

Entwicklung einer *disposable*-  
Durchflussmesszelle zur spektroskopischen  
Bioprozessüberwachung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation  
von  
Tobias Steinwedel, M. Sc.

2022

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

**Korreferent:** apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

**Tag der Promotion:** 27.04.2022

---

## Danksagung

Im Laufe der Entstehung dieser Arbeit durfte ich viele tolle und hilfsbereite Menschen kennenlernen. Ich möchte diese Gelegenheit also nutzen, all denen Danke zu sagen, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis am Institut für Technische Chemie anfertigen zu können. Darüber hinaus vielen Dank, dass Du das TCI zu einem besonderem Ort gemacht hast, an dem es neben fachlichen Themen auch immer Platz für das Zwischenmenschliche gibt.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Sascha Beutel für die Übernahme des Korreferats bedanken. Vielen Dank, dass Du dich immer für uns Doktoranden eingesetzt hast.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Dr. Dörte Solle möchte ich an dieser Stelle für die umfassende Betreuung und die schönen Weihnachtsevents danken. Man konnte sich jederzeit sicher sein, dass du dir Zeit nimmst und gemeinsam nach Lösungen suchst, wenn das Projekt mal Schwierigkeiten aufgeworfen hat. Dr. Mathias Belz und Philipp Raithel möchte ich für die gute Zusammenarbeit in zahlreichen Telefonkonferenzen und die fortwährende Unterstützung im Projekt danken.

Ina, Pia, Carlotta, Anton und Jana - Danke für die Unterstützung bei den vielen *Kooperationen*. Ob Würfel-Chaos, nicht-endende Kultivierungen, unzählige ÄKTA-Läufe oder undichte Schläuche mit verstopften Spiralen, ihr habt nie aufgegeben und mir damit sehr geholfen.

Bei meinem Büro möchte ich mich für die vielen langen Abende und schönen Erinnerungen bedanken. Pia, Marline, Ina, Marc und Torsten - vielen Dank, dass man immer auf euch zählen kann!

Marc, ich freue mich wirklich, dass Du die gesamte Zeit vom ersten Tag des Studiums bis jetzt dabei warst. Mit dir hat alles immer besonders Spaß gemacht. Danke!

Alina, Kimia, Svenja, Ole und Taieb sowie dem Rest des Instituts danke ich für die schöne Zeit und den Zusammenhalt. Auch das Brauteam möchte ich hier nicht vergessen. Danke für die erfolgreichen Brauwettbewerbe und das tatkräftige Abwaschen!

Ich möchte mich außerdem ganz besonders bei Jana bedanken. Danke, dass du mich immer unterstützt und das Leben so einfach erscheinen lässt.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern und meiner Schwester danken. Vielen Dank, dass ihr in allen Lebenslagen für mich da seid und immer an mich geglaubt habt!

---

## Kurzfassung

Biopharmazeutische Produktionsprozesse dienen der Herstellung komplexer Biomoleküle zu therapeutischen Zwecken. Wachstumsfaktoren, Impfstoffe oder monoklonale Antikörper sind nur einige Beispiele für biotechnologisch hergestellte Produkte. Die große Mehrheit, der in der Vergangenheit etablierten Herstellungsverfahren, nutzt Equipment aus Edelstahl zur Durchführung der einzelnen Unit-Operations. Im Gegensatz dazu setzen moderne Produktionsprozesse vermehrt auf vorsterilisiertes Single-Use-Equipment. Dadurch entfallen zuvor notwendige Reinigungsschritte und Validierungen zwischen den Produktionszyklen und die Produktionsanlagen lassen sich deutlich flexibler einsetzen. Damit einhergehend steigt auch der Bedarf für compatible Sensoren, die ihrerseits ebenfalls Einwegprodukte sind oder einzelne Single-Use-Komponenten besitzen.

Daher wurde in dieser Arbeit eine Einweg-Durchflussmesszelle zur spektroskopischen Bioprozessüberwachung im Up- und Downstream entwickelt. Sie ist für den Einsatz an Single-Use-Systemen optimiert und ermöglicht sowohl die Aufnahme von Absorptionsspektren im UV/VIS-Spektralbereich als auch die Messung von Streulicht in verschiedenen Detektionswinkeln. Die Messzelle besteht aus Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) und wird additiv im *fused filament fabrication* (FFF)-Verfahren gefertigt. Dabei konnte die Biokompatibilität des Druckmaterials gemäß ISO 10993-5:2009 nachgewiesen werden. Zur Messung dient ein faseroptisches Spektrometer oder eine in den Messzellenhalter integrierte LED-Messtechnik. Für Pfadlängen (>3 mm) konnte eine hohe Genauigkeit des Fertigungsprozesses gezeigt werden. Der lineare Messbereich erstreckt sich bei Pfadlängen von <5 mm auf bis zu  $8 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Darüber hinaus wurde die Messzelle zur Überwachung von verschiedenen fed-batch-Prozessen und einem Perfusionsprozess eingesetzt. Insbesondere wurde dabei das Zellwachstum von CHO-Zellen in verschiedenen Reaktorsystemen überwacht. Um den hohen Dynamikbereich der Messmethode zu zeigen, wurde auch eine Hochzelldichtekultivierung mit *Komagataella phaffii* durchgeführt. Dabei konnte für die verschiedenen Anwendungen das Zellwachstum erfolgreich mithilfe der gemessenen Streulichtintensität abgebildet werden. Des Weiteren wurde die Messzelle zur Überwachung der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt. Hier konnte durch Aufnahme von Absorptionsspektren der Aggregatanteil des Antikörpers bestimmt werden.

**Schlagerwörter:** Single-Use, Durchflussmesszelle, Sensortechnologie, UV/VIS-Spektroskopie, Streulicht, Bioprozessüberwachung, 3D-Druck

---

## Abstract

Biopharmaceutical production processes are used to produce complex biomolecules for therapeutic purposes. Growth factors, vaccines or monoclonal antibodies are just a few examples of biotechnologically manufactured products. The vast majority of traditional manufacturing processes use stainless steel equipment to perform the individual unit operations. In contrast, modern production processes increasingly rely on pre-sterilized single-use equipment. This eliminates the need for cleaning steps and validation between production cycles and allows production equipment to be used much more flexible. This has also led to an increasing demand for compatible sensors, which in turn are single-use products or have individual single-use components.

Therefore, a single-use flow cell for spectroscopic bioprocess monitoring of up- and downstream processes was developed throughout this thesis. It is optimized to work with single-use systems and allows both the acquisition of absorption spectra in the UV/VIS spectral range and the measurement of scattered light at different detection angles. The flow cell is made of acrylonitrile butadiene styrene (ABS) and is additively manufactured using the fused filament fabrication (FFF) process. The biocompatibility of the printed material was demonstrated according to ISO 10993-5:2009. An external fiber optic spectrometer or LED measurement technology integrated into the measuring cell holder is used to perform the measurement. For path lengths ( $>3$  mm), high accuracy of the manufacturing process has been shown. The linear measuring range extends up to  $8 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$  for path lengths  $<5$  mm.

In addition, the sensor system was used to monitor various fed-batch processes and a perfusion process. In particular, this involved monitoring the cell growth of CHO cells in various bioreactor systems. To demonstrate the high dynamic range of the measurement method, a high cell density cultivation with *Komagataella phaffii* was conducted as well. The cell growth was successfully monitored for the different applications based on scattered light intensity. Furthermore, the flow cell was used to monitor the purification of a monoclonal antibody. Here, the aggregate fraction of the antibody could be determined by recording absorption spectra.

**keywords:** Single-use, flow cell, sensor technology, UV/VIS spectroscopy, scattered light, bioprocess monitoring, 3D printing

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung . . . . .	I
Kurzfassung . . . . .	II
Abstract . . . . .	III
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>2</b>
<b>3. Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
3.1. Methoden der Bioprozessentwicklung . . . . .	3
3.1.1. Von Empirischen Herangehensweisen zum Real Time Release .	3
3.1.2. Bedeutung der online Sensorik für Real Time Release Testing .	5
3.2. Spektroskopische Sensoren zur Bioprozessüberwachung . . . . .	7
3.2.1. UV/VIS Spektroskopie . . . . .	9
3.2.2. Lichtstreuung . . . . .	11
3.3. Herausforderungen für Single-Use Systeme . . . . .	12
3.3.1. Single-Use Reaktorsysteme . . . . .	13
3.3.2. Schnittstellen und kommerziell erhältliche Sensorsysteme . . .	15
<b>4. Aufbau und Konzept des Sensorsystems</b>	<b>18</b>
4.1. Gesamtkonzept . . . . .	18
4.2. Die Einweg-Multifunktionsmesszelle . . . . .	19
4.2.1. Absorptions-Messzelle . . . . .	20
4.2.2. Streulicht-Messzelle . . . . .	22
4.3. Messzellenhalter und Messequipment . . . . .	23
4.3.1. Absorptionsmodul . . . . .	23
4.3.2. Streulichtmodul . . . . .	25
4.3.3. Anbindung an verschiedene Prozesssysteme . . . . .	25
4.3.4. Zusammenfassung . . . . .	27
<b>5. Entwicklung erster Prototypen</b>	<b>29</b>
5.1. Sterilität und Biokompatibilität . . . . .	29
5.2. Evaluierung des Fenstermaterials . . . . .	32
5.3. Untersuchung des Verweilzeitverhaltens . . . . .	33

5.4. Zusammenfassung . . . . .	35
<b>6. Validierung der Messmethode</b>	<b>36</b>
6.1. Genauigkeit des Herstellungsprozesses . . . . .	36
6.2. Bestimmung des linearen Messbereichs . . . . .	39
6.3. Überprüfung der Selektivität der Messmethode . . . . .	43
6.4. Zusammenfassung . . . . .	48
<b>7. Online Monitoring von CHO-DG44 Kultivierungen in verschiedenen Reaktorsystemen</b>	<b>50</b>
7.1. Batch-Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	50
7.2. Fed-Batch-Kultivierung im 10 l Edelstahlreaktor . . . . .	54
7.3. Perfusionsprozess im modularen Single-Use-Bioreaktorsystem . . . . .	56
<b>8. Online-Überwachung der Biomasse für Hochzelldichte-Verfahren</b>	<b>60</b>
8.1. Fed-Batch-Kultivierung von <i>Komagataella phaffii</i> im 30 l Edelstahlreaktor	60
<b>9. UV/VIS-Spektroskopie zur Qualitätskontrolle im Aufreinigungsprozess eines monoklonalen Antikörpers</b>	<b>64</b>
9.1. Überwachung des Capture-Schritts . . . . .	64
9.2. Anionenaustauschchromatographie zur Abtrennung von Nukleinsäuren	67
9.3. Detektion von Antikörper-Aggregaten . . . . .	71
<b>10. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>76</b>
<b>11. Chemikalien und Materialien</b>	<b>80</b>
11.1. Chemikalien und Reagenzien . . . . .	80
11.2. Geräte und Materialien . . . . .	82
11.2.1. Laborausstattung . . . . .	82
11.2.2. Verbrauchsmaterialien . . . . .	83
11.2.3. Verwendete Software . . . . .	84
11.2.4. Verwendete 3D-Drucker . . . . .	85
11.2.5. Verwendete 3D-Druckmaterialien . . . . .	85
11.3. Lösungen und Puffer . . . . .	85
11.4. Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien . . . . .	87
11.5. Verwendete Kulturmedien und Zusätze . . . . .	87

<b>12. Methoden</b>	<b>91</b>
12.1. Herstellungsprozess der Sensorkomponenten . . . . .	91
12.1.1. Einweg-Messzelle . . . . .	91
12.1.2. Messzellenhalter . . . . .	92
12.2. Messmethode . . . . .	92
12.2.1. Aufnahme von Absorptionsspektren . . . . .	92
12.2.2. Absorptionsmessung mit LED-Messtechnik . . . . .	93
12.2.3. Streulichtmessungen . . . . .	94
12.3. Entwicklungsprozess . . . . .	94
12.3.1. Desinfektion und Sterilisation von 3D-Druckmaterialien . . . . .	94
12.3.2. Herstellung der Extraktionsmedien . . . . .	95
12.3.3. Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen . . . . .	96
12.3.4. CTB-Assay . . . . .	96
12.3.5. Aufnahme von Verweilzeitspektren . . . . .	97
12.4. Validierung . . . . .	98
12.4.1. Bestimmung der exakten Pfadlänge . . . . .	98
12.4.2. Gradientenmessung . . . . .	98
12.4.3. Design of Experiment . . . . .	99
12.4.4. Multivariate Datenanalyse mittels PLS-Regression . . . . .	100
12.5. Kultivierungen mit CHO-Zellen . . . . .	102
12.5.1. Batch Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	102
12.5.2. Fed Batch Kultivierung im 10 L Edelstahlreaktor . . . . .	103
12.5.3. Perfusionsprozess . . . . .	104
12.6. Hochzelldichte-Kultivierung mit <i>Komagataella phaffii</i> . . . . .	105
12.7. Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers . . . . .	105
12.7.1. Affinitätschromatographie mit Protein A . . . . .	105
12.7.2. Anionenaustauschchromatographie . . . . .	106
12.7.3. DNA-Aufreinigung für Spiking-Versuche . . . . .	106
12.7.4. Herstellung von Antikörper-Aggregaten durch wiederholtes Ein- frieren . . . . .	106
12.7.5. Optische Detektion von Antikörper-Aggregaten . . . . .	107
12.7.6. Berechnung des Aggregationsindex . . . . .	107
12.7.7. HPLC-SEC . . . . .	107
12.7.8. Nachbearbeitung der Spektraldaten . . . . .	108



<b>Anhang</b>	<b>118</b>
<b>A. Zusätzliche Experimentelle Daten</b>	<b>118</b>
<b>B. Unterstützende Arbeiten</b>	<b>121</b>
<b>C. Curriculum Vitae</b>	<b>122</b>
<b>D. Publikationsliste</b>	<b>123</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
AD	Außendurchmesser
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CPP	kritische Prozessparameter (engl. <i>critical process parameter</i> )
CQA	kritische Qualitätsattribute (engl. <i>critical quality attribute</i> )
DoE	Statistische Versuchsplanung (engl. <i>Design of Experiment</i> )
FDA	engl. Food and Drug Administration
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
HCP	engl. <i>host cell protein</i>
HDPE	Hart-Polyethylen (engl. <i>High Density Polyethylen</i> )
HIC	Hydrophobe-Interaktionschromatographie
ID	Innendurchmesser
IGG	Immunglobulin
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LED	Leuchtdiode (engl. <i>light emitting diode</i> )
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantification</i> )
MIR	mittleres Infrarot
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PA	Polyamid
PAT	engl. <i>Process Analytical Technology</i>

---

PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principle component analysis</i> )
pCO <sub>2</sub>	Gelöstkohlenstoffdioxidkonzentration
PEEK	Polyetheretherketon
PLS	engl. <i>partial least square</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration
QbD	engl. <i>Quality by Design</i>
rel. AU	engl. <i>relative absorbance units</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RTRT	engl. <i>real time release testing</i>
SUB	engl. <i>single-use bioreactor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
ZDBC	Zinkdibuthyldithiocarbamat

# 1. Einleitung

*„Auf Alles, was ich als Poet geleistet habe, bilde ich mir gar nichts ein. [...] Dass ich aber [...] in der schwierigen Wissenschaft der Farbenlehre der Einzige bin, der das Rechte weiß, darauf tue ich mir etwas zu gute.“*

Goethe, der große Dichter, war also fest davon überzeugt, auch ein großer Naturwissenschaftler zu sein. In seiner 1810 erschienenen Schrift „Zur Farbenlehre“ griff er John Isaac Newton an, welcher bereits im 17. Jahrhundert experimentell demonstrierte, dass weißes Licht aus verschiedenen Farben zusammengesetzt ist. Newton nutzte dazu einen abgedunkelten Raum und ließ Sonnenlicht durch ein kleines Loch auf ein Prisma fallen. Dahinter entstand durch Lichtbrechung ein gut sichtbarer Regenbogen mit allen Farben des sichtbaren Lichtspektrums. Goethe ging anders vor und betrachtete eine weiße Wand durch ein Prisma, um das Farbspektrum zu sehen. Die vielen sich überlagernden Lichtstrahlen der weißen Wand verhinderten jedoch eine solche Beobachtung. Trotz methodischer Fehler verbuchte Goethe sein Experiment als Erfolg und sprach der Newtonschen Lehre ihre Gültigkeit ab.

Newton sollte jedoch Recht behalten und stellte damit die Basis zur Erklärung verschiedenster Alltagsbeobachtungen, wie dem Himmelsblau oder der Abendröte. Verantwortlich für diese Phänomene sind keine Prismen, sondern Gasmoleküle in der Atmosphäre. An diesen Gasteilchen wird das Sonnenlicht auf dem Weg zum Betrachter in alle Richtungen gestreut. Der Physiker Lord Rayleigh erkannte bald, dass diese Streuung wellenlängenabhängig ist. Blaues Licht wird bei der nach ihm benannten Rayleigh-Streuung stärker gestreut als rotes. Tagsüber erscheint der Himmel demnach blau, weil die blauen Lichtanteile zur Erdoberfläche gestreut werden. Bei niedrigem Sonnenstand ist die Strecke des Sonnenlichts durch die Atmosphäre jedoch länger. Dadurch wird ein Großteil des blauen Lichts seitlich weggestreut. Übrig bleiben die roten Lichtanteile, welche den Himmel am Abend rot erscheinen lassen.

All das beruht auf der Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Durch die Beobachtung von Licht lassen sich also immer auch Informationen über das jeweilige Umfeld sammeln. Dies ist der Grund für die weite Verbreitung optischer Sensoren in verschiedensten Anwendungen. Auch einzelne Zellen und die Moleküle in ihrem Inneren beeinflussen das Licht um sie herum. Im Bereich der Biotechnologie können diese Sensoren also helfen, die Prozesse innerhalb einer Zelle zu verstehen und sinnvoll zu regeln. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines solchen Sensors und zeigt seine Implementierung an verschiedenen Bioprozessen.

## 2. Zielsetzung

Ziel der vorgelegten Dissertation ist die Entwicklung einer Einweg-Durchflussmesszelle zur optischen Bioprozessüberwachung. Diese soll sich durch eine einfache Handhabung auszeichnen und vielseitig einsetzbar sein. Daher wird ein vorsterilisiertes Produkt angestrebt, welches direkt durch den Nutzer in den jeweiligen Prozess integriert werden kann. Als Schnittstelle dienen sterile Schlauchverbindungen. Damit soll sowohl die Überwachung konventioneller batch-Prozesse als auch die Messung im Probenstrom kontinuierlicher Prozesse ermöglicht werden. Als Einweg-Produkt bedient die Messzelle jedoch vor allem den Bedarf an geeigneter Messtechnik für moderne Single-Use-Bioreaktoren. Ebenfalls Teil der Entwicklung wird ein wiederverwendbarer Messzellenhalter sein. Dieser übernimmt die optische Verbindung der Durchflussmesszelle zur Lichtquelle bzw. Detektoreinheit und sorgt damit für eine reproduzierbare Einkopplung von Licht in die Messkammer. Das Messprinzip beruht dabei auf der UV/VIS-Spektroskopie und der Detektion von Streulicht in verschiedenen Winkeln. Zur Umsetzung des beschriebenen Konzepts soll zunächst das Herstellungsverfahren für die Messzelle etabliert werden. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Auswahl biokompatibler Materialien, eine effiziente Sterilisierungsmethode sowie die Einhaltung von Fertigungstoleranzen der kritischen Bauteile. Eine nachfolgende Charakterisierung und Validierung der Messmethode soll sicherstellen, dass das entwickelte System zur Quantifizierung ausgewählter biogener Chromophore geeignet ist. Anschließend soll das Sensorsystem an verschiedenen Upstream-Prozessen zur Überwachung des Zellwachstums erprobt werden. Der Fokus liegt dabei auf der Kultivierung von CHO Zellen, da diese eine große Bedeutung im Bereich der biopharmazeutischen Industrie besitzen. Die Vielseitigkeit des Sensors soll hier durch die Auswahl verschiedener Reaktortypen und Prozessstrategien gezeigt werden. Weiterhin soll der Sensor auch für die Überwachung von Downstream-Prozessen eingesetzt werden. Daher werden einige Prozessschritte am Beispiel der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers mit dem Sensorsystem überwacht. Die durchgeführten Messungen werden stetig mit etablierten Messmethoden und Sensoren verglichen. Sie dienen als Referenz und ermöglichen somit eine abschließende Beurteilung des Sensorsystems.

## **3. Theoretische Grundlagen**

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der Bioprozessüberwachung und zugehöriger online Messtechnik beschrieben, die zum besseren Verständnis dieser Arbeit beitragen sollen. Nach einer allgemeinen Einführung in den Entwicklungsprozess und die Etablierung neuer Bioprozesse, soll die Bedeutung der online Sensorik am Beispiel einer modernen Methode zur Prozessvalidierung erläutert werden. In Hinblick auf das zu entwickelnde Sensorsystem werden im weiteren Verlauf die Grundlagen der UV/VIS-Spektroskopie und Lichtstreuung erläutert. Abschließend werden die Erkenntnisse auf den Bereich der modernen Single-Use-Bioreaktoren übertragen und die Herausforderungen in der Entwicklung geeigneter Sensoren für diese Systeme beschrieben.

### **3.1. Methoden der Bioprozessentwicklung**

Biopharmazeutische Produkte bilden eine wichtige Säule des heutigen Gesundheitssystems. Zu dieser Gruppe gehören verschiedene Naturstoffe, Proteine und andere biogene Makromoleküle. Eine wirtschaftliche Produktion dieser Therapeutika ist abhängig von der Verfügbarkeit robuster und skalierbarer Bioprozesse. Die Methodik der Entwicklung neuer Bioprozesse hat sich mit der Zeit von empirischen Herangehensweisen hin zu einem wissensbasierten Prozessverständnis entwickelt [39]. Damit wurde auch der Bedarf an Daten und zugehöriger Messtechnik immer bedeutender. Die folgenden Abschnitte geben daher einen Überblick über die verschiedenen Methoden der Bioprozessentwicklung.

#### **3.1.1. Von Empirischen Herangehensweisen zum Real Time Release**

Produktions- und Aufreinigungsprozesse werden im Zuge der Bioprozessentwicklung optimiert und etabliert. In unterschiedlichen Entwicklungsphasen werden Teilaufgaben wie Stammselektion, Medien/Feed-Entwicklung, Reaktordesign und Fütterungsstrategien bearbeitet. Dies geschieht traditionellerweise unter Verwendung von empirischen Methoden, welche einen hohen experimentellen Aufwand erfordern. Zeit- und

Kostendruck in der Prozessentwicklung führten in diesem Zusammenhang zur Entwicklung von Hochdurchsatz-Screening-Verfahren. Durch die Kombination von Reaktorminiaturisierung, Parallelisierung und Prozessautomatisierung lässt sich der Zeitaufwand für das Screening deutlich reduzieren. Zugleich wird eine Vielzahl unterschiedlicher Experimente möglich, die unter vergleichbaren Bedingungen simultan durchgeführt werden können. Die nötige Anzahl an Versuchen kann durch den Einsatz statistischer Versuchsplanung (DoE) weiter verringert werden. [38, 21, 20, 23]

Problematisch an diesen empirischen Herangehensweisen ist, dass biologische Zusammenhänge zwischen Prozess und Produkt häufig im Verborgenen bleiben. Der steigende Optimierungsdruck, welcher insbesondere durch die stärkere Vermarktung von Biosimilars entstanden ist, verlangt jedoch immer effizientere Herstellungsverfahren. Daher ist es von Vorteil, schon im Zuge des Screenings auf Geräte zu setzen, die hinsichtlich mechanischer und physikalischer Eigenschaften vergleichbar zu Bioreaktoren im Produktionsmaßstab sind [29, 36, 8]. Sie ermöglichen es, Prozessparameter wie Temperatur, pH-Wert und Gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ) zu überwachen und zu regeln. Ebenso verfügen sie häufig über eine Prozessanalytik zur Echtzeit-Überwachung von Abgasen und Biomasse. Damit lassen sich schon in der Prozessentwicklung das Zellwachstum und die Produktbildungskinetik in großvolumigen Bioreaktoren vorhersagen (scale-up) [12, 24].

Die verfügbaren Daten werden auch für ein besseres Prozessverständnis genutzt. Dieses ist nötig zur Anwendung wissenschaftlich basierter Bioprozessentwicklung „Quality by Design“ (QbD) [4, 41]. Dahinter steckt der Anspruch, dass die Qualität eines Produktes nicht ausschließlich durch einen hohen Aufwand von Testverfahren und Qualitätssicherungsmaßnahmen (QC) bestimmt wird, sondern wesentlich in der Prozessentwicklung gestaltet wird [48, 1]. Dafür müssen alle Aspekte des Herstellungsprozesses vollständig verstanden und kontrolliert sein (mechanistisches Modell) [49]. Kernelement dieser Herangehensweise ist die kausale Verknüpfung von kritischen Prozessparametern und gewünschten bzw. unerwünschten Qualitätsattributen eines Produkts. Diese Faktoren werden als critical process parameters (CPPs) und critical quality attributes (CQAs) bezeichnet. Weiterhin sind auch die Eigenschaften der Rohmaterialien, die unter dem Begriff critical material attributes (CMAs) zusammengefasst werden, von Bedeutung. Die statistische Versuchsplanung wird innerhalb des QbD genutzt, um potenzielle CPPs zu ermitteln, ihren Wertebereich einzugrenzen und den Einfluss auf die CQAs zu bestimmen [40, 35]. Es wird ein sogenannter *process design space* angelegt, welcher die Grenzen relevanter CPPs festlegt [40]. Bewegt sich der

Prozess innerhalb dieses festgelegten Wertebereichs, kann die Einhaltung der Qualitätsstandards des Produkts (CQAs) gewährleistet werden.

Darüber hinaus werden Konzepte zur Prozessvalidierung, wie das Real Time Release Testing (RTRT), möglich. Real Time Release Testing vereint das tiefe Prozessverständnis des QbD mit den Werkzeugen der PAT-Initiative [52]. Traditionelle QC-Tests sind bei einer Echtzeit-Produktfreigabe nicht mehr erforderlich. Eine Voraussetzung dafür ist das kontinuierliche Überwachen der CPPs mithilfe von vorher festgelegten Kontrollen. Bei der Definition der nötigen Messungen hilft das zuvor erlangte Prozessverständnis. Die Produktqualität wird durch eine Reihe von CQAs definiert. Diese müssen durch eine gültige Kombination von gemessenen CMAs und CPPs kontrolliert und sichergestellt werden. Ein CQA wird während des Herstellungsprozesses zu dem Zeitpunkt gemessen, an dem dieses CQA durch den Prozess erzeugt wird. Dies geschieht meistens indirekt durch die Messung von CPPs, da die CQAs häufig nicht unmittelbar gemessen werden können. Damit unterscheidet sich das RTRT essenziell von der konventionellen QC-Endproduktprüfung. Abweichungen im Produktionsprozess können früh identifiziert und durch adaptive Prozessregelung ausgeglichen werden. Damit wird das Risiko der Ablehnung ganzer Chargen deutlich reduziert [45]. Weiterhin bietet das RTRT viele Möglichkeiten zur Automatisierung [44]. Somit können die Herstellungskosten bei gleichbleibend hohen Qualitätsstandards gesenkt werden.

### **3.1.2. Bedeutung der online Sensorik für Real Time Release Testing**

Die kontinuierliche Überwachung von kritischen Prozessparametern erfordert den Einsatz von geeigneten Sensorsystemen [28]. Sie sind damit ein zentraler Baustein in der Etablierung von Strategien zur Echtzeitfreigabe von biopharmazeutischen Produkten. Grundsätzlich können verschiedene Sensortypen verwendet werden, die sich in ihrer Positionierung im Prozess und der Geschwindigkeit der Messung unterscheiden. Im optimalen Fall findet die Messung direkt im Bioprozess (z. B. Bioreaktor) inline statt. Dabei besteht direkter Kontakt zwischen Sensor und Kulturmedium bzw. Pufferlösung. In einzelnen Fällen kann der Sensor in einem Bypass positioniert sein, um bestimmte Störeffekte durch z. B. Begasung zu verhindern. Das Sensorsignal bildet hier den aktuellen Zustand des Prozesses ab und liegt ohne Verzögerung direkt vor. Somit wird diese Analyse häufig auch als online bezeichnet. Befindet sich der Sensor in der Nähe aber außerhalb der Prozesseinheit, spricht man von einer atline Messung. Die Probe wird



meist über ein automatisiertes Probenentnahmesystem zum Sensor geführt. Hierbei kann es zu einer gewissen Verzögerung kommen, sodass hier je nach Messfrequenz von einer quasi-online Messung gesprochen wird. Andere Messverfahren werden als offline bezeichnet und weisen einen höheren Zeitverzug auf, da die Probe in der Regel manuell in einem externen Messgerät analysiert wird. Aufgrund der nötigen kontinuierlichen Überwachung von CPPs und CQAs, sind lediglich online-Sensoren relevant für das RTRT. [5]

Innerhalb des Produktionsprozesses bestehen viele Faktoren, die die Qualität des Endprodukts beeinflussen können. Der Einsatz von Sensorsystemen kann daher bei verschiedenen Prozessoperationen nötig sein und wird im Zuge des QbD-Verfahrens durch eine Risikoanalyse festgelegt [40]. Der Fokus liegt in der Regel auf dem Upstream-Prozess und den verschiedenen Operationen des Downstream-Prozesses. Wobei letzterer, aufgrund der reduzierten Komplexität der Proben, für online-Messungen besser zugänglich ist. Des Weiteren werden die finale Formulierung und Abfüllung des Endprodukts kontrolliert. Aber auch eine Überwachung der Rohmaterialien ist zunehmend von Bedeutung [33]. Kleine Variationen in der Güte des Rohmaterials enden bei traditionellen Prozessstrategien als unerklärliche Variabilität in der Produktqualität. Dies kann zur Ablehnung ganzer Chargen führen. Das Festlegen eines *process design space* ermöglicht im Gegensatz zu traditionellen Prozessstrategien eine gewisse Flexibilität. Im besten Fall gelingt es, durch adaptive Regelungssysteme, auf solche Schwankungen zu reagieren und eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

Abhängig von der verfügbaren Sensortechnologie können verschiedene Strategien zur Beurteilung der Erfüllung von CQAs verfolgt werden. Die besten Ergebnisse werden durch direktes Messen des CQA während des Herstellungsprozesses erzielt. Voraussetzung dafür ist, dass die Messgröße mit einem erhältlichen Sensorsystem zugänglich ist. Dies ist jedoch häufig nicht der Fall. Daher können mechanistische oder empirische Modelle zur Vorhersage eingesetzt werden. Diese basieren dann auf den leichter zugänglichen CPPs. Mechanistische Modelle bieten eine bessere Extrapolation bei unterschiedlichen Prozessbedingungen, erfordern allerdings ein hohes Prozessverständnis [19]. Empirische Modelle sind datengetrieben und können daher auch ohne ein vollständiges Prozessverständnis eine präzise Vorhersage von CQAs ermöglichen. Dabei kommen häufig multivariate Analyseverfahren, wie die principle component analysis (PCA) oder die partial least square regression (PLS-Regression) zum Einsatz [43, 16, 9]. Ist eine Echtzeit-Vorhersage der CQAs nicht möglich, wird lediglich die Einhaltung des *process design space* überwacht. Die Echtzeit-Vorhersage der CQAs ermöglicht

jedoch die Etablierung von Feedbackschleifen. Diese machen Gebrauch von den vorhandenen online-Messungen oder Vorhersagen und können Qualitätsschwankungen durch Regeleingriffe minimieren. Daher sind sie für die Etablierung des Real Time Release Testing zu bevorzugen. [25]

### 3.2. Spektroskopische Sensoren zur Bioprozessüberwachung

Optische Spektroskopie umfasst die Gesamtheit aller qualitativen und quantitativen Methoden, die auf die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Atomen, Molekülen, Flüssigkeiten oder Festkörpern zurückzuführen sind. Die Wechselwirkungen werden durch Sensoren mithilfe unterschiedlicher spektroskopischer Methoden in verschiedenen Wellenlängenbereichen erfasst. Optische Sensoren zur Bioprozessüberwachung nutzen den Wellenlängenbereich von energiereicher Ultraviolettstrahlung (UV) bis hin zur Mittelinfrarot-Spektroskopie (MIR) [5, 37]. Abbildung 3.1 zeigt die Spektralbereiche der häufig verwendeten spektroskopischen Verfahren für die Bioprozessanalytik. Die Verfahren lassen sich grob in die Kategorien Absorptions-, Reflexions-, Streuungs-, und Lumineszenzspektroskopie einteilen [46]. Für Letztere ist innerhalb der Bioprozesstechnik jedoch lediglich die Fluoreszenzspektroskopie relevant. Auch die anderen Kategorien lassen sich in verschiedene Untergruppen auftei-

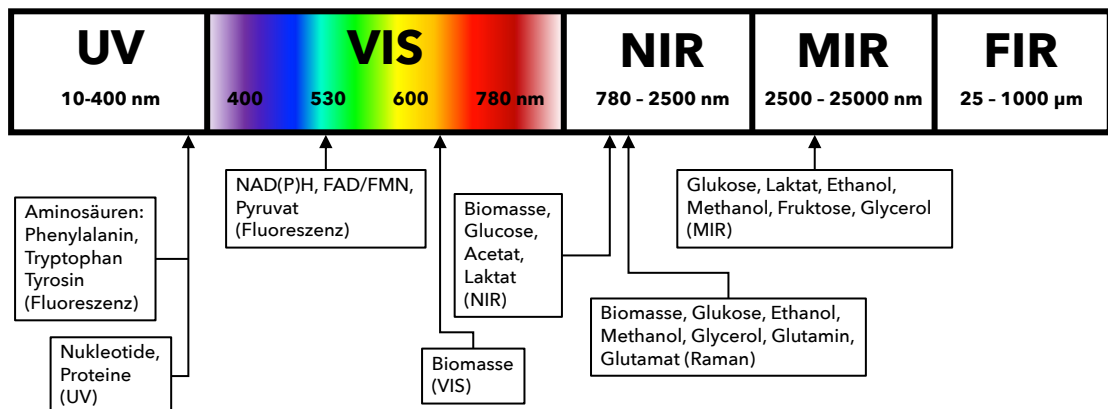


Abbildung 3.1.: Wellenlängenbereiche spektroskopischer Verfahren in der Bioprozessüberwachung mit zugehörigen Analyten

len. Zu den Absorptionstechniken zählen die UV/VIS- und Infrarotspektroskopie. Verfahren zur Trübungsmessung sowie die Raman-Spektroskopie nutzen Lichtstreuung zur Analyse. Die genannten Methoden besitzen zahlreiche Eigenschaften, die sie für eine Verwendung in der Bioprozessüberwachung interessant machen. Die Sensoren werden in der Regel über optische Lichtwellenleiter an den Bioprozess angeschlossen. Die Messung erfolgt inline jedoch nicht invasiv. Das erleichtert die Sterilisierung des Sensors. Darüber hinaus liefern sie kontinuierlich, ohne Zeitverzug und Probenentnahme, Informationen aus dem Bioprozess. Da eine Vielzahl von Biomolekülen spektroskopisch aktiv ist, bieten optische Sensoren die Möglichkeit zur simultanen Multiparameteranalytik [50]. Somit kann bereits ein einzelner Sensor Informationen über eine Vielzahl von Prozessvariablen liefern.

Je nach eingesetzter Messmethode stellen spektroskopische Sensoren unterschiedliche Anforderungen an den jeweiligen Messaufbau. So können die Interaktionen der Probe mit dem eingestrahlichten Licht in unterschiedlichen Winkeln im Bereich von  $0^\circ$  bis  $180^\circ$  erfasst werden (Abbildung 3.2). Transmissionsmessungen, wie die Absorptionsmessung, erfordern das ungehinderte Passieren eines Lichtstrahls durch die Probe. Die Detektion findet also in der Regel an der gegenüberliegenden Seite des einfallenden

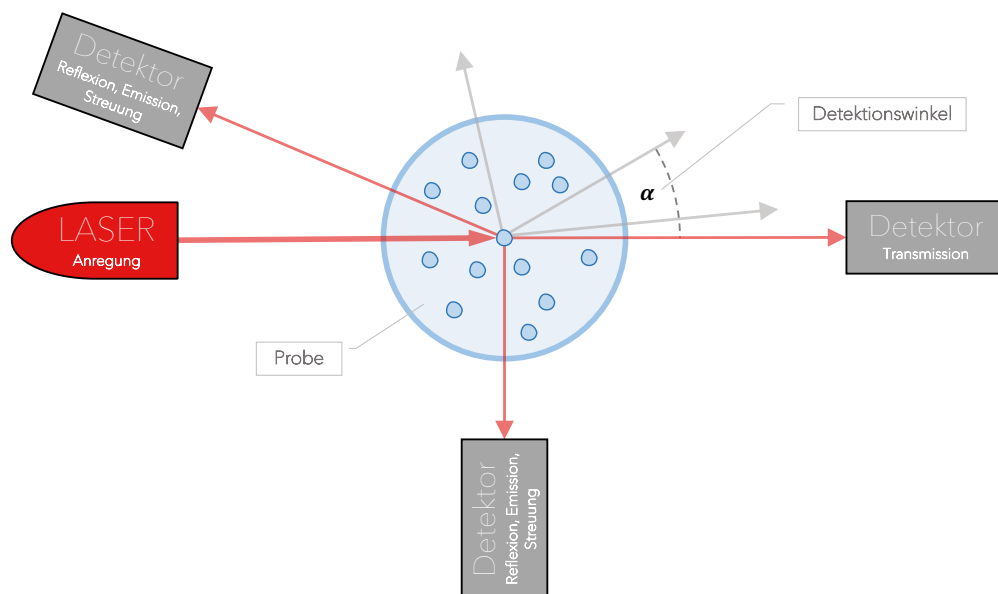


Abbildung 3.2.: Schema zur Wechselwirkung von Licht mit Partikeln in einer Probe. Dargestellt sind verschiedene Detektionsarten abhängig vom Detektionswinkel.

den Lichts statt. Reflexions-, Emissions-, und Streuungsmessungen können in einem Winkel von bis zu 180° zum Anregungslicht detektiert werden. Bauartbedingt werden jedoch auch kleinere Winkel verwendet. Hier sind vor allem die Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie relevant. Eine besondere Stellung nehmen Messungen der Trübung ein. Sie können grundsätzlich in jedem Winkel aufgenommen werden. Der tatsächliche Messaufbau orientiert sich hier an den speziellen Anforderungen der jeweiligen Anwendung [5, 10]. In den folgenden Abschnitten wird näher auf die UV/VIS-Spektroskopie und Streulichtmessungen eingegangen.

### 3.2.1. UV/VIS Spektroskopie

Die optische Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums ist eine weit verbreitete Methode zur Analyse biologischer Proben [11]. Das Verfahren nutzt dazu den Wellenlängenbereich von 220 nm bis 800 nm [22]. Zumeist wird hier die Absorption bestimmter Moleküle (Chromophore) gemessen. Andere relevante Interaktionen mit dem eingestrahlt Licht werden durch Streuung, Beugung, Brechung oder Reflexion verursacht. Die Absorption wird durch lichtabsorbierende funktionelle Gruppen hervorgerufen. Dazu zählen vor allem konjugierte Doppelbindungen, aromatische Systeme oder Heteroatome mit freien Elektronenpaaren [46]. Damit sind unter anderem Proteine und DNA mithilfe der UV/VIS-Spektroskopie detektierbar, da diese aus aromatischen oder heterozyklischen Verbindungen bestehen. Eine Übersicht weiterer biogener Chromophore bietet die zuvor gezeigte Abbildung 3.1.

Relevant zur Lichtabsorption sind die konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme und nichtbindende n-Elektronen. Sie werden bei Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und in ein höheres Energieniveau überführt. Dies resultiert in einer spezifischen Absorptionsbande im UV/VIS-Spektrum. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums hängt von der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand ab. Man spricht hier im Fall des Grundzustands vom höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO). Elektronen aus dem HOMO werden bei Lichtabsorption in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) überführt. Mit steigender Anzahl an konjugierten Doppelbindungen in einem Molekül sinkt die Energiedifferenz zwischen HOMO und LUMO, was zu einer Verschiebung der ersten Absorptionsbande zu höheren Wellenlängen führt [28]. Eine Quantifizierung der in Abbildung 3.1 aufgeführten Moleküle, kann durch die Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes rea-

liert werden. Die zugehörigen Analysen beruhen auf Transmissionsmessungen. Diese bestimmen das Verhältnis der Intensität des Anregungslichts  $I_0$  zum abgeschwächten Licht  $I$  nach dem Passieren der zu untersuchenden Probe.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.1)$$

$I$  : Intensität des austretenden Lichtstrahls

$I_0$  : Intensität des einfallenden Lichtstrahls

Die Transmission nimmt bei zunehmender Analytkonzentration und durchstrahlter Strecke exponentiell ab. Daher wird häufig das logarithmische Verhältnis der Transmission gebildet. Die resultierende Absorption  $A$  ist linear zur Konzentration des Analyten und erlaubt so eine schnelle optische Konzentrationsbestimmung. Unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  eines Stoffes lässt sich auch die Absorption einer Probe mit bekannter Konzentration  $c$  bei definierter Schichtdicke  $d$  berechnen. Diese Beziehung wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d = -\log(T) \quad (3.2)$$

$\varepsilon$  : molarer Extinktionskoeffizient

$c$  : Konzentration des Analyten

$d$  : Schichtdicke

Das Gesetz gilt nur unter Einhaltung bestimmter Bedingungen, die insbesondere bei komplexen Proben wie Proteinlösungen oder Zellsuspensionen nicht immer erfüllt sind. Die absorbierenden Moleküle müssen homogen verteilt sein, dürfen nicht streuen und auch keine Wechselwirkungen untereinander zeigen. Dies ist speziell für Zellsuspensionen problematisch, da Zellen als Streulichtzentren fungieren. Ebenso können Streuung und Reflexion auch an der Probenoberfläche auftreten und die Intensität des eingestrahlt Lichts verringern. Die Extinktion  $E$  (auch: optische Dichte OD) schließt neben der reinen Absorption auch die genannten Effekte wie Streuung, Beugung, Brechung und Reflexion mit ein. Sie ist damit ein Maß für die allgemeine Abschwächung von Licht nach Durchqueren eines Mediums und leitet sich von der Opazität, dem Kehrwert der Transmission, ab.

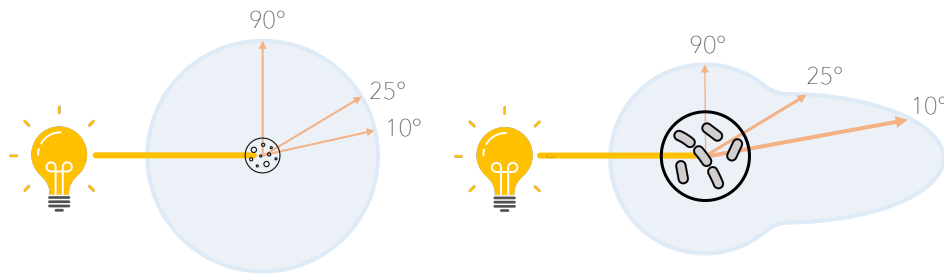
$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.3)$$

### 3.2.2. Lichtstreuung

Trübung in Flüssigkeiten wird durch kleine suspendierte Partikel verursacht, die einen anderen Brechungsindex aufweisen als das umgebende Medium. Dieser Unterschied führt zur Reflexion und Streuung und damit zu einer Richtungsänderung des eingestrahnten Lichts. Sofern das eingestrahlte Licht bis zum Verlassen der Probe nur einmal gestreut wurde, ist die Abschwächung proportional zur Anzahl der Partikel. Um den Einfluss der Absorption möglichst gering zu halten, liegen die für Trübungsmessungen verwendeten Wellenlängen im nahen Infrarotbereich (NIR 700-1000 nm). Das gestreute Licht besitzt dabei die gleiche Wellenlänge wie das eingestrahlte Licht. Dies wird auch als elastische Streuung bezeichnet und unterscheidet sich somit von der unelastischen Streuung, welche für die Raman-Spektroskopie relevant ist. [51]

Die Streuung ist abhängig von der Form, Größe und dem Material bzw. dem Brechungsindex der Partikel. Dabei gilt je größer der Unterschied zwischen den Brechungsindizes, desto höher ist die Intensität des Streulichts. Das Verhältnis zwischen Größe und Wellenlänge hat wiederum Einfluss auf die Winkel- und Wellenlängenabhängigkeit des gestreuten Lichts. Unter Annahme der einmaligen Streuung an einer homogenen, dielektrischen Kugel können, je nach Größe, bestimmte räumliche Verteilungen des Streulichts festgestellt werden (Abbildung 3.3). Für Partikel, deren Durchmesser deutlich kleiner als die Wellenlänge ist, findet man eine symmetrische Winkelintensitätsverteilung des gestreuten Lichts um ein Partikel herum (Reyleigh-Streuung). Partikel mit einer Größe im Bereich der Wellenlänge oder darüber, führen zu asymmetrischen oder komplexen Streulichtverteilungen. Sie können mithilfe der Mie-Streuung beschrieben werden und zeigen eine verstärkt vorwärts gerichtete Streuung [32].

Auch biologische Zellen fungieren als Streuzentren. Mit ihrer Größe von bis zu 30  $\mu\text{m}$  für Säugetierzellen, lösen auch sie asymmetrische Streulichtverteilungen aus. Durch interne Strukturen (Zellorganellen) und unterschiedliche Formen oder Morphologien wird dieser Effekt noch verstärkt [14, 30]. Dies wird beispielsweise in der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung oder Sortierung von verschiedenen Zelltypen genutzt [53]. Weiterhin können Streulichtmessungen auch zur Größenbestimmung von Zellen oder Partikeln genutzt werden. Messungen der Zelldichte (optische Dichte) sind ebenfalls weit verbreitet. Viele Systeme nutzen einfache Transmissionsmessungen zur Bestimmung der Trübung. Diese Methode ist, aufgrund der Überlagerung mehrerer Streulichtereignisse, nur für geringe Trübungen nutzbar. Ebenso bietet die



**Abbildung 3.3.:** Schematische Darstellung zur winkelabhängigen Intensitätsverteilung bei verschiedenen Partikelgrößen. Symmetrische Rayleigh-Streuung bei kleinen Partikeln (links) und asymmetrische Streulichtverteilung für größere Partikel oder Zellen (rechts).

Streulichtmessung mit geringen Detektionswinkeln ( $11^\circ - 30^\circ$ ) eine hohe Sensitivität für geringe Trübungen. Jedoch ist das Signal für mittlere oder hohe Trübungen gesättigt. Systeme zur Messung von hohen Trübungen nutzen daher oftmals die Messung des Rückstreulichts [5].

### 3.3. Herausforderungen für Single-Use Systeme

Gerührte Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl sind bis heute weit verbreitet für die Entwicklung und Herstellung von Biopharmazeutika. Seit ihrer Einführung hat die fortschreitende Bioreaktorentwicklung dafür gesorgt, dass der Anwender heute zwischen einer Vielzahl verschiedener Reaktorformen und Rührwerkstypen wählen kann. Außerdem sind relevante technische Daten wie Mischzeit, Sauerstofftransferrate und Verweilzeitverteilung leicht zugänglich [27]. Aufgrund des internationalen Wettbewerbs in der pharmazeutischen Industrie und des wachsenden finanziellen Drucks im Gesundheitswesen werden zunehmend Einweg-Bioreaktoren (SUB) eingesetzt [7]. Durch fortschreitende Entwicklung von großvolumigen Single-Use Bioreaktoren (SUB) und einem wachsenden Portfolio an Equipment, finden Single-Use Systeme eine immer breitere Anwendung in der biopharmazeutischen Industrie. Insbesondere bei hochwertigen Produkten, wie monoklonalen Antikörpern (mAbs) oder Impfstoffen, und häufig wechselnden Prozessen, haben SUBs aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile ihre Pendanten aus Edelstahl ersetzt. Dazu zählen vor allem die kurzen Rüstzeiten, durch das Wegfallen von aufwändigen Reinigungs- und Sterilisierungsarbeiten. Darüber hinaus

ist der Einsatz umweltschädlicher Reinigungsmittel nicht mehr nötig. Auch die Energiekosten fallen aufgrund nicht notwendiger Reinigungs- und Sterilisierungsverfahren geringer aus.

Gleichzeitig stellt der Übergang zu Einweg-Bioreaktorsystemen auch neue Anforderungen an das Zubehör von Bioreaktoren. Im Hinblick auf die Prozessanalysetechnik (PAT)-Initiative der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) ist es notwendig, verschiedene Prozessparameter zu überwachen, um die Qualität der biotechnologischen Produkte zu gewährleisten. Zudem wurde in Kapitel 3.1.2 die Bedeutung von online-Sensorik für neue Freigabeverfahren wie das Real Time Release Testing erläutert. Daher werden dringend Sensoren und geeignete Schnittstellen zur online-Überwachung in Einweg-Bioreaktorsystemen benötigt.

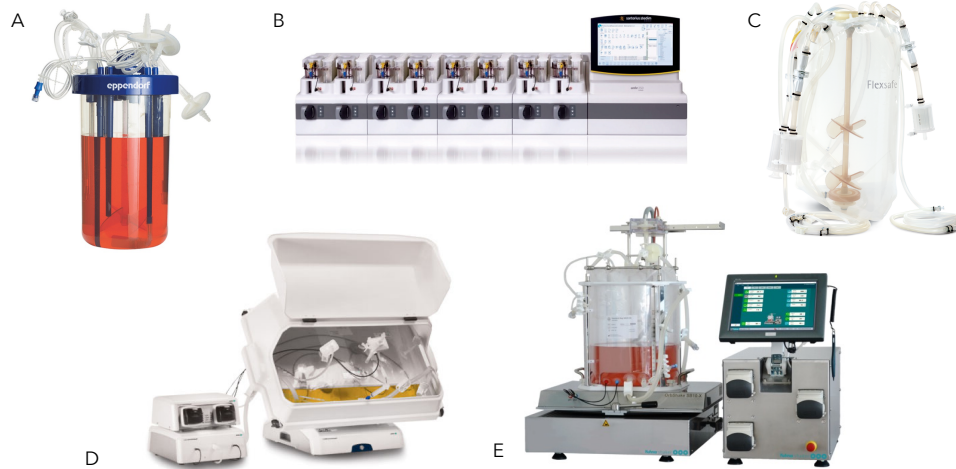
### 3.3.1. Single-Use Reaktorsysteme

Grundsätzlich können SUBs in verschiedene Bauarten eingeteilt werden, die sich hauptsächlich an der Form und dem Material des Reaktors und der Art der Durchmischung orientieren. Eine Übersicht der verschiedenen Systeme gibt Abbildung 3.4. Alle haben gemein, dass der eigentliche Reaktor aus Kunststoff gefertigt ist und nach dem einmaligen Gebrauch entsorgt werden muss.

Die erste Kategorie bilden die sogenannten Rührkesselreaktoren (STR). Dabei kann weiter zwischen Systemen mit flexiblen Beuteln oder festen Rührkesseln unterschieden werden. Hinsichtlich ihrer Bauweise ähneln Letztere den klassischen Bioreaktoren aus Edelstahl oder Glas, werden jedoch aus Polycarbonat hergestellt. Verschiedene Systeme von 10 mL bis 40 L Arbeitsvolumen sind erhältlich. Sowohl das BioBLU<sup>®</sup> (Eppendorf) als auch das Ambr<sup>®</sup> 250 (Sartorius Stedim Biotech) sind modulare, stapelbare Systeme mit bis zu 32 oder mehr parallelen Kultivierungsgefäßen. Die Kultivierungsgefäße bieten Arbeitsvolumina von 10 bis 250 ml und eignen sich für Hochdurchsatz-Screening-Experimente und Prozessentwicklungen, die DoE-Ansätze und QbD-konforme Prozesse ermöglichen [3]. Die im Benchtop-Maßstab konzipierten gerührten SUBs, darunter der UniVessel<sup>®</sup> SU (Sartorius Stedim Biotech), der Mobius<sup>®</sup> Cell-Ready 3L Bioreaktor (Merck Millipore), der BioBLU<sup>®</sup> 1c und 3c (Eppendorf) und der SmartVessel<sup>™</sup> Bioreaktor (Finesse), kommen dem klassischen Design von wiederverwendbaren, gerührten Zellkultur-Bioreaktoren sehr nah.

Die STR-Beutelreaktoren ermöglichen mit bis zu 4000 L Arbeitsvolumen deutlich größere Prozesse. In der Regel bestehen sie aus flexiblen, mehrschichtigen Polyethylen-





**Abbildung 3.4.:** Übersicht erhältlicher Single-Use Bioreaktorsysteme. Fester Rührkesselreaktor BioBLU<sup>®</sup> 1c von Eppendorf (A), Modulare parallelisierbare Rührkesselreaktoren Ambr<sup>®</sup> 250 von Sartorius Stedim Biotech (B), Flexibler Beutelreaktor mit internem Rührsystem BIostat STR<sup>®</sup> von Sartorius Stedim Biotech (C), Wellendurchmischer flexibler Beutelreaktor ReadyToProcess WAVE 20 von GE Healthcare (D), Orbital geschüttelter Bioreaktor OrbShake von Kühner (E).

folien und unterscheiden sich damit von den zuvor genannten Systemen aus Polycarbonat. Sie sind nicht freistehend, sondern benötigen Support-Container aus Edelstahl oder Kunststoff, da die Materialien empfindlich gegenüber äußeren Kräfteinwirkungen sind, die zu Undichtigkeiten führen können. Weiterhin ist es wichtig, dass sie ordnungsgemäß installiert werden und perfekt in ihre Haltevorrichtung passen, um eine optimale Performance zu erreichen, vor allem im Hinblick auf die Wärmeübertragung. Der BIostat STR<sup>®</sup> (Sartorius Stedim Biotech) kommt der klassischen Konfiguration eines modernen wiederverwendbaren Bioreaktors so nah wie möglich. Die Beutel sind bis zu einem Arbeitsvolumen von 2000 L erhältlich. Homogene Durchmischung im Beutel wird durch ein integriertes Rührsystem erreicht.

Eine weitere Gruppe nutzt die schon erwähnten flexiblen Beutel-Reaktoren in Kombination mit schwenkbaren Schüttelplatten. Die Vermischung innerhalb des Beutels erfolgt durch einen welleninduzierten Mischprozess, der durch die oszillierende Bewegung der Schüttelplatte entsteht. Die verschiedenen wellengemischten Bioreaktoren unterscheiden sich in ihrem Beuteldesign (Folienmaterial, Größe und Abmessungen), den installierten Sensortypen und der Art der Plattformbewegung, die eindimensio-

nal (1-D), zweidimensional (2-D), oder dreidimensional (3-D) sein kann [26]. Einem ähnlichen Durchmischungsprinzip unterliegen die orbital geschüttelten Bioreaktoren. Auch sie nutzen kein klassisches Rührwerk, sondern eine Schüttelplatte, die sich in diesem Fall kreisförmig bewegt. Damit erinnern sie an den Betrieb klassischer Schüttelkolben, bieten jedoch hinsichtlich der Überwachung wichtiger Prozessparameter und Regelungstechnik ähnliche Flexibilität wie traditionelle Bioreaktoren.

### 3.3.2. Schnittstellen und kommerziell erhältliche Sensorsysteme

Einwegensensoren müssen kosteneffizient im Hinblick auf ihre Verwendung sein, wohingegen eine gute Langzeitstabilität oftmals nicht erforderlich ist [6]. Bisher verbreitete Sensoren für Edelstahlreaktoren sind schon aufgrund ihres hohen Preises nicht für die einmalige Anwendung in SUBs geeignet. Ein weiteres Problem sind die Schnittstellen zum Anschluss der Sensoren an den Bioreaktor. Diese sind zwar für Edelstahlreaktoren standardisiert, variieren aber insbesondere bei kleinen SUBs je nach Hersteller [2]. Dieser Umstand erschwert den universellen Einsatz eines Sensors an verschiedenen SUBs.

Die meisten herkömmlichen Sensorsysteme für die Online-Überwachung basieren auf einem invasiven Messprinzip. Dazu gehören elektrochemische Sensoren wie pH-Elektroden und Sensoren zur Messung von gelöstem Sauerstoff (Clark-Elektrode). Im Gegensatz zu nichtinvasiven Sensoren müssen sie in direktem Kontakt mit dem Kulturmedium stehen und werden in der Regel zusammen mit dem Bioreaktor vor Beginn des Prozesses mit Heißdampf sterilisiert. Einweg-Bioreaktoren werden jedoch vorsterilisiert geliefert und können vom Anwender nur mit zusätzlichem Aufwand nachträglich mit invasiven Sensoren bestückt werden. Das gesamte System muss vom Hersteller zusammengesetzt werden, bevor die endgültige Sterilisation erfolgt. Somit muss der Sensor zusammen mit dem SUB gekauft werden. Dies ist nur für preiswerte Sensoren geeignet. Daher sollten komplexe Sensorsysteme neu konstruiert werden, um die Produktionskosten zu senken. Ein Beispiel für diese Lösung ist die single-use pH-Elektrode, die vormontiert mit SUBs wie dem Ambr<sup>®</sup> 250 (Sartorius Stedim AG, Deutschland) vertrieben wird. Invasive Sensoren müssen jedoch weiterhin die Reaktorwand durchdringen, um Daten über die flüssige oder feste (Zell-)Phase zu erfassen, und stellen daher ein Kontaminationsrisiko dar.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, das kostenintensive Bauteil mit der gesamten Elektronik vom montierten Sensorkopf zu trennen und die wiederwendbare Technik

später an den Einweg-Bioreaktor anzuschließen. Dadurch muss nur der Teil des Sensors entsorgt werden, welcher die Sterilbarriere durchbricht. Der Hauptteil des Sensors kann anschließend wiederverwendet werden. Diese Strategie verfolgen optische Chemosensoren zur Messung des pH-Werts, des  $pO_2$ -Anteils und von gelöstem Kohlenstoffdioxid ( $pCO_2$ ). Der Sensor spot mit dem Indikatorfarbstoff befindet sich an der Innenseite des Bioreaktors. Die Messungen werden von außen berührungslos durch das transparente Behältermaterial vorgenommen. Die PreSens Precision Sensing GmbH bietet verschiedene Sensorsysteme zur optischen Messung von pH,  $pO_2$  und  $pCO_2$  an. Zugleich bietet eine Reihe von Herstellern ihre SUBs mit integrierten Sensorpatches an, welche somit vorsterilisiert sind. Darüber hinaus ermöglichen invasive Sensoren, die auf der Radiofrequenz-Identifikations-Technologie (RFID) basieren, eine drahtlose Übertragung von Informationen durch das Kunststoffmaterial von SUBs über ein elektromagnetisches Feld. Dadurch können sie die Vielseitigkeit invasiver Sensoren mit den Vorteilen nichtinvasiver Sensorsysteme kombinieren.

Ebenso eröffnen SUBs auch neue Möglichkeiten für den Einsatz neuartiger Sensortechnologien für die Bioprozessüberwachung [13]. Nichtinvasive Messgeräte zur Impedanzmessung können in Zukunft bei SUBs ohne spezielle Schnittstelle eingesetzt werden, da das Kunststoffmaterial für die Messwellenlängen durchlässig ist [42]. Selbst wenn das Kunststoffmaterial für die erforderlichen Wellenlängen nicht vollständig durchlässig ist, gestaltet sich die entsprechende Schnittstelle sehr einfach. Bei optischen Messungen mit UV-Licht besteht die Schnittstelle im Wesentlichen aus einer Quarzglasplatte, durch die das Licht in den Bioreaktor eintritt oder ihn verlässt. Außerdem ermöglicht die Sterilisation durch  $\gamma$ -Bestrahlung die Anwendung von Biosensoren und anderen Technologien, die nicht thermostabil sind.

Letztlich können Sensorsysteme ohne erhältliche Schnittstellentechnik über direkte Schlauchverbindungen oder aseptische Kopplungssysteme installiert werden. Direktes Verbinden von Schläuchen unter sterilen Bedingungen erfordert den Einsatz thermoplastischer Schläuche (C-Flex™, AdvantaFlex®, PharMed® oder Bioprene™). Voraussetzung zur Herstellung einer aseptischen Schweißverbindung ist, dass die verwendeten Schläuche steril sind, die gleichen Abmessungen (Innendurchmesser und Außendurchmesser) haben und eine ausreichende Länge aufweisen. Um eine Kontamination zu verhindern, müssen die Enden beider Schläuche thermisch versiegelt oder mit einem Stopfen oder einer Klemme verschlossen werden. Die Systeme zum Verschweißen von Schläuchen, wie der Sterile Tube Fuser (GE Healthcare) oder der BioWelder® TC (Sartorius Stedim Biotech), nutzen eine vorgeheizte Klinge zum Durchtrennen

der Schlauchverbindungen. Im Anschluss werden die Enden der Schläuche vertauscht und erneut miteinander verschmolzen, sodass eine neue Verbindung geschlossen wird. Aseptische Kopplungssysteme benötigen hingegen kein weiteres Equipment. Der Benutzer kann diese von Hand innerhalb kurzer Zeit miteinander verbinden. Die Systeme bestehen aus zwei zusammengehörigen Adaptern aus Kunststoff, welche auf Schlauchenden montiert werden. Die aseptischen Teile auf der Anschlussseite werden mit Kappen, Membranen, Kunststofffolien, Silikonmembranen oder abgedichteten Stopfen verschlossen. Nach dem Verbinden werden die Membranen, Folien oder Stopfen entfernt, und beide Teile mechanisch gesichert. Aseptische Konnektoren sind sicher und bieten den Vorteil, dass Verbindungen schnell und ohne weitere Ausrüstung hergestellt werden können [17, 54]. Darüber hinaus ist es möglich, Schläuche unterschiedlicher Größe miteinander zu verbinden.

# 4. Aufbau und Konzept des Sensorsystems

## 4.1. Gesamtkonzept

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines optischen Sensorsystems zur online-Bioprozessüberwachung. Kern des Systems ist eine Einweg-Multifunktionsmesszelle, welche zusammen mit wiederverwendbarer Messtechnik eingesetzt werden soll. Diese umfasst einen Messzellenhalter, an welchen weiteres Equipment modular angeschlossen werden kann. Über Lichtwellenleiter sind somit verschiedene Lichtquellen und Detektoren integrierbar. Das Messprinzip basiert auf der UV/VIS-Spektroskopie (Transmissionsmessungen), sowie Messungen von Streulicht in verschiedenen Winkeln. Das Licht durchquert die Messzelle dabei durch eingesetzte Fenster aus Quarzglas. Das Konzept ist auf den Einsatz an modernen Single-Use Bioreaktoren ausgelegt, wobei die Installation der Messzelle im Bypass erfolgt. Dies vereint die Vorteile von Single-Use Equipment mit der Möglichkeit den Sensor universell an verschiedensten Reaktorsystemen zu installieren. Bei der Anwendung im Upstream-Bereich soll der Sensor vor allem der Überwachung von Wachstumsprozessen (Biomasse) mittels Streulichts dienen. Darüber hinaus eröffnet der Messaufbau auch die Messung kritischer Parameter im Downstream-Bereich. Dazu zählen insbesondere die Messung von DNA- und Proteinkonzentrationen mithilfe von Absorptionsmessungen. Auch hier wird zunehmend Single-Use-Equipment eingesetzt, sodass die Messzelle sich ideal integrieren lässt. Das Gesamtkonzept ist in Abbildung 4.1 schematisch festgehalten. Das dargestellte Schema zeigt die im Messzellenhalter fixierte Messzelle und die elementaren Bauteile des Sensorkonzeptes. Die einzelnen Komponenten werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

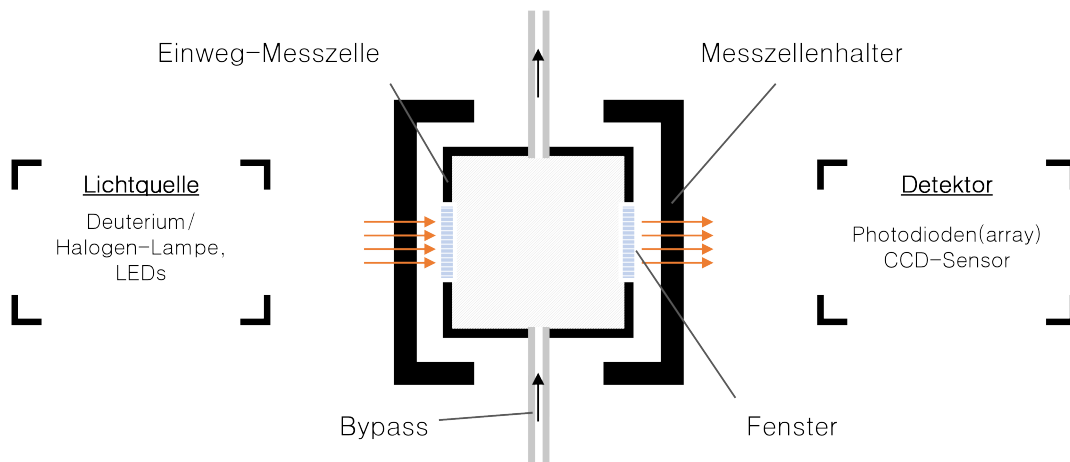


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des Sensorkonzepts

## 4.2. Die Einweg-Multifunktionsmesszelle

Zentraler Bestandteil des entwickelten Sensorsystems ist die Einweg-Multifunktionsmesszelle. Sie besteht aus einem Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) und wird im additiven Fertigungsverfahren (3D-Druck) hergestellt. Zur Einkopplung von Licht werden Fenster aus Quarzglas eingesetzt und verklebt, die für den relevanten Wellenlängenbereich durchlässig sind. Weiterhin besitzt die Messzelle zwei Schlauchanschlüsse, mit denen das System in einen bestehenden Bypass oder einem Chromatographiesystem integriert werden kann. Die Schlauchstücke werden im Zuge des Herstellungsverfahrens installiert und zusammen mit der Messzelle durch Gammastrahlung sterilisiert. Das vorangehende Versiegeln der Schlauchenden ermöglicht eine einfache Handhabung bei gleichzeitiger Gewährleistung der Sterilität.

Für einen gleichmäßigen Transport des Mediums durch den Bypass wird eine Pumpe genutzt. Grundsätzlich sind dabei verschiedene Bauarten der Pumpe möglich (z. B. Peristaltik- oder Hubkolbenpumpe). Der Probenstrom verläuft durch die Messzelle und verlässt diese wiederum vollständig. Durch die sterile Herstellung der Messzelle kann der Probenstrom in den Bioreaktor zurückgeführt werden (geschlossenes System). Die Messung erfolgt daher ohne Probenentnahme also volumenverlustfrei. Dabei können, abhängig vom verwendeten Equipment, optische Messungen zum Absorptions- und Streulichtverhalten vorgenommen werden. Je nach Messmethode werden unterschiedliche Anforderungen an die Architektur der Messkammer gestellt. Daher wurden zwei verschiedene Ausführungen der Messkammer entwickelt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

### 4.2.1. Absorptions-Messzelle

Die Absorption einer Probe wird bestimmt, indem die Abschwächung eines Lichtstrahls beim Durchqueren des Mediums gemessen wird. Die entwickelte Absorptionsmesszelle besitzt daher zwei gegenüberliegende Fenster, durch die ein Lichtstrahl in die Probe ein- und auch wieder austreten kann (Abbildung 4.2). Die Distanz zwischen den Fenstern entspricht der Pfadlänge der Messung. Die Absorptionsmesszelle kann in verschiedenen Konfigurationen, die sich hinsichtlich ihrer Pfadlängen unterscheiden, gefertigt werden. Um einen möglichst breiten Absorptionsbereich abdecken zu können, sind Pfadlängen von 1,5 mm bis 20 mm möglich (alle verwendeten Pfadlängen mit zugehörigem Volumen siehe Tabelle 12.1 in Abschnitt 12.1.1). Die Probe wird mit einem Schlauch über den untenliegenden Zugang in die Messkammer geführt und verlässt diese nach oben. Im Querschnitt wird deutlich, wie die Breite des Flusskanals zunimmt, bis sie der Pfadlänge der Messzelle entspricht. Hinter der Messkammer verjüngt sich der Kanal wieder auf das Ausgangsmaß. Dadurch wird das Volumen der Messzelle minimiert und die Fließgeschwindigkeit gegenüber einer scharfkantigen Messkammergeometrie erhöht. Die vertikale Orientierung des Durchflusskanals und

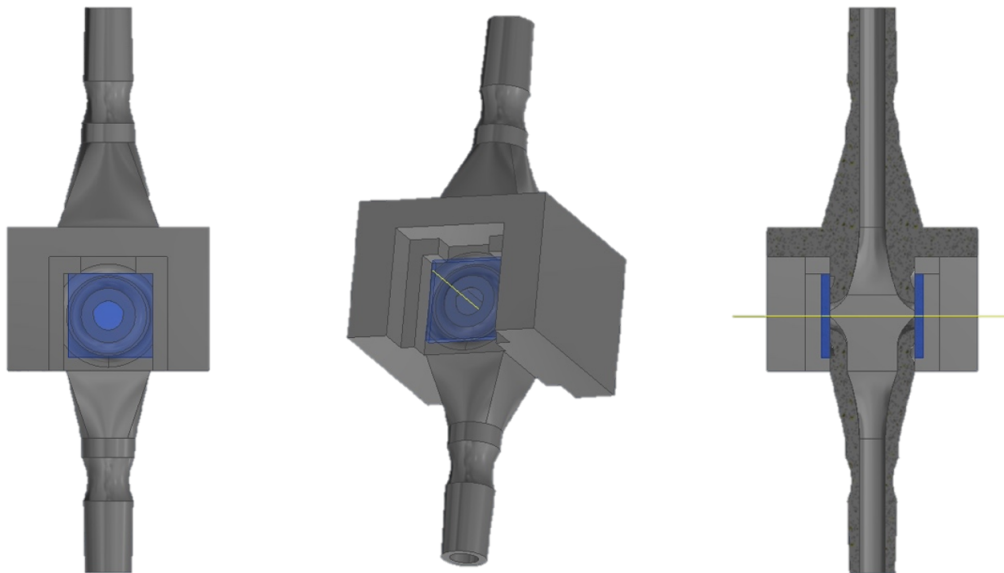


Abbildung 4.2.: Zeichnungen (links und Mitte) und Querschnitt (rechts) der Absorptionsmesszelle. Die eingesetzten Fenster sind in blau eingefärbt. Die gelbe Linie zeigt die optische Achse an, durch welche der Lichtstrahl zur Absorptionsmessung verläuft.

der geradlinige Verlauf ermöglichen es, dass Luftblasen die Messzelle ungehindert passieren können. Damit wird eine dauerhafte Störung des Messsignals durch Luftblasen verhindert.

Neben den Messzellen mit einfacher Pfadlänge wurde eine Mehrkanal-Absorptionsmesszelle entwickelt (Abbildung 4.3). Diese Konfiguration vereint mehrere Messkammern mit unterschiedlichen Pfadlängen in einer Flusszelle. Die Pfadlängen können dabei beliebig miteinander kombiniert werden. Die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle ist damit für Messungen geeignet, die einen hohen Dynamikumfang erfordern. Des Weiteren sind parallele Absorptionsmessungen mit unterschiedlichen Wellenlängen möglich. Der Aufbau entspricht ansonsten dem zuvor beschriebenen Konzept. Größere Pfadlängen ab 10 mm sind mit einer optimierten Messkammergeometrie ausgestattet, um die Strömungsgeschwindigkeit zu erhöhen und das Volumen der Messkammer gering zu halten. Die Messzelle wird dabei aufgrund der speziellen Kanalkonstruktion s-förmig durchlaufen. Dabei verläuft die Flussrichtung innerhalb der Messzone parallel zur optischen Achse (Abbildung 4.4).



Abbildung 4.3.: Mehrkanal-Absorptionsmesszelle



Abbildung 4.4.: Querschnitt der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle



### 4.2.2. Streulicht-Messzelle

Die Messzelle zur Messung von Streulicht basiert auf der Konstruktion der Absorptions-Flusszelle. Auch hier finden sich zwei gegenüberliegende Fenster, durch die ein Lichtstrahl in die Messkammer eintreten und diese wieder verlassen kann (Abbildung 4.5). Damit sind auch mit dieser Messzelle Transmissionsmessungen möglich. Der Abstand zwischen den Scheiben beträgt in diesem Fall 5 mm. Für die Detektion von Streulicht in verschiedenen Winkeln sind jedoch Anpassungen der Flusszellegeometrie erforderlich. Die Öffnungen der Fenster wurden vergrößert und sind oval geformt. Dadurch lässt sich Streulicht mit einem minimalen Ablenkungswinkel von  $20^\circ$  detektieren. Weiterhin ist auch Rückstreulicht im Winkel von  $160^\circ$  zugänglich. Um Streulicht im Winkel von  $90^\circ$  detektieren zu können, wurde ein weiteres Fenster ergänzt. Dieses befindet sich senkrecht zu den anderen Fenstern, seitlich an der Messkammer. Zusammenfassend ermöglicht die Messzelle zusätzlich zur Transmission auch die Messung von Streulicht in drei verschiedenen Winkeln ( $20^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $160^\circ$ ).

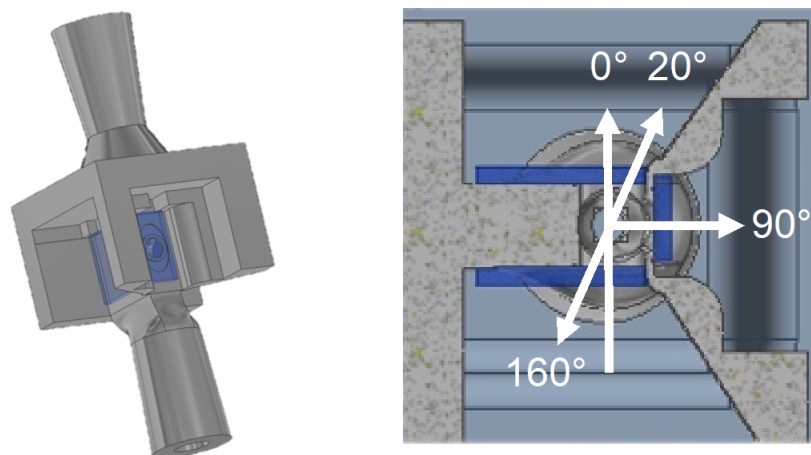
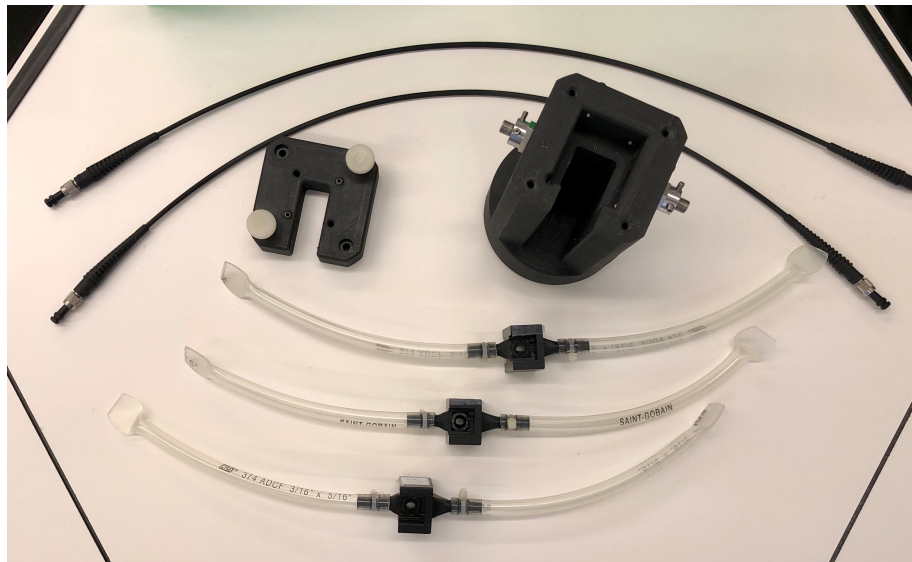


Abbildung 4.5.: Zeichnung (links) und Querschnitt (rechts) der Streulicht-Messzelle

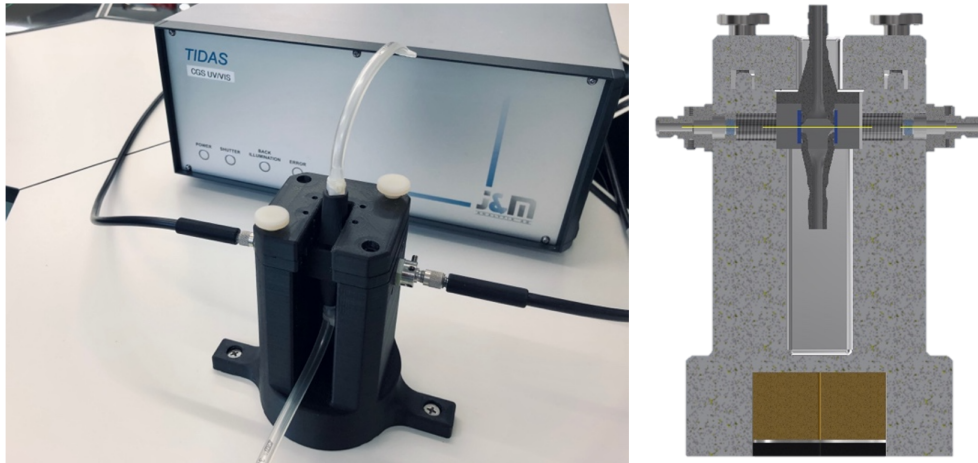
## 4.3. Messzellenhalter und Messequipment

### 4.3.1. Absorptionsmodul

Das Sensorsystem setzt sich immer aus einer Messzelle und einem Messzellenhalter zusammen. Für die Absorptionsmessungen können zusätzlich Lichtwellenleiter zum Anschluss eines Spektrometers verwendet werden. Diese zentralen Komponenten sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Alle vorgestellten Messzellen werden für eine Messung in den zugehörigen Messzellenhalter eingesetzt. Dieser stellt die Verbindung der Messzelle zur Lichtquelle und Detektoreinheit her. Als optische Schnittstelle dient eine faseroptische Kopplung mit F-SMA-Steckern (SMA 905). Diese Lösung bietet größtmögliche Flexibilität hinsichtlich des anzuschließenden Messequipments und ist Teil des modularen Sensorkonzepts. Es können somit eine Vielzahl an verschiedenen faseroptischen Spektrometern, Lichtquellen und Detektoreinheiten zur Messung verwendet werden. Außerdem können die empfindlichen, großen oder thermisch problematischen Komponenten (LEDs, Photodioden, Kühlelemente, Elektronik etc.) in einiger Entfernung zum Messort platziert werden, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen deutlich einfacher zu beherrschen sind. Eine Freistrahloptik führt das Licht im weiteren Verlauf von und zur Messzelle (Abbildung 4.7). Dabei erzeugen Kollimatoren einen parallelen Strahlengang.



**Abbildung 4.6.:** Komponenten des Absorptionsmoduls. Zu sehen sind drei Absorptionsmesszellen mit versiegelten Schlauchstücken, der Messzellenhalter sowie Lichtwellenleiter.

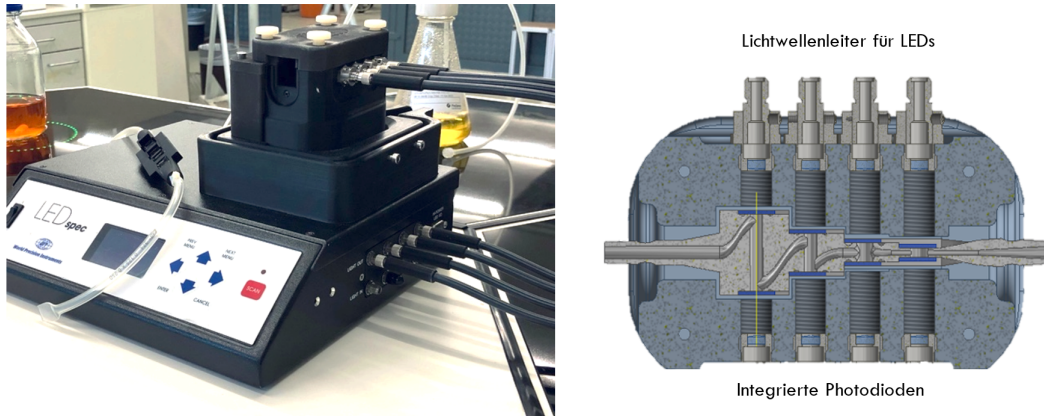


**Abbildung 4.7.: Messzellenhalter der Einzelpfadlängen-Messzelle.** Fertiger Aufbau des Absorptionsmoduls mit Spektrometer und Einzelpfadlängen-Messzelle (links). Querschnitt durch den Absorptions-Messzellenhalter bei eingesetzter Messzelle (rechts). In Gelb eingezeichnet wurde die optische Achse, welche den Strahlengang repräsentiert.

Der Messzellenhalter garantiert darüber hinaus eine exakte Positionierung und mechanische Fixierung der Messzelle und sorgt damit für eine reproduzierbare Einkopplung von Licht in die Messzelle. Ein mit Schrauben befestigter Deckel verhindert das Eindringen von Fremdlicht, sodass die Messung nicht beeinträchtigt wird.

Für Absorptionsmessungen stehen zwei Messaufbauten zur Verfügung. Messungen mit einzelnen Pfadlängen werden mit einem faseroptischen Spektrometer (TIDAS S520, J & M Analytics) mit integrierter Lichtquelle durchgeführt (Abbildung 4.7). Licht wird über einen Lichtleiter zur Messzelle geführt, durchquert anschließend die Probe und gelangt über einen zweiten Lichtleiter zum Detektor (Photodiodenarray). Das Gerät ist geeignet für Messungen im Bereich von 180-950 nm und deckt somit den relevanten UV/VIS bzw. NIR Bereich ab.

Der andere Messaufbau nutzt Leuchtdioden (LEDs) und Photodioden zur Messung der Absorption. Licht gelangt von der Kontrolleinheit über Lichtleiter zum Messzellenhalter und in die Messzelle. Die Photodioden sind direkt in den Messzellenhalter integriert. Dieser Aufbau wird zusammen mit der Multipfadlängen-Messzelle verwendet (Abbildung 4.8). Als Lichtquelle dient eine Multi-LED-Einheit mit monochromatischen LEDs für die Wellenlängen 260 nm, 280 nm, 340 nm und 450 nm. Im Gegensatz zum anderen Aufbau wird demnach kein Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Es werden lediglich die Absorptionswerte bei den genannten Wellenlängen ermittelt.



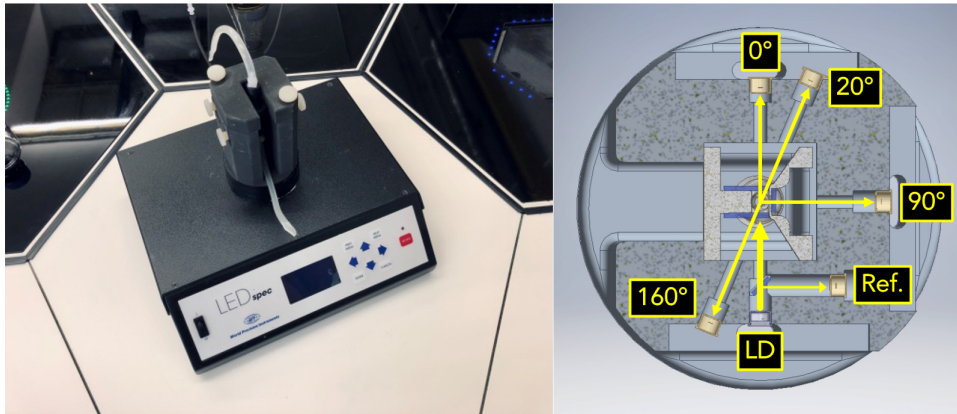
**Abbildung 4.8.: Messzellenhalter der Multipfadlängen-Messzelle.** Multipfadlängen-Messzelle mit zugehöriger Messtechnik (links). Jede der vier ausgewählten Wellenlängen wird durch einen einzelnen Lichtwellenleiter geführt. Querschnitt des Messzellenhalters mit eingesetzter Multipfadlängen-Messzelle (rechts).

### 4.3.2. Streulichtmodul

Für Streulichtmessungen im NIR-Bereich steht ein eigener Messzellenhalter zur Verfügung (Abbildung 4.9). Dieser nutzt eine Laserdiode mit 850 nm als Lichtquelle. Ein Teil des Lichts gelangt über einen Strahlteiler zu einer Referenzdiode. Damit kann eine konstante Lichtintensität eingestellt werden. Die Detektion des Streulichts erfolgt mithilfe von Photodioden. Sowohl die Lichtquelle als auch die Photodioden sind in diesem Fall in den Messzellenhalter integriert und arbeiten über eine Freistrahloptik ohne den Einsatz von Lichtwellenleitern. Für jeden Detektionswinkel wird eine einzelne Photodiode benutzt, sodass insgesamt vier Photodioden in den Halter integriert wurden. Ein externes Modul übernimmt die Steuerung der Messung und übermittelt die Daten an einen Computer.

### 4.3.3. Anbindung an verschiedene Prozesssysteme

Die Messzellen werden im Bypass eingesetzt und sind dafür beidseitig mit versiegelten Schlauchstücken ausgestattet. Diese werden bereits im Herstellungsprozess installiert und zusammen mit der Messzelle sterilisiert. Je nach Anforderungsprofil der jeweiligen Anwendung können verschiedene Schläuche mit verschiedenen Abmessungen verwendet werden. Schläuche mit Innendurchmessern von 4,8 mm können direkt auf die Messzelle geschoben werden und mit Kabelbindern gesichert werden. Dazu wird



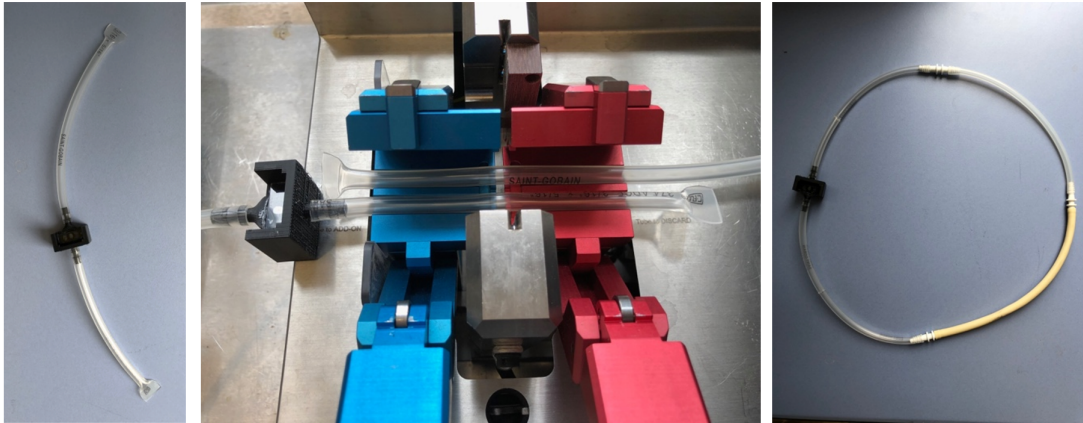
**Abbildung 4.9.:** Messzellenhalter der Streulicht-Messzelle. Messequipment des Streulichtmoduls inklusive Messzellenhalter und eingesetzter Streulicht-Messzelle (links). Querschnitt durch den Streulicht-Messzellenhalter (rechts). Zu sehen ist die integrierte Messtechnik mit Laserdiode (LD), der Referenzdiode (Ref.) und den vier Photodioden zur Detektion von Transmission und Streulicht in vier Winkeln.



**Abbildung 4.10.:** Installation von verschiedenen Schläuchen an die Messzelle. Messzelle mit integrierter Schlaucholive zum direkten Anschluss von Schläuchen (links). Verschiedene Adapter zum Anschluss von Schläuchen mit kleineren Abmessungen (rechts).

eine passende Schlauchtülle zusammen mit der Messzelle im 3D-Druck-Verfahren gefertigt (Abbildung 4.10 links). Für andere Schlauchdurchmesser steht eine breite Auswahl von kommerziell erhältlichen Adaptern zur Verfügung (Abbildung 4.10 rechts). Die Adapter werden über ein genormtes Gewinde (Kennung: 1/4" – 28 UNF) mit der Messzelle verbunden. Das Gewinde wird im Zuge der Nachbearbeitung durch einen Gewindeschneider in die Messzelle eingearbeitet.

Die Anbindung der vorsterilisierten Messzelle zum Bioreaktor wird mithilfe von aseptischen Schweißverbindungen hergestellt (Abbildung 4.11). Die während des Herstellungsprozesses installierten Schläuche werden unter sterilen Bedingungen mit dem bestehenden Bypasssystem verbunden. Dazu wird der BioWelder<sup>®</sup> TC (Sartorius SteDIM Biotech) genutzt. Dieses Vorgehen erfordert keinen Einsatz von Sterilbänken und kann somit flexibel direkt am Prozess durchgeführt werden.



**Abbildung 4.11.:** Exemplarische Integration der Messzelle in ein Bypasssystem durch steriles Verschweißen von thermoplastischen Schläuchen. Vorsterilisierte Messzelle mit versiegelten Schlauchstücken (links). Messzelle und Bypass werden in den BioWelder<sup>®</sup> TC eingesetzt (Mitte). Fertiger Bypass mit integrierter Messzelle (rechts).

#### 4.3.4. Zusammenfassung

Es wurden zwei verschiedene Messzellenkonzepte zur Messung der Absorption beschrieben. Beide nutzen gegenüberliegende Fenster zur optischen Messung und werden mit Probenflüssigkeit durchströmt. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der gleichzeitig zur Verfügung stehenden Pfadlängen. Während die Einzelpfadlängen-Messzelle eine Pfadlänge zur Messung der Absorption besitzt und in verschiedenen Größen gefertigt werden kann, kombiniert die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle mehrere Pfadlängen miteinander. Für beide Messzellenkonzepte zur Messung von Absorption wurden zugehörige Messzellenhalter konstruiert, welche zur Fixierung der Messzellen und der Einkopplung von Licht in die Messzelle dienen. Der Messzellenhalter der Einzelpfadlängen-Messzelle wurde mit F-SMA-Steckern ausgestattet und ermöglicht somit den flexiblen Anschluss von unterschiedlicher Messtechnik. Für die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle wurde eine Messtechnik entwickelt, die auf monochromatischen

LEDs und Photodioden basiert und zum Teil in den Messzellenhalter integriert wurde. Darüber hinaus wurde eine Messzelle zur Messung von Streulicht in verschiedenen Winkeln konstruiert. Die Anordnung der Fenster ermöglicht dabei eine Detektion in Transmissionsrichtung und zusätzlich in den Winkeln von 20°, 90° und 160°. Eine Laserdiode dient hier als Lichtquelle und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 850 nm. Zur Detektion des Streulichts werden Photodioden eingesetzt, welche in den Messzellenhalter integriert wurden.

Zum Anschluss von Schläuchen an eine Messzelle kann eine Schlauchtülle direkt im Herstellungsprozess an die Messzelle angebracht werden. Zudem stehen verschiedene Adapter zur Verfügung, die den Anschluss anderer Schlauchdurchmesser ermöglichen. Die angebrachten Schläuche werden zusammen mit der Messzelle sterilisiert und können mittels aseptischer Schweißverbindungen in ein bestehendes Bypasssystem integriert werden.

## 5. Entwicklung erster Prototypen

Die Anwendung des Sensorsystems zur Bioprozessüberwachung stellt einige Anforderungen an die Bauteile, welche mit dem Prozessmedium in Kontakt stehen. Zum einen muss die Sterilität über den Prozesszeitraum gewährleistet sein. Darüber hinaus soll das Wachstum der Zellen nicht durch eventuell enthaltene Extractables und Leachables beeinträchtigt werden. Damit werden Substanzen zusammengefasst, die sich unter bestimmten Bedingungen aus einem Material herauslösen können. Auch ein scherstressarmer Flüssigkeitstransport durch die Messzelle ist erforderlich. Diese Anforderungen wurden bereits während der Entwicklung der ersten Prototypen berücksichtigt. Daher wurden verschiedene Sterilisationsmethoden evaluiert und in einem weiteren Schritt die Biokompatibilität der sterilisierten Materialien überprüft. Anhand der ermittelten Ergebnisse soll anschließend ein geeignetes Material zur Herstellung der Messzelle ausgewählt werden. Auch das Fenstermaterial muss für die Messung geeignet sein. Neben der Biokompatibilität sind hier vor allem die optischen Eigenschaften von Bedeutung. Die folgenden Abschnitte beschreiben den Entwicklungsprozess der ersten funktionellen Messzellen hinsichtlich Materialauswahl und Fluidodynamik innerhalb der Messkammer.

### 5.1. Sterilität und Biokompatibilität

Da die Messzelle während der Bioprozessüberwachung in direktem Kontakt zum Kulturmedium und den Zellen steht, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, um den Prozess nicht negativ zu beeinflussen. Ein kritischer Faktor ist die Sterilität der Messzelle. Die Auswahl einer geeigneten Sterilisationsmethode hängt von der Bauform und dem gewählten Material ab. Die Messzelle soll per 3D-Druck durch Fused Filament Fabrication (FFF) hergestellt werden. Die dazu verwendeten Kunststoffe werden als Thermoplaste bezeichnet und sind schmelzfähig. Verfahren wie die Heißdampfsterilisation, die hohe Temperaturen zur Sterilisation nutzen, sind daher ungeeignet. Eine Sterilisierung der innenliegenden Messkammer durch Bestrahlung mit UV-Licht ist aufgrund der Lichtundurchlässigkeit der verwendeten Kunststoffe nicht praktikabel. Daher wurden für dieses Projekt nasschemische Verfahren und die Bestrahlung mit Gammastrahlung auf ihre Eignung zur Sterilisation der Messzelle überprüft. Dabei zeigte sich, dass lediglich die Sterilisation mit Hypochlorit (5 %, pH 6,5)

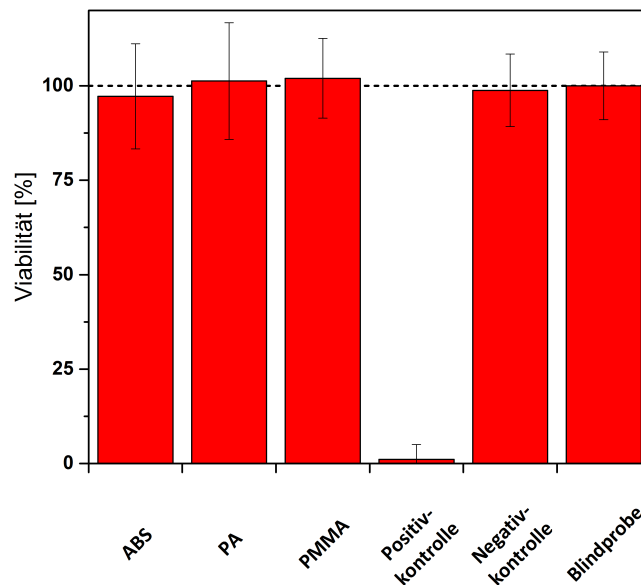


und die Bestrahlung mit Gammastrahlung (>25 kGy) zu durchweg sterilen Testobjekten führten (Tabelle A.1 Anhang). Da die chemische Sterilisation für vorgefertigte Produkte weniger Akzeptanz findet, werden die im weiteren Verlauf verwendeten Messzellen mithilfe von Gammastrahlung sterilisiert.

Nach Festlegung einer geeigneten Sterilisationsmethode, wird die Biokompatibilität verschiedener 3D-Druck Materialien untersucht. Dazu wird ein Verfahren zur Beurteilung der *in vitro* Zytotoxizität von Medizinprodukten (gemäß ISO 10993-5:2009) herangezogen. Mithilfe von 3D-gedruckten Testobjekten mit einem definierten Oberfläche / Volumen-Verhältnis wird der Einfluss dieser Materialien auf das Wachstum von Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) untersucht. Dazu werden Extraktionsmedien, durch Inkubation der Testmaterialien im Zellkulturmedium, hergestellt. Dieses Verfahren untersucht die Materialien demnach auf das Vorkommen von Extractables und Leachables. Zu den getesteten Materialien zählen Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS), Polyamid (PA) sowie Polymethylmethacrylat (PMMA). Darüber hinaus sind zertifizierte Referenzmaterialien Teil der Testmethode. Im Fall der Positivkontrolle wird ein Polyurethanfilm mit 0,25 % Zinkdibutylidithiocarbamat (ZDBC) verwendet. Damit soll eine korrekte Reaktion des Prüfsystems bei Vorliegen eines zytotoxischen Materials überprüft werden. Als Negativkontrolle dient high-density-Polyethylen (HDPE), welches als biokompatibel klassifiziert ist. Die Beurteilung erfolgt nach Durchführung eines Zellviabilitäts-Tests (CellTiter Blue<sup>®</sup> Assay), welcher die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen bestimmt. Der Test beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen einen Farbstoff (Resazurin) zu einem fluoreszierenden Endprodukt umzuwandeln. Durch Messung der Fluoreszenzintensität lässt sich auf die Viabilität der Zellen rückschließen.

Die Ergebnisse des Zellviabilitäts-Tests sind in Abbildung 5.1 zusammengefasst. Alle drei Testmaterialien weisen keinen signifikanten Unterschied in der Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Blindprobe (Medium ohne Prüfkörper) auf. Zellen, die mit ABS-haltigen Extraktionsmedien kultiviert wurden, zeigen eine Zellviabilität von knapp 100 %. Extraktionsmedien, die mit PA oder PMMA inkubiert wurden, führen zu einer geringfügig höheren Stoffwechselaktivität der MSCs. Die Gesamtvarianz der Daten lässt jedoch keine Aussage zu diesen geringfügigen Unterschieden zu. Sie können durch unterschiedliche Zellzahlen der verschiedenen Ansätze bedingt sein.

Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen den Testmaterialien und der Negativkontrolle beobachtet werden. Dies unterstützt die Annahme, dass alle drei getesteten Materialien als *in vitro* biokompatibel eingestuft werden



**Abbildung 5.1.:** Ergebnisse des CellTiter-Blue®-Zellviabilitätstests zur Analyse der Stoffwechsellkapazität (dargestellt als Viabilität in % zum Blindwert) von MSCs (AD37A). Es wurden drei verschiedene Extraktionsmedien mit unterschiedlichen 3D-druckbaren Materialien (ABS, PA, PMMA) getestet. Zusätzlich wurden Extraktionsmedien mit zertifizierten Referenzmaterialien (Positiv- und Negativkontrolle) untersucht. Die Daten basieren auf zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils neun Replikaten für jedes Material.

können. Im Gegensatz dazu zeigt die Positivkontrolle eine signifikante Abnahme der Viabilität. Die Daten deuten darauf hin, dass unter dem Einfluss des zytotoxischen Referenzmaterials keine signifikante Stoffwechselaktivität messbar ist. Dies zeigt die Eignung des Testsystems, ordnungsgemäß auf das Vorhandensein zytotoxischer Materialien zu reagieren. Mikroskopieaufnahmen zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Extraktionsmedien, finden sich im Anhang (Abbildung A.1).

Unter Berücksichtigung weiterer technisch-mechanischer Materialeigenschaften, wurde ABS als Material für die Fertigung der Messzelle ausgewählt. So bietet das Material gute Voraussetzungen für eine mechanische Nachbearbeitung (z. B. Gewindeschneiden) und ist damit auch für die Herstellung des Messzellenhalters geeignet. Zudem ist ABS einfach sterilisierbar, biokompatibel und im Bereich additiver Fertigungsverfahren weit verbreitet. Die schwarze Färbung schirmt Fremdlicht zuverlässig von der Messkammer ab und sorgt damit für eine störungsfreie Messung. Auch das Material für die eingesetzten Fenster zählt zu den kritischen Bauteilen. Der folgende Abschnitt

beschreibt daher die Anforderungen des Fenstermaterials, anhand welcher die Entscheidung für das Fenstermaterial getroffen wurde.

## 5.2. Evaluierung des Fenstermaterials

Optische Messungen sind stark von den Eigenschaften der verwendeten optischen Materialien abhängig. Insbesondere für Messungen im UV-Bereich ist die Wahl geeigneter Materialien entscheidend, da viele Materialien eine hohe Absorption in diesem Spektralbereich zeigen. Weiterhin konnte in einer Voruntersuchung festgestellt werden, dass das zu verwendende Zellkulturmedium bereits eine hohe Eigenabsorption im UV-Bereich aufweist (Abbildung A.2 Anhang). Niedrige Pfadlängen können diesem Effekt entgegenwirken und die Transmission im UV-Bereich verbessern. Es ist daher essenziell, dass das Sensorsystem auf eine hohe Transmission in diesem Bereich hin optimiert wird. Für den Messzellenhalter sind hier die Kollimatoren relevant, die auf eine hohe UV-Durchlässigkeit hin ausgewählt wurden.

Ebenso sollen die Fenster der Einweg-Messzelle dahingehend evaluiert werden. Hinsichtlich niedriger Herstellungskosten wurden zunächst Kunststofffenster aus einem Cycloolefin-Copolymer (COC) ausgewählt, welches auch in Einweg-UV-Küvetten Verwendung findet und eine ausreichende UV-Durchlässigkeit besitzt. Die optischen Eigenschaften des COC-Fensters verändern sich jedoch nach der Bestrahlung mit Gammastrahlung. Dies resultiert in einer stark verminderten Transmission im UV-Bereich (Abbildung 5.2). Die verminderte Transmission kann ab einer Wellenlänge von 450 nm beobachtet werden. Unterhalb von 270 nm findet nach Gamma-Bestrahlung keine messbare Transmission mehr statt. Aufgrund der notwendigen Sterilisierung der Messzelle durch Gammastrahlung, ist COC kein geeignetes Fenstermaterial. Im weiteren Verlauf werden daher Messzellen mit Fenstern aus Quarzglas eingesetzt. Dieses besitzt optimale Transmissionseigenschaften und ist inert gegenüber Bestrahlung mit Gammastrahlung. Die Verwendung von Quarzglas ermöglicht eine durchgehende Transmission von etwa 90 %. Als Referenz dient hier ein Messzellenhalter ohne eingesetzte Messzelle. Damit konnte die Transmission insbesondere im Bereich des UV-Spektrums deutlich verbessert werden. Im VIS-Bereich ist die Differenz zur Transmission der COC-Fenster nur leicht erhöht.

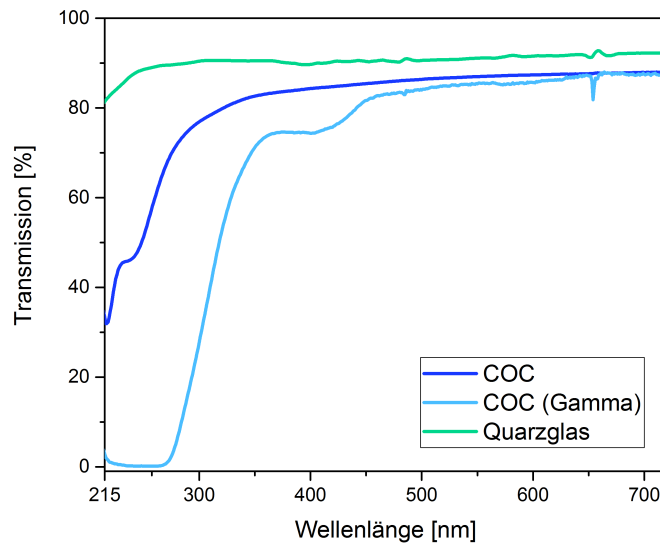


Abbildung 5.2.: Transmissionsspektren verschiedener Fenstermaterialien.

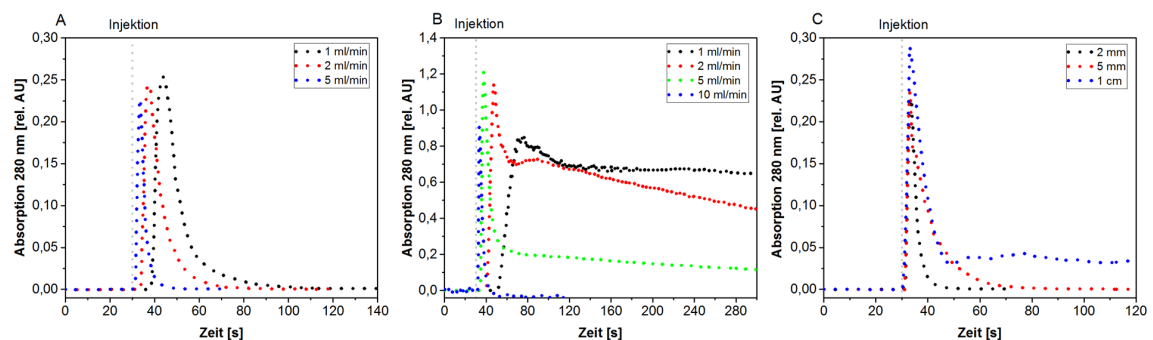
### 5.3. Untersuchung des Verweilzeitverhaltens

Nachdem die geeigneten Materialien zur Fertigung der Messkammer evaluiert wurden, konnte nun ein erstes Funktionsmuster hergestellt werden. Dieses soll nun hinsichtlich notwendiger Optimierungen untersucht werden. Die Fluiddynamik innerhalb der Messzelle ist ein kritischer Faktor für einen präzisen Messvorgang. Daher soll in diesem Abschnitt das Verweilzeitverhalten innerhalb der Messkammer untersucht werden. Aus der Analyse des Verweilzeitverhaltens können später wichtige Parameter für den Betrieb der Messzelle, wie zum Beispiel die optimale Flussrate, abgeleitet werden. Für eine valide Messung muss der Volumenabschnitt innerhalb der Messkammer zu jedem Zeitpunkt repräsentativ für den Reaktorinhalt sein. Daher ist es notwendig, dass die eintretenden Volumenabschnitte die Messkammer in einem bestimmten Zeitabschnitt wieder verlassen. Die Zeitdauer ist abhängig von der Fluiddynamik, wobei in diesem Fall der Volumenstrom  $v$  eine wichtige Variable darstellt. Andere Faktoren, wie der charakteristische Länge  $d$  sowie die kinematische Viskosität  $\nu$  des Fluids werden in diesem Versuch konstant gehalten. Mit den genannten Parametern lässt sich die Reynolds-Zahl berechnen (Formel 5.1).

$$Re = \frac{vd}{\nu} \quad (5.1)$$

Dies ist eine Kennzahl, welche das Verhältnis zwischen Trägheits- und Zähigkeitskräften beschreibt. Demnach ist der Wert ein Anhaltspunkt für den vorliegenden Strömungstyp. Zu unterscheiden sind hier laminare und turbulente Strömungen. Für kleine Reynolds-Zahlen kann von laminarer Strömung ausgegangen werden. Ab einer kritischen Größe der Reynolds-Zahl wird die bis dahin laminare Strömung anfällig gegenüber kleinsten Störungen. Es ist dann mit einem Umschlag in eine turbulente Strömung zu rechnen. Diese beiden Grenzfälle treten nur selten in realen Anwendungen auf. In diesem Fall sind beispielsweise die Messkammergeometrie, die Oberflächenbeschaffenheit des 3D-Druck Materials, sowie die Pulsation der Pumpe unbekannte Einflussgrößen. Eine Berechnung der Reynoldszahl ist daher oftmals nur für einfache Geometrien (Rohre, Schläuche) sinnvoll und wird hier nicht weiter verfolgt.

Um die Messzelle hinsichtlich ihrer Fluidodynamik zu charakterisieren, wurden Verweilzeitspektren aufgenommen. Der dazu verwendete Aufbau kann in Abbildung 12.1 (Methoden) eingesehen werden. Es wurden  $20 \mu\text{l}$  einer konzentrierten BSA-Lösung ( $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) als Tracer in den Probenstrom injiziert und die Absorption bei  $280 \text{ nm}$  über die Zeit aufgenommen. Damit lässt sich die Zeitdauer feststellen, bis der Tracer aus dem System ausgewaschen wurde. Die in Abbildung 5.3 dargestellten Verweilzeitspektren zeigen eine deutliche Abhängigkeit zur Pfadlänge der verwendeten Messzelle und zum eingestellten Volumenstrom. Die Abhängigkeit der Pfadlänge lässt sich über die unterschiedlichen Messkammervolumina erklären. Messzellen mit größeren Pfadlängen besitzen größere Volumina. Daher halten sich Moleküle des Tracers länger innerhalb der Messkammer auf. Darüber hinaus kann das Auftreten von Totzonen den Austrag des Tracers stark verzögern. Innerhalb von Totzonen findet lediglich



**Abbildung 5.3.:** Verweilzeitspektren von Messzellen mit verschiedenen Pfadlängen bei unterschiedlichen Flussraten.  $2 \text{ mm}$  Pfadlänge (A).  $20 \text{ mm}$  Pfadlänge (B). Vergleich verschiedener Pfadlängen bei gleicher Flussrate  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (C)

eine geringe Durchmischung statt. Ein dort eingetragenes Tracermolekül kann folglich für längere Zeit innerhalb der Messkammer verweilen, bis es herausgewaschen wird. Dieser Effekt tritt umso stärker auf, je niedriger die eingestellte Flussrate ist. Die Verweilzeitspektren der Messzelle mit 20 mm Pfadlänge zeigen diese Abhängigkeit deutlich (Abbildung 5.3 B). So sinkt die Absorption im beobachteten Zeitraum lediglich bei einer Flussrate von  $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  wieder auf das Ausgangsniveau ab. Geringere Flussraten führen zu einer deutlich langsameren Auswaschung des Tracers. Für eine Pfadlänge von 2 mm reichen hingegen schon geringe Flussraten aus, um den Tracer im Beobachtungszeitraum auszuwaschen (Abbildung 5.3 A). Dennoch zeigt sich auch hier eine Abhängigkeit zur eingestellten Flussrate. Abbildung 5.3 C zeigt die Verweilzeitspektren verschiedener Messzellen bei einer Flussrate von  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Hier wird deutlich, dass besonders für Pfadlängen ab 10 mm eine untere Grenze für die verwendete Flussrate festgelegt werden muss, um einen kompletten Austrag des Tracers aus der Messzelle zu gewährleisten. Im Messbetrieb könnten ansonsten Verzerrungen des Messsignals auftreten. Insbesondere während der Überwachung von Downstream-Prozessen, würde dies zu ausgeprägtem Tailing der Messsignale führen. Eine weitere Optimierung der Messkammergeometrie ist möglich. Da jedoch bereits anhand von Voruntersuchungen (hohe Eigenabsorption des Kulturmediums) festgestellt wurde, dass kleine Pfadlängen für die geplanten Anwendungen von Vorteil sein könnten, wird eine Optimierung großer Pfadlängen zu diesem Zeitpunkt nicht weiterverfolgt.

## 5.4. Zusammenfassung

Im Zuge der beschriebenen Untersuchungen wurde ABS als geeignetes Material zur Herstellung der Messzelle ausgewählt. Basierend auf einer zertifizierten Testmethode konnte zuvor die Biokompatibilität des Materials bestätigt werden. Ebenso wurde mit der Gamma-Bestrahlung eine zuverlässige und praktikable Sterilisationsmethode gewählt. Neben dem Material der Messzelle wurden auch verschiedene Fenstermaterialien auf ihre optischen Eigenschaften hin überprüft. Dabei konnte lediglich Quarzglas die gewünschten Transmissionseigenschaften erfüllen. Es zeigt sich darüber hinaus auch als inert gegenüber der Gammastrahlung und ist somit für eine Verwendung als Fenster der Messzelle geeignet. Letztlich wurde auch die Fluidodynamik innerhalb der Messkammer untersucht. Es zeigten sich, abhängig von der gewählten Messkammergeometrie (Pfadlänge) unterschiedliche Verweilzeitspektren. Um die gewünschte Fluidodynamik zu erzielen, gilt insbesondere für Pfadlängen ab 10 mm eine untere Grenze des einzustellenden Volumenstroms von  $>5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## 6. Validierung der Messmethode

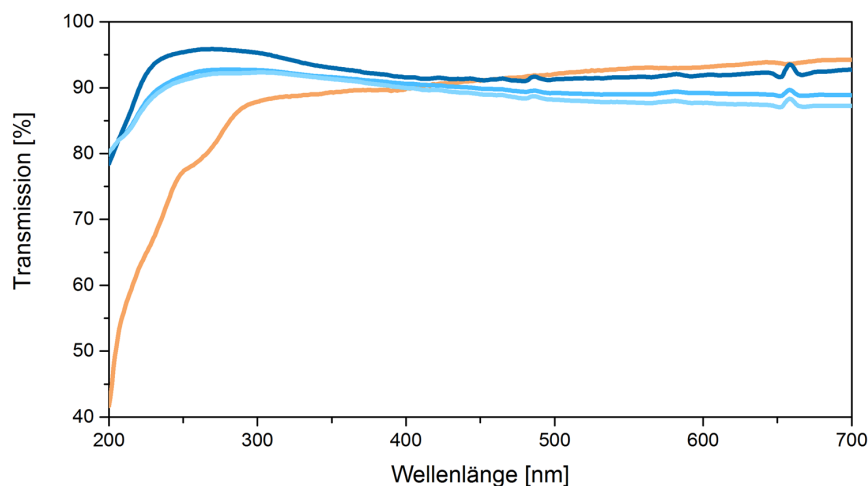
In den zuvor beschriebenen Abschnitten wurden die Materialien, die Sterilisationsmethode und die Messkammergeometrie der Messzelle festgelegt. Die daraufhin angefertigten Prototypen ermöglichen die Durchführung erster Messungen zur Charakterisierung der Messzelle. Die Messungen werden mit zellfreien Proben durchgeführt und dienen dazu die Messmethode zu validieren. Dabei soll neben der Linearität des Messsignals auch die Selektivität der Messung evaluiert werden. Weiterhin ist auch die Genauigkeit des Herstellungsprozesses von Bedeutung, da diese direkten Einfluss auf die Messgenauigkeit hat.

### 6.1. Genauigkeit des Herstellungsprozesses

Die korrekte Funktionsweise des Sensorsystems hängt entscheidend von der Präzision und Reproduzierbarkeit der Fertigung der Messzelle ab. Das dazu verwendete 3D-Druckverfahren bietet enorme Vorteile hinsichtlich der Flexibilität verschiedene Konstruktionen im Prototypenstadium herstellen zu können. Da die Messzelle jedoch Teil einer optischen Messeinrichtung ist, muss sie auch hohe Ansprüche in Bezug auf die Fertigungstoleranzen erfüllen. Auch für Single-Use Bauteile muss erwartbar sein, dass die Exemplare untereinander vergleichbaren Spezifikationen entsprechen. Es muss daher überprüft werden, ob die Messzellen reproduzierbar und in den gewünschten Spezifikationen gefertigt werden können. Kritische Abschnitte im Herstellungsprozess, welche die Qualität der Messung beeinflussen können, sind der 3D-Druckprozess sowie das manuelle Einsetzen und Verkleben des Quarzglasfensters. Der Herstellungsprozess jeder Messzelle wird mithilfe von zwei Qualitätsmerkmalen überprüft: Intensität der Transmission und Genauigkeit der Pfadlänge. An erster Stelle muss gewährleistet sein, dass Licht die Messzelle passieren kann. Eine einfache Methode zur Prüfung dieses Merkmals ist die Aufnahme eines Transmissionsspektrums. Fehler im Druckvorgang oder verunreinigte Fenster können so schnell erkannt werden. Jede Messzelle sollte einen hohen Lichtdurchsatz für den UV/VIS-Spektralbereich aufweisen. Hinsichtlich der hohen Eigenabsorption des Kulturmediums ist dies insbesondere für den UV-Bereich notwendig. Abbildung 6.1 zeigt die Transmissionsspektren verschiedener Messzellen. Drei der Messzellen besitzen eine über den gesamten beobachteten Spektralbereich hohe Transmission von über 80 %. Die Spektren variieren

dabei nur geringfügig, sodass von einer guten Reproduzierbarkeit gesprochen werden kann. Kleine Variationen der Transmission werden durch das Heranziehen von Referenzspektren bei der Berechnung der Absorption herausgerechnet und stellen daher kein Problem dar. Darüber hinaus zeigt Abbildung 6.1 auch ein Transmissionsspektrum, welches insbesondere im UV-Bereich deutlich niedrigere Transmissionswerte aufweist. Dies lässt sich auf Rückstände des Klebers auf einem der eingesetzten Fenster zurückführen. Der Kleber zeigt eine hohe UV-Absorption und beeinflusst somit die UV-Transmission der Messzelle. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Qualitätskontrolle jeder Messzelle vor Verwendung, um Produktionsfehler aufzudecken.

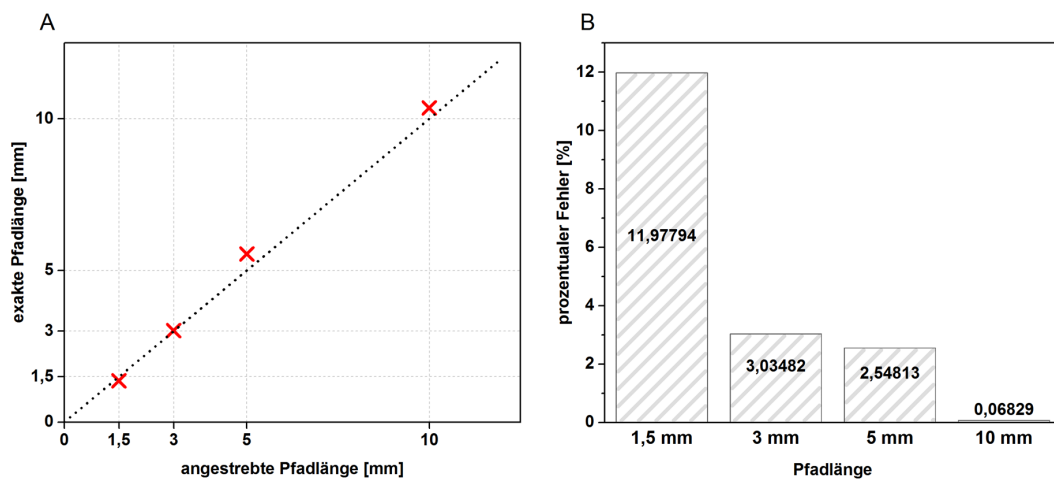
Neben der Gewährleistung einer hohen Transmission, ist auch die Pfadlänge der Messzelle ein kritischer Parameter. Die Pfadlänge hat direkten Einfluss auf die gemessenen Absorptionswerte. Weiterhin ist eine exakte Pfadlänge zur präzisen Quantifizierung eines Analyts nötig. In diesem Zusammenhang wird von Präzision und Richtigkeit gesprochen. Währenddessen die Präzision eine Aussage darüber erlaubt, wie reproduzierbar der Herstellungsprozess verläuft (Streuung), gibt die Richtigkeit Auskunft über die Differenz zwischen gewünschter und tatsächlich gemessener Pfadlänge (systematischer Fehler). Die Pfadlänge kann durch Ungenauigkeiten im 3D-Druckverfahren oder durch falsches Einsetzen der Fenster beeinflusst werden. Daher wurde die exakte Pfadlänge verschiedener Messzellen mithilfe von Referenzmessungen bestimmt



**Abbildung 6.1.:** Transmissionsspektren einer Charge von Messzellen (10 mm Pfadlänge mit Quarzglasfenstern). Eine Messzelle (oranges Spektrum) weist aufgrund von Kleberückständen auf dem Fenster ein abweichendes Transmissionsspektrum auf und wurde aussortiert.



(Abschnitt 12.4.1). Abbildung 6.2 A zeigt jeweils die Mittelwerte der gemessenen Pfadlängen von einem Satz Messzellen gleicher Pfadlänge. Die Messwerte wurden gegen die angestrebte Pfadlänge aufgetragen. Für Koordinatenpunkte, die auf der eingezeichneten Winkelhalbierenden liegen, stimmen die gemessene und die angestrebte Pfadlänge überein (hohe Richtigkeit). Für die untersuchten Messzellen konnte im Durchschnitt eine gute Übereinstimmung mit der angestrebten Pfadlänge gezeigt werden. Die absolute Abweichung des Mittelwerts ist für größere Pfadlängen höher (systematischer Fehler). Diese Abweichung lässt sich jedoch durch einen Korrekturfaktor ausgleichen. Wichtiger ist die Präzision des Herstellungsprozesses. Nur so kann sichergestellt werden, dass Messzellen gleicher Spezifikation zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Allerdings zeigt die relative Standardabweichung innerhalb einer Gruppe, dass die Präzision des Herstellungsprozesses für kleinere Pfadlängen abnimmt (Abbildung 6.2 B). Insbesondere die Herstellung der 1,5 mm Pfadlänge weist eine im Vergleich zur Pfadlänge hohe Streuung auf. Dies ist bedingt durch die begrenzte Auflösung des 3D-Druckers. Ebenso wirken sich bei dieser Pfadlänge Ungenauigkeiten beim Einsetzen der Fenster prozentual stärker aus. Es ist daher empfehlenswert, die Pfadlängen kleinerer Messzellen genau zu bestimmen, falls es die Anwendung erfordert. Für größere Pfadlängen konnte eine gute Präzision festgestellt werden.

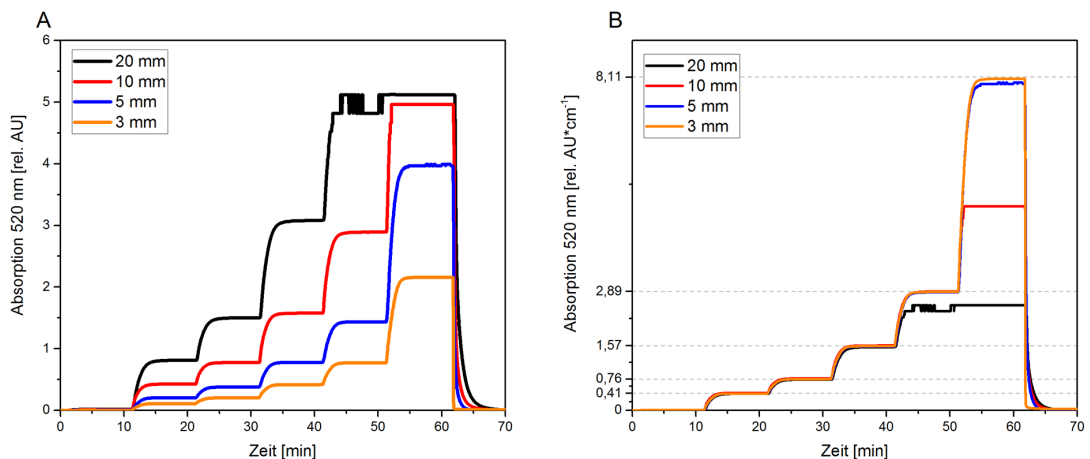


**Abbildung 6.2.: Bestimmung der exakten Pfadlänge.** Mittlere exakte Pfadlängen verschiedener Messzellen (A). Die Winkelhalbierende gibt die angestrebte Pfadlänge an. Abweichungen von dieser Linie sind herstellungsbedingt. Relative Standardabweichung der Gruppen in % zur jeweils angestrebten Pfadlänge (B)

## 6.2. Bestimmung des linearen Messbereichs

Nachdem eine präzise und reproduzierbare Fertigung nachgewiesen wurde, wird der lineare Messbereich des Sensorsystems untersucht. Eine lineare Signalantwort ist insbesondere für quantitative Analysen relevant. Dazu wurden unterschiedlich konzentrierte Amaranth-Lösungen mit der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle und einer Referenzküvette analysiert. In beiden Fällen wurde die Absorption bei 520 nm gemessen. Die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle nutzt dazu die LED-Messtechnik mit Photodioden zur Detektion der vier Messkanäle. Jeder Messkanal repräsentiert dabei eine Pfadlänge.

Die verschiedenen Lösungen werden nacheinander mithilfe eines Selektionsventils und einer Peristaltikpumpe durch die Messzelle gepumpt. Die Absorption eines Messkanals wurde jeweils gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 6.3 A). Für jede der dargestellten Pfadlängen lässt sich ein stufenweises Ansteigen der Absorptionswerte beobachten. Die kurzen und gleichmäßigen Übergangsphasen weisen auf eine gute Fluidodynamik innerhalb der Messkammern hin. Hinweise auf eine Rückvermischung oder Totzonen lassen sich nicht erkennen. Erwartungsgemäß ist die Absorption bei größeren Pfadlängen höher. Demnach resultieren für jede der eingesetzten Lösungen je nach Pfadlänge unterschiedliche Absorptionswerte.



**Abbildung 6.3.: Absorptionsmessungen mit unterschiedlich konzentrierten Amaranth-Lösung.** Die Messungen wurden mit der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle durchgeführt. Vier verschiedene Pfadlängen wurden gleichzeitig mit der LED-Messtechnik inklusive integrierter Photodioden durchgeführt. Gemessene Absorptionswerte der verschiedenen Pfadlängen (A). Normierte Absorptionswerte (B)

Diese Werte lassen sich jedoch durch eine Normierung angleichen. Die gemessenen Absorptionswerte werden auf eine Pfadlänge von 10 mm normiert, sodass die Werte aller Kanäle direkt miteinander vergleichbar sind. Da im zuvor beschriebenen Abschnitt bereits eine fertigungsbedingte Abweichung der tatsächlichen Pfadlängen zu den angestrebten Pfadlängen beobachtet wurde, sind zudem die exakten Pfadlängen der verwendeten Messzelle bestimmt worden. Diese konnten als Korrekturfaktor in die Messung miteinbezogen werden und sorgen somit für ein präziseres Messergebnis. Die normierten und korrigierten Absorptionswerte sind in (Abbildung 6.3 B) dargestellt. Horizontale Hilfslinien geben die durch Referenzmessungen ermittelte Absorption an. Bis zu einer Absorption von  $1,57 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$  sind die normierten Absorptionswerte der verschiedenen Pfadlängen nahezu identisch. Die Korrektur der Messwerte mithilfe der exakt bestimmten Pfadlängen war demnach erfolgreich. Bei der Messung der nächsten Konzentrationsstufen zeigen sich Sättigungseffekte bei den Kanälen mit 10 mm und 20 mm Pfadlänge (erkennbar an geringeren Absorptionswerten). Dies resultiert aus dem maximalen Dynamikumfang der Messkanäle, der jeweils bei 3 AU liegt. Die kurzen Pfadlängen hingegen sind auch bei den hochkonzentrierten Lösungen in der Lage die Absorption korrekt zu detektieren. Für niedrige Konzentrationen zeigt sich jedoch eine deutlich höhere Sensitivität der großen Pfadlängen (Abbildung 6.3 A). Die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle ist damit für Anwendungen, die einen hohen Dynamikumfang erfordern sehr gut geeignet.

Die Linearität des Messverfahrens lässt sich überprüfen, indem die tatsächliche Absorption gegen die mit der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle ermittelte, normierte Absorption aufgetragen wird (Abbildung 6.4). Mithilfe einer Regressionsanalyse wird die Linearität der einzelnen Messkanäle in einem bestimmten Absorptionsbereich untersucht. Dazu werden die Bestimmtheitsmaße ( $R^2$ ) herangezogen (Tabelle 6.1). Diese zeigen für den Bereich von  $0-3 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$  für die drei niedrigsten Pfadlängen eine gute Linearität. Die Ergebnisse der 20 mm Pfadlänge weichen aufgrund von Sättigungseffekten bereits im Bereich von  $3 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$  deutlich von den anderen Messungen ab. Entsprechen bei der linearen Regression die Regressionsparameter denen einer Winkelhalbierenden, kann von einer hohen Linearität ausgegangen werden. Für Messungen mit 20 mm Pfadlänge gilt diese Aussage nur bis zu einer Absorption von  $1,5 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Die anderen Pfadlängen zeigen auch bei höheren Absorptionswerten eine hohe Linearität, wobei insbesondere die beiden kurzen Pfadlängen hervorgehoben werden können, die auch im Bereich von  $8 \text{ AU} \cdot \text{cm}^{-1}$  lineare Messsignale liefern. Messungen mit 10 mm Pfadlänge sind bis 3 AU linear.

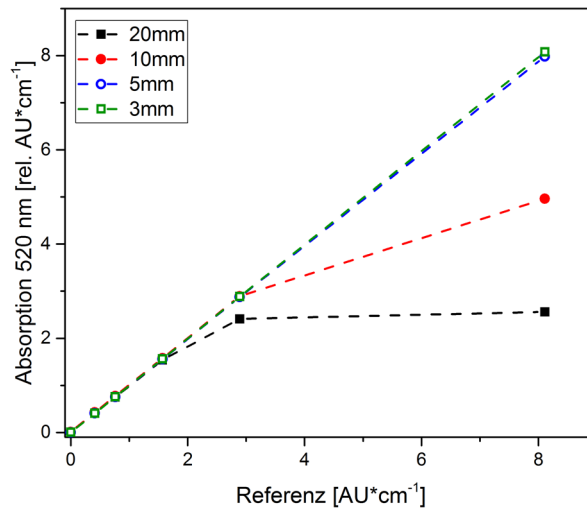


Abbildung 6.4.: Vergleich der tatsächlichen Absorption (mit Referenzmessung bestimmt) mit der gemessenen Absorption (Mehrkanal-Messzelle). Große Pfadlängen zeigen Sättigungseffekte bei hohen Absorptionen.

Tabelle 6.1.: Regressionsparameter der Daten zur Bestimmung des linearen Messbereichs verschiedener Pfadlängen der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle.

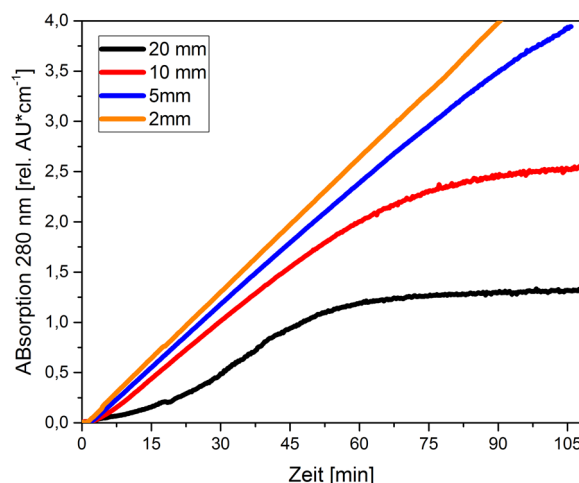
	max. Absorption [AU*cm <sup>-1</sup> ]	Y-Achsenabschnitt [AU*cm <sup>-1</sup> ]	Steigung	R <sup>2</sup>
3 mm	8	1,27*10 <sup>-3</sup>	0,996	1
5 mm	8	0,0106	0,984	0,99
10 mm	3	0,0151	0,996	0,99
20 mm	1,5	0,0151	0,976	1

In einem weiteren Versuch wurde das Messsignal verschiedener Pfadlängen bei einem stetig steigendem Konzentrationsgradienten untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten statischen Messungen, spielt hier folglich auch die Fluidynamik eine Rolle. Dabei soll überprüft werden, ob die Messzelle auch bei einem kontinuierlichen Fluss und stetig ansteigender Analytkonzentration verlässliche Messsignale liefert. Der dazu verwendete Aufbau lässt sich in Abschnitt 12.4.2 einsehen.

Zwei mit PBS-Puffer gefüllte und luftdichte Gefäße sind über einen Schlauch miteinander verbunden, sodass sich die Flüssigkeitsstände beider Gefäße über den Schlauch

ausgleichen können. In einem der Gefäße wurde zusätzlich eine definierte Menge Bovines Serumalbumin (BSA) gelöst. Aus dem anderen Gefäß wird mithilfe einer Pumpe kontinuierliche Puffer entnommen. Der entstehende Unterdruck sorgt dafür, dass BSA-haltiger Puffer über den Verbindungsschlauch nachgezogen wird. Daher entsteht eine stetig ansteigende BSA-Konzentration in dem sich leerendem Gefäß. Der entnommene Puffer wird direkt durch eine Absorptionsmesszelle gepumpt und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei wird der Versuch einzeln mit verschiedenen Pfadlängen durchgeführt. Die Absorptions-Messzellen sind hier mit einem faseroptischen Spektrometer (TIDAS S520, J & M GmbH) verbunden. Die aufgenommenen Daten der verschiedenen Messzellen werden gegen die Zeit aufgetragen und verglichen (Abbildung 6.5).

Es bestätigen sich in diesem Versuch die zuvor erlangten Erkenntnisse hinsichtlich des linearen Messbereichs unterschiedlicher Pfadlängen. Kurze Pfadlängen ermöglichen es deutlich höhere Konzentrationen zu messen. Je größer die verwendete Pfadlänge ist, desto früher tritt der Sättigungseffekt auf. Im Gegensatz zur LED-Messtechnik tritt der Sättigungseffekt hier bereits bei niedrigeren Absorptionen auf. Messungen über 2 AU sind den vorliegenden Daten zufolge mit dem TIDAS S520 nicht linear. Die LED-Messtechnik erlaubt aufgrund der höheren Lichtintensität hingegen Messungen bis zu 3 AU. Darüber hinaus lassen sich hier auch Verzerrungen des Messsignals durch unerwünschte Strömungseffekte beobachten. Insbesondere die 20 mm Pfadlän-



**Abbildung 6.5.: Dynamische Absorptionsmessung mit Absorptionsmesszellen einer bestimmten Pfadlänge.** Ein kontinuierlicher Konzentrationsgradient (BSA) wurde durch die Messzelle gepumpt. Dargestellt ist die auf die Pfadlänge normierte Absorption bei 280 nm. Große Pfadlängen zeigen Sättigungseffekte bei hohen Absorptionen.

ge zeigt ein deutlich verzögertes Ansprechverhalten auf den ansteigenden Konzentrationsgradienten. Dies lässt sich vermutlich auf die verhältnismäßig niedrige Flussrate von  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  zurückführen.

### 6.3. Überprüfung der Selektivität der Messmethode

Bisher konnte die Messzelle hinsichtlich ihrer Fertigungstoleranzen und des linearen Messbereichs charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Herstellungsprozess als auch die Messtechnik ausreichend akkurat für eine präzise Absorptionsmessung sind. Die bisherigen Untersuchungen wurden mit Reinstlösungen durchgeführt. In realen Anwendungen liegen jedoch häufig mehrere Analyten in einer Probe vor. Da die Absorption hinsichtlich der Wellenlänge keine scharfen Grenzen besitzt, kann es zur Überlagerung verschiedener Absorptionsmaxima kommen. Dies gilt insbesondere für die Applikation des Sensors im Upstream-Bereich. Anwendungen im Downstream-Bereich sind aufgrund der geringeren Komplexität der Proben diesbezüglich weniger problematisch. Aber auch hier finden sich verschiedenste Biomoleküle, die erst im Zuge der Aufreinigung entfernt werden. Das Sensorsystem muss demnach in der Lage sein, auch bei Vorliegen von Stoffgemischen eine valide Quantifizierung einzelner Komponenten durchzuführen.

Die möglichen Überlagerungen sollen mit der Vermessung von unterschiedlich zusammengesetzten Mischlösungen verschiedener biogener Chromophore aufgeklärt werden. Zu den ausgewählten Chromophoren zählen BSA, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), sowie Riboflavin. Letztere nehmen zentrale Funktionen im Stoffwechsel von Zellen ein und sind damit in biotechnologischen Prozessen stets präsent. BSA wird stellvertretend für Proteine verwendet. Für jedes Chromophor wurden Konzentrationsstufen im linearen Messbereich festgelegt. In den Mischlösungen finden sich die Chromophore in genau diesen Konzentrationen wieder, wobei immer eine unterschiedliche Kombination an Konzentrationen getestet wird. Aufgrund der hohen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten wird der Versuchsumfang dahingehend reduziert, als dass nur ein Teil der möglichen Kombinationen vermessen wird (DoE). Diese wurden so zusammengestellt, dass die Konzentrationen der verschiedenen Chromophore in den Mischlösungen möglichst nicht miteinander korrelieren. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit werden, gleichmäßig über den Versuchszeitraum verteilt, Zentralversuche durchgeführt. Diese beinhalten die Vermessung einer immer gleich zusammengesetzten Mischlösung. Dadurch können systematische Fehler, die durch äußere

Umstände verursacht werden, aufgedeckt werden. Der Versuchsplan mit allen Mischlösungen ist in Tabelle 12.4 (Abschnitt 12.4.3) aufgelistet.

Die Mischlösungen werden einzeln und nacheinander in einer Messzelle mit bestimmter Pfadlänge vermessen. Für weitere Pfadlängen wird ein neuer Versuchsdurchgang durchgeführt. Ein angeschlossenes Spektrometer nimmt die Absorptionsspektren der Mischlösungen auf. Mit den erhaltenen Spektraldaten wird im Anschluss eine PLS-Regression durchgeführt. Dabei wird überprüft, ob die Erstellung einer Kalibrationsfunktion auch möglich ist, wenn die Chromophore nicht in Reinstlösung vorliegen. Das Verfahren selektiert Spektralbereiche mit hohem Informationsgehalt und ist daher für komplexe Daten wie Absorptionsspektren mit vielen Variablen geeignet. Bei hoher Selektivität des Messverfahrens sollten die aus dem Kalibrationsdatensatz errechneten Konzentrationen den tatsächlichen Konzentrationen entsprechen. Werden die Wertepaare gegeneinander aufgetragen ergibt sich eine Winkelhalbierende.

Die Auftragungen von vorhergesagter Konzentration gegen die tatsächliche Konzentration für die drei verwendeten Analyten lässt sich in Abbildung 6.6 einsehen. Dabei wurden jeweils exemplarisch die Daten von zwei verschiedenen Pfadlängen ausgewählt, um die Unterschiede in der Vorhersagegenauigkeit zu zeigen. Die eingezeichnete Linie repräsentiert die Winkelhalbierende. Eine genaue Vorhersage erzeugt Datenpunkte auf dieser Linie. Die Dreifachbestimmungen der einzelnen Konzentrationsstufen zeigen in Abhängigkeit zur gewählten Pfadlänge unterschiedlich große Streuungen. Diese Variationen sind durch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Mischlösungen und den jeweiligen Messfehler zu erklären. Je nach gewählter Pfadlänge lassen sich die Einflüsse der anderen Komponenten demnach mehr oder weniger erfolgreich durch das Modell korrigieren. Eine genaue Beurteilung der Vorhersagegenauigkeit wurde abschließend mittels Regressionsanalyse vorgenommen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. Teil A der Tabelle zeigt jeweils die Pfadlänge mit der genauesten Vorhersage. Im Teil B wurden die Daten der Pfadlänge mit der schlechtesten Vorhersage notiert. Die Bestimmtheitsmaße im Teil A sind in allen drei Fällen nahe dem Wert für eine ideale Korrelation. Des Weiteren entsprechen die Steigungen und der y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden nahezu denen einer Winkelhalbierenden. All dies deutet auf ein gutes Kalibrationsmodell hin. Die beschriebenen Parameter verschlechtern sich deutlich für die in Teil B angegebenen Pfadlängen. Daraus folgt, dass die Quantifizierung eines Analyten in einem Stoffgemisch grundsätzlich möglich ist. Jedoch hängt die Güte der Vorhersage von der Wahl der Pfadlänge ab. Unter den hier gewählten Umständen war für eine genaue Quantifi-

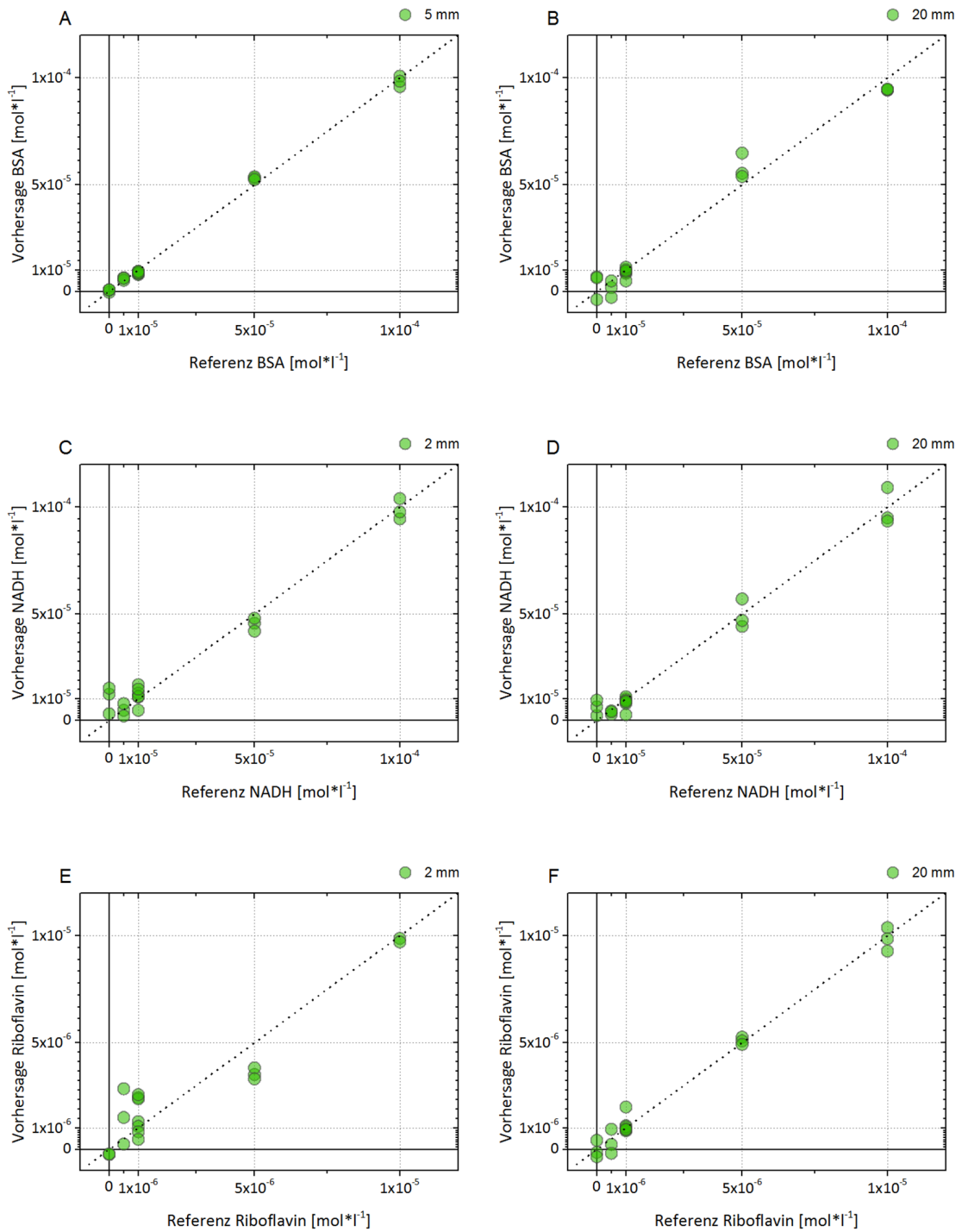


Abbildung 6.6.: PLS-Regression zur Quantifizierung verschiedener Analyten. Auftragung der tatsächlichen Analytkonzentrationen gegen die aus den Kalibrationsmodellen errechneten Konzentrationen für BSA (A-B), NADH (C-D) und Riboflavin (E-F).



**Tabelle 6.2.: Regressionsparameter der Kalibrationsmodelle.** Teil A gibt jeweils die Ergebnisse derjenigen Pfadlänge an, die zu den genauesten Modellen geführt hat. Teil B wiederum zeigt die Ergebnisse der Pfadlänge mit der schlechtesten Vorhersagegenauigkeit.

A	Pfadlänge	Y-Achsenabschnitt [mol*l <sup>-1</sup> ]	Steigung	R <sup>2</sup>	LOQ [mol*l <sup>-1</sup> ]
BSA	5 mm	8,10*10 <sup>-8</sup>	0,997	0,997	7,25*10 <sup>-6</sup>
NADH	20 mm	5,47*10 <sup>-7</sup>	0,981	0,981	3,39*10 <sup>-5</sup>
Riboflavin	20 mm	3,45*10 <sup>-8</sup>	0,988	0,988	1,21*10 <sup>-6</sup>
<b>B</b>					
BSA	20 mm	6,77*10 <sup>-7</sup>	0,976	0,976	7,67*10 <sup>-5</sup>
NADH	2 mm	1,49*10 <sup>-6</sup>	0,947	0,947	7,33*10 <sup>-5</sup>
Riboflavin	2 mm	4,83*10 <sup>-7</sup>	0,853	0,886	3,04*10 <sup>-5</sup>

zierung von BSA eine geringe Pfadlänge von Vorteil. Die eingesetzten Konzentrationen von BSA führen bei großen Pfadlängen zu Absorptionen von über 3 AU\*cm<sup>-1</sup> und folglich zur Sättigung und zu schlechten Vorhersageergebnissen. Im Gegensatz dazu war für die präzise Quantifizierung von NADH und Riboflavin eine große Pfadlänge notwendig. Diese Stoffe weisen deutlich niedrigere Absorptionen auf und profitieren daher von den hohen Pfadlängen. Dies spiegelt sich auch in den errechneten Bestimmungsgrenzen (LOQ) wider (Tabelle 6.2). Diese liegen für die jeweils geeignetste Pfadlänge im Bereich von einer Größenordnung niedriger als für die in Teil B dargestellten ungeeigneten Pfadlängen.

Um die Einflüsse der verschiedenen Komponenten auf die Messung eines anderen Analyten besser zu verstehen, werden die Regressionskoeffizienten betrachtet. Damit wird der Beitrag bemessen, den eine Wellenlänge zu dem jeweiligen Kalibrationsmodell beisteuert. Je höher der Wert eines Regressionskoeffizienten, desto größer ist der Einfluss auf das gesamte Modell. Koeffizienten mit unterschiedlichem Vorzeichen gehen entgegengesetzt in die Gleichung ein. Abbildung 6.7 A zeigt die Regressionskoeffizienten basierend auf den Messungen mit den in Teil A der Tabelle 6.2 aufgeführten Pfadlängen. Die Regressionskoeffizienten der einzelnen Modelle unterscheiden sich deutlich voneinander und ähneln im Verlauf den Absorptionsspektren der verwendeten Chromophore (Abbildung 6.7 B). Im Fall von BSA besitzt der Spektralbereich um

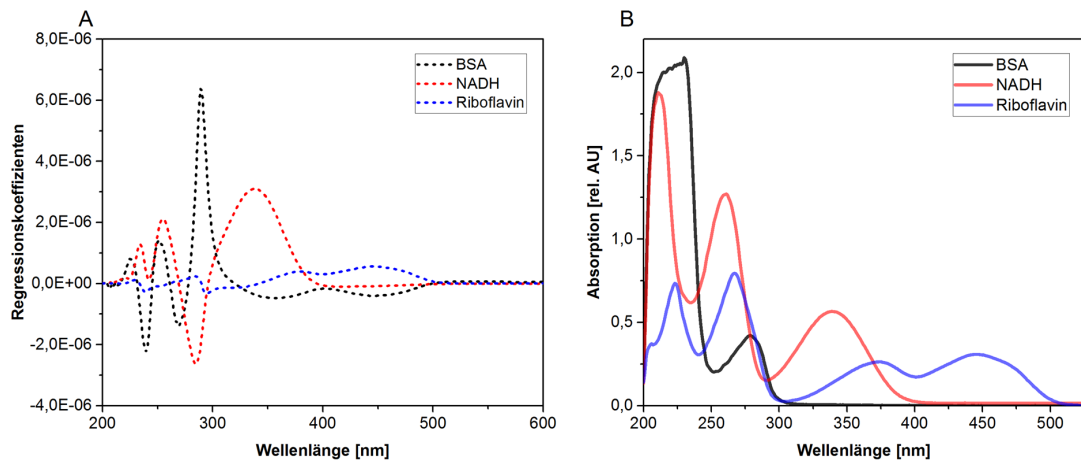


Abbildung 6.7.: Regressionskoeffizienten der Kalibrationsmodelle von BSA, NADH und Riboflavin (A). Absorptionsspektren der drei verwendeten Chromophore (B).

290 nm einen großen Einfluss auf das Kalibrationsmodell. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Anhand der dargestellten Absorptionsspektren wird allerdings auch deutlich, dass die anderen Stoffe ebenfalls in diesem Bereich Licht absorbieren. Der für das Modell relevante Spektralbereich ist daher leicht zu höheren Wellenlängen verschoben, um den Einfluss der anderen Stoffe zu verringern. Um das Ergebnis zusätzlich zu korrigieren, gehen bestimmte Spektralbereiche mit negativem Regressionskoeffizienten in das Modell ein. Speziell fällt hier der Bereich um 450 nm auf. Hier wird die durch Riboflavin verursachte zusätzliche Absorption unterhalb von 300 nm bemessen. Aber auch im Bereich von 350 nm und unterhalb von 280 nm gibt es relevante Spektralbereiche, welche möglicherweise den Einfluss des NADH quantifizieren. Ähnlich verhält es sich mit dem Kalibrationsmodell für NADH. Hauptsächlich relevant für die Quantifizierung ist der Bereich um 340 nm. Hier liegt auch das Absorptionsmaximum von NADH. Für die Korrektur wird insbesondere ein Bereich um 280 nm verwendet. Hier zeigen sowohl BSA als auch Riboflavin Absorption. Das Kalibrationsmodell für Riboflavin hingegen nutzt weniger verschiedene Spektralbereiche zur Quantifizierung. Hier sind die Bereiche um 380 nm und 450 nm relevant. Eine umfangreiche Korrektur ist hier nicht nötig, da die Absorption bei 450 nm nicht durch andere Komponenten beeinflusst wird.

Diese Korrekturen funktionieren nur, solange der betreffende Spektralbereich verlässliche Daten liefert. Sättigungseffekte stören die Vorhersage des Modells. Hier liegt eine mögliche Begründung für die bessere Genauigkeit des BSA-Modells bei kleinen Pfad-

längen. So ist für dieses Modell der Spektralbereich unter 250 nm stärker relevant als bei den anderen Modellen. Anhand der Absorptionsspektren wird jedoch deutlich, dass dieser Bereich bedingt durch die Absorption aller drei Komponenten hohe Absorptionswerte aufweist. Im Falle einer Sättigung in diesem Bereich, können die Werte nicht mehr zur höheren Präzision des Gesamtmodells beitragen.

Insgesamt zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass die Messmethode ausreichend selektiv zur Quantifizierung einzelner Analyten in einem Stoffgemisch ist. Das Sensorsystem profitiert hier von der Aufnahme ganzer Absorptionsspektren. Diese liefern eine große Menge an Informationen, die durch multivariate Datenanalyseverfahren nutzbar gemacht werden können. Darüber hinaus zeigt sich, dass auch die Pfadlänge entscheidend für die Präzision der Messung ist. Um alle drei Analyten mit ausreichender Präzision quantifizieren zu können sind mehrere Pfadlängen und Wellenlängen nötig. Durch die Verwendung der Mehrkanal-Absorptionszelle können demnach Messungen reduziert werden, indem mehrere Pfadlängen zusammen gemessen werden.

## 6.4. Zusammenfassung

Die Eignung der Messzelle zum Zweck der Absorptionsmessung konnte anhand verschiedener Untersuchungen gezeigt werden. Der Fertigungsprozess, welcher sich aus dem 3D-Druck der Messzelle und dem manuellen Einsetzen der Fenster zusammensetzt, ist für Pfadlängen ab 3 mm hinreichend präzise und weist eine hohe Richtigkeit auf. Messzellen mit 1,5 mm Pfadlänge weisen die größte Streuung hinsichtlich der Pfadlänge auf und sollten daher im Zuge einer Qualitätskontrolle auf die exakte Pfadlänge hin untersucht werden. So kann ein Korrekturfaktor bei der Datenauswertung miteinbezogen werden. Die Transmission der Quarzfenster liegt im betrachteten Spektralbereich bei über 80 %. Kleberückstände können die Transmission jedoch deutlich verringern. Die Aufnahme eines Transmissionsspektrums sollte daher auch Teil der Qualitätskontrolle sein.

Der lineare Messbereich ist abhängig von der gewählten Pfadlänge. Während sich große Pfadlängen durch eine hohe Sensitivität auszeichnen, ermöglichen kurze Pfadlängen die Messung von hochkonzentrierten Lösungen. Die Mehrkanal-Absorptionsmesszelle besitzt folglich einen hohen Dynamikbereich. Dabei ist auch die entwickelte LED-Messtechnik von Vorteil. Sie zeichnet sich durch einen Messbereich von bis zu  $8 \text{ AU} \cdot \text{cm}_{-1}$  aus. Messungen mit dem verwendeten Spektrometer erreichen die Sättigungsgrenze bereits bei niedrigeren Konzentrationen. Die Aufnahme ganzer Absorpti-

onsspektren ermöglicht jedoch die selektive Quantifizierung von BSA, NADH und Riboflavin in einem Stoffgemisch. Die Messzelle erfüllt damit wichtige Voraussetzungen, um Absorptionsmessungen vornehmen zu können. Auch die Quantifizierung einzelner Stoffe unter Anwendung multivariater Datenanalyse ist möglich. Hier erweisen sich unterschiedliche Pfadlängen als hilfreich. Neben der Möglichkeit verschiedene Konfigurationen der Messzelle zu verwenden, ist auch die Modularität von Vorteil. So lässt sich die Messtechnik an den jeweiligen Anwendungsfall anpassen und ermöglicht so bestmögliche Messergebnisse.

# 7. Online Monitoring von CHO-DG44 Kultivierungen in verschiedenen Reaktorsystemen

Nachdem das Sensorsystem charakterisiert und die Validität der Messmethode bestätigt wurde, soll das System nun zur Überwachung von Bioprozessen genutzt werden. In diesem Abschnitt werden dazu Kultivierungen mit einem CHO-DG44-Stamm in verschiedenen Reaktorsystemen durchgeführt. Tierische Zelllinien haben eine große Bedeutung in der biopharmazeutischen Industrie und werden für die Produktion von biotechnologischen Produkten vielfach eingesetzt. Dazu gehören monoklonale Antikörper, Impfstoffe aber auch verschiedene andere Proteine, die aufgrund komplexer Glykosylierungen nicht mithilfe von Bakterien hergestellt werden können. Folglich sind die zugehörigen Prozesse ein wichtiges Applikationsfeld für das entwickelte Sensorsystem. Außerdem stellen tierische Zellen einen hohen Anspruch an Sensorsysteme und werden häufig in Single-Use Bioreaktoren kultiviert. Es soll überprüft werden, ob sich die Erkenntnisse aus den vorherigen Experimenten bestätigen und das System zuverlässige Daten liefert. Die Kultivierungen basieren jeweils auf unterschiedlichen Fütterungsstrategien. Zusammen mit den verschiedenen Reaktorsystemen können so unterschiedliche Anwendungsprofile getestet werden.

## 7.1. Batch-Kultivierung im Schüttelkolben

Kultivierungen im Schüttelkolben werden für Vorkulturen und in der Prozessentwicklung häufig eingesetzt. Aufgrund des Einsatzes in einem Inkubator sind Schüttelkolben unzureichend mit Sensorik ausgerüstet und stellen daher ein interessantes Applikationsgebiet für den kompakten und modularen Sensor dar. Die hier beschriebene Kultivierung wurde als batch-Prozess in einem Mycap<sup>®</sup> CCX System (Sartorius Stedim Biotech) durchgeführt. Das System verfügt über Schlauchanschlüsse im Deckel zum aseptischen Flüssigkeitstransfer. Diese können zu einem Bypass zusammengefügt werden, in welchem eine Absorptionmesszelle mit 3 mm Pfadlänge integriert wurde. Die Modularität und Kompaktheit des Sensorsystems erlauben dabei die Positionierung des gesamten Bypasses im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Dies verringert das Bypassvolumen und ge-

währleistet eine konstante Temperatur im Bypass sowie in der Messzelle. Der Messzellenhalter wird dabei neben den Schüttelkolben direkt auf der Schüttelplatte montiert. Ein faseroptisches Spektrometer befindet sich außerhalb des Inkubators und ist über Lichtwellenleiter mit dem Messzellenhalter verbunden. Für den Flüssigkeitstransport im Bypass wird ebenso eine Peristaltikpumpe auf der Schüttelplatte installiert und ein kontinuierlicher Volumenstrom von  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt, um das Sedimentieren der Zellen im Bypass zu verhindern.

In diesem Versuch wird der Einfluss des Sensorsystems – bestehend aus Bypass, Pumpe und Messkammer – auf das Zellwachstum einer Kultivierung mit kleinem Volumen untersucht. Eine Referenzkultur im selben Inkubator, ohne Sensorsystem und Bypass, dient als Vergleich. Abbildung 7.1 zeigt die durch offline Messungen ermittelten viablen Zellzahlen (VCC) beider Kulturen zusammen mit der Viabilität. Die Wachstumskurven unterscheiden sich hinsichtlich der maximal erreichten Zellzahl deutlich voneinander. Während die Referenzkultur in der Spitze über  $8 \text{ Mio. Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$  aufweist, stoppt das Wachstum der Zellen, die mit Bypass kultiviert wurden bei knapp  $3 \text{ Mio. Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Zu Beginn verlaufen die Wachstumskurven noch nahezu deckungsgleich. Erst im Laufe des dritten Tages zeigen sich Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Die Zellzahl des Mycap-Kolbens stabilisiert sich im weiteren Verlauf auf einen Wert knapp unter  $3 \text{ Mio. Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Im anderen Kolben setzt sich

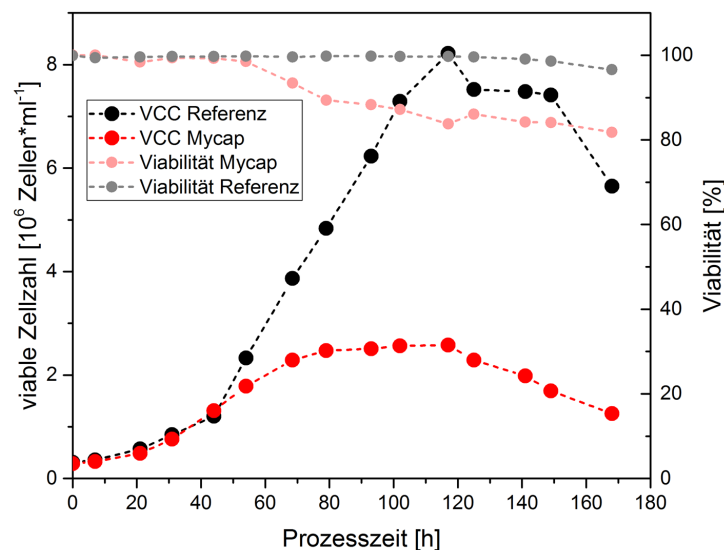
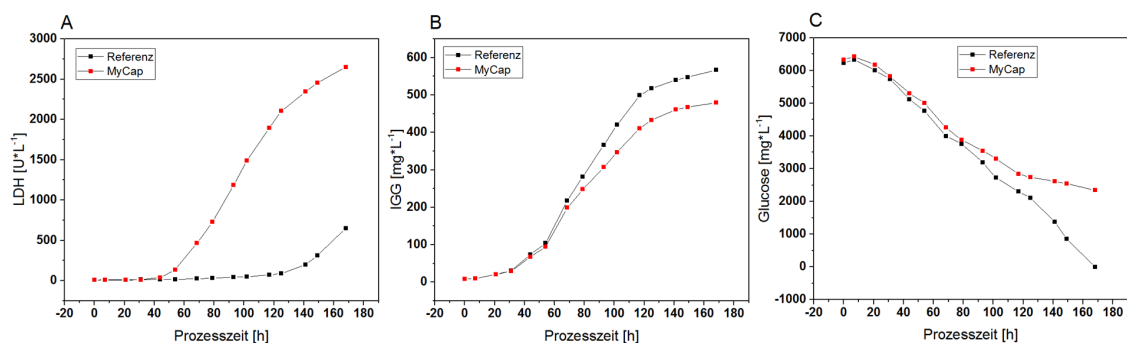


Abbildung 7.1.: Viable Zellzahlen und Viabilität der Zellen des Referenzkolbens und des Mycap-Kolbens mit angeschlossenem Bypass.

das Zellwachstum weiter linear fort. Zum gleichen Zeitpunkt sinkt auch die Viabilität der Zellen im Mycap-Kolben ab. Diese stabilisiert sich im Laufe der Kultivierung auf ca. 85 % mit leicht fallender Tendenz. Die Zellen im Referenzkolben haben bis kurz vor Ende eine Viabilität von über 99 %. Ab etwa 120 h beginnt in beiden Kolben die Absterbephase, sodass die gemessenen viablen Zellzahlen sinken. Die Daten zeigen einen deutlichen Einfluss der Sensorüberwachung auf das Wachstum der Zellen. Dieser resultiert vermutlich aus dem mechanischen Stress durch die Peristaltikpumpe. Die eingestellte Flussrate führt insbesondere bei einem kleinen Reaktorvolumen dazu, dass die Zellen im Laufe der Kultivierung sehr häufig den Bypass durchlaufen und dem Einfluss der Pumpe ausgesetzt sind. Weiterhin sind sogenannte Bypass-Effekte möglich. Durch fehlenden Gasaustausch innerhalb des Bypasses sind Veränderungen des Gelöstsauerstoffanteils und des pH-Werts möglich.

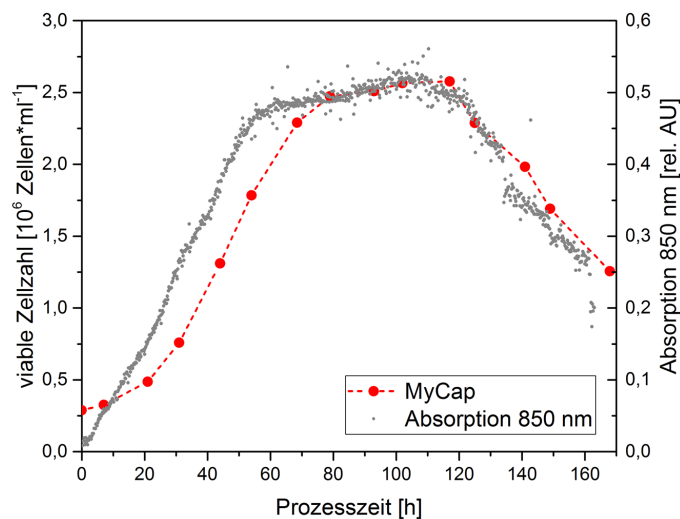
Die Analyse wichtiger Metabolite liefert weitere Erkenntnisse über den Stoffwechsel der Zellen. Dabei bestätigt die deutlich erhöhte Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand des Mycap-Kolbens (Abbildung 7.2 A) die zuvor festgestellte verminderte Viabilität. Als intrazelluläres Protein deutet die hohe Konzentration im Überstand auf eine Zerstörung der Zellmembran hin und zeigt damit das Vorhandensein toter Zellen an. Wie zuvor bereits vermutet, wird höchstwahrscheinlich der mechanische Stress der Peristaltikpumpe ursächlich dafür sein. Trotz des deutlich verringerten Wachstums der Zellen lässt sich feststellen, dass die produzierte Menge an monoklonalem Antikörper nicht im gleichen Maße abweicht. (Abbildung 7.2 B). Es ist demnach eine deutlich erhöhte spezifische Produktivität der Zellen im Mycap-Kolben zu beobachten. Auch der Verlauf der Glucosekonzentration zeigt eine vergleichbare Stoffwechselaktivität, trotz niedrigerer Zellzahl. In beiden Kulturen ist der Verbrauch



**Abbildung 7.2.: Konzentrationen verschiedener Metabolite im Überstand.** Dargestellt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von LDH (A), IGG (B) sowie Glucose (C).

an Glucose zunächst annähernd gleich (Abbildung 7.2 C). Erst mit Beginn der Absterbephase unterscheiden sich die vorliegenden Glucosekonzentrationen stärker voneinander. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine durch Stresseinwirkung induzierte stärkere Produktion des monoklonalen Antikörpers.

Über das Wachstumsverhalten der Zellen hinaus wurde überprüft, inwieweit das Messsignal den Prozess abbilden kann. Dazu wurden während der Kultivierung Absorptionsspektren aufgenommen. Hierbei wurde eine hohe Eigenabsorption des Mediums beobachtet, welche die zusätzliche Extinktion der Zellen unterhalb von 300 nm so stark überlagert, dass keine ausreichende Lichtintensität für den Detektor vorhanden ist. Daher konzentriert sich die Beurteilung des Sensors an dieser Stelle auf die Messungen im NIR-Bereich. Der zeitliche Verlauf der Absorption bei 850 nm ist in Abbildung 7.3 zusammen mit der viablen Zellzahl dargestellt. Dabei zeigt sich ein sehr ähnlicher Verlauf beider Messgrößen. Zu Beginn der Kultivierung sind leichte Abweichungen vom Verlauf der Zellzahl zu sehen. Die stationäre Phase, sowie die Absterbephase werden jedoch korrekt vom Sensorsignal wiedergegeben. Somit konnte gezeigt werden, dass das Sensorsystem grundsätzlich zur Überwachung einer tierischen Zellkultur geeignet ist. Der Messaufbau war den gesamten Versuchszeitraum über steril. Die Vorsterilisierung der Messzelle sowie der spätere Zusammenbau des Bypasses waren demnach erfolgreich. Dennoch ist der bestehende Versuchsaufbau aufgrund



**Abbildung 7.3.:** Beschreibung der viablen Zellzahl durch die gemessene Absorption bei 850 nm. Die Absorptionswerte wurden mit der entwickelten Absorptionssmesszelle (Pfadlänge: 3 mm) und einem faseroptischen Spektrometer aufgenommen.



des deutlich eingeschränkten Zellwachstums nur bedingt für Kultivierungen im kleinen Maßstab geeignet. Abhilfe könnte die Wahl eines anderen Pumpentyps bringen. Vakuumpumpen oder Spritzenpumpen üben konstruktionsbedingt deutlich weniger mechanischen Stress auf die Zellen aus und würden damit eine gute Alternative darstellen.

## 7.2. Fed-Batch-Kultivierung im 10 l Edelstahlreaktor

Die Messung im Bypass ermöglicht die Verwendung des Sensorsystems auch an konventionellen Edelstahlreaktoren. Hier wurde im Zuge eines fed-batch-Prozesses der zuvor beschriebene CHO-DG44-Stamm in einem 10 l Edelstahlreaktor kultiviert. Das deutlich höhere Reaktorvolumen im Verhältnis zum Bypassvolumen sollte den Einfluss auf das Zellwachstum deutlich verringern. Weiterhin wurde der Aufbau des Bypasses verändert. Im Gegensatz zur zuvor durchgeführten Schüttelkolbenkultivierung wird die Zellsuspension nicht kontinuierlich durch den Bypass geführt, sondern durch eine Hubkolbenpumpe vor und zurück gepumpt [34]. Durch diese Pumpentechnik sind die Zellen keinem dauerhaften mechanischem Stress durch eine Peristaltikpumpe ausgesetzt. Die Messzelle sitzt dabei zwischen Reaktor und Hubkolbenpumpe, sodass sie bei jedem Pumpvorgang mit Medium durchströmt wird. Die Messung findet in der Folge nicht kontinuierlich statt, sondern in einem Intervall von 30 min. Um das Zellwachstum zu überwachen, wurde der Prozess mit der Streulicht-Messzelle im Bypass ausgestattet. Gleichzeitig werden über ein automatisiertes Probenentnahmesystem Proben für die offline Zellzahlbestimmung gesammelt. Die Ergebnisse der offline Analyse wurden anschließend mit den Sensordaten abgeglichen (Abbildung 7.4).

Dabei wird deutlich, dass je nach Detektionswinkel unterschiedliche Verläufe der Streulichtintensität resultieren. Diese bilden jeweils verschiedene Kultivierungsphasen unterschiedlich gut ab. So ist das im 20° Winkel detektierte Streulicht besonders gut geeignet für niedrige Zellzahlen. Ab einer Zellzahl von 6 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> steigt das Signal jedoch nicht mehr und sinkt mit weiter steigender Zellzahl kontinuierlich ab. Es ähnelt ab diesem Zeitpunkt dem Verlauf der Transmission (nicht dargestellt). Die sinkende Intensität ist bedingt durch eine zu hohe Trübung der Zellsuspension. Die Streuungsereignisse finden nicht mehr unabhängig voneinander statt. Vielmehr wird ein Lichtstrahl beim Durchqueren der Messkammer mehrfach gestreut und verliert damit an Intensität. Das 90° Streulicht zeigt diesen Effekt bei den hier auftretenden Zelldichten nicht. Vielmehr ist das Messsignal in der Lage die ab Tag 4 auftretenden höheren Zelldichten gut abzubilden. Darüber hinaus lassen sich anhand des Signals

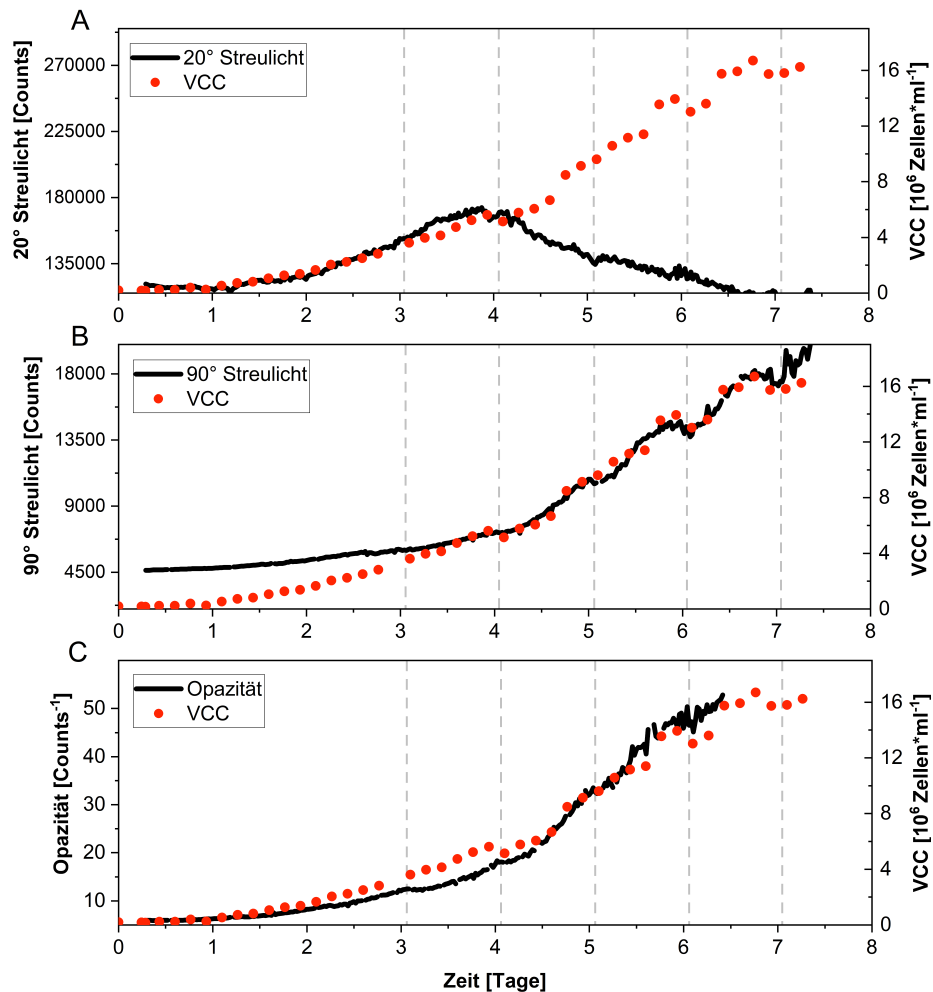


Abbildung 7.4.: Streulichtmessungen während eines fed-batch-Prozesses mit CHO-DG44 Zellen. Dargestellt sind verschiedene Detektionswinkel: 20° Streulicht (A), 90° Streulicht (B) sowie die Opazität (C). Die Opazität berechnet sich aus den Transmissionsdaten durch Bildung des Kehrwerts. Vertikale Hilfslinien zeigen die Fütterungszeitpunkte.

auch die durch Zufütterung (vertikale Hilfslinien) resultierenden Verdünnungseffekte erkennen. Für niedrige Zelldichten ist das Signal aufgrund der schlechteren Sensitivität weniger geeignet. Gleiches gilt für den Kanal zur Detektion von Rückstreulicht, welcher aufgrund der noch geringeren Sensitivität bis zum Ende der Kultivierung keine verwertbaren Daten geliefert hat (nicht dargestellt).

Die ebenfalls dargestellte Opazität zeichnet sich sowohl durch eine ausreichende Sensitivität für niedrige Zelldichten, als auch einen guten Dynamikumfang für höhere Zelldichten aus. Die Opazität ermöglicht es somit die Zellzahl über einen langen Zeitraum präzise zu beschreiben. Die Werte berechnen sich aus dem Kehrwert der Transmission

und sind ein Maß für die Lichtundurchlässigkeit eines streuenden und lichtdurchlässigen Materials. Die Genauigkeit ist dabei nicht so hoch wie bei den zuvor genannten Kanälen, jedoch liefert das Signal von Beginn bis kurz vor Ende der Kultivierung verlässliche Daten. Da sich die Opazität aus den Daten der Transmission ableitet, ist eine Berechnung für die höchsten Zellzahlen nicht mehr möglich. Ähnlich wie das 20° Streulicht ist auch die Transmission aufgrund der hohen Trübung am Ende der Kultivierung nicht mehr messbar. Insgesamt sind die Streulichtdaten für eine Überwachung der Trübung während einer Kultivierung mit tierischen Zellkulturen sehr gut geeignet. Die verschiedenen Detektionswinkel zeichnen sich durch unterschiedliche Sensitivitäten und Dynamikbereiche aus. Damit ist eine Beschreibung der Zellzahl zu jeder Zeit ohne Verdünnung der Probe möglich. Die entwickelte Messzelle hebt sich somit von anderen Trübungssensoren ab, welche in der Regel lediglich einen Detektionswinkel berücksichtigen.

### **7.3. Perfusionsprozess im modularen Single-Use-Bioreaktorsystem**

Eine weitere Möglichkeit der Prozessführung sind kontinuierliche Prozesse. Analog zum fed-batch-Prozess wird ebenfalls Nährmedium während des Prozesses zugegeben. Gleichzeitig wird allerdings auch zellhaltiges Medium und Produkt aus dem Reaktor entnommen. So wird nicht nur das Problem der Substratlimitierung gelöst, vielmehr können auch toxische Stoffwechselprodukte abgeführt werden. Sowohl die Zugabe als auch die Entnahme von Medium finden kontinuierlich mit einem bestimmten Volumenstrom statt. Sind die Volumenströme gleich und das Feed Medium richtig gewählt, kann sich ein stationärer Gleichgewichtszustand einstellen. Die Wachstumsrate der Zellen entspricht dabei exakt der Verdünnungsrate, die durch den kontinuierlichen Austausch von Medium reguliert wird. Vorteile kontinuierlicher Prozesse liegen in den wegfallenden Totzeiten für Reinigung zwischen zwei Versuchsdurchgängen. Weiterhin besitzen die Prozesse eine höhere Produktivität als batch-Prozesse und ermöglichen so kleinere Reaktorgefäße bei gleicher Produktausbeute. Die Produktivität kann durch den Einsatz von Zellrückhaltesystemen noch weiter gesteigert werden. Diese Systeme ermöglichen hohe Zelldichten bei gleichzeitig hohem Durchsatz an Medium. Daraus resultieren vor allem höhere Produkttiter, die kontinuierlich abgeführt werden können.

Die Durchführung kontinuierlicher Prozesse erfordert den Einsatz von online Messtechnik zur Überwachung der Zelldichte. Schwankungen der Wachstumsrate können bei konstanter Verdünnungsrate zum Auswaschen der Zellen oder zur Zunahme der Zelldichte und in der Folge zur Substratlimitierung führen. Daher ist eine zuverlässige Regelung der zugehörigen Volumenströme notwendig. In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die entwickelte NIR-Streulicht-Messzelle zur online-Überwachung der Zelldichte von tierischen Zellkulturen geeignet ist. Insbesondere die aus der Transmission errechnete Opazität zeichnete sich im relevanten Trübungsbereich durch einen guten Dynamikumfang und eine hohe Sensitivität aus. Daher sollen auch hier die aufgezeichneten Sensordaten mit den durch offline-Messungen ermittelten viablen Zellzahlen verglichen werden. Besonders herausfordernd ist hier die nötige Langzeitstabilität der Messung, aufgrund der deutlich längeren Laufzeit kontinuierlicher Prozesse.

Der zuvor beschriebene Prozess wurde in einem Ambr<sup>®</sup> 250 Modular System (Sartorius Stedim Biotech) durchgeführt. Dieses System findet vor allem im Zuge der Prozessoptimierung und Charakterisierung Anwendung und zeichnet sich durch Einweg-Reaktorgefäße aus. Sie bestehen aus einem stabilen Kunststoff und sind mit sämtlichem Equipment ausgestattet. Die vorsterilisierte Einweg-Messzelle kann hier mittels aseptischen Schweißverbindungen thermoplastischer Schläuche integriert werden. Eine Peristaltikpumpe sorgt für einen kontinuierlichen Volumenstrom im Bypass. Einflüsse auf das Zellwachstum sollten hier durch den ständigen Austausch von Medium und das Abführen von Zellen gemindert werden. Für die Zellrückhaltung wird ein ebenfalls mittels 3D-Druck hergestellter mikrofluidischer Zellseparator verwendet [15].

Die während des Prozesses aufgenommenen Werte der Opazität wurden mit den zugehörigen offline Daten zur viablen Zellzahl in Abbildung 7.5 gegen die Zeit aufgetragen. Dabei lässt sich eindeutig erkennen, dass die Werte zur Opazität über den gesamten Prozesszeitraum dem Verlauf der viablen Zellzahl folgen. Dabei werden sowohl die Zunahme als auch die zwischenzeitliche Abnahme der Zellzahl zuverlässig erkannt. Im Verlauf der Kultivierung treten vereinzelt, zeitlich beschränkte Abweichungen von den offline Daten auf (z. B. bei 275 h). Diese werden hauptsächlich durch Zelltrümmer oder -cluster ausgelöst, die sich in der Messkammer ansammeln. Daher sollte das System regelmäßig, durch kurzzeitiges Erhöhen der Flussrate, gespült werden.

Zu Beginn lässt sich eine kurze batch-Phase erkennen. Das Ende liegt bei ca. 75 h nach Prozessbeginn und ist durch ein Plateau in den Messdaten erkennbar. Kurz darauf wurden der Volumenstrom für das Feed-Medium und die Zellrückhaltung gestartet. In der

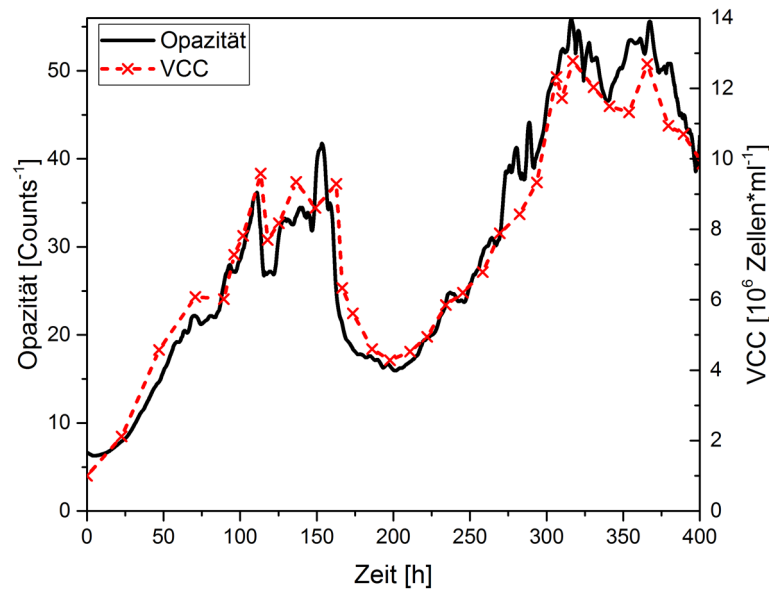


Abbildung 7.5.: Viable Zellzahl (VCC) während der Durchführung eines kontinuierlichen Perfu-sionsprozesses. Zusätzlich wurde die mit der Einweg-Streulicht-Messzelle aufgenom-mene Opazität dargestellt, welche sich aus der Transmission errechnet.

Folge steigt die Zellzahl wieder deutlich an bis schließlich eine quasi-stationäre Phase durch Erhöhung der Flussrate für das Feed-Medium erreicht wird. Die Zellzahl bewegt sich im Folgenden über einen Zeitraum von ca. 50 h in einem Bereich zwischen 8-10 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup>. Anstieg und stationäre Phasen sind auch anhand der aufgezeichneten Opazität erkennbar. Im weiteren Verlauf sinkt die Zellzahl stark ab und erreicht einen Wert von nur noch 4 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup>. Das Absinken der Zellzahl wurde durch eine Fehlfunktion des Zellrückhaltesystems ausgelöst. Nach Austausch der Retentionseinheit konnte die Zellzahl wieder deutlich gesteigert werden. Auch die Opazität steigt in der folgenden Phase wieder an. Der Anstieg setzt sich fort, bis eine Zellzahl von etwa 12 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> erreicht wurde. Im Folgenden konnte die Zellzahl bis zu einer Prozesszeit von 400 h in einem Bereich von 11-13 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> gehalten werden.

Das Messsignal ist trotz dieser langen Betriebszeit noch zuverlässig und bildet die Zellzahl verlässlich ab. Eine offline-Analyse der Zellzahl ist bei Einsatz des Sensors folglich nicht mehr zwingend notwendig. Sie kann daher entweder vollständig ersetzt oder durch die Sensordaten ergänzt werden. Durch den Verzicht der manuellen sowie zeit- und arbeitsintensiven Entnahme von offline-Proben, kann das Risiko von Kontaminationen gemindert werden. Außerdem wird die Ausbeute erhöht, da dem System kein

zusätzliches Volumen entnommen werden muss. Das Sensorsystem ist damit in der Lage die Datenbasis für eine automatisierte Regelung des Volumenstroms und damit der Verdünnungsrate zu stellen. Durch die Nutzung von online-Daten wird darüber hinaus eine deutlich kürzere Reaktionszeit ermöglicht, um auf Schwankungen in der Zellzahl reagieren zu können. So vergehen – zwischen den beiden offline-Messpunkten bei etwa 150 h nach Prozessbeginn – über 6 h bis die drastische Abnahme der Zellzahl bemerkt werden kann. In der Zwischenzeit lieferte das eingesetzte Sensorsystem mit der Streulicht-Messzelle kontinuierlich Daten, die auf das schnelle Absinken der Zellzahl hindeuten. Damit ist das Messsystem eine nützliche Ergänzung, um die Durchführung komplexer Prozesse zu erleichtern und automatisierte Regelungssysteme zu entwickeln.

## 8. Online-Überwachung der Biomasse für Hochzelldichte-Verfahren

Das Sensorsystem konnte seine Eignung zur online-Überwachung von tierischen Zellkulturen beweisen. Die hohen Anforderungen an Sterilität, Messgenauigkeit und Langzeitstabilität wurden dabei erfüllt. Weiterhin war der Dynamikumfang der NIR-Streulicht-Messzelle ausreichend, um alle Trübungsintensitäten, die im Laufe einer Kultivierung auftreten, erfassen zu können. Bei der Kultivierung von Mikroorganismen werden allerdings deutlich höhere Trübungsintensitäten erreicht, als dies bei tierischen Zellkulturen der Fall ist. Um das Sensorsystem auch bei sehr hohen Trübungen zu erproben, wurde eine Hochzelldichte-Kultivierung mit *Komagataella phaffii* durchgeführt.

### 8.1. Fed-Batch-Kultivierung von *Komagataella phaffii* im 30 l Edelstahlreaktor

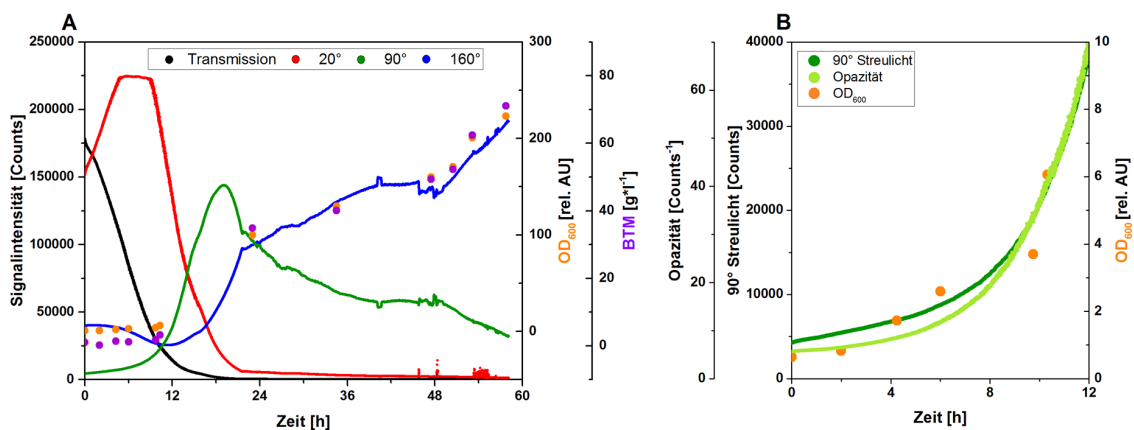
Der Prozess wird als fed-batch-Kultivierung in einem 30 l Edelstahlreaktor durchgeführt und dient der Produktion eines gelatinemimetischen Proteins (GelMP). Dieses basiert auf der Alpha-Kette des humanen Kollagen I und steht unter der Kontrolle des Promoters der Methanol-induzierbaren Alkoholoxidase. Daher gliedert sich der Prozess in eine batch-Phase und eine anschließende Produktionsphase, die durch die Zufütterung von Methanol gestartet wird. Für die batch-Phase werden 10 l Medium im Reaktor vorgelegt, welches mit den Zellen einer Vorkultur angeimpft wird. Während dieser Phase nutzen die Zellen Glycerol als Kohlenstoff- und Energiequelle. Der batch-Prozess endet mit Verbrauch des vorgelegten Glycerols.

Die NIR-Streulicht-Messzelle ist während des gesamten Prozesses über einen Bypass am Bioreaktor angeschlossen. Eine Peristaltikpumpe sorgt für einen kontinuierlichen Volumenstrom. Die Einflüsse auf das Zellwachstum können aufgrund des Verhältnisses zwischen Bioreaktor- und Bypassvolumen, sowie der hohen Wachstumsrate und Toleranz gegenüber mechanischem Scherstress der Zellen, vernachlässigt werden. Als Referenz zu den Streulichtmessungen wurden durch Probenentnahme und offline-Messung sowohl die Biotrockenmasse (BTM) als auch die optische Dichte bei 600 nm

( $OD_{600}$ ) bestimmt. Diese haben sich als Methoden zur Überwachung der Biomasse während einer Kultivierung etabliert und stellen somit eine gute Vergleichsmessung für das Sensorsystem dar.

Die Gegenüberstellung der Sensordaten mit den offline-Analysen ist in Abbildung 8.1 A dargestellt. Für das Sensorsystem wurden die Streulichtintensitäten der verschiedenen Detektionswinkel abgebildet, deren Verläufe sich deutlich voneinander unterscheiden. Die Transmission verhält sich, wie erwartet, gegenläufig zur steigenden Zelldichte. Die Signalintensität sinkt, bis sie schließlich aufgrund zu hoher Trübung nicht mehr messbar ist. Sie ist demnach nicht geeignet zur Überwachung von hohen Trübungen. Gleiches gilt für Streulicht, welches im  $20^\circ$  Winkel detektiert wird. Ähnlich wie die Transmissionsmessung zeigt das Signal für niedrige Zelldichten eine hohe Sensitivität, steigt jedoch – anders als die Transmission – zunächst mit zunehmender Zelldichte an. Im weiteren Verlauf wird ein Intensitätsmaximum erreicht, welches bereits in Abschnitt 7.2 beobachtet werden konnte. Die Sättigung des Detektors könnte durch Einstellen einer niedrigeren LED-Intensität behoben werden. Für weiter ansteigende Zelldichten verläuft die Signalantwort des  $20^\circ$  Streulichts analog zur Transmission und sinkt bis auf einen Wert nahe Null ab.

Das Ende der batch-Phase (bei etwa 20 h) lässt sich im  $90^\circ$  und  $160^\circ$  Messkanal klar anhand einer deutlichen Änderung im Signalverlauf erkennen. Die Messungen des  $90^\circ$



**Abbildung 8.1.:** Streulichtmessungen mit der NIR-Streulicht-Messzelle während einer fed-batch-Kultivierung mit *Komagataella phaffii*. Als Referenzmessungen wurde zu bestimmten Zeitpunkten die  $OD_{600}$  und die BTM bestimmt. Dargestellt sind die vier Streulichtmesskanäle mit Referenzmessungen über den gesamten Kultivierungszeitraum (A), sowie ausgewählte Kanäle zusammen mit der optischen Dichte in den ersten 12 h nach Prozessbeginn (B).



Streulichts und des Rückstreulichts ( $160^\circ$ ) sind weitaus weniger sensitiv und zeigen folglich geringere Signaländerungen im Bereich niedriger Trübungen. Im  $90^\circ$  Detektionswinkel zeigt sich ebenfalls ein Intensitätsmaximum. Dieses tritt jedoch erst bei höheren Zelldichten auf und erreicht nicht das Detektionslimit des Sensors. Weiterhin ist das Signal auch bei hohen Zelldichten am Ende der Kultivierung noch messbar, sinkt jedoch hier mit steigender Zelldichte wieder ab. Der  $90^\circ$  Detektionswinkel besitzt damit einen deutlich höheren Dynamikumfang als die beiden zuvor genannten Detektionswinkel. Eine einfache Überwachung der Biomasse ist jedoch aufgrund der wechselnden Signalantwort, mit zunächst steigenden und anschließend sinkenden Werten, erschwert.

Einzig die Messung des Rückstreulichts bildet den Verlauf der Biomasse auch bei hohen Zelldichten korrekt ab. Dabei verlaufen sowohl die offline bestimmten Werte der  $OD_{600}$ , als auch der Biotrockenmasse nahezu deckungsgleich mit der Intensität des Rückstreulichts. Das gilt auch für die hohen Trübungen, die am Ende der Kultivierungen auftreten. Hier konnte eine  $OD_{600}$  von deutlich über 200 AU festgestellt werden. Im Gegensatz zur Referenzmessung mit einer konventionellen Küvette, muss die Probe bei der Messung mit dem Sensor nicht verdünnt werden. Das ist ein deutlicher Vorteil und zeigt, dass das Sensorsystem auch zur Überwachung von Hochzelldichte-Kultivierungen eingesetzt werden kann. Die Detektion noch höherer Zelldichten erscheint möglich, sollte aber weiter untersucht werden. Limitiert wird die Detektion vor allem durch die Sättigungsgrenze der jeweiligen Photodiode. Da es sich um eine Reflexionsmessung handelt, ist ein im weiteren Verlauf wieder absinkendes Signal nicht wahrscheinlich. Vielmehr wird ab einer gewissen Zelldichte die Eindringtiefe des eingestrahnten Lichts so gering werden, dass von einer Grenzflächenmessung gesprochen werden kann. Das Sensorsignal wird sich folglich einer Sättigungsgrenze annähern, ab welcher eine Zunahme der Trübung nicht mehr detektiert werden kann.

Für die Überwachung im niedrigen Trübungsbereich eignet sich das Rückstreulicht nicht. Die Detektion ist im Vergleich zu den anderen Kanälen wenig sensitiv. Das kurzzeitige Absinken des Signals könnte auf eine Änderung der Viskosität des Mediums bei steigenden Zelldichten zurückzuführen sein. Die Änderung der Viskosität hat Einfluss auf den Brechungsindex an der Grenzfläche vom Fenster zum Medium und beeinflusst damit die Reflexion des eingestrahnten Lichts am Fenster, welches vom Detektor des Rückstreulichts aufgenommen wird. Wie jedoch bereits zuvor gezeigt werden konnte, stellt die aus der Transmissionsmessung berechnete Opazität eine gute Methode zur Überwachung niedriger Zelldichten dar. Daher wurde diese zusammen mit der

optischen Dichte bei 600 nm aufgetragen (Abbildung 8.1 B). Die Grafik zeigt den Zeitabschnitt bis 12 h nach Prozessbeginn. Zusätzlich wurde auch die Signalintensität des 90° Streulichts aufgetragen. Beide Messungen sind in der Lage die Änderungen bei niedrigen Trübungen gut wiederzugeben und ähneln sich im dargestellten Zeitabschnitt sehr stark. Das 20° Streulicht zeigt eine ebenfalls gute Sensitivität, wurde jedoch aufgrund der frühen Sättigung des Signals nicht für weitere Vergleiche herangezogen. Insgesamt ermöglicht die NIR-Streulichtmesszelle mit den vier Messkanälen eine zuverlässige Überwachung über einen weiten Trübungsbereich und ist dabei nicht auf Verdünnung oder anderweitige Probenvorbereitungen angewiesen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Messung von optischen Dichten, welche im Bereich von 200 AU liegen. Damit ist ein wichtiges Kriterium gegeben, um den Sensor für ein breites Spektrum an Prozessen im Bereich mikrobiologischer Kultivierungen einsetzen zu können.

# 9. UV/VIS-Spektroskopie zur Qualitätskontrolle im Aufreinigungsprozess eines monoklonalen Antikörpers

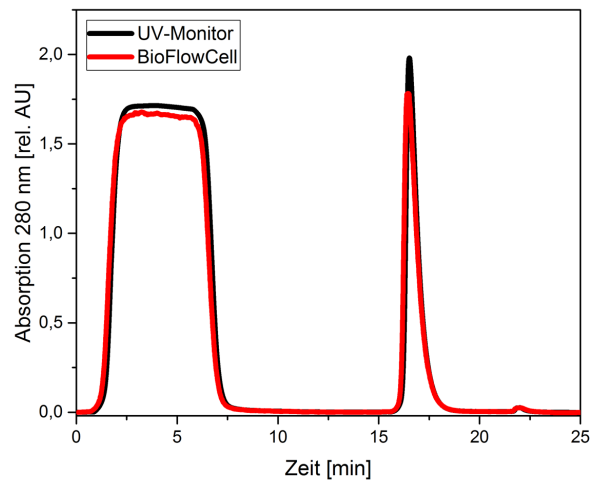
Die bisherigen Einsätze des Sensors beschränkten sich auf den Upstream-Teil einer vollständigen Bioprozesskette. Dabei konnte insbesondere die NIR-Streulicht-Messzelle zur Überwachung des Zellwachstums genutzt werden. Messzellen zur Messung der Absorption waren aufgrund der Komplexität und hohen Absorptionseigenschaften der zu messenden Proben nur eingeschränkt nutzbar. Im Zuge der Herstellung eines biopharmazeutischen Produkts wird der Aufreinigung und damit dem Downstream-Bereich allerdings ebenfalls große Bedeutung zugeschrieben. Im Zuge der verschiedenen Aufreinigungsschritte müssen verschiedene Komponenten entfernt werden, um die Reinheit des jeweiligen Produkts zu verbessern. Spektroskopische Verfahren wie die UV/VIS-Spektroskopie zeichnen sich durch ihre hohe Sensitivität und die Fähigkeit der simultanen Detektion mehrerer Analyten aus. Sie besitzen damit optimale Voraussetzungen, um den Aufreinigungsprozess zu dokumentieren und zu überwachen. Durch die Abtrennung der Biomasse nach der Kultivierung, wird die spektroskopische Analyse der Proben bereits deutlich vereinfacht. Beispielsweise wird die Identifikation einzelner Komponenten anhand von Absorptionsspektren möglich. In den folgenden Abschnitten wird die Einweg-Absorptionsmesszelle daher zur Überwachung verschiedener Abschnitte im Aufreinigungsprozess eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt.

## 9.1. Überwachung des Capture-Schritts

Der erste Schritt der chromatographischen Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers ist der Capture-Schritt. In der Regel wird hierbei auf eine Protein A Affinitätschromatographie zurückgegriffen. Dabei werden die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Immunglobulinen und immobilisiertem, rekombinantem Protein A ausgenutzt. Beim Auftragen der Probe auf die Chromatographiesäule binden die Antikörper an

das Säulenmaterial. Alle anderen ungebundenen Bestandteile werden in einem nachfolgenden Waschschrift von der Säule gespült. Dazu zählen unter anderem *host cell proteins* (HCPs), also zelleigene Proteine. Der gebundene Antikörper wird anschließend durch einen Puffer mit niedrigem pH-Wert eluiert. Die hohe Spezifität der Bindung zwischen Protein A und Antikörper stellt dabei sicher, dass der Antikörper in der Elutionsfraktion in deutlich erhöhter Reinheit vorliegt. Der Verlauf einer Chromatographie wird in der Regel bereits mithilfe von Durchflussmesszellen spektroskopisch überwacht. Diese sind meist fest in das Chromatographiesystem integriert und wiederverwendbar. Die integrierten Systeme zeichnen dabei die Absorption bei 280 nm auf. Diese Wellenlänge eignet sich gut zur Detektion von Antikörpern, da diese als Proteine eine starke Absorption in diesem Wellenlängenbereich aufweisen. Um die Eignung des Sensorsystems zur Überwachung chromatographischer Systeme zu überprüfen, wurde eine Absorptionsmesszelle in den Probenstrom einer *fast protein liquid chromatography* (FPLC-)Anlage integriert und die Absorption bei 280 nm während einer Protein A Chromatographie aufgezeichnet. Der Anschluss erfolgt dabei über gebräuchliche Schläuche aus Polyetherketon (PEEK) mit 0,5 mm ID und 1/16" AD. Somit sind keine weiteren Änderungen am System nötig und ein Anschluss der Messzelle ist jederzeit möglich. Die Messzelle besitzt eine exakte Pfadlänge von 1,19 mm und wird zusammen mit einem faseroptischen Spektrometer betrieben.

Die Gegenüberstellung der Absorptionswerte der entwickelten Einweg-Messzelle (Bio-FlowCell) mit den Daten des integrierten Systems (UV-Monitor) zeigt Abbildung 9.1. Die Absorptionswerte der Zellen wurden dabei normiert, um die unterschiedlichen Pfadlängen auszugleichen. Für die Chromatographie wurde der Überstand einer Kultivierung mit dem zuvor genannten CHO-DG44-Stamm verwendet. Der erste Peak bildet den Waschschrift und somit die Absorption unerwünschter Bestandteile ab, die nicht an die Säule gebunden haben. Im darauffolgenden Peak lässt sich die Elutionsfraktion beobachten, die zum Großteil aus dem monoklonalen Antikörper besteht. Der Vergleich beider Systeme zeigt keine qualitativen Unterschiede im Verlauf der Absorptionswerte. Beide Peaks werden erfolgreich vom entwickelten Sensorsystem erfasst. Die verwendete Einweg-Messzelle verursacht dabei keine sichtbare Verzerrung der Peakform. Lediglich die Peakhöhen unterscheiden sich leicht voneinander. So wäre bei vorhandenen Totzonen innerhalb der Messkammer oder anderen fluidodynamischen Effekten ein flacherer Anstieg (*fronting*) oder ein verzögertes Absinken (*tailing*) der Absorption sichtbar geworden. Dies würde das Auffangen der verschiedenen Fraktionen und damit die weitere Verwendung des aufgereinigten Antikörpers erschweren,



**Abbildung 9.1.:** Verlauf der normierten Absorption bei 280 nm während des Capture-Schrittes zur Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers. Dargestellt ist die Messung mit einem integrierten System (UV-Monitor) und der entwickelten Einweg-Absorptionsmesszelle (BioFlowCell).

**Tabelle 9.1.:** Analyse der Peakflächen der zur Überwachung des Capture-Schritts verwendeten Sensoren.

Peaknummer	UV-Monitor		BioFlowCell	
	max. Abs. [AU]	Fläche [%]	max. Abs. [AU]	Fläche [%]
1	1,71	85,48	1,68	84,33
2	1,98	14,43	1,78	15,66

sowie Zeit- und Pufferbedarf erhöhen.

Eine Analyse der Peakflächen zeigt, dass die Abweichung zwischen beiden Systemen knapp über 1 % liegt (Tabelle 9.1). Diese Abweichung kann durch Ungenauigkeiten in der Bestimmung der exakten Pfadlänge der Einweg-Messzelle bedingt sein. Ein dadurch möglicherweise fehlerhafter Korrekturfaktor erschwert den Vergleich beider Messungen. Darüber hinaus sind die Absorptionswerte direkt abhängig von der zu Beginn erfolgten Referenzmessung, welche beide Systeme unabhängig voneinander durchführen. Diese Referenzmessung dient als Nullwert und wird zusammen mit

den späteren Messwerten zur Berechnung der jeweiligen Absorption verwendet. Abschließend kann jedoch festgehalten werden, dass das entwickelte Sensorsystem eine geeignete Alternative zum integrierten System bietet. Die kostengünstig hergestellte Einweg-Absorptionsmesszelle stellt damit eine qualitativ gleichwertige Methode zur Überwachung eines chromatographischen Aufreinigungsprozesses dar.

## **9.2. Anionenaustauschchromatographie zur Abtrennung von Nukleinsäuren**

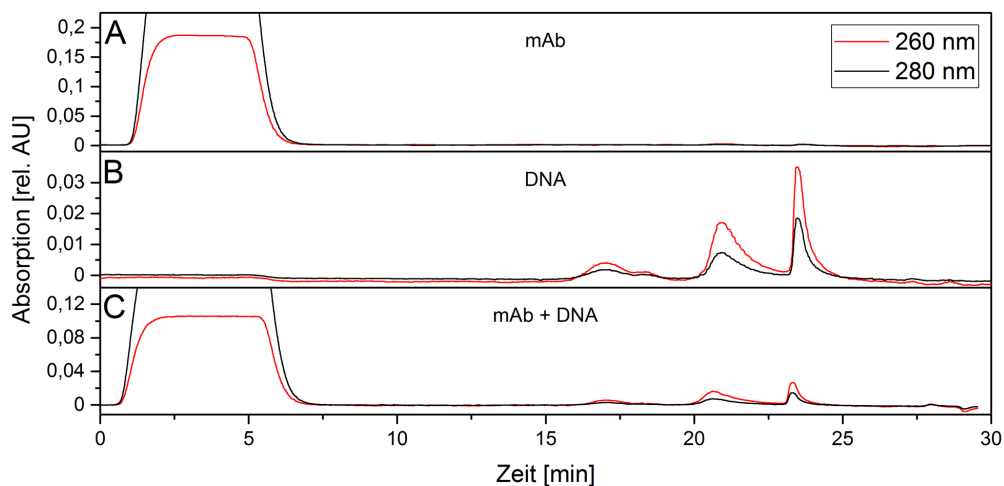
Nach Beendigung des Capture-Schritts folgen in der Regel weitere chromatographische Verfahren. Diese werden als Polishing-Schritte bezeichnet und haben das Ziel, die Reinheit des monoklonalen Antikörpers weiter zu steigern. Mithilfe einer Anionenaustauschchromatographie (AEX) lassen sich beispielsweise Nukleinsäuren aus der Produktlösung entfernen. Im Fall von sekretierten Proteinen kann zwar ein Großteil der Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) bereits während der Zentrifugation zusammen mit den intakten Zellen abgetrennt werden. Dennoch können sich Restbestandteile lysierter Zellen im Überstand befinden, die im Zuge der Aufreinigung entfernt werden müssen. Im Fall von intrazellulären Proteinen, müssen die Zellen ohnehin aufgeschlossen werden. Dabei gehen die Nukleinsäuren ins Medium über und lassen sich nicht mehr durch Zentrifugation entfernen. Der Capture-Schritt entfernt nur einen Teil der Nukleinsäuren im Zuge des Waschvorgangs, eine nachfolgende AEX trennt die verbliebenen Nukleinsäuren gezielt ab.

Die Kontrolle der erfolgreichen Abtrennung der Nukleinsäuren ist mit einem konventionellen UV-Detektor nur bedingt möglich, da in der Regel lediglich die Absorption bei 280 nm gemessen wird. Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum allerdings bei 260 nm und lassen sich somit spektroskopisch von Proteinen unterscheiden. Das entwickelte Sensorsystem ist in der Lage die Absorption verschiedener Wellenlängen zu ermitteln und sollte somit auch in der Lage sein diesen Polishing-Schritt zu überwachen. Analog zum Capture-Schritt soll daher die Abtrennung von Nukleinsäuren während einer AEX mit dem Sensorsystem überwacht werden.

Bei der AEX folgt, nach der Auftragung der Probe auf die Säule, ein Waschvorgang, welcher ungebundene Komponenten wie den Antikörper von der Säule spült (Flow-Through). Negativ geladene Substanzen wie Nukleinsäuren binden an die Säule und werden erst im weiteren Verlauf durch Anlegen eines Salzgradienten von der Säule

le eluiert. Um zu ermitteln, wie Nukleinsäuren von der Säule eluieren, wurden drei verschiedene Proben chromatographisch in einem AEX-Durchgang aufgetrennt und mithilfe der Einweg-Absorptionsmesszelle analysiert. Abbildung 9.2 zeigt die Chromatogramme der verschiedenen Proben. Die ersten beiden Proben enthalten jeweils entweder aufgereinigten Antikörper oder DNA. Eine weitere Probe enthält beide Komponenten. Ein Vergleich der verschiedenen Chromatogramme macht deutlich, dass der Antikörper direkt zu Beginn ohne signifikante Wechselwirkung mit der Säule detektiert wird (A). Dies ist erkennbar an dem Auftragungspeak direkt zu Beginn des Versuchs. Im weiteren Verlauf können bei dieser Probe keine weiteren Stoffe detektiert werden. Eventuell vorhandene DNA eluiert erst deutlich später durch Anlegen des Salzgradienten von der Säule. Diese Beobachtung zeigt sich bei der Probe, welche lediglich DNA enthält (B). Hier lassen sich drei Peaks erkennen, die zum Ende der Chromatographie eluieren. Der zuvor beobachtete Auftragungspeak ist hier nicht vorhanden. Das Chromatogramm der Probe mit beiden Komponenten zeigt alle zuvor beschriebenen Peaks.

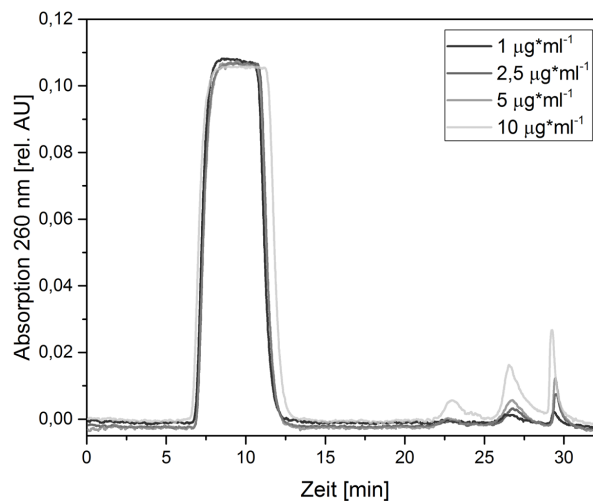
Die Auftrennung lässt sich anhand der beiden dargestellten Wellenlängen erkennen. Während des Auftragungspeaks, welcher vor allem durch den Antikörper verursacht wird, dominiert die Absorption bei 280 nm. Für die späteren Peaks in der Elutionsphase zeigt sich hingegen eine höhere Absorption bei 260 nm. Hier sind also vor allem



**Abbildung 9.2.: Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographie.** Die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm wurden mit der Einweg-Absorptionsmesszelle und einem faseroptischen Spektrometer aufgenommen. Dargestellt sind verschiedene zusammengesetzte Proben: aufgereinigter Antikörper (A), aufgereinigte DNA (B) sowie eine Mischung aus Antikörper und DNA.

Nukleinsäuren verantwortlich für die Absorption. Die parallele Detektion beider Wellenlängen erlaubt folglich die Auftrennung von Antikörper und Nukleinsäuren zu detektieren. Gegenüber Sensoren, welche die Absorption lediglich bei 280 nm erfassen, ergibt sich eine höhere Sensitivität für die Detektion von Nukleinsäuren. Darüber hinaus lassen sich beide Komponenten anhand der unterschiedlichen Absorptionsmaxima eindeutig voneinander unterscheiden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Signalantwort auch eine Quantifizierung der enthaltenen Nukleinsäuren ermöglicht. Dazu wurde eine Antikörper-Lösung mit verschiedenen Mengen an Nukleinsäuren versetzt. Durch dieses Spiking-Experiment können Proben mit unterschiedlich starken Verunreinigungen simuliert werden. Dabei soll untersucht werden, ob das Sensorsystem diese Verunreinigung detektieren kann und weiterhin eine quantitative Aussage über den Grad der Verunreinigung möglich ist. Die Chromatogramme der verschiedenen Proben sind in Abbildung 9.3 dargestellt. Die einzigen Unterschiede sind in den drei Peaks während der Elutionsphase zu erkennen. Der Auftragungspeak am Anfang des Prozesses wird durch die unterschiedlichen Mengen DNA nicht beeinflusst. Dadurch wird die vorherige Annahme bestätigt, dass Nukleinsäuren am Ende des Prozesses durch Anlegen des Salzgradienten eluieren. Anhand der dargestellten Chromatogramme wird



**Abbildung 9.3.: Spiking-Experiment mit verschiedenen DNA-Konzentrationen.** Dargestellt sind die Chromatogramme verschiedener AEX Durchläufe. Die Absorption bei 260 nm wurde mit der Einweg-Absorptionsmesszelle und einem faseroptischen Spektrometer aufgenommen. Die aufgetragenen Proben unterscheiden sich nur in der Menge an enthaltener DNA.



ebenfalls deutlich, dass die Peakhöhe während der Elution mit zunehmender DNA-Konzentration größer wird. Zur Untersuchung der Korrelation zwischen Sensorsignal und DNA-Konzentration werden die Peakflächen berechnet und gegen die enthaltene Konzentration von Nukleinsäuren aufgetragen (Abbildung 9.4). Dabei wird eine Korrelation beider Größen ersichtlich. Eine ebenfalls durchgeführte Regressionsanalyse zeigt einen linearen Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,994.

Das Sensorsystem mit Einweg-Absorptionsmesszelle ist damit geeignet zur Überwachung der Abtrennung von Nukleinsäuren mittels AEX. Im Gegensatz zu bestehenden Systemen, die lediglich mit einer Wellenlänge arbeiten, ist mit der entwickelten Messzelle eine Unterscheidung zwischen Nukleinsäuren und Proteinen möglich. Die Messung kann folglich eine erfolgreiche Abtrennung der Nukleinsäuren während des Prozesses nachweisen. Weiterhin ist auch die Quantifizierung der abgetrennten Nukleinsäuren anhand der Messdaten möglich. Somit kann ohne weitere Analytik die Effizienz der Chromatographie überprüft werden.

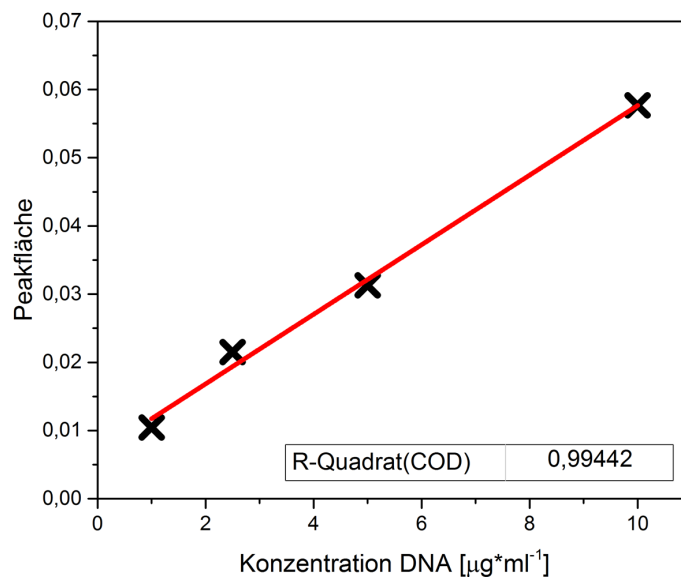


Abbildung 9.4.: Auftragung der Peakflächen während der Elutionsphase gegen die jeweilige Konzentration an DNA in der Probe.

### 9.3. Detektion von Antikörper-Aggregaten

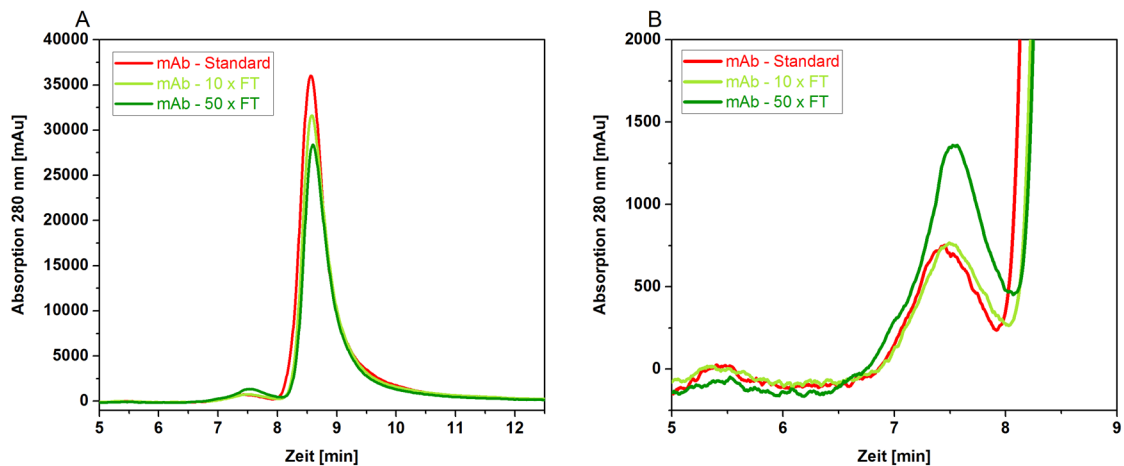
Neben prozessbedingten Verunreinigungen wie Proteinen und Nukleinsäuren, müssen im Zuge des Aufreinigungsprozesses auch produktbedingte Verunreinigungen entfernt werden. Im Fall des monoklonalen Antikörpers gehören vor allem Antikörperfragmente und -aggregate zu dieser Gruppe. Eine Verunreinigung mit Aggregaten ist bei einer späteren therapeutischen Verwendung des Antikörpers nicht erwünscht, da hierdurch unerwünschte Immunreaktionen verursacht werden können. Ebenfalls könnte die Aktivität aggregierter Antikörper verringert sein. Der Aggregatanteil des Produkts ist somit ein wichtiges Qualitätsmerkmal und die Bestimmung Teil der abschließenden Qualitätskontrolle. Sie können nicht nur während des Upstream-Prozesses aufgrund fehlerhafter Proteinfaltung entstehen. Auch der niedrige pH-Wert während der Protein A Elution kann eine Aggregation des Antikörpers induzieren. Darüber hinaus schließen sich häufig Verfahren zur Virusinaktivierung an, welche bei niedrigem pH-Wert stattfinden.

Aggregate lassen sich beispielsweise mithilfe einer Hydrophoben-Interaktionschromatographie (HIC) oder einer Kationenaustauschchromatographie (CEX) entfernen. Für größere Probenmengen wird in der Regel eine CEX verwendet, welche zwischen dem Capture-Schritt und der AEX durchgeführt wird. Die CEX wird im Bind-and-Elute-Modus betrieben und trennt nach Molekülladung auf. Da lediglich positiv geladene Moleküle an die Säule binden wird der Prozess bei einem pH Wert unterhalb des isoelektrischen Punkts des Zielproteins (mAb) durchgeführt. Moleküle mit schwächeren Wechselwirkungen als der Antikörper werden während des Waschschriffs von der Säule gewaschen. Aggregate besitzen häufig eine höhere Ladung als das Monomer und binden daher stärker an die Säule. Durch Anlegen eines Salzgradienten werden anschließend zunächst Moleküle mit schwächerer Ladung verdrängt. Folglich eluiert zunächst das Monomer, während die Aggregate auf der Säule verbleiben.

Die Bestimmung des Aggregatanteils des Produkts wird anschließend mittels HPLC-SEC vorgenommen. Die enthaltenen Komponenten werden der Größe nach aufgetrennt, sodass sich bei Vorhandensein von Aggregaten neben dem Peak für das Monomer ein zusätzlicher Peak im Chromatogramm zeigt. Dieser ist zeitlich vor dem Monomer-Peak des Antikörpers zu sehen. Über die ermittelten Peakflächen lässt sich schließlich der Anteil an Aggregaten bestimmen. Weiterhin können Antikörperaggregate auch spektroskopisch über die Aufnahme von Absorptionsspektren detektiert werden. Dieses Verfahren ist schneller und erfordert weniger Probenvorbereitung als eine

HPLC-SEC. Mithilfe der entwickelten Einweg-Absorptionsmesszelle können ebenfalls Absorptionsspektren aufgenommen werden. Somit könnte das Sensorsystem die erfolgreiche Abtrennung von Aggregaten in der zuvor beschriebenen CEX erfassen. Die Produktqualität könnte so ohne zusätzliche Analytik bestimmt werden.

Um die erfolgreiche Detektion von Aggregaten zweifelsfrei nachweisen zu können, werden verschiedene Proben mit unterschiedlichen Aggregatanteilen mit der Messzelle und der HPLC-SEC analysiert. Die HPLC-SEC dient dabei als Referenzmessung. Zur Herstellung der Proben muss zunächst eine Methode zur reproduzierbaren Bildung von Aggregaten etabliert werden. Bei Voruntersuchungen wurde der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Aggregatbildung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Antikörperlösungen zu einer vermehrten Aggregatbildung führen. Daher wurden, ausgehend von einer Antikörper-Stammlösung, verschiedene Proben nach diesem Verfahren hergestellt. Diese unterscheiden sich in der Anzahl von Gefriervorgängen (Zyklen). Ein Zyklus besteht dabei aus dem Einfrieren und anschließendem Auftauen einer Probe. Die verschiedenen Proben wurden nachfolgend mittels HPLC-SEC auf ihren Aggregatanteil untersucht. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Abbildung 9.5 dargestellt. Zu sehen ist die Stammlösung sowie zwei Proben mit jeweils 10 bzw. 50 Zyklen. Für alle Proben ist ein klarer Monomer-Peak bei einer Retentionszeit von 8,5 min erkennbar. Die Peakhöhe nimmt dabei mit steigender Anzahl an Zyklen ab. Ebenso lässt sich ein kleiner



**Abbildung 9.5.: Chromatogramme der HPLC-SEC.** Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm über die Zeit. Gemessen wurden Proben mit unterschiedlicher Anzahl an Gefrier- und Auftauvorgängen, sowie eine Standard-Probe. Ganzes Chromatogramm (A), Ausschnitt des Aggregat-Peaks (B).

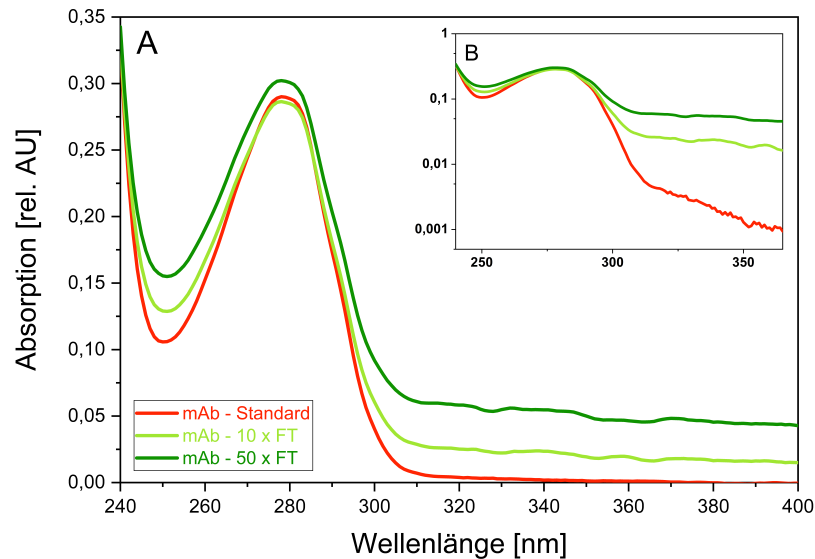
vorgelagerter Peak beobachten, der auf Aggregate zurückzuführen ist. Dieser ist insbesondere bei 50 Zyklen deutlich ausgeprägter als in der Standard-Probe. Mit zunehmender Zyklusanzahl verschiebt sich demnach die Intensität des Monomer-Peaks hin zum Aggregat-Peak. Die Analyse der Peakflächen und -höhen zeigt einen Aggregatanteil von 2,17 % bis zu 5,51 % (Tabelle 9.2). Weiterhin lässt sich auch ein klarer Zusammenhang zwischen Zyklusanzahl und Aggregatanteil erkennen. Jede Steigerung der Zyklusanzahl führt zu einer sukzessiven Zunahme an Aggregaten.

**Tabelle 9.2.:** Analyse der Peakflächen und -höhen der HPLC-SEC Chromatogramme. Proben sind nach aufsteigender Anzahl an Einfrier- und Auftauvorgängen (x FT) geordnet.

	Aggregat		Monomer	
	Fläche [%]	Höhe [%]	Fläche [%]	Höhe [%]
<b>Standard</b>	2,17	2,14	97,83	97,86
<b>10 x FT</b>	2,54	2,37	97,46	97,63
<b>15 x FT</b>	2,88	2,61	97,12	97,39
<b>30 x FT</b>	4,23	3,88	95,77	96,12
<b>40 x FT</b>	5,46	4,65	94,54	95,35
<b>50 x FT</b>	5,51	4,77	94,49	95,23

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich mit diesem Verfahren gezielt Aggregate bilden lassen. Daher soll nun anhand dieser Proben, der Einfluss von Aggregaten auf das Absorptionsspektrum einer Antikörperlösung untersucht werden. Lassen sich hier charakteristische Veränderungen erkennen, ist eine optische Detektion möglich. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurden die Proben in eine Einweg-Absorptionsschmelzelle gepumpt und mithilfe des faseroptischen Spektrometers analysiert. Die Absorptionsspektren für einen Teil der Proben sind in Abbildung 9.6 dargestellt. Hier zeigt sich zunächst der charakteristische Absorptionsverlauf für Proteine. Alle Proben besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Absorptionswert im Maximum unterscheidet sich dabei nur minimal zwischen den verschiedenen Proben. Signifikante Veränderungen lassen sich im Wellenlängenbereich über 300 nm erkennen. Während die unbehandelte Standard-Probe in diesem Bereich kaum messbare Absorption aufweist, besitzen die behandelten Proben eine deutlich erhöhte Absorp-

tion. Diese ist im Fall von 50 Zyklen nochmals ausgeprägter als bei 10 Zyklen. Durch halblogarithmische Auftragung lassen sich diese Unterschiede weiter verdeutlichen (Abbildung 9.6 B). Da reine Proteinproben im Bereich über 320 nm keine Absorption zeigen und eine Verunreinigung anhand der Standard-Probe ausgeschlossen werden kann, lässt sich diese Absorptionszunahme der Streuung an Aggregatpartikeln zuordnen.



**Abbildung 9.6.: Aufnahme von Absorptionsspektren zur Detektion von Antikörper-Aggregaten.** Absorptionsspektren der Proben mit unterschiedlicher Anzahl an Gefrier- und Auftauvorgängen, sowie einer Standard-Probe (A). Halblogarithmische Auftragung der Spektren (B). Die Spektren wurden mit der Einweg-Absorptionsmesszelle und einem faseroptischen Spektrometer aufgenommen.

Eine weitere Methode zur Charakterisierung von Antikörperproben auf Basis von Absorptionsmessungen bietet die Berechnung des Aggregationsindex (Abschnitt 12.7.6). Dieser zieht die Absorptionswerte bei 280 nm und 350 nm heran und berechnet daraus ein Verhältnis, welches den Anteil an Aggregaten in einer Probe widerspiegelt. Anhand der aufgenommenen Absorptionsspektren wurde der Aggregationsindex für die analysierten Proben berechnet (Tabelle 9.3). Die berechneten Werte bestätigen die Detektion von Aggregaten mithilfe des Sensorsystems. Dabei ist nicht nur eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Aggregaten möglich. Vielmehr lässt sich die vermehrte Bildung von Aggregaten bei wachsender Zyklusanzahl auch anhand des Aggregationsindex erkennen. Das Sensorsystem stellt damit eine verlässliche Alternative zur Qualitätskontrolle von Antikörperlösungen dar. Die optische Messung

*KAPITEL 9. UV/VIS-SPEKTROSKOPIE ZUR QUALITÄTSKONTROLLE IM  
AUFREINIGUNGSPROZESS EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS*

---

mit der Einweg-Messzelle ist schnell, zerstörungsfrei und benötigt wenig Probenvolumen. Weiterhin kann die Aufnahme der Absorptionsspektren auch inline während des Aufreinigungsprozesses stattfinden. Das Sensorsystem ermöglicht somit eine lückenlose Qualitätsüberwachung ohne die Notwendigkeit einer Probenentnahme und kann damit auch für kontinuierliche Aufreinigungsprozesse eingesetzt werden.

**Tabelle 9.3.:** Berechnung der Aggregationsindizes, basierend auf den mit dem Sensorsystem ermittelten Absorptionswerten.

	Abs. 280 nm	Abs. 350 nm	Aggregationsindex
<b>Standard</b>	0,286	0,001	0,21
<b>10 x FT</b>	0,284	0,02	7,59
<b>15 x FT</b>	0,304	0,024	8,66
<b>30 x FT</b>	0,313	0,052	20,06
<b>40 x FT</b>	0,305	0,047	18,34
<b>50 x FT</b>	0,298	0,05	20,31

# 10. Zusammenfassung und Ausblick

Die Arbeit beschreibt das Konzept einer Einweg-Durchflussmesszelle zur spektroskopischen Bioprozessüberwachung. Mit den entwickelten Prototypen und den daraus resultierenden Funktionsmustern wurde zunächst die Validierung der gewählten Messmethode durchgeführt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedenste Applikationen im Up- und Downstream-Bereich untersucht. Der Sensor konnte erfolgreich zur Überwachung von tierischen Zellkultivierungen an verschiedensten Reaktorsystemen eingesetzt werden. Auch eine Hochzelldichte-Kultivierung mit einem Hefestamm wurde in diesem Zusammenhang durchgeführt. Zentrale Erkenntnis war hierbei die präzise Überwachung der Biomasse mit großem Dynamikbereich. Nachfolgend wurden weitere Anwendungsmöglichkeiten des Sensors im Bereich der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers gezeigt. Hier zeigte sich großes Potential, weshalb sich zukünftige Arbeiten speziell mit der Etablierung des Sensors im Bereich der Qualitätskontrolle im Downstream-Bereich befassen sollten.

Der Sensor ist modular aufgebaut und setzt sich immer aus einer Einweg-Messzelle und einem wiederverwendbarem Messzellenhalter zusammen. Die Messzelle wird im 3D-Druck-Verfahren aus biokompatiblen ABS-Kunststoff gefertigt und besitzt Fenster aus Quarzglas zur Einkopplung von Licht. Dafür stehen optische Schnittstellen zur Verfügung, die es ermöglichen verschiedene Lichtquellen und Detektoren anzuschließen. Die Messzelle ist in zwei verschiedenen Konfigurationen entwickelt worden, um verschiedene Messtechniken zu ermöglichen. Zum einen besteht die Möglichkeit Absorptionmessungen mit Pfadlängen im Bereich von 1,5 mm bis 20 mm durchzuführen. Dabei kann sich die Messung auf ausgewählte Wellenlängen beschränken oder die Aufnahme ganzer Absorptionsspektren mit einem faseroptischen UV/VIS-Spektrometer durchgeführt werden. Eine zweite Messzellen-Konfiguration ist für die Detektion von Streulicht in verschiedenen Winkeln geeignet. Der zugehörige Messzellenhalter beinhaltet die gesamte Messtechnik, welche eine Laserdiode zur Anregung und Photodioden für die verschiedenen Detektionswinkel (Transmission, 20°, 90°, 160°) umfasst. Die Anbindung der Einweg-Messzellen an den jeweiligen Bioprozess erfolgt über das Verschweißen steriler Schlauchverbindungen. Im Zuge des Herstellungsprozesses wird die Messzelle mit versiegelten Schlauchstücken bestückt und abschließend durch Bestrahlung mit Gammastrahlung sterilisiert. Auf diese Weise ist eine einfache Handhabung und Installation ohne die Notwendigkeit einer Sterilbank möglich.

Da die Sterilität der Messzelle für die spätere Anwendung gewährleistet sein muss, wurden verschiedene Sterilisationsmethoden zur Sterilisierung von 3D-Druck Materialien evaluiert. Hinsichtlich Effektivität und Praktikabilität konnte lediglich die Bestrahlung mit Gammastrahlung überzeugen. Weitergehend wurde durch in vitro Zytotoxizitätstests die Biokompatibilität der Materialien überprüft (ISO 10993-5:2009). Nachgewiesene Biokompatibilität und optimale Materialeigenschaften führten letztlich zur Auswahl von ABS als Material für die Fertigung der Messzelle. Auch die optischen Eigenschaften des Fenstermaterials wurden an dieser Stelle untersucht. Voraussetzung für den Einsatz im Sensorsystem war eine insgesamt hohe Transmission im gesamten Messbereich, wobei besonderer Fokus auf dem UV-Bereich lag. Als einziges Material, welches diesen Anspruch auch nach der Bestrahlung mit Gammastrahlung erfüllt, konnte Quarzglas identifiziert werden. Nach erfolgter Materialauswahl konnten erste Funktionsmuster zur Untersuchung des Verweilzeitverhaltens in der Messkammer hergestellt werden. In Messzellen mit kurzen Pfadlängen und dementsprechend kleinem Messkammervolumen, konnte der Tracer bei Aufnahme eines Diracstoßes in kurzer Zeit wieder ausgewaschen werden. Größere Pfadlängen erfordern dafür höhere Volumenströme und sollten daher, ohne weitere Optimierung der Messkammergeometrie, nicht mit Flussraten unter  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  betrieben werden.

Für die Validierung der Messzelle stand die Untersuchung der Fertigungstoleranzen im Mittelpunkt. Mittels Transmissionsmessungen, konnte nachgewiesen werden, dass die Messzellen für Messungen im UV/VIS-Bereich geeignet sind. Darüber hinaus wurden die exakten Pfadlängen verschiedener Messzellen mithilfe von Referenzmessungen bestimmt. Hier zeigten sich lediglich geringe Abweichungen von der angestrebten Pfadlänge, wobei die Präzision mit kürzer werdender Pfadlänge abnimmt. Für Konzentrationsbestimmungen ist es daher ratsam, die Pfadlänge der verwendeten Messzelle exakt zu bestimmen und einen Korrekturfaktor in die Berechnung miteinzubeziehen. Nachfolgende Arbeiten sollten sich jedoch mit einer Optimierung der Herstellungstoleranz für kurze Pfadlängen beschäftigen. Für das Sensorsystem mit LED-Messtechnik konnte eine Linearität bis zu einer Absorption von 3 AU nachgewiesen werden. Große Pfadlängen zeigen eine gute Sensitivität im niedrigen Konzentrationsbereich, erreichen jedoch die Sättigungsgrenze früher als kurze Pfadlängen. Letztere sind somit in der Lage deutlich höhere Konzentrationen linear zu erfassen. Valide Konzentrationsbestimmungen mit Reinstlösungen sind im beschriebenen linearen Messbereich möglich. Darüber hinaus konnte auch die Selektivität der Messmethode mittels PLS-Regression bestätigt werden. Unter Verwendung gesamter Absorptionsspektren lassen sich ein-



zelne Komponenten eines Stoffgemisches quantifizieren.

Nach der erfolgreichen Charakterisierung und Validierung des Sensorsystems wurden verschiedene Kultivierungen mit einer CHO-DG44 Zelllinie durchgeführt. Absorptionsmessungen unterhalb von 300 nm waren jedoch aufgrund der hohen Eigenabsorption des Kulturmediums nicht möglich. Durch die Wahl verschiedener Prozessstrategien und Reaktortypen, wurde allerdings die Vielseitigkeit des Sensors unter Beweis gestellt. So konnte unter anderem eine kontinuierliche Prozessüberwachung am Schüttelkolben realisiert werden. Alle relevanten Sensorkomponenten wurden dabei innerhalb des CO<sub>2</sub>-Inkubators platziert. Allerdings wurde das Zellwachstum durch den kontinuierlichen Betrieb des Bypasses negativ beeinflusst. Für die Anwendung im 10 l Edelstahlreaktor wurden daher Optimierungen am Messaufbau vorgenommen. Größeres Reaktorvolumen und ein scherstressarmes Befüllen des Bypasses mithilfe einer Hubkolbenpumpe vermindern den Einfluss auf das Zellwachstum. Die Aufnahme einer Wachstumskurve war anhand der Daten der NIR-Streulicht-Messzelle über den gesamten Prozesszeitraum möglich. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Sensitivität und des Dynamikbereichs der einzelnen Detektionswinkel. Geringe Trübungen können mit hoher Präzision durch das 20° Streulicht aufgezeichnet werden, wohingegen das 90° Streulicht insbesondere für höhere Trübungen am Prozessende geeignet war. Die aus der Transmission errechnete Opazität bildete die Zellzahl über einen weiten Bereich ebenfalls gut ab, erreichte jedoch bei einer Zellzahl von über 15 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> ein Detektionslimit.

Die Langzeitstabilität der Messung wurde im Zuge eines Perfusionsprozesses bestätigt. Mithilfe der NIR-Streulicht-Messzelle konnten Veränderungen der Zellzahl über einen Zeitraum von 400 h zuverlässig aufgezeichnet werden. Kritische Abweichungen vom angestrebten stationären Zustand können mit dem Sensorsystem deutlich früher erkannt werden als mit parallel durchgeführten offline-Analysen. Um den maximalen Dynamikbereich der Streulichtmessung zu bestimmen, wurde außerdem eine Hochzelldichtekultivierung mit *Komagataella phaffii* überwacht. Hier zeigte sich, dass das Sensorsystem auch zur Messung sehr hoher Trübungen geeignet ist. So wurde durch die Aufzeichnung des Rückstreulichts (160°) das Zellwachstum bis zu einer optischen Dichte von über 200 AU überwacht. Zukünftig bietet sich an dieser Stelle die Entwicklung von Vorhersagemodellen zur Berechnung der Zellzahl oder Biomasse aus den Sensordaten an. Dies kann einen deutlichen Mehrwert in Form einer automatisierten Prozessführung darstellen.

Neben der Anwendung im Upstream wurde der Sensor auch zur Überwachung ver-

schiedener Downstream-Prozesse zur Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt. Zunächst wurde die Aufnahme der Absorption bei 280 nm mit der Einweg-Absorptionsmesszelle im Zuge des Capture-Schritts vorgenommen. Ein integriertes System zur Aufnahme von UV-Absorptionen diente dabei als Referenz. Der Vergleich beider Datensätze zeigte nur minimale Differenzen im Sensorsignal. Messgenauigkeit und fluidische Eigenschaften der Einweg-Messzelle entsprechen denen des konventionellen, wiederverwendbaren Systems. Da die Absorptionsmesszelle sich auch zur parallelen Aufnahme mehrerer Wellenlängen eignet wurde in einem weiteren Experiment die Abtrennung von Nukleinsäuren mittels AEX untersucht. Die zusätzliche Detektion der Absorption bei 260 nm ermöglichte hier die eindeutige Identifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren im Elutionspeak. Damit lassen sich sowohl der Grad der Verunreinigung bemessen als auch die erfolgreiche Abtrennung dokumentieren. Abschließend wurde der Sensor auch zur Charakterisierung von Antikörper-Proben eingesetzt und die Detektion von Antikörper-Aggregaten durch Aufnahme von Absorptionsspektren realisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Trübung einer Probe durch Aggregate erhöht. Daraus resultiert eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsspektrums im Bereich über 300 nm. Die Detektion lässt sich weiter vereinfachen, indem der Aggregationsindex berechnet wird. Dafür ist lediglich eine Bestimmung der Absorption bei 280 nm und 350 nm nötig. Durch weitere Untersuchungen sollte dieses Verfahren auch im direkten Probenstrom des Prozesses umgesetzt werden, um eine online Detektion von Aggregaten zu ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Sensorsystem zur Überwachung unterschiedlicher Bioprozesse geeignet ist. Es bietet vergleichbare Qualitätsmerkmale wie etablierte Systeme und verknüpft diese mit den Vorteilen von Single-Use-Equipment. Die Modularität und einfache Installation ermöglichen dabei eine Kompatibilität des Sensors zu verschiedensten Systemen im Up- und Downstreambereich. Für den Upstream-Bereich ist insbesondere die präzise Überwachung des Zellwachstums mithilfe der NIR-Streulichtmesszelle hervorzuheben. Sie zeichnet sich durch einen großen Dynamikumfang aus, welcher nahezu alle üblichen Prozessstrategien abdeckt. Lediglich der Einfluss auf das Zellwachstum im Fall niedriger Arbeitsvolumina sollte bedacht werden. Weiterhin ermöglicht die Einweg-Absorptionsmesszelle eine umfassende Qualitätskontrolle im Downstream-Bereich. Das System lässt sich leicht in bestehende Chromatographie-Systeme integrieren und erweitert damit die online Analysemöglichkeiten. Es ist daher empfehlenswert die Möglichkeiten zur spektroskopischen Charakterisierung verschiedener Biopharmazeutika weiter auszuschöpfen.

# 11. Chemikalien und Materialien

## 11.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11.1.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories, Österreich
Ammoniumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Biotin	AppliChem GmbH, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
CellTiter-Blue Viability Assay Kit	Promega GmbH, Deutschland
Cobaltchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich-Corporation, USA
Eisen(II)-sulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Merck KGaA, Deutschland
Gentamycin	Merck KGaA, Deutschland
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG
Humanserum	CC-pro, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kupfer(II)-sulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA

Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Magnesiumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Manganchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumhypochlorit	Carl Roth GmbH & Co. KG
Nicotinamadenindinukleotidphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pepton	Carl Roth GmbH & Co. KG
Riboflavin	Sigma-Aldrich-Corporation, USA
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, USA
Salzsäure	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypanblau	Merck KGaA, Deutschland
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zink(II)-chlorid	Merck KGaA, Deutschland

---

## 11.2. Geräte und Materialien

### 11.2.1. Laborausstattung

Tabelle 11.2.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Abgasanalytik BlueInOne Ferm	BlueSens gas sensor GmbH, Deutschland
Ambr 250 Modular	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Autosampler	Institut für Technische Chemie, Hannover [34]
CEDEX HiRes Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
CEDEX Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator HERAccl 240	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Bioreaktor Typ Cplus 10 l	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Bioreaktor Typ Cplus 30 l	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
BioSealer	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Biowelder TC	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluorometer Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
FPLC-System Äkta Pure	GE Healthcare, USA
HPLC-System Hitachi Chromaster	VWR International, USA
LED Photometer LEDSpec	WPI Inc., USA
Magnetrührer	IKA Werke GmbH, Staufen
Mehrfachdispenser Multipette E3	Eppendorf AG, Deutschland
Methanolsensor	Raven Biotech Inc., Kanada
Mikropipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikroplattenlesegerät Cytation 5	BioTek Instruments Inc., USA

Mikroplatten-Spektralphotometer Epoch	BioTek Instruments Inc., USA
Miniaturpumpe MINISTAR	WPI Inc., USA
MJP EasyClean	3D Systems Inc., USA
Neubauer Zählkammer	Assistent, Deutschland
pH-Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
pH-Sonde EasyFerm Plus K8 425	Hamilton Company, USA
Photometer Multiscan Go	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand GmbH, Deutschland
pO <sub>2</sub> -Sonde Oxyferm FDA 425	Hamilton Company, USA
Schlauchpumpe	IDEX Health & Science GmbH, Deutschland
Schüttler IKA KS 260 basic	IKA-Werke GmbH, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX SUPER 52	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland
UV-Sterilisationsgerät	Master Home Products International, USA
UV/VIS Spektrometer TIDAS S520	J & M GmbH, Deutschland
Thermoblock	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallsonde LABSonic	Sartorius AG, Göttingen
Vortex-Mixer	Scientific Industries, USA
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

### 11.2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11.3.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einmalhandschuhe	AMPri Handelsgesellschaft mbH, Deutschland
Einwegpipette 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Einwegpipetten Costar Stripette	Corning Ing., USA
Einwegspritzen	B. Braun Melsungen AG, Deutschland

Mikroküvetten	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 well	Brand, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 well TC-Platte	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
MyCap CCX Schüttelkolben	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Luftfilter Sartopore Air Midisart	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Thermoplastik Schläuche C-Flex	VWR International GmbH, Deutschland
Schüttelkolben Corning	VWR International GmbH, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
T-Flasche, T25, T75, T175	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Vakuumfilter	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Corning, Inc, USA

### 11.2.3. Verwendete Software

**Tabelle 11.4.:** Im Zuge dieser Arbeit verwendete Programme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
LEDSpec Software	WPI Inc., USA
Matlab 9.9	The MathWorks, Inc., USA
Microsoft Office Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond
Microsoft Office Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond
Origin 2016G	OriginLab Corporation, Northhampton
The Unscrambler X.10.1	Camo Software AS, Norwegen

### 11.2.4. Verwendete 3D-Drucker

Tabelle 11.5.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete 3D-Drucker

Name	Hersteller
ProJet 2500 Plus	3D Systems Inc., USA
Agilista 3200W	Keyence Corporation, USA
Ultimaker 2+	Ultimaker B.V, Niederlande

### 11.2.5. Verwendete 3D-Druckmaterialien

Tabelle 11.6.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete 3D-Druckmaterialien

Name	Hersteller
AR-M2	Keyence Corporation, USA
AR-S1 Supportmaterial	Keyence Corporation, USA
Honeycomb Filaments ABS Filament	Freeform4U GmbH, Deutschland
M2R-CL	3D Systems Inc., USA
M2-SUP Supportmaterial	3D Systems Inc., USA

## 11.3. Lösungen und Puffer

Der pH-Wert der Lösungen und Puffer wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt.

Tabelle 11.7.: Im Zuge dieser Arbeit hergestellte Lösungen und Puffer

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
		80 g NaCl
		2 g KCl
	<b>10 x PBS</b>	14,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		2,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O



FPLC - AEX	Äquilibriumspuffer	20 mM	bis-TRIS
		0,4 M	NaCl
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 6,5
FPLC - AEX	Elutionspuffer	20 mM	bis-TRIS
		1 M	NaCl
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 6,5
FPLC - Protein A	Äquilibriumspuffer	100 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		150 mM	NaCl
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 7,5
FPLC - Protein A	Elutionspuffer	0,1 M	Citronensäure
		150 mM	NaCl
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 3,5
FPLC - Protein A	CIP-Puffer	0,1 M	TRIS
		500 mM	NaCl
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 8,5
HPLC - SEC	Laufpuffer	100 mM	NaSO <sub>4</sub>
		50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		ad 1000 ml	ddH <sub>2</sub> O
			pH 6,6

## 11.4. Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

Tabelle 11.8.: Im Zuge dieser Arbeit verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

Stamm	Hersteller
CHO DG44	Sartorius Stedim Biotech, Deutschland
<i>Komagataella phaffii</i>	[18]
Humane mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe	[31]

## 11.5. Verwendete Kulturmedien und Zusätze

Tabelle 11.9.: Im Zuge dieser Arbeit hergestellte Medien zur Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Medium/Zusatz	Zusammensetzung
Standard Proliferationsmedium	10 % (v/v) Humanserum
	0,5 % (v/v) Gentamycin
	ad 250 ml $\alpha$ -MEM
Medium für CTB-Assay	10 % (v/v) CTB-Reagenz
	ad 15 ml $\alpha$ -MEM-Basalmedium

Tabelle 11.10.: Im Zuge dieser Arbeit hergestellte Stammlösungen und Medien zur Kultivierung von *Komagataella phaffii*

Medium/Zusatz	Zusammensetzung
10 x NaI-Stammlösung	0,4 g NaI
	ad 40 ml ddH <sub>2</sub> O
100 x H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -Stammlösung	1 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	ad 40 ml ddH <sub>2</sub> O
Hexametaphosphat	150 g Hexametaphosphat
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O

	5,99 g	$\text{CuSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$
	3 g	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	0,2 g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$
	0,5 g	$\text{CoCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$
	20,04 g	$\text{ZnCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$
<b>Spurenelemente</b>	65,05 g	$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	19,2 ml	96,2 % $\text{H}_2\text{SO}_4$
	0,4 g	D-Biotin
	58 ml	10 x NaI-Stammlösung
	7800 ml	100 x $\text{H}_3\text{BO}_3$ -Stammlösung
	ad 50 ml	dd $\text{H}_2\text{O}$
	10 g	Hefeextrakt
<b>YPD-Medium</b>	20 g	Pepton
	10 g	Dextrose
	ad 1 l	dd $\text{H}_2\text{O}$

---

Zur Herstellung des Fermentationsmediums werden die angegebenen Salze zusammen mit dem Glycerin in Wasser gelöst und im Bioreaktor autoklaviert. Anschließend können die Spurenelemente und das Hexametaphosphat über einen Sterilfilter hinzugegeben werden.

**Tabelle 11.11.:** Zusammensetzung des Fermentationsmediums zur Kultivierung von *Komagataella phaffii*

Zusammensetzung		Bemerkung
50 ml	Glycerin	
0,9 g	CaSO <sub>4</sub>	
14,67 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	autoklavieren
11,67 g	MgSO <sub>4</sub> *(H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub>	
9 g	(NH) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	
ad 829 ml	ddH <sub>2</sub> O	
167 ml	Hexametaphosphat	sterilfiltrieren
4 ml	Spurenelemente	
pH 5		

**Tabelle 11.12.:** Im Zuge dieser Arbeit verwendete Medien zur Kultivierung von CHO-DG44 Zellen

Medium/Zusatz	Zusammensetzung		
<b>Vorkultur-Medium</b>	20,04	g*l <sup>-1</sup>	Cellca SMD
	0,24	g*l <sup>-1</sup>	NaOH
	1,8	g*l <sup>-1</sup>	NaHCO <sub>3</sub>
	6	mM	L-Glutamin
	15	nM	MTX
<b>Hauptkultur-Medium</b>	22,31	g*l <sup>-1</sup>	Cellca PM
	6,2	ml*l <sup>-1</sup>	5 M NaOH
	1,8	g*l <sup>-1</sup>	NaHCO <sub>3</sub>
	6	mM	L-Glutamin

<b>Feed Medium A</b>	154,12	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	Cellca FMA
	3,148	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	NaOH
<b>Feed Medium B</b>	94,6	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	Cellca FMB
	32,1	$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	NaOH
<b>Glucose-Lösung</b>	40	% (w/v)	D(+)-Glucose; wasserfrei

---

# 12. Methoden

## 12.1. Herstellungsprozess der Sensorkomponenten

### 12.1.1. Einweg-Messzelle

Die Einweg-Messzellen werden additiv mit einem Ultimaker 2+ (Ultimaker B.V., Niederlande) hergestellt. Dabei wird das *fused filament fabrication* (FFF)-Verfahren angewandt. Das verwendete Material ist Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS). Die Quarzglasfenster werden im Anschluss mit UV-aushärtenden Klebstoff mit der Messzelle verklebt. Abschließend durchläuft jede Messzelle eine Qualitätskontrolle. Zunächst wird die Messzelle in den Messzellenhalter eingesetzt und ein Transmissionsspektrum aufgenommen. Weiterhin wird gemäß Abschnitt 12.4.1 die exakte Pfadlänge der Messzelle bestimmt. Neben den optischen Eigenschaften wird im Zuge der Qualitätskontrolle auch eine Prüfung auf Dichtigkeit durchgeführt. Dabei wird die Messzelle Wasser gefüllt und anschließend der Druck innerhalb des Systems erhöht. Der Test gilt als bestanden, wenn über einen Zeitraum von mindestens 1 min und einem Haltedruck von 2 bar keine Flüssigkeit aus der Messzelle austritt.

Nachdem die Qualitätskontrolle durchgeführt wurde, wird die Messzelle für die Sterilisierung vorbereitet. Dazu wird jeweils ein Ende zweier Schlauchstücke (C-Flex<sup>®</sup> Biopharmaceutical Tubing, Saint-Gobain Performance Plastics) mit einem BioSealer TC (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) verschlossen. Das andere Ende wird mit der Messzelle verbunden und mit Kabelbindern gesichert. Die so luftdicht verschlossene Messzelle wird in einer Plastikverpackung verstaut und diese unter Vakuum verschweißt. In diesem Zustand ist die Messzelle vorbereitet zur Sterilisierung. Die Sterilisierung wird mithilfe von Gamma-Strahlung durchgeführt (BBF Sterilisationservice GmbH, Deutschland), wobei die Messzelle einer Mindestdosis von >25 kGy ausgesetzt ist. Die sterilisierte Messzelle ist somit bereit für eine Anwendung am jeweiligen Bioprozess. Eine Übersicht über die verfügbaren Pfadlängen und zugehörigen Messkammervolumina gibt Tabelle 12.1.

Tabelle 12.1.: Verfügbare Pfadlängen der Einweg-Messzelle und zugehörige Volumina der Messkammern.

Pfadlänge [mm]	1,5	3	5	10	20
Messkammervolumen [ $\mu$ l]	200	300	400	700	700

### 12.1.2. Messzellenhalter

Der Messzellenhalter wird analog zur Einweg-Messzelle im 3D-Druckverfahren aus ABS hergestellt. Zum Anschluss der externen Messtechnik (Lichtquelle, Spektrometer) werden SMA-Stecker in den Halter integriert. Diese enthalten Kollimatoren, um einen parallelisierten Lichtstrahl mit 5 mm Durchmesser zu erzeugen. Die nötigen Gewindeanschlüsse werden durch Gewindeschneider in das Material geschnitten. Weiterhin werden auch Madenschrauben zur Fixierung der Messzelle eingesetzt. Der Messzellenhalter beinhaltet im Fall der NIR-Streulichtmessung und der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle auch einen Teil der Messtechnik. Dazu sind weitere mechanische Nachbearbeitungen notwendig. Messungen mit der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle werden mit LED-Messtechnik durchgeführt. Die dafür nötigen Photodioden wurden in den Messzellenhalter integriert. Das verringert den Platzbedarf des Systems. Für die NIR-Streulichtmessungen wurden darüber hinaus alle zur Messung notwendigen optischen Komponenten in den Halter integriert. Dazu zählt die Laserdiode als auch die verschiedenen Photodioden zur Detektion von Streulicht in unterschiedlichen Winkeln.

## 12.2. Messmethode

### 12.2.1. Aufnahme von Absorptionsspektren

Zur Aufnahme von Absorptionsspektren mit der entwickelten Absorptionsmesszelle wird ein faseroptisches Spektrometer (TIDAS S520, J & M Analytics) verwendet. Dieses wird über Lichtwellenleiter an den Messzellenhalter angeschlossen. Proben werden kontinuierlich mit einer Peristaltikpumpe durch die Messzelle gepumpt oder mithilfe einer Spritze in die Messkammer gedrückt. Die Messzelle ist während der Messung aufrecht in den Messzellenhalter eingesetzt, sodass Luftblasen die Messkammer nach oben verlassen können. Weiterhin wird sie durch Madenschrauben fixiert, damit die Position der Messzelle während der gesamten Messdauer unverändert bleibt. Der

Messzellenhalter wird zur Abschirmung von Fremdlicht mit einem Deckel verschlossen.

Bevor die Messung gestartet wird, sollte die Integrationszeit so eingestellt werden, dass die Detektorauslastung bei ca. 80 % liegt. Die Messung wird in drei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Zunächst wird ein Dunkelspektrum aufgenommen. Anschließend wird die Messzelle mit der Referenzprobe befüllt und ein Referenzspektrum aufgenommen. Letztlich wird ein Intensitätsspektrum der jeweiligen Probe aufgezeichnet. Nach Abzug des Dunkelspektrums lässt sich die Absorption aus dem Referenzspektrum und dem Intensitätsspektrum der Probe mit Formel 12.1 berechnen.

$$Absorption = \log_{10} * \frac{Intensität_{Referenz}}{Intensität_{Probe}} \quad (12.1)$$

### 12.2.2. Absorptionsmessung mit LED-Messtechnik

Für die Messungen mit der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle steht ein Messzellenhalter mit integrierten Photodioden zur Verfügung. Dieser wird zusammen mit einem LED-Photometer (LEDSpec, World Precision Instruments Inc., USA) eingesetzt, welches für den Einsatz modifiziert und angepasst wurde. Das LEDSpec bietet sieben verschiedene LED-Lichtquellen mit Wellenlängen im Bereich von 260–850 nm (Tabelle 12.2). Diese können in ihrer Intensität manuell eingestellt werden, sodass der Detektor optimal ausgelastet wird. Über Lichtwellenleiter gelangt das Licht zum Messzellenhalter und wird nach dem Durchqueren der Messzelle von den im Halter integrierten Photodioden detektiert. Eine im LEDSpec positionierte Referenz-Photodiode

Tabelle 12.2.: Wellenlängen der im LEDSpec verbauten LEDs mit zugehöriger Spektraler Breite und Verwendung.

LED No.	1	2	3	4	5	6	7
Wellenlänge [nm]	260	280	340	450	520	700	850
Spektrale Breite [nm]	10	10	10	20	10	30	30
Analyt / Verwendung	DNA	Proteine	NADH	Flavine	Amaranth	Offset	Offset



ermöglicht eine Driftkorrektur. Zusätzlich werden die Messwerte unter Berücksichtigung der Intensitäten im NIR-Bereich (850 nm) korrigiert (offset). Die Signalauswertung wird durch das LEDSpec vorgenommen und die Daten über eine USB-Schnittstelle von einem Computer aufgezeichnet. Dabei können neben den Intensitäten auch Transmission oder Absorption berechnet werden. Es stehen vier Kanäle zur Detektion zur Verfügung wobei die LEDs frei auf jeden der zur Verfügung stehenden Kanäle geschaltet werden können.

### **12.2.3. Streulichtmessungen**

Die NIR-Streulichtmessungen werden unter Verwendung des LED-Photometers (LED-Spec, World Precision Instruments Inc., USA) durchgeführt. Als Lichtquelle dient eine Laserdiode (*vertical-cavity surface-emitting laser*, VCSEL) mit einer Wellenlänge von 850 nm. Zur Detektion von Streulicht stehen vier Photodioden zur Verfügung. Lichtquelle und Photodioden sind in den Messzellenhalter integriert. Diese sind dabei so angeordnet, dass eine Detektion von Streulicht in den Winkeln 20°, 90° und 160° möglich wird. Zusätzlich wird auch die Transmission gemessen. Signalauswertung und Datenaufnahme werden durch das LEDSpec durchgeführt, welches für diesen Einsatz modifiziert und angepasst wurde. Eine zusätzlich verbaute Referenz-Photodiode ermöglicht eine Dunkel- und Driftkorrektur des Signals. Dafür wird ein Teil des Lichts über einen Strahltrenner zur Referenz-Photodiode geführt. Die Intensität der Lichtquelle wird über die zugehörige Software eingestellt, sodass der Detektor optimal ausgelastet ist. Messwerte werden als Intensitätswerte in der Einheit Counts aufgenommen.

## **12.3. Entwicklungsprozess**

### **12.3.1. Desinfektion und Sterilisation von 3D-Druckmaterialien**

Es wurden verschiedenen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren zur Behandlung von unterschiedlichen 3D-Druckmaterialien eingesetzt. Dazu wurden würfelförmige Testobjekte mit einer Kantenlänge von 5 mm aus den verschiedenen Materialien gefertigt. Zu den getesteten Verfahren zählen die Behandlung mit Ethanol (70 %), Isopropanol (70 %), Natriumhypochlorit (5 %, pH 6,5) sowie die Bestrahlung mit UV-Licht oder Gammastrahlen (>25 kGy).

Für nasschemische Verfahren (Ethanol, Isopropanol und Natriumhypochlorit) wurde jeweils ein Testobjekt in 1 ml der Flüssigkeit eingetaucht, sodass es vollständig mit der Flüssigkeit bedeckt wurde. Die Einwirkzeit der Desinfektionsmittel beträgt 60 min bzw. 24 h. Die Bestrahlung mit Gammastrahlen wurde durch die Firma BBF Sterilisationsservice GmbH durchgeführt. Die Sterilisation mit UV-Licht wurde mithilfe einer UV-Lampe durchgeführt, wobei jede Seite des Testobjekts für 10 min bestrahlt wurde. Anschließend wurde die Eignung der Verfahren zur Sterilisation der Materialien mithilfe eines Steriltests überprüft. Dazu wurden die Testobjekte in 1 ml LB-Medium (pH 7,5) überführt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden drei Blindproben ohne Testobjekte angesetzt, sowie unbehandelte Testobjekte in LB-Medium als Positivkontrolle überführt. 80 µl des LB-Mediums werden auf Agarplatten (LB-Agar) ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und nach 7 Tagen auf Kontaminationen untersucht (Tabelle A.1).

### 12.3.2. Herstellung der Extraktionsmedien

Um die In-vitro-Toxizität verschiedener 3D-druckbarer Materialien zu testen, wurde die ISO-Norm 10993 verwendet. In Übereinstimmung mit Teil 12 dieser Norm (ISO 10993-12:2012) wurden kleine Würfel mit einer Kantenlänge von 5 mm und einer Gesamtoberfläche von 1,5 cm<sup>2</sup> gedruckt. Diese Testobjekte wurden mit dem Ultimaker 2+ (Ultimaker B.V., Niederlande) hergestellt. Die in dieser Studie verwendeten Materialien sind Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS), Polyamid (PA) und Polymethylmethacrylat (PMMA). Die Sterilisation erfolgt durch Gamma-Bestrahlung (>25 kGy) (BBF Sterilisationsservice GmbH, Deutschland).

Es wurden Referenzmaterialien verwendet, um die Eignung des Versuchsablaufs zur Erzielung einer reproduzierbaren Reaktion nachzuweisen. High Density Polyethylen (HDPE) dient als Negativkontrolle. Eine positive Reaktion des Testsystems wird durch die Verwendung einer Polyurethanfolie erzielt, die 0,25 % Zinkdibuthyldithiocarbamat (ZDBC) enthält. Die Referenzmaterialien wurden vom Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute, Japan, bezogen. Beide Materialien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert.

Die Extraktionsmedien wurden gemäß ISO 10993-12:2012 hergestellt, um die potenziellen Leckeigenschaften der 3D-gedruckten Materialien zu bewerten. Die sterilisierten Testobjekte wurden in Zellkulturmedium Minimum Essential Medium Eagle, mit Alpha-Modifikation ( $\alpha$ -MEM) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), das 10 % Human-

serum (c.c.pro GmbH, Deutschland) und 0,5 % Gentamicin (PAA Laboratories GmbH, Österreich) enthielt, 72 h lang bei 37° C mit einem Oberflächen/Volumen-Verhältnis von  $3 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$  inkubiert. Zellkulturmedium, welches über einen Zeitraum von 72 h lang bei 37° C ohne Testobjekte inkubiert wurde, dient als Blindprobe.

### 12.3.3. Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen

Für den Zytotoxizitätstest wurden aus humanem adipogenem Gewebe gewonnene mesenchymale Stammzellen (MSCs) verwendet. Die Kultivierung der MSCs wurden wie von Siller et al. beschrieben durchgeführt [47]. Dazu wurde  $\alpha$ -MEM Standardproliferationsmedium verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C in T75-Kulturflaschen inkubiert (5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>). Bei Erreichen einer Konfluenz von >80 % wurde eine neue Passage angesetzt. Dabei wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von Accutase (4 ml, 10-15 min inkubieren bei 37 °C danach Reaktion mit 4 ml  $\alpha$ -MEM-Medium stoppen) werden die Zellen von der Oberfläche gelöst und anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (300 x g, 5 min) abgetrennt, in 5 ml neuem Medium resuspendiert und anschließend mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  Trypanblau vermischt und auf die Zählkammer aufgetragen. Anhand der Gesamtzellzahl lässt sich das Volumen an Zellsuspension ermitteln, welches nötig ist um die nächste Passage mit 3000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  anzusetzen.

### 12.3.4. CTB-Assay

Zur indirekten Bewertung der Zellebensfähigkeit in verschiedenen Extraktionsmedien, wird ein CellTiter-Blue<sup>®</sup> Zellviabilitätstest (Promega GmbH, Deutschland) verwendet. Zur Vorbereitung werden die Zellen analog zu Abschnitt 12.3.3 gewaschen, abgelöst, zentrifugiert und gezählt. Anschließend werden die Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät, sodass jedes Well 150  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit jeweils 5000 Zellen enthält. Die Mikrotiterplatte wird danach für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Das Medium wird im nächsten Schritt aus jedem einzelner Well abgesaugt und die Zellen mit jeweils 150  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer gewaschen. Danach wird das jeweilige Extraktionsmedium auf die Zellen gegeben. Die Platte wird anschließend für weitere 24 h inkubiert. Nach einem weiterem Waschschrift kann 100 $\mu\text{l}$  der 10 %-igen CTB-Lösung in jedes Well pipettiert werden. Die Platte wird daraufhin für weitere 2 h inkubiert.

Anschließend wird mittels Fluoroskan Ascent-Fluorometer die Fluoreszenzintensität bei einer Exzitationswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bestimmt.

### 12.3.5. Aufnahme von Verweilzeitspektren

Zur Aufnahme von Verweilzeitspektren wird eine Tracer-Lösung (BSA:  $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  in PBS-Puffer) in den Probenstrom der Messzelle injiziert. Die Tracer-Lösung wird im Vorfeld in die Probenschleife eines HPLC-Injektionsventils (Volumen:  $20 \mu\text{l}$ ) gefüllt. Das Ventil garantiert eine reproduzierbare Injektion des Tracers in Form eines Dirac-Stoßes. Eine Peristaltikpumpe sorgt für einen kontinuierlichen Volumenstrom.

In der Ladestellung ist die Probenschleife vom Probenstrom abgekoppelt. Die Messzelle wird mit PBS-Puffer durchspült. Durch Umstellen des Ventils in die Injektionsstellung wird die Probenschleife geöffnet und die Tracer-Lösung in die Messzelle gepumpt. Ein angeschlossenes Spektrometer überwacht dabei die Absorption bei 280 nm. Der Messaufbau ist in Abbildung 12.1 dargestellt.

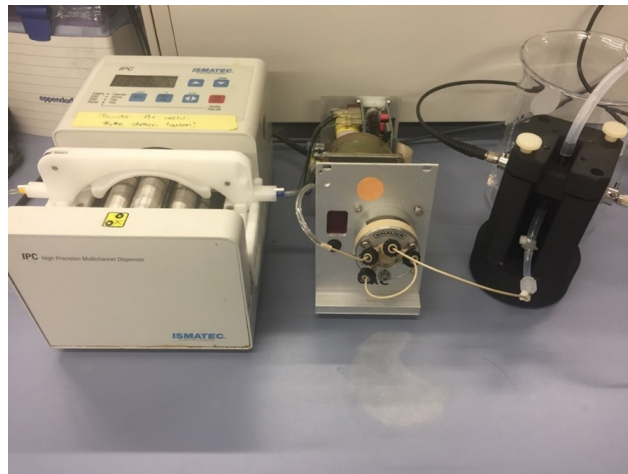


Abbildung 12.1.: Versuchsaufbau zur Aufnahme von Verweilzeitspektren. Peristaltikpumpe (links), Injektionsventil (Mitte), Messzelle mit Messzellenhalter (rechts)

## 12.4. Validierung

### 12.4.1. Bestimmung der exakten Pfadlänge

Zur Bestimmung der exakten Pfadlänge einer Absorptionsmesszelle werden zwei Amaranth-Referenzlösungen mit definiertem Absorptionswert (0,75 AU; 1,5 AU) aus einer Stammlösung mit 20 AU hergestellt. Für die Stammlösung werden 137 mg Amaranth in 250 ml Wasser gelöst. Durch entsprechendes Verdünnen lassen sich anschließend die gewünschten Absorptionswerte einstellen. Mithilfe einer Pumpe werden die Lösungen nacheinander in die jeweilige Messzelle gepumpt und die Absorption bei 520 nm mit einem Spektrometer bestimmt. Als Referenzlösung dient Wasser. Die Messungen werden mit einer Quarzküvette (Pfadlänge 10 mm) wiederholt.

Der Absorptionswert wird im Anschluss durch den Offset bei 700 nm korrigiert. Der korrigierte Absorptionswert kann in Formel 12.2 eingesetzt werden, um die exakte Pfadlänge der Messzelle zu bestimmen. Diese ergibt sich aus dem Mittelwert der Messungen mit den beiden Referenzlösungen. Die Messungen mit der Quarzküvette dienen dabei als Referenz.

$$Pfadlänge_{Messzelle}[mm] = 10mm * \frac{Absorption_{Messzelle}}{Absorption_{Küvette}} \quad (12.2)$$

### 12.4.2. Gradientenmessung

Zur Messung eines stetig ansteigenden Konzentrationsgradienten wurden zwei luftdicht verschlossene Glasgefäße mit jeweils 500 ml PBS-Puffer gefüllt. Ein Gefäß enthält zusätzlich BSA in einer Konzentration von  $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Beide Gefäße sind über eine Schlauchverbindung miteinander verbunden, welche vor Versuchsbeginn komplett mit Flüssigkeit gefüllt sein muss. So können sich die Flüssigkeitspegel beider Gefäße ausgleichen. Weiterhin ist das Gefäß ohne BSA über einen Schlauch mit der Einweg-Absorptionsmesszelle verbunden. Mithilfe einer Peristaltikpumpe wird Flüssigkeit aus dem Gefäß entnommen und durch die Messzelle gepumpt. Dabei entsteht ein Unterdruck in dem Gefäß, welcher dafür sorgt, dass PBS-Puffer mit BSA aus dem anderen Gefäß nachgezogen wird. Dies bewirkt wiederum eine stetig zunehmende Konzentration an BSA in dem Gefäß. Für eine gute Durchmischung sind die Gefäße auf einem Magnetprüher platziert und enthalten Magnetprührstäbchen. Die Absorption bei 280 nm wird während des Versuchs kontinuierlich mit einem faseroptischen Spektrometer aufgezeichnet.

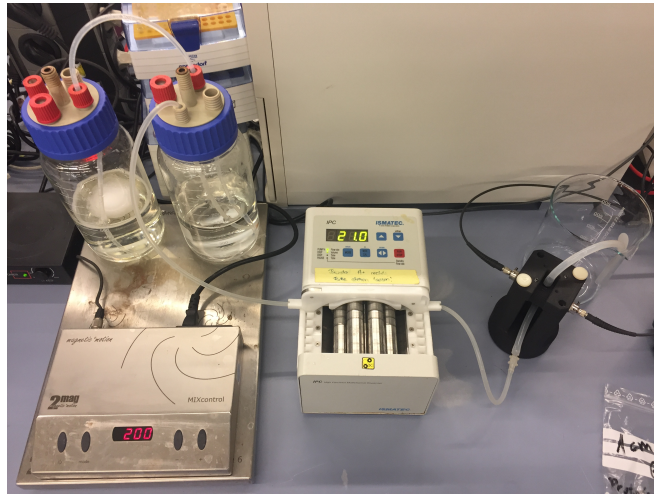


Abbildung 12.2.: Aufbau zur Gradientenmessung. Luftdichte Glasgefäße auf Magnetrührplatte (links), Peristaltikpumpe (Mitte), Absorptionssmesszelle (rechts).

### 12.4.3. Design of Experiment

Zur Bestimmung der Selektivität der Messmethode werden Lösungen hergestellt, die sich jeweils aus den drei relevanten Fluorophoren BSA, NADH und Riboflavin zusammensetzen. Dafür werden die in Tabelle 12.3 aufgeführten Stammlösungen verwendet. Für jeden Fluorophor werden fünf Konzentrationen (inklusive Nullprobe) festgelegt, die im linearen Messbereich des Sensors liegen. Eine Lösung beinhaltet jeden Fluorophor in einer der ausgewählten Konzentrationen. Eine Übersicht der verschiedenen Lösungen bietet Tabelle 12.4. Der Versuch wird aufgeteilt in drei Blöcke. Jeder dieser Blöcke beinhaltet fünf verschieden zusammengesetzte Mischlösungen, wobei jede Konzentrationsstufe eines Fluorophors genau einmal vorkommt. Vor und nach diesen Blöcken werden Zentralversuche durchgeführt. Dieser beinhaltet eine immer gleich zusammengesetzte Lösung. Die Kombinationen der unterschiedlichen Konzentrationen wurden im Vorfeld so ausgewählt, dass sich möglichst niedrige Korrelationskoeffizienten zwischen den Konzentrationen der verschiedenen Fluorophore ergeben. Damit wird der Versuchsumfang deutlich reduziert.

Die aufgelisteten Lösungen werden jeweils in 15 ml-Reaktionsgefäßen mit einem Gesamtvolumen von 10 ml hergestellt. Mithilfe einer Peristaltikpumpe werden die Lösungen einzeln in eine Absorptionssmesszelle gepumpt. Es werden pro Probe 10 Intensitätsspektren in einem Zeitraum von 10 s aufgenommen und gemittelt. Als Referenzspektrum dient PBS-Puffer. Für jede Pfadlänge wird ein neuer Versuchsdurchgang mit

neu angesetzten 3-Komponentenlösungen durchgeführt.

Tabelle 12.3.: Herstellung der Stammlösungen für das Design of Experiment

	BSA [50 ml]	NADH [10 ml]	Riboflavin [1 l]
<b>Konzentration Stammlösung [mol/l]</b>	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
<b>Einwaage</b>	1,65 g	0,0071 g	0,0094 g
<b>Verdünnungsstufen [mol/l]</b>	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$
	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$
	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$

#### 12.4.4. Multivariate Datenanalyse mittels PLS-Regression

Mit den im Zuge des Design of Experiments aufgenommenen Absorptionsspektren der in Tabelle 12.4 aufgeführten Proben, wird eine PLS-Regression durchgeführt. Dabei wird überprüft, ob die Erstellung einer Kalibrationsgeraden auch in Gegenwart anderer Chromophore möglich ist. Die Absorptionsspektren wurden zunächst importiert und mit Hilfe des Programms The Unscrambler 10.1 (Camo Software AS, Norwegen) horizontal fusioniert. Außer der Mittelwertzentrierung wurden keine weiteren Korrekturen oder Filterungen vorgenommen. Der NIPALS-Algorithmus (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) wurde verwendet, um die PLS-Modelle für jeden Analyten und jede Pfadlänge zu erstellen. Die Anzahl der Hauptkomponenten wurde auf ein Minimum beschränkt, um eine Überanpassung zu vermeiden, während gleichzeitig ein hohes Bestimmtheitsmaß und ein niedriger, aber ähnlicher RMSEC und RMSECV angestrebt wurde. Der Algorithmus extrahiert die relevanten Wellenlängen für jede Komponente und berechnet ein Regressionsmodell, welches aus den Spektraldaten die Konzentration des jeweiligen Chromophors berechnet. Die Validierung des Modells erfolgt mithilfe einer Kreuzvalidierung. Durch Auftragung der berechneten Konzentrationen gegen die Referenzkonzentrationen lässt sich die Genauigkeit des Modells beurteilen. Dazu werden die Parameter der Regressionsgeraden mit denen einer im idealen Fall vorliegenden Winkelhalbierenden verglichen. Zudem werden Fehlerquadratsumme und Bestimmtheitsmaß angegeben. Die Parameter werden für jede Pfad-

Tabelle 12.4.: Zusammensetzung der verschiedenen Mischlösungen

BSA [mol/l]	NADH [mol/l]	Riboflavin [mol/l]
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-6}$	0	$5 \cdot 10^{-6}$
0	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	0
$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-6}$	0
$5 \cdot 10^{-5}$	0	$1 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
0	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$
0	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-6}$	0	$1 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-6}$
$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	0
$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$

länge einzeln bestimmt und miteinander verglichen. Abschließend werden die verschiedenen PLS-Modelle hinsichtlich ihrer Vorhersagegenauigkeit verglichen, um die beste Pfadlänge für jeden Analyten auszuwählen. Anhand der in diesem Zusammenhang auch berechneten gewichteten Regressionskoeffizienten können die relevanten Spektralbereiche der verschiedenen Modelle miteinander verglichen werden.



## 12.5. Kultivierungen mit CHO-Zellen

### 12.5.1. Batch Kultivierung im Schüttelkolben

Für die Kultivierung wurden CHO DG44 Zellen (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem MyCap CCX Schüttelkolben (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) kultiviert. Die Zelllinie produziert ein Immunglobulin G1 (IgG1) als monoklonalen Antikörper. Es wurden chemisch definierte Medien für die Vorkultur und Produktionsmedien für die Hauptkultur von der Sartorius Stedim Cellca Plattform verwendet.

Das Inokulum wurde in fünf Passagen hergestellt und in einem 7,5 %-igen CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch, 85 % relativer Luftfeuchtigkeit, bei konstanten 36,8 °C auf einer Schüttelplattform (120 U\*min<sup>-1</sup>), in 500 ml Erlenmeyer-Schüttelkolben, mit 150 ml Vorkulturmedium inkubiert. Ab der vierten Passage wird Vorkultur-Medium ohne MTX verwendet. Die Hauptkultur wurde auf eine finale Zellkonzentration von 1 Mio Zellen\*ml<sup>-1</sup> mit einem Arbeitsvolumen von 161 ml eingestellt. Ebenfalls wurde eine Referenzkultur in einem 500 ml Schüttelkolben und einem Arbeitsvolumen von 150 ml aus derselben Vorkultur angeimpft. Die Unterschiede im Arbeitsvolumen ergeben sich aus dem Bypassvolumen. Dadurch soll das Volumen in beiden Schüttelkolben angeglichen werden.

Der Bypass wurde zum Teil mit Heißdampf vorsterilisiert und vor Beginn der Hauptkultur mit der vorsterilisierten Absorptionsschleife (1,5 mm Pfadlänge) durch Verschweißen von Schläuchen verbunden. Der Anschluss des Bypasses an den MyCap-Schüttelkolben erfolgte mit AseptiQuik G-Konnektoren. Eine Peristaltikpumpe sorgt für einen kontinuierlichen Volumenstrom von 4 ml\*min<sup>-1</sup>. Die Kultivierungsparameter der Hauptkultur entsprechen denen der Vorkultur. Während der Kultivierung konnten dem MyCap-Schüttelkolben über einen Probenentnahme-Port manuell Proben mit einer Spritze entnommen werden. Diese wurden zur Bestimmung der viablen Zellzahl und Viabilität (Cedex HiRes, Roche), sowie der Metabolitkonzentrationen (Cedex Bio, Roche) genutzt. Zu den analysierten Metaboliten zählen Glucose, Glutamin, Glutamat, Lactat, Lactatdehydrogenase und IGG. Zusätzlich wurden mithilfe der entwickelten Absorptionsschleife und einem faseroptischen Spektrometer Absorptionsspektren aufgenommen.

### 12.5.2. Fed Batch Kultivierung im 10 L Edelstahlreaktor

Die fed batch Kultivierung wurde mit CHO DG44 Zellen (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Göttingen, Deutschland) in einem 10 L Edelstahl Bioreaktor (Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Es wurden chemisch definierte Medien für die Vorkultur und Produktionsmedien für die Hauptkultur von der Sartorius Stedim Cellca Plattform verwendet. Das Inokulum wurde in fünf Passagen hergestellt und in einem 7,5 %-igen CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch, 85 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 36,8 °C auf einer Schüttelplattform (120 U/min) in 500 ml Erlenmeyer-Schüttelkolben mit 150 ml Vorkulturmedium inkubiert. Ab der vierten Passage wird Vorkultur-Medium ohne MTX verwendet. Die Hauptkultur wurde aus der Vorkultur beimpft, um eine anfängliche viable Zellkonzentration von 0,3 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> im Bioreaktor zu erreichen, mit einem tatsächlichen Arbeitsvolumen von 6,6 L. Die Zellen werden bei 36,8 °C, einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 60% und einer Rührerdrehzahl von 294 rpm kultiviert, wobei der pH-Wert auf 7,1 geregelt wird. Die Feedmedien A und B werden ein Mal täglich jeweils über eine Peristaltikpumpe zugegeben. Bei 6,6 l Arbeitsvolumen beträgt das täglich zugegebene Gewicht 277,2 g FMA sowie 27,7g FMB. Sinkt die Glucose-Konzentration nach Tag 5 unter einen Wert von 5 g/l<sup>-1</sup> wird Glucose-Lösung zugegeben, bis dieser Wert wieder erreicht wurde.

Über ein automatisiertes Probenentnahmesystem wurde mit einem Intervall von 4 h eine Probe für offline Analytik entnommen. Das Probenentnahmesystem arbeitet mit einer Hubkolbenpumpe und einem Autosampler, welcher die Proben bis zur Verwendung bei 4 °C lagert. Die NIR-Streulichtmesszelle wurde durch Verschweißen von Schläuchen in das System eingesetzt und füllt sich zusätzlich zum Zeitpunkt der Probenentnahme auch alle 30 min für eine Dauer von 90 s mit Medium. Innerhalb dieser 90 s werden 30 Messungen mit einer Messfrequenz von 1 s durchgeführt. Die 30 Messwerte einer Messung werden während der Datenauswertung auf Ausreißer untersucht und diese gegebenenfalls entfernt. Die übrigen Messwerte werden gemittelt und das Ergebnis dem Zeitpunkt des ersten Messwertes zugeordnet. Somit ergeben sich 2 Messpunkte pro Stunde, die zur Auswertung gegen die Zeit aufgetragen werden. Zusätzlich wird auch die über offline Analytik bestimmte viable Zellzahl aufgetragen und mit den Streulichtdaten verglichen.

### 12.5.3. Perfusionsprozess

Für die Perfusionskultivierung wurden CHO DG44 Zellen (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Göttingen, Deutschland) mit dem Ambr<sup>®</sup> 250 Modular System (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) kultiviert. Die Zelllinie produziert ein Immunglobulin G1 (IgG1) als monoklonalen Antikörper. Es wurden chemisch definierte Medien für die Vorkultur und Produktionsmedien für die Hauptkultur von der Sartorius Stedim Cellca Plattform verwendet. Das Inokulum wurde in fünf Passagen hergestellt und in einem 7,5 %-igen CO<sub>2</sub>/Luft-Gemisch, 85 % relativer Luftfeuchtigkeit bei 36,8 °C auf einer Schüttelplattform (120 U/min) in 500 ml Erlenmeyer-Schüttelkolben mit 150 ml Vorkulturmedium inkubiert. Ab der vierten Passage wird Vorkultur-Medium ohne MTX verwendet. Die Hauptkultur wurde aus der Vorkultur beimpft, um eine anfängliche viable Zellkonzentration von 1 Mio. Zellen\*ml<sup>-1</sup> im Bioreaktor zu erreichen, mit einem tatsächlichen Arbeitsvolumen von 0,24 l. Das für die Hauptkultur verwendete Medium und der später verwendete Feed setzen sich aus Hauptkultur-Medium (91,2 %), Feed Medium A (8 %) sowie Feed Medium B (0,8 %) zusammen.

Die Kultivierung erfolgte bei einer Rührgeschwindigkeit von 855 U/min und einer Temperatur von 36,8 °C mit programmierten Sollwerten für den pH-Wert von 7,1 und einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 60 %. Antifoam C Emulsion 2 % (Sigma-Aldrich, Inc., Saint-Louis, USA) wurde alle 12 Stunden zugegeben, um Schaumbildung zu verhindern. Der Prozess begann mit einer dreitägigen batch-Phase, wurde mit einer Perfusionsphase fortgesetzt und dauerte insgesamt 16 Tage mit unterschiedlichen Verdünnungsraten von 0,01 h<sup>-1</sup> bis 0,032 h<sup>-1</sup> und einem um 0,25 ml\*h<sup>-1</sup> höheren Zufluss, um die Volumenverringerung durch die Probenahme zu kompensieren. Die Bestimmung der viablen Zellzahl (VCC) und der Viabilität anhand der Gesamtzellzahl (TCC) wurde mit dem Cedex HiRes<sup>®</sup> Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die dazu nötigen Proben wurden während der Perfusionsphase mit einem Zeitabstand von 12 h entnommen. Während der batch-Phase erfolgte die Probenentnahme täglich. Weitere Informationen zur Reaktorvorbereitung, zu Medien und Kulturbedingungen wurden von Schellenberg et al. beschrieben. Durch Ersetzen der mitgelieferten Septumkappe durch einen 4-Wege-Zugabeport aus Metall (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) wurde ein Bypass zur Installation der NIR-streuenden Durchflusszelle und einer neuartigen mikrofluidischen Zellretentionsvorrichtung eingerichtet.

## 12.6. Hochzelldichte-Kultivierung mit *Komagataella phaffii*

Die Kultivierung von *Komagataella phaffii* GS115 (his4) erfolgte in einem Edelstahl-Bioreaktor (Biostat<sup>®</sup> Cplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 30 L. Die Zellen wurden zuvor mit dem Expressionsvektor pPic9K-GelMP transformiert, um ein Gelatine-mimetisches Protein (GelMP) herzustellen. Die Vorkultur wurde in Schüttelkolben angezogen, bis eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 10-15 erreicht war. Die Zellen wurden anschließend zur Inokulation der Hauptkultur mit einer  $OD_{600} = 0,1$  und einem Gesamtvolumen von 10 l verwendet. Der Prozess wurde bei 30 °C, einem pH-Wert von 5, einem Gehalt an gelöstem Sauerstoff (DO) von 30 % Luftsättigung und einer Gasflussrate von  $10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgeführt. Nach Erschöpfung der Kohlenstoffquelle (Glycerin) wurde die Methanolzufuhr auf 0,2 % v/v Methanol eingestellt, um die GelMP-Produktion einzuleiten. Weitere Informationen, einschließlich Medien und Reaktorvorbereitung, sind von Gellermann et al. beschrieben.

## 12.7. Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers

### 12.7.1. Affinitätschromatographie mit Protein A

Der monoklonale Antikörper wurde in CHO DG44-Zellen produziert und in das Zellmedium sekretiert. Im Hinblick auf die weitere Verwendung des Antikörpers muss dieser zunächst aufgereinigt werden. Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren des Zellkulturmediums aus dem Überstand entfernt. Anschließend wurde eine zweistufige Tiefenfiltration mit Sartoclear<sup>®</sup> DL90 und Sartoclear<sup>®</sup> DL20 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die geklärte Lösung wurde dann mit einer Protein-A-Säule HiTrap<sup>™</sup> Protein A HP (Säulenvolumen 1 mL, GE Healthcare, Chicago, USA) gereinigt, die in ein ÄKTA-Pure-Chromatographiesystem (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) eingebaut war. Ein Chromatographielauf besteht aus verschiedenen Phasen, die mit einer Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgeführt wurden. Zunächst wurde die Protein-A-Säule mit Äquilibrierungspuffer gespült, dann wurde der geklärte Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Probe wurde zuvor mit einem  $0,45 \mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter filtriert. Alle ungebundenen Substanzen wurden in einem Waschschriff mit Äquilibrierungspuffer

entfernt, gefolgt von der Elution des Antikörpers mit Elutionspuffer und einem abschließenden CIP-Schritt (cleaning in place) mit CIP-Puffer und der Regeneration der Säule mit Äquilibrationpuffer.

### **12.7.2. Anionenaustauschchromatographie**

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine HiTrap Q HP Säule (Säulenvolumen 1 ml, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) im Flow-through-Modus verwendet. Das System wurde vollständig mit Äquilibrationpuffer gespült und äquilibriert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und mit Äquilibrationpuffer gewaschen. Die die Elution wurde der Anteil an Elutionspuffer im Probenstrom mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumina (CV) bis auf 50 % erhöht. Der CIP-Schritt wurde anschließend mit 100 % Elutionspuffer durchgeführt. Während des Versuchs wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einer 1,5 mm Absorptionsmesszelle überwacht (exakte Pfadlänge: 1,19 mm) überwacht.

### **12.7.3. DNA-Aufreinigung für Spiking-Versuche**

Zur Aufreinigung von DNA werden 50 ml einer CHO DG44 Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt und bei maximaler Drehzahl für 10 min zentrifugiert. Das entstehende Präzipitat wird in 4 ml CTAB-Extraktionspuffer resuspendiert und bei 60 °C für 1 h inkubiert. Anschließend werden 4 ml Chloroform:Isoamylalkohol hinzugegeben und die Lösung bei 1800 x g für 4 min zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur erneuten Extraktion werden nun 3 ml Chloroform:Isoamylalkohol sowie 300 µl 5M NaCl Lösung zugegeben. Nach der Zentrifugation und der Überführung der oberen Phase, werden 3 ml eiskaltes Ethanol zugegeben und die Lösung vorsichtig gemischt. Nach 30-minütiger Wartezeit wird die Lösung bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Das entstehende Präzipitat wird in 2-3 ml RNase freiem Wasser gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop ergibt eine DNA-Konzentration von 3.729,47 ng/µl.

### **12.7.4. Herstellung von Antikörper-Aggregaten durch wiederholtes Einfrieren**

Die Antikörper-Stammlösung wird auf eine Konzentration von 1 g\*l<sup>-1</sup> verdünnt. Die Lösung wird in verschiedene Proben mit einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgeteilt.

Die Proben wurden für 1 min in einem Kühlbad (Trockeneis, 99,9 % Ethanol) eingefroren und dann 4 min bei 30 °C und 300 rpm in einem Thermoschüttler aufgetaut. Der Vorgang wurde für 10 bis 50 Zyklen wiederholt. Es wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zyklen getestet, um die optimalen Parameter für die Aggregatbildung zu ermitteln.

### 12.7.5. Optische Detektion von Antikörper-Aggregaten

Die durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen behandelten Proben, werden mit einer Spritze aufgezogen und über ein Schlauchstück in eine Absorptionsmesszelle mit 1,5 mm Pfadlänge gefüllt. Die Messzelle wird in den zugehörigen Messzellenhalter gesetzt und dieser mit einem faseroptischen Spektrometer (TIDAS S520) verbunden. Gemäß Abschnitt 12.2.1 wird ein Absorptionsspektrum der Probe aufgenommen. Als Referenz dient dabei der Laufpuffer der HPLC-SEC. Die aufgenommenen Spektren der verschiedenen Proben werden anschließend durch Anwendung eines Savitzky-Golay-Filters (Filterbreite  $w=11$ , Ordnung  $o=2$ ) nachbearbeitet und nach Auftragung in ein Koordinatensystem miteinander verglichen.

### 12.7.6. Berechnung des Aggregationsindex

Der Aggregationsindex wird als Qualitätsindikator für das aufgereinigte Produkt verwendet. Er beschreibt die Menge der aggregierten Antikörper im Verhältnis zur Gesamtmenge der Antikörper in der Probe und kann nach Formel 12.3 berechnet werden.

$$AI = \left( \frac{OD_{350}}{OD_{280} - OD_{350}} \right) * 100 \quad (12.3)$$

### 12.7.7. HPLC-SEC

Die Konzentrationen von Antikörperaggregaten und -fragmenten wurden mit einem kommerziellen HPLC-System (Chromaster, VWR International, Radnor, USA) analysiert, das mit der Säule Yarra™ 3 µm SEC-3000 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) betrieben wurde. Die Proben wurden auf eine Konzentration von etwa  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  verdünnt, gefiltert (0,22 µm) und in einem Autosampler (10 °C) gekühlt. Das System wurde auf eine Flussrate von  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt, wobei eine Kombination aus 100 mM Natriumphosphat-Puffer und 100 mM Natriumsulfat bei pH 6,6 als mobile

Phase verwendet wurde. Die Temperatur des Säulenofens betrug 25 °C, die Temperatur des Autosamplers 10 °C und das Injektionsvolumen 5 µl.

### **12.7.8. Nachbearbeitung der Spektraldaten**

Die aufgenommenen Intensitätsspektren wurden mit MATLAB® (The MathWorks, Inc., US) verarbeitet. Zunächst wurden die Daten des Äquilibrationsschritts entfernt und negative Datenpunkte herausgefiltert. Das Referenzspektrum wird durch Mittelwertbildung der ersten zehn aufgenommenen Spektren des Basisliniensignals berechnet. Für jede weitere Messung wird die Absorption unter Verwendung des Referenzspektrums berechnet und mit einem Medianfilter geglättet (Fensterbreite  $f=41$ ). Chromatogramme können über die Zeit und für verschiedene Wellenlängen erstellt werden. Für den Vergleich bestimmter Absorptionsspektren wird der Zeitpunkt der maximalen Absorption (Peakmaximum) automatisch ermittelt. Auf das ausgewählte Absorptionsspektrum wird vor dem Plotten ein Savitzky-Golay-Filter angewendet (Filterbreite  $w=11$ , Ordnung  $o=2$ ).

# Literaturverzeichnis

- [1] S. F. Abu-Absi, L. Yang, P. Thompson, C. Jiang, S. Kandula, B. Schilling, and A. A. Shukla. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(6):894–905, 2010.
- [2] Adriana G. Lopes. Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations. *Food and bioproducts processing*, 93:98–114, Jan. 2015. PubAg AGID: 5431243.
- [3] R. Bareither and D. Pollard. A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnology Progress*, 27(1):2–14, Feb. 2011.
- [4] O. J. Böhl, J. Schellenberg, J. Bahnemann, B. Hitzmann, T. Scheper, and D. Solle. Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process. *Engineering in Life Sciences*, 21(3-4):196–207, 2021.
- [5] P. Biechele, C. Busse, D. Solle, T. Scheper, and K. Reardon. Sensor systems for bioprocess monitoring. *Engineering in Life Sciences*, 15(5):469–488, 2015.
- [6] C. Busse, P. Biechele, I. de Vries, K. F. Reardon, D. Solle, and T. Scheper. Sensors for disposable bioreactors. *Engineering in Life Sciences*, 17(8):940–952, aug 2017.
- [7] C. Challener. Single-use bioreactors have reached the big time. *BioPharm International*, 30, 2017.
- [8] G.-Q. Chen. Production of Polyhydroxyalkanoates. pages 655–692. Jan. 2017.
- [9] A. Christler, T. Scharl, D. G. Sauer, J. Köppl, A. Tscheließnig, C. Toy, M. Melcher, A. Jungbauer, and A. Dürauer. Technology transfer of a monitoring system to predict product concentration and purity of biopharmaceuticals in real-time during chromatographic separation. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(10):3941–3952, 2021.
- [10] J. Claßen, F. Aupert, K. F. Reardon, D. Solle, and T. Scheper. Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(3):651–666, Jan. 2017.



- 
- [11] J. L. Claßen. Multimodale spektroskopie zur Überwachung von chozellkultivierungen, 2019.
- [12] D. De Wilde, T. Dreher, C. Zahnow, U. Husemann, G. Greller, T. Adams, and C. Fenge. Superior Scalability of Single-Use Bioreactors. *Innovations in Cell Culture*, page 14, 2014.
- [13] C. Demuth. Chemische Sensoren in der Bioprozessanalytik. *Chemie in unserer Zeit*, 48(1):60–67, 2014.
- [14] A. Dunn and R. Richards-Kortum. Three-dimensional computation of light scattering from cells. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2(4):898–905, Dec. 1996.
- [15] A. Enders, J.-A. Preuss, and J. Bahnemann. 3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention. *Micromachines*, 12(9):1060, Sept. 2021.
- [16] S. M. Faassen and B. Hitzmann. Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(5):10271–10291, Apr. 2015.
- [17] A. Geipel-Kern. Einweg-technologien werden für biotech-industrie wichtiger. *Process*, 28-9, 2009.
- [18] P. Gellermann, C. Schneider-Barthold, S. N. Bolten, E. Overfelt, T. Scheper, and I. Pepelanova. Production of a Recombinant Non-Hydroxylated Gelatin Mimetic in *Pichia pastoris* for Biomedical Applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(3):39, Sept. 2019.
- [19] K. V. Gernaey, A. E. Lantz, P. Tufvesson, J. M. Woodley, and G. Sin. Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. *Trends in Biotechnology*, 28(7):346–354, July 2010.
- [20] J. Harms, X. Wang, T. Kim, X. Yang, and A. S. Rathore. Defining Process Design Space for Biotech Products: Case Study of *Pichia pastoris* Fermentation. *Biotechnology Progress*, 24(3):655–662, 2008.

- 
- [21] J. Hemmerich, S. Noack, W. Wiechert, and M. Oldiges. Microbioreactor Systems for Accelerated Bioprocess Development. *Biotechnology Journal*, 13(4):1700141, 2018.
- [22] F. Hinderer. *UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie*. Springer-Verlag GmbH, Oct. 2020.
- [23] P. v. Hoek, J. Harms, X. Wang, and A. S. Rathore. *Case Study on Definition of Process Design Space for a Microbial Fermentation Step*. Oct. 2008.
- [24] W.-T. Hsu, R. P. S. Aulakh, D. L. Traul, and I. H. Yuk. Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology*, 64(6):667–678, Dec. 2012.
- [25] M. Jiang, K. A. Severson, J. C. Love, H. Madden, P. Swann, L. Zang, and R. D. Braatz. Opportunities and challenges of real-time release testing in biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(11):2445–2456, 2017.
- [26] V. Jossen, R. Eibl, and D. Eibl. Single-Use Bioreactors – An Overview. *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, pages 37–52, Aug. 2019.
- [27] V. Jossen, R. Eibl, R. Pörtner, M. Kraume, and D. Eibl. Stirred bioreactors: current state and developments, with special emphasis on biopharmaceutical production processes. *Current developments in biotechnology and bioengineering*, pages 179–215, 2017.
- [28] R. W. Kessler. *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*. Wiley-VCH Verlag, 2006.
- [29] B. J. Kim, J. Diao, and M. L. Shuler. Mini-scale bioprocessing systems for highly parallel animal cell cultures. *Biotechnology Progress*, 28(3):595–607, June 2012.
- [30] M. Kinnunen and A. Karmenyan. Overview of single-cell elastic light scattering techniques. *Journal of Biomedical Optics*, 20(5):051040, mar 2015.
- [31] M. Kirsch, A.-C. Herder, C. Boudot, A. Karau, J. Rach, W. Handke, A. Seltsam, T. Scheper, and A. Lavrentieva. Xeno-Free In Vitro Cultivation and Osteogenic Differentiation of hAD-MSCs on Resorbable 3D Printed RESOMER®. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(15):E3399, July 2020.

- [32] B. G. Kitchener, J. Wainwright, and A. J. Parsons. A review of the principles of turbidity measurement. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*, 41(5):620–642, Oct. 2017.
- [33] M. Lanan. QbD for Raw Materials. In *Quality by Design for Biopharmaceuticals*, chapter 11, pages 193–209. John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- [34] T. H. Lücking. Entwicklung einer universellen Bypass-Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen, 2015.
- [35] F. Li, Y. Hashimura, R. Pendleton, J. Harms, E. Collins, and B. Lee. A Systematic Approach for Scale-Down Model Development and Characterization of Commercial Cell Culture Processes. *Biotechnology Progress*, 22(3):696–703, 2006.
- [36] X. Li, K. Scott, W. J. Kelly, and Z. Huang. Development of a Computational Fluid Dynamics Model for Scaling-up Ambr Bioreactors. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(6):710–725, Nov. 2018.
- [37] N. D. Lourenço, J. A. Lopes, C. F. Almeida, M. C. Sarraguça, and H. M. Pinheiro. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4):1211–1237, Sept. 2012.
- [38] T. Nagraik, A. G. Salcedo, D. Solle, and T. Scheper. Process Optimization using High Throughput Automated Micro-Bioreactors in Chinese Hamster Ovary Cell Cultivation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (159):e60577, May 2020.
- [39] H. Narayanan, M. F. Luna, M. von Stosch, M. N. Cruz Bournazou, G. Polotti, M. Morbidelli, A. Butté, and M. Sokolov. Bioprocessing in the Digital Age: The Role of Process Models. *Biotechnology Journal*, 15(1):1900172, 2020.
- [40] A. S. Rathore. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends in Biotechnology*, 27(9):546–553, Sept. 2009.
- [41] A. S. Rathore and H. Winkle. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 27(1):26–34, Jan. 2009.
- [42] T. Reinecke, P. Biechele, M. Sobocinski, H. Suhr, K. Bakes, D. Solle, H. Jantunen, T. Scheper, and S. Zimmermann. Continuous noninvasive monitoring of cell

- growth in disposable bioreactors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251:1009–1017, Nov. 2017.
- [43] M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, C. Grimm, D. Solle, and T. Scheper. Comparative study of non-invasive monitoring via infrared spectroscopy for mammalian cell cultivations. *Journal of Biotechnology*, 168(4):636–645, Dec. 2013.
- [44] T. Scheper, S. Beutel, N. McGuinness, S. Heiden, M. Oldiges, F. Lammers, and K. F. Reardon. Digitalization and Bioprocessing: Promises and Challenges. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 57–69. Springer International Publishing, Cham, 2021.
- [45] A. Schmidt, H. Helgers, F. L. Vetter, A. Juckers, and J. Strube. Digital Twin of mRNA-Based SARS-COVID-19 Vaccine Manufacturing towards Autonomous Operation for Improvements in Speed, Scale, Robustness, Flexibility and Real-Time Release Testing. *Processes*, 9(5):748, May 2021.
- [46] W. Schmidt. *Optische Spektroskopie*. Wiley-VCH, WeinheimNew YorkChichester-BrisbaneSingaporeToronto, 2000.
- [47] I. G. Siller, A. Enders, T. Steinwedel, N.-M. Epping, M. Kirsch, A. Lavrentieva, T. Scheper, and J. Bahnemann. Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials. *Materials*, 12(13):2125, Jan. 2019.
- [48] R. D. Snee. Quality by Design: Building Quality into Products and Processes. *Statistics for Biology and Health*, pages 461–499. Springer International Publishing, Cham, 2016.
- [49] D. Solle, B. Hitzmann, C. Herwig, M. Pereira Remelhe, S. Ulonska, L. Wuerth, A. Prata, and T. Steckenreiter. Between the Poles of Data-Driven and Mechanistic Modeling for Process Operation. *Chemie Ingenieur Technik*, 89(5):542–561, 2017.
- [50] R. Ulber, J.-G. Frerichs, and S. Beutel. Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(3):342–348, June 2003.
- [51] H. C. van de Hulst. *Light scattering by small particles*. Dover Publications, New York, 1981.

- [52] D. P. Wasalathanthri, R. Shah, J. Ding, A. Leone, and Z. J. Li. Process analytics 4.0: A paradigm shift in rapid analytics for biologics development. *Biotechnology Progress*, 37(4):e3177, 2021.
- [53] D. Watson, N. Hagen, J. Diver, P. Marchand, and M. Chachisvilis. Elastic Light Scattering from Single Cells: Orientational Dynamics in Optical Trap. *Biophysical Journal*, 87(2):1298–1306, Aug. 2004.
- [54] D. Wendt. Biotrends: disposable processing systems: how suppliers are meeting today's biotech challenges from fluid handling to filtration. *BioPharm International*, 18-22, 2003.

# Abbildungsverzeichnis

3.1. Wellenlängenbereiche spektroskopischer Verfahren in der Bioprozess- überwachung mit zugehörigen Analyten . . . . .	7
3.2. Schematische Darstellung zur Wechselwirkung von Licht mit Partikeln in einer Probe . . . . .	8
3.3. Schematische Darstellung zur winkelabhängigen Intensitätsverteilung bei verschiedenen Partikelgrößen. . . . .	12
3.4. Übersicht erhältlicher Single-Use Bioreaktorsysteme. . . . .	14
4.1. Schematische Darstellung des Sensorkonzepts . . . . .	19
4.2. Zeichnung und Querschnitt der Absorptionmesszelle . . . . .	20
4.3. Mehrkanal-Absorptionmesszelle . . . . .	21
4.4. Querschnitt der Mehrkanal-Absorptionmesszelle . . . . .	21
4.5. Technische Zeichnung und Querschnitt der Streulicht-Messzelle . . . .	22
4.6. Notwendige Komponenten des Absorptionsmoduls . . . . .	23
4.7. Messzellenhalter der Einzelpfadlängen-Messzelle . . . . .	24
4.8. Messzellenhalter der Multipfadlängen-Messzelle . . . . .	25
4.9. Messzellenhalter der Streulicht-Messzelle . . . . .	26
4.10. Installation von verschiedenen Schläuchen an die Messzelle . . . . .	26
4.11. Exemplarische Integration der Messzelle in ein Bypasssystem durch ste- riles Verschweißen von thermoplastischen Schläuchen . . . . .	27
5.1. Ergebnisse des CellTiter-Blue®-Zellviabilitätstests . . . . .	31
5.2. Transmissionsspektren verschiedener Fenstermaterialien . . . . .	33
5.3. Verweilzeitspektren von Messzellen mit verschiedenen Pfadlängen bei unterschiedlichen Flussraten . . . . .	34
6.1. Transmissionsspektren einer Charge von Messzellen . . . . .	37
6.2. Bestimmung der exakten Pfadlänge . . . . .	38
6.3. Absorptionmessungen mit unterschiedlich konzentrierten Amaranth- Lösung . . . . .	39
6.4. Linearer Messbereich verschiedener Pfadlängen . . . . .	41
6.5. Dynamische Absorptionmessung mit Absorptionmesszellen einer be- stimmten Pfadlänge . . . . .	42

---

6.6. PLS-Regression zur Quantifizierung verschiedener Analyten . . . . .	45
6.7. Regressionskoeffizienten der Kalibrationsmodelle . . . . .	47
7.1. Wachstumskurven der CHO-DG44 Batch-Kultivierung im Schüttelkolben	51
7.2. Metabolitkonzentrationen der CHO-DG44 Batch-Kultivierung im Schüttelkolben . . . . .	52
7.3. Vergleich der viablen Zellzahl mit den Absorptionsdaten des Sensorsystems . . . . .	53
7.4. Streulichtmessungen während eines fed-batch-Prozesses mit CHO-DG44 Zellen . . . . .	55
7.5. Viable Zellzahl im Verlauf des Perfusionsprozesses . . . . .	58
8.1. Streulichtmessungen während einer Hochzelldichtekultivierung mit <i>Komagataella phaffii</i> . . . . .	61
9.1. Chromatogramm des Capture-Schritts zur Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers . . . . .	66
9.2. Chromatogramme der Anionenaustauschchromatographie . . . . .	68
9.3. Spiking-Experiment mit verschiedenen DNA-Konzentrationen . . . . .	69
9.4. Auftragung der Peakflächen gegen die DNA-Konzentration . . . . .	70
9.5. Chromatogramme der HPLC-SEC . . . . .	72
9.6. Absorptionsspektren zur Detektion von Antikörper-Aggregaten . . . . .	74
12.1. Versuchsaufbau zur Aufnahme von Verweilzeitspektren . . . . .	97
12.2. Aufbau zur Gradientenmessung . . . . .	99

# Tabellenverzeichnis

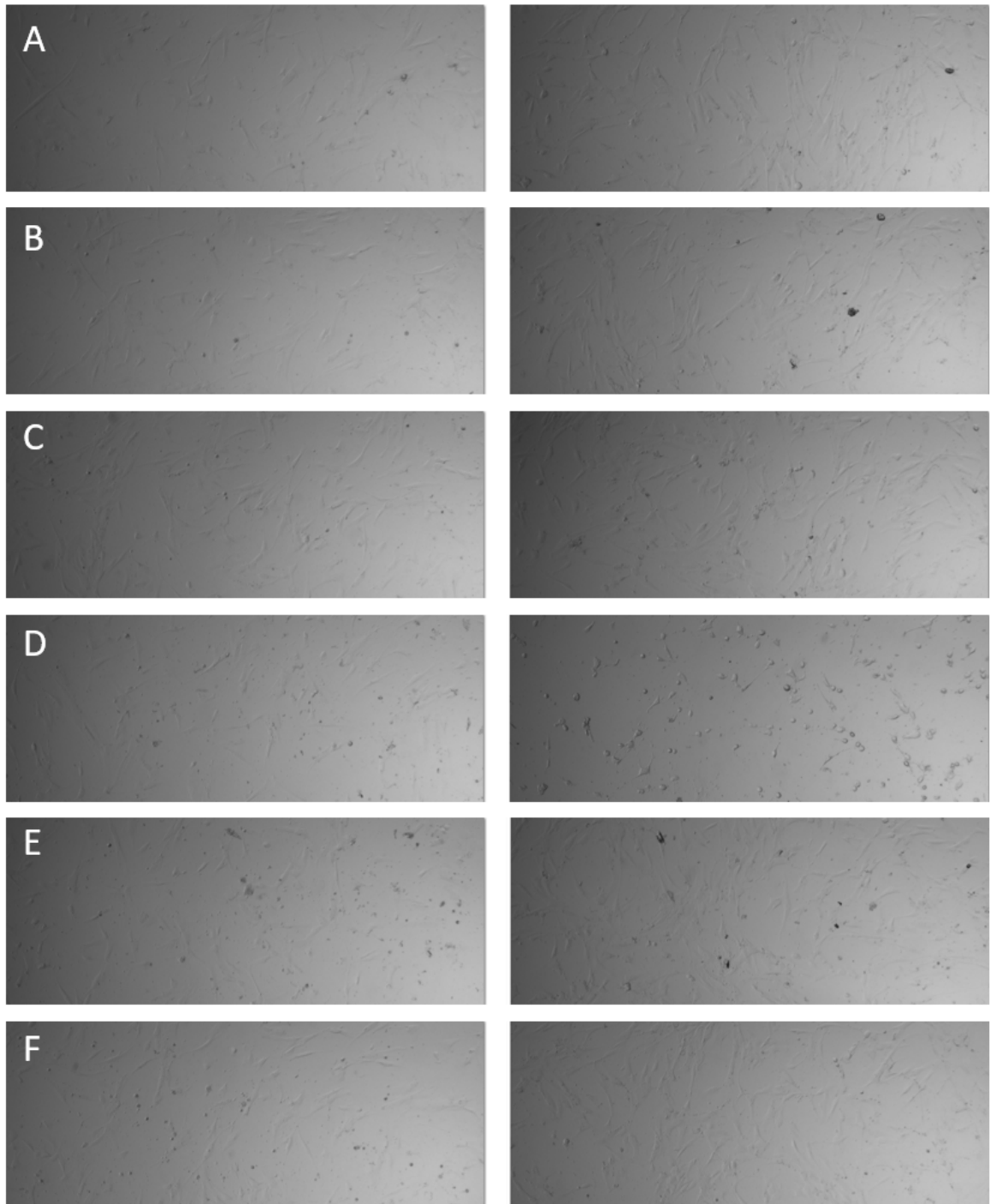
6.1. Regressionsparameter der Daten zur Bestimmung des linearen Messbereichs verschiedener Pfadlängen der Mehrkanal-Absorptionsmesszelle	41
6.2. Regressionsparameter der Kalibrationsmodelle . . . . .	46
9.1. Analyse der Peakflächen der zur Überwachung des Capture-Schritts verwendeten Sensorsysteme . . . . .	66
9.2. Analyse der Peakflächen und -höhen der HPLC-SEC Chromatogramme	73
9.3. Berechnung der Aggregationsindizes, basierend auf den mit dem Sensorsystem ermittelten Absorptionswerten . . . . .	75
11.1. Chemikalien und Reagenzien . . . . .	80
11.2. Geräte . . . . .	82
11.3. Verbrauchsmaterialien . . . . .	83
11.4. Programme . . . . .	84
11.5. 3D-Drucker . . . . .	85
11.6. 3D-Druckmaterialien . . . . .	85
11.7. Lösungen und Puffer . . . . .	85
11.8. Mikroorganismen und Zelllinien . . . . .	87
11.9. Medien und Zusätze zur Kultivierung mesenchymaler Stammzellen . .	87
11.10 Stammlösungen und Medien zur Kultivierung von <i>Komagataella phaffii</i>	87
11.11 Zusammensetzung des Fermentationsmediums zur Kultivierung von <i>Komagataella phaffii</i> . . . . .	89
11.12 Medien zur Kultivierung von CHO-DG44 Zellen . . . . .	89
12.1. Verfügbare Pfadlängen der Einweg-Messzelle und zugehörige Volumina der Messkammern . . . . .	92
12.2. Wellenlängen der im LEDSpec verbauten LEDs . . . . .	93
12.3. Herstellung der im Design of Experiment verwendeten Stammlösungen	100
12.4. Zusammensetzung der verschiedenen Mischlösungen . . . . .	101
A.1. Eignung verschiedener Methoden zur Sterilisation und Desinfektion von 3D-Druckmaterialien . . . . .	118



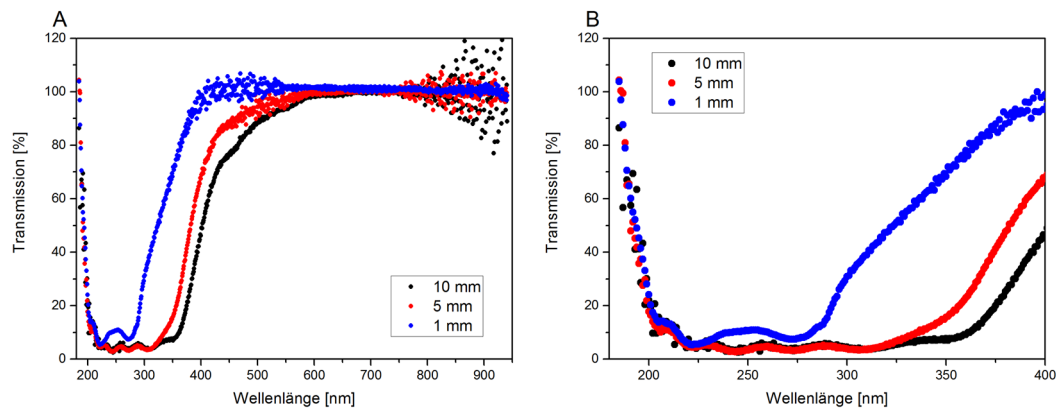
# A. Zusätzliche Experimentelle Daten

Tabelle A.1.: Überblick über die Effizienz verschiedener Methoden zur Sterilisation von 3D-Druck Materialien. Keine Kontamination (++), teilweise Kontamination (+ -), alle Proben kontaminiert (- -)

Methode	Einwirkzeit	Druckmaterial				
		ABS	PA	PMMA	M2R-CL	AR-M2
Ethanol	1 h	--	++	--	- +	++
	24 h	--	++	++	++	++
Isopropanol	1 h	- +	+ -	++	++	++
	24 h	--	++	++	++	++
Hypochlorit	1 h	++	++	++	++	++
	24 h	++	++	++	++	++
UV	10 min pro Seite	++	++	++	++	++
Gamma-Strahlung	>25 kGy	++	++	++	++	++



**Abbildung A.1.: Durchlichtmikroskopaufnahmen der mesenchymalen Stammzellen AD37A.** Zu sehen sind Zellen vor Inkubation mit Extraktionsmedien (links) sowie 24 h nach Inkubation mit Extraktionsmedien der folgenden Materialien: ABS (A), PA (B), PMMA (C), Positivkontrolle (D), Negativkontrolle (E), Blindprobe (F).



**Abbildung A.2.: Transmissionsspektren von Zellkulturmedium CHOMACS für Kultivierung von CHO-Zellen bei unterschiedlichen Pfadlängen.** Für die Referenzmessung wurde Reinstwasser in die Messzelle gefüllt.

## **B. Unterstützende Arbeiten**

Teile der experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Zusammenhang einer studentischen Abschlussarbeit unter Anleitung und in Zusammenarbeit mit dem Autor der Dissertation durchgeführt.

### **Bachelorarbeit**

Melina Polichronidis: Evaluierung der Sterilität und Biokompatibilität einer additiv gefertigten Durchflussmesszelle. März - Mai 2019. Teilergebnisse sind in Abschnitt 5.1 verwendet worden

# C. Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

**Name:** Tobias Steinwedel  
**Geburtstag und -ort:** 21.04.1994, Gehrden  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

## Ausbildung

**12/2017 - 04/2022** Leibniz Universität Hannover  
Promotion im Fach Chemie

**10/2015 - 09/2017** Leibniz Universität Hannover  
Master of Science in Life Science

**10/2012 - 09/2015** Leibniz Universität Hannover  
Bachelor of Science in Life Science

**2004 - 2012** Matthias Claudius Gymnasium Gehrden  
Allgemeine Hochschulreife

# D. Publikationsliste

## Veröffentlichungen

Raithel, P., **Steinwedel, T. (20%)**, Belz, M., Solle, D. (2021). Disposable flowcell for spectroscopic analysis in bioprocesses. In *Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics, Treatment and Environmental Applications XXI* (Vol. 11635, p. 1163514). International Society for Optics and Photonics.

**Steinwedel, T. (60%)**, Dahlmann, K., Solle, D., Scheper, T., Reardon, K.F. and Lambers, F. (2019). Sensors for Disposable Bioreactor Systems. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA; pp. 69-82.

Siller, I. G., Enders, A., **Steinwedel, T. (5%)**, Epping, N. M., Kirsch, M., Lavrentieva, A., Scheper, T., Bahnemann, J. (2019). Real-time live-cell imaging technology enables high-throughput screening to verify in vitro biocompatibility of 3D printed materials. *Materials*, 12(13), 2125.

König, J.C., **Steinwedel, T. (20%)**, Solle, D., Lindner, P., de Vries, I., Hentrop, T., Findeis, M., John, G.T., Scheper, T. and Beutel, S., 2018. Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, 7(2), pp.461-467.

## Patente

Belz, M., Raithel, P., Solle, D., **Steinwedel, T. (20%)** (2021). Flow cell system for optical fluid analysis and bioreactor system. *Internat. Publication No. WO 2021/094009 A1*. Genf, Schweiz. World International Property Organization

## Vorträge

König, J.C., **Steinwedel, T.**, Solle, D., Lindner, P., De Vries, I., Hentrop, T., Findeis, M., John, G.T., Scheper, T., Beutel, S., Development and characterisation of a new fluorescence sensor for online monitoring of bioprocesses. *2nd European Biosensor Symposium 2019*, Florenz, Italien

## Posterbeiträge

**Steinwedel, T. (80%)**, Raithel, P., Belz, M., Solle, D., Scheper, T., BioFlowCell - Hochintegrierte optische Einweg-Messzellen zur spektroskopischen Bioprozessüberwachung, *14. Kolloquium Prozessanalytik*, Hannover, 2018