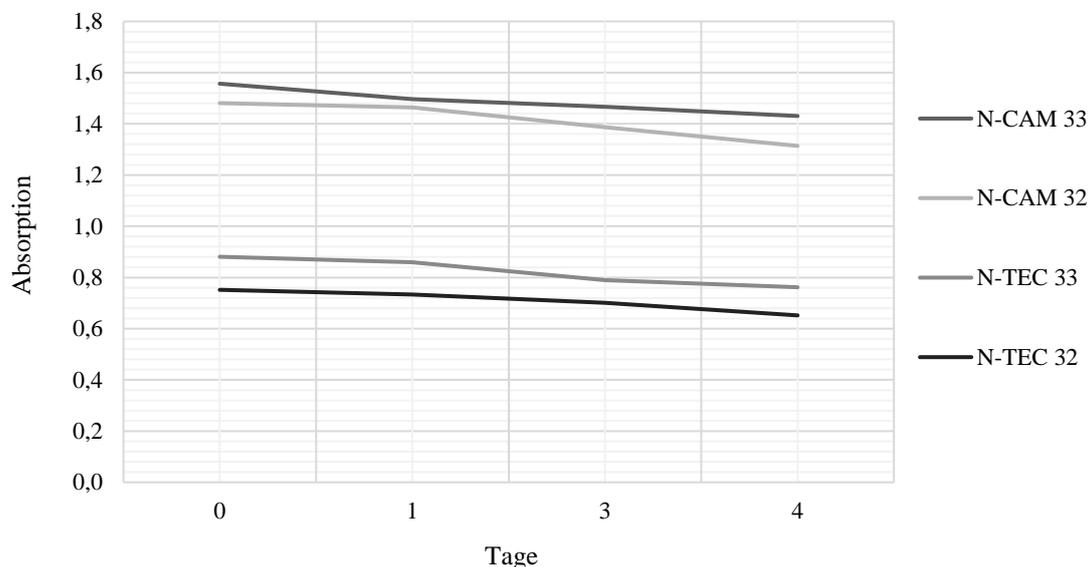


Abbildung 4 Graphische Darstellung der Absorption des Mediums im Verlauf von 4 Tagen

Abbildung 4 veranschaulicht die flach verlaufende Zerfallskurve des Analyten im Medium. Die am Freigabetag gemessene LDH Konzentration im Überstand muss auf die ursprünglichen 100 % hochskaliert werden.

3.2 Linearität der Absorptionsmessung

Grundvoraussetzung für die Entwicklung des Viabilitäts-Assays war der Nachweis einer linearen Beziehung zwischen der LDH Konzentration im Medium und der gemessenen Absorption. Eine lineare Beziehung war Voraussetzung für die Errechnung unterschiedlicher Viabilitätswerte. Die Linearität wurde in 2 Durchläufen untersucht. Hierfür wurde ein kommerziell erwerblicher LDH-Standard in unterschiedlichen Konzentrationen im Nährmedium verdünnt und anschließend mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen.

Tabelle 10 Absorption in Abhängigkeit zur LDH Konzentration

Verdünnung [LDH:CM]	Mittelwert (n=3)	Standardabweichung (n=3)
1:30.000	1,6071	0,0647
1:40.000	1,2680	0,0369
1:50.000	1,0943	0,0577
1:60.000	0,9106	0,0093
1:70.000	0,8205	0,0182
1:100.000	0,6293	0,0371
1:150.000	0,4782	0,0313
1:200.000	0,3762	0,0162
1:300.000	0,2913	0,0051
1:500.000	0,2159	0,0024
0	0,1024	0,0045

Tabelle 10 stellt die gemessenen Absorptionswerte sowie die Standardabweichung für verschiedene LDH Konzentrationen dar. Die Verdünnungen richteten sich nach den Bereichen der erwarteten Absorptionswerte für die nachfolgenden Experimente sowie den Absorptionswerten für die Überstände des Freigabeproduktes. Von besonderer Relevanz war der Bereich von 1:40.000 bis 1:70:000 da diese Absorptionswerte im Bereich einer Viabilität von 70 %, also der Mindestanforderung zur Freigabe des Produktes, entsprechen. Alle geringeren Absorptionswerte erfüllen diese Anforderung, sodass bei den Verdünnungen in diesen Bereichen größere Schritte gewählt werden konnten. Dennoch sind auch diese Verdünnungswerte zur Bestimmung des Linearitätsbereiches von Relevanz.

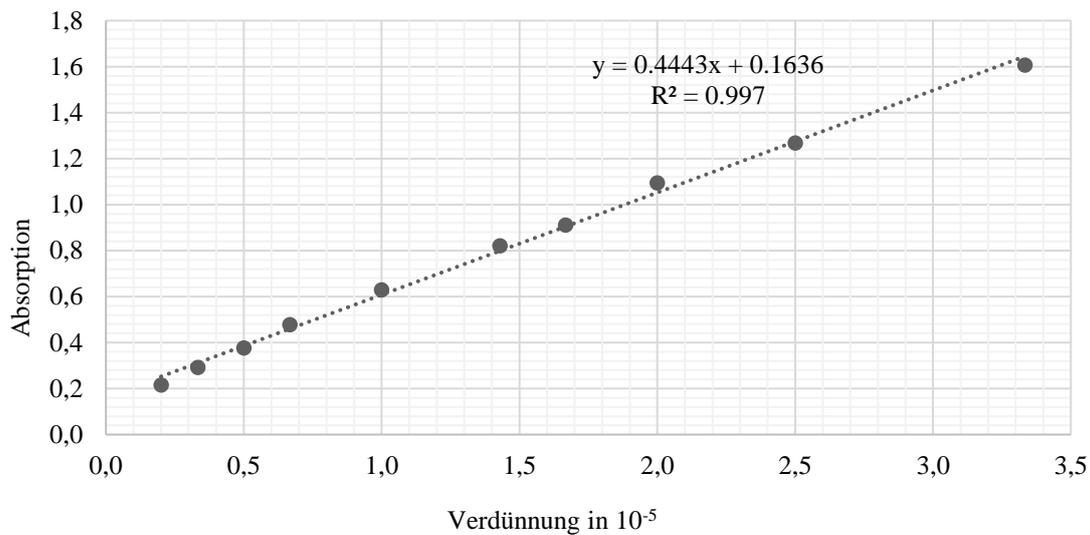


Abbildung 5 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängigkeit der LDH Konzentration

Abbildung 5 stellt die die Absorption in Abhängigkeit der LDH Konzentration dar. Eine Linearität konnte bei einer LDH Konzentration von 1:500.000 bis 1:30.000 mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,997$ nachgewiesen werden. Für die nachfolgenden Versuche wurde infolgedessen LDH in einer Verdünnung von 1:80.000 als Kontroll-Standard verwendet.

3.3 Potenzielle Auswirkungen auf die Absorptionsmessung

Verschiedene Substanzen können durch chemische Reaktionen oder Verdünnungseffekte Einfluss auf die Absorptionsmessung nehmen. Um diese Fehlerquellen zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. In einer 24-well-Platte wurde in 12 Wells 942 μ l Kulturmedium (CM) pipettiert. Jeweils in Triplikaten wurde zusätzlich Wasser, Wasser und eine unbesiedelte Kollagenstanze, Lysepuffer sowie Lysepuffer und eine unbesiedelte Kollagenstanze zu den Wells hinzugefügt.

942 µl CM 94 µl Wasser	942 µl CM 94 µl Wasser	942 µl CM 94 µl Wasser	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Wasser	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Wasser	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Wasser
942 µl CM 94 µl Lysepuffer	942 µl CM 94 µl Lysepuffer	942 µl CM 94 µl Lysepuffer	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Lysepuffer	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Lysepuffer	942 µl CM 6 mm Stanze 94 µl Lysepuffer

Abbildung 6 Versuchsplan zur Untersuchung potenzieller Auswirkungen auf die Absorptionsmessung

Abbildung 6 stellt den Versuchsplan zur Untersuchung potenzieller Auswirkungen auf die Absorptionsmessung schematisch dar. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen im Brutschrank wurde die LDH Konzentration mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen.

Tabelle 11 Messergebnisse zum Einfluss auf die Absorption

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Anteil an Kontrolle
CM + Wasser	0,0931	0,0024	0,9308 (1)
CM + Wasser + Stanze	0,0974	0,0063	0,9735 (2)
CM + Lysepuffer	0,0963	0,0028	0,9631 (3)
CM + Lysepuffer + Stanze	0,0978	0,0055	0,9777 (4)
Kontrolle: CM	0,1000	0,0013	1,0000

Tabelle 11 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen zur Bestimmung potenzieller Messeinflüsse dar. Die Anwesenheit des Lysepuffers sowie einer unbesiedelten Kollagenstanze, haben die Absorptionsmessung mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay nicht beeinflusst. Der geringe Absorptionsabfall bei der Zugabe von reinem Wasser (1) sowie von Lysepuffer (3), ist durch den Verdünnungseffekt zu erklären oder dadurch, dass die Absorption bereits unterhalb von 0,1 lag. Die trockene Kollagenstanze hingegen nimmt Flüssigkeit auf und erhöht hierdurch wieder geringfügig die LDH Konzentration im Nährmedium (2,4). Es konnte kein signifikanter

Absorptionsunterschied zwischen reinem Wasser und dem Lysepuffer festgestellt werden. Auch die Kombination aus Stanze und Lysepuffer beeinflusste die Messung nicht.

3.4 Nachweisbarkeit der LDH aus einer Knorpelmatrix im Nährmedium

Der Spikeversuch sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit LDH, welches von beschädigten Chondrozyten innerhalb einer Knorpelmatrix freigesetzt wird, ins Nährmedium diffundiert, im Vergleich zu LDH, das direkt in das Nährmedium appliziert wurde.

In Zellsuspensionen kann die LDH bereits kurz nach dem Zelltod im Nährmedium nachgewiesen werden (Invitrogen 2019). Ob und in welchem Ausmaß die LDH auch durch eine 13 Tage gereifte Knorpelmatrix ins Medium diffundiert, musste untersucht werden. Hierzu wurde der Herstellungsprozess an Tag 23, im Rahmen des Mediumwechsels, manipuliert.

942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	938 µl ChM 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH
942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	938 µl ChM 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH
942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	938 µl ChM 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH	938 µl ChM N-TEC 31 4,74 µl LDH

Abbildung 7 Versuchsplan LDH Spikeversuch mit besiedelten Stanzen (Patient N-TEC 31)

Abbildung 7 stellt den Versuchsplan zur Untersuchung der Wiederfindungsrate der LDH im Nährmedium dar. Das Nährmedium wurde abgesaugt, die Kontrollstanzen

ausgenommen und auf die noch feuchten besiedelten Kollagenstanzen wurde je 4,74 µl 1:400 verdünnte LDH pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank wurden die nun mit LDH gespikten Stanzen mit ChM auf ein Gesamtvolumen von 942 µl aufgefüllt. Die besiedelten Kollagenstanzen wurden bis zu Tag 26, dem Freigabetag, im Brutschrank kultiviert. Der Versuch mit den Zellen von Patient N-TEC 33 wurde identisch durchgeführt. Am Freigabetag wurde die LDH Konzentration im Medium mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen.

Tabelle 12 LDH-Messungen aus dem Spikeversuch (Patient N-TEC 31)

Substrat	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4961	0,0255		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4179	0,0280		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4394	0,0282		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4823	0,0084	1,4689	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4372	0,0361		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,5731	0,0098		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,4207	0,0241		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,3729	0,0143		
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,5805	0,0193		
Medium + LDH	0,5543	0,0229		
Medium + LDH	0,5953	0,0158		0,5805
Medium + LDH	0,5919	0,0218		
Besiedelte Kollagenstanze	0,9431	0,0157		
Besiedelte Kollagenstanze	0,7436	0,0077		
Besiedelte Kollagenstanze	0,7151	0,0031	0,8083	
Besiedelte Kollagenstanze	0,7356	0,0061		
Besiedelte Kollagenstanze	0,8809	0,0169		
Besiedelte Kollagenstanze	0,8315	0,0068		
Leerwert: CM	0,0869	0,0018		0,0869
LDH-Standard	0,8000	0,0081		

Tabelle 12 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des Spikeversuches für die Patientenzellen N-TEC 31 dar. Das Medium der besiedelten Kollagenstanzen wies im

Mittel eine Absorption von 0,8083, das gespikte Medium von 0,5805 auf. Die Summe der beiden Absorptionswerte ergab einen theoretischen Absorptionswert von 1,3888. Dieser Wert wurde mit der Absorption des Mediums der gespikten besiedelten Kollagenstanzen verglichen. Der Wiederfindungswert betrug 105,77 %.

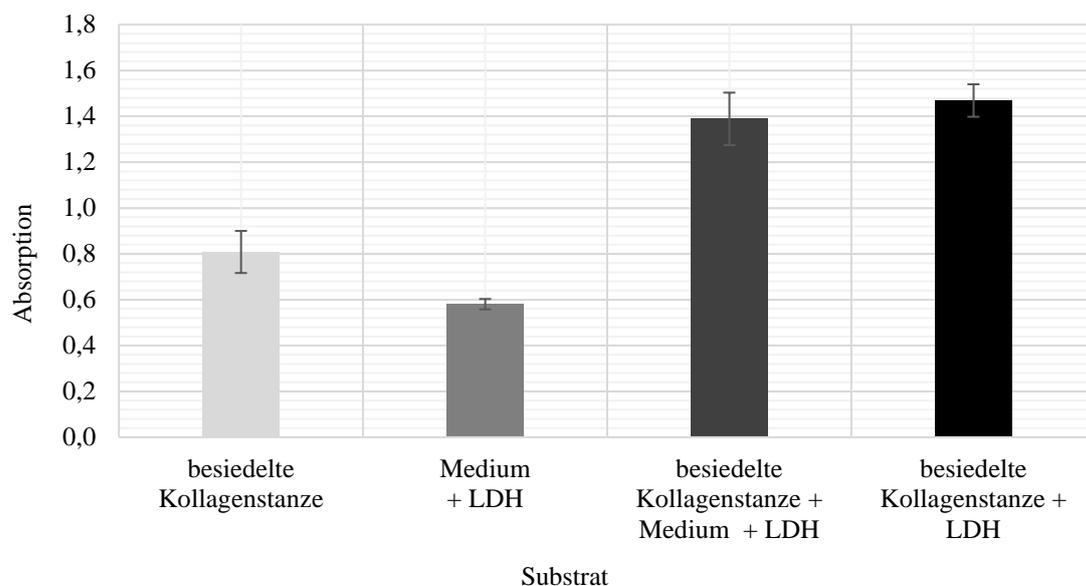


Abbildung 8 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe verschiedener Substrate für N-TEC 31

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse aus den Spikeversuchen für die Patientenzellen N-TEC 31 grafisch dar. Die Daten zeigen, dass die auf die besiedelten Kollagenstanzen pipettierte LDH nach 3 Tagen Kultivierung im Brutschrank für Patient N-TEC 31 in vollem Umfang im Nährmedium nachgewiesen werden konnte. Der Spikeversuch mit den Knorpelzellen von Patient N-TEC 33 ergab vergleichbare Ergebnisse.

Tabelle 13 LDH-Messungen aus dem Spikeversuch (Patient N-TEC 33)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert Gesamt (n=9)
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,0062	0,0313	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,1140	0,0845	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	0,9032	0,0223	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,0905	0,0312	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,1491	0,0517	1,1065
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,0760	0,0818	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,2199	0,0285	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,2008	0,0257	
Besiedelte Kollagenstanze + LDH	1,1990	0,0383	
Medium + LDH	0,5543	0,0229	
Medium + LDH	0,5953	0,0158	0,5805
Medium + LDH	0,5919	0,0218	
Besiedelte Kollagenstanze	0,5134	0,0255	
Besiedelte Kollagenstanze	0,4110	0,0239	
Besiedelte Kollagenstanze	0,4769	0,0317	
Besiedelte Kollagenstanze	0,4575	0,0225	0,4923
Besiedelte Kollagenstanze	0,5474	0,0369	
Besiedelte Kollagenstanze	0,5479	0,0196	
Leerwert: CM	0,0753	0,0031	0,0753
LDH-Standard	0,8000	0,0238	0,8000

Tabelle 13 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des Spikeversuches für die Patientenzellen N-TEC 33 dar. Das Medium der besiedelten Kollagenstanzen wies im Mittel eine Absorption von 0,4923, das gespikete Medium von 0,5805 auf. Die Summe der beiden Absorptionswerte ergab einen theoretischen Absorptionswert von 1,0728. Dieser Wert wurde mit der Absorption des Mediums der gespikten besiedelten Kollagenstanzen verglichen. Der Wiederfindungswert betrug 103,14 %.

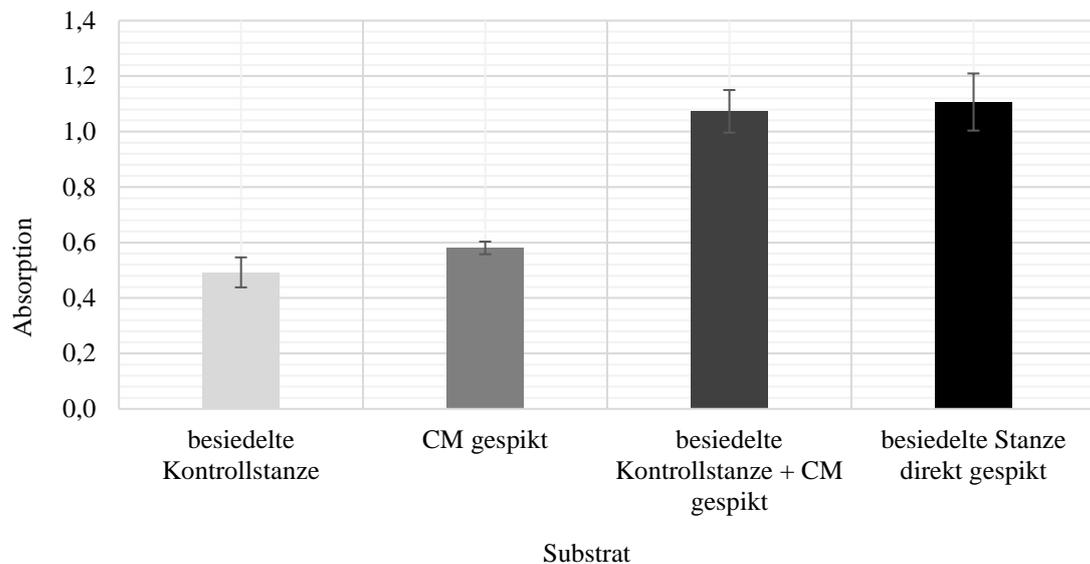


Abbildung 9 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe verschiedener Substrate für N-TEC 33 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung)

Abbildung 9 stellt die Ergebnisse aus den Spikeversuchen für die Patientenzellen N-TEC 33 grafisch dar. Die Daten zeigen, dass die auf die besiedelten Kollagenstanzen pipettierte LDH nach 3 Tagen Kultivierung im Brutschrank für Patient N-TEC 33 in vollem Umfang im Nährmedium nachgewiesen werden konnte. Da die Wiederfindungsrate für beide Versuche und mit verschiedenen Methoden mindestens bei 100 % lag, konnte davon ausgegangen werden, dass jegliche freigesetzte LDH, trotz gebildeter Knorpelmatrix, im Medium nachweisbar war.

3.5 Lysefähigkeit des Lysepuffers für dreidimensionale Gewebe

Der im Kit enthaltene Lysepuffer kann für die Lyse von Zellsuspensionen mit bis zu 100.000 Zellen/ml verwendet werden. Hierbei muss eine Lysedauer von 45 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C eingehalten werden (Invitrogen 2019). Für die Erstellung einer Eichkurve war die vollständige Lyse von 13 Tage gereiften Knorpelimplantaten notwendig. Da es sich im Bio-Chip Projekt um ein dreidimensionales Gewebekonstrukt handelt, in dem sich mehr als das zehnfache der empfohlenen Zellzahl befindet, musste der Lysepuffer auf Eignung getestet und die optimale Lysedauer ermittelt werden. Hierfür wurden erneut, wie bereits beschrieben, Mini-Knorpelimplantate hergestellt. Am

Freigabetag wurden die Knorpelimplantate für unterschiedliche Zeiträume mit dem Lysepuffer aus dem Assay Kit lysiert und anschließend die Absorption gemessen.

942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4 h
942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 24 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 24 h	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 24 h

Abbildung 10 Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 31)

Abbildung 10 stellt den Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten für die Patientenzellen N-TEC 31 grafisch dar. Nach der angegebenen Lysedauer im Brutschrank wurde die LDH Konzentration im Medium mit dem CyQuant LDH Cytotoxicity Assay gemessen. Da zu erwarten war, dass durch die Lyse große Mengen LDH freigesetzt werden, wurde das Medium für die Messung 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt. Das Ziel hierbei war die Messung von Absorptionswerten im Linearitätsbereich. Um die Lyseversuche miteinander vergleichen zu können und die Erstellung einer Eichkurve zu ermöglichen, wurde bei allen Messungen ein LDH-Standard mit einer Konzentration von 1:80.000 sowie CM mitgemessen.

Tabelle 14 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 31)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption	Standard-abweichung	Verdünnung nach d. Lyse
Knorpelstanze 1: 2h Lyse	0,7697	0,0343	1:5
Knorpelstanze 2: 2h Lyse	0,7927	0,0221	1:5
Knorpelstanze 3: 2h Lyse	0,7571	0,0303	1:5
Knorpelstanze 4: 4h Lyse	1,1721	0,0448	1:5
Knorpelstanze 5: 4h Lyse	1,3971	0,0432	1:5
Knorpelstanze 6: 4h Lyse	1,3328	0,0221	1:5
Knorpelstanze 7: 24h Lyse	0,9427	0,0075	1:5
Knorpelstanze 8: 24h Lyse	0,9388	0,0167	1:5

Knorpelstanze 9: 24h Lyse	0,7407	0,0121	1:5
Leerwert: CM	0,0892	0,0019	
LDH-Standard	0,8000	0,0046	

Tabelle 14 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des Lyseversuches für die Patientenzellen N-TEC 31 dar. Die LDH Konzentration stieg nach 4 Stunden Lyse über den 2 Stunden Wert an. Nach 24 Stunden sank der Wert bereits ab. Der Konzentrationsanstieg wurde zum einen auf die nach zwei Stunden noch unvollständige Lyse und zum anderen durch eine gewisse Diffusionsdauer der LDH durch die Knorpelmatrix ins Medium zurückgeführt. Der Konzentrationsabfall nach 24 Stunden könnte auf Wechselwirkungen des Lysepuffers mit der LDH zurückzuführen sein.

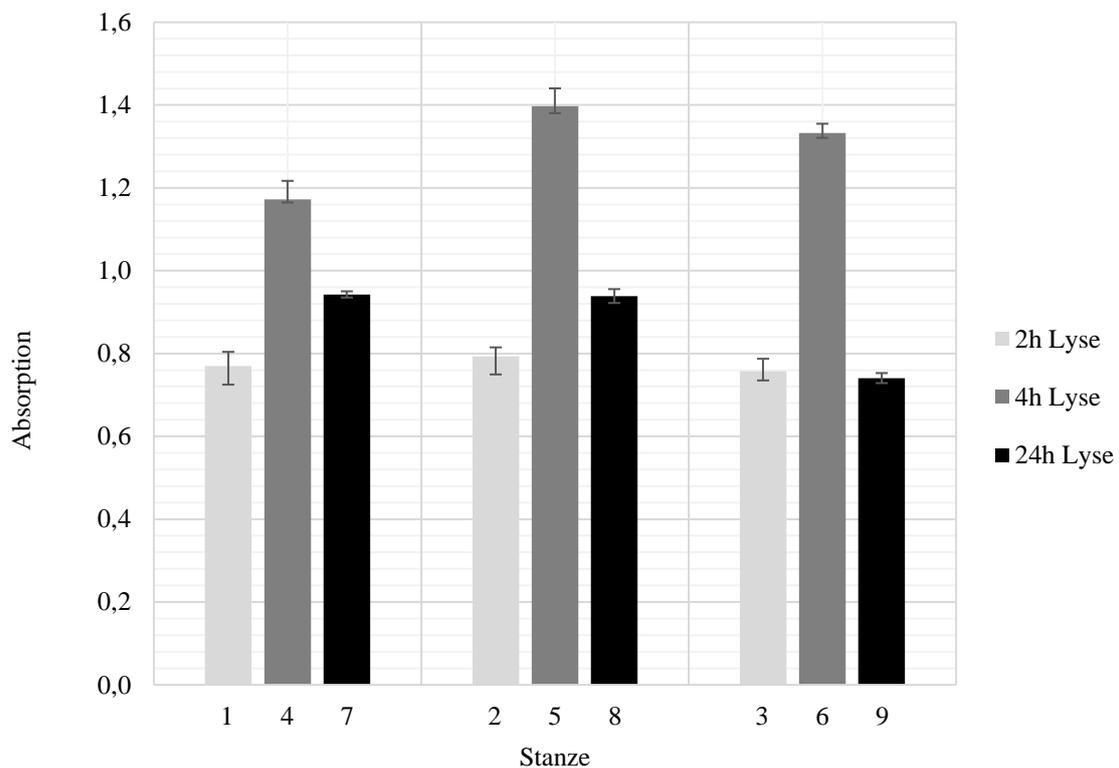


Abbildung 11 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für N-TEC 31 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).

Die Abbildung 11 verdeutlicht eine nicht hinreichende Lysedauer von 2 Stunden. Da jedoch der 24 Stunden Wert niedriger als der 4 Stunden Wert war, konnte kein Plateau erreicht werden.

Eine Verdünnung von 1:5 erwies sich als zu gering, da mit der Erreichung eines Plateaus mit höheren Absorptionswerten gerechnet werden musste. Der Lyseversuch für Patient N-TEC 31 konnte aufgrund dieser Unzulänglichkeiten nicht für die Erstellung einer Eichkurve herangezogen werden. Die neuen Erkenntnisse erforderten eine Modifikation des Versuchsaufbaus.

942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 2 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 4 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 4 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 4 h
942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 6 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 6 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 6 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 24 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 24 h	942 µl ChM N-TEC 33 Lyse 24 h
942 µl ChM N-TEC 33 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 33 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 33 KONTROLLE			

Abbildung 12 Modifizierter Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 33)

Abbildung 13 stellt den Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten für die Patientenzellen N-TEC 33 grafisch dar. Für die zweite Durchführung des Lyseexperiments wurden 12 Mini-Knorpelimplantate hergestellt. Die Verdünnung wurde auf 1:10 erhöht, zusätzlich wurde eine weitere Absorptionsmessung nach 6 Stunden Lyse durchgeführt.

Tabelle 15 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 33)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Verdünnung
Knorpelstanze 1: 2h Lyse	0,4185	0,0091	1:10
Knorpelstanze 2: 2h Lyse	0,3159	0,0062	1:10
Knorpelstanze 3: 2h Lyse	0,2808	0,0058	1:10
Knorpelstanze 4: 4h Lyse	0,6989	0,0297	1:10

Knorpelstanze 5: 4h Lyse	0,7194	0,0146	1:10
Knorpelstanze 6: 4h Lyse	0,6507	0,0318	1:10
Knorpelstanze 7: 6h Lyse	0,7413	0,0271	1:10
Knorpelstanze 8: 6h Lyse	0,7241	0,0183	1:10
Knorpelstanze 9: 6h Lyse	0,6477	0,0317	1:10
Knorpelstanze 10: 24h Lyse	0,6749	0,0113	1:10
Knorpelstanze 11: 24h Lyse	0,6588	0,0156	1:10
Knorpelstanze 12: 24h Lyse	0,5708	0,0055	1:10
Leerwert: CM	0,1170	0,0058	
LDH-Standard	0,8000	0,0239	

Tabelle 15 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des Lyseversuches für die Patientenzellen N-TEC 33 dar. Wie erwartet konnten durch die Verdünnung um den Faktor 10 Absorptionswerte zwischen 0,2 und 0,8 gemessen werden. In diesem Bereich können nach dem Lambert-Beer'schem Gesetz die genauesten Absorptionswerte gemessen werden (Hansen et al. 2012). Durch die zusätzliche Messung nach 6 Stunden Lyseeinwirkung konnte nachgewiesen werden, dass eine Lyse von 4 Stunden nicht ausreichend war, um die maximale LDH Konzentration im Medium bestimmen zu können. Nach 24 Stunden sank der Wert wie im vorangegangenen Durchlauf ab.

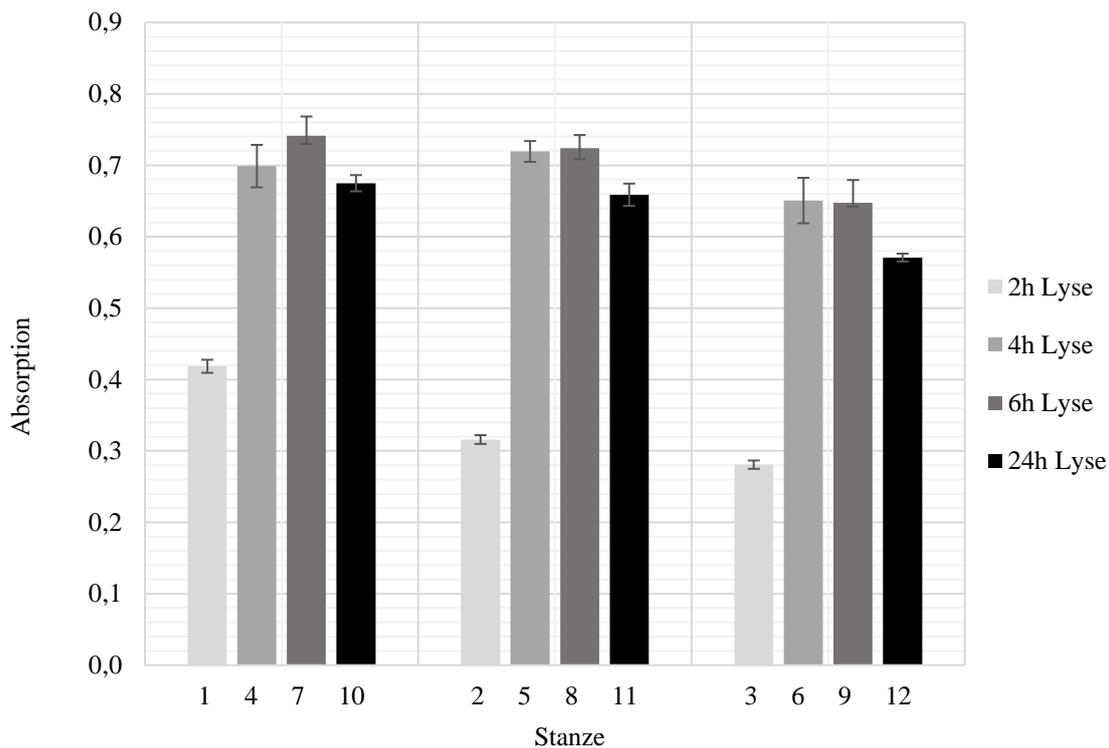


Abbildung 13 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für N-TEC 33 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).

Abbildung 13 erlaubt die Aussage, dass nach einer 6 stündigen Lyseeinwirkung ein statistisches Plateau der Absorptionswerte erzielt wurde. Da die Unterschiede der Absorptionswerte nach 4 und 6 Stunden sehr gering waren, erwies es sich als kritisch, dass an den jeweiligen Messzeitpunkten nicht das Medium derselben, sondern einer anderen lysierten Knorpelstanze verwendet wurde. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Schwankungen, aufgrund der Heterogenität der Kollagenmatrix, um generelle Unterschiede zwischen den Mini-Knorpelimplantaten handelte.

Durch den modifizierten Versuchsaufbau konnten einige Unklarheiten beseitigt werden. Problematisch erwies sich jedoch die Tatsache, dass verschiedene Mini-Knorpelimplantate zu den jeweiligen Zeiträumen gemessen wurden. Aufgrund der heterogenen Struktur der Kollagenmatrix sowie dem manuell durchgeführten Besiedlungsprozess, wiesen die Mini-Knorpelimplantate Unterschiede auf. Der Versuchsaufbau musste daher nochmals modifiziert werden. Auf eine

Konzentrationsmessung nach zwei und nach 24 Stunden konnte verzichtet werden. Stattdessen wurden zusätzliche Messungen nach 8 und 12 Stunden durchgeführt. Der Versuch wurde parallel für 3 Zellspender durchgeführt.

942 µl ChM N-TEC 30 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 30 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 30 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 31 Lyse 4-12 h 8478 µl CM
942 µl ChM N-TEC 36 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 36 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 36 Lyse 4-12 h 8478 µl CM	942 µl ChM N-TEC 30 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 31 KONTROLLE	942 µl ChM N-TEC 36 KONTROLLE

Abbildung 14 Modifizierter Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 30, 31, 36)

Abbildung 14 stellt den Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten für die Patientenzellen N-TEC 30, 31 und 36 grafisch dar. Um die Unterschiede zwischen den Mini-Knorpelimplantaten auszugleichen, wurden diese mit dem Überstand am Freigabetag in ein 15 ml Tube umgesetzt. Durch die Zugabe von CM wurde der Überstand um den Faktor 10 verdünnt. Anschließend wurde der Lysepuffer in die Tubes pipettiert. Die Inkubation erfolgte für die angegebene Dauer im Brutschrank. Die LDH Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten konnten bei diesem Versuchsaufbau jedes Mal mit dem Überstand derselben Knorpelstanze erfolgen. Hierfür wurden für die Triplikate am Messzeitpunkt 150 µl Medium aus dem Tube entnommen und die LDH Konzentration bestimmt. Die Tubes mit den Mini-Knorpelimplantaten wurden bis zum nächsten Messzeitpunkt für die weitere Lyse im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 16 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 30)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)
N-TEC 30: 4h Lyse	0,2394	0,0037	0,2598
N-TEC 30: 4h Lyse	0,3014	0,0326	

N-TEC 30: 4h Lyse	0,2385	0,0066	
N-TEC 30: 6h Lyse	0,3098	0,0062	
N-TEC 30: 6h Lyse	0,4304	0,0083	0,4092
N-TEC 30: 6h Lyse	0,4873	0,0098	
N-TEC 30: 8h Lyse	0,3495	0,0100	
N-TEC 30: 8h Lyse	0,4388	0,0044	0,4301
N-TEC 30: 8h Lyse	0,5019	0,0084	
N-TEC 30: 12h Lyse	0,3616	0,0119	
N-TEC 30: 12h Lyse	0,4061	0,0088	0,4198
N-TEC 30: 12h Lyse	0,4918	0,0184	
Leerwert: CM	0,0984	0,0017	
LDH-Standard	0,8000	0,0144	

Tabelle 16 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des modifizierten Lyseversuches für die Patientenzellen N-TEC 30 dar. Die höchste durchschnittliche LDH Konzentration konnte für Patient N-TEC 30 nach einer Lysedauer von 8 Stunden gemessen werden. Sie betrug 0,4301 und sank nach einer Lyse von 12 Stunden ab.

Tabelle 17 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 31)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)
N-TEC 31: 4h Lyse	0,5907	0,0110	
N-TEC 31: 4h Lyse	0,3927	0,0063	0,4089
N-TEC 31: 4h Lyse	0,2432	0,0050	
N-TEC 31: 6h Lyse	0,7404	0,0194	
N-TEC 31: 6h Lyse	0,6519	0,0122	0,6808
N-TEC 31: 6h Lyse	0,6499	0,0079	
N-TEC 31: 8h Lyse	0,7684	0,0269	
N-TEC 31: 8h Lyse	0,7006	0,0115	0,7500
N-TEC 31: 8h Lyse	0,7809	0,0012	
N-TEC 31: 12h Lyse	0,6924	0,0262	
N-TEC 31: 12h Lyse	0,6574	0,0191	0,7085
N-TEC 31: 12h Lyse	0,7756	0,0037	
Leerwert: CM	0,0984	0,0017	

LDH-Standard	0,8000	0,0144
--------------	--------	--------

Tabelle 17 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des modifizierten Lyseversuches für die Patientenzellen N-TEC 31 dar. Auch für den Patient N-TEC 31 wurde die höchste durchschnittliche LDH Konzentration nach 8 Stunden Lyseeinwirkung gemessen. Die deutlich höheren Absorptionswerte von 0,7500 sind einerseits auf Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der besiedelten Kollagenmatrix, andererseits auf die individuellen Proliferationseigenschaften der humanen Chondrozyten zurückzuführen.

Tabelle 18 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 36)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)
N-TEC 36: 4h Lyse	0,2949	0,0032	
N-TEC 36: 4h Lyse	0,1857	0,0015	0,2519
N-TEC 36: 4h Lyse	0,2752	0,0056	
N-TEC 36: 6h Lyse	0,4154	0,0031	
N-TEC 36: 6h Lyse	0,4329	0,0100	0,4351
N-TEC 36: 6h Lyse	0,4570	0,0058	
N-TEC 36: 8h Lyse	0,4304	0,0064	
N-TEC 36: 8h Lyse	0,4043	0,0156	0,4229
N-TEC 36: 8h Lyse	0,4341	0,0075	
N-TEC 36: 12h Lyse	0,4050	0,0035	
N-TEC 36: 12h Lyse	0,4124	0,0008	0,4267
N-TEC 36: 12h Lyse	0,4628	0,0262	
Leerwert: CM	0,0984	0,0017	
LDH-Standard	0,8000	0,0144	

Tabelle 18 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des modifizierten Lyseversuches für die Patientenzellen N-TEC 36 dar. Bei der Lyse der Mini-Knorpelimplantate von Patient N-TEC 36 wurde die durchschnittlich höchste LDH Konzentration nach 6 Stunden gemessen.

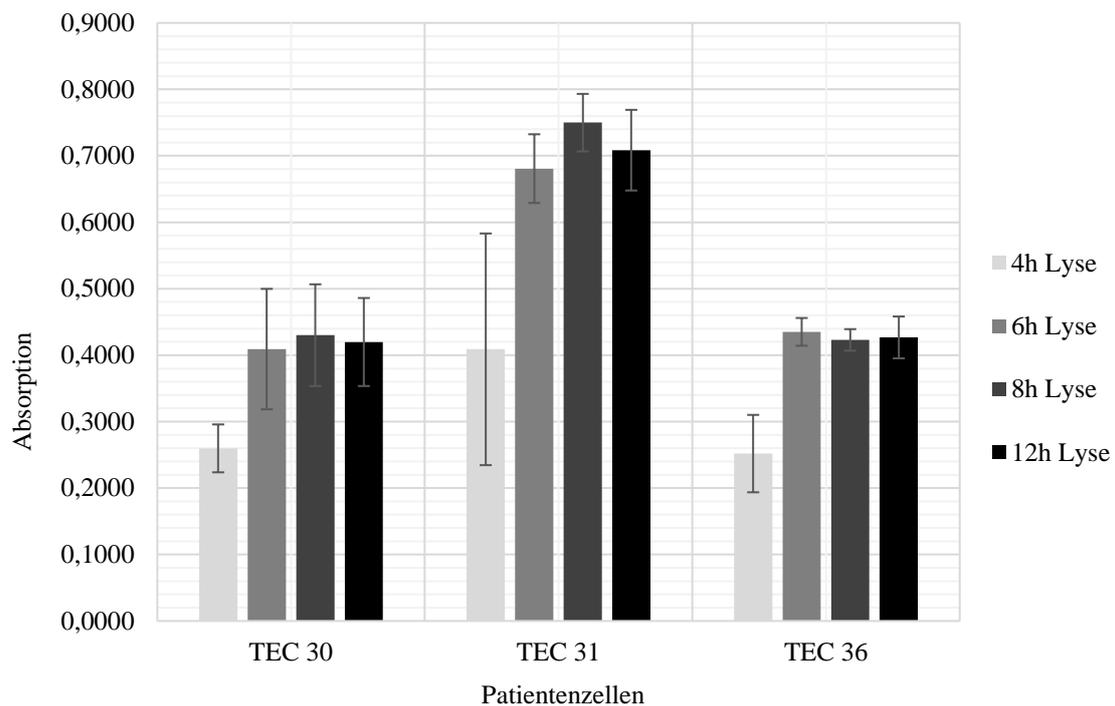


Abbildung 15 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantate für N-TEC 30, 31, 36 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).

Abbildung 15 verdeutlicht die Bildung eines Plateaus nach 6 bzw. 8 Stunden Lyseeinwirkung. Bei allen Mini-Knorpelimplantaten wurden nach 12 Stunden niedrigere oder keine gestiegenen LDH Konzentrationen gemessen.

Im Rahmen einer Vergleichsstudie zur analogen Herstellung größerer Knorpelimplantate mit einem modifizierten Nährmedium wurde der Lyseversuch wiederholt. Der Herstellungsprozess unterschied sich von der bisherigen Herstellung durch die Besiedelung einer 20 cm² großen Kollagenmatrix. Zusätzlich wurde das Patientenserum durch Serumersatzpräparat ersetzt. Die Wiederholung der Lyseversuche sollte zum einen Erkenntnisse darüber liefern, ob vergleichbare LDH Konzentrationen gemessen werden, zum anderen sollte überprüft werden, inwieweit das Lysat einen Einfluss auf die Absorptionsmessung hat. Die Patientenkodierung wurde von N-TEC auf PFOA geändert. Die Herstellung erfolgte im Reinraum nach SOPs. Der Versuch wurde für 2 verschiedene Patientenzellen durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 2 Kollagenmatrizen simultan besiedelt und kultiviert. Die Kennzeichnung wurde daher um die Buchstaben A und B erweitert.

942 µl ChM PFOA A03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA A03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA A03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B03 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM
942 µl ChM PFOA A04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA A04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA A04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM	942 µl ChM PFOA B04 Lyse 4-12 h 8.478 µl CM

Abbildung 16 Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient PFOA A03, B03, A04, B04)

Abbildung 16 stellt den Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten für die Patientenzellen PFOA 03 und PFOA 04 grafisch dar. Die Mini-Knorpelimplantate wurden wie im vorangegangenen Lyseversuch zunächst mit dem Überstand in ein 15 ml Tube umgesetzt, verdünnt und anschließend lysiert. Die Messungen der Absorption erfolgte nach 4, 6, 8 und 12 Stunden Lyseeinwirkung.

Tabelle 19 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient PFOA 03)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption (n=3)	Standard- abweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)
PFOA A03: 4h Lyse	0,5344	0,0231	
PFOA A03: 4h Lyse	0,4068	0,0246	0,4314
PFOA A03: 4h Lyse	0,3530	0,0024	
PFOA A03: 6h Lyse	0,5878	0,0081	
PFOA A03: 6h Lyse	0,4075	0,0104	0,4539
PFOA A03: 6h Lyse	0,3664	0,0288	
PFOA A03: 8h Lyse	0,6465	0,0264	
PFOA A03: 8h Lyse	0,4566	0,0047	0,4977
PFOA A03: 8h Lyse	0,3902	0,0058	
PFOA A03: 12h Lyse	0,6412	0,0146	
PFOA A03: 12h Lyse	0,4440	0,0123	0,4847
PFOA A03: 12h Lyse	0,3690	0,0202	
PFOA B03: 4h Lyse	0,2570	0,0085	0,2609
PFOA B03: 4h Lyse	0,2657	0,0055	

PFOA B03: 4h Lyse	0,2600	0,0063	
PFOA B03: 6h Lyse	0,3184	0,0247	
PFOA B03: 6h Lyse	0,2832	0,0048	0,2902
PFOA B03: 6h Lyse	0,2689	0,0080	
PFOA B03: 8h Lyse	0,3610	0,0352	
PFOA B03: 8h Lyse	0,3219	0,0117	0,3279
PFOA B03: 8h Lyse	0,3009	0,0288	
PFOA B03: 12h Lyse	0,3238	0,0046	
PFOA B03: 12h Lyse	0,3051	0,0080	0,3013
PFOA B03: 12h Lyse	0,2751	0,0081	
Leerwert: CM	0,0524	0,0026	
LDH-Standard	0,8000	0,0322	

Tabelle 19 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des modifizierten Lyseversuches für die Patientenzellen PFOA 03 dar. Die Knorpelimplantate PFOA A03 und PFOA B03 beinhalteten die Zellen desselben Patienten. Das Ziel der Herstellung zweier großer Knorpelimplantate ist eine vorgesehene Erweiterung der Indikation für die Behandlung von Patienten. Die höchste LDH Konzentration wurde für beide Implantate nach 8 Stunden Lyse gemessen. Sie betrug für PFOA A03 0,4977 und für PFOA B03 0,3279. Da das Implantat PFOA B-03 eine heterogene Besiedlung und ein deutlich verringertes Gewicht aufwies, wurden diese Werte für die Eichkurve nicht berücksichtigt.

Tabelle 20 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient PFOA 04)

Well Inhalt	Mittelwert Absorption	Standard- abweichung	Mittelwert Gesamt
PFOA A04: 4h Lyse	0,4480	0,0151	
PFOA A04: 4h Lyse	0,3940	0,0496	0,4284
PFOA A04: 4h Lyse	0,4430	0,0514	
PFOA A04: 6h Lyse	0,4434	0,0113	
PFOA A04: 6h Lyse	0,3439	0,0106	0,3918
PFOA A04: 6h Lyse	0,3879	0,0039	
PFOA A04: 8h Lyse	0,5024	0,0116	
PFOA A04: 8h Lyse	0,4049	0,0080	0,4470
PFOA A04: 8h Lyse	0,4338	0,0134	
PFOA A04: 12h Lyse	0,4650	0,0074	0,4191

PFOA A04: 12h Lyse	0,3990	0,0142	
PFOA A04: 12h Lyse	0,3934	0,0129	
PFOA B04: 4h Lyse	0,4659	0,0072	
PFOA B04: 4h Lyse	0,3644	0,0164	0,3849
PFOA B04: 4h Lyse	0,3245	0,0123	
PFOA B04: 6h Lyse	0,4748	0,0062	
PFOA B04: 6h Lyse	0,3677	0,0051	0,3900
PFOA B04: 6h Lyse	0,3274	0,0040	
PFOA B04: 8h Lyse	0,5233	0,0247	
PFOA B04: 8h Lyse	0,4161	0,0102	0,4371
PFOA B04: 8h Lyse	0,3719	0,0100	
PFOA B04: 12h Lyse	0,5269	0,0239	
PFOA B04: 12h Lyse	0,4252	0,0079	0,4375
PFOA B04: 12h Lyse	0,3604	0,0076	
Leerwert: CM	0,0524	0,0026	
Kontrolle: LDH-Standard	0,8000	0,0322	

Tabelle 20 stellt die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen des modifizierten Lyseversuches für die Patientenzellen PFOA 04 dar. Die höchste durchschnittliche LDH Konzentration wurde ebenfalls für beide Implantate nach 8 Stunden Lyse gemessen. Sie Betrag für PFOA A-04 0,4470 und für PFOA B-04 0,4371.

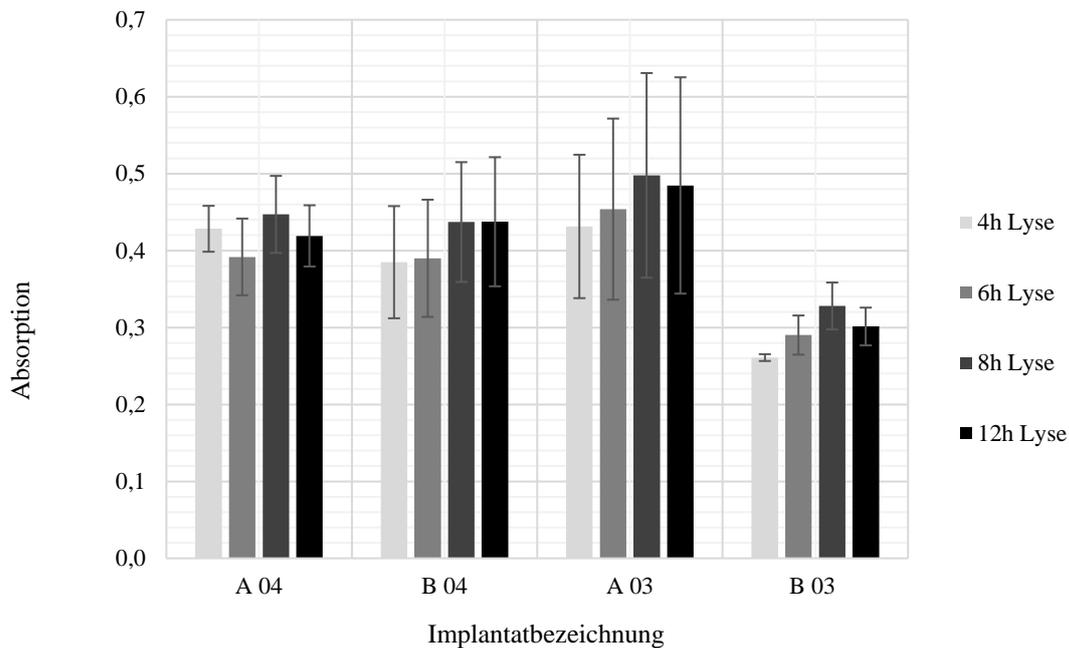


Abbildung 17 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für PFOA 03 und PFOA 04 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).

Abbildung 17 suggerierte eine deutlich höhere Standardabweichung der Ergebnisse als die in den vorangestellten Versuchen. In den bisherigen Versuchen entsprach ein Balken im Diagramm einer Knorpelstanze mit 3 Triplikaten. Zur besseren Übersicht wurden in Abbildung 17 je Balken 3 Mini-Knorpelimplantate mit je 3 Triplikaten zusammengeführt. Unter Berücksichtigung dieser Besonderheit bestätigt das Ergebnis die bisherigen Versuche.

Für die Erstellung einer Eichkurve konnten die Absorptionswerte von 18 lysierten Mini-Knorpelimplantaten von insgesamt 5 verschiedenen Patienten berücksichtigt werden. Die Absorptionmessungen für die ersten Lysedurchläufe (Patient N-TEC 31 und N-TEC 33) wurden aufgrund der beschriebenen Problematik nicht berücksichtigt.

3.6 Erstellung einer Eichkurve

Um in einem standardisierten Verfahren die Viabilität eines Knorpelimplantats am Freigabetag beurteilen zu können, war die Erstellung einer Eichkurve notwendig. Diese sollte nicht nur für einen Patienten, sondern allgemeingültig anwendbar sein. Die

Erstellung einer Eichkurve erforderte die Absorptionsmessung von Knorpelimplantaten mit definierten Viabilitätswerten. Da es jedoch nicht möglich war, dreidimensionale Knorpelstrukturen, besiedelt mit über einer Millionen Zellen, prozentual zu lysieren, musste die Eichkurve durch ein mathematisches Konstrukt generiert werden.

Die Eichgerade wurde auf Basis der Lyse- und Linearitätsexperimente erstellt. Die höchste gemessene Absorption des Mediums einer vollständig lysierten Knorpelstanze, nach einer achtstündigen Lyse, ist mit einer Viabilität von 0 % gleichzusetzen. Da das Medium vor der Lyse um den Faktor 10 verdünnt wurde, konnte dieser tatsächliche Absorptionswert nicht gemessen werden. Die Verdünnung war notwendig, um Absorptionswerte in dem Bereich von 0,2 bis 0,8 messen zu können. Die Anzahl lysierter Zellen ist proportional zur LDH Menge im Medium, welches wiederum in einem linearen Zusammenhang mit der Absorption steht (Kumar et al. 2018). Der gemessene Wert einer vollständig lysierten Knorpelstanze wurde demnach mit einer Viabilität von 90 % gleichgesetzt. Aufgrund der linearen Beziehung konnte für jeden Absorptionswert ein entsprechender Wert der Viabilität errechnet werden.

Die folgende Tabelle fasst die höchsten gemessenen Absorptionswerte für alle zu berücksichtigenden Lyseexperimente zusammen. Die Lysewerte für Patient PFOA: B03 wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Das Implantat wies deutlich weniger Knorpelmatrix auf und hatte ein reduziertes Gewicht.

Tabelle 21 Übersicht der maximal gemessenen LDH Konzentrationen (1:10 verdünnt)

Patient	Lysedauer [Stunden]	Mittelwert Absorption (n=3)	Standardabweichung (n=3)	Mittelwert gesamt (n=9)
N-TEC 30	8	0,3495	0,0100	0,4301
N-TEC 30	8	0,4388	0,0044	
N-TEC 30	8	0,5019	0,0084	
N-TEC 31	8	0,7684	0,0269	0,7500
N-TEC 31	8	0,7006	0,0115	
N-TEC 31	8	0,7809	0,0012	
N-TEC 36	6	0,4154	0,0031	0,4351

N-TEC 36	6	0,4329	0,0100	
N-TEC 36	6	0,4570	0,0058	
PFOA: A03	8	0,6465	0,0264	
PFOA: A03	8	0,4566	0,0047	0,4977
PFOA: A03	8	0,3902	0,0058	
PFOA: B03	8	0,3610	0,0352	
PFOA: B03	8	0,3219	0,0117	0,3279*
PFOA: B03	8	0,3009	0,0288	
PFOA: A04	8	0,5024	0,0116	
PFOA: A04	8	0,4049	0,0080	0,4470
PFOA: A04	8	0,4338	0,0134	
PFOA: B04	8	0,5233	0,0247	
PFOA: B04	8	0,4161	0,0102	0,4371
PFOA: B04	8	0,3719	0,0100	

Tabelle 21 stellt eine Übersicht über die maximal gemessenen Absorptionswerte aller Lyseversuche dar. Um ein möglichst vorsichtiges Beurteilungsverfahren sicherzustellen wurde der geringste Absorptionswert der Maximalwerte als Basis für die Eichgerade verwendet. Mit diesem Vorgehen kann bei einer Freigabemessung zwar keine exakte Viabilität angegeben werden, dafür jedoch eine Mindestviabilität. Die niedrigste Absorption wurde nach 8 Stunden Lyseeinwirkung bei Patient N-TEC 30 gemessen. Der Wert betrug 0,4301 und wurde für die Erstellung der Eichkurve herangezogen und mit einer Viabilität von 90 % gleichgesetzt.

Einem Absorptionswert von 0,4301 konnte aufgrund der Linearitätsversuche eine LDH Konzentration von 1:166.722 zugeordnet werden. Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge wurde für eine Verdopplung der LDH Konzentration ein um 0,4443 höherer Absorptionswert angenommen. Dieser Wert entsprach der durchschnittlichen Geradensteigung aus den Linearitätsversuchen. Gleichzeitig wurde für eine Verdopplung der LDH Menge eine Viabilität von 80 % angenommen. Mithilfe dieses Vorgehens konnten weitere Werte errechnet werden.

Tabelle 22 Viabilität in Abhängig der Absorption und der LDH Konzentration

LDH Konzentration	Theoretische Absorption	Viabilität [%]	LDH Konzentration	Absorption	Viabilität [%]
5,9980*10 ⁻⁵	2,8286	0	2,3992*10 ⁻⁵	1,2296	60
5,3982*10 ⁻⁵	2,5621	10	1,7994*10 ⁻⁵	0,9631	70
4,7984*10 ⁻⁵	2,2956	20	1,4995*10 ⁻⁵	0,8299	75
4,1986*10 ⁻⁵	2,0291	30	1,1996*10 ⁻⁵	0,6966	80
3,5988*10 ⁻⁵	1,7626	40	0,5998*10 ⁻⁵	0,4301	90
2,9990*10 ⁻⁵	1,4961	50	0	0,1636	100

Tabelle 22 stellt den Zusammenhang zwischen der LDH Konzentration und den theoretisch bzw. tatsächlich gemessenen Absorptionswerten dar. Die errechneten Viabilitätswerte galten für innerhalb von 8 Stunden freigesetzter und direkt gemessener LDH. Im Herstellungsprozess befinden sich die Knorpelimplantate nach dem letzten Mediumwechsel noch 3 Tage im 37 °C warmen Brutschrank. Es konnte bei 37 °C eine Zerfallsrate der LDH von 2,64 % pro Tag festgestellt werden. Eine gleichmäßige LDH Abgabe vorausgesetzt, wurden für 3 Tage eine Zerfallsrate von insgesamt 5,27 % definiert. Dieser Wert wurde aus der Annahme errechnet, dass die LDH gleichmäßig über 1-3 Tage zerfällt. Hierdurch verringert sich die gesamte LDH Konzentration zu 1/3 um 7,92 %, zu 1/3 um 5,28 % und zu 1/3 um 2,64 %. Da die Lyseversuche diesen Zerfall nicht abbilden, muss dies im Rahmen einer Rückrechnung von der gemessenen (94,73 %) auf die ursprüngliche (100 %) LDH Menge berücksichtigt werden.

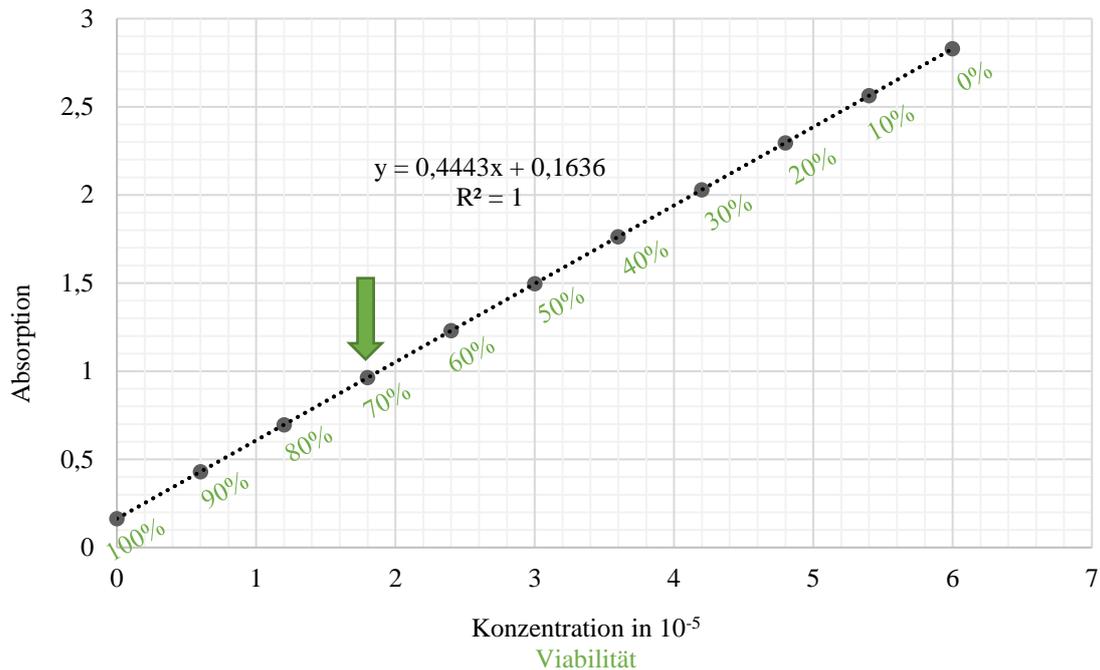


Abbildung 18 Grafische Darstellung der Viabilität in Abhängig der Absorption und der LDH Konzentration

Abbildung 18 zeigt den Bereich auf, in welchem akzeptable Vitalitätswerte erreicht werden. Beträgt die Absorption des Freigabeproduktes nach Rückrechnung $\leq 0,9631$ so ist das Produkt freizugeben. Die abgebildeten Absorptionswerte im real nicht messbaren Bereich entsprechen den Berechnungen aus Tabelle 22.

3.7 Validierung der entwickelten Methode nach GMP-Richtlinien

Die Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) definiert die Validierung als eine Bestätigung eines nicht normierten Prüfverfahrens. Diese Bestätigung basiert auf der Untersuchung und anschließenden Bereitstellung des Nachweises, dass ein neu entwickeltes Prüfverfahren die geforderten Anforderungen erfüllt. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein neu entwickeltes Prüfverfahren, für welches noch keine Norm besteht. Für das entwickelte Verfahren wurde vor dem Einsatz als Freigabeinstrument eines neuartigen Arzneimittels eine Validierung nach GMP-Richtlinien gefordert (European Commission 2017).

3.7.1 Risikoanalyse

Vor der Aufstellung des Validierungsplanes wurde eine vollständige Risikoanalyse nach GMP-Richtlinien durchgeführt (European Commission 2017). Die Risikoanalyse wurde in 2 Bereiche aufgeteilt. Zum einen wurden die Risiken der Vorbereitung und Durchführung des LDH-Assays bewertet, zum anderen die des verwendeten Systems, des Multiplattenreaders Infinite M200 von Tecan.

Als größte Risiken bei der Präparation des LDH-Assay Kits und des LDH-Standards wurden die Lagerung sowie die Konzentrationseinstellung der Substanzen identifiziert. Fehler führen bei diesen Vorgängen zwangsläufig zu falschen oder unplausiblen Absorptionswerten, eine sinnvolle Viabilitätsbeurteilung wäre nicht möglich. Zur Minimierung der Risiken wurde in den SOPs definiert, dass der LDH-Standard nicht gelagert werden darf, sondern am Tag der Freigabemessung jedes Mal neu angesetzt werden muss.

Als sehr kritisch wurde der Teil des Samplings, der Mediumgewinnung des Freigabeproduktes, eingestuft. Ist das Sample des Überstandes nicht repräsentativ für das gesamte Nährmedium, treten während des Transportes hohe Temperaturabweichungen auf oder ist die LDH aus der Knorpelmatrix nicht im Medium nachweisbar, wird die Viabilität des Freigabeproduktes mit dem LDH-Assay falsch beurteilt. Als besonders kritisch wurde bewertet, dass die Entdeckungswahrscheinlichkeit dieser Vorkommnisse sehr gering ist. Diese Risiken wurden ebenfalls in der SOP berücksichtigt. So muss nach dieser das Sample aus dem gesamten verfügbaren Überstand bestehen, die Repräsentativität wurde dadurch sichergestellt.

Das Risiko, die LDH abgestorbener Zellen nicht im Medium nachweisen zu können, wurde durch die Spiking-Versuche widerlegt. Für die eigentliche Durchführung des Assays wurden das unvollständige Auftauen der Reagenzien, Pipettierfehler sowie Abweichung vom Pipettierschema als Risiko analysiert. Zur Minimierung dieser Risiken wurden genaue Anweisungen der Durchführung verfasst sowie ein Pipettierschema erstellt. Der letzte Schritt, die Datenauswertung, beinhaltet die allgemeinen Risiken der Excel Anwendung. Zur Vermeidung von Copy-paste-Fehlern sowie der falschen

Formelanwendung oder Zellauswahl, wurde ein schreibgeschütztes Auswertungsdokument erstellt, welches die Viabilität nach Einfügen der erhaltenen Messdaten automatisiert errechnet.

Die Risiken bei der Verwendung des Infinite M200 Multiplattenlesers von Tecan wurden in die Bereiche Technik und Anwendung unterteilt. Die technischen Risiken beinhalten die unzureichende Messgenauigkeit, Sensorschäden oder -verschmutzungen sowie starke Temperaturabweichungen innerhalb des Gerätes. Die Risiken wurden mit einer niedrigen Auftretens- und einer hohen Entdeckungswahrscheinlichkeit bewertet, sodass keine weiteren Maßnahmen definiert wurden. Für den Bereich Anwendung wurde als Risiko erkannt, dass verschiedene Arbeitsgruppen des Instituts Zugang zum Multiplattenleser haben und keine Zugangsbeschränkung zum Gerät besteht. Kritisch zu betrachten ist fernerhin die Möglichkeit, Daten für die Freigabe manipulieren zu können. Um dieses Risiko zu vermeiden, wurde definiert, dass vor dem Einsatz als Freigabegerät eine Software implementiert werden muss, welche die Manipulation von Daten verhindert sowie eine Nachverfolgung jeglicher Dokumentenbearbeitung ermöglicht.

3.7.2 Validierungsparameter

Die Richtlinie ICH Q2(R1), veröffentlicht vom International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human Use, definiert die Anforderungen an ein neues Prüfverfahren. Zusätzlich muss die Guideline on bioanalytical method validation (EMA 2011) berücksichtigt werden. Die Richtlinien beinhalten die Parameter Robustheit, Linearität, Genauigkeit, Präzision, Spezifität sowie die Definition des Arbeitsbereichs. Anforderungen werden zudem für den Kontrollstandard sowie für die Stabilität des Analyten definiert. Das Detektions- sowie das Quantifizierungslimit müssen nach Richtlinie für die Entwicklung eines Verunreinigungstest, jedoch nicht für einen Assay bestimmt werden.

3.7.2.1 Robustheit

Die Robustheit sollte bereits während des Entwicklungsprozesses berücksichtigt werden. Während der Methodenentwicklung wurde untersucht, inwiefern Prozessbestandteile und

Prozessabweichungen sich auf die Zuverlässigkeit der Messungen auswirken. Die ICH Richtlinie fordert bei empfindlichen Prozessschritten eine umfangreiche Überwachung des Ablaufes sowie die ausführliche Dokumentation von auftretenden Abweichungen.

3.7.2.2 Linearität

Die Linearität innerhalb eines analytischen Testverfahrens beschreibt die Fähigkeit, Messergebnisse zu erhalten, welche proportional zur Konzentration des Analyten sind. Die Richtlinie des ICHs fordert die Auswertung von mindestens 5 verschiedenen Konzentrationen des Analyten mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) oder dem Bestimmtheitsmaß (R^2).

3.7.2.3 Genauigkeit

Die Genauigkeit eines analytischen Testverfahrens beschreibt die Ausprägung der Differenz zwischen den theoretische korrekten (Nominalwert) gegenüber den gemessenen Werten. Eine Differenz kann aus zufälligen oder systematischen Fehlern resultieren. Die Genauigkeit muss nach den Richtlinien der EMA (2011) für den gesamten Arbeitsbereich bestimmt werden. Wird die Genauigkeit während eines Messdurchlaufes bestimmt, so müssen mindestens 5 Proben mit je 4 Konzentrationen gemessen werden. Diese Proben werden in dieser Arbeit als QC-Samples bezeichnet. Die durchschnittlichen Messergebnisse dürfen nicht mehr als 15 % vom Nominalwert abweichen. An den Maxima und Minima des Arbeitsbereichs dürfen Abweichung von bis zu 20 % auftreten.

Wird die Genauigkeit zwischen den Messdurchläufen bestimmt sind an mindestens zwei unterschiedlichen Tagen Messungen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen notwendig. Die Messergebnisse dürfen ebenfalls nur 15 % bzw. 20 % vom Nominalwert abweichen.

3.7.2.4 Präzision

Die Präzision beinhaltet die Wiederholbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Messungen. Sie sollte sowohl innerhalb als auch zwischen den Messdurchläufen

bestimmt werden. Zum Nachweis der Wiederholbarkeit innerhalb eines Durchlaufes müssen mindestens 5 Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und je 3 Replikaten im Arbeitsbereich durchgeführt werden. Wird die Präzision zwischen den Messdurchläufen bestimmt sollten an mindestens zwei unterschiedlichen Tagen Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt werden. Der Variationskoeffizient muss $\leq 15\%$ betragen.

Der Nachweis der Reproduzierbarkeit muss in einem anderen Labor überprüft werden und ist nur notwendig, wenn das entwickelte Verfahren als standardisiertes Verfahren zum Beispiel in die Pharmacopeia aufgenommen werden soll. Deshalb wurde die Reproduzierbarkeit hier nicht berücksichtigt.

Für die Präzision sollte die absolute Standardabweichung, die relative Standardabweichung sowie das Konfidenzintervall angegeben werden.

3.7.2.5 Spezifität

Die Spezifität innerhalb eines analytischen Testverfahrens beschreibt die Fähigkeit, den Analyten trotz Gegenwart potenziell vorkommender weiterer Bestandteile eindeutig zu bestimmen.

3.7.2.6 Der Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich definiert die niedrigste und die höchste Konzentration des Analyten in der Probe für die nachgewiesen wurde, dass die Anforderungen an Linearität, Genauigkeit und Präzision gewährleistet sind. Der Arbeitsbereich kann von den Linearitätsversuchen abgeleitet werden.

3.7.2.7 Referenz- und Kalibrierungsstandard

Neben den beschriebenen Parametern definiert die European Medicines Agency (2011) in der Guideline on bioanalytical method validation zusätzlich die Anforderungen an einen Referenzstandard. Dieser soll für die Erstellung eines Kalibrierungsstandards, für Qualitätskontrollen sowie für Stabilitätsversuche genutzt werden. Die Qualität des

Standards muss sichergestellt werden. Zulässige Referenzstandards sind Vergleichsstandards, im Handel erwerbliche Standards oder ausführlich charakterisierte Standards aus nicht kommerzieller Herstellung. Als Voraussetzung gilt ein Analysezertifikat, welches Angaben zur Reinheit, zu den spezifischen Lagerbedingungen sowie zur Haltbarkeit beinhaltet.

Es wird gefordert, dass die Reaktion des Assays auf verschiedenen Konzentrationen des Analyten bekannt ist. Der Kalibrierungsstandard sollte in der identischen Matrix wie die zu untersuchenden Proben hergestellt und bei jeder Messung einer Probe mitgemessen werden.

3.7.3 Durchführung der Validierung

Die nach GMP-Richtlinien geforderte Installation- and Operation Qualification (IOQ) für den Tecan Reader wurde in Zusammenarbeit mit dem Leiter der Qualitätskontrolle des Fraunhofer ISC - Translationszentrums für Regenerative Medizin (TLZ-RT) durchgeführt und dokumentiert und ist nicht Teil dieser Arbeit. Durchgeführte wurde die Validierung der analytischen Methode, auch als Performance Qualification bezeichnet. Für die Performance Qualification (PQ) wurde nachfolgende Validierungsmatrix für die Durchführung entwickelt.

Tabelle 23 PQ - Validierungsmatrix

Durchlauf	Operator	Tag	LDH - Standard	LDH Assay	Gerät	QC - Samples	Verdünnungsreihe
1	1	1	A	A	A	A	A
2	1	1	B	B	A	A	B
3	2	2	A	A	B	B	C
4	3	2	B	B	B	C	D

Tabelle 23 stellt schematisch den Versuchsablauf für die Validierung der entwickelten Methode dar. Aus der Validierungsmatrix können die untersuchten Variablen entnommen werden. Die 4 Validierungsläufe wurden von 3 verschiedenen Operatoren an 2 unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Für den LDH-Standard und das LDH-Assay Kit wurden jeweils 2 verschiedene Chargen verwendet. Die Validierungsläufe wurden an 2

Geräten und mit 3 separat hergestellten QC-Samples durchgeführt. Teil dieser Arbeit sind die Validierungsläufe 1 und 2. Die Validierungsläufe 3 und 4 wurden von Mitarbeitern der Qualitätssicherung des TLZ-RT durchgeführt und werden separat ausgewertet.

Jeder Operator bereitete mindestens 24 Stunden vor der Durchführung des Validierungslaufes, nach SOP, das LDH Kit für die Messung vor. Am Tag der Durchführung wurde der LDH-Standard, die QC-Samples sowie die Verdünnungsreihe nach folgendem Schema von jedem Operator eigenständig angesetzt. Die erwartete Absorption wurde aus den Lyseversuchen für N-TEC 30, 31 und 36 abgeleitet. Zur Herstellung der 1. Verdünnung wurden 10 µl LDH-Standard mit 1.990 µl CM kombiniert. 100 µl aus der 1. Verdünnung wurden für die 2. Verdünnung mit 4.900 µl CM kombiniert.

Tabelle 24 Schema zum Ansetzen der Verdünnungsreihe und der QC-Samples

Konzentration	Volumen 2. Verdünnung / CM	Erwartete Absorption	Viabilität
1:30.000	500 µl / 1.000 µl	1,6446	~ 50 %
1:40.000	333 µl / 1.000 µl	1,2744	~ 60 %
1:50.000	250 µl / 1.000 µl	1,0522	~ 65 %
1:60.000	200 µl / 1.000 µl	0,9041	~ 70 %
1:70.000	167 µl / 1.000 µl	0,7983	~ 75 %
1:100.000	111 µl / 1.000 µl	0,6079	~ 85 %
1:150.000	71,4 µl / 1.000 µl	0,4598	~ 90 %
1:200.000	52,6 µl / 1.000 µl	0,3858	> 90 %
1:300.000	34,5 µl / 1.000 µl	0,3117	> 95 %
1:500.000	20,4 µl / 1.000 µl	0,2525	> 95 %
CM	0 µl / 1.000 µl	0,0943	

Tabelle 24 die Anleitung zum Ansetzen der benötigten LDH Verdünnungen sowie der QC-Samples dar. Die grün hinterlegten Verdünnungen wurden doppelt angesetzt und dienten zusätzlich als QC-Samples. Die Messergebnisse aus der Verdünnungsreihe und den QC-Samples wurden zur Berechnung der Linearität, der Genauigkeit und der Präzision verwendet. Zusätzlich konnte der Arbeitsbereich definiert werden. Die Akzeptanzkriterien für die Validierungsparameter wurden mit der ICH Topic Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Text an Methodology Step 5 (EMA 2005) und der

Guideline on bioanalytical method validation (EMA 2011) nach GMP Richtlinien definiert.

Tabelle 25 Akzeptanzkriterien für die Validierungsparameter

Validierungsparameter	Parameter	Akzeptanzkriterium
Robustheit	Stabilität des Analyten bei 37 °C	Tägliche Zerfallsrate $\leq 5 \%$
	LDH Nachweisbarkeit zerstörter Zellen einer Knorpelmatrix im Kulturmedium	Nachweisbarkeit $\geq 85 \%$
Linearität	Korrelationskoeffizient	$\geq 0,995$
	Bestimmtheitsmaß (R^2)	$\geq 0,995$
	Steigung der Regressionsgeraden	angegeben
	Y-Achsenabschnitt	angegeben
Genauigkeit	QC-Sample Verdünnung 1:50.000 – 1:300.000	Nominalwertabweichung $\leq 15 \%$
	QC-Sample Verdünnung 1:500.000	Nominalwertabweichung $\leq 20 \%$
Präzision	Standardabweichung der QC-Samples	angegeben
	Konfidenzintervall der QC-Samples	angegeben
	Variationskoeffizient (CV)	$\leq 15 \%$
Arbeitsbereich	LDH Konzentration in dem die Linearität, Genauigkeit und Präzision die Akzeptanzkriterien erfüllt	1:50.000 – 1:120.000

Tabelle 25 stellt die nach GMP Richtlinien zu untersuchenden Validierungsparameter und deren definierte Akzeptanzkriterien dar. Die Robustheit wurde nach Leitlinie bereits während der Methodenentwicklung untersucht. Für den Nachweis der Spezifität waren keine zusätzlichen Experimente zu den bereits durchgeführten notwendig. Die Spezifität des kommerziell erwerblichen LDH-Assay Kits wird vom Hersteller angegeben. Wie gezeigt hat das CM-Medium sowie der Lysepuffer keinen Einfluss auf die Spezifität. Für

einige Parameter werden keine quantitativen Akzeptanzkriterien definiert, stattdessen muss der jeweilige Wert nur angegeben werden.

3.7.4 Ergebnisse der Methodvalidierung

Der erste Validierungslauf wurde von Operator 1 an Tag 1 an Gerät A durchgeführt. Es wurde der LDH-Standard A und das LDH-Assay Kit A verwendet. Gemessen wurden die Verdünnungsreihe A und die QC-Samples A.

Tabelle 26 Ergebnisse Validierungslauf 1

Konzentration	MW (n=3)	SD (n=3)	Nominalwert	QC-Sample	MW (n=3)	SD (n=3)	Konfidenzintervall
1:30.000	1,6632	0,0293	1,6858				
1:40.000	1,2996	0,0172	1,3024				
1:50.000	1,1106	0,0773	1,0724	1	1,1258	0,0027	0,0031
1:60.000	0,9107	0,0022	0,9191				
1:70.000	0,8262	0,0271	0,8095	2	0,8601	0,0145	0,0164
1:100.000	0,6465	0,0493	0,6124	3	0,6487	0,0048	0,0054
1:150.000	0,4854	0,0373	0,4590	4	0,4964	0,0328	0,0371
1:200.000	0,3728	0,0073	0,3823	5	0,4056	0,0215	0,0243
1:300.000	0,2906	0,0073	0,3057	6	0,3014	0,0098	0,0111
1:500.000	0,2169	0,0021	0,2443	7	0,2248	0,0123	0,0139
CM	0,1059	0,0028					

Tabelle 26 stellt eine Übersicht der Auswertung des ersten Validierungslaufes dar. Aus den Mittelwerten der Verdünnungsreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt. Diese wurde zur Errechnung der Nominalwerte verwendet. Für die Mittelwerte der QC-Samples wurden auf Basis der Nominalwerte die Genauigkeit und Präzision berechnet.

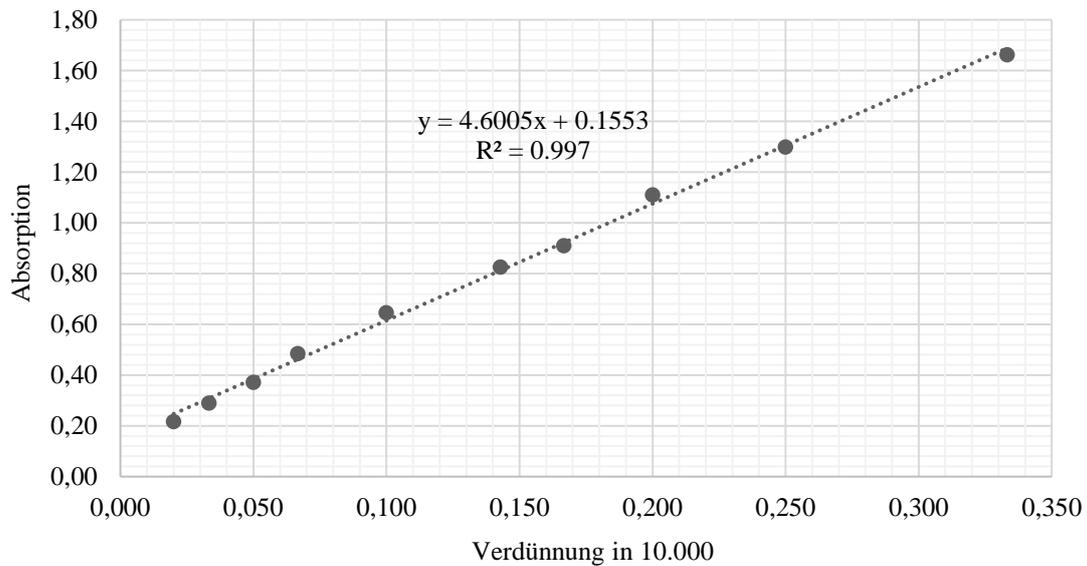


Abbildung 19 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängig der Verdünnung der LDH für Validierungslauf 1

Abbildung 19 verdeutlicht den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der gemessenen Absorption. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,999, das Bestimmtheitsmaß 0,997, die Steigung der Regressionsgeraden sowie der Y-Achsenabschnitt können dem Diagramm entnommen werden. Die Parameter für die Linearität haben die definierten Akzeptanzkriterien für den gesamten Messbereich erfüllt. Die Abweichung der QC-Samples vom Nominalwert betragen zwischen 1,40 % und 8,15 %. Die definierten Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit innerhalb des Validierungslaufes wurden für alle QC-Samples erfüllt. Die Standardabweichung sowie das Konfidenzintervall können Tabelle 26 entnommen werden. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 0,24 % und 6,60 %. Die Präzision für Validierungslauf 1 hat für alle QC-Samples die Akzeptanzkriterien erfüllt.

Der zweite Validierungslauf wurde von Operator 1 an Tag 1 an Gerät A durchgeführt. Es wurde der LDH-Standard B und das LDH-Assay Kit B verwendet. Gemessen wurden die Verdünnungsreihe B und die QC-Samples A.

Tabelle 27 Ergebnisse Validierungslauf 2

Konzentration	MW	SD	Nominal -wert	QC- Sample	MW	SD	Konfidenz- intervall
1:30.000	1,5510	0,0132	1,6007				
1:40.000	1,2364	0,0106	1,2435				
1:50.000	1,0781	0,0395	1,0292	1	1,1633	0,0373	0,0422
1:60.000	0,9106	0,0145	0,8863				
1:70.000	0,8149	0,0013	0,7842	2	0,8646	0,0141	0,0159
1:100.000	0,6121	0,0109	0,6005	3	0,6821	0,0442	0,0501
1:150.000	0,4710	0,0299	0,4577	4	0,5251	0,0236	0,0267
1:200.000	0,3796	0,0238	0,3862	5	0,4434	0,0142	0,0160
1:300.000	0,2921	0,0032	0,3148	6	0,3159	0,0106	0,0120
1:500.000	0,2149	0,0026	0,2576	7	0,2384	0,0268	0,0304
CM	0,0988	0,0023	1,6007				

Tabelle 27 stellt eine Übersicht der Auswertung des zweiten Validierungslaufes dar. Aus den Mittelwerten der Verdünnungsreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt. Diese wurde zur Errechnung der Nominalwerte verwendet. Für die Mittelwerte der QC-Samples wurden auf Basis der Nominalwerte die Genauigkeit und Präzision berechnet.

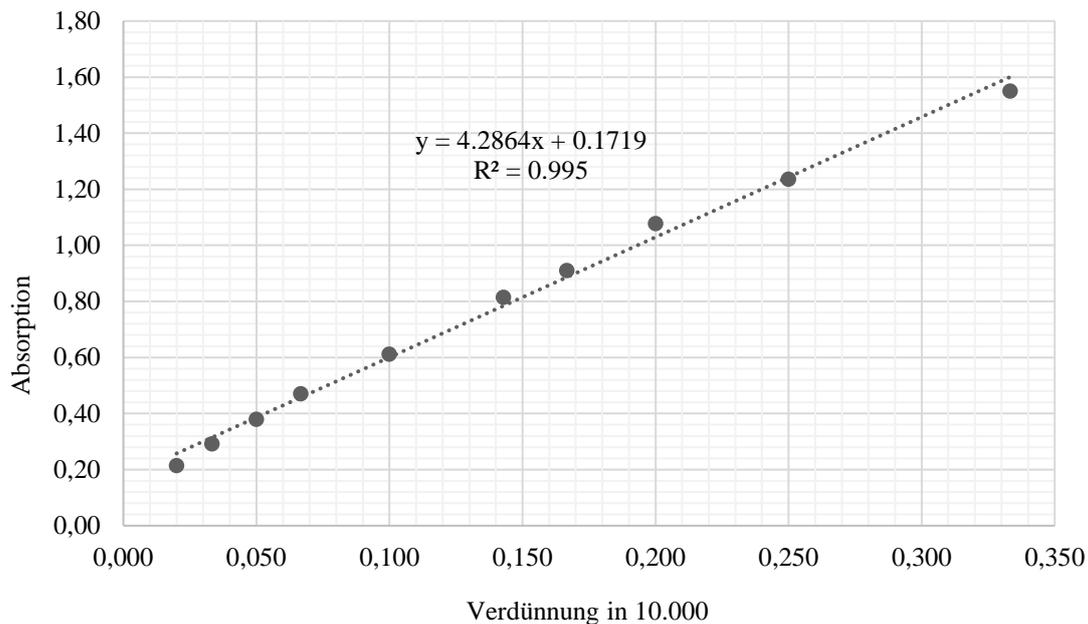


Abbildung 20 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängig der Verdünnung der LDH für Validierungslauf 2

Auch für den zweiten Validierungslauf verdeutlicht Abbildung 20 den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und der gemessenen Absorption. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,997, das Bestimmtheitsmaß 0,995, die Steigung der Regressionsgeraden sowie der Y-Achsenabschnitt können dem Diagramm entnommen werden. Die Parameter für die Linearität haben die definierten Akzeptanzkriterien für den gesamten Messbereich erfüllt. Die Abweichung der QC-Samples vom Nominalwert betragen zwischen 0,36 % und 14,73 %. Die definierten Akzeptanzkriterien für die Genauigkeit innerhalb des Validierungslaufes wurden für alle QC-Samples erfüllt. Die Standardabweichung sowie das Konfidenzintervall können Tabelle 27 entnommen werden. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 1,63 % und 11,25 %. Die Präzision für Validierungslauf 2 hat für alle QC-Samples die Akzeptanzkriterien erfüllt.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte ein Verfahren zur Beurteilung der Viabilität, eines durch Zellkultur hergestellten Knorpelimplantates, entwickelt und nach GMP-Richtlinien validiert werden. Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, den für Zellsuspensionen geeigneten CyQuant LDH Cytotoxicity Assay, durch Modifikationen in der Handhabung, für dreidimensionale Gewebe verwenden zu können. Vor der Entwicklung des Assays wurden herstellungsspezifische Untersuchungen vorgenommen.

4.1 Einfluss des Herstellungsprozesses auf LDH und Nachweisbarkeit im Nährmedium

Aus irreversibel beschädigten oder zerstörten Chondrozyten freigesetzte LDH wird aufgrund des Herstellungsprozesses erst bis zu 3 Tage nach der Freisetzung, im Rahmen der Qualitätskontrolle, gemessen. Unklar war in diesem Zusammenhang die Stabilität des Enzyms in diesem Zeitraum bei 37 °C im Brutschrank, zudem war die generelle Nachweisbarkeit der LDH im Nährmedium unklar. Grundvoraussetzung zur Anwendung des LDH-Assays war die Stabilität und die Nachweisbarkeit der LDH im Nährmedium.

Aufgrund der vorangestellten Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die LDH zwar an Aktivität verliert oder zerfällt, dies aber nur in einem geringen Ausmaß stattfindet. Eine Zerfallsrate von 2,64 % pro Tag, bzw. von 5,27 % über 3 Tage bei 37 °C konnte bedenkenlos durch eine Rückrechnung in der Viabilitätsbeurteilung berücksichtigt werden. Diese Ergebnisse werden durch die bisherige Datenlage unterstützt. So stellten Weseloh et al. (1975) fest, dass im menschlichen Gelenkknorpel zu mehr als 75 % LDH vom Isotyp 5 und zu mehr als 20 % LDH vom Isotyp 4 vorkommen. Houle et al. (2015) konnten in ihren Versuchen zur LDH Stabilität zeigen, dass LDH Typ 5 und 4 in Hundeserum insbesondere bei Temperaturen von 4 °C und -20 °C nach 3 Tagen zu über 90 % nachweisbar waren. Die Stabilitätsversuche waren trotz der vorhandenen Daten unerlässlich, da in der Literatur eine LDH Stabilität bei 37 °C in Kulturmedium bisher nicht abschließend untersucht wurde. Ausgeschlossen werden konnten zudem Einflüsse

auf die Messergebnisse durch die Anwesenheit der Kollagenmatrix, des Nährmediums sowie die Lysepuffers.

Zur Beurteilung der Nachweisbarkeit von LDH im Nährmedium wurden in einem simulierten Herstellungsprozess Mini-Knorpelimplantate, mit einem Durchmesser von 6 mm, hergestellt. Durch das künstliche Auftragen einer definierten LDH Menge auf die Mini-Knorpelimplantate, wurde die Wiederfindungsrate im Medium untersucht. Hierzu wurden das Medium am letzten Mediumwechsel abgesaugt und die LDH auf die feuchten Mini-Knorpelimplantate aufgetragen. Damit die LDH in die Knorpelmatrix gelangen konnte, wurden die Mini-Knorpelimplantate für eine Dauer von 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und danach mit frischem Nährmedium versorgt. Nach 3 Tagen Inkubation, also dem Freigabetag, wurde der LDH Gehalt im Medium gemessen. Ziel war es hierbei zu untersuchen, in welchem Ausmaß die LDH, welches auf die Kollagenstanze gegeben wurde, nachweisbar ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Knorpelmatrix die LDH nicht zurückhält. Die LDH konnte in vollem Umfang im Nährmedium nachgewiesen werden.

Kritisch zu hinterfragen ist bei diesem Vorgehen die Tatsache, dass 3 Tage vor dem Freigabetermin bereits eine große Menge Knorpelmatrix gebildet wurde. Wird nun unterstellt, dass die LDH zerstörter Chondrozyten nicht aus der Matrix hinaus diffundieren kann, so kann nicht sicher behauptet werden, dass die auf die Knorpelmatrix pipettierte LDH auch in die Matrix hineindiffundiert. In diesem Fall wäre die LDH von Beginn des Versuchs an im Medium gewesen und wäre daher in vollem Umfang nachweisbar. Da es nicht möglich war ein alternatives Vorgehen zu entwickeln, musste unterstellt werden, dass die auf die Knorpelmatrix pipettierte LDH durch nach der 30-minütigen Inkubationszeit in die Matrix aufgenommen wurde. Der sichere Nachweis hierfür konnte nicht erbracht werden.

Ein alternatives Vorgehen wäre die direkte Injektion in statt auf die Knorpelmatrix, hierbei würden jedoch durch die Invasivität der Manipulation gesunde Knorpelzellen beschädigt werden, wodurch die LDH Konzentration von der Realität abweichen würde. Zudem wäre bei diesem Vorgehen nicht sicherzustellen, dass die LDH tatsächlich in die

Knorpelmatrix und nicht unerwünscht in die Kollagenmatrix injiziert wird. Erschwert wird dieser Umstand durch die Tatsache, dass nicht an jeder Stelle auf der Kollagenmatrix eine Knorpelmatrix gebildet wird.

Während der Experimente stellte sich heraus, dass die Kollagenstanzen am Freigabetag mit einer unterschiedlichen Zellzahl besiedelt waren, obwohl die Behandlung und die Patientenzellen identisch waren. Die Ursache wurde auf die heterogene Struktur der Kollagenmatrix zurückgeführt, welche eine unterschiedlich dichte Besiedelung zulässt. Werden nun zwar gleich behandelte Mini-Knorpelimplantate verglichen, so muss trotzdem berücksichtigt werden, dass signifikant erscheinende Ergebnisse auch auf unterschiedlich besiedelte Kollagenstanzen zurückzuführen sein könnten. Hierbei sei angemerkt, dass auch im realen Herstellungsprozess auf größeren Membranen eine gewisse Heterogenität bezüglich der Struktur besteht. Andererseits verdeutlicht diese Heterogenität der Knorpelmatrix die Relevanz der Entwicklung einer alternativen Viabilitätsbeurteilung. Die bisherige Beurteilung erfolgte über extrem kleine Bereiche durch histologische Schnitte des Freigabeproduktes. Diese werden nur aus den Randbereichen des Implantates entnommen, sodass eine Repräsentativität der histologischen Schnitte nicht sichergestellt werden kann. Die von den Behörden geforderte objektive Bewertung in einem validierten und nicht-invasiven Verfahren kann durch die Beurteilung von histologischen Schnitten aus den Randbereichen einer Knorpelimplantates nicht erfüllt werden.

Da in dem entwickelten Verfahren die gesamte LDH im Überstand gemessen wird, stellt dieses eine repräsentative, präzise, schnelle und kostengünstige Alternative zur Beurteilung der Viabilität dar. Die Beurteilung erfolgt zudem objektiv und nicht-invasiv. Kritisch ist zu hinterfragen, ob die Erkenntnisse aus den Versuchen mit 6 mm Mini-Knorpelimplantaten vollständig auf den realen Prozess übertragen werden können. Die Bedingungen der Reinraumherstellung konnten exakt herabskaliert nachgestellt werden, sodass die Fläche der Knorpelmatrix auf das Volumen des Mediums bedenkenlos übertragen werden kann. Es besteht zudem kein Grund zur Annahme, dass im realen Prozess eine dichtere Knorpelmatrix gebildet wird, da die Fläche der Kollagenmatrix mit der identischen Zahl an Knorpelzellen besiedelt wurde.

4.2 Erstellung der Eichgerade für die Beurteilung des Freigabeproduktes

Der Lyseversuch stellte ein zentrales Element bei der Entwicklung der Methode dar. Mehrfach musste der Versuchsaufbau modifiziert werden. Durch den finalen Versuchsaufbau konnte die Heterogenität der Kollagenmatrix relativiert, die notwendige Lysedauer ermittelt sowie die richtige Verdünnung des Mediums eruiert werden. Um eine möglichst vorsichtige Bewertung des Freigabeproduktes zu gewährleisten, wurde die, nach vollständiger Lyse, niedrigste gemessene Absorption für die Erstellung einer Eichgeraden verwendet. Da eine Verdünnung von 1:10 für das Medium der Lyseversuche gewählt wurde, konnte für diese Absorption eine Viabilität von 90 % angenommen werden. Die aus den Linearitätsversuchen bekannte Steigung konnte dann zur Errechnung weiterer Viabilitätswerte verwendet werden. Diese Steigung konnte in mehreren Durchläufen bestätigt werden und ist somit als zuverlässiges Instrument zu betrachten. Die Eichkurve basiert auf der Auswertung 18 lysierter Mini-Knorpelimplantate. Kritisch hinterfragt werden muss, ob Situationen auftreten könnten, bei denen ein noch dünner besiedeltes Freigabeprodukt, aufgrund der damit einhergehenden verhältnismäßig niedrigeren Absorptionswerte, fälschlicherweise als ausreichend viabel beurteilt wird.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Ausnahmefällen auch geringer besiedelte Knorpelimplantate gemessen werden, als jene die im Lyseversuch berücksichtigt wurden. Da jedoch ein möglichst vorsichtiges Beurteilungsvorgehen gewählt wurde, kann das Risiko als gering angesehen werden. So konnte mit den Daten des Lyseversuchs für den Patient PFOA B03 ein Worstcase-Szenario entworfen werden. Das Gewicht und die Beschaffenheit des Produktes wurden von allen Mitarbeitern der Herstellung als auffällig beurteilt. Eine Knorpelmatrix im üblichen Ausmaß wurde nicht gebildet, der Worstcase ist eingetreten. Würde nun die Eichkurve mit der Absorption von 0,3009 (PFOA B03) statt mit 0,4301 (N-TEC 30) erstellt, so ergäbe sich eine kritische Absorption von 0,5755 statt 0,9631 für eine Vitalität von 70 %. Obgleich ein vergleichbar schwach besiedeltes Implantat von den Mitarbeitern der Herstellung mit hoher Wahrscheinlichkeit entdeckt werden würde, wurden für bisherige Freigaben nie ein Absorptionswert von $\geq 0,6100$ gemessen. Die üblichen Absorptionswerte der Freigabeprodukte, allerdings bisher nicht

nach SOP gemessen, betragen zwischen 0,2533 und 0,6100. Die gewählte Beurteilungsmethode kann demnach als sehr vorsichtig und zuverlässig beurteilt werden. Die erhaltenen Viabilitätswerte stellen durch das Verfahren keinen exakte, sondern eine Mindestviabilität dar.

Weitere Erkenntnisse könnten durch ein kombiniertes Vorgehen zur Viabilitätsbeurteilung gewonnen werden. Sobald im laufenden Prozess an den Freigabetagen eine Absorptionsmessung des Überstandes nach den erstellten SOPs durchgeführt wird, könnten die Beurteilungen des Pathologen mit den Ergebnissen aus der entwickelten Methode verglichen werden. Etwaige Abweichungen könnten dann nachträglich erörtert und bei Notwendigkeit an die entwickelte Methode angepasst werden.

4.3 Validierung der Methode

Die Validierung der entwickelten Methode stellte den zweiten Kernbereichs der Promotion dar. Auf Basis der Richtlinien der European Medicines Agency (2011), wurden eine Risikoanalyse durchgeführt, SOPs entwickelt und schließlich ein Validierungsplan aufgestellt. Erst bei Durchführung der Validierung wurde durch verschiedene Operatoren deutlich, wie relevant die Temperatur der Reagenzien für den LDH-Assay ist. Nach diversen gescheiterten Validierungsvorbereitungstests, konnte als Hauptfaktor für die abweichenden Absorptionswerte eine zu geringe Temperatur des Reaktionsmixes identifiziert werden. Es wurde deutlich, dass eine Temperatur der Reagenzien von 20 °C notwendig für die erfolgreiche Durchführung des Assays war. Dies begründet sich aus der Tatsache, dass es sich um eine enzymatische Reaktion handelt. Enzymatische Reaktionen sind stark abhängig von der Temperatur, sodass es durch eine nicht ausreichende Erwärmung des gefrorenen LDH-Assay-Substratmixes zwangsläufig zu falschen Messergebnissen kommt (Berg et al. 2018). Nach der Verankerung dieser Erkenntnisse in der SOP, konnten für die Parameter Linearität, Genauigkeit und Präzision in den Validierungsläufen 1 und 2 die Akzeptanzkriterien erfüllt werden.

Der Parameter Robustheit wurde bereits während der Methodenentwicklung berücksichtigt. Die Spezifität musste aufgrund der Anwendung eines LDH-spezifischen, kommerziell erwerblichen, Kits nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte eine alternative Methode zur Beurteilung der Viabilität hergestellter Knorpelimplantate entwickelt werden. Diese Methode erfüllt die Ansprüche an Reproduzierbarkeit, Objektivität und Standardisierbarkeit und konnte im Rahmen der Validierung nach GMP-Richtlinien validiert werden.

5. Zusammenfassung

Aufgrund der sich umkehrenden Alterspyramide in Deutschland leiden bereits jetzt immer mehr Menschen an Gelenkknorpelschäden. Doch nicht nur das Alter, sondern auch Unfälle und Sportverletzungen und Übergewicht können zu irreversiblen Knorpeldefekten führen. Obwohl es diverse Behandlungsmöglichkeiten gibt, können die bisherige Methoden nicht als dauerhafte Heilung betrachtet werden. Im Rahmen des internationalen Forschungsprojektes BIO-CHIP sollte eine vielsprechende Behandlungsmethode mit neuartigen Arzneimitteln untersucht werden.

Als Ausgangsmaterial des Arzneimittels, ein hergestelltes Knorpelimplantat, dienen patienteneigene Knorpelzellen aus der Nase. Diese werden isoliert, vermehrt und letztlich auf einer Matrix zu einem Knorpelimplantat kultiviert. Wesentliche Voraussetzung für die Implantatfreigabe stellt neben toxikologischen und biologischen Unbedenklichkeitstests die Beurteilung der Viabilität dar. Diese wurde bisher anhand von Histologieschnitten von der Pathologie durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines standardisierten und objektiven Viabilitätstests für die Chondrozyten innerhalb der Knorpelmatrix. Hierfür wurde die LDH als Marker für irreversibel geschädigte Zellen verwendet. Die LDH Konzentration konnte mit dem CyQuant LDH-Assay durch die Messung der Absorption gemessen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass LDH die erforderliche Stabilität und Nachweisbarkeit im Medium besitzt. Mithilfe der Lyse, analog zum Herstellungsprozess, gezüchteter Mini-Knorpelimplantate, konnten die maximal erreichbaren LDH Konzentrationen ermittelt werden. Mithilfe dieser Konzentrationen wurde eine Eichkurve generiert. Diese dient als Beurteilung der Viabilität zukünftig gemessener Absorptionen des Überstandmediums.

Das entwickelte Verfahren erfordert keine invasiven Eingriffe am Implantat und zeichnet sich durch eine einfache Durchführung aus, da nur der Überstand gemessen werden muss. Die durchgeführte Validierung der Methode bescheinigte eine hohe Robustheit, Linearität, Genauigkeit und Präzision.

6. Summary

Due to the reversing age pyramid in Germany, more and more people are already suffering from joint cartilage damage. But not only age, but also accidents and sports injuries and being overweight can lead to irreversible cartilage defects. Although there are various treatment options, the previous methods cannot be considered a permanent cure. As part of the international research project BIO-CHIP, a promising treatment method with novel drugs was to be investigated.

The patient's own cartilage cells from the nose serve as the starting material for the drug, a manufactured cartilage implant. These are isolated, multiplied and ultimately cultivated on a matrix to form a cartilage implant. In addition to toxicological and biological safety tests, an essential prerequisite for the approval of the implant is the assessment of the viability. This was previously carried out on the basis of histology from the pathology department.

The aim of the present work was the development and validation of a standardized and objective viability test for the chondrocytes within the cartilage matrix. For this, the LDH was used as a marker for irreversibly damaged cells. The LDH concentration could be measured with the CyQuant LDH assay by measuring the absorption. It could be proven that LDH has the required stability and detectability in the medium. With the help of the lysis, of cultivated mini-cartilage implants, the maximum achievable LDH concentrations could be determined. A calibration curve was generated using these concentrations. This serves to assess the viability of future measured absorptions of the supernatant medium.

The developed method does not require any invasive interventions on the implant and is characterized by its simple implementation, since only the protrusion has to be measured. The validation of the method certified a high level of robustness, linearity, accuracy and precision.

7. Literaturverzeichnis

(2001) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. OJ L311:67–126.

(2007) Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. OJ L324:121–137.

Aslantürk, Özlem Sultan (2018): In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Marcelo L. Larramendy und Sonia Soloneski (Hg.): Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World: InTech.

Benninghoff, A.; Drenckhahn, D. (2008). Taschenbuch Anatomie. München Jena: Elsevier, Urban & Fischer.

Berg, J., Tymoczko, J., Gatto., Stryer, L., Held, A., Maxam, G., Seidler, L., Häcker, B.; Jarosch, B. (2018): Stryer Biochemie. Berlin: Springer Spektrum.

Chesterman, P. J.; Smith, A. U. (1968): Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. In: The Journal of bone and joint surgery. British volume 50 (1), S. 184–197.

Coligan, John E.; Bierer, Barbara E.; Margulies, David H.; Shevach, Ethan M.; Strober, Warren (2001): Current Protocols in Immunology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Darling, Eric M.; Athanasiou, Kyriacos A. (2003): Biomechanical Strategies for Articular Cartilage Regeneration. In: Annals of Biomedical Engineering 31 (9), S. 1114–1124. DOI: 10.1114/1.1603752.

Deutsche Akkreditierungsstelle (2015): Validierung und Verifizierung von Prüfverfahren nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 für Prüflaboratorien auf dem Gebiet der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik im Bereich der Abteilung 4 (Gesundheitlicher Verbraucherschutz | Agrarsektor | Chemie | Umwelt)

European Commission (2017): EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. Good Manufacturing Practice. Guidelines on Good Manufacturing Practise specific to Advanced Therapy Medicinal Products.

European Medicines Agency (2011): Guideline on bioanalytical method validation.

Gaissmaier, Christoph; Koh, Jason L.; Weise, Kuno; Mollenhauer, Juergen A. (2008): Future perspectives of articular cartilage repair. In: Injury 39 Suppl 1, S114-20. DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.033.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen). Online verfügbar unter: https://www.gbe-bund.de/gbe/!pkg_olap_tables.prc_set_page?p_uid=gast&p_aid=56938917&p_sprache=D&p_help=2&p_indnr=550&p_ansnr=59069190&p_version=3&D.001=1000001&D.946=14527&D.011=44302, zuletzt geprüft am 25.11.2020.

Hansen, S., Bjergaard, S. & Rasmussen, K. (2012): Introduction to pharmaceutical chemical analysis. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Inc.

Houle, J. C., Chen, A. V., Brenna, A. C., Mealey, K. L., & Kiszonas, A. M. (2015): Determination of optimal storage temperature and duration for analysis of total and isoenzyme lactate dehydrogenase activities in canine serum and cerebrospinal fluid. Veterinary Clinical Pathology, 44(2), 253–261. <https://doi.org/10.1111/vcp.12263>

Hunziker, E. B.; Quinn, T. M.; Häuselmann, H-J (2002): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. In: Osteoarthritis and cartilage 10 (7), S. 564–572.

ICH Q2(R1) (2006): Validation of analytical procedures: Text and methodology. Current step 5.

Imhoff, A. B. & Vogt, S. Tissue-Engineering am Kniegelenk - was ist gesichert? DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN, S. 98–104. Zugriff am 17.08.2019. Online verfügbar unter: <https://www.germanjournalsportsmedicine.com/fileadmin/content/archiv2007/heft04/98-104.pdf> , zuletzt geprüft am 18.08.2019.

Invitrogen (2019): Product information sheet, CyQuant LDH Cytotoxicity Assay Kit. Catalog Numbers C20300 and C20301. Pub. No. MAN0018500. Rev. B.0.

Jeuken, Ralph M.; Roth, Alex K.; Peters, Ruud J. R. W.; van Donkelaar, Corrinus C.; Thies, Jens C.; van Rhijn, Lodewijk W.; Emans, Pieter J. (2016): Polymers in Cartilage Defect Repair of the Knee: Current Status and Future Prospects. In: Polymers 8 (6). DOI: 10.3390/polym8060219.

Jiang, Yang Zi; Zhang, Shu Fang; Qi, Yi Ying; Wang, Lin Lin; Ouyang, Hong Wei (2011): Cell transplantation for articular cartilage defects: principles of past, present, and future practice. In: Cell transplantation 20 (5), S. 593–607. DOI: 10.3727/096368910X532738.

Kai, Dan; Jin, Guorui; Prabhakaran, Molamma P.; Ramakrishna, Seeram (2013): Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. In: Biotechnology journal 8 (1), S. 59–72. DOI: 10.1002/biot.201200249.

Kessler, Michael W.; Grande, Daniel A. (2008): Tissue engineering and cartilage. In: Organogenesis 4 (1), S. 28–32. DOI: 10.4161/org.6116.

Kreuz, P. C.; Steinwachs, M. R.; Erggelet, C.; Krause, S. J.; Konrad, G.; Uhl, M.; Südkamp, N. (2006): Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. In: *Osteoarthritis and cartilage* 14 (11), S. 1119–1125. DOI: 10.1016/j.joca.2006.05.003.

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018): Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6).

Larramendy, Marcelo L.; Soloneski, Sonia (Hg.) (2018): Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World: InTech.

Lehoczky, G., Wolf, F., Mumme, M., Gehmert, S., Miot, S., Haug, M., Jakob, M., Martin, I., & Barbero, A. (2020). Intra-individual comparison of human nasal chondrocytes and debrided knee chondrocytes: Relevance for engineering autologous cartilage grafts [JB]. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 74(1), 67–78. <https://doi.org/10.3233/CH-199236>.

Makris, Eleftherios A.; Gomoll, Andreas H.; Malizos, Konstantinos N.; Hu, Jerry C.; Athanasiou, Kyriacos A. (2015): Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. In: *Nature reviews. Rheumatology* 11 (1), S. 21–34. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.157.

Marlovits, Stefan; Zeller, Philip; Singer, Philipp; Resinger, Christoph; Vécsei, Vilmos (2006): Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. In: *European journal of radiology* 57 (1), S. 24–31. DOI: 10.1016/j.ejrad.2005.08.009.

McCarthy, H. S.; Roberts, S. (2013): A histological comparison of the repair tissue formed when using either Chondrogide(®) or periosteum during autologous chondrocyte implantation. In: *Osteoarthritis and cartilage* 21 (12), S. 2048–2057. DOI: 10.1016/j.joca.2013.10.004.

Mow, V. C.; Wang, C. C.; Hung, C. T. (1999): The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. In: *Osteoarthritis and cartilage* 7 (1), S. 41–58. DOI: 10.1053/joca.1998.0161.

O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *European journal of biochemistry* 267 (17), S. 5421–5426. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

Ossendorf, Christian; Steinwachs, Matthias R.; Kreuz, Peter C.; Osterhoff, Georg; Lahm, Andreas; Ducommun, Pascal P.; Erggelet, Christoph (2011): Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the treatment of large and complex cartilage lesions of the knee. In: *Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology: SMARTT 3*, S. 11. DOI: 10.1186/1758-2555-3-11.

Peltari, K., Pippenger, B., Mumme, M., Feliciano, S., Scotti, C., Mainil-Varlet, P., Procino, A., von Rechenberg, B., Schwamborn, T., Jakob, M., Cillo, C., Barbero, A., & Martin, I. (2014): Adult human neural crest-derived cells for articular cartilage repair. *Science Translational Medicine*, 6(251), 251ra119-251ra119. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009688

Riedel, F.; Goessler, U. R.; Stern-Straeter, J.; Riedel, K.; Hörmann, K. (2008): Regenerative Medizin. Chancen für die rekonstruktive Kopf-Hals-Chirurgie. In: *HNO* 56 (3), S. 262–274. DOI: 10.1007/s00106-007-1604-y.

Rudert, M.; Wirth, C. J. (1998): Knorpelregeneration und Knorpelersatz. In: *Orthopäde* 27 (5), S. 309–321. DOI: 10.1007/s001320050237.

Shah, Mehul R.; Kaplan, Kevin M.; Meislin, Robert J.; Bosco, Joseph A. (2007): Articular cartilage restoration of the knee. In: *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 65 (1), S. 51–60.

Steadman, J. Richard; Briggs, Karen K.; Rodrigo, Juan J.; Kocher, Mininder S.; Gill, Thomas J.; Rodkey, William G. (2003): Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. In: *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 19 (5), S. 477–484. DOI: 10.1053/jars.2003.50112.

Steinwachs, Matthias (2009): New technique for cell-seeded collagen-matrix-supported autologous chondrocyte transplantation. In: *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 25 (2), S. 208–211. DOI: 10.1016/j.arthro.2008.10.009.

Viganò, Marco; Lugano, Gaia; Colombini, Alessandra; Luca, Paola de; Perucca Orfei, Carlotta; Ragni, Enrico; Girolamo, Laura de (2019): Evaluation of Different Seeding Methods for Cell-Seeded Collagen Matrix-Supported Autologous Chondrocyte Transplantation. In: *Joints*. DOI: 10.1055/s-0039-1693458.

Walter, C.; Rohde, B.; Wicke, D. C.; Pohler, C.; Lührmann, A.; Leyen, H. von der (2011): Regulatorischer Rahmen für neuartige Therapien. Vom Labor zur klinischen Prüfung. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 54 (7), S. 803–810. DOI: 10.1007/s00103-011-1308-z.

Weisenthal, L. M.; Dill, P. L.; Kurnick, N. B.; Lippman, M. E. (1983): Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. In: *Cancer research* 43 (1), S. 258–264.

Weseloh, G.; Fießelmann, A. (1975): Zur Lactatdehydrogenase-Isoenzymverteilung im menschlichen Knorpel. *Archiv Für Orthopädische Und Unfall-Chirurgie*, 83(3), 345-351. doi:10.1007/bf00416288

Zeifang, Felix; Oberle, Doris; Nierhoff, Corinna; Richter, Wiltrud; Moradi, Babak; Schmitt, Holger (2010): Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. In: The American journal of sports medicine 38 (5), S. 924–933. DOI: 10.1177/0363546509351499.

Ziegele, Bettina; Müller, Athalia (2012): Arzneimittel für neuartige Therapien ATMP - Advanced therapy medicinal products. Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise. Online verfügbar unter: https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/pu/innovationsbuero/broschuere-atmp.pdf?__blob=publicationFile&v=3, zuletzt geprüft am 18.12.2019.

I Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbic acid 2-phosphate
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
AMG	Arzneimittelgesetz
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien
ChM	Chondrogenic Medium
CM	Culture Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EM	Expansion Medium
FGF	Fibroblast Growth Factor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSA	Humanes Serumalbumin
INT	Tetrazoliumsalz
LDH	L-Lactatdehydrogenase
MACI	Matrixgestützte autologe Chondrozytenimplantationen
MP	Manufacturing Protocol
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PFOA	Patellofemorale Gelenkarthrose
SD	Standardabweichung
SFM	Serum Free Medium
SOP	Standard Operating Procedure
TE	Tissue Engineering
TERM	Tissue Engineering und Regenerative Medizin
TGF	Transforming Growth Factor
TLZ-RT	Translationszentrum für Regenerative Therapien
ws	working-solution

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Arthroseerkrankungen in Deutschland. Verteilung nach betroffenem Gelenk (links). Verteilung der Kniearthrosen nach Alter (rechts). Abbildung eigens erstellt auf Basis von (GBE-Bund 2019).....	2
Abbildung 2 Gekoppelte Enzymreaktion zur Messung der LDH Konzentration (Eigene Darstellung)	17
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses im Reinraum. Links: Prozessablauf. Rechts: Verwendete Chemikalien für den jeweiligen Prozess.....	22
Abbildung 4 Graphische Darstellung der Absorption des Mediums im Verlauf von 4 Tagen	25
Abbildung 5 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängig der LDH Konzentration	27
Abbildung 6 Versuchsplan zur Untersuchung potenzieller Auswirkungen auf die Absorptionsmessung.....	28
Abbildung 7 Versuchsplan LDH Spikeversuch mit besiedelten Stanzen (Patient N-TEC 31).....	29
Abbildung 8 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe verschiedener Substrate für N-TEC 31.....	31
Abbildung 9 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe verschiedener Substrate für N-TEC 33 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).....	33
Abbildung 10 Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 31).....	34
Abbildung 11 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für N-TEC 31 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).	35
Abbildung 12 Modifizierter Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 33).....	36
Abbildung 13 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für N-TEC 33 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).	38

Abbildung 14 Modifizierter Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient N-TEC 30, 31, 36).....	39
Abbildung 15 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantate für N-TEC 30, 31, 36 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).	42
Abbildung 16 Versuchsplan für die Lyse von Mini-Knorpelimplantaten (Patient PFOA A03, B03, A04, B04).....	43
Abbildung 17 Grafische Darstellung der Absorptionshöhe aus unterschiedlich lang lysierten Mini-Knorpelimplantaten für PFOA 03 und PFOA 04 (Fehlerindikator auf Basis der Standardabweichung).	46
Abbildung 18 Grafische Darstellung der Viabilität in Abhängig der Absorption und der LDH Konzentration	50
Abbildung 19 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängig der Verdünnung der LDH für Validierungslauf 1	59
Abbildung 20 Graphische Darstellung der Absorption in Abhängig der Verdünnung der LDH für Validierungslauf 2	61

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendetes biologisches Material	12
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Lösungen	13
Tabelle 3 Verwendetes Labormaterial	14
Tabelle 4 Verwendete Kits.....	15
Tabelle 5 Verwendete Laborgeräte und -software.....	15
Tabelle 6 Vorversuche für die Methodenentwicklung.....	18
Tabelle 7 Umrechnung von Bio-Chip zu simulierter Herstellung	19
Tabelle 8 Herstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen.....	20
Tabelle 9 Absorptionswerte Stabilitätsversuch.....	24
Tabelle 10 Absorption in Abhängigkeit zur LDH Konzentration	26
Tabelle 11 Messergebnisse zum Einfluss auf die Absorption	28
Tabelle 12 LDH-Messungen aus dem Spikeversuch (Patient N-TEC 31)	30
Tabelle 13 LDH-Messungen aus dem Spikeversuch (Patient N-TEC 33)	32
Tabelle 14 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 31)	34
Tabelle 15 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 33)	36
Tabelle 16 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 30)	39
Tabelle 17 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 31)	40
Tabelle 18 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient N-TEC 36)	41
Tabelle 19 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient PFOA 03).....	43
Tabelle 20 Messergebnisse zur notwendigen Lysedauer (Patient PFOA 04).....	44
Tabelle 21 Übersicht der maximal gemessenen LDH Konzentrationen (1:10 verdünnt)	47
Tabelle 22 Viabilität in Abhängig der Absorption und der LDH Konzentration	49
Tabelle 23 PQ - Validierungsmatrix	55
Tabelle 24 Schema zum Ansetzen der Verdünnungsreihe und der QC-Samples.....	56
Tabelle 25 Akzeptanzkriterien für die Validierungsparameter.....	57
Tabelle 26 Ergebnisse Validierungslauf 1	58
Tabelle 27 Ergebnisse Validierungslauf 2	60

IV Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an PD Dr. Oliver Pullig und Patrick Bittorf, unter deren Betreuung es mir ermöglicht wurde am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin meine Promotion durchzuführen. Vielen Dank für euer Vertrauen und die viele Unterstützung die ich jederzeit von euch erhalten habe. Weiterhin vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll und Dr. Maria Steinke für die Betreuung meiner Doktorarbeit als Zweit- bzw. Drittgutachter.

Ein besonderer Dank gilt Barbara Bayer, Kirsten Langenbrink, Mona Röschlau und Heidi Linß für die wissenschaftliche Betreuung und Hilfsbereitschaft im Labor. Oft habt ihr mir bereitwillig bei Fragen geholfen und mich bei meinen Experimenten unterstützt – nur mit euch konnte der (fast) reibungslose Ablauf meiner Versuchsreihen gelingen. Mein Dank richtet sich auch an alle Kollegen aus den anderen Forschungsgruppen des Lehrstuhls Tissue Engineering und Regenerative Medizin für die warme und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für den emotionalen Rückhalt und dafür, dass ihr mir das Studium und die Promotion ermöglicht habt, danken. Über all die Jahre habe ich bei euch immer einen gern genutzten Rückzugsort gehabt – ihr seid die Konstante in meinem Leben!

Danke

V Lebenslauf

10/2015 – 03/2018	Vorklinischer Studienabschnitt der Zahnmedizin Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
09/2016	Naturwissenschaftliche Vorprüfung Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
03/2018 – 04/2018	Zahnärztliche Vorprüfung Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
04/2018 – 02/2020	Klinischer Studienabschnitt der Zahnmedizin Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
02/2020 – 11/2020	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) Julius-Maximilians-Universität, Würzburg