

Multimodale Spektroskopie zur Überwachung von CHO-Zellkultivierungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Jens Lukas Claßen, M. Sc. (RWTH)

2019

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Prozessanalytik und Getreidewissenschaften
Universität Hohenheim

Tag der Promotion: 21.05.2019

**„Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
Nach dem Gesetz, dem Grund, *Warum* und *Wie*.“**

**Johann Wolfgang von Goethe
(1749 - 1832)**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben. Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheper dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Danke für die Bereitstellung des spannenden, anwendungsorientierten Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung während dieser Zeit. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Hitzmann für die Übernahme des Korreferats sowie PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Frau Dr. Dörte Solle für die ausgezeichnete Betreuung und die wertvollen Ratschläge während meiner ganzen Zeit am TCI. Herzlichen Dank für das Korrekturlesen meiner Dissertation und das Ermöglichen der Teilnahme an zahlreichen Konferenzen. Vielen Dank für die immer offenstehende Tür.

Allen Mitgliedern der AG Solle und Bahnemann danke ich für die tolle Zeit in der Zellkultur. Auch bedanke ich mich bei meinem Bacheloranden Jonathan Nyenhuis für das wissenschaftliche Engagement und die Unterstützung bei Teilprojekten dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann für die großartige Unterstützung bei technischen Fragestellungen. Bei Cornelia Alic, Ulrike Dreschel, Martina Weiß, Martin Pähler und Dr. Ivo Havlik bedanke ich mich für die ganz tolle Unterstützung bei sämtlichen Angelegenheiten im betrieblichen Alltag.

Ein herzlicher Dank geht an Florian, Daniel, Jule und Tammi für die gute Freundschaft und die unvergessliche Zeit mit ihnen in Hannover! Bei Flo und Tammi möchte ich mich für die einzigartige Zusammenarbeit bedanken – wir waren ein gutes Team. Daniel danke ich für die gute Freundschaft seit Beginn des Bachelorstudiums. Danke an alle TCI'ler für die letzten drei wunderschönen Jahre.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und an meine Geschwister für die bedingungslose Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Danke! Zu guter Letzt danke ich herzlichst meiner Freundin Yasmin für die Unterstützung und Geduld.

Kurzfassung

Biopharmazeutika haben heutzutage ein breites Anwendungsgebiet in der medizinischen Versorgung. Zur biotechnologischen Produktion dieser therapeutischen Proteine werden vor allem gentechnisch modifizierte Säugetierzellen eingesetzt. Säugetierzellen sind hoch empfindliche biologische Systeme, die sich nur bei idealen Umgebungsbedingungen vermehren und ein Produkt bilden. Um die richtigen Bedingungen während der Kultivierung von Zellen stets zu erfüllen, hat die Bioprozessüberwachung eine entscheidende Bedeutung. Dabei besteht die besondere Herausforderung, viele Größen, bei oft niedrigen Konzentrationen, über einen langen Zeitraum zu überwachen. Eine gute Möglichkeit zur Überwachung solcher Größen stellt die Spektroskopie dar.

Diese Arbeit beschreibt die Evaluierung der 2D-Fluoreszenz-, der UV/VIS-, und der Raman-Spektroskopie zur Überwachung von Säugetierzellkultivierungen. Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht welche im Bioprozess relevanten Analyten nebeneinander in komplexen Lösungen mit den verschiedenen spektroskopischen Methoden detektiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der spektroskopischen Methoden unterschiedliche Analyten simultan nebeneinander detektiert werden können. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein SIP- (engl. *Sterilization-in-Place*) Bypass-System entwickelt, welches die Adaption spektroskopischer Sensoren an unterschiedliche Reaktorsysteme ermöglicht, ohne die Sterilität zu gefährden. Die sterile Adaption der Sensoren konnte an die sonst nicht zugänglichen Glasbioreaktoren mit dem SIP-Bypass-System ermöglicht werden.

Im Hauptteil der Arbeit wurden die spektroskopischen Methoden zur Echtzeitüberwachung von CHO-Zellkultivierungen evaluiert. Mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse wurden Kalibrationsmodelle für verschiedene Analyten erstellt. Die Modelle wurden zur Vorhersage von Analyten in weiteren Kultivierungen eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass unter anderem schwer zugängliche Größen, wie die metabolische Aktivität und die Viabilität der Zellen, durch die Spektroskopie überwacht werden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass anhand der Spektraldaten Prozessabweichungen frühzeitig über Prozesstrajektorien erkannt werden können.

Schlagwörter: 2D-Fluoreszenzspektroskopie, UV/VIS-Spektroskopie, Raman-Spektroskopie, Bioprozessüberwachung, Multivariate Datenanalyse, Säugetierzellkultivierung

Abstract

Biopharmaceuticals today have a wide range of applications in medical care. For the biotechnological production of these therapeutic proteins, genetically modified mammalian cells are mainly used. Mammalian cells are highly sensitive biological systems that only proliferate and build a product under ideal environmental conditions. Bioprocess monitoring is of crucial importance in ensuring that the right conditions are always met during the cultivation of cells. This has a particular challenge, since mammalian cell cultivation is a complex process in which a large number of factors, often at low concentrations, have to be monitored over a long period of time. One way to monitor these factors is to use spectroscopic methods.

This thesis describes the evaluation of 2D-fluorescence, UV/Vis, and Raman spectroscopy for mammalian cell culture monitoring. In the first part of the work, relevant analytes in the complex solutions of the bioprocess were investigated. The study has shown that different analytes can be detected side by side using spectroscopic methods. In addition, a SIP (Sterilization-in-Place) bypass system was developed, which allows the adaptation of spectroscopic sensors to different reactor systems without endangering sterility. The sterile adaptation of the sensors to the otherwise inaccessible glass bioreactors was made possible with the SIP bypass system.

In the main part of the work, the spectroscopic methods for real-time monitoring of CHO cell cultures were evaluated. Using multivariate data analysis, calibration models for different analytes were developed. The models were used to predict analytes in further cultivations. The results show that parameters that are difficult to access, such as metabolic activity and cell viability, can be monitored by spectroscopy. In addition, it could be shown that process deviations can be detected at an early stage via process trajectories on the basis of spectral data.

Keywords: 2D-fluorescence spectroscopy, UV/Vis spectroscopy, Raman spectroscopy, Bioprocess monitoring, Multivariate data analysis, Mammalian cell cultivation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung.....	2
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Säugetierzellkultivierungen in der Bioprozesstechnik.....	3
2.1.1	Metabolismus von Säugetierzellen.....	4
2.1.2	Zelltod in Säugetierzellen.....	7
2.1.3	Bioprozessüberwachung von Säugetierzellkultivierungen.....	9
2.1.4	Process Analytical Technology (PAT).....	11
2.2	Optische Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung.....	12
2.2.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	15
2.2.2	2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	17
2.2.3	Raman-Spektroskopie.....	19
2.3	Multivariate Datenanalyse.....	21
2.3.1	Hauptkomponentenanalyse – PCA.....	22
2.3.2	Multivariate Regression (PLS-Regression).....	23
2.3.3	Statistische Versuchsplanung (DoE).....	25
3	Spektroskopische Sensoren und Anbindung an den Bioprozess.....	27
3.1	UV/VIS-Spektrometer.....	27
3.2	2D-Fluoreszenzspektrometer.....	29
3.3	Berührungslose Raman-Spektroskopie.....	30
3.4	Entwicklung eines SIP-Bypass-Systems.....	31
3.4.1	Edelstahl Bypass-Kammern für die Spektroskopie.....	32
3.4.2	SIP-Bypass-System.....	33
3.4.3	<i>Scale-up</i> : Übertragbarkeit der Spektraldaten.....	35
4	Qualifizierung der spektroskopischen Methoden.....	36
4.1	Design of Experiments (DoE): UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	37
4.2	Design of Experiments (DoE): Raman-Spektroskopie.....	44
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Qualifizierung der spektroskopischen Methoden.....	50
5	CHO-K1 Zellkultivierungen im Bioreaktor.....	51
5.1	Übersicht der CHO-K1 Zellkultivierungen im 10 L Bioreaktor.....	52
5.2	Qualitative Untersuchung der UV/VIS- und 2DF-Spektroskopie.....	55
5.2.1	Analyse der 2D-Fluoreszenzspektren.....	55

5.2.2	Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren mit Hilfe der PCA	58
5.2.3	Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren anhand von Prozesstrajektorien.....	61
5.2.4	Analyse der UV/VIS-Spektren	64
5.2.5	Qualitative Untersuchung der UV/VIS-Spektren anhand von Prozesstrajektorien.....	66
5.3	Quantitative Untersuchung der Spektren: UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie	68
5.3.1	PLS-Modelle basierend auf 2D-Fluoreszenzspektren.....	68
5.3.2	PLS-Modelle basierend auf UV/VIS-Spektren.....	74
5.4	Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Untersuchung der 2D-Fluoreszenz-/UV/VIS-Spektren.....	78
5.5	Untersuchung der Nekrose und Apoptose in CHO-Kultivierungen.....	79
5.5.1	Cisplatin-induzierter Zelltod im 2 L Bioreaktor.....	79
5.6	Zusammenfassung der Apoptose und Nekrose Untersuchungen.....	86
6	CHO-DG44 Zellkultivierung zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers.....	86
6.1	Übersicht der CHO-DG44 Zellkultivierungen im 2 L Bioreaktor.....	87
6.2	Qualitative Untersuchung der Raman-Spektren	89
6.3	Quantitative Untersuchung der Raman-Spektren	94
6.4	Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Untersuchung der Raman-Spektren.....	97
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	98
8	Anhang.....	102
8.1	Materialien.....	102
8.1.1	Chemikalien.....	102
8.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	103
8.2	Methoden.....	104
8.2.1	Reaktorkultivierungen	104
8.2.2	<i>Offline</i> Analytik.....	109
8.2.3	Multivariate Datenanalyse.....	115
8.2.4	Datenvorverarbeitungsmethoden.....	116
8.2.5	Erstellung von statistischen Versuchsplänen	118
8.2.6	Ergänzende Daten.....	120
9	Literaturverzeichnis.....	124
10	Abbildungsverzeichnis.....	133
11	Unterstützende Arbeiten.....	139
12	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	140
13	Lebenslauf.....	141

Abkürzungsverzeichnis

%-sat	Sättigungsprozent
λ	Wellenlänge
ε	Absorptionskoeffizient
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
2DF	Zweidimensionale Fluoreszenz
A	Absorption
APC	Engl. <i>Allophycocyanin</i>
BEM	Engl. <i>Batch evolution model</i>
BSA	Engl. <i>Bovine serum albumine</i>
c	Konzentration
CHO	Engl. <i>Chinese hamster ovary</i>
CIP	Engl. <i>Cleaning in place</i>
cm^{-1}	Wellenzahl
CPP	Engl. <i>Critical process paramater</i>
d	Durchstrahlte Strecke
DNA	Engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DoE	Engl. <i>Design of Experiments</i>
Em	Emission
Engl.	Englisch
et al.	Lat. <i>et alii</i>
Ex	Exzitation
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GZK	Gesamtzellkonzentration
h	Engl. <i>hour</i> , Stunden
HOMO	Engl. <i>Highest occupied molecular orbital</i>
I_0	Anregungslicht
I_{Probe}	Abgeschwächtes Licht

K	Kultivierung
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	Engl. <i>Light-emitting diode</i>
LOD	Engl. <i>Limit of detection</i>
LOMO	Engl. <i>Lowest occupied molecular orbital</i>
LOQ	Engl. <i>Limit of quantification</i>
LZK	Lebendzellkonzentration
M	Molar
min	Minute
MSPC	Engl. Multivariate statistical process control
MTX	Methotrexat
MVDA	Multivariate Datenanalyse
NADH/NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
PAT	Engl. <i>Process analytical technology</i>
PBS	Engl. <i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Engl. <i>Principal component</i>
PCA	Engl. <i>Principal component analysis</i>
Phe	Phenylalanin
PI	Engl. <i>Propidium iodide</i>
PLS	Engl. <i>Partial least squares</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
QbD	Engl. <i>Quality by design</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
Reg.Koeff.	Regressionskoeffizient
Rel. AU	Engl. <i>relative amplitude units</i>
RFI	Engl. <i>Relative fluorescence intensity</i>
RMSE	Engl. <i>Root mean square error</i>
RMSEC	Engl. <i>Root mean square error of calibration</i>
RMSECV	Engl. <i>Root mean square error of cross validation</i>
RMSEP	Engl. <i>Root mean square error of prediction</i>

rpm	Engl. <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
S_0	Singulett-Grundzustand
$S_{1,2}$	Angeregter Elektronenzustand
Sacova	Engl. <i>Safe coupling valve</i>
SIP	Engl. <i>Sterilization in place</i>
SNV	Engl. <i>Standard normal variate</i>
T	Transmission
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
VIS	Engl. <i>visible</i> , sichtbares Licht
X	Unabhängige Variable
Y	Abhängige Variable
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Arzneimittel aus gentechnisch veränderten Hamsterzellen retten Leben.

In der medizinischen Biotechnologie werden Hamsterzellen als lebende Fabriken eingesetzt. Ihre Produktionsstätten sind moderne Bioreaktoren, Behälter, in denen die Zellen unter möglichst optimalen Bedingungen in einem Nährmedium herangezüchtet werden. Unter diesen Bedingungen vermehren sich die Zellen und produzieren ein wertbringendes Erzeugnis - ein biopharmazeutisches Arzneimittel. Das Innere eines Bioreaktor gleicht einer *Black Box*, in der unzählige Größen Einfluss auf Zellwachstum und Produktbildung haben. In der industriellen Produktion werden meist nur Größen, wie die Temperatur, der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt mit etablierten Messtechniken, zeitnah im Inneren des Bioreaktors erfasst. Weitere wichtige Größen, wie z.B. die vorhandene Nährstoffkonzentration oder die Viabilität der Zellen, können nur zu bestimmten Zeitpunkten durch eine Probeentnahme außerhalb des Bioreaktors untersucht werden. Suboptimale Bedingungen werden somit erst zeitverzögert erfasst, wodurch gegensteuernde Maßnahmen oft nur schwer möglich sind. Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge und der niedrigen Konzentrationen von zu überwachenden Größen steht die Messtechnik vor einer großen Herausforderung.

Damit diese unzähligen Größen möglichst in Echtzeit überwacht werden können, sind moderne Messtechniken nötig, die einen Blick in die *Black Box* ermöglichen. Hierfür werden spektroskopische Messmethoden eingesetzt, bei denen die Wechselwirkung von eingestrahlttem Licht mit Gegebenheiten innerhalb des Bioreaktors, Rückschlüsse über verschiedene Größen geben können. Durch den Einsatz verschiedener spektroskopischer Methoden, in Kombination mit modernen Datenauswertungsverfahren, können in Echtzeit gleichzeitig kontinuierlich Informationen über eine Vielzahl von Größen gewonnen werden. Die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit Licht geben beispielsweise Auskunft über die Nährstoffkonzentrationen, die metabolische Aktivität und die Viabilität der Zellen. Diese spektroskopischen Methoden dienen somit als Werkzeug, um die Umgebungsbedingungen im

Herstellungsprozess in Echtzeit zu verfolgen und Abweichungen frühzeitig zu erkennen, um damit zielführend eine hohe Quantität und Qualität der Arzneimittel zu gewährleisten.

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung der 2D-Fluoreszenz-, UV/VIS- und Raman-Spektroskopie für die Bioprozessüberwachung von CHO-Zellkultivierungen. Hierzu soll zunächst untersucht werden, ob die Analyten NADH, NAD, Riboflavin, FAD, Pyridoxin und das Modellprotein BSA nebeneinander in den typischen Konzentrationen innerhalb einer CHO-Zellkultivierung in komplexen Lösungen mit Hilfe der UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie detektierbar sind. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die Analyten Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat mit Hilfe der berührungslosen Raman-Spektroskopie nebeneinander gemessen werden können. Bei den Experimenten sollen vor allem die Sensitivität und Selektivität der jeweiligen Messmethode untersucht werden. Zusätzlich sollen die jeweiligen Detektionsgrenzen (LOD und LOQ) bestimmt werden. Des Weiteren soll ein System entwickelt werden, welches die sterile Anbindung von spektroskopischen Sensoren an unterschiedliche Bioreaktoren ermöglicht.

Im Fokus steht die Evaluierung der spektroskopischen Methoden für die qualitative und quantitative Überwachung von CHO-Zellkultivierungen. Hierbei sollen, mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse, Kalibrationsmodelle erstellt werden, die für die Vorhersage von Analyten in einer unabhängigen Kultivierung eingesetzt werden. Zusätzlich sollen anhand der Spektraldaten Prozesstrajektorien erstellt werden, wodurch eine frühzeitige Prozessabweichung realisiert werden kann. Anhand der Ergebnisse sollen die Möglichkeiten und Grenzen der drei spektroskopischen Methoden untersucht und diskutiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der Säugetierzellkultivierung und deren Bioprozessüberwachung beschrieben, die zum besseren Verständnis dieser Arbeit beitragen sollen.

2.1 Säugetierzellkultivierungen in der Bioprosesstechnik

Biopharmazeutika sind heutzutage in der medizinischen Versorgung nicht mehr wegzudenken. Sie werden in einem breiten Anwendungsbereich, wie z.B. bei Gerinnungsstörungen, Krebs-, Autoimmun- und Stoffwechselkrankheiten, erfolgreich eingesetzt. Als Biopharmazeutika werden Arzneimittel bezeichnet, die durch biotechnologische Methoden in gentechnisch veränderten Organismen hergestellt werden. Es sind meist komplexe rekombinante Proteine. Im Jahr 2017 machten Biopharmazeutika mit einem Umsatz von 10,2 Milliarden Euro 26% des gesamten deutschen Pharmamarktes aus [1]. 2017 wurde mit 23 neu zugelassenen Biopharmazeutika einem Anteil von 51% aller Neuzulassungen ein neuer Rekord aufgestellt. Dabei machen monoklonale Antikörper, Impfstoffe und Insuline 60% aller Wirkstoffarten der Biopharmazeutika aus. Der größte Entwicklungsschwerpunkt und Umsatz liegt in der Immunologie und Onkologie.

Heutzutage werden zur biotechnologischen Produktion von therapeutischen Proteinen, neben bakteriellen Wirtszelllinien, vor allem Säugetierzellen kultiviert. Ursprünglich konnten diese komplexen Proteine in aufwendigen Verfahren nur aus tierischem Gewebe bzw. Blutplasma gewonnen werden. In Säugetierzellen werden 60% aller Biopharmazeutika produziert. Das am häufigsten verwendete Expressionssystem ist hier die CHO-Zelle (engl. *Chinese Hamster Ovary*). Diese wurde im Jahr 1957 durch die Gewebeentnahme aus den Eierstöcken eines chinesischen Hamsters von T. Puck in den USA isoliert [2]. Die Ausgangszelllinie wurde durch Chemikalien immortalisiert, was zur Folge hatte, dass sich die davon abgeleitete Zelllinie CHO-K1 beliebig häufig teilen konnte [3].

Das gezielte Einbringen von genetischen Informationen für z.B. therapeutische Proteine ist durch die Hybridomatechnologie und der DNA Rekombinationstechniken bereits ausführlich entwickelt [4, 5]. CHO-Zellen sind seit zwei Jahrzehnten sichere Wirtszelllinien, wodurch die

Genehmigung durch Arzneimittelbehörden erleichtert wird. Die geringe Produktivität von komplexen Proteinen ist häufig ein Nachteil von Säugetierzellen und kann durch bestehende Genamplifikationen in CHO-Zellen erfolgreich umgangen werden [6, 7]. CHO-Zellen haben zudem eine hohe Effizienz bei posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Glykosylierung von Proteinen, die eine hohe strukturelle und funktionelle Bedeutung für die Bioaktivität beim Menschen besitzt [8]. Das Glykosylierungsmuster der rekombinanten Proteinen ist den Proteinen, die in den humanen Zellen produziert werden, sehr ähnlich [2].

Zusätzlich können CHO-Zellen leicht an das Wachstum in regulatorisch freundlichen serumfreien Suspensionsbedingungen angepasst werden [6]. Heutzutage werden CHO-Zellen für die Produktion von Biopharmazeutika in Rührkesselreaktoren mit einer Größe bis zu über 10.000 L in einer Suspension kultiviert. Diese werden sowohl im Batch-, Fed-batch als auch im Perfusionsbetrieb gefahren. In der pharmazeutischen Industrie werden die meisten Prozesse im Fed-Batch und Perfusionsverfahren betrieben [9].

Neben den genannten Vorteilen birgt die Kultivierung von CHO-Zellen auch diverse Herausforderungen. Säugetierzellen besitzen im Vergleich zu Bakterien keine Zellwand und sind somit sensibler für Zellschäden durch hydrodynamische und mechanische Einflüsse. Das Rühr- und Begasungssystem muss daher so eingestellt werden, dass es zu keiner Schädigung der Zellen kommt, jedoch eine ausreichende Durchmischung und Sauerstoffversorgung gewährleistet ist [2]. Des Weiteren sind CHO-Zellen empfindlich gegenüber Nährstofflimitierungen, Änderungen des pH-Wertes und der Osmolarität. Durch eine intensive Bioprozessüberwachung und Prozessregelung können diese Limitierungen vermieden werden.

2.1.1 Metabolismus von Säugetierzellen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen des Metabolismus von Säugetierzellen erläutert, die für das Verständnis der untersuchten Biomoleküle und für die Ergebnisse aus den praktischen Arbeiten notwendig sind. Die zentralen Stoffwechselwege in tierischen Zellen, in denen die untersuchten Biomoleküle eine entscheidende Bedeutung haben, sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

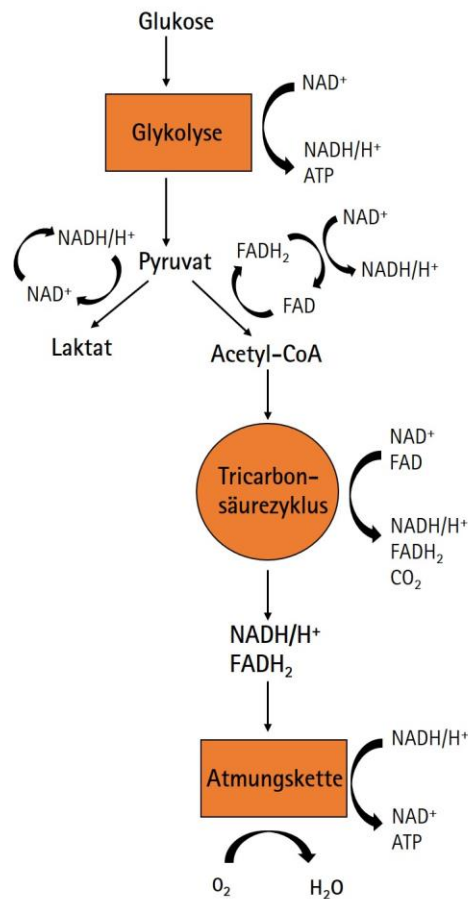


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zentralen Stoffwechselwege von tierischen Zellen (Vgl. [10]).

Während der Kultivierung nehmen Säugetierzellen Zucker, Aminosäuren, Lipide und Nucleoside aus dem Medium auf, um daraus Energie zu gewinnen und diese als Grundbausteine für das Zellwachstum, für die Zellvermehrung und die Produktbildung zu nutzen [7]. Innerhalb der metabolischen Aktivitäten sind die Coenzyme Nicotinamidadenindinucleotid (NAD⁺/NADH) und die von Vitamin B₂ (Riboflavin) sich ableitenden Biomoleküle Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) an zahlreichen Redoxreaktionen maßgeblich beteiligt. Dabei fungieren diese Coenzyme als biochemischer Elektronencarrier, wobei sie Elektronen von einem Substrat aufnehmen und an einen Elektronenakzeptor wieder abgeben [10]. NAD⁺ wird in Säugetierzellen aus der Nicotinsäure (Niacin, Vitamin B₃), Nicotinamid und als Abbauprodukt der Aminosäure Tryptophan gewonnen. Das oxidierte NAD⁺ wird in der Redoxreaktion durch die Aufnahme von 2 Elektronen und einem Proton zu NADH reduziert. Dies geschieht vor allem im Katabolismus

innerhalb der Glykolyse und dem Tricarbonsäurezyklus, bei denen die aufgenommenen Elektronen zur Gewinnung von dem energiereichen Adenosin Triphosphat (ATP) dienen.

In tierischen Zellen ist Glukose die wichtigste Energiequelle [11]. Die Energiegewinnung durch die Metabolisierung von Glukose zu Pyruvat geschieht durch die Glykolyse. Innerhalb der Glykolyse werden energiereiche Komponenten wie ATP und NADH im Verlaufe mehrerer enzymatischen Reaktionen generiert. Glukose, die über die membrangebundenen Glukosetransporter (Glut1 bis Glut6) in die Zelle aufgenommen wird, wird zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert [10]. Bei der enzymatischen Umwandlung wird ein Phosphorylrest von Adenosin Triphosphat (ATP) abgespalten und auf die Glukose übertragen. Nach der Phosphatabspaltung entsteht das energieärmere Adenosin Diphosphat (ADP). Da die Zelle keine membrangebundenen Transporter für Glukose-6-Phosphat besitzt, kann Glukose nach der Phosphorylierung nicht mehr die Zelle verlassen. Glukose-6-Phosphat wird im Anschluss über eine Vielzahl an enzymatischen Reaktionen mit ATP und NADH Gewinn zu Pyruvat umgewandelt. Es entsteht NADH, da freiwerdende Elektronen durch die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphglycerat auf das oxidierte NAD^+ übertragen werden.

Das durch die Glykolyse gebildete Pyruvat kann auf zwei unterschiedlichen Wegen weiter verstoffwechselt werden. Der größte Anteil der Pyruvat-Moleküle wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in einer reversiblen Reaktion, unter Verwendung von NADH, als Reduktionsmittel zu Laktat konvertiert und in den Kulturüberstand abgegeben. Säugetierzellen nutzen diese als „Warburg Effekt“ bezeichnete Konversion für die Regenerierung von NAD^+ aus NADH, welches in der Glykolyse gebraucht wird [12, 13].

In zu hohen Konzentrationen wirkt das freigesetzte Laktat durch die pH-Wert-Senkung inhibitorisch und hat einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum [13]. Bei einem hohen Glukoseverbrauch wird vermehrt Laktat produziert, damit die Verfügbarkeit von NAD^+ für eine erhöhte Glykolyserate gewährleistet ist. Dieser Schritt ist jedoch reversibel und die Zelle kann den Metabolismus von der Laktatproduktion zu Laktatverbrauch umschalten [14]. Somit kann Laktat wieder zur Energiegewinnung in Pyruvat konvertiert werden.

Pyruvat wird anschließend in die Mitochondrien transportiert. Hier kann es durch die Pyruvatdehydrogenase unter NADH Gewinn zu Acetyl-CoA katalysiert werden, um letztendlich in den Tricarbonsäurezyklus (TCA) einzutreten. Die Pyruvatdehydrogenase überträgt hierbei die freiwerdenden Elektronen nicht direkt auf das oxidierte NAD^+ . Die Elektronen werden zunächst von dem oxidierten FAD unter Reduzierung zu FADH_2 aufgenommen. Im TCA wird Acetyl-CoA durch Dehydrogenasen und vier weiteren Oxidationsreaktionen unter Bildung der reduzierten Reduktionsäquivalente (NADH und FADH_2) abgebaut. Hierbei nutzen, bis auf die Succinat-Dehydrogenase, welche FAD verwendet, alle anderen Dehydrogenasen NAD^+ als Elektronenakzeptor.

Anschließend übertragen die entstandenen reduzierten Reduktionsäquivalente die zuvor aufgenommenen Elektronen an die Membranproteine in der Atmungskette. Am Ende der Atmungskette werden die Elektronen unter ATP Gewinn (pro Glukosemolekül ~ 30 ATP) auf den terminalen Elektronenakzeptor, dem molekularen Sauerstoff, übertragen [10].

Zusammenfassend haben diese Coenzyme eine entscheidende Bedeutung innerhalb der zentralen Stoffwechselwege (Glykolyse, Tricarbonsäurezyklus und Atmungskette) von tierischen Zellen und liefern eine fundierte Aussage über metabolische Aktivitäten innerhalb der Zellen.

2.1.2 Zelltod in Säugetierzellen

Während der CHO-Zellkultivierung ist die Aufrechterhaltung der Viabilität von Zellen über einen längeren Zeitraum eine hohe Herausforderung. In der Kultivierung hat die Viabilität der Zellen einen immensen Einfluss auf die maximal erreichbare Zellzahl und damit auch auf die Produktivität. Bei Säugetierzellen wird prinzipiell zwischen zwei Arten von Zelltod unterschieden, dem passiven Zelltod (Nekrose) und dem programmierten Zelltod (Apoptose und Autophagie). Diese beiden Arten von Zelltod können anhand von unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zellen charakterisiert werden, die in Abbildung 2 schematisch dargestellt sind [15].

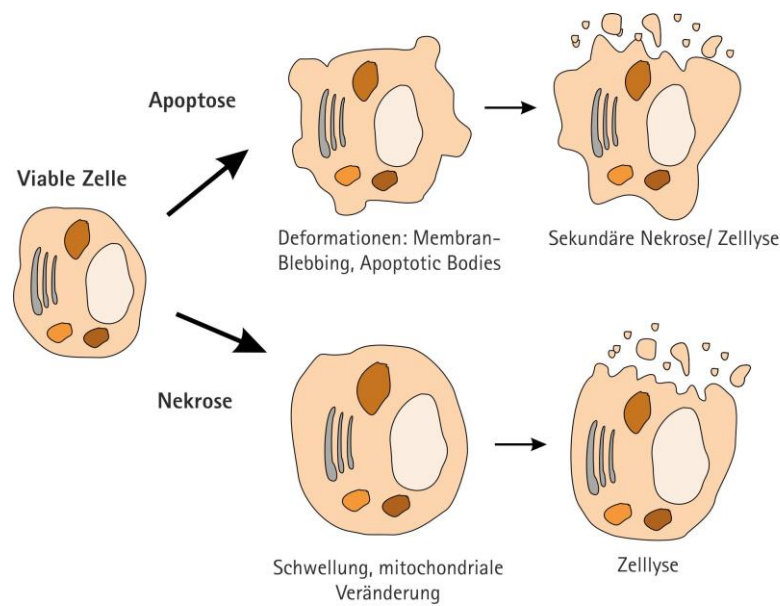


Abbildung 2: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Charakteristika der Zellen bei der Nekrose und Apoptose.

Nekrose kann durch plötzlich starke externe Stressbedingungen, wie z.B. durch massive hydrodynamische Kräfte, hohe Rührerdrehzahlen, große Temperaturschwankungen oder Nährstofflimitierungen, ausgelöst werden [16]. Charakteristische Veränderungen sind hierbei, das Anschwellen der Zelle und des Zellkerns, ungleichmäßige Kondensation des Chromatins, Zerschneiden der Plasmamembran, Auflösung der DNA, Zusammenbrechen der Organellen und letztendlich die Zellyse [17, 18].

Der programmierte Zelltod durch Apoptose hingegen kann bereits durch nur kleine Änderungen in der Umgebung, welche oft schwer zu detektieren sind, ausgelöst werden [19]. Morphologische Veränderungen sind hierbei die Deformation der Zellen, Umlagerung der Phosphatidylserine auf die Membranaußenseite, Kondensation des Chromatins, Ausstülpungen der Zellmembran (*Membran-Blebbing*) und Bildung von abgeschnürten Vesikeln (*Apoptotic Bodies*). Schließlich kommt es zur sekundären Nekrose bzw. Zellyse [20]. Neben den morphologischen Veränderungen werden innerhalb des Apoptose-Prozesses intrazellulär verschiedene biochemische Signalkaskaden ausgelöst, die von Elmore *et al.* ausführlich zusammengefasst sind [21].

2.1.3 Bioprozessüberwachung von Säugetierzellkultivierungen

Säugetierzellen sind hoch empfindliche biologische Systeme, die sich nur bei idealen Umgebungsbedingungen vermehren und ein Produkt, wie z.B. rekombinante Proteine, bilden. Um die richtigen Bedingungen während der Kultivierung von Zellen stets zu erfüllen, hat die Bioprozessüberwachung eine entscheidende Bedeutung. Diese stellt eine besondere Herausforderung dar, da es sich bei Säugetierzellkultivierungen um ein anspruchsvolles Mehrphasensystem handelt, bei dem die Phasen miteinander interagieren. Die Zellen bilden hier die Festphase, welche in einer Flüssigphase, dem komplexen Zellkulturmedium, suspendiert sind und mit einer Gasphase belüftet werden [22]. Während der Kultivierung von Zellen müssen physikalische (z.B. Druck, Temperatur, Viskosität) chemische (z.B. pH, Nährstoffe, Metabolite, pO_2 , pCO_2) und biologische Prozessvariablen (Zellzahl, Viabilität, Metabolismus) in allen drei Phasen überwacht werden [23]. Bei den chemischen Prozessvariablen gibt es eine hohe Anzahl von verschiedenen Analyten im Bioprozess, die oft in niedrigen Konzentrationen vorliegen. Dies stellt für die Messtechnik eine enorme Herausforderung dar.

Die häufigsten eingesetzten Sensoren im Kultivierungsprozess sind diejenigen, welche physikalischen Variablen, wie die Temperatur, den Druck und den Füllstand, überwachen. Chemische Prozessvariablen werden meist durch *inline* Sensoren innerhalb der Flüssigphase gemessen und überwacht. Das Überwachen von biologischen Eigenschaften stellt häufig eine Schwierigkeit dar. Hierbei ist insbesondere die Überwachung der Viabilität der Zellen von hoher Bedeutung. Denn nur lebende und metabolisch aktive Zellen können sich weiter vermehren und ein wertschöpfendes Produkt bilden [24].

Für die Prozessanalytik können die Sensoren bzw. Analytoren an verschiedenen Positionen im Bioprozess adaptiert sein – dies wird als Taxonomie deklariert. Die Adaption der Sensoren wird in *inline*, *atline* und *offline* unterschieden (Abbildung 3).

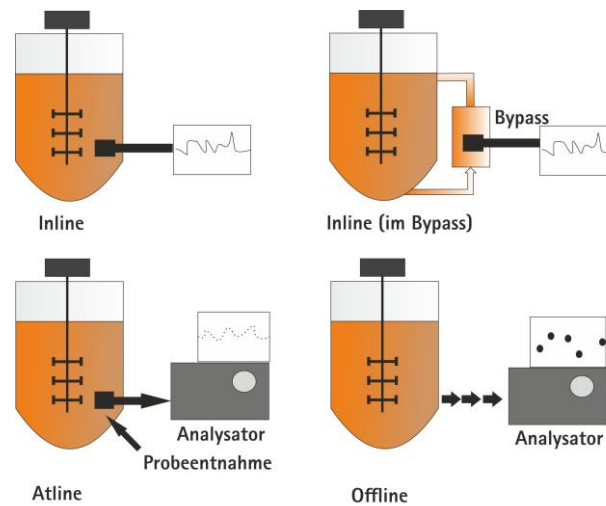


Abbildung 3: Taxonomie von Prozesssensoren: *Inline*, *atline* und *offline*.

Bei der Adaption des Sensors darf die Sterilität des gesamten Prozesses nicht gefährdet werden. Ein *inline* Sensor ist direkt im Kontakt mit dem Medium (invasiv) oder ist lediglich durch eine Glaswand von dem Medium (nichtinvasiv) separiert [25]. Dadurch ist die Entnahme einer Probe, die ein Kontaminationsrisiko darstellt, nicht nötig. Für die Adaption an den Bioprozess muss der Sensor sterilisierbar und an einer repräsentativen Stelle angebracht sein, damit aussagekräftige Daten aufgenommen werden können. *Inline* Sensoren können zudem in einem Bypass-System angebracht werden, um z.B. Störeffekte, wie die Begasung, zu vermindern. Bei Messungen im Bypass müssen jedoch mögliche Differenzen, wie z.B. die Durchmischung im Vergleich zum Prozess, beachtet werden. Bei *atline* Anwendungen wird eine Probe durch eine integrierte (halb)-automatisierte Probenahme entnommen und mit einem Prozessanalysator (z.B. HPLC, GC, MS) in der Nähe des Prozesses analysiert. Hierbei kommt es zu einer gewissen Zeitverzögerung zwischen Probenahme und Analyse. Bei der *offline* Analytik werden einzelne Proben entnommen, in ein zentrales Labor transportiert und analysiert. Zeitverzögerungen von Stunden können entstehen, die eine effiziente Prozesskontrolle einschränken [25].

2.1.4 Process Analytical Technology (PAT)

Process Analytical Technology (PAT) ist eine Initiative, die im Jahr 2004 von der amerikanischen Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde (Food and Drug Administration, FDA) ins Leben gerufen wurde [26]. Im Rahmen der PAT-Initiative sollen die Hersteller von biopharmazeutischen Produkten ermutigt werden von der bisherigen stichprobenartigen Qualitätsendkontrolle zu einer prozessbegleitenden Überwachung des Herstellungsprozesses durch neuste wissenschaftliche Methoden überzugehen, um somit ein besseres Prozessverständnis aufzubauen. Ausführungsvorschläge für eine PAT-Umsetzung wurden innerhalb der International Council for Harmonisation (ICH) in den Dokumenten ICH Q8, ICH Q9 und ICH Q10 veröffentlicht [27–29]. Darin wird PAT beschrieben als ein „System für die Analyse und Kontrolle von Produktionsprozessen, die auf zeitnahen Messungen von kritischen Qualitätsparametern und Performance Attributen bei Ausgangsstoffen und in-Prozess-Materialien basieren sowie Prozesse, die gewährleisten sollen, dass das Endprodukt nach dem Herstellungsprozess von angemessener Qualität ist“ [26]. Ziel ist es, eine höhere Produktqualität und ein besseres Prozessverständnis durch Echtzeit-Messungen mit „*state-of-the-art*“ Technologien, durch kontinuierliche Weiterentwicklung der Prozesse, flexiblere Herstellungsprozesse und kürzere Freigabezeiten zu realisieren. Damit diese Ziele erreicht werden, stimuliert die PAT-Initiative die Implementierung und Weiterentwicklung von analytischen Technologien, wie insbesondere der spektroskopischen Methoden in der biopharmazeutischen Industrie. Die analytischen Methoden müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Sie müssen relevante und repräsentative Prozessdaten liefern. Zudem muss das PAT-Sensorsystem eine hohe Robustheit bei unterschiedlichen Prozessbedingungen, eine hohe Zuverlässigkeit und eine angemessene Bedienerfreundlichkeit besitzen.

Informationen aus den komplexen Spektren der spektroskopischen Verfahren müssen mit entsprechender multivariater Datenanalyse extrahiert werden. Die Datenanalyse wird in Kapitel 2.3 näher erläutert. In den nachfolgenden Kapiteln werden unterschiedliche spektroskopische Methoden als PAT-Werkzeug ausführlich beschrieben und deren Evaluierung in Bioprozessen veranschaulicht.

2.2 Optische Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung

Die optische Spektroskopie umfasst die Prozessanalytik, die auf Wechselwirkungen von Atomen, Molekülen, Flüssigkeiten oder Festkörpern mit elektromagnetischer Strahlung zurückzuführen sind [30]. Die Wechselwirkungen und Auftrennung elektromagnetischer Strahlung werden, entsprechend ihrer Energie, durch verschiedene spektroskopische Methoden in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen erfasst.

Bei Absorption von elektromagnetischer Strahlung wird ein Energiebetrag ΔE der Strahlung aufgenommen, der von Frequenz der Strahlung ν und Wellenlänge λ abhängt. Mit einbezogener Proportionalitätskonstante, dem sogenannten Planck'sche Wirkungsquantum h ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$), ergibt sich die Gleichung 1 [30]. Die Energie der aufgenommenen elektromagnetischen Strahlung nimmt mit abnehmender Wellenlänge λ ($c =$ Lichtgeschwindigkeit $2,988 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$) zu. Somit haben kürzere Wellenlängen eine höhere Energie.

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Die optische Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung nutzt den Wellenlängenbereich von der energiereichen Ultraviolettstrahlung (UV) bis hin zur Mittelinfrarot-Spektroskopie (MIR) zur Detektion von relevanten Prozessvariablen [31]. Diese Wellenlängenbereiche umfassen auch die Raman- und Fluoreszenzspektroskopie, die nicht ausschließlich auf Absorption der eingestrahlten Energie beruhen. Abbildung 4 zeigt die Wellenlängenbereiche der typischen spektroskopischen Methoden für die Bioprozessüberwachung in Nanometer (nm).

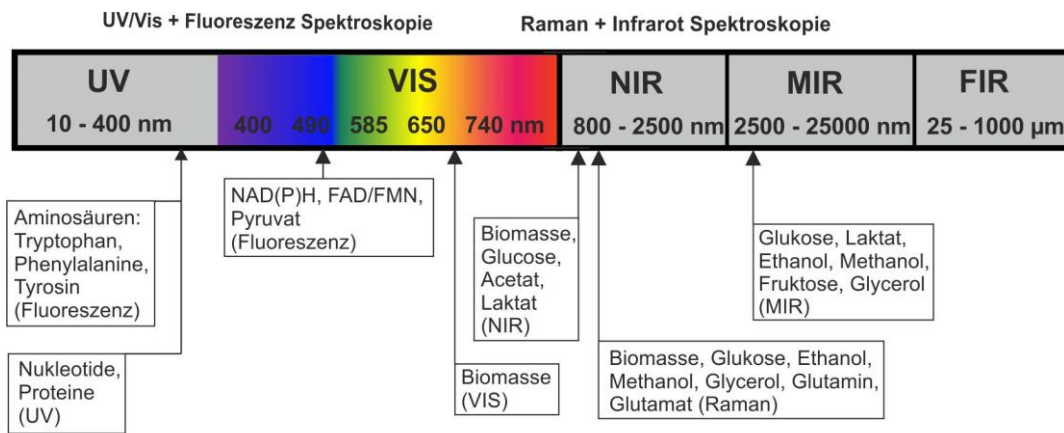


Abbildung 4: Übersicht von Wellenlängenbereichen für die spektroskopische Bioprozessüberwachung.

In der optischen Spektroskopie gibt es verschiedene Basiseffekte für die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie. Hierbei wird zwischen Absorption, Reflexion, Emission bzw. Fluoreszenz und Streuung unterschieden [25]. Je nach Art der Wechselwirkung können unterschiedliche Messanordnungen in der Spektroskopie verwendet werden, um diese Interaktionen mit Licht in unterschiedlichen Winkeln von 0° , 90° oder 180° zu erfassen. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 5 skizziert. Innerhalb dieser Arbeit wurden für die durchgeführte Bioprozessanalytik, Transmissionssonden und Reflexionssonden verwendet, auf die in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

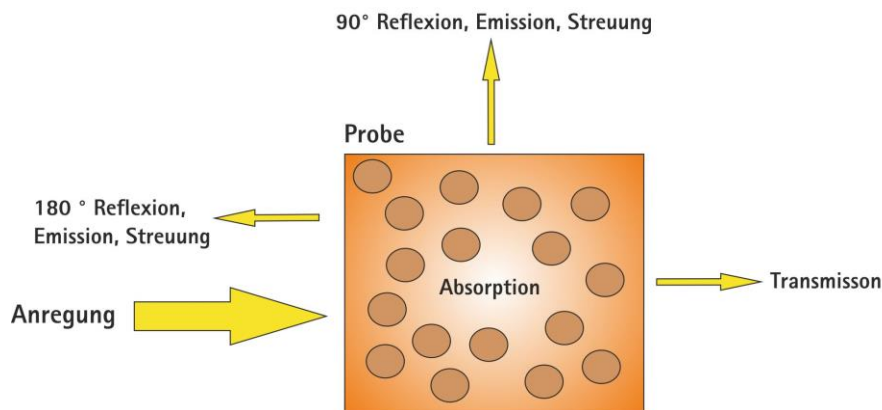


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Wechselwirkungen zwischen Licht mit Molekülen, Flüssigkeiten und Festkörpern in einer Probe.

Die Transmission T misst das Verhältnis der Intensität des Anregungslichtes I_0 zum abgeschwächten Licht I_{Probe} nach dem Austreten der zu untersuchenden Probe.

$$T = \frac{I_{\text{Probe}}}{I_0} \quad (2)$$

Bei der Bestrahlung einer Probe mit elektromagnetischer Strahlung werden bestimmte Frequenzbereiche absorbiert. Die Absorption A von elektromagnetischer Strahlung bei einer Wellenlänge ist proportional zur Konzentration c des absorbierenden Stoffes, des molaren Absorptionskoeffizienten ε und der durchstrahlten Strecke d einer Probe und kann mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden. Das logarithmische Verhältnis aus I_0/I ergibt die Absorption einer Probe.

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * d = -\log(T) \quad (3)$$

Aufgrund der weiten Einsatzgebiete und der unterschiedlichen Analysemöglichkeiten gewinnt der Einsatz von optischen Sensoren zur *inline* Bioprozessüberwachung immer mehr an Bedeutung. Spektroskopische Sensoren sind meist über Glasfaserkabel an den Prozess angeschlossen und liefern kontinuierlich, ohne Zeitverzögerung und Probenentnahme, Informationen aus dem Bioprozess [2]. Sie bieten den Vorteil der simultanen Multiparameteranalytik und können somit mit nur einem Sensor Informationen über eine Vielzahl von Prozessvariablen gleichzeitig liefern. Zudem haben die Sensoren keinen Störeffekt auf den Bioprozess.

Durch die multimodale Spektroskopie, mit dem Einsatz von unterschiedlichen Methoden und Kombinationen können verschiedene Informationen aus dem Bioprozess gewonnen werden, die für eine Prozessregelung und somit für die Produktqualität relevant sind. Sandor *et al.* zeigte bereits die erfolgreiche Implementierung der multimodalen Spektroskopie durch die Kombination der Nahinfrarot- (NIR) und Mittelinfrarot-Spektroskopie (MIR) in Säugetierzellkultivierungen [32].

2.2.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die optische Spektroskopie im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Bereich der elektromagnetischen Strahlung zwischen 200 bis 780 nm ist eine der ältesten spektroskopischen Methoden zur Untersuchung von Molekülen. Aufgrund der hohen Extinktionskoeffizienten in dem genannten Wellenlängenbereich ist es eine empfindliche Messmethode.

Die UV/VIS-Spektroskopie basiert auf unterschiedlichen Effekten der Interaktion von Licht und Materie: Absorption, Streuung, Beugung, Brechung und Reflexion. Das UV und sichtbare Licht wird durch funktionelle Gruppen in einem Molekül absorbiert. Diese bezeichnet man als Chromophore. Meist sind dies ungesättigte Gruppen, wie konjugierte Doppelbindungen, aromatische Systeme und Heteroatome mit freien Elektronenpaaren [30]. Damit sind u.a. Proteine und die DNA detektierbar, da diese aus heterozyklischen oder aromatischen Verbindungen bestehen.

Die Absorption von Licht bei einer bestimmten Wellenlänge führt bei den Chromophoren zu einer elektronischen Anregung des Moleküls. Elektronen, wie z.B. nichtbindende n-Elektronen oder π -Elektronen, werden dabei aus einem besetzten Molekülorbital (HOMO, engl. *highest occupied molecular orbital*) in ein energetisch höheres unbesetztes Molekülorbital (LUMO, engl. *lowest unoccupied molecular orbital*) angehoben [33]. Durch die Anregung wird Licht in einer für die funktionellen Gruppen spezifischen Wellenlänge absorbiert und eine charakteristische Absorptionsbande wird im UV/VIS-Spektrum erkennbar. Mit steigender Anzahl an konjugierten Doppelbindungen in einem Molekül wird die Energiedifferenz zwischen HOMO und LUMO kleiner, was zu einer längeren Wellenlänge der ersten Absorptionsbande und meist auch zu höheren Extinktionskoeffizienten führt [34]. Die elektronische Anregung eines Moleküls ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

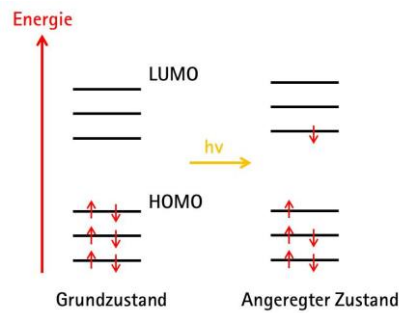


Abbildung 6: Schematische Darstellung der elektronischen Anregung eines Moleküls in der UV/VIS-Spektroskopie.

Eine quantitative Analyse bestimmter Analyten ist mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie durch die Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz realisierbar. Die UV/VIS-Spektroskopie in der Bioprozessüberwachung erfolgt meist in der Transmission, Reflexion oder Streuung über eine bestimmte optische Pfadlänge bzw. Brennweite. In Tabelle 1 sind die Absorptionswellenlängen typischer biogener Chromophore aufgelistet.

Tabelle 1: Absorptionswellenlängen typischer biologischer Moleküle [35, 36].

Klassifizierung	Chromophor	λ_{\max} [nm]
Aminosäuren	Phenylalanin	258
	Tyrosin	275, 195
	Tryptophan	280
Coenzyme	NADH/NADPH	340, 260
	NAD ⁺	260
	FAD, FMN	260, 375, 445, 450
Vitamine	Riboflavin	365, 445
	Pyridoxin	320, 250
Nukleotide	Adenosin	267
	Guanin	248
	Cytosin	271
	Thymin	265
	Uridin	262
Peptidbindungen		224, 214, 206
Carboxylgruppen, Amide		206
Konjugierte Ringsysteme		313
Doppelbindungen		254

2.2.2 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist im Vergleich zur UV/VIS-Spektroskopie eine deutlich sensitivere Messmethode. Das Messprinzip beruht auf der spontanen Lichtemission durch eine fluoreszierende Substanz (Fluorophor), die beim Übergang eines elektronisch angeregten Moleküls zurück in einen Zustand niedrigerer Energie erfolgt [37]. Dieser Effekt tritt im Gegensatz zur Phosphoreszenz nur so lange auf wie es elektronisch angeregt wird.

Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge im UV- oder sichtbaren Bereich wechselwirken die Photonen mit den Elektronen des Moleküls. Gemäß des Franck-Codon-Prinzips führt dies zur Anregung der Elektronen aus dem Singulett-Grundzustand (S_0) innerhalb von 10^{-15} s in höhere Schwingungszustände der angeregten Elektronenzustände (S_1 oder S_2) [38]. Innerhalb des energiereichen Zustands kann es durch Vibrations- und Rotationübergänge unter einem Temperatúrausgleich mit der Umgebung zu einem strahlungslosen Übergang der Elektronen kommen, welche als innere Konversionen deklariert werden. Neben diesem strahlungslosen Zerfall kann die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand auch durch die Emission von Licht innerhalb von 10^{-8} s erfolgen [38]. Das emittierte Licht ist aufgrund der inneren Konversionsprozesse immer energieärmer und somit langwelliger als die Anregungswellenlänge. Fluorophore besitzen charakteristische Anregungswellenlängen (Exzitation, Ex) und Fluoreszenzwellenlängen (Emission, Em) und lassen sich daher unterscheiden. Abbildung 7 stellt die elektronischen Zustände von Elektronen schematisch dar.

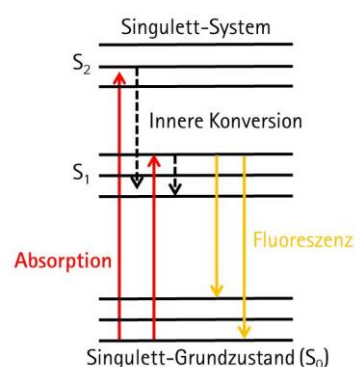


Abbildung 7: Schematische Darstellung der elektronischen Zustände von Elektronen.

In der 2D-Fluoreszenzspektroskopie, die meist bei Bioprozessen eingesetzt wird, wird die Anregungswellenlänge variiert und jeweils das gesamte Emissionsspektrum aufgezeichnet.

Somit entsteht ein charakteristisches 2D-Spektrum für die untersuchte Probe. Die Intensität der Fluoreszenz wird in relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) angegeben. Die Fluoreszenz-Messungen erfolgen im Bioprozess meist in Reflexion.

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie eignet sich zur Bioprozessüberwachung, da es innerhalb der biochemischen Vorgänge in Zellen eine Reihe von fluoreszierenden Biomolekülen gibt. Auch intrinsische Fluorophore können direkt in den Zellen detektiert werden.

Fluorophore bestehen meist aus kondensierten aromatischen Verbindungen mit leicht anregbaren π -Elektronen. Dazu zählen u.a. die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp), die Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) sowie die Vitamine Pyridoxin und Riboflavin. In Tabelle 2 sind die Exzitations- und Emissionsmaxima der genannten biogenen Fluorophore aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht der Exzitations- und Emissionsmaxima biogener Fluorophore [39–41].

Klassifizierung	Fluorophor	Exzitation/ λ_{ex} [nm]	Emission/ λ_{em} [nm]
Aminosäuren	Phenylalanin	260	280
	Tyrosin	275	300
	Tryptophan	280	350
Coenzyme	NADH	290, 351	440, 460
	NADPH	336	464
	FAD, FMN	280, 375, 454	520
Vitamine	Riboflavin	280, 375, 454	520
	Pyridoxin	332, 340	400

Für die Proteinfluoreszenz sind die aromatischen Aminosäuren hauptverantwortlich. Die Fluoreszenzspektren der drei aromatischen Aminosäuren überlagern sich. Den größten Einfluss auf die Proteinfluoreszenz hat Tryptophan, da diese den höchsten Absorptionskoeffizienten hat und die längste Emissionswellenlänge [38].

Konformationsänderungen von Proteinen haben durch die drei-dimensionale Struktur und damit Lage der Aminosäuren einen Einfluss auf die Fluoreszenz. Die allgemeine Proteinfluoreszenz wird meist bei einer Exzitation von 280 nm gemessen.

Auch die Umgebung innerhalb des Bioprozesses hat verschiedene Störeinflüsse auf die Fluoreszenz und beeinflusst das Spektrum [37, 42]. Hier sind die Temperatur und der pH-Wert zu nennen. Höhere Temperaturen führen zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der steigenden Wahrscheinlichkeit von deaktivierenden Stößen mit weiteren Molekülen. Bei Veränderung des pH-Wertes kann es durch Protonierungen der fluoreszierenden Moleküle zu veränderten Fluoreszenzeigenschaften, wie der Änderung der Intensitäten und Verschiebung der Fluoreszenzmaxima, kommen. Da der pH-Wert und die Temperatur bei Säugetierzellkultivierungen im Idealfall konstant sind, sollten hierdurch keine Veränderungen hervorgerufen werden. Auch die Begasung kann sich aufgrund der gebildeten Gasblasen, welche optische Messungen beeinträchtigen, auf die Fluoreszenz bemerkbar machen. Zudem haben Änderungen des Mediums bzw. der Zellsuspension, wie z.B. die Dichte, Polarität und Viskosität, im Verlaufe der Kultivierung einen Einfluss auf die Signalintensität.

Eine entscheidende Veränderung ist die zunehmende Zellzahl im Bioreaktor, die zu einer Erhöhung der Trübung des Mediums führt und eine höhere Intensität des Streulichts verursacht. Durch eine höhere Zellzahl wird das Anregungslicht stärker absorbiert und die Eindringtiefe des Lichts verringert. Außerdem kann die Fluoreszenzintensität durch die Präsenzen von Löschesubstanzen (Quencher), wie z.B. molekularen Sauerstoff oder Kaskadeneffekten, mit weiteren Fluorophoren abgeschwächt werden [43].

2.2.3 Raman-Spektroskopie

Die Streuung von Licht an Molekülen wurde im Jahre 1923 von Smekal theoretisch vorausgesagt und im Jahre 1928 von dem indischen Physiker Raman experimentell nachgewiesen [33]. Ramans Entdeckung wurde daraufhin 1930 mit dem Nobelpreis in Physik gewürdigt. Seit dieser Zeit wird die inelastische Streuung von Licht an Molekülen als Raman-Streuung bezeichnet.

Der Raman-Effekt basiert darauf, dass ein Molekül mit monochromatischem Licht (z.B. durch einen Laser) bestrahlt wird und dabei ein Teil der energiereichen Photonen absorbiert wird,

ein weiterer Teil transmittiert und ein Teil gestreut wird. In Abbildung 8 ist der Raman-Effekt schematisch dargestellt. Dabei wird der Großteil der Photonen gestreut, ohne dass sich ihre Energie verändert, und sie besitzen somit noch die gleiche Frequenz wie das Anregungslicht. Das durch die Photonen angeregte Molekül kehrt hierbei wieder in den Grundzustand zurück [44]. Dieser Effekt wird als elastische Streuung oder Rayleigh-Streuung bezeichnet.

Bei einem sehr kleinen Teil des gestreuten Lichts ist ein Energieunterschied zwischen Anregungs- und Streulicht vorhanden. Die Photonen der elektromagnetischen Strahlung erzeugen ein Dipolmoment im Molekül, was zu einer Polarisierung führt und eine Strahlungsausgabe ermöglicht. Die Energie, die hierbei von dem Molekül abgegeben oder aufgenommen wird, entspricht der Differenz zwischen zwei Energieniveaus einer Molekülschwingung. Hierbei kommt es zur Stokes- und Anti-Stokes-Streuung. Bei der Stokes-Streuung werden Photonen des Anregungslichtes von dem Molekül absorbiert und diese geben Energie an das Molekül ab, wodurch eine höhere Schwingungsenergie erzeugt wird. Dadurch geht das Molekül in einen virtuellen Zwischenzustand über und relaxiert durch die Emission einer energieärmeren Streuung mit geringerer Frequenz. Virtuelle Energieniveaus beschreiben keine definierten elektronischen oder vibronischen Niveaus des Moleküls.

Bei der Anti-Stokes-Streuung wird ein Teil der Energie in einen angeregten Schwingungszustand virtuell absorbiert, wobei das Molekül unter Emission einer energiereicheren Streuung in den Schwingungszustand des ursprünglichen elektronischen Zustandes relaxiert. Damit weist das Streulicht eine niedrigere Frequenz auf. Die Anti-Stokes-Streuung ist nur möglich, sofern sich das Molekül vor der Anregung in einem höheren Energiezustand befindet. Die Anti-Stokes-Streuung ist im Vergleich zu der Stokes-Streuung deutlich schwächer ausgeprägt, da sich aufgrund des thermischen Gleichgewichts nur eine geringe Anzahl an Molekülen in einem angeregten Schwingungszustand befinden [44]. Die Wellenzahlverschiebung des einfallenden Lichts wird als Raman-Verschiebung (engl. *Raman shift*) bezeichnet und in Einheiten von reziproken Wellenlängen, den Wellenzahlen [cm^{-1}], angegeben. Die Raman-Spektroskopie liefert Informationen zu Schwingungsübergängen in Molekülen im Bereich von $4000 - 0 \text{ cm}^{-1}$ [45].

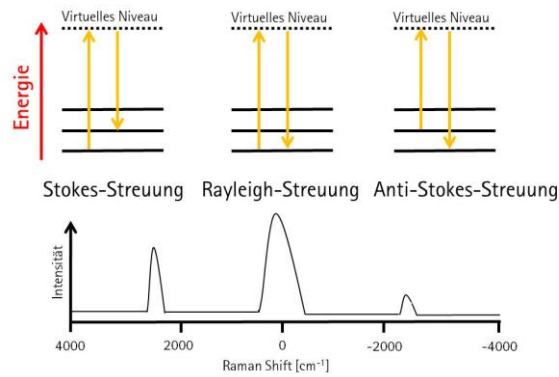


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Raman-Effekts.

2.3 Multivariate Datenanalyse

Bei der spektroskopischen Bioprozessüberwachung wird die multivariate Datenanalyse (MVDA) benötigt, um Informationen aus den hochdimensionalen Datensätzen, den Spektren, zu extrahieren. Spektren stellen multivariate Daten dar, da jede Wellenlänge beziehungsweise Wellenzahl in einem Spektrum einer unabhängig gemessenen Variablen entspricht. Ziel der MVDA ist eine Informationsverdichtung oder auch Datenreduktion der hochdimensionalen Spektren. Aus der großen Anzahl von Variablen sollen die relevanten Informationen herausgefiltert werden, damit diese leichter zu interpretieren sind [46].

Die Daten können hierbei qualitativ und quantitativ ausgewertet werden. Der qualitative Ansatz benötigt ausschließlich Spektraldaten für die Interpretation. Bei dem quantitativen Ansatz hingegen werden Spektraldaten mit Referenzdaten korreliert. Abbildung 9 stellt schematisch die verschiedenen Ansätze der MVDA dar. Hier werden die beiden wichtigsten Methoden der spektralen Datenanalyse, die Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis* – PCA) und die PLS- (engl. *partial least square*) Regression vorgestellt.

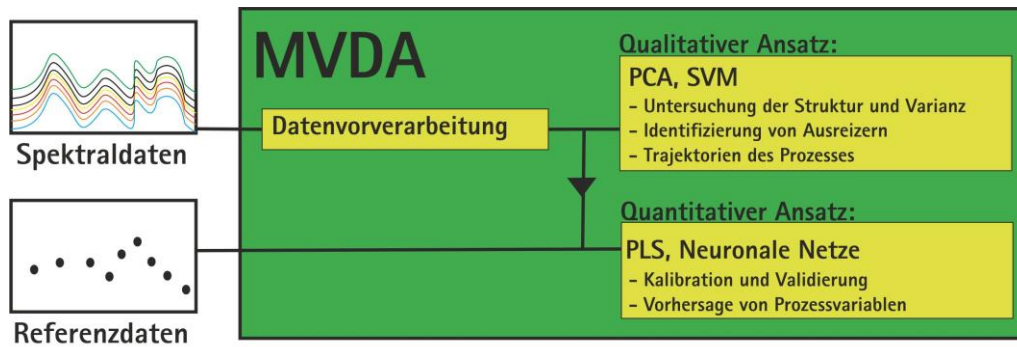


Abbildung 9: Schematische Übersicht der multivariaten Datenanalyse (MVDA).

2.3.1 Hauptkomponentenanalyse – PCA

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist eine qualitative Methode mit dem Ziel, die komplexen Daten auf die relevanten Daten durch ein mathematisches Modell zu reduzieren und zu strukturieren. Sie berechnet aus den gemessenen Variablen neue latente Variablen, die als Hauptkomponenten (engl. *principal component* – PC) bezeichnet werden [47]. Dabei werden die Spektraldaten in einer Datenmatrix X zusammengefasst, in der jede Zeile für ein Spektrum und jede Spalte für eine Variable oder Wellenlänge steht [48]. Die Datenmatrix X wird bezüglich der maximalen Varianz untersucht. Hierbei werden die ursprünglichen Daten in ein neues Koordinatensystem übertragen. Innerhalb des neuen Koordinatensystems beschreibt die erste Hauptkomponente (PC-1) den größten Teil der Gesamtvarianz der Datenmatrix und enthält damit die relevantesten Informationen aus dem Bioprozess. Weitere PCs, die jeweils orthogonal zu den bereits berechneten PCs stehen müssen, beschreiben einen geringen Anteil der Gesamtvarianz. Die letzten PCs enthalten oft nur noch Informationen über das Messrauschen. Ziel soll es sein, die relevanten Prozessinformationen mit möglichst wenigen PCs zu beschreiben. Die Datenmatrix X wird wie folgt in zwei neue Matrizen zerlegt:

$$X = TP^T + E \quad (4)$$

Die Gewichts- oder Scoresmatrix T beinhaltet die transformierten und reduzierten Spektren und die Spaltenzahl wird durch die Anzahl der PCs bestimmt. Die Scores entsprechen jeweils einem Spektrum. Die Matrix besitzt genauso viele Zeilen wie die ursprüngliche Datenmatrix X und genauso viele Spalten wie PCs berücksichtigt werden. Die Faktoren- oder

Hauptkomponentenmatrix P besitzt genauso viele Spalten wie die Datenmatrix X , welche in dieser Matrix als Faktorenladungen (engl. *Loadings*) deklariert werden.

Die *Loadings* geben den Einfluss einer Variablen, bzw. Wellenlänge, bezüglich einer PC mit einem Wert zwischen -1 und $+1$ an. Bei Variablen, die keinen Einfluss auf die jeweilige PCs haben, liegt der *Loading*-Wert bei 0 . Für eine Datenreduktion werden weniger PCs als die vorhandenen Variablen von X berücksichtigt. In der Residuenmatrix E werden die Differenzen zwischen der ursprünglichen Datenmatrix X und des Produkts aus den *Scores* T und den Hauptkomponenten P angegeben und haben somit die gleichen Dimensionen wie X . Je mehr PCs verwendet werden, desto geringer ist der Fehler in E [48].

Zur Interpretation der PCA werden vor allem die *Loading*- und *Score*-Werte untersucht. Innerhalb der *Loading*-Werte ist zu erkennen welche Bereiche im Spektrum einen relevanten Einfluss auf die jeweilige Hauptkomponente haben. Die *Score*-Werte repräsentieren die jeweiligen Spektren und können in einem spektralen Verlauf, dem *Score*-Plot, dargestellt werden. Dadurch können signifikante Unterschiede, wie z.B. Ausreißer oder Gruppen erkannt werden. Nah beieinander liegende *Score*-Werte zeigen, dass diese Spektren sich sehr ähnlich sind [48].

2.3.2 Multivariate Regression (PLS-Regression)

Die PLS-Regression ist eine multivariate Regressionsmethode und dient der Analyse von Zusammenhängen zwischen einer oder mehreren Zielgrößen (Y-Variablen), wie z.B. Konzentrationen von Analyten und vielen unabhängigen Messgrößen (X-Variablen), wie z.B. Spektren. Ziel der PLS ist die Erstellung eines linearen Regressionsmodells, welches einen funktionalen Zusammenhang zwischen den unabhängigen Variablen (X) und den davon abhängigen Variablen (Y) beschreibt [48].

Dafür wird sowohl mit den X-Daten als auch mit den Y-Daten eine PCA durchgeführt, wobei beide im Informationsaustausch miteinander stehen. Die PCA berechnet aus den X-Variablen die *Scores* T und *Loadings* P . Hierbei ist jedoch ein Zwischenschritt nötig, die Berechnung der W -Matrix, welche die Verbindung zu den Y-Variablen sicherstellt. Bei der PCA der Y-Variablen entsteht die U -Matrix mit den *Scores* und die Q -Matrix mit den *Loadings*. Die

Residuenmatrizen E und F sind von der Anzahl der gewählten Hauptkomponenten abhängig. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der PLS und der jeweiligen Matrizen.

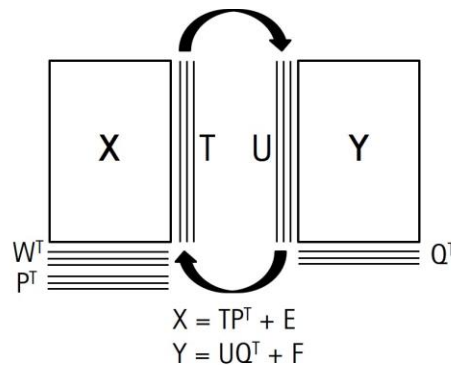


Abbildung 10: Schematische Darstellung der PLS und der jeweiligen Matrizen.

Die X-Variablen und Y-Variablen werden so zerlegt, dass die Kovarianz zwischen den Matrizen T und U maximal wird. Aus der PLS ergibt sich eine Regressionsgleichung, mit der aus einem gemessenen Spektrum x_i eine Konzentration y_i eines Analyten vorhergesagt werden kann [48]. Der Offset des Modells wird durch b_0 und der Regressionskoeffizientenvektor durch b angegeben. Beide verändern sich mit der Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten.

$$y_i = b_0 + b * x_i^T \quad (5)$$

Die Ergebnisse der PLS-Regression werden anhand der PLS-Scores, Regressionskoeffizienten und des Modellfehlers analysiert. Die Score-Werte für die X- und Y-Daten geben Auskunft über die Varianz innerhalb der jeweiligen Hauptkomponenten. In den Regressionskoeffizienten sind die Informationen enthalten, welche Bereiche im Spektrum relevant für die Vorhersage der zugehörigen Y-Variablen sind. Die Güte des PLS-Modells wird anhand der Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers zwischen Modellvorhersage und Referenzwert bestimmt. Dieser wird als RMSE (engl. *root mean square error*) abgekürzt.

Für die Kalibrierung, bei der alle X- und Y-Daten für das PLS-Modell verwendet werden, wird der RMSEC (engl. *root mean square error of calibration*) berechnet. Dieser beinhaltet jedoch keine Informationen darüber, ob das PLS-Modell auch auf neue Datensätze anwendbar ist. Für diese Einschätzung erfolgt meist die Validierung durch eine Kreuzvalidierung, bei der einzelne Messwerte aus der Kalibration herausgenommen und durch Modelle aus den

restlichen Daten vorhergesagt werden. Dies wird so lange durchgeführt, bis jeder Messwert aus dem Datensatz einmal durch das Modell vorhergesagt wird. Der Fehler wird als RMSECV (engl. *root mean square error of cross validation*) bezeichnet.

Noch besser kann die Anwendbarkeit und Robustheit des PLS- Modells auf weitere Datensätze durch den RMSEP (eng. *root mean square error of prediction*) berechnet werden. Hierfür wird eine Y-Variable in einem komplett neuen Datensatz, z.B. einer neuen Kultivierung, vorhergesagt. Die Berechnungen der jeweiligen Fehler werden im Anhang näher beschrieben.

2.3.3 Statistische Versuchsplanung (DoE)

Eine Kalibration ist die Erstellung eines mathematischen Modells zur Bestimmung einer Konzentration aus einem Messsignal. Bei einer univariaten linearen Abhängigkeit zwischen der Konzentration und dem Messsignal kann die Korrelation durch eine Regressionsgrade beschrieben werden. Hierbei reichen drei verschiedene Messpunkte aus, um die Steigung zwischen den beiden Punkten zu berechnen. Messungenauigkeiten und Rauschen können hierüber jedoch nicht erfasst werden. Um diese zu erfassen, müssen auf dem gleichen Konzentrationsniveau mehrfache Messungen, mindestens drei, durchgeführt werden. Zur Erstellung einer multivariaten Kalibration, z.B. von Spektraldaten, sind zwei Konzentrationsniveaus nicht ausreichend. Es werden mindestens so viele verschiedene Niveaus benötigt wie Hauptkomponenten im Modell verwendet werden.

Bei spektroskopischen Methoden wird für die multivariate Kalibration zunächst für jeden Analyten einzeln eine Kalibration aus unterschiedlichen Konzentrationsniveaus in einer Reinstlösung, in der nur die eine Komponente vorliegt, erstellt. Die Reinstspektren zeigen in welchen Bereichen des Spektrums sich Informationen über den zu untersuchenden Analyten befinden. Diese Informationen sind hilfreich bei der Interpretation von komplexen Lösungen, in denen verschiedene Analyten nebeneinander in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen.

Innerhalb einer Kultivierung werden verschiedene relevante Analyten in einer komplexen Lösung, dem Zellkulturmedium, nebeneinander produziert und abgebaut. Es treten Wechselwirkungen und auch Überlagerungen zwischen den einzelnen Analyten in den Spektren auf. Um nachzuweisen, ob die Analyten unabhängig voneinander detektierbar sind, reicht es nicht aus, die Konzentrationen parallel zu erhöhen, weil dadurch kollineare Konzentrationskombinationen und unerwünschte Korrelationen auftreten würden. Wichtige Charakteristika sind hier die Sensitivität, Selektivität und Spezifität der analytischen Messmethode [34]. Die Sensitivität ist die Fähigkeit einer Methode, die Änderung einer Analytkonzentration zu erfassen. Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit, mehrere verschiedene Analyten parallel zu erfassen. Bei einer hohen Spezifität kann ein Analyt in einem komplexen Gemisch eindeutig identifiziert werden [34].

Für die Beschreibung der Selektivität, also der Untersuchung, ob die Analyten nebeneinander und in unterschiedlichen Konzentrationen gemessen werden können, müsste ein vollfaktorieller Versuchsplan, welcher alle möglichen Kombinationen der Konzentrationsstufen aller Analyten hat, erstellt werden. Dieser Ansatz wäre sehr zeitintensiv, da sehr viele Kalibrationslösungen gemessen werden müssten.

Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit ein statistischer Versuchsplan (engl. *Design of experiments* – DoE), bei dem eine möglichst geringe und trotzdem optimale Kombination an Konzentrationsniveaus für eine simultane Kalibration mehrerer Analyten erfolgen kann, erstellt und angewendet. Für einen effizienten Versuchsplan muss die Anzahl der zu messenden Konzentrationsstufen für die jeweiligen Analyten bestimmt werden. Je größer die Anzahl der Konzentrationsstufen ist, desto genauer ist die Kalibration. Hierbei muss der gesamte zu kalibrierende Konzentrationsraum für jeden Analyten enthalten sein. Zudem muss der Versuchsplan Nullproben beinhalten. Der Versuchsplan muss so erstellt werden, dass alle Konzentrationsstufen aller Analyten in möglichst unkorrelierter Kombination vorliegen. Für dieses Ziel werden Matrizen erstellt, bei der die Zeilen durch die Anzahl der Konzentrationsstufen bestimmt ist und die Anzahl der Spalten durch die Analyten. Jede Spalte enthält randomisierte Zahlen, welche für die Konzentrationsstufen der einzelnen Analyten kodieren. Bei einer linear unabhängigen Verteilung der Zahlen in den Spalten werden bei der Hauptkomponentenanalyse für diese Matrix alle maximal möglichen

Hauptkomponenten benötigt, um die Gesamtvarianz zu beschreiben. Bei einer korrelierten Verteilung hingegen werden weniger Hauptkomponenten benötigt. Somit sind die zufällig erstellten Matrizen auf eine unkorrelierte Verteilung über die benötigten Hauptkomponenten zu identifizieren.

Für den erstellten Versuchsplan werden über einen Brut-Force-Algorithmus viele Matrizen erzeugt, bewertet und die am wenigsten korrelierenden ausgewählt. Diese werden mehrfach durch den Mittelwertstandard ergänzt, um hierüber die Versuchsvarianz bestimmen zu können. Der so erstellte Versuchsplan ist im Anhang dargestellt.

3 Spektroskopische Sensoren und Anbindung an den Bioprozess

In diesem Kapitel werden die jeweiligen Messtechniken, Aufbau der spektroskopischen Sensoren und die unterschiedlichen Adaptionen an Bioprozesse vorgestellt. Bei der UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um Prototyp-Systeme, die für den Einsatz an Zellkulturprozessen evaluiert wurden. Für die Raman-Spektroskopie wurde ein neuartiges Sondendesign für eine berührungslose Messung zur Überwachung von Säugetierzellkultivierungen evaluiert. In den experimentellen Arbeiten werden anschließend die Einsatzmöglichkeiten bei CHO-Zellkultivierungen sowie Vor- und Nachteile der jeweiligen spektroskopischen Methode untersucht und kritisch diskutiert.

3.1 UV/VIS-Spektrometer

In dieser Arbeit wurde ein prozesstaugliches UV/VIS-Spektrometer und eine Sonde zur Erfassung von chemischen und biologischen Veränderungen in Säugetierzellkultivierungen charakterisiert. Die chemischen Informationen werden über die wellenlängenabhängige Absorption im UV und VIS-Bereich und die morphologischen Änderungen durch Messungen des Streulichts im VIS-Bereich erfasst.

Das verwendete UV/VIS-Spektrometer (J & M Analytik AG, Essingen) umfasst einen integrierten Multiplexer, welcher eine simultane Detektion der UV/VIS-Transmission und VIS-Streuung ermöglicht. Das Spektrometer hat einen Detektionsbereich von 190–720 nm mit

einer spektralen Auflösung unter 7 nm und einen Diodenarray-Detektor (256 Pixel). Zur Anregung wurde eine D₂/Halogen (35 W/7,5 W) Breitbandanregungsquelle verwendet. Das System besitzt eine großzügige Temperierung, enthält jedoch keine beweglichen Teile. Somit ist eine gute Prozesstauglichkeit und Robustheit vorhanden.

Es wurde eine UV/VIS-Transmissions-Tauchsonde (Excalibur XP 25, Hellma Analytics GmbH, Müllheim) mit einem Messspalt von 1 mm für die *inline* Messungen verwendet. Die Sonde kann über den Standard Stutzen (25 mm, Ingold®) an den Bioreaktor adaptiert werden.

Das Spektrometer wurde mit der Software TidasDAQ3 (J & M Analytik AG, Essingen) angesteuert. Zur Detektion der UV/VIS-Absorption wurde bei jeder Messung ein Spektrensatz aus Dunkel-, Lampen- und Probenspektrum aufgenommen. Das verwendete UV/VIS-Prozessspektrometer mit angeschlossener Transmissionssonde ist in Abbildung 11 dargestellt.

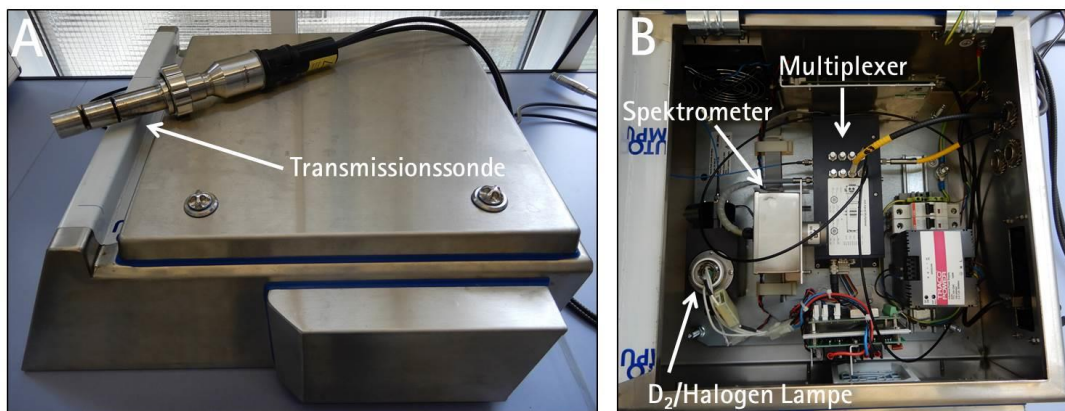


Abbildung 11: Verwendetes UV/VIS-Prozessspektrometer mit angeschlossener Transmissionssonde (A) und einem Blick in das Innere des Spektrometers (B).

Für eine optimale Qualität der Spektren bei unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten, mit steigender Zellzahl, wurden verschiedene Belichtungszeiten/Integrationszeiten zwischen 30 und 1000 ms untersucht. Um die gesamte Kultivierung zu überwachen, zeigten sich die besten Ergebnisse bei einer Integrationszeit von 50 ms.

3.2 2D-Fluoreszenzspektrometer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neu entwickeltes 2D-Fluoreszenz-Sensorsystem für die Überwachung von Säugetierzellkultivierungen evaluiert. Das System beinhaltet nur drei Exzitationswellenlängen (280, 365 und 455 nm), da hiermit die relevantesten biogenen Fluorophore (vgl. Tabelle 2) im Prozess angeregt werden können.

Für die Anregung wurden LEDs (engl. *light-emitting diode*) eingesetzt, weil diese Technologie keine beweglichen Teile benötigt. Die einzelnen LEDs (Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau) können ohne den Einsatz eines Multiplexers individuell angesteuert werden und sind jeweils über eine Lichtfaser mit der Sonde verbunden.

In der Mitte der Fluoreszenzsonde (Art Photonics GmbH, Berlin) ist eine zentrale Lichtfaser installiert, welche das emittierte Licht zum Detektor zurückführt. Die Sonde misst in Reflexion. Das Sondendesign erlaubt eine Adaption an den Standard-Stützen (25 mm, Ingold®) von Bioreaktoren. Durch eine Photodiode wurde eine *Feedback*-Kontrolle der LED-Intensitäten realisiert. Für die drei Exzitationswellenlängen wird jeweils ein Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich 180,5 bis 997,5 nm mit einer spektralen Auflösung von 4 nm mit Hilfe eines CCD-Detektors (engl. *charge-coupled device*; Tidas OEM 800, J & M Analytik AG, Essingen) aufgezeichnet. Das System wurde ebenfalls mit der Software TidasDAQ3 betrieben. Das verwendete 2D-Fluoreszenzspektrometer ist in Abbildung 12 zu sehen.

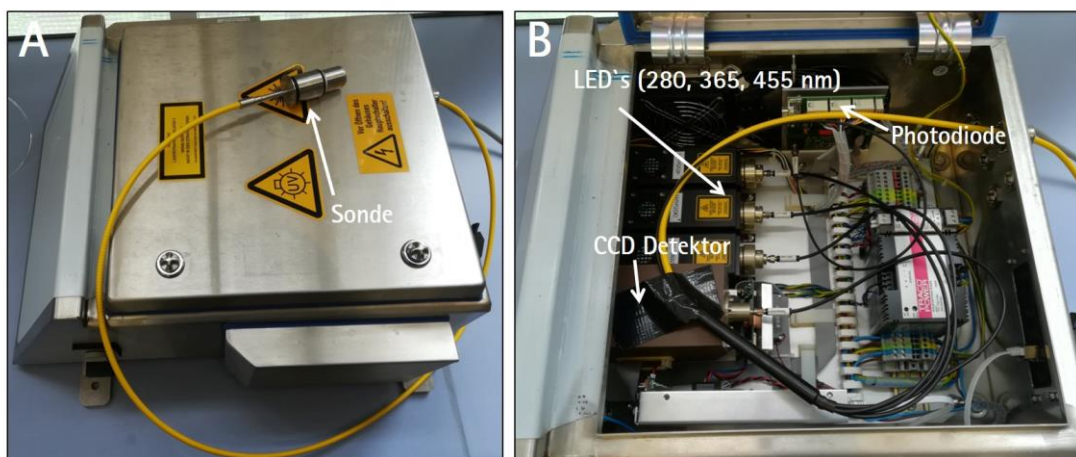


Abbildung 12: Verwendetes 2D-Fluoreszenzspektrometer mit über einen Lichtleiter angeschlossener Prozesssonde (A) und einem Blick in das Innere des Spektrometers (B).

Um eine hohe Reproduzierbarkeit der Spektren in Säugetierzellkultivierungen zu gewährleisten, wurden bei jeder Messung Dunkelstromkorrekturen und LED-Intensitätsmessungen vorgeschaltet. Für die Detektion der biogenen Fluorophore im Bioprozess wurden anschließend für jede Exzitationswellenlänge Spektren mit zwei unterschiedlichen Belichtungszeiten ($\lambda_{\text{ex}280}$: 13, 110 ms, $\lambda_{\text{ex}365}$: 13, 110 ms, $\lambda_{\text{ex}455}$: 1200, 3600 ms) aufgenommen.

3.3 Berührungslose Raman-Spektroskopie

Für die Detektion der inelastischen Streuung von Licht an relevanten Molekülen in Säugetierzellkultivierungen wurde eine berührungslose Raman-Prozesssonde evaluiert. Das System realisiert eine Strahlführung über Linsen mit relativ großen Durchmessern und einer großen Brennweite (> 25 mm), die es ermöglicht mit einem Abstand berührungslos durch Schauglasarmaturen zu messen [49]. Die Anregung der Moleküle erfolgt über einen 785 nm Laser. Diese Anregungswellenlänge wird bei Zellkultivierungen meist genutzt, um Autofluoreszenz weitestgehend zu minimieren. Die inelastische Streuung wird mit einer langwelligeren Wellenlänge als der Laser über einen Lichtleiter zu dem Prozess-Raman-Spektrometer (MultiSpec® Raman, tec5 AG, Oberursel) geleitet. Mit Hilfe eines CCD-Detektors wird der Raman Shift in einem spektralen Bereich von $300\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ detektiert. Braun *et al.* (2016) beschreibt den detaillierten optischen Aufbau der berührungslosen Raman-Sonde [49]. Zur Erfassung von Spektren mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis wurde eine geeignete Integrationszeit bestimmt. Hierfür wurden durch ein Quarzglas Spektren jeweils für das Medium ohne Zellen und einer Zellsuspension aufgenommen. Eine Integrationszeit von 50 s zeigte die höchste Qualität in den Spektren.

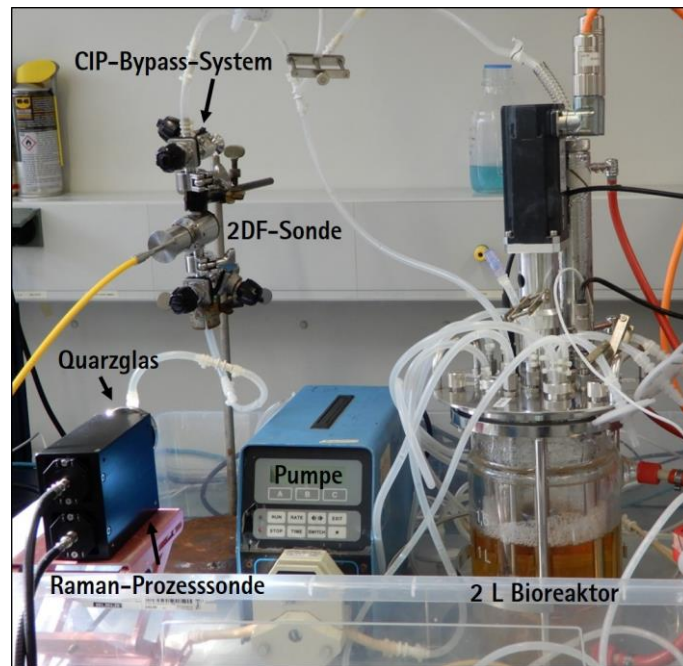


Abbildung 13: Berührungslose Raman-Prozesssonde angeschlossen an einen 2 L Bioreaktor.

3.4 Entwicklung eines SIP-Bypass-Systems

Der Einsatz von spektroskopischen Methoden in der Bioprozesstechnik steht vor vielen Herausforderungen. Insbesondere stellt die Adaption der Sonden an verschiedene Reaktorsysteme, aufgrund unterschiedlicher Anschlussmöglichkeiten und Steriltechnik, ein Problem dar.

Für die erfolgreiche Produktion von wertschöpfenden biopharmazeutischen Produkten ist die Entwicklung eines geeigneten Herstellungsverfahrens unabdingbar [2]. Aufgaben der Prozessentwicklung sind hierbei neben der Zelllinienentwicklung, Medienoptimierung, Zellkultivierungsmethode und *Scale-up* auch die Auswahl der geeigneten Prozessanalytik bzw. Analysatoren zur Überwachung des Prozesses [7]. Eine Etablierung geeigneter Analysatoren, wie z.B. spektroskopischer Methoden, innerhalb der frühen Entwicklungsphase, erleichtert die benötigte Validierung.

Die Übertragbarkeit der generierten Spektraldaten während des *Scale-up* ist hier von hoher Bedeutung. In den einzelnen *Scale-up* Schritten vom Labormaßstab über den technischen Maßstab bis hin zum Produktionsmaßstab können Edelstahl-, Glas- und Einwegbioreaktoren (engl. *Disposable/single use bag bioreactor*) eingesetzt werden. Diese Systeme weisen jedoch

keine einheitlichen Möglichkeiten der Sensor-Adaption auf. Bei Edelstahlbioreaktoren können die Sonden meist über Standard-Stutzen (25 mm, Ingold®) an den Bioprozess adaptiert werden. Glasreaktoren hingegen sind meist nur mit kleineren Gewinden (PG 13,5) im Reaktordeckel ausgestattet, bei denen die Adaption der Spektroskopie nur bedingt möglich ist. Die Integration von spektroskopischen Methoden in Einwegbioreaktoren ist bisher ebenfalls nur sehr begrenzt möglich [50].

3.4.1 Edelstahl Bypass-Kammern für die Spektroskopie

Um diese Problematik zu lösen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein SIP- (engl. *Sterilization-in-Place*) Bypass-System entwickelt, welches die Adaption verschiedener spektroskopischer Sensoren an unterschiedliche Reaktorsysteme ermöglicht, ohne die Sterilität zu gefährden. Aufgrund der unterschiedlichen Messprinzipien wurden für die UV/VIS-, 2D-Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie unterschiedliche Bypass-Kammern entwickelt, die im Folgenden dargestellt werden. Die entwickelten Bypass-Messkammern sind in Abbildung 14 zu sehen.

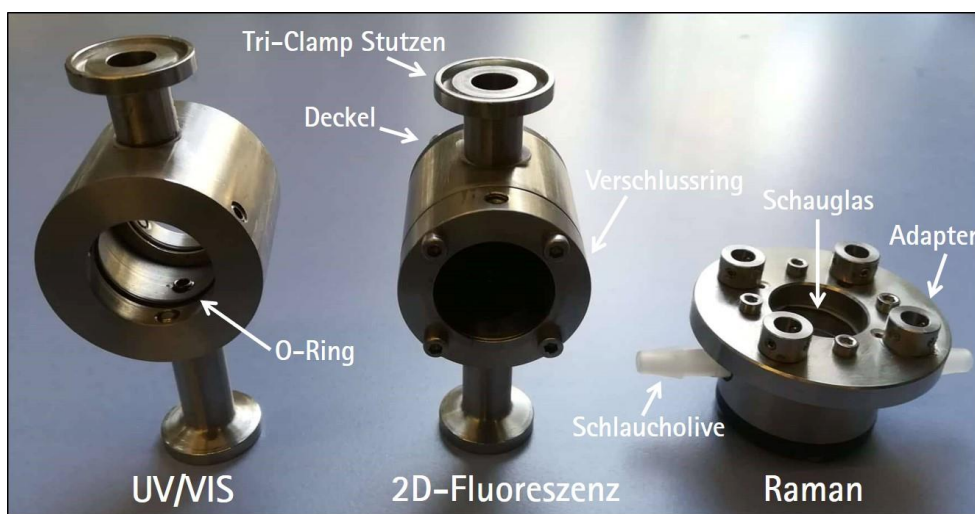


Abbildung 14: Edelstahl Bypass-Messkammern für die UV/VIS- (links), 2D-Fluoreszenz- (Mitte) und Raman-Spektroskopie (rechts).

Für die Integration der UV/VIS-Transmissions-Tauchsonde wurde eine Edelstahl Bypass-Kammer entwickelt, durch die Zellsuspension aus dem Bioreaktor mit Hilfe einer Pumpe fließen kann. Somit ist die Sonde, inklusive Messspalt, mit Zellsuspension umflutet und die Transmissionsmessung wird ermöglicht. Die Sterilität innerhalb des Bypasses wird durch die Abdichtung mit Dichtungsringen (O-Ringen) auf beiden Seiten gewährleistet. Die Bypass-

Kammer kann durch die angeschweißten Tri-Clamp Stutzen (für Klemm-Verbindungen) modular mit weiteren Bypass-Kammern und mit den später beschriebenen SIP-System zur Sterilisation verbunden werden. Die modulare Bauweise ermöglicht die Kombination unterschiedlicher Sonden innerhalb des Bypass-Systems in Reihenschaltung.

Die Bypass-Kammer für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie mittels einer Reflexionsmessung wurde nach dem Konzept von Lücking (2015) entworfen [51]. Die Bypass-Kammer besteht aus einem Klemmring, einem Kammerring und einem Verschluss, welche die Messkammer effizient abdichten. Um Reflektionen in der Kammer zu minimieren, wurde der Deckel durch Sandstrahlen mattiert und anschließend mit Titanaluminiumnitrid (TiAlN) beschichtet [51]. In dem erweiterten Design wurden das Volumen und damit die Pfadlänge für die Fluoreszenzmessung in der Bypass-Kammer vergrößert. Dadurch wird eine tiefere Eindringtiefe des Lichts und eine weitere Minimierung von zufälliger Licht-Reflektion realisiert. Für den modularen Betrieb und die Sterilisation wurden Tri-Clamp Stutzen an die Bypass-Kammer geschweißt.

Für die berührungslose Raman-Prozesssonde wurde eine Bypass-Messkammer mit entsprechendem Schauglas entworfen. Der Bypass kann über die Schlaucholiven mit Silikonschläuchen an den Bioreaktor angeschlossen werden und zusammen mit dem Schlauchsystem autoklaviert werden. Somit kann der Reaktorinhalt während der Kultivierung in einem Kreislauf durch den Bypass gepumpt werden. Die Raman-Prozesssonde kann durch Adapter (siehe Abbildung 14), die einen definierten Abstand und Position gewährleisten, mit der Messkammer verbunden werden und durch das Schauglas aus Quarzglas in Reflexion messen. Auch bei dieser Bypass-Kammer wurde ein mit Titanaluminiumnitrid beschichteter Deckel eingesetzt, um Reflektionen zu minimieren. Die technischen Zeichnungen der drei Bypass-Kammern sind im Anhang dargestellt.

3.4.2 SIP-Bypass-System

Die sterile Prozessführung ist bei Säugetierzellkultivierungen von sehr hoher Bedeutung. Säugetierzellen wachsen im Vergleich zu Mikroorganismen langsam. Kommt es zu einer Kontamination durch Bakterien oder Pilze, wachsen diese in den nährstoffreichen Medien

deutlich schneller und metabolisieren die für das Zellwachstum der Zielorganismen nötigen Nährstoffe.

CIP (engl. *Cleaning-in-Place*)- und SIP (engl. *Sterilization-in-Place*)-Systeme sind ein wesentlicher Bestandteil jeder qualitätsbewussten Herstellung von biopharmazeutischen Produkten [52]. Kleine mobile Glasbioreaktoren werden meist durch thermischen Dampfdruck (121°C, 15 min, nach dem europäischen Arzneibuch) in einem Autoklav sterilisiert [2]. Bei größeren Behältern, Reaktoren aus Edelstahl oder Rohrleitungen wird in den meisten Fällen eine Sterilisierung vor Ort mit gesättigtem Dampf bei einem Druck von 1 bar durchgeführt. Moderne *disposable* Reaktor-Systeme werden γ -sterilisiert geliefert und es können keine Sensoren mehr *inline* angeschlossen werden ohne die Sterilgrenze zu durchbrechen.

Eine Sterilisation vor Ort wird häufig bei spektroskopischen Sonden verwendet, bei denen die Sonden nicht von dem Lichtleiter gelöst werden können. Dies war auch der Fall bei der verwendeten UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzsonde. Somit können diese Sonden nicht autoklaviert werden ohne die Messtechnik zu zerstören. Dies bedeutet, dass viele spektroskopische Sensoren bisher nicht zusammen mit autoklavierbaren oder γ -sterilisierten Reaktorsystemen eingesetzt werden können.

Für die Sterilisation der Bypass-Kammern, inklusive angeschlossener Sensorik, wurde eine Kombination aus aneinander geschweißten manuell betätigenden 2/2-Wege-Membranventilen (GEMÜ Gebr. Müller Apparatebau GmbH & Co. KG, Ingelfingen) entwickelt. An das erste Membranventil ist eine aus Edelstahl bestehende Schlaucholive, ein Tri-Clamp Stutzen zur Klemm-Verbindung und ein zweites Membranventil angeschlossen (siehe Abbildung 15).

Die Schlaucholive dient der Verbindung zum Bioreaktor über einen Silikonschlauch. An die Tri-Clamp Stutzen können Sterilfilter für das Autoklavieren, die Bypass-Kammern oder der Metallschlauch für den Heißdampf angekoppelt werden. Mit Hilfe dieser Konstruktion kann die Bypass-Kammer, inklusive adaptierten spektroskopischen Sonden, durch Heißdampf sterilisiert werden und somit steril an jegliche Reaktorsysteme angeschlossen werden. Die sterilen Silikonschläuche der Bypass-Kammer und des Bioreaktors (Eingang und Ausgang) werden steril durch ein thermisches Schweißverfahren mit Hilfe des BioWelder® (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) verbunden. Die Bypass-Kammer ist somit durch eine

Schlaufe mit dem Bioreaktor verbunden und wird durch eine Pumpe (Volumenstrom 4 mL min^{-1}) kontinuierlich mit Zellkultursuspension durchströmt. Das Durchströmen des Kreislaufs mit dem verwendeten Volumenstrom zeigt keine negative Auswirkung auf die Viabilität der Zellen. Eine ausführliche SOP (engl. *Standard operation procedure*) zur Beschreibung der Abläufe und Vorgänge sowie die technischen Zeichnungen können dem Anhang entnommen werden (8.2.2.7).

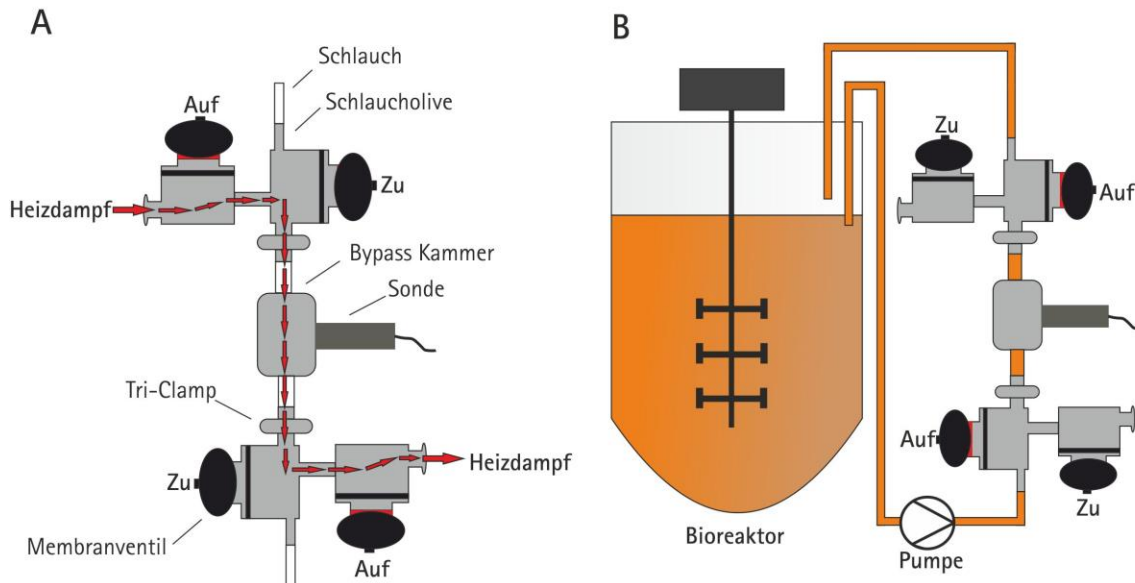


Abbildung 15: Schematische Darstellung des SIP-Bypass-Systems mit adaptierter Prozesssonde im Sterilisationsbetrieb (A) und im Kultivierungsbetrieb (B).

Das SIP-Bypass-System ermöglicht die Anbindung an sonst nur schwer spektroskopisch zugängliche Glas- und Einwegbioreaktoren. Des Weiteren kann die Sterilisation von Sonden, wie auch die eingesetzte UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzsonde, die nicht vom Lichtleiter abtrennbar sind, realisiert werden.

3.4.3 Scale-up: Übertragbarkeit der Spektraldaten

Die Übertragbarkeit der Spektraldaten in einem *Scale-up* bei unterschiedlichen Systemen wurde durch 2D-Fluoreszenzspektren in der SIP-Bypass-Kammer, die jeweils bei zwei CHO-Zellkultivierungen im 10 L und 2 L Bioreaktor angeschlossen waren, analysiert. Hierfür

wurden im vier Stunden Intervall Spektren aufgenommen. Auf die CHO-Kultivierungen wird im Kapitel 5 näher eingegangen.

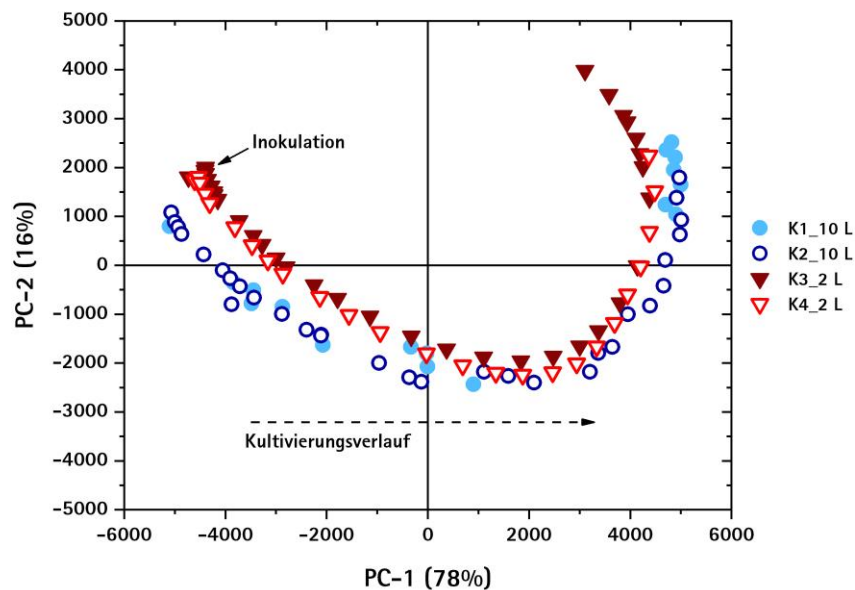


Abbildung 16: Skalierbarkeit der SIP-Bypass-Kammer: 2D-Fluoreszenz PCA-Scores der Spektren für zwei Kultivierungen im 10 L (K1, K2) und zwei Kultivierungen im 2 L Bioreaktor (K3, K4).

Um die Vergleichbarkeit der Spektren zu prüfen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit den Spektraldaten aus vier verschiedenen Kultivierungen durchgeführt. Im *Score*-Diagramm ist eine Vergleichbarkeit der Spektren beider Reaktorsysteme zu erkennen (siehe Abbildung 16).

Die Varianzen zwischen den einzelnen Kultivierungen sind gering, da die *Score*-Werte im gesamten Kultivierungsverlauf nah beieinander liegen. Somit lassen sich die Spektraldaten, die in der Messkammer im Bypass gemessen werden unabhängig von dem Reaktorsystem vergleichen.

4 Qualifizierung der spektroskopischen Methoden

In diesem Kapitel werden die bereits vorgestellten UV/VIS-, 2D-Fluoreszenz- und Raman-Sensoren hinsichtlich der Spezifität und Selektivität, in Bezug auf die in Säugetierzellkultivierungen relevanten Analyten, untersucht und diskutiert. Ein besonderer

Fokus liegt hier auf der Fragestellung, ob die Analyten in komplexen Lösungen nebeneinander detektierbar sind. Die erstellten komplexen Lösungen sind vergleichbar mit dem späteren Einsatzgebiet im Bioprozess, da insbesondere in Zellkulturmedien eine Vielzahl an Analyten enthalten sind.

Die PLS ist ein Regressionsmodell, das einen funktionalen Zusammenhang zwischen den Spektraldaten (unabhängigen Variablen, X) und den davon abhängigen Konzentrationen der Analyten (Variablen, Y) berechnet [48]. Der Zusammenhang ist insbesondere dann schwierig zu interpretieren, wenn unterschiedliche Analyten im sehr nah beieinander liegenden Spektralbereich absorbieren und die Konzentrationen untereinander korrelieren. Die PLS kann nur dann die Konzentration eines Analyten anhand der Spektraldaten in einem Gemisch selektiv bestimmen, wenn die Konzentrationen der verschiedenen Analyten keine Korrelationen untereinander aufweisen. Zusätzlich kann es bei der 2D-Fluoreszenzspektroskopie auch zu Quenching- und Kaskadeneffekten zwischen den einzelnen Analyten kommen. Um dies zu umgehen und herauszufinden, ob die verschiedenen Analyten nebeneinander selektiv detektierbar sind, wurden Versuchspläne erstellt. Die Versuchspläne wurden nach den Prinzipien des DoEs erstellt und so gewählt, dass alle Konzentrationsstufen der Analyten nicht untereinander korrelieren. Die verwendeten Versuchspläne wurden in Matlab (Version 8.4.0.150421 (R2014b)) berechnet. Das Skript ist im Anhang zu finden. Anhand der Spektraldaten werden die Modellerstellungen und die Detektionsgrenzen (LOD und LOQ) für die Analyten der jeweiligen spektroskopische Methode bestimmt.

4.1 Design of Experiments (DoE): UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Durch die UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie können ähnliche Analyten aus einer Säugetierzellkultivierung erfasst werden. Aus diesem Grund wurde der Versuchsplan für diese beiden spektroskopischen Methoden zusammen erstellt und untersucht. Die untersuchten Analyten und die untersuchten Konzentrationsbereiche sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die gewählten Konzentrationsbereiche decken sich mit den typischen Konzentrationen innerhalb

einer CHO-Zellkultivierung [53, 54]. Das Rinderserumalbumin (BSA) wurde als Modellprotein repräsentativ für die im Kultivierungsprozess auftretende Proteinmischung verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der untersuchten Analyten und der ausgewählten Konzentrationsbereiche.

Analyt	Konzentrationsbereich
NADH	0 – 1,3 (mg/L)
NAD	0 – 20 (mg/L)
Riboflavin	0 – 0,15 (mg/L)
FAD	0 – 0,05 (mg/L)
Pyridoxin	0 – 0,15 (mg/L)
BSA	0 – 1 (g/L)

Der Versuchsplan beinhaltet für jeden Analyten fünf verschiedene Konzentrationsstufen, inklusive einer Blindprobe. Jede Konzentrationsstufe kommt im Versuchsplan drei Mal vor. Damit insbesondere die Sensitivität der Messmethode untersucht werden kann, kommen vor allem niedrige Konzentrationsbereiche im Versuchsplan vor. Der Versuchsplan aus 19 Lösungen schließt außerdem einen Zentralversuch ein, der vier Mal gemessen wurde. Der Zentralversuch besteht aus einer Lösung, die jeweils 20% der höchsten Konzentration für jeden Analyten beinhaltet. Dieser dient der Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Messvarianz über den gesamten Versuchszeitraum. Somit können systematische Fehler aufgrund von äußeren Umständen erkannt werden. Der Versuchsplan und die Zusammensetzung der untersuchten Lösungen sind im Anhang aufzufinden.

Die 19 Lösungen wurden bei gleichen Umgebungsbedingungen (37°C, abgedunkelt) vermessen. Mit den aus den Versuchsplänen aufgenommenen Spektraldaten und den jeweils eingesetzten Analytkonzentrationen wurden PLS-Regressionsmodell erstellt. Die Güte der PLS-Modelle wird durch die Anzahl der benötigten PLS-Faktoren, Vorhersagefehler der Kalibrierung (RMSEC), der Kreuzvalidierung (RMSECV) und dem berechneten LOD und LOQ bewertet.

BSA:

Für das Modellprotein BSA können beide Messmethoden gute Korrelationen zwischen den Referenzwerten und den aus den Spektren mit Hilfe der PLS vorhergesagten Werten hervorbringen (siehe Abbildung 17, A und C). Die Abweichungen der BSA Werte in Bezug auf die Winkelhalbierende ($y = x$) und der Kalibrationsgerade aus der Kreuzvalidierung sind minimal.

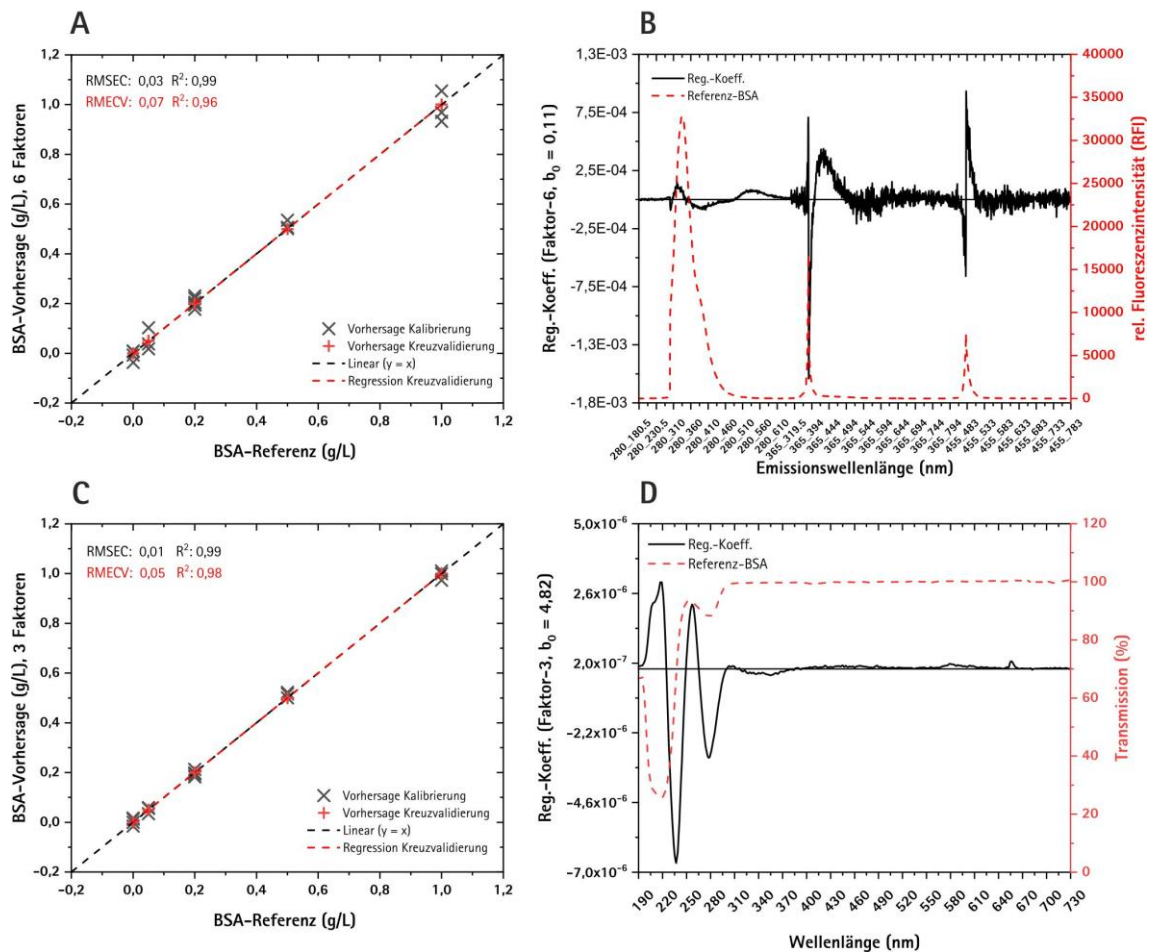


Abbildung 17: BSA-Referenz gegen PLS-Vorhersage für 2D-Fluoreszenz (A) und UV/VIS (C); Vergleich zwischen dem PLS-Regressionskoeffizient und dem Reinstspektrum von BSA für 2D-Fluoreszenz (B) und UV/VIS (D).

Der berechnete LOD von $0,23 \text{ g L}^{-1}$ und LOQ von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ist für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie höher als für die UV/VIS-Spektroskopie mit einem LOD von $0,14 \text{ g L}^{-1}$ und einem LOQ von $0,18 \text{ g L}^{-1}$ (siehe Tabelle 4). Zudem benötigt das Modell aus den UV/VIS-Spektren weniger Faktoren (3) als das Modell aus den 2D-Fluoreszenzspektren (6), um über

99% der Gesamtvarianz aus den Y-Daten zu erklären. Bei dem PLS-Modell, basierend aus den 2D-Fluoreszenzspektren, ist das Minimum der Restvarianz erst bei sechs PLS-Faktoren erreicht. Anhand der multivariaten Regressionskoeffizienten wird sichtbar welcher Wellenlängenbereich die Informationen für das PLS-Modell beinhaltet und damit den Zusammenhang zwischen den Spektren und den Konzentrationen beschreibt. Ein Vergleich zwischen den multivariaten Regressionskoeffizienten mit den Reinstspektren zeigt, ob das PLS-Modell ausschließlich durch den untersuchten Analyten beschrieben wird und welche anderen Einflüsse ggf. durch das Modell zusätzlich berücksichtigt werden.

Im 2D-Fluoreszenzspektrum ist ein deutlicher Peak bei $\lambda_{\text{Ex}} 280 \text{ nm} / \lambda_{\text{Em}} 280\text{--}350 \text{ nm}$ zu sehen, welcher auf die fluoreszierenden Aminosäuren zurückzuführen ist (siehe Abbildung 17, B). Diese Informationen werden auch für das PLS-Modell verwendet und sind in den Regressionskoeffizienten erkennbar. Zudem hat das Streulicht ($\lambda_{\text{Ex}} 365, 455 \text{ nm} / \lambda_{\text{Em}} 365, 455 \text{ nm}$) einen Einfluss auf das PLS-Modell. Innerhalb der Regressionskoeffizienten ist neben der typischen Proteinregion ein weiterer Wellenlängenbereich ($\lambda_{\text{Ex}} 365 / \lambda_{\text{Em}} 460$) zu sehen, der einen Einfluss auf das PLS-Modell hat. Dieses Signal wird durch einen Kaskadeneffekt ausgelöst. Das durch BSA emittierte Licht von 340 nm regt die in den Lösungen enthaltenden NADH-Moleküle an, welche im Folgeschluss Licht bei ca. 460 nm emittieren. Die Regressionskoeffizienten für die Anregungswellenlängen 365 und 455 nm beinhalten zudem größeres Messrauschen.

Im UV/VIS-Spektrum wird die typische Absorption bei 280 nm für Proteine festgestellt, die einen Einfluss auf das PLS-Modell besitzt (siehe Abbildung 17, D). Des Weiteren ist eine Absorption im Reinstspektrum bei 240 nm detektierbar, die auf die Peptidbindungen innerhalb des Proteins zurückzuführen ist und eine Bedeutung im PLS-Modell hat.

Riboflavin und NADH:

Der Vorhersagefehler aus der Kreuzvalidierung zeigt mit einem RMSEVC von $0,006 \text{ mg L}^{-1}$, dass Riboflavin anhand der 2D-Fluoreszenzspektren mit Hilfe der PLS-Regression sensitiv detektiert und vorhergesagt werden kann. Mit einem LOD von $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ und einem LOQ von $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ können selbst niedrigste Konzentrationen erfasst werden. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ zeigt die hohe Genauigkeit der Vorhersagen. Innerhalb der Kreuzvalidierung können die Riboflavin-Konzentrationen mit einem sehr geringen RMSECV von $0,006 \text{ mg L}^{-1}$

bestimmt werden. Nur ein PLS-Faktor wird für das Modell benötigt, um 99,99% der Gesamtvarianz zu erklären. Die aus der Literatur bekannten Wellenlängenbereiche (λ_{Ex} 280, 365, 455/ λ_{Em} 525, 525, 525) sind deutlich im Reinstspektrum und auch in den Regressionskoeffizienten erkennbar (Abbildung 18, B) [42].

Riboflavin konnte durch die UV/VIS-Spektroskopie nur im Reinstspektrum erfasst werden. Die Erstellung eines quantitativen PLS-Modells für die Riboflavin Konzentration, neben anderen hochkonzentrierten Substanzen, war nicht erfolgreich möglich. Möglicherweise waren die Riboflavin Konzentrationen für diese Messmethode zu gering.

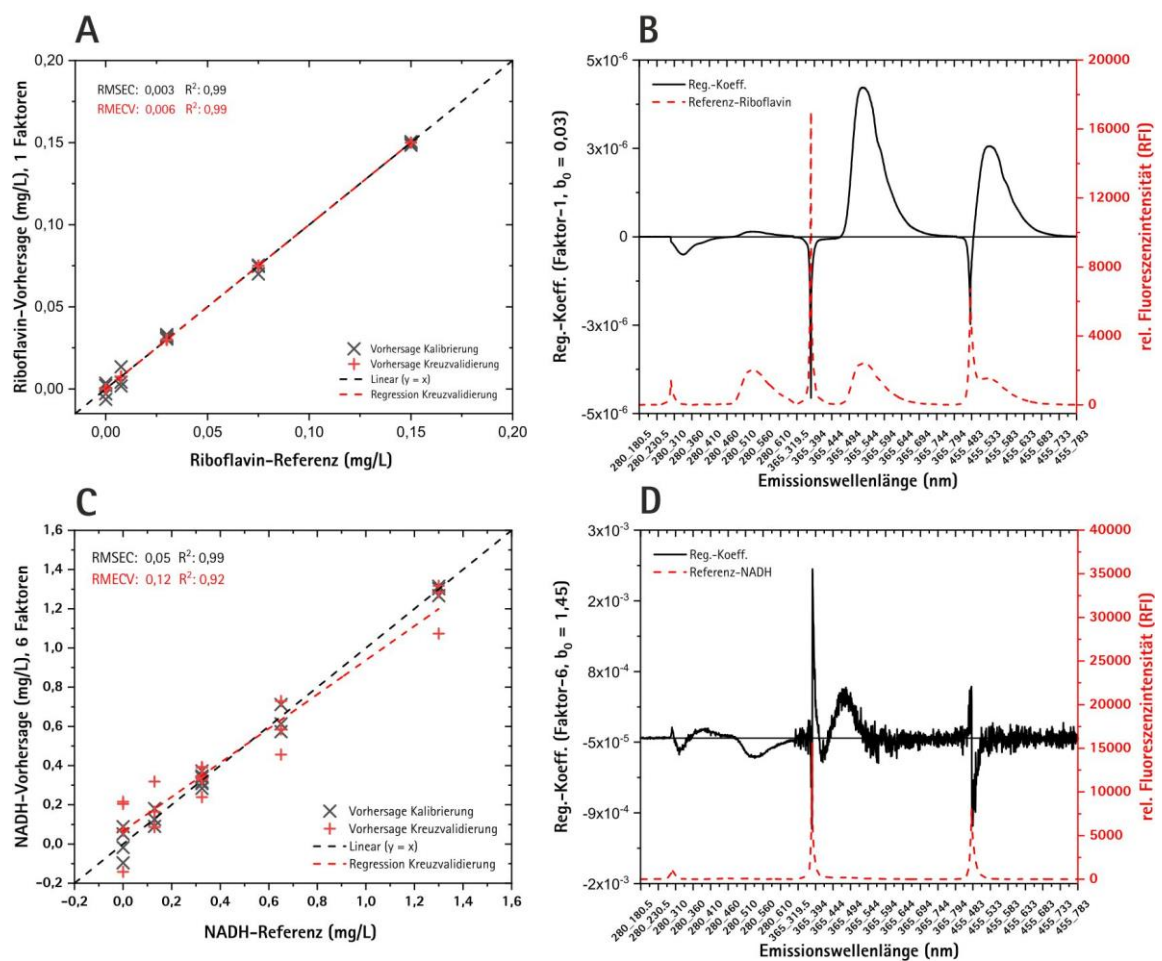


Abbildung 18: 2D-Fluoreszenz; Referenz gegen PLS-Vorhersage jeweils für Riboflavin (A) bzw. NADH (C); Vergleich der PLS-Regressionskoeffizient mit dem Reinstspektrum von Riboflavin (B) bzw. NADH (D).

Die Auswertungen für NADH ergeben mit einem RMSEC von $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ und einem RMSECV von $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ höhere Vorhersagefehler als für Riboflavin. Es werden auch sechs PLS-

Faktoren benötigt, um das Minimum der Restvarianz zu erreichen. Insbesondere streut die Vorhersage unterhalb von $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, was auch den hohen LOQ von $0,56 \text{ mg L}^{-1}$ erklärt. In dem Reinstspektrum sind lediglich Signale für das Streulicht erkennbar (siehe Abbildung 18, D). Anhand der Regressionskoeffizienten ist jedoch erkennbar, dass das Modell auch die für NADH spezifische Wellenlängenregion ($\lambda_{\text{Ex}} 360 \text{ nm}/\lambda_{\text{Em}} 460 \text{ nm}$) berücksichtigt. Zudem ist bei den Anregungswellenlängen 365 und 455 nm ein Messrauschen der Spektren in den Regressionskoeffizienten zu erkennen.

NADH konnte durch die UV/VIS-Spektroskopie innerhalb der komplexen Lösungen nicht detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass die Moleküle bei Konzentrationen von $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ zu wenig Licht absorbieren, um detektiert werden zu können.

Pyridoxin, FAD und NAD:

Die Biomoleküle Pyridoxin, FAD und NAD konnten in den gewählten Konzentrationen mit beiden spektroskopischen Methoden nicht detektiert werden. NAD^+ absorbiert bei 365 nm kein Licht, sondern nur einen geringen Anteil bei 280 nm bei einer sehr geringen Fluoreszenz [55], daher war eine Detektion neben der hohen Proteinfluoreszenz nicht detektierbar. Für die UV/VIS-Spektroskopie waren die Konzentrationen, wie für das NADH-Molekül, wahrscheinlich zu niedrig. Die Struktur von FAD und Riboflavin weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. FAD besteht aus einem Riboflavin-Gerüst mit angehängtem Adenosindiphosphat. Das Signal befindet sich daher in demselben Wellenlängenbereich, und geringe FAD Konzentrationen sind neben Riboflavin spektroskopisch nicht differenzierbar. Pyridoxin konnte aufgrund der niedrigen Absorption ebenfalls nicht detektiert werden. Bereits im Reinstspektrum waren nur geringe Signale erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Durch einen weiteren Versuchsplan konnte analysiert werden, dass Proteine (BSA) und DNA durch die UV/VIS-Spektroskopie nebeneinander detektierbar sind. Für beide Analyten wurden nur 3 PLS-Faktoren benötigt, um über 99% der Gesamtvarianz in den Spektren zu beschreiben. Dies ist insbesondere bei der Aufreinigung von therapeutischen Proteinen im *Downstream Processing* von hoher Relevanz. Der nach den Prinzipien eines DoE erstellte Versuchsplan ist dem Anhang zu entnehmen. Die Auswertungen zeigen, dass beide Komponenten nebeneinander, trotz der sehr dicht beieinander liegenden Absorption im UV-

Bereich, analysierbar sind. Im Vergleich zum BSA liegen die Signale für DNA bei 260 nm (siehe Abbildung 19, D).

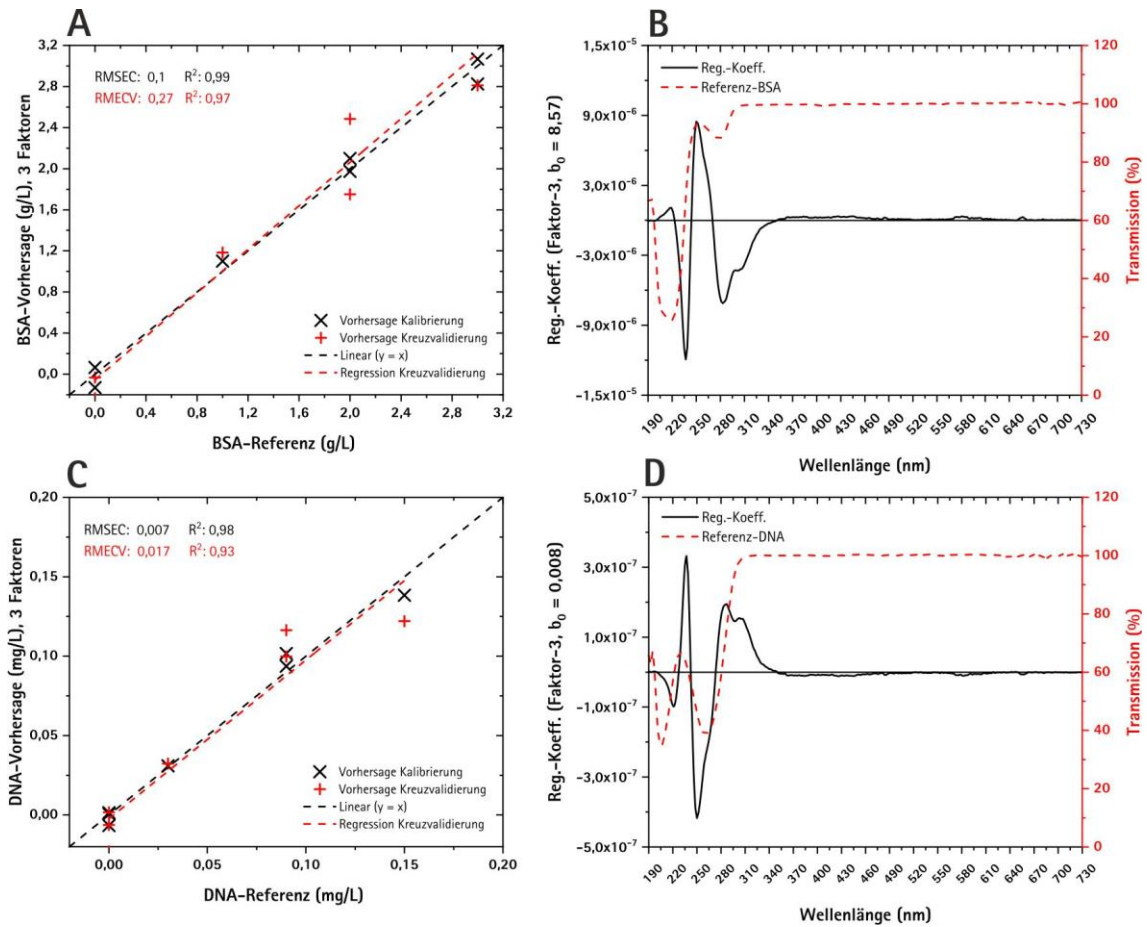


Abbildung 19: UV/VIS; Referenz gegen PLS-Vorhersage jeweils für BSA (A) bzw. DNA (C); Vergleich jeweils zwischen dem PLS-Regressionskoeffizient und dem Reinstspektrum von BSA (B) bzw. DNA (D).

Tabelle 4: Zusammenfassung der DoE-Ergebnisse (UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie).

Analyt	Messmethode	Faktoren	R ²	RMSEC	RMSECV	LOD	LOQ
BSA (g/L)	2D-F	6	0,96	0,03	0,07	0,23	0,3
BSA (g/L)	UV/VIS	3	0,98	0,01	0,05	0,14	0,18
Riboflavin (mg/L)	2D-F	1	0,99	0,003	0,006	0,0026	0,0128
NADH (mg/L)	2D-F	6	0,92	0,05	0,12	0,22	0,56
DNA (mg/L)	UV/VIS	3	0,93	0,007	0,017	0,049	0,075

Die Ergebnisse aus den Experimenten zeigen, dass mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich zur UV/VIS-Spektroskopie mehr Analyten in den untersuchten Konzentrationsbereichen in den komplexen Lösungen, detektiert werden konnten. Das Modellprotein BSA konnte durch beide spektroskopische Methoden erfasst werden, wobei hierbei die UV/VIS-Spektroskopie bessere Resultate zeigte. Riboflavin und NADH konnten in den verwendeten Konzentrationen nur mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie gemessen werden. Pyridoxin, FAD und NAD konnten mit beiden Methoden nicht selektiv detektiert werden. Anhand der ersten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die 2D-Fluoreszenzspektroskopie besser für eine Bioprozessüberwachung geeignet ist.

4.2 Design of Experiments (DoE): Raman-Spektroskopie

Für die Überwachung von chemischen Prozessvariablen, wie z.B. wichtiger Nährstoffe und Metabolite innerhalb der CHO-Zellkultivierung, kann die Raman-Spektroskopie eine gewinnbringende Ergänzung zu den bisher gezeigten spektroskopischen Methoden sein. Zu Beginn wurde untersucht, ob die relevanten Prozessvariablen BSA, Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat durch das Schauglas der Bypass-Messkammer mit Hilfe der berührungslosen Raman-Abstandssonde detektierbar sind. Um dies herauszufinden, wurden pro Analyten Reinstlösungen mit hohen Konzentrationen von 100 mM in PBS angesetzt und durch das Schauglas spektroskopisch vermessen. Hieraus konnte außerdem entnommen werden in welchem Spektralbereich die chemischen Informationen der jeweiligen im Bioprozess relevanten Variablen zu finden sind. In Abbildung 20 sind die Raman-Spektren der Reinstlösungen von Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat im Vergleich zum reinen PBS-Spektrum dargestellt. Die breite Bande bei $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, die bei allen Analyten erkennbar ist, wird durch die O-H-Streckschwingung des Wassermoleküls verursacht [33]. Im Anschluss wurde mittels eines erstellten Versuchsplan die Selektivität der berührungslosen Raman-Spektroskopie untersucht.

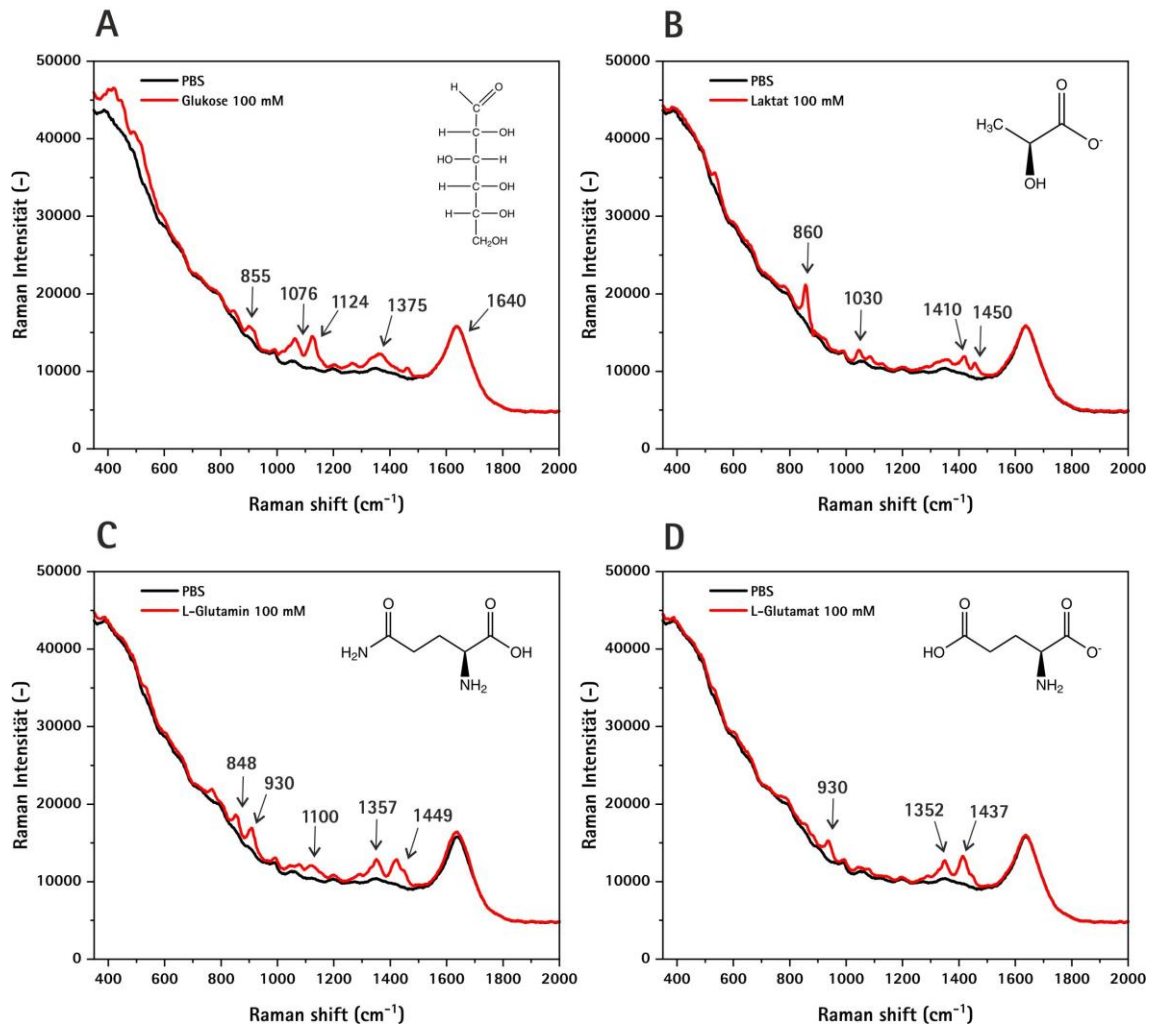


Abbildung 20: Raman-Spektren der 100 mM Reinstlösungen von Glukose (A), Laktat (B), Glutamin (C) und Glutamat (D).

Für D-Glukose sind deutliche Banden im Wellenzahlbereich von 910 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , 1124 cm^{-1} und 1375 cm^{-1} zu sehen, die sich von der Basislinie des PBS-Spektrums abheben (siehe Abbildung 20, A). Die chemische Information für die C-C-Streckschwingung ist in dem spektralen Bereich zwischen $855\text{--}975 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen [56]. Der Peak bei $\sim 1175 \text{ cm}^{-1}$ wird durch die C-O-Streckschwingungen der CHOH Gruppe des Ringes und der C-O-C-Streckung ausgelöst. Der spektrale Bereich zwischen $1326\text{--}1375 \text{ cm}^{-1}$ wird durch die CH_2 -Deformation der funktionellen Gruppe CH_2OH von Glukose verursacht [57]. Somit stimmen die Banden mit der Struktur des Glukose-Moleküls, bzw. den Bindungen überein und ein spezifischer Fingerabdruck kann mittels der Raman-Spektroskopie erfasst werden.

Das gemessene Reinstspektrum für Laktat beinhaltet einen prägnanten Peak bei 860 cm^{-1} und charakteristische Banden bei 1030 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} (Abbildung 20, B). Der Peak bei $\sim 860\text{ cm}^{-1}$ kann der C-COOH-Schwingung des Laktat-Moleküls zugeordnet werden. Die Banden bei 1030 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} können für die C-CH₃-Deformationsschwingungen und OH-Streckschwingung herangezogen werden [58]. Das Spektrum kann zur Identifizierung von Laktat verwendet werden. Damit ist die Detektion mit der berührungslosen Raman-Spektroskopie möglich.

Für L-Glutamin sind deutliche Raman-Banden in den Wellenzahlbereich 848 cm^{-1} , 930 cm^{-1} , 1357 cm^{-1} und 1449 cm^{-1} sichtbar. Außerdem ist ein kleiner Peak bei 1100 cm^{-1} im Spektrum zu sehen. Die Bande bei 848 cm^{-1} kann der C-C-Streckschwingung in der Seitenkette des Glutamin-Moleküls zugeordnet werden. Die Bande bei 930 cm^{-1} wird durch die C-COOH-Schwingung ausgelöst und die Banden bei 1357 cm^{-1} und 1449 cm^{-1} jeweils durch die CH₂-Deformationsschwingungen. Die schwache Bande bei $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ steht für die NH₂-Bindung des Glutamins [59]. Demnach enthält das Raman-Spektrum alle charakteristischen Informationen eines spezifischen Fingerabdrucks des Glutamin-Moleküls und kann mit dieser spektroskopischen Methode erfolgreich detektiert werden.

Das Raman-Spektrum für L-Glutamat sieht dem Glutamin-Spektrum sehr ähnlich. Lediglich ist die Bande bei $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ nicht enthalten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im Glutamat-Molekül, im Gegensatz zum Glutamin, keine NH₂-Gruppe am Ende der Seitenkette, sondern eine OH-Gruppe enthalten ist. Dies zeigt, dass sich die beiden strukturähnlichen Aminosäuren voneinander im Raman-Spektrum unterscheiden lassen und deutet auf eine hohe Selektivität der Raman-Spektroskopie hin.

Entsprechend der Ergebnisse zeigen alle Reinstlösungen der untersuchten Bioprozessvariablen deutliche, stoffspezifische Signale und somit einen spezifischen Fingerabdruck, der für die Identifizierung der jeweiligen Variablen herangezogen werden kann.

Design of Experiments (DoE):

Zur Selektivitätsuntersuchung der Raman-Spektroskopie wurde ebenfalls ein statistischer Versuchsplan nach den bereits beschriebenen Prinzipien mit den zuvor analysierten

Prozessvariablen erstellt und ausgewertet. Insgesamt wurden auch hier 19 Lösungen spektroskopisch durch das Schauglas vermessen. Die jeweiligen Konzentrationsbereiche der Prozessvariablen entsprechen denen in einer CHO-Zellkultivierung (vgl. Tabelle 5). Die Zusammensetzungen der Lösungen sind in einer Tabelle im Anhang zu finden.

Tabelle 5: Übersicht der untersuchten Analyten und der ausgewählten Konzentrationsbereiche.

Analyt	Konzentrationsbereich (g/L)
D-Glukose	0 - 7,5
Laktat	0 - 4
L-Glutamin	0 - 1,5
L-Glutamat	0 - 0,5
BSA	0 - 3

Mit den aus den Lösungen gemessenen Raman-Spektren wurden PLS-Regressionsmodelle jeweils für die Analyten berechnet und der LOD und LOQ bestimmt. Die Spektren für die Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamat-Vorhersage wurden mittels SNV-Vorverarbeitung (engl. *Standard normal variate*) standardisiert und korrigiert. Dazu wird die Standardabweichung und der Mittelwert des kompletten Spektrums berechnet und jede Wellenzahl des Spektrums nach Gleichung angepasst (siehe 8.2.4.1).

Das PLS-Vorhersagemodell für Glukose stützt sich auf zwei Hauptkomponenten, um über 99% der Gesamtvarianz zu beschreiben. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,98$ zeigt, dass die Glukose-Konzentrationen gut durch das PLS-Regressionsmodell vorhergesagt werden können (Abbildung 21, A). Die vorhergesagten Konzentrationen aus der Kreuzvalidierung mit einem RMSECV von $0,53 \text{ g L}^{-1}$ zeigen, dass Glukose mittels der Raman-Spektroskopie detektiert werden kann, jedoch Ungenauigkeiten insbesondere bei niedrigen Konzentrationen unterhalb von 1 g L^{-1} auftreten. Der ermittelte LOQ liegt bei $0,59 \text{ g L}^{-1}$ und erst ab dieser Konzentration sind zuverlässige Werte bestimmbar. Anhand der Regressionskoeffizienten ist zu erkennen, dass die betragsmäßig größten Koeffizienten mit den spezifischen Glukose-Banden bei der Wellenzahl $1076, 1124$ und 1375 cm^{-1} aus dem Reinstspektrum übereinstimmen (Abbildung 21, B).

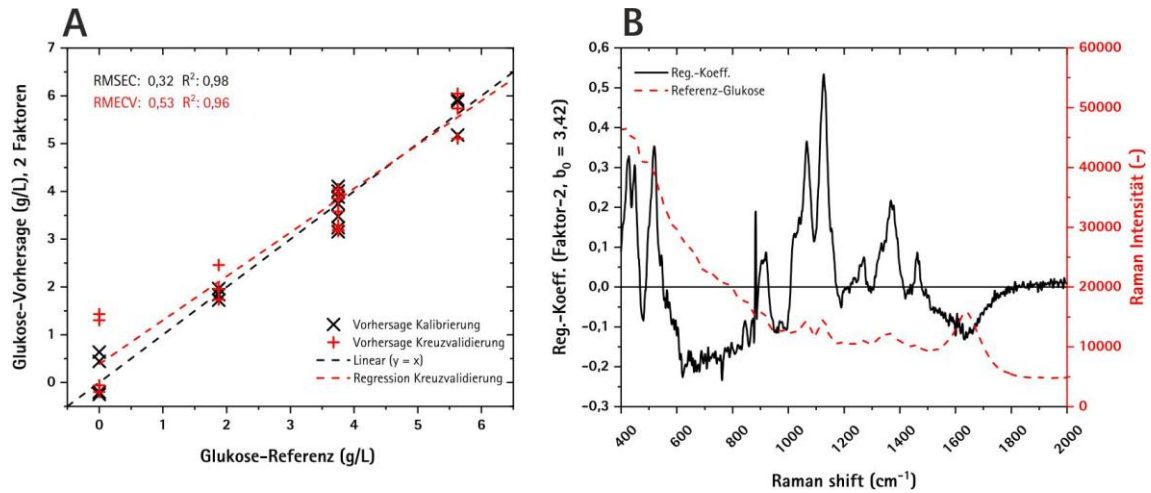


Abbildung 21: Glukose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Regressionskoeffizienten und Glukose-Referenzspektrum (B).

Für die Berechnung der Laktat-Konzentrationen werden fünf Hauptkomponenten benötigt, um über 99% der Gesamtvarianz zu beschreiben. Ein Bestimmtheitsmaß von 0,98 wird anhand der vorhergesagten Werte erreicht (Abbildung 22, A). Die Vorhersage aus der Kreuzvalidierung streut bei niedrigen Konzentrationen stärker, und es werden durch das PLS-Modell auf Basis der Spektren höhere Laktat-Konzentrationen vorhergesagt als die realen Messwerte in den Lösungen hergeben. Der berechnete LOQ für Laktat ist mit $0,45 \text{ g L}^{-1}$ etwas höher als für die Glukose. In den Regressionskoeffizienten ist deutlich zu erkennen, dass besonders die bereits ermittelten Raman-Banden bei 860 , 1410 und 1450 cm^{-1} für den spezifischen Fingerabdruck von Laktat einen signifikanten Einfluss auf das PLS-Modell haben (Abbildung 22, B). Im Vergleich zum Glukose-Modell sind die Signale gegenüber dem Messrauschen in den Regressionskoeffizienten schwächer. Dies ist vor allem dadurch begründet, dass die untersuchten Laktat-Konzentrationen deutlich geringer sind und somit schwächere Signale in der Raman-Streuung erzeugen.

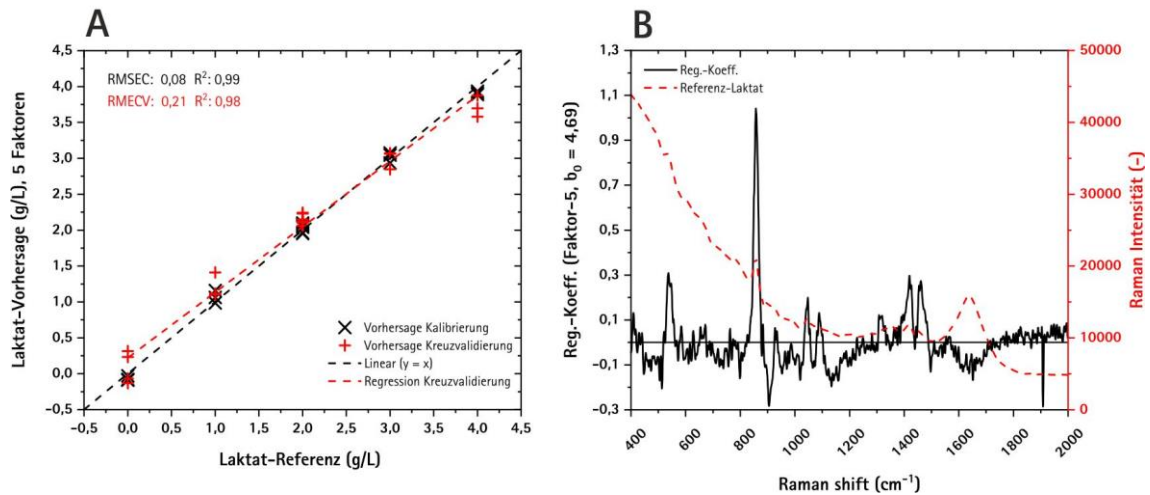


Abbildung 22: Laktat – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Regressionskoeffizienten und Laktat-Referenzspektrum (B).

Das PLS-Modell für das Modellprotein BSA wurde mit Raman-Spektren ohne Datenvorverarbeitung durchgeführt. Aus den Regressionskoeffizienten wird ersichtlich, dass besonders die Amid III Bande $\sim 1230\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$, die hauptsächlich von C-N-Valenzschwingungen und NH-Beugung hervorgerufen wird, einen großen Einfluss auf das Modell hat (Abbildung 23, B). Außerdem ist die Beugeschwingung der C_αH Gruppe im Rückgrat des BSA bei $\sim 870\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ in den Regressionskoeffizienten zu erkennen [60]. Ein weiteres deutliches Signal bei $\sim 860\text{ cm}^{-1}$ hat den signifikantesten Einfluss auf das PLS-Modell. Das Signal wird durch die Schwingungen der Disulfidbrücken im Protein verursacht [61]. Zudem ist eine Basislinienverschiebung aufgrund der Autofluoreszenz der aromatischen Aminosäuren bei hohen BSA-Konzentrationen zu erkennen, die ein starkes Messrauschen verursacht. Durch die charakteristischen Signale können die BSA-Konzentration mit einem RMSECV von $0,23\text{ g L}^{-1}$ vorhergesagt werden (Abbildung 23, A). Besonders bei niedrigen Konzentrationen treten größere Streuungen in der Vorhersage auf.

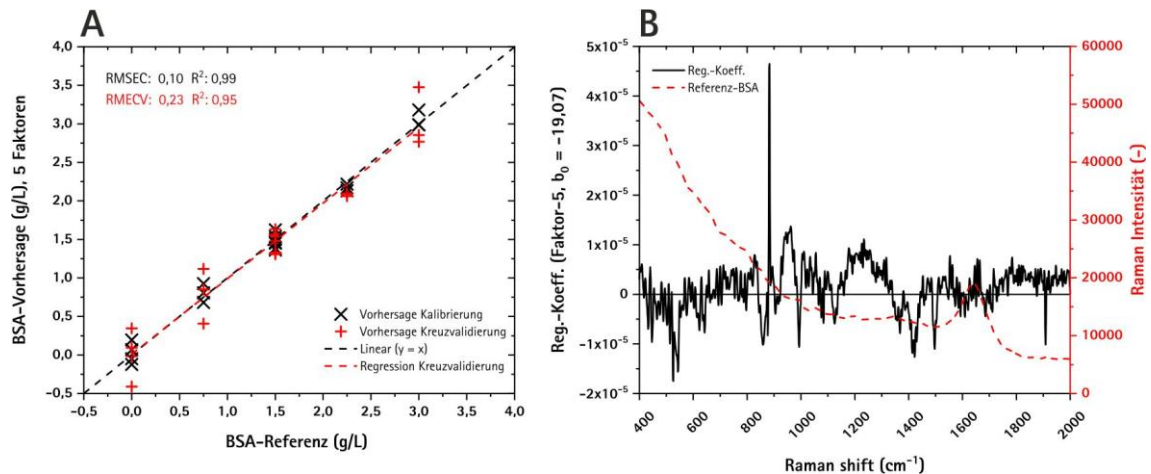


Abbildung 23: BSA – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Regressionskoeffizienten und BSA-Referenzspektrum (B).

L-Glutamin und L-Glutamat konnten innerhalb der komplexen DoE-Lösungen nicht vorhergesagt werden. Für L-Glutamin konnte im Gegensatz zu L-Glutamat in Reinstlösungen ein PLS-Modell mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99 erstellt werden (siehe Anhang). Es ist anzunehmen, dass die niedrigen Aminosäuren-Konzentrationen in den komplexen Lösungen nur geringe Raman-Signale liefern, die durch die von BSA hervorgerufene Basislinienverschiebung und der Überlagerung weiterer Signale beeinträchtigt werden.

Tabelle 6: Zusammenfassung der DoE-Ergebnisse (Raman-Spektroskopie).

Analyt	Datenvorverarbeitung	Faktoren	R^2	RMSEC	RMSECV	LOD	LOQ
Glukose (g/L)	SNV	2	0,96	0,32	0,53	0,29	0,59
Laktat (g/L)	SNV	5	0,98	0,08	0,21	0,29	0,45
BSA (g/L)	-	5	0,95	0,10	0,23	0,38	0,63

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Qualifizierung der spektroskopischen Methoden

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie weist im Hinblick auf die untersuchten Analyten BSA, NADH und Riboflavin eine hohe Spezifität und Selektivität auf. Die Analyten können nebeneinander in komplexen Lösungen mit jeweils einem LOQ unterhalb der typischen Konzentrationsbereiche in CHO-Zellkultivierungen detektiert werden. Somit sind die Ergebnisse dieser Messmethode für die Bioprozessüberwachung vielversprechend. Die

Resultate der UV/VIS-Spektroskopie hingegen, zeigen in den komplexen DoE-Lösungen ausschließlich für die Detektion von BSA und DNA eine gute Qualität. Durch diese beiden spektroskopischen Methoden ist es vor allem möglich, Prozessvariablen zu detektieren, die Informationen über biologische Aktivitäten liefern können.

Die Verwendung der Raman-Spektroskopie kann zusätzlich Informationen über chemische Prozessvariablen liefern. Mit dieser Messmethode kann die wichtigste C-Quelle, die Glukose, der Metabolit Laktat und die Proteinkonzentration nebeneinander detektiert werden. Die berührungslose Raman-Spektroskopie kann daher Informationen sowohl über die Nährstoffkonzentrationen und Metabolit-Konzentrationen als auch die Antikörper-Konzentration im Bioreaktor liefern.

Die spektroskopische Überwachung von CHO Zellkultivierungen ist daher erst durch die Kombination der verschiedenen untersuchten Methoden umfassend möglich. Erst durch diesen multimodalen Ansatz sind neben den Umgebungsbedingungen das Zellwachstum und deren Produktivität beobachtbar.

5 CHO-K1 Zellkultivierungen im Bioreaktor

In diesem Kapitel wird der Einsatz der UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur *inline* Bioprozessüberwachung von CHO-K1 Zellkultivierungen detailliert untersucht und kritisch bewertet. Die Evaluierung der Raman-Spektroskopie wird im Anschlusskapitel innerhalb eines Prozesses mit einer weiteren CHO-Zelllinie (CHO-DG44) analysiert. Die zentrale Fragestellung ist hier, welche gewinnbringenden qualitativen und quantitativen Prozessinformationen aus den Spektraldaten der jeweiligen Messmethode gewonnen werden können, um eine intensive *inline* Bioprozessüberwachung zu ermöglichen.

Die Datengrundlage für die Evaluierung der UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie bilden sechs CHO-K1 Zellkultivierungen im 10 L Edelstahlbioreaktor. Zunächst werden die unterschiedlichen Kultivierungen anhand der ermittelten *offline* Referenzdaten vorgestellt. Der Hauptteil dieses Kapitel besteht aus der qualitativen und quantitativen Untersuchung der Spektraldaten aus diesen Kultivierungen. Die Möglichkeiten und Grenzen der

spektroskopischen Methoden als nützliches PAT-Werkzeug werden erläutert und kritisch diskutiert.

5.1 Übersicht der CHO-K1 Zellkultivierungen im 10 L Bioreaktor

In Abbildung 24 sind die Verläufe der Gesamt (GZK)- und Lebendzellkonzentration (LZK), Viabilität der Zellen und die Konzentrationen wichtiger Prozessvariablen über die Zeit aus einer repräsentativen CHO-K1 Zellkultivierungen dargestellt.

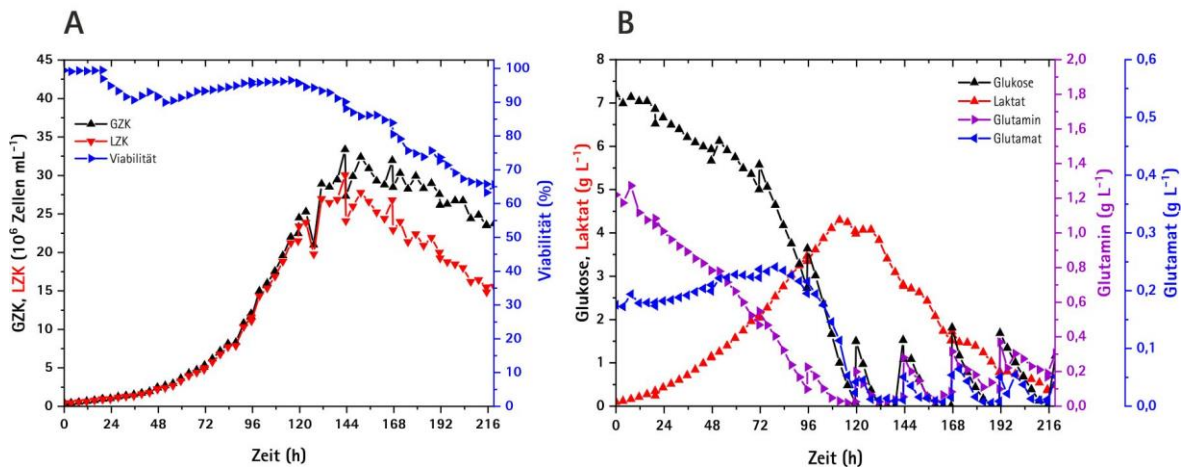


Abbildung 24: Typischer CHO-K1 Kultivierungsverlauf eines *Fed-Batch*-Prozesses der *offline* Prozessvariablen Gesamt (GZK)- und Lebendzellkonzentration (LZK), Viabilität (A), Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentration (B).

Das exponentielle Zellwachstum bis ~ 130 h korreliert stark mit dem Verbrauch der wichtigsten Kohlenstoffquelle Glukose und der Stickstoffquelle L-Glutamin. Zu diesem Zeitpunkt wird die maximale GZK von 35×10^6 Zellen mL^{-1} erreicht. Im Anschluss ist eine Abnahme der LZK und somit auch der Viabilität der Zellen zu erkennen. Nach dem Verbrauch von Glukose nach ~ 120 h wurde im 24 h Intervall Glukose und Glutamin reichhaltiges *Feed*-Medium hinzugefüttert. Die Glukosekonzentration steigt bei jeder Zufütterung auf einen Wert von knapp 2 g L^{-1} und wird anschließend innerhalb der nächsten 24 h von den Zellen in der Glykolyse metabolisiert. Der gleiche Trend ist auch bei den beiden Aminosäuren L-Glutamin und L-Glutamat sichtbar.

Die Laktatkonzentration steigt während der exponentiellen Wachstumsphase bis zu einer Konzentration von $\sim 4,5 \text{ g L}^{-1}$ an. Während der Kultivierung konvertieren CHO-Zellen einen

Anteil des gebildeten Pyruvats durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat (Warburg Effekt). Laktat ist ein Metabolit eines ineffektiven Stoffwechselweges, welches insbesondere bei hohem Glukoseverbrauch von schnell proliferierenden Zellen gebildet wird [62]. In hohen Konzentrationen ist Laktat toxisch für die Zellen und hat einen inhibierenden Effekt auf das Zellwachstum und die Produktivität [54]. Anschließend ist bei ~120 h ein metabolischer *Shift* zur Laktat-Verwertung zu erkennen. Hier findet eine metabolische Änderung der Zellen statt und Laktat wird als C-Quelle wieder verstoffwechselt.

Die Datengrundlage für die spätere Analyse der Spektren und *offline*-Analytik wurden in sechs *Fed-Batch*-Kultivierungen der Zelllinie CHO-K1 (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) im 10 L Edelstahlbioreaktor (Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) generiert. Tabelle 7 stellt eine Übersicht der Kultivierungen dar.

Tabelle 7: Übersicht der CHO-K1 Zellkultivierungen im 10 L Bioreaktor.

Kultivierung	Betrieb	Dauer (h)	Anmerkungen
CHO-K1-1	<i>Fed-Batch</i>	238	-
CHO-K1-2	<i>Fed-Batch</i>	189	-
CHO-K1-3	<i>Fed-Batch</i>	210	-
CHO-K1-4	<i>Fed-Batch</i>	189	-
CHO-K1-5	<i>Fed-Batch</i>	264	Sauerstofflimitierung von 15 h
CHO-K1-6	<i>Fed-Batch</i>	232	Automatische Glukoseregulung auf 1 g/L; 6 h ohne Durchmischung

Zur Evaluierung der UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurden die *offline* Referenzwerte für die GZK, LZK, die Viabilität der Zellen und die Laktatkonzentration herangezogen. Die jeweiligen Varianzen zwischen den *Fed-Batch*-Kultivierungen für die genannten Prozessvariablen sind in Abbildung 25 dargestellt. Abgesehen von CHO-K1-5 sind die Verläufe der Kultivierungen sehr ähnlich.

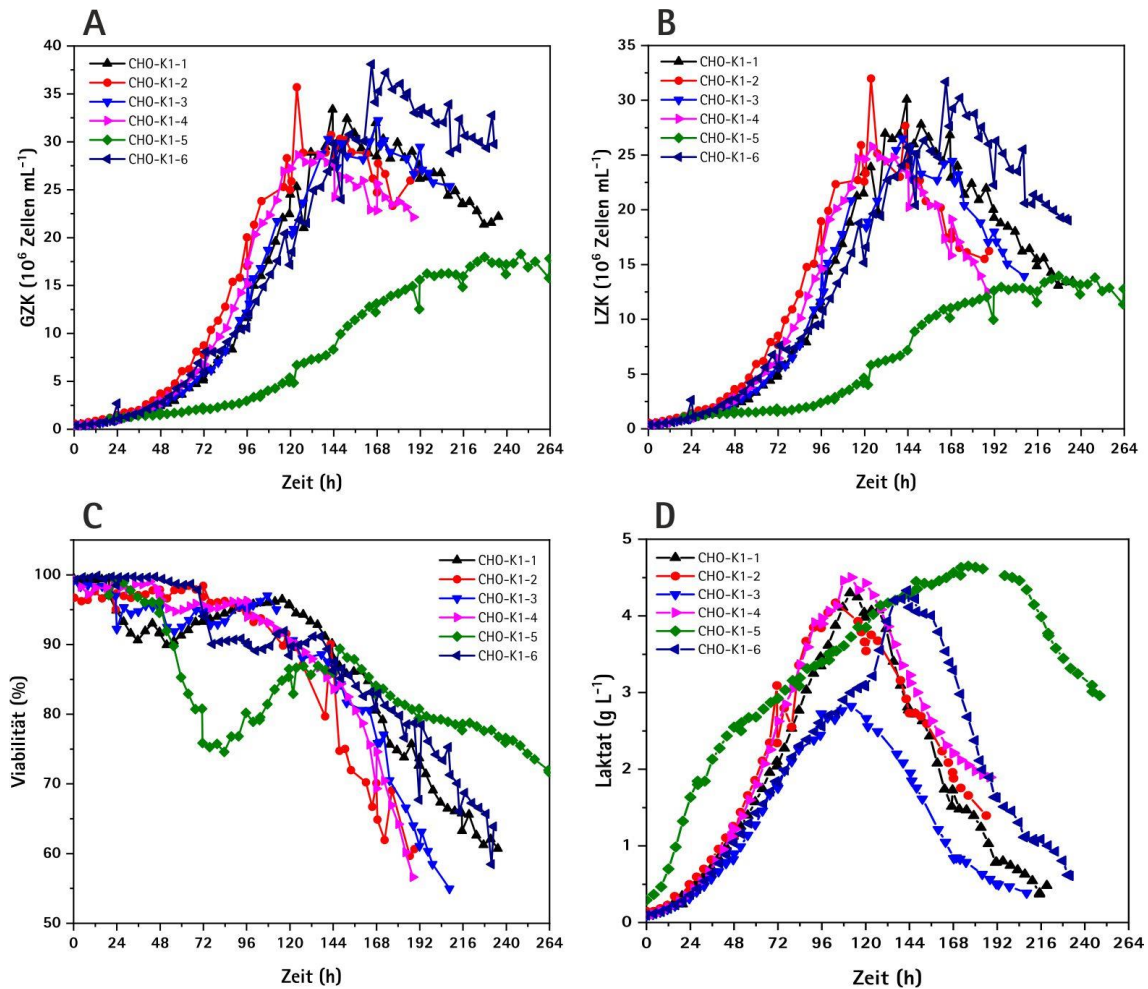


Abbildung 25: *Offline* Referenzmessungen von sechs CHO-K1 Zellkultivierungen. Gesamtzellkonzentration (GZK) (A), Lebendzellkonzentration (LZK) (B), Viabilität (C), Laktatkonzentration (D).

In allen Kultivierungen steigt die GZK innerhalb der ersten 140 h auf $\sim 32 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} an. Anschließend sinkt die LZK bis auf ca. 15×10^6 Zellen mL^{-1} bis ungefähr zu Stunde 200. Die Viabilität der Zellen ist bei allen Kultivierungen konstant bei über 90% in den ersten 136 h und fällt im Anschluss auf unter 60% am Ende der Kultivierungen. In der Kultivierung CHO-K1-5 ist ein drastischer Rückgang der Viabilität zwischen 30 bis 68 h zu erkennen, der sich auch auf das Zellwachstum stark auswirkt. Dies ist auf eine Sauerstofflimitierung zwischen 26-41 h nach der Inokulation zurückzuführen. Die Viabilität der Zellen erholt sich im Anschluss wieder, allerdings wurde eine vergleichbar hohe Zellzahl in dieser Kultivierung nicht mehr erreicht.

Auch der Laktat-shift ist bei allen Kultivierungen bis auf CHO-K1-5 vergleichbar. Bei CHO-K1-6 tritt der Laktat-shift ca. 25 h später ein. In Kultivierung K6 wurde die

Glukosekonzentration über 1 g/L gehalten, somit stand immer ausreichend Glukose zur Verfügung. In CHO-K5 steigt die Laktatkonzentration schon vor der Sauerstofflimitierung ungewöhnlich stark an.

Es sind zwei signifikante Veränderungen während eines typischen Kultivierungsprozesses zu beobachten: Zuerst die metabolische Veränderung innerhalb der Zellen durch den Wechsel auf die Laktatverstoffwechslung und etwas später die Abnahme der Viabilität.

5.2 Qualitative Untersuchung der UV/VIS- und 2DF-Spektroskopie

Eine wichtige Grundlage für die Evaluierung von neuen spektroskopischen Methoden zur *inline* Bioprozessüberwachung von CHO-Zellkultivierungen ist eine Vergleichbarkeit der Messdaten von mehreren Prozessen. In diesem Kapitel werden zunächst die reinen Spektraldaten analysiert, anschließend erfolgt die Analyse mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die Untersuchung anhand der Darstellung des Prozessverhaltens als Trajektorie (*Batch Evolution Model*, BEM). Zuerst werden jeweils die Daten der 2D-Fluoreszenzspektroskopie betrachtet und im Anschluss die Daten der UV/VIS-Spektroskopie.

5.2.1 Analyse der 2D-Fluoreszenzspektren

Exemplarisch sind für alle CHO-Zellkultivierungen die Emissionsspektren für jede der drei Exzitationswellenlängen über die Prozessdauer einer Kultivierung (CHO-K1-3) dargestellt (siehe Abbildung 26).

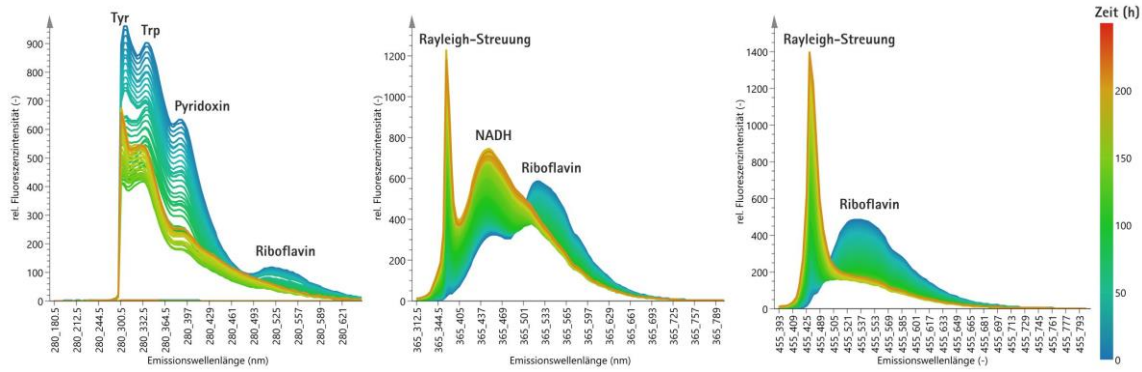


Abbildung 26: Typischer Verlauf der 2D-Fluoreszenzemissionspektren für die Exzitationswellenlängen von 280 (links), 365 (Mitte) und 455 nm (rechts) während einer CHO-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.

Die rel. Fluoreszenzintensitäten der Aminosäuren Tyrosin (Tyr, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/303$), Tryptophan (Trp, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/340$) und des Vitamins Pyridoxin ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/389$) nehmen während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen ab und anschließend wieder zu. Säugetierzellen nehmen die fluoreszierenden Aminosäuren aus dem Medium auf, da sie nicht in der Lage sind, diese zu synthetisieren und verwenden diese für die Bildung von Biomasse und für die Produktion von Proteinen. Beide Effekte reduzieren die Fluoreszenzintensität der Aminosäuren während der Kultivierung, da die Integration der Aminosäuren in die größeren Proteinstrukturen die Fluoreszenzintensitäten abhängig von der Lage innerhalb der Proteinstruktur abschwächt [63]. Eine hydrophile Umgebung oder das Vorhandensein von Quenchern, wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure, innerhalb der Proteine kann die Fluoreszenz inhibieren [64, 65].

Die emittierte Fluoreszenz der intrazellulären reduzierten NADH-Moleküle ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/437$) nimmt während des Kultivierungsprozesses bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase zu. Der Anstieg korreliert mit der zellulären Atmung der Zellen und der ansteigenden Lebendzellkonzentration. Das Coenzym überträgt Elektronen und ist essentiell für die ATP Generierung in Zellen [66]. Das Überwachen der Änderungen von cytosolischen NADH-Konzentrationen kann daher Informationen über den Energie-Stoffwechsel und Redoxzustände von Zellen in verschiedenen metabolischen und physiologischen Zuständen liefern.

Das Vitamin Riboflavin wird von den wachsenden CHO-Zellen verbraucht, und damit ist auch ein Rückgang in den Fluoreszenzintensitäten der Spektralregionen $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/525$, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/525$ und $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 455/525$ während der exponentiellen Wachstumsphase zu erkennen (siehe Abbildung 26). Riboflavin ist essenziell für die Biosynthese der Coenzyme FAD und FMN, welche beide als biochemische Elektronencarrier im Tricarbonsäurezyklus und der Atmungskette fungieren (siehe Abbildung 1). Das Signal nimmt in dieser Wellenlängenregion ab, da die FAD-Fluoreszenzintensität schwächer als die Intensität für Riboflavin ist [67].

In Abbildung 27 ist die Gelöst-Sauerstoffkonzentration ($p\text{O}_2$) innerhalb der Kultivierung CHO-K1-5 dargestellt. Nach 25 h wurde der $p\text{O}_2$ -Setpoint von 40% unterschritten. Anstelle der Sauerstoff-Regelung wurde Stickstoff (N_2) in den Reaktor geleitet und der $p\text{O}_2$ erreichte eine Sättigung von 0% in der Zellsuspension. Über 15 h wurde die Sättigung bei 0% mit der N_2 -Regelung aufrechterhalten und anschließend ab 42 h wieder mit Sauerstoff geregelt.

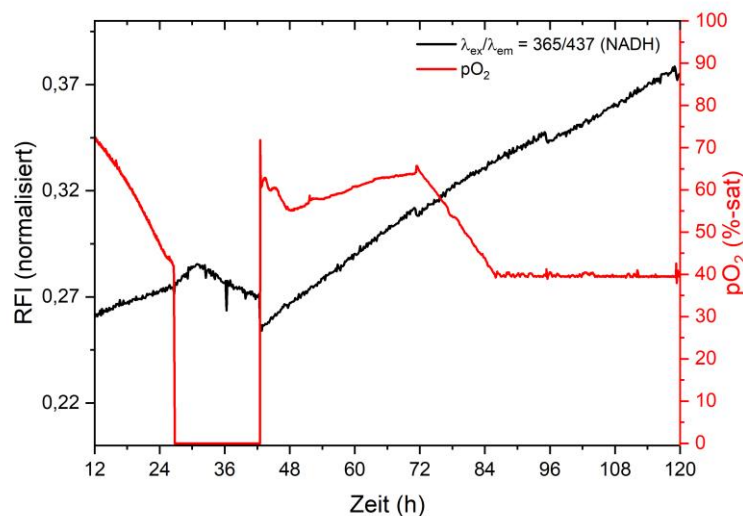


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der normalisierten rel. Fluoreszenzintensität (RFI) der NADH-Wellenlängenregion ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/437$) und die Gelöst-Sauerstoffkonzentration in der Kultivierung CHO-K1-5.

Anhand des Verlaufs der normalisierten rel. Fluoreszenzintensität (RFI) der Wellenlängenregion für NADH ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/437$) lässt sich die Sauerstofflimitierung beobachten. Bei Beginn der Sauerstofflimitierung ist ein stärkerer Anstieg der NADH-Fluoreszenzintensität zu erkennen. Dies ist damit zu begründen, dass sich während einer

Sauerstofflimitierung das Gleichgewicht zwischen der oxidierten und reduzierten Form des Coenzym zur reduzierten Form (NADH) bewegt [68]. NADH akkumuliert in der Zelle, da es innerhalb der Atmungskette ohne molekularen Sauerstoff keine Elektronen an den terminalen Elektronenakzeptor abgeben kann und nicht zu dem nicht-fluoreszierenden NAD^+ oxidiert werden kann (siehe Abbildung 1). Allerdings stagniert die aerobe Glykolyse der Zellen, wenn NADH aufgrund der Abwesenheit des terminalen Elektronenakzeptors nicht zurück in NAD^+ oxidiert werden kann. Die Folge ist ein Rückgang des NADH-Pools innerhalb der Zellen und damit ein Rückgang der Fluoreszenzintensität. Nach der erneuten Sauerstoffzufuhr bei 42 h beginnt die Glykolyse bzw. NADH Oxidation in den CHO-Zellen und damit auch der Abfall des Signals in der Wellenlängenregion für die NADH-Fluoreszenz. Somit ist die spektroskopische Überwachung des NADH-Moleküls nützlich, um metabolische Aktivitäten, wie die Glykolyse, unter verschiedenen physiologischen Zuständen der Zelle zu erfassen.

Ein weiteres intensives Signal in den Spektren ist die Rayleigh-Streuung bei $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$. Die Streuung steigt im Verlauf des Prozesses, da wachsende Zellen als Streulichtzentren agieren und die Eindringtiefe des Anregungslichts reduzieren. Zudem führen höhere Zellkonzentrationen zu einem größeren Anteil von Rückwärtsstreuung.

Somit enthalten die 2D-Fluoreszenzspektren wichtige Informationen über relevante Biomoleküle während des Kultivierungsprozesses. Wichtige Prozessvariablen, wie die GZK, LZK, Viabilität der Zellen, Nährstoffkonzentrationen und der Zellmetabolismus, haben einen Einfluss auf die untersuchten Wellenlängenregionen bzw. den Fluoreszenzintensitäten. Aufgrund der hohen Komplexität der Spektren ist der Gebrauch von multivariaten Datenanalysemethoden für eine weitere Interpretation unverzichtbar.

5.2.2 Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren mit Hilfe der PCA

Der erste Schritt in der multivariaten Datenanalyse ist die qualitative Untersuchung der Spektren mit Hilfe der PCA, bei der die multivariaten Daten zu einer kleineren Anzahl an unkorrelierten Variablen, den Scores der jeweiligen Hauptkomponente (PCs), reduziert werden. Die PCA gibt einen Überblick über die Spektraldaten der sechs CHO-K1 Zellkultivierungen, bei den Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede innerhalb der Daten in einem

Scoreplot visualisiert werden können. Abbildung 28, A stellt den Scoreplot der PC-2 gegen die PC-1 für alle sechs Kultivierungen dar. Eine Datenvorverarbeitung der 2D-Fluoreszenzspektren war nicht notwendig, da die Signale reproduzierbar und klar erkennbare Peaks zu erkennen sind, die bereits einen ausreichenden Informationsgehalt aufweisen.

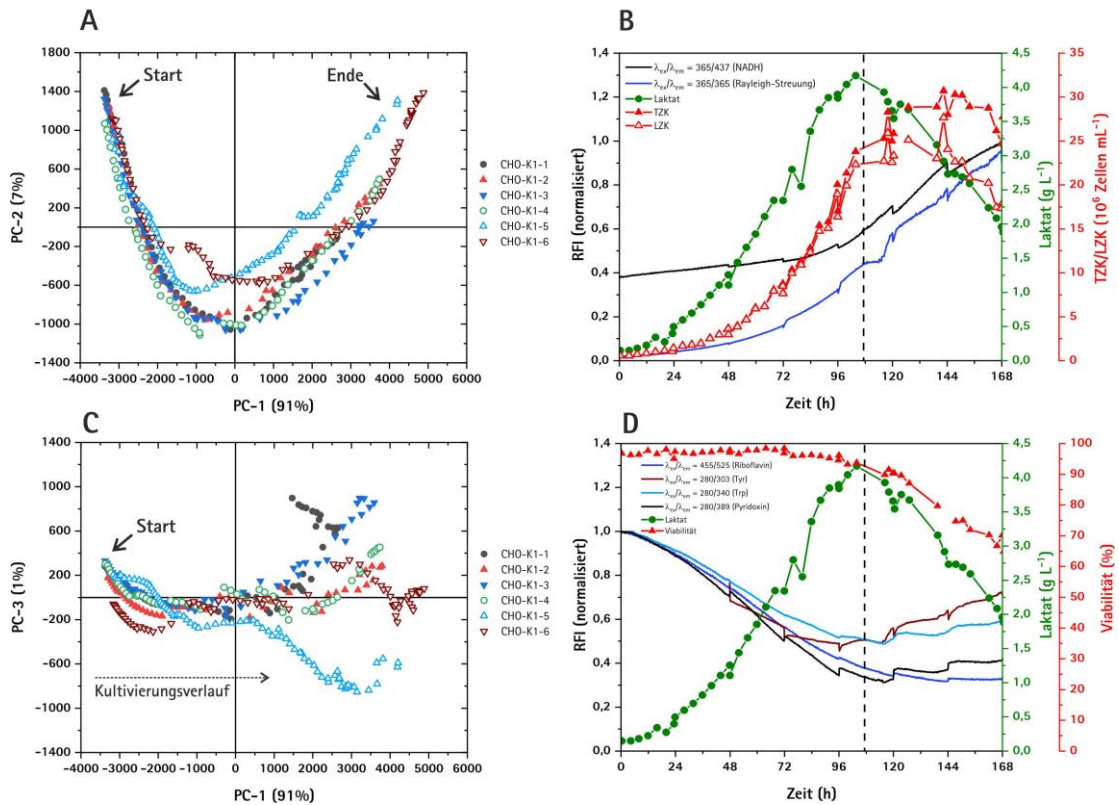


Abbildung 28: PCA-Scores der 2D-Fluoreszenzspektren zu den Zeitpunkten der *offline* Referenzwerte von 6 verschiedenen 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen. A: PC-2 gegen PC-1, C: PC-3 gegen PC-1, B: Verlauf der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) der Wellenlängenregion für NADH, der Rayleigh-Streuung und der *offline* Werte für Laktat, TZK und LZK, D: Verlauf von der RFI für Riboflavin, Tyrosin, Tryptophan, Pyridoxin und der *offline* Werte für Laktat und der Viabilität. Die vertikale gestrichelte Linie bei 110 h markiert das Minimum der Score-Werte in der zweiten PC.

Die ersten zwei PCs beschreiben zusammen 98% der gesamten spektralen Varianz. Der Trend innerhalb der Scores ist sehr ähnlich bei allen Kultivierungen. Neben dem Startpunkt und dem Ende der Kultivierung ist auch ein Wendepunkt in den Score-Werten gut erkennbar. Die Score-Werte bei der Inokulation liegen dicht beieinander, was für eine hohe Reproduzierbarkeit der spektroskopischen Messungen bei vergleichbaren Bedingungen mit geringen Zellkonzentrationen zu Beginn der Kultivierungen spricht. PC-1 beschreibt 91% der

Varianz innerhalb der Spektren. Diese wird hauptsächlich verursacht durch die Rayleigh-Streuung und die Fluoreszenzänderung der Aminosäuren, des Riboflavins und von NADH (siehe im Anhang Abbildung 54). Somit ist das Zellwachstum für den Anstieg der Scores der ersten PC verantwortlich.

Der Verlauf der *Score*-Werte von den Kultivierungen CHO-K1-5 und CHO-K1-6 unterscheidet sich leicht von den *Score*-Werte der anderen Kultivierungen. In CHO-K1-6 ist ein Unterschied vor dem Minimum in den *Score*-Werten der zweiten PC zu erkennen, der auf die sechs Stunden ohne Durchmischung während der Kultivierung zurückzuführen ist. Der Unterschied in den *Score*-Werten für CHO-K1-5 ist durch die bereits beschriebene Sauerstofflimitierung und der damit verbundenen Zellatmung und niedrigeren Zellkonzentration begründet.

Der vertikale *Score*-Werte-Verlauf entlang der zweiten PC mit 7% Erklärungsanteil verläuft bei allen Prozessen erst fallend bis zu einem Minimum und anschließend steigt dieser wieder bis zum Ende der Kultivierung an. Anhand der zugehörigen *Loading*-Werte ist zu erkennen, dass insbesondere die Wellenlängenregionen für die aromatischen Aminosäuren, Pyridoxin und Riboflavin einen starken Einfluss auf die zweite Hauptkomponente haben (siehe Abbildung 54 im Anhang). Die Minimum *Score*-Werte innerhalb der PC-2 befinden sich genau zu dem Zeitpunkt, in dem die CHO-Zellen den Zellmetabolismus von Laktat-Produktion zu Laktat-Abbau ändern. Der Zeitpunkt ist durch die vertikale gestrichelte Linie in Abbildung 28, B gekennzeichnet. Die Überwachung der Laktatkonzentration ist von hoher Bedeutung, da sich die Akkumulation von Laktat toxisch auf die CHO-Zellen auswirkt und deren Produktivität vermindern kann [69]. Laktat fluoresziert nicht und kann deswegen nicht über PLS-Modelle aus den Fluoreszenzspektren quantitativ vorhergesagt werden. In der Literatur sind dennoch Ansätze für eine Laktat-Korrelation ohne eine direkte Kausalität zu finden [70].

Die RFI der Wellenlängenregion für die Rayleigh-Streuung zeigt, dass diese zu dem Zeitpunkt des Laktat-*Shifts* für eine kurze Zeit stagniert (Abbildung 28, B). Der Effekt ist in allen sechs Kultivierungen sichtbar und deutet daraufhin, dass die Proliferation der Zellen in dieser Zeit unterbrochen ist. Dies ist wahrscheinlich damit zu begründen, dass die Zellen die Energie zu diesem Kultivierungszeitpunkt anstelle für das Wachstum für die Änderung des Metabolismus verwenden. Zudem steigt die Fluoreszenzintensität in der Wellenlängenregion für NADH während des Laktat-*Shifts* stärker an. Eine mögliche Erklärung für den Signalanstieg ist, dass

das Enzym Laktatdehydrogenase NADH bei der Umwandlung von Laktat zu Pyruvat generiert (siehe Abbildung 1) [71]. Pan *et al.* (2017) zeigte, dass die Tricarbonsäurezyklus Aktivität zum Zeitpunkt des Laktat-*Shifts* ansteigt [72]. Das umgewandelte Pyruvat und das niedrigere NADH/NAD⁺ Verhältnis unterstützen die höhere Aktivität im Tricarbonsäurezyklus und damit auch die höhere Proliferation der Zellen und damit den schnellen Zellwachstums und den rapiden Anstieg der Rayleigh-Streuung nach der metabolischen Veränderung.

Des Weiteren repräsentiert der Verlauf der zweiten PC die Fluoreszenzintensitäten der Aminosäuren. Die RFI der aromatischen Aminosäuren fällt lediglich bis zu dem untersuchten Zeitpunkt, stagniert für eine Zeit und steigt anschließend leicht an (Abbildung 28, D). Forschungen belegen, dass die Aufnahme von allen essentiellen Aminosäuren nach dem Laktat-*Shift* abnimmt [72]. Es werden zudem höhere Aminosäurekonzentrationen mit dem *Feed-Medium* hinzugefügt als von den CHO-Zellen metabolisiert werden. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt für den Anstieg der Fluoreszenz ist, dass absterbende Zellen bei der Zellyse intrazelluläre Komponenten in das Medium abgeben.

Der *Scoreplot* der PC-3, mit einer Erklärungsvarianz von 1% gegen PC-1, beinhaltet weitere Informationen über die sechs Prozesse. Besonders variieren die *Score*-Werte entlang der PC-3 ab dem Mittelpunkt der Kultivierungen. Kultivierung CHO-K1-5 hat, wie auch bei den anderen Analysen, die größte Abweichung innerhalb der Prozesse. Aus den *Loadings* der PC-3 ist zu entnehmen, dass besonders die Wellenlängenregion für die NADH-Fluoreszenz den größten Einfluss hat (siehe Abbildung 54). Dies zeigt, dass die dritte Hauptkomponente maßgeblich die Viabilität bzw. die Aktivität im Tricarbonsäurezyklus der Zellen beschreibt.

5.2.3 Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren anhand von Prozesstrajektorien

Die spektroskopische Bioprozessüberwachung wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich durch die multivariate statistische Prozesskontrolle (eng. *multivariate statistical process control*, MSPC) erweitert. Die MSPC ist ein weiterer Ansatz, bei dem, basierend auf den Varianzen in den Spektraldaten, ohne die Berücksichtigung von *offline* Referenzdaten, qualitative Aussagen über den laufenden Prozess getroffen werden können. Hierdurch können

frühzeitige Abweichungen des Prozesses anhand der Spektraldaten erkannt werden in dem das Prozessverhaltens als Trajektorie (*Batch Evolution Model*, BEM) dargestellt wird.

Zur Bestimmung einer Prozesstrajektorie (BEM) wurde ein PLS-Modell für die Kultivierungszeit erstellt. Hierfür wurden alle Spektren, die im 10 min Intervall aufgenommen wurden von mehreren Kultivierungen verwendet.

Das erstellte BEM verwendet 3 PCs, korrespondierend mit $R^2X = 0,792$, $R^2Y = 0,992$ und $Q^2Y = 0,983$. Abbildung 29 (oben) stellt die Trajektorie der *Score*-Werte der ersten PC von drei Kultivierungen (CHO-K1-1, CHO-K1-2 und CHO-K1-3) dar. Diese drei Kultivierungen wurden als „optimal“ deklariert. Daher stellt das BEM aus diesen drei Kultivierungen einen „goldenen Batch“ dar und wird als „Golden Batch Trajektorie“, die einen optimalen Verlauf einer Kultivierung repräsentiert mit der dreifachen (\pm) Standardabweichung dargestellt, die den zulässigen Variationsbereich angibt. Kultivierungen, die innerhalb dieses Kontrolllimits verlaufen, können als erfolgreiche Prozesse angesehen werden.

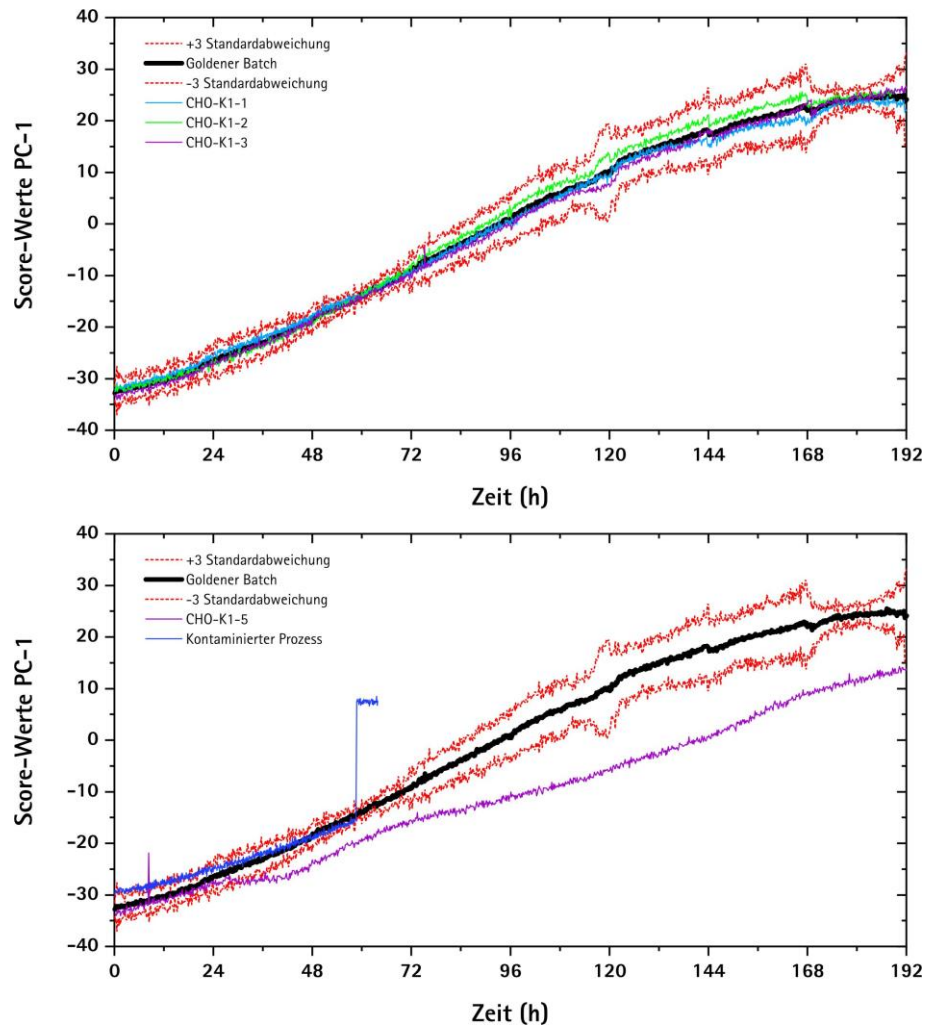


Abbildung 29: Prozesstrajektorien anhand der 2D-Fluoreszenzspektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrolllimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung mit Sauerstofflimitierung (CHO-K1-5) und kontaminierte Kultivierung außerhalb der Kontrollimits (unten).

Die untere Trajektorie zeigt (Abbildung 29), die bereits analysierte Kultivierung mit der Sauerstofflimitierung (CHO-K1-K5). Nach 26 h, beim Eintritt der Sauerstofflimitierung, verläuft die Trajektorie außerhalb der Kontrollimits. Dies unterstreicht die bereits untersuchten spektralen Unterschiede innerhalb dieser Kultivierung, die durch die Abwesenheit von Sauerstoff und die damit verbundene Veränderung des zellulären Metabolismus, hervorgerufen werden.

Anhand der Trajektorie aus den 2D-Fluoreszenzspektren kann somit frühzeitig, ohne *offline* Daten, erkannt werden, dass die Kultivierung von dem „golden Batch“ abweicht. Neben dieser

Beobachtung konnte in einer weiteren Kultivierung anhand der spektralen Veränderung eine bakterielle Kontamination in den ersten 50 h erkannt werden (Abbildung 29, unten). Durch eine bakterielle Kontamination werden Nährstoffe schneller abgebaut und das Streulicht steigt aufgrund des schnelleren Zellwachstums der Bakterien rapide an. Dies führt zu bemerkenswerten spektralen Veränderungen während der Kultivierung.

Somit konnte gezeigt werden, dass *Batch Evolution* Modelle erfolgreich zur qualitativen Untersuchung von Säugetierzellkultivierungen verwendet werden können, um Prozessabweichungen frühzeitig zu erkennen.

5.2.4 Analyse der UV/VIS-Spektren

Für die Analyse der UV/VIS-Spektren ist der spektrale Verlauf einer Kultivierung (CHO-K1-3) mit den aufgezeichneten Spektren im 10 min Intervall in Abbildung 30 exemplarisch dargestellt. Das Spektrum zum Zeitpunkt $t=0$ in Abbildung 30, A ist charakteristisch für die D_2 /Halogen Lichtquelle. Mit zunehmender Prozesszeit nehmen die Signalintensitäten, angegeben in *Counts*, über den gesamten spektralen Bereich ab. Durch die zunehmende Trübung in der Zellsuspension wird das Anregungslicht innerhalb des Messspalts der Transmissionssonde stärker abgeschwächt.

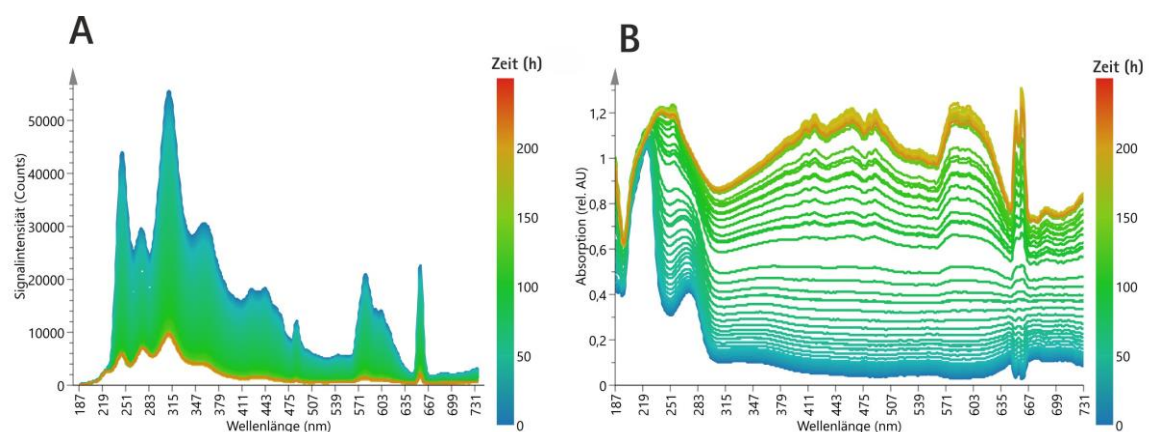


Abbildung 30: Typischer Verlauf der UV/VIS-Spektren anhand der Signalintensität in *Counts* (A) und die Umrechnung in die rel. Absorption (rel. AU) (B) während einer CHO-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.

In Abbildung 30, B sind die Spektren, bei denen jeweils *offline* Referenzwerte vorliegen, in die relative Absorption (rel. AU) in Bezug auf I_0 nach Gleichung 2 und 3 umgerechnet. Durch die Trübung wird über den gesamten Wellenlängenbereich mehr Licht absorbiert und eine systematische Verschiebung der Basislinie entsteht. Zusätzlich kommt es bei einer höheren Zellkonzentration und Trümmern bzw. Aggregaten von toten Zellen zu einer stärkeren Lichtstreuung. Durch diese Effekte können chemische Informationen in einzelnen spezifischen Wellenlängenregionen schwieriger erfasst werden.

Die PCA-Scores der Absorptionsspektren aus den sechs CHO-Zellkultivierungen, die in Abbildung 31 dargestellt sind, zeigen einen vergleichbaren Verlauf innerhalb der einzelnen Prozesse. In allen Verläufen steigen die *Score*-Werte nach der Inokulation entlang der zweiten Hauptkomponente an bis diese anschließend bei einem Wendepunkt wieder zum Kultivierungsende sinken. Im Vergleich zu dem *Scoreplot* der 2D-Fluoreszenzspektren sind jedoch deutlich größere Unterschiede zwischen den Kultivierungen zu erkennen. Bereits zum Zeitpunkt der Inokulation sind größere Abweichungen zwischen den Kultivierungen zu sehen. Bei der Hauptkomponentenanalyse erklärt die erste PC 98% der Gesamtvarianz in den spektralen Daten, die zweite PC trägt mit weiteren 1% bei.

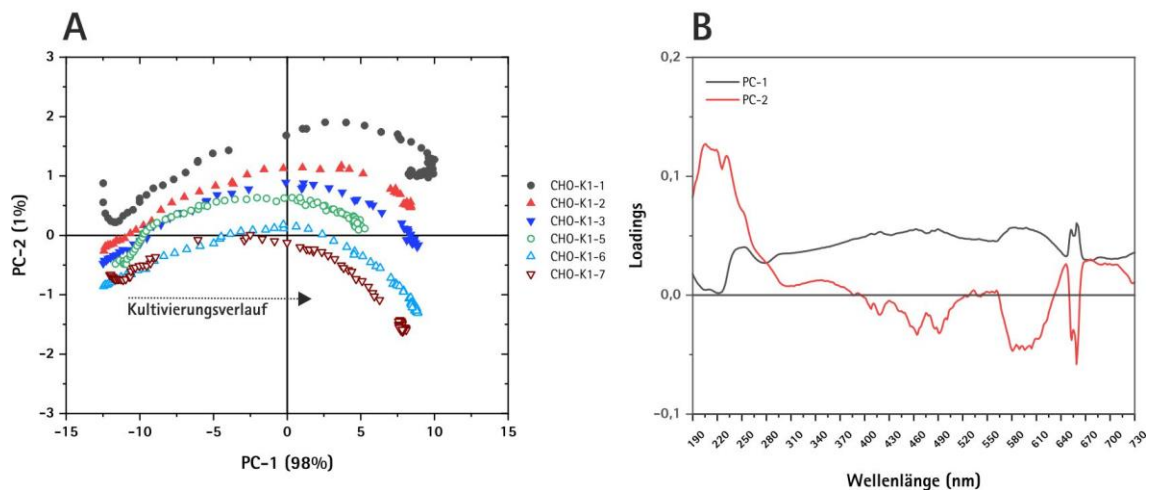


Abbildung 31: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren zu den Zeitpunkten der *offline* Referenzwerte von sechs 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (A) und der zugehörigen *Loadings* (B).

Die *Loadings* der ersten Hauptkomponente sind über den gesamten Wellenlängenbereich positiv und beschreiben die Verschiebung der Basislinie, die durch die Zunahme der Trübung bzw. der Zellzahl dominiert wird. Die Informationen der PC-1 basieren hauptsächlich auf der Zunahme der Trübung und der damit stärkeren Absorption von Licht. Die *Loadings* der zweiten Hauptkomponente zeigen, dass insbesondere der spektrale Bereich zwischen ca. 190–250 nm einen entscheidenden Einfluss hat. In dieser Wellenlängenregion absorbieren organische Verbindungen wie Amide, Carboxylgruppen und Peptidbindungen Licht.

Durch eine SNV-Transformation der UV/VIS-Spektren könnten die vorhandenen Störeinflüssen aufgrund von Streuungen und damit auch die Varianzen zwischen den Prozessen eliminiert werden. Jedoch gehen bei den SNV-transformierten Spektren Informationen, die für die Vorhersage der Zellkonzentrationen gebraucht werden, verloren. Daher wurde auf eine Vorverarbeitung verzichtet.

5.2.5 Qualitative Untersuchung der UV/VIS-Spektren anhand von Prozesstrajektorien

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zeigte bereits gute Ergebnisse für die qualitative Bioprozessüberwachung anhand von *Batch Evolution* Modellen ausschließlich basierend auf den Spektraldaten. In diesem Abschnitt werden nun Prozesstrajektorien mittels der in den Kultivierungen aufgenommenen UV/VIS-Spektren dargestellt und analysiert.

Ein PLS-Modell wurde mit allen Spektren, die ebenfalls im 10 min Intervall während der gesamten Kultivierungen aufgenommen worden sind, berechnet. Das BEM verwendet eine PC mit $R^2X = 0,959$, $R^2Y = 0,777$ und $Q^2Y = 0,771$. Die *Score*-Werte der ersten PC aus den CHO-Kultivierungen sind in Abbildung 32 gegen die Zeit aufgetragen. Wie bei den 2D-Fluoreszenzspektroskopie Daten wurden die Kultivierungen CHO-K1-1, CHO-K1-2 und CHO-K1-3 für die Berechnung des „golden Batch“ genutzt und die dreifache (\pm) Standardabweichung für jeden *Score*-Wert berechnet (oben).

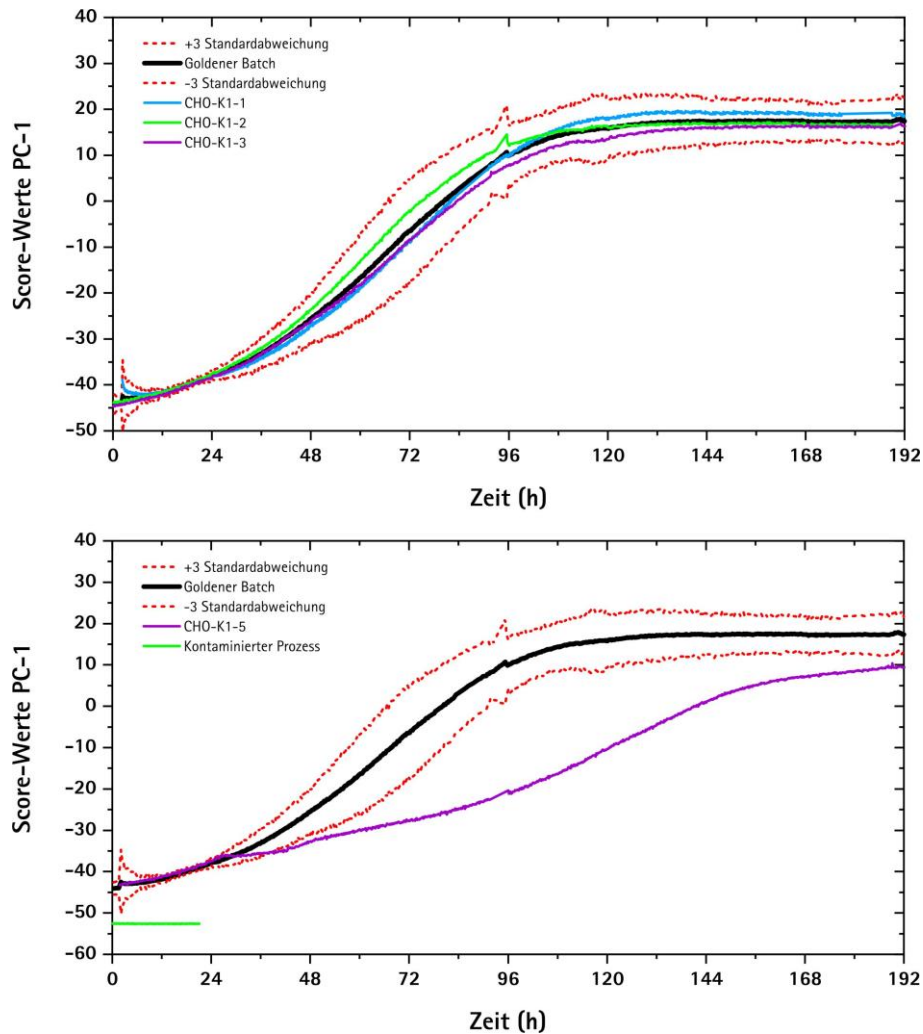


Abbildung 32: Prozesstrajektorien anhand der UV/VIS-Spektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrolllimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung mit Sauerstofflimitierung (CHO-K1-5) und kontaminierte Kultivierung außerhalb der Kontrollimits (unten).

Die Auswirkungen der Sauerstofflimitierung auf die Kultivierung CHO-K1-5 wird ebenfalls durch den Vergleich mit dem BEM in den UV/VIS-Spektren ersichtlich. Auch hier laufen die *Score*-Werte nach 36 h außerhalb der Kontrollimits. Ein weiterer Prozess mit einer bakteriellen Kontamination wurde spektroskopisch überwacht. In dem BEM liegen die *Score*-Werte während der gesamten Prozesszeit außerhalb der Standardabweichungen. Die *Score*-Werte liegen im Vergleich zur mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie untersuchten Kontamination schon zu Beginn des Prozesses außerhalb der Kontrollimits. Die Spektraldaten deuten darauf hin, dass bereits die Vorkultur mit der inokuliert worden ist kontaminiert war

(unten). Somit unterscheiden sich die UV/VIS-Spektren des kontaminierten Bioprozesses aufgrund einer stärkeren Trübung schon zu Beginn der Kultivierung.

5.3 Quantitative Untersuchung der Spektren: UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Nachdem im vorherigen Kapitel die reinen Spektraldaten analysiert wurden, werden in diesem Kapitel die Ergebnisse aus der PLS-Regression zur quantitativen Untersuchung von chemischen und biologischen Eigenschaften aus Spektren vorgestellt und kritisch diskutiert. Hierfür werden PLS-Modelle zur Kalibration und Validierung durch eine Korrelation von Spektren mit *offline* Referenzwerten wichtiger Prozessvariablen erstellt. Die Güte der PLS-Modelle wird durch die Anzahl der benötigten Faktoren, dem R^2 und Q^2 , Vorhersagefehler der Kalibrierung (RMSEC) und der Kreuzvalidierung (RMSECV) bewertet. Anschließend wird das Modell durch eine externe Validierung anhand des RMSEP für eine weitere Kultivierung, die nicht zur Modellkalibration herangezogen wurde beurteilt.

5.3.1 PLS-Modelle basierend auf 2D-Fluoreszenzspektren

Für quantitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren wurden fünf *Fed-Batch* Kultivierungen mit allen Daten der *offline* Analytik und der dazugehörigen Spektren als Datenset für die Kalibration verwendet. Ein separater unabhängiger Prozess wurde zur externen Validierung der PLS-Modelle genutzt. Spektrale Daten wurden in einem 10 min Intervall aufgenommen, womit eine nahezu kontinuierliche *inline* Überwachung der Prozesse realisiert werden kann.

Überwachung der Gesamtzellkonzentration (GZK):

Die Überwachung der Gesamtzellkonzentration (GZK) ist eine herkömmliche Methode für die Bestimmung der Zellzahl in Säugetierzellkultivierungen. CHO-Zellen beinhalten eine breite Anzahl an Fluorophoren, die sich während des Zellmetabolismus dynamisch verändern, so dass die Fluoreszenzspektroskopie zur Überwachung der Zellzahl geeignet erscheint.

Für die Kalibrierung des PLS-Modells wurden insgesamt zwei Faktoren verwendet. Die größte Varianz (79,3%) wird durch den ersten PLS-Faktor beschrieben und stützt sich hauptsächlich auf die Informationen aus der Rayleigh-Streuung, den Aminosäuren- und Riboflavin-

Konzentrationen. Anhand der Regressionskoeffizienten ist zu erkennen, dass das Streulicht im Verlaufe der Kultivierung zunimmt (siehe Abbildung 33, B). Wie bereits beschrieben, agieren die Zellen als Streuzentren. Die zunehmende Zellzahl im Bioreaktor führt zu einer Erhöhung der Trübung des Mediums und die Intensität des Streulichts nimmt dadurch zu. Durch eine höhere Zellzahl wird das Anregungslicht stärker absorbiert und die Eindringtiefe des Lichts verringert.

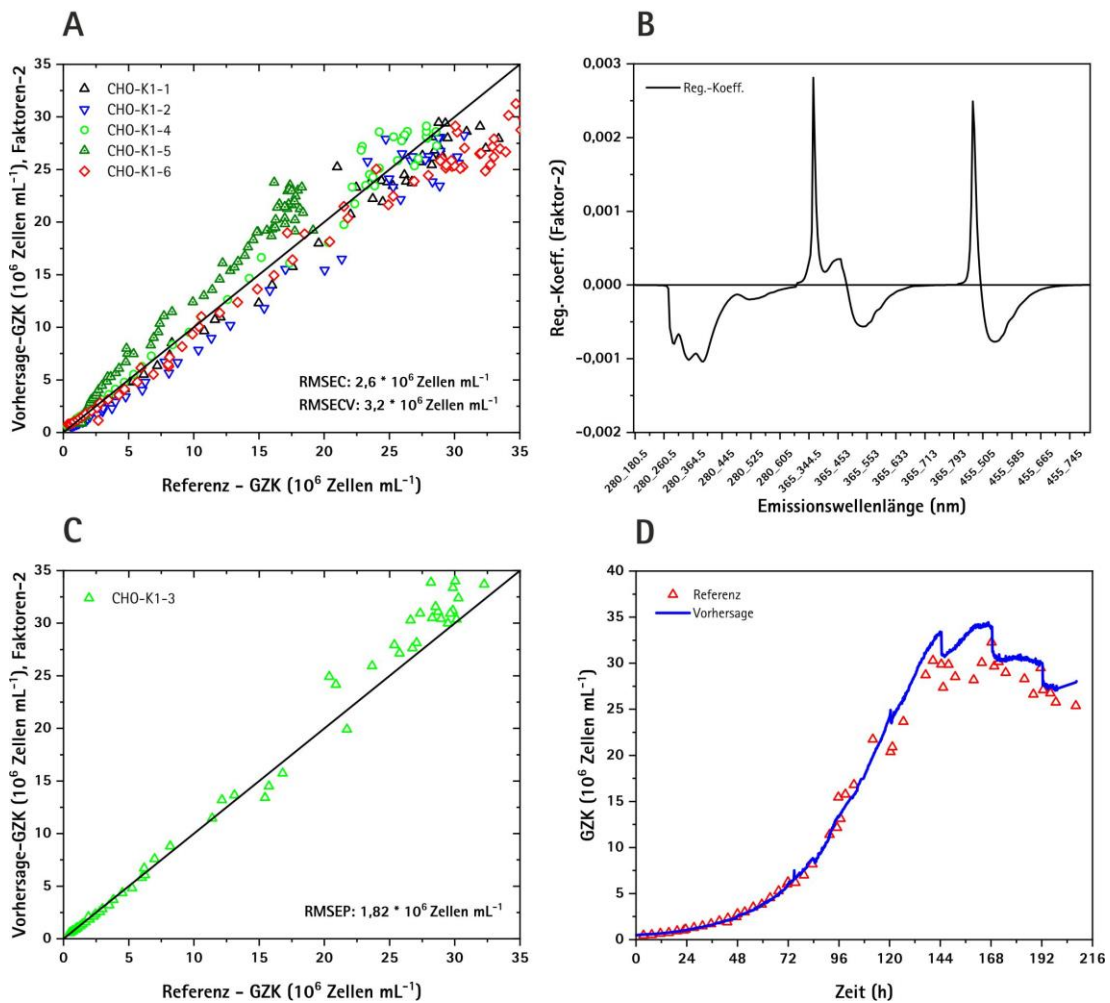


Abbildung 33: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Gesamtzellkonzentration (GZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der GZK gegen die *offline* Referenzwerte für CHO-K1-3 (D).

Des Weiteren korreliert der Verbrauch der essentiellen Aminosäuren und des Vitamins Riboflavin mit der Gesamtzellzahl. Daher hat der Spektralbereich, in dem die Aminosäuren fluoreszieren, negative Regressionskoeffizienten.

Mit einem RMSEC von $2,6 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und einem RMSECV von $3,2 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} kann die Gesamtzellkonzentration gut aus den Fluoreszenzspektren vorhergesagt werden. Die Vergleichbarkeit der beiden Werte in Bezug auf die gemessene Zellkonzentration unterstreicht die Robustheit des PLS-Modells. Innerhalb der Kreuzvalidierung ist zu erkennen, dass die vorhergesagten Konzentrationen bis ca. 20×10^6 Zellen mL^{-1} nah entlang der Winkelhalbierenden liegen und oberhalb dieser Konzentration stärkere Streuungen auftreten (Abbildung 33, A). Ein Grund für die stärkere Streuung am Ende der Kultivierung ist die höhere Messgenauigkeit des Cedex® Referenzmesssystems von 5-10% bei höheren Zellkonzentrationen.

Auch bei der externen Validierung wird die GZK in der Kultivierung CHO-K1-3 mit einem RMSEP von $1,82 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} präzise vorhergesagt. In Abbildung 33, D sind die vorhergesagten Konzentrationen gegen die *offline* Referenzwerte von CHO-K1-3 gegen die Kultivierungszeit dargestellt. Insbesondere kann die lag-Phase und die exponentielle Wachstumsphase bis zu dem Zeitpunkt 125 h akkurat anhand der Informationen aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorhergesagt werden. In der Vorhersage sind auch die Zeitpunkte der Zufütterung, bei der die Zellkonzentration verdünnt wird, gut erkennbar.

Überwachung der Lebendzellkonzentration (LZK):

Zur Ergänzung der GZK ist das Überwachen der Lebendzellkonzentration (LZK) eine wichtige Prozessvariable, um zu erkennen, ab welchem Zeitpunkt der Kultivierung die CHO-Zellen beginnen abzusterben. Die *real-time* Überwachung der LZK liefert Informationen über die Änderung der Zellphysiologie und erlaubt frühzeitige Regelungsstrategien bzw. den optimalen Zeitpunkt des Prozessabbruchs zu erfassen, um weitere Aufarbeitungsschritte für eine möglichst effiziente Produktausbeute vorzubereiten.

Das PLS-Modell für die Vorhersage der LZK stützt sich auf 4 Faktoren, um über 99% der Gesamtvarianz zu erklären. In Abbildung 34, A sind die Ergebnisse der Kreuzvalidierung dargestellt. Mit einem RMSEC von $1,52 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und einem RMSECV von $2,3 \times 10^6$

Zellen mL^{-1} können die Zellkonzentrationen präzise vorhergesagt werden. Es ist hervorzuheben, dass auch die Zellkonzentrationen in der Absterbephase akkurat bestimmt werden können.

Die Regressionskoeffizienten zeigen, dass besonders die Regionen für die Aminosäuren, die Rayleigh-Streuung, Riboflavin und NADH im PLS-Modell dominieren (siehe Abbildung 34, B). Wie bereits durch Marose *et al.* (1998) beschrieben wurde korreliert die Fluoreszenzregion von Tyrosin und Tryptophan stark mit der Lebendzellkonzentration [68]. Die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/437$ (NADH Region) hat ebenfalls einen hohen Einfluss. Wie bereits zuvor erwähnt wurde, hat NADH eine wichtige Funktion in oxidativen-reduktiven Reaktionen innerhalb des Zellmetabolismus. Bei absterbenden CHO-Zellen verändert sich die metabolische Aktivität und somit auch das intrazelluläre NAD^+/NADH Verhältnis. Diese Veränderung zwischen dem Gehalt des nicht-fluoreszierenden NAD^+ und des fluoreszierenden NADH-Moleküls wird in den 2D-Fluoreszenzspektren erfasst und spiegelt sich im PLS-Modell wieder.

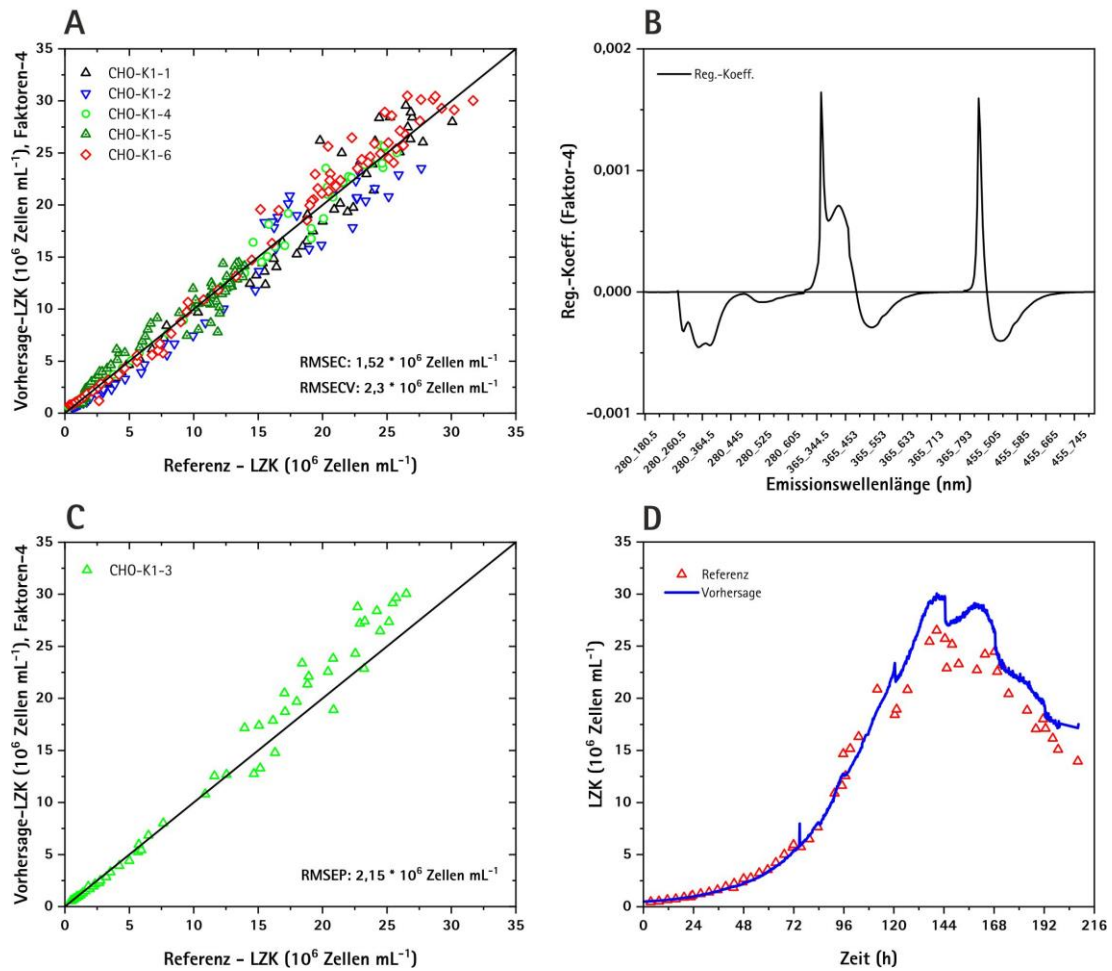


Abbildung 34: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Lebendzellkonzentration (LZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der LZK gegen die *offline* Referenzwerte für CHO-K1-3 (D).

Mit einem RMSEP von $2,15 \cdot 10^6$ Zellen mL^{-1} kann die Lebendzellkonzentration bei der externen Validierung vorhergesagt werden. Die Vorhersage der LZK gegen die *offline* Referenzwerte für CHO-K1-3 in Abbildung 34, D zeigen, dass die LZK mit Hilfe der 2D-Fluoreszenzspektroskopie in *real-time* erfasst werden können.

Überwachung der Viabilität:

Die Überwachung der Viabilität von Zellen ist von hoher Bedeutung, da nur lebende und metabolisch aktive Zellen sich proliferieren und Produkte bilden können [24]. Für das PLS-Modell wurden fünf Faktoren gewählt, womit annähernd 100% der Gesamtvarianz erklärt werden. Im Vergleich zur GZK und LZK sind die Regressionskoeffizienten in der

Wellenlängenregion für das Streulicht und der NADH-Fluoreszenz negativ (siehe Abbildung 35, B). Dies erklärt sich dadurch, dass die Viabilität mit steigender Zellzahl und damit einhergehend mit steigender Streuung abnimmt. Absterbende Zellen verlieren die ovale Form und beginnen mit der Zellyse, wobei neben den intakten Zellen auch zunehmend mehr Zelltrümmer im Medium vorliegen, welche die Streueigenschaften verändern [73]. Wie bereits erwähnt, verändert sich bei Abnahme der Viabilität auch das intrazelluläre NAD^+/NADH Verhältnis durch die Verminderung der Glykolyse und des Tricarbonsäurezyklus Aktivität und kann im 2D-Fluoreszenzspektrum erfasst werden. Die fluoreszierenden Aminosäuren haben einen positiven Einfluss auf das PLS-Modell, da bei der Zellyse Proteine in das Medium freigegeben werden und die Fluoreszenzintensitäten steigen.

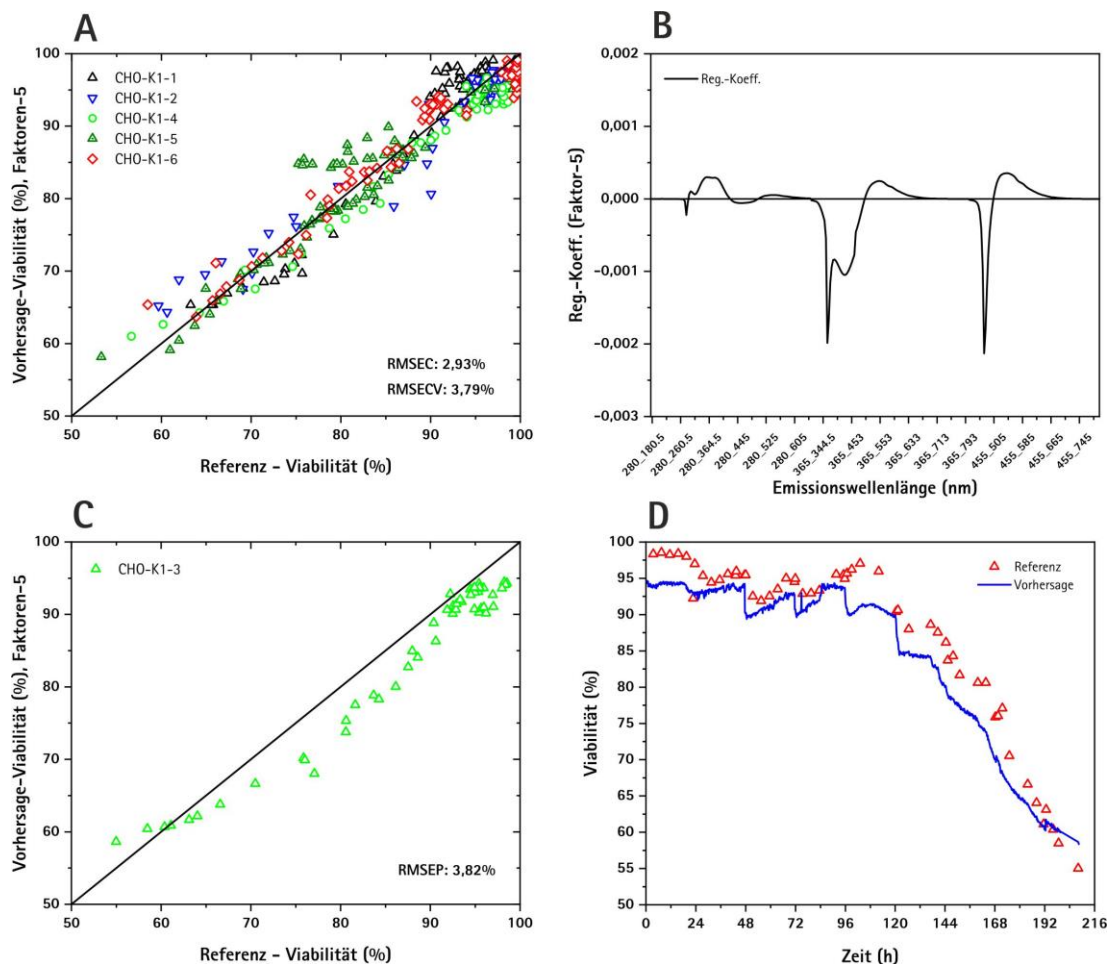


Abbildung 35: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Viabilität; Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Viabilitäten gegen die *offline* Referenzen für CHO-K1-3 (D).

Das Modell stützt sich überwiegend auf die *offline* Referenzwerte mit einer Viabilität von mehr als 80%. Die Prozesse wurden unterhalb einer Viabilität von 60% beendet. Bei niedrigeren Viabilitäten sind somit größere Vorhersagefehler zu erkennen. Mit einem RMSEP von 3,82% ist es möglich eine externe Kultivierung CHO-K1-3 vorherzusagen (siehe Abbildung 35, D). Bei der Auftragung der *offline* ermittelten Viabilitäten durch Zellfärbung und den durch das Modell vorhergesagten Werten ist zu erkennen, dass die vorhergesagten Viabilitäten zu Beginn der Kultivierung unterhalb der Referenzwerte liegen. Zudem ist zu sehen, dass die Zufütterungen in den vorhergesagten Viabilitäten zu erkennen sind. Möglicherweise haben hier die durch die Zufütterung entstandenen Verdünnungen der Zell- und NADH-Konzentrationen einen gewissen Einfluss auf das Modell, welcher jedoch keine Kausalität zur Viabilität haben kann.

5.3.2 PLS-Modelle basierend auf UV/VIS-Spektren

Für quantitative Untersuchung der UV/VIS-Spektren wurden ebenso fünf *Fed-Batch* Kultivierungen mit allen Daten der *offline* Analytik und der dazugehörigen Spektren als Datenset für die Kalibration verwendet. Die PLS-Modelle wurden anschließend bei einem externen unabhängigen Testset evaluiert, um verschiedene Variablen während des Prozesses vorherzusagen.

Überwachung der Gesamtzellkonzentration (GZK):

Das PLS-Modell für die Gesamtzellkonzentration in CHO-Zellkultivierungen benötigt drei Faktoren, um 99,9% der Gesamtvarianz der GZK zu erklären. Abbildung 36, A zeigt die Ergebnisse der Kreuzvalidierung aus den UV/VIS-Spektren von fünf Kultivierungen.

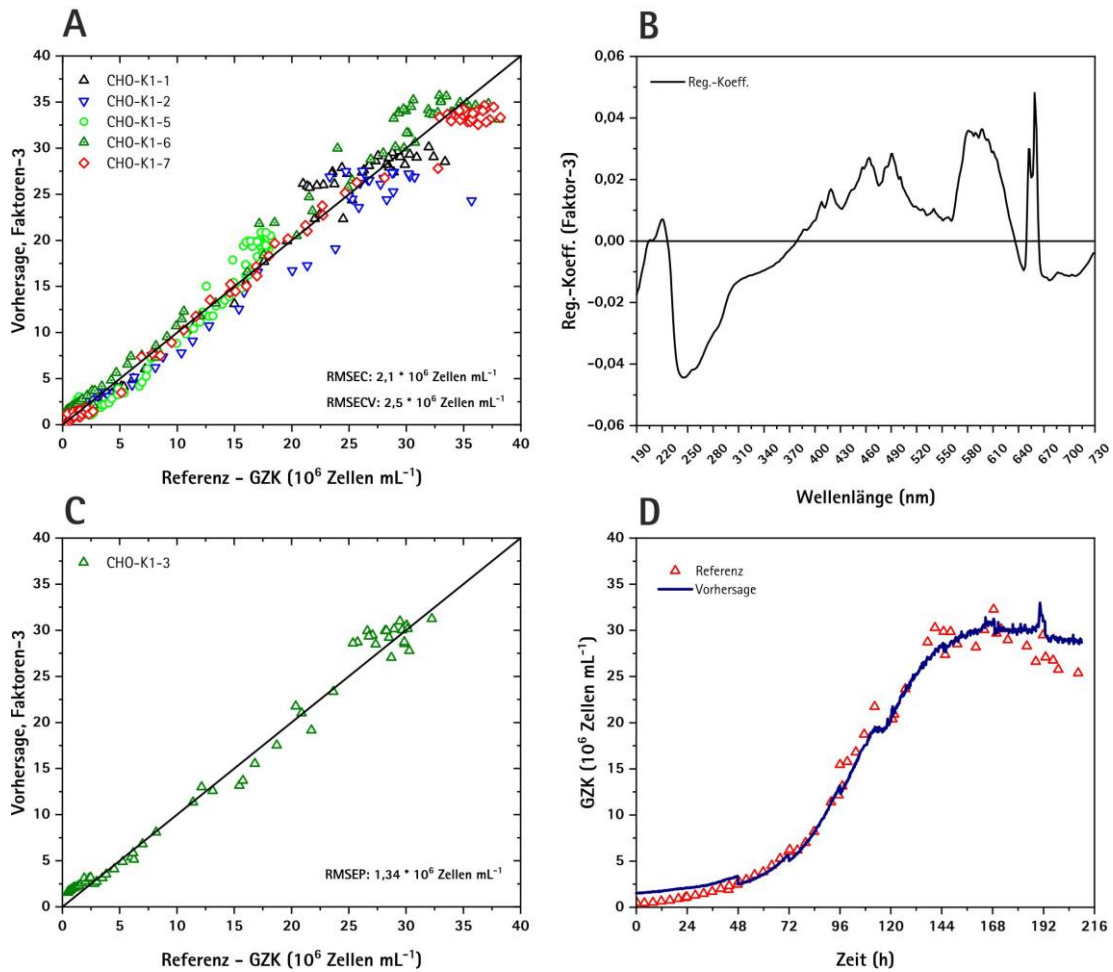


Abbildung 36: UV/VIS Ergebnisse für die Gesamtzellkonzentration (GZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der GZK gegen die *offline* Referenzen für CHO-K1-3 (D).

Über den gesamten Kultivierungsverlauf kann die GZK mit einem RMSEC von $2,1 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und einem RMSECV von $2,5 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} vorhergesagt werden. Die einzelnen Messpunkte zentrieren sich besonders bis zu einer GZK von 20×10^6 Zellen mL^{-1} nah an der Winkelhalbierenden. Auch nach dieser Konzentration sind nur wenige Ausreißer aufzufinden. Die Regressionskoeffizienten der PLS unter Berücksichtigung von drei Faktoren, zeigen dass besonders Informationen für die GZK im Wellenlängenbereich 230–304 nm, 380, 390–560 nm, 565–625 nm und 650–660 nm liegen. Der Wellenlängenbereich von 230 – 304 nm hat negative Regressionskoeffizienten, da die Absorption in diesem Bereich durch den Abbau bzw. die Integration von Aminosäuren und Nukleotiden mit zunehmender GZK während der Kultivierung abnimmt. In den weiteren genannten Wellenlängenbereichen, die Informationen

beinhalten, sind die Regressionskoeffizienten positiv. Dies ist auf die zunehmende Absorption bei höheren Zellkonzentrationen bzw. höherer Trübung zurückzuführen.

Die externe Validierung zeigt, dass das Modell mit einem RMSEP von $1,34 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} gut bei einem unabhängigen Testset verwendet werden kann (siehe Abbildung 36, C). Die Vorhersage der GZK bei CHO-K1-3 zeigt einen sehr vergleichbaren Verlauf zu den gemessenen *offline* Referenzwerten.

Überwachung der Lebendzellkonzentration (LZK):

Für das PLS-Modell der LZK wurden vier Faktoren verwendet. Bei der Kreuzvalidierung ist zu erkennen, dass große Schwankungen ab einer Lebendzellkonzentration von ca. 18×10^6 Zellen mL^{-1} auftreten. Die Vorhersagen der LZK sind ab dieser Konzentration für die meisten Kultivierungen höher als die gemessenen *offline* Referenzwerte (siehe Abbildung 37, A). Auffällig ist, dass die Vorhersagen bei CHO-K1-2 unterhalb der gemessenen Referenzwerte liegen.

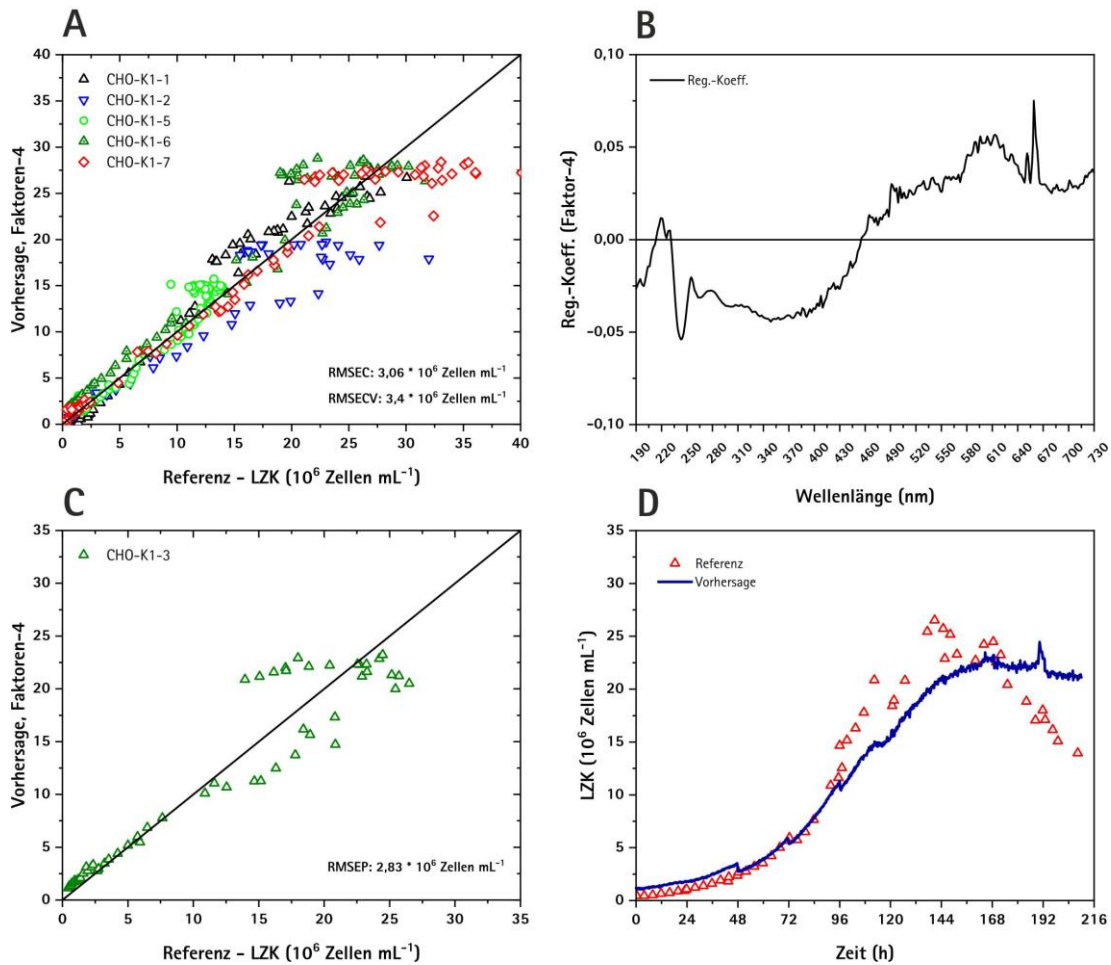


Abbildung 37: UV/VIS Ergebnisse für die Lebendzellkonzentration (LZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der LZK gegen die *offline* Referenzen für CHO-K1-3 (D).

Bei der externen Validierung von CHO-K1-3 ist auch zu erkennen, dass das PLS-Modell die Absterbephase der Zellen nicht abdecken kann. In der Phase bevor die Zellen absterben (Kultivierungszeit 96–144 h) ist die Vorhersage unterhalb der gemessenen Zellkonzentration (siehe Abbildung 37, D). Im Anschluss kann der Rückgang der LZK nicht erfasst werden und das Modell berechnet höhere Konzentrationen. Demnach kann das Modell absterbende Zellen nicht robust erfassen.

In den Regressionskoeffizienten ist zu sehen, dass die Wellenlängenregion von 245–450 nm negative Werte hat. Diese Beobachtung kann durch verschiedenen Faktoren verursacht werden. Ein Grund hierfür ist, wie bereits erwähnt, die Integration von Nukleotiden und Aminosäuren in intrazelluläre Bestandteile.

5.4 Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Untersuchung der 2D-Fluoreszenz-/UV/VIS-Spektren

Die qualitative und quantitative Untersuchung der Spektraldaten zeigte, dass sowohl die 2D-Fluoreszenz- als auch die UV/VIS-Spektroskopie gewinnbringende Informationen über die Säugetierzellkultivierungen hervorbringen können. Innerhalb der qualitativen Untersuchung können Trends in den Prozessverläufen anhand der *Score*-Werte aus der Hauptkomponentenanalyse erkannt werden. Veränderungen im Zellmetabolismus oder Limitierungen können ohne Referenzdaten, nur anhand von Spektraldaten, erkannt werden. Durch *Batch-Evolution* Modelle konnten Abweichungen im Bioprozess, wie Sauerstofflimitierungen oder Kontaminationen, in *real-time* verfolgt werden. Bei der quantitativen Analyse konnten insbesondere sonst nur schwer zugängliche biologische Prozessvariablen, wie die Viabilität der Zellen, *inline* überwacht werden. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse für die Kalibration und Validation bei einem externen Datensatz zusammengefasst.

Tabelle 8: PLS-Ergebnisse für die Kalibration und Validierung/ Vorhersage in einem externen Datensatz.

Analyt	Methode	Bereich	Faktoren	R ²	RMSEC	RMSECV	RMSEP
GZK (10 ⁶ Zellen/mL)	2-DF	0,3-38	2	0,99	2,6	3,2	1,82
LZK (10 ⁶ Zellen/mL)	2-DF	0,3-32	4	0,98	1,52	2,3	2,15
Viabilität (%)	2-DF	53-100	5	0,96	2,93	3,79	3,82
GZK (10 ⁶ Zellen/mL)	UV/VIS	0,3-38	3	0,99	2,1	2,5	1,34
LZK (10 ⁶ Zellen/mL)	UV/VIS	0,3-32	4	0,90	3,06	3,4	2,83

Abschließend kann also festgehalten werden, dass beide spektroskopische Methoden ein geeignetes PAT-Tool darstellen, um vor allem biologische Informationen aus dem Bioprozess zu überwachen. Vor allem die Ergebnisse der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zeigen, dass diese Methode ein sehr sensibles Werkzeug in der Prozessanalytik darstellen kann.

5.5 Untersuchung der Nekrose und Apoptose in CHO-Kultivierungen

In diesem Kapitel wird die Untersuchung der Nekrose und Apoptose von CHO-Zellen in 2 L Kultivierungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Spektroskopie beschrieben. Der Zelltod kann in Kultivierungen durch Stressbedingungen, wie z.B. Nährstoff- oder Sauerstofflimitierungen, Hyperosmolarität, hydrodynamischer Stress und Akkumulation, von Nebenprodukten ausgelöst werden [74–77]. Der apoptotische und nekrotische Zelltod führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen, die möglicherweise spektroskopisch erfasst werden können. Die Anbindung der Spektroskopie an einen 2 L Glasreaktor (Biostat® Bplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) erfolgte durch das entwickelte SIP-Bypass-System.

5.5.1 Cisplatin-induzierter Zelltod im 2 L Bioreaktor

Um einen möglichst hohen Anteil an apoptotischen Zellen beobachten zu können, wurde die Apoptose gezielt durch das zytotoxische und antiproliferative Chemotherapeutikum Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin) während der exponentiellen Wachstumsphase bei vier Kultivierungen induziert. Cisplatin wurde unter anderem deswegen gewählt, weil es im Vergleich zu anderen zytotoxischen Substanzen, wie z.B. Camptothecin, keine cyclisch-konjugierten Systeme besitzt, die starke Eigensignale in den Spektren hervorrufen. Durch die Querverknüpfungen von Cisplatin mit den DNA-Strängen inhibiert es die DNA-Synthese innerhalb der CHO-Zellen [78]. Es löst einen Zellzyklusarrest vor allem am G2/M-Kontrollpunkt aus und führt bei zu hohen DNA-Schädigung zu einer Initiierung der Apoptose [78–81].

In dieser Arbeit wurde der Zelltod, neben den bereits verwendeten Cedex® Messungen, durch durchflusszytometrische Analysen mittels BD Accuri C6 und mikroskopische Aufnahmen bestimmt. Herkömmliche Cedex® Messungen durch die Trypanblau-Färbung können lediglich tote Zellen identifizieren, jedoch nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen klassifizieren. Eine durchflusszytometrische Möglichkeit, apoptotische und nekrotische Zellen nachzuweisen, ist die Fluoreszenzmarkierung von Zellen mittels APC-Annexin-V und Propidiumiodid (PI). Annexin V bindet an Phosphatidylserine. Bei viablen Zellen befindet sich

die Phosphatidylserine normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran. Während der morphologischen Veränderungen bei der Apoptose findet eine Translokation an der Außenseite der Zellmembran statt [82]. Mittels fluoreszenzmarkierten Annexin V können somit apoptotische Zellen detektiert werden. Durch die gleichzeitige Verwendung des DNA-Farbstoffs PI, welcher nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann, kann zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen differenziert werden [83, 84]. Die Zellen streuen dabei das Laserlicht und das emittierte Fluoreszenzlicht der eingesetzten Fluorophore in alle Richtungen zur Achse der Laserstrahls.

Abbildung 38 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der gefärbten Zellen nach der Cisplatin-Induktion ($70 \mu\text{M}$) in Kultivierung CHO-K1-A1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Aufgetragen ist die Propidiumiodid-Fluoreszenz gegen die APC-Annexin-V-Fluoreszenz. In den Quadranten steht jeder Punkt für eine detektierte Zelle. Als viable Population (Annexin-V negativ, PI negativ) werden die Zellen im linken unteren Quadrant deklariert als apoptotische Population (Annexin-V positiv, PI negativ) die Zellen im rechten unteren Quadrant und als nekrotische Population (PI positiv) die im oberen Quadranten.

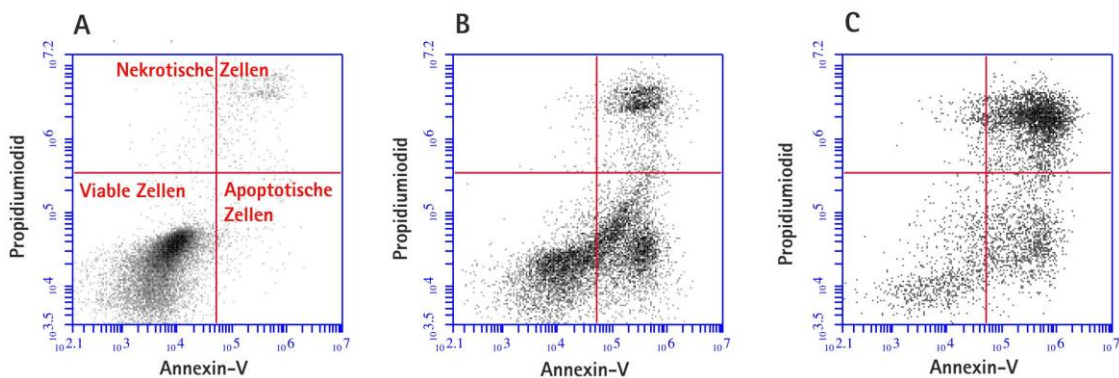


Abbildung 38: Ergebnis der Durchflusszytometrie mit APC-Annexin-V Färbung und Propidiumiodid Färbung von CHO-K1-Zellen nach Cisplatin-Induktion ($70 \mu\text{M}$). Jeder Punkt steht für eine detektierte Zelle. **A:** Direkt nach Cisplatin-Induktion (96% Viable Zellen, 0,7% Apoptotische Zellen, 3,3% Nekrotische Zellen); **B:** 24 h nach Cisplatin-Induktion (61% Viable Zellen, 23% Apoptotische Zellen, 16% Nekrotische Zellen); **C:** 46 h nach Induktion (28% Viable Zellen, 17% Apoptotische Zellen, 55% Nekrotische Zellen).

Die Daten zeigen, dass der Anteil apoptotischer Zellen 24 h nach Cisplatin-Induktion auf 23% ansteigt. Mit weiterer Inkubationszeit erhöht sich der Anteil der nekrotischen

Population und die Population an apoptotischen Zellen verringert sich. Somit löst die Cisplatin-Induktion zunächst eine Apoptose aus, welche anschließend in eine sekundäre Nekrose der Zellen übergeht.

Abbildung 39 stellt den Verlauf von ausgewählten *offline* Daten der Kultivierung CHO-K1-A1 exemplarisch dar. Cisplatin wurde bei allen vier Kultivierungen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zellkonzentration von ca. 9×10^6 Zellen mL^{-1} in den Bioreaktor induziert.

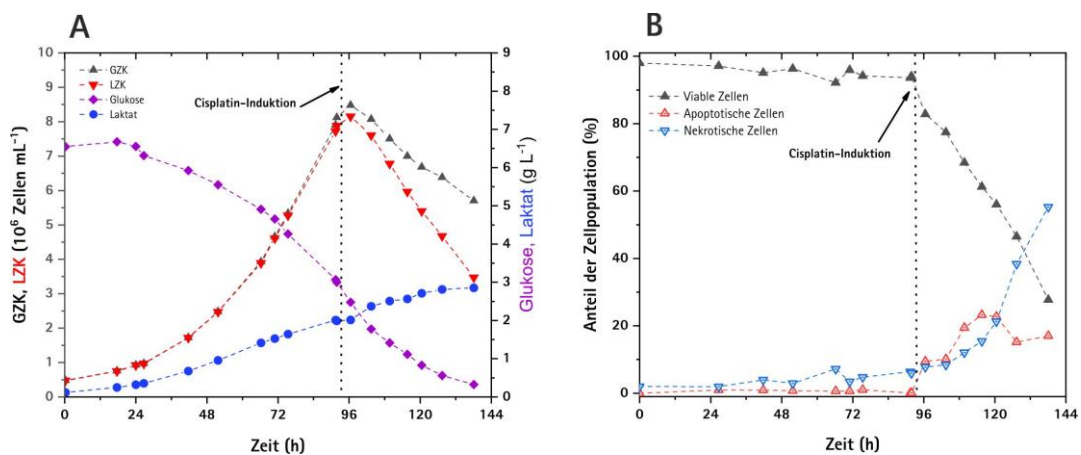


Abbildung 39: Verlauf einer CHO-K1 Kultivierung mit Cisplatin-Induktion (70 µM) nach 95 h.

Auffällig ist die drastische Abnahme der Zellzahl durch die antiproliferative Wirkung des Cisplatin. Die LZK reduziert sich um mehr als die Hälfte innerhalb von 48 h nach einer Inkubationszeit mit Cisplatin. Obwohl die Zellen nach der Inkubation an Viabilität verlieren, wird die vorliegende Glukose noch fast vollständig verstoffwechselt. Auch die Bildung von Laktat steigt nach der Induktion weiter bis auf eine Konzentration von 3 g L^{-1} an. Beides deutet darauf hin, dass die Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus der noch nicht abgestorbenen Zellen nicht vollständig eingestellt wird.

In Abbildung 39, B sind die Prozentanteile der Zellpopulationen aus den Durchflusszytometrie gegen die Zeit aufgetragen. Eine starke Abnahme der viablen Zellen bei zuerst einer Zunahme der apoptotischen und später der nekrotischen Zellen, ist nach Zugabe des Cisplatin zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von 25 h sind 23% aller Zellen apoptotisch. Am Ende der Kultivierung sind 55% aller Zellpopulationen nekrotisch. Somit konnte durch die

Cisplatin-Induktion erfolgreich der Zelltod eingeleitet werden, welcher im Folgenden spektroskopisch untersucht wird.

Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren:

In Abbildung 40 A sind die PCA-Scores der PC-3 gegen die PC-1 aus den 2D-Fluoreszenzspektren der Kultivierungen CHO-K1-A1 und CHO-K1-A2 graphisch dargestellt. Die Auftragung der PC-2 gegen PC-1 zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den Verläufen der Score-Werte der Kultivierungen ohne Cisplatin-Induktion (siehe Anhang). Es ist zu erkennen, dass zwischen den spektralen Daten der beiden Kultivierungen, in denen der Zelltod durch die Cisplatin-Induktion induziert wurde, keine großen Varianzen auftraten. Die erste PC beschreibt mit 71% die Gesamtvarianz innerhalb der Spektren, die dritte Hauptkomponente hat eine Erklärungsvarianz von 1%. Die Score-Werte der dritten Hauptkomponente starten bei einem Minimum und steigen mit zunehmender Kultivierungsdauer an bis diese später nach ca. 70 h wieder abfallen. Auffällig ist der drastische Wendepunkt ~10 h nach Zugabe des Cisplatin. Anhand der *Loadings*-Werte ist zu erkennen, dass insbesondere die Wellenlängenregion für die aromatischen Aminosäuren, der Rayleigh-Streuung und NADH die dritte Hauptkomponente dominieren (siehe Anhang).

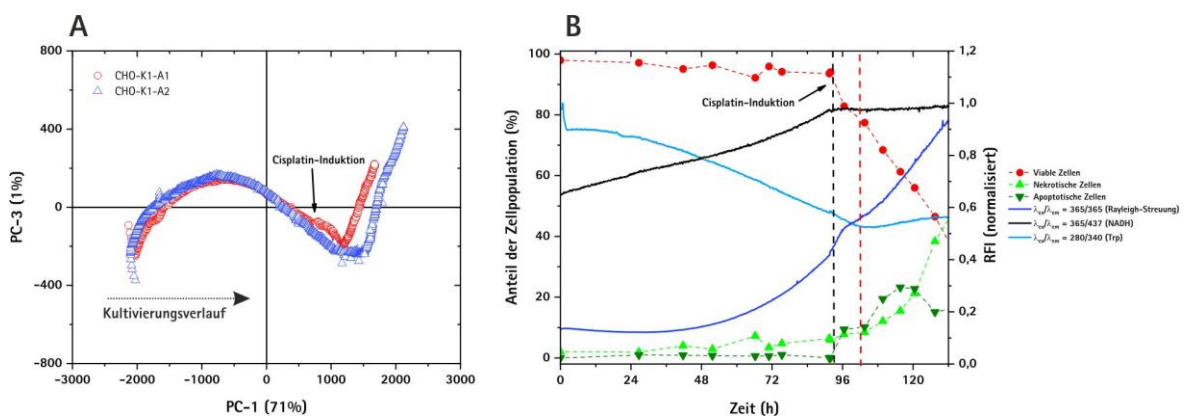


Abbildung 40: PCA-Scores der 2D-Fluoreszenzspektren von zwei CHO-K1 Kultivierungen im 2 L Bioreaktor mit Induktion des Zelltods durch Cisplatin. **A:** PC-3 gegen PC-1, **B:** Verlauf der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) der Wellenlängenregion für NADH, der Rayleigh-Streuung, Tryptophan und der *offline* Werte aus den Durchflusszytometrie-Analysen von CHO-K1-A1. Die rote gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt des Wendepunktes nach Cisplatin-Induktion in PC-3.

Die Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) gegen die Zeit zeigt, dass sich die Intensitäten nach Zugabe des Cisplatin verändern. Das Signal der Rayleigh-Streuung ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 365/365$) steigt bis zu diesem Zeitpunkt mit der steigenden Zellkonzentration exponentiell an. Nach Zugabe des Cisplatin, steigt das Signal zunächst für etwa 8 h stärker an, flacht dann wieder ab und steigt anschließend linear an. Die rot gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt der Wende in den PC-3 Score-Werten. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einem linearen Anstieg der Rayleigh-Streuung, und das Signal steigt mit der Abnahme der viablen Zellen an. Die Veränderung des Streulichts wird durch die morphologischen Veränderungen der CHO-Zellen während der Apoptose und Nekrose, die in Abbildung 41 mikroskopisch abgebildet sind, verursacht.

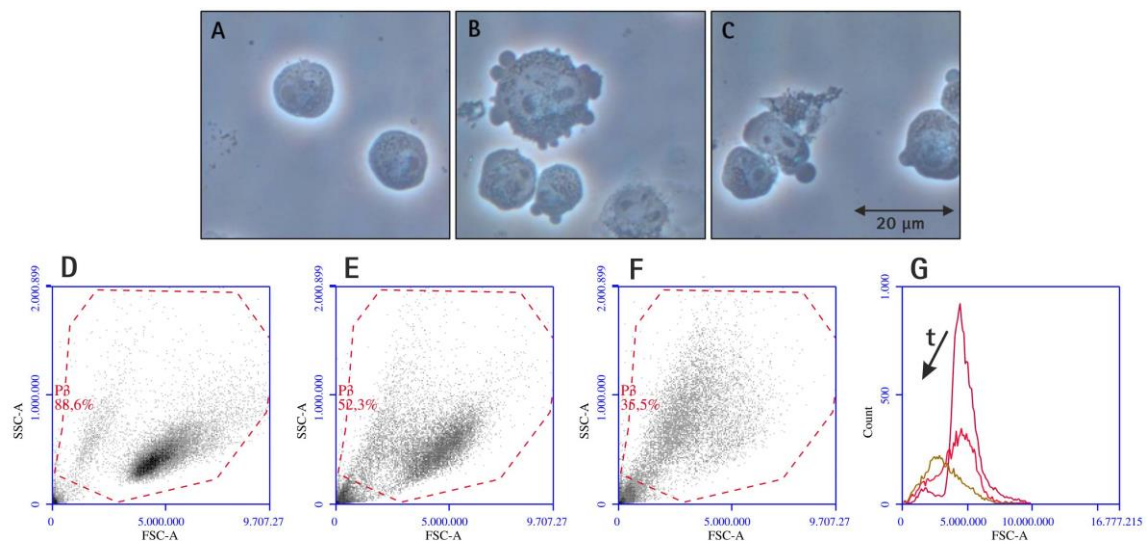


Abbildung 41: Morphologische Veränderungen der CHO-Zellen durch Cisplatin-Induktion. **A:** Runde viable Zellen, direkt nach Cisplatin-Induktion; **B:** Apoptotische Zelle 24 h nach Induktion; **C:** Nekrotische Zelle mit 46 h nach Induktion; **D-F:** Durchflusszytometrisch erfasste Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) zu denselben Zeitpunkten; **G:** Histogramme der Größenverteilung (FSC) zu denselben Zeitpunkten.

Viable Zellen besitzen eine runde Form und haben daher ein anderes Streuverhalten als apoptotische bzw. nekrotische Zellen. Die Apoptose führt zu einer Deformation der Zellen und es kommt zu Ausstülpungen der Zellmembran und zur Bildung von Vesikeln (*Apoptotic Bodies*). Des Weiteren kommt es zu einem mitochondrialen Anschwellen und einer Zunahme der DNA-Fragmentation innerhalb der Zellen [85–87], welche zu einer erhöhten Granulierung

der Zellen führt. Diese Veränderungen führen zu einem anderem Streuverhalten und sind in den Spektren erkennbar. Mulvey *et al.* konnte ähnliche Veränderung des Streulichts während der Apoptose in CHO-Zellen mittels der Elastischen-Streuspektroskopie (*Elastic scattering spectroscopy, ESS*) beobachten [73, 88].

Durch den zunehmenden nekrotischen Zelltod schrumpfen die Zellen und es kommt anschließend zur Zellyse. Zelltrümmer und die freigesetzten Organellen agieren ebenfalls als Streuzentren und wirken sich auf die Lichtstreuung aus [89]. Die lysierten Zellkomponenten sind auch durch den Anstieg des Signals für aromatische Aminosäuren (Tryptophan) ersichtlich.

Auch die durchflusszytometrisch analysierten Zellen zeigen im Verlauf der Apoptose und Nekrose starke Veränderungen bezüglich der Lichtstreuung aufgrund der unterschiedlichen Zellgröße und Granularität (siehe Abbildung 41). Es ist zu erkennen, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Cisplatin-Induktion vor allem recht groß sind und eine geringe Granularität aufweisen. Dies ist anhand des starken FSC und schwachen SSC zu erkennen (D). Nach 24 h, bei dem ein erhöhter Anteil der Zellen apoptotisch ist, ist eine Verringerung der FSC und eine Vergrößerung im SSC zu sehen. Damit werden die Annahmen bestätigt, dass apoptotische Zellen schrumpfen und sich die Granularität aufgrund von *Apoptotic Bodies* und *Membran-Blebbing* erhöht. Nach 46 h ist ein weiterer Anstieg im SSC und eine weitere Verminderung im FSC ersichtlich. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Großteil der Zellen bereits nekrotisch. Das Vorliegen von Zelltrümmern führt insbesondere zu stärkerem Seitwärtsstreulicht. Das Histogramm stellt die Zellgrößenverteilung direkt nach Induktion, nach 24 h und nach 48, dar (G). Auch hier ist eine deutliche Verschiebung zu geringen Zellvolumina im Laufe des Zelltods zu erkennen. Diese Beobachtungen begründen die Veränderungen der Rayleigh-Streuung in den 2D-Fluoreszenzspektren.

In der Wellenlängenregion für NADH ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 365/437$) in Abbildung 40 ist zu erkennen, dass die RFI bis zur Cisplatin-Induktion steigt und anschließend stagniert. Es ist aus der Literatur bereits bekannt, dass der NADH/NADPH Abbau ein Ereignis innerhalb der frühen Apoptose ist [90]. Nach der Cisplatin-Induktion wird das weitere Zellwachstum gehindert, wodurch auch die Bildung des Coenzym NADH eingeschränkt ist. Die Stoffwechselaktivität in apoptotischen und nekrotischen Zellen wird herabgesetzt, wodurch sich ein Gleichgewicht

zwischen dem NAD^+ / NADH -Pool einstellt. Wie bereits erwähnt, ist zu beobachten, dass auch nach der Apoptose-Induktion Glukose weiter mit geringer Stoffwechselaktivität abgebaut wird und Laktat von den Zellen gebildet wird. In apoptotische Zellen läuft die Glykolyse vermutlich langsamer ab, und das durch Glukose gebildete Pyruvat wird in Laktat umgewandelt bevor dieses in Acetyl-CoA umgesetzt wird. Damit würde bei der Umsetzung von Pyruvat in Laktat weiter NADH in NAD^+ oxidiert werden, was dazu führt, dass der NADH -Pool und damit die entsprechende Fluoreszenzintensität nicht weiter zunimmt.

Qualitative Untersuchung der UV/VIS-Spektren:

Die UV/VIS-Spektren wurden mittels SNV vorgearbeitet, da ohne die Datenverarbeitung nahezu 100% der Gesamtvarianz durch die Basislinienverschiebung bzw. Trübung verursacht werden. In Abbildung 42, A ist der Verlauf der PCA-Scores für die zweite gegen die erste Hauptkomponente aufgetragen.

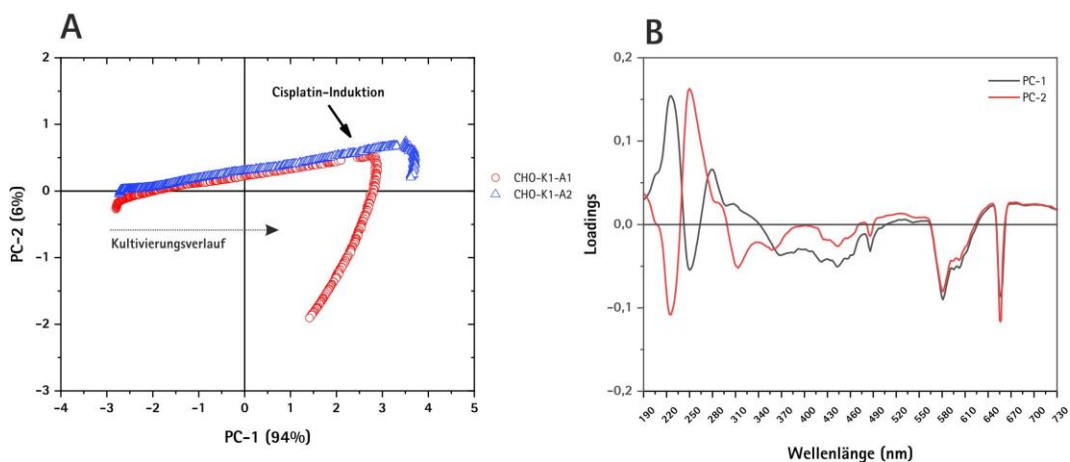


Abbildung 42: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren von zwei CHO-K1 Kultivierungen im 2 L Bioreaktor mit Induktion des Zelltods durch Cisplatin (A), *Loading*-Werte von PC-1 und PC-2 (B).

Die *Score*-Werte der beiden Kultivierungen haben einen ähnlichen Verlauf. Zunächst ist ein Anstieg entlang der PC-1 zu beobachten, und anschließend ist jeweils ~4 h nach Cisplatin-Induktion eine deutliche Beugung in der zweiten Hauptkomponente zu erkennen. PC-1 beschreibt mit 94% der Gesamtvarianz das Zellwachstum. In den dazugehörigen *Loading*-Werten ist zu erkennen, dass insbesondere die Wellenlängenregionen der Peptidbindungen

(224 nm), DNA (260 nm) und Proteine (280 nm) Licht absorbieren und einen Einfluss haben. Zudem haben die Wellenlängenregionen von 340–460 nm, in denen besonders NADH und Riboflavin absorbieren und die Region bei ~600 nm, welche maßgeblich Informationen über die Zellzahl aufweist, eine Bedeutung für die PC-1. Mit 6% der spektralen Varianz enthält die PC-2 hauptsächlich Informationen über die Veränderungen in der Wellenlängenregion der Peptidbindungen, DNA und der Trübung.

Ungefähr 4 h nach Cisplatin-Induktion sind 10% der Populationen apoptotisch und weitere 10% nekrotisch. Die starke Veränderung der DNA-Absorption in den Spektren sind zu diesem Zeitpunkt lässt darauf schließen, dass sich die DNA nach Induktion der Apoptose zunächst verdichtet, anschließend Fragmente entstehen und bei der sekundären Nekrose in das Medium lysiert wird [18]. Somit ist davon auszugehen, dass diese morphologischen Veränderungen durch die PC-2 beschrieben werden und eine qualitative Untersuchung des Zelltods im Bioreaktor realisieren.

5.6 Zusammenfassung der Apoptose und Nekrose Untersuchungen

Es konnte gezeigt werden, dass die morphologischen Veränderungen im Verlauf der Apoptose und Nekrose qualitativ anhand der Spektraldaten beobachtet werden können. Mittels einer Hauptkomponentenanalyse konnten die Zeitpunkte des Zelltods mit beiden spektroskopischen Methoden visualisiert werden. Vor allem können in den 2D-Fluoreszenzspektren die Veränderungen des Streulichts aufgrund der Zellmorphologie erkannt werden. Die quantitative Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen ist aufgrund der hohen Überschneidung der beiden Zellstadien nur begrenzt zu realisieren. Dennoch ist es sinnvoll, diese Zusammenhänge in weiteren Forschungen näher zu untersuchen.

6 CHO-DG44 Zellkultivierung zur Produktion eines monoklonalen Antikörpers

Im vorherigen Teil dieser Arbeit wurden bei den Versuchen, die CHO-K1 Zelllinie eingesetzt, die kein Produkt bildet. Für die Etablierung der Raman-Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung wird die Antikörper-produzierende Zelllinie CHO-DG44 kultiviert. Als

Grundlage für die Evaluierung der berührungslosen Raman-Spektroskopie werden vier *Fed-Batch* Kultivierungen im 2 L Bioreaktor (Biostat® Bplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) verwendet. Insbesondere werden hier Substrate und Metabolite betrachtet, die durch die UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie - wegen ihrer Struktur - nicht überwacht werden können. Die Ergebnisse dieser spektroskopischen Methode werden dargestellt und diskutiert.

6.1 Übersicht der CHO-DG44 Zellkultivierungen im 2 L Bioreaktor

Für die Produktion des monoklonalen Antikörpers IgG (Immunglobulin-G) wurden vier CHO-DG44 Zellkultivierungen über jeweils eine Dauer von 12 Tagen im *Fed-Batch* Betrieb durchgeführt. Dabei wurden über die gesamte Zeit zweimal täglich Proben für die *offline* Analytik entnommen. Die Konzentrationsverläufe der Glukose-, Laktat-, L-Glutamin-, L-Glutamat-, IgG-, Gesamtzell- und Lebendzellkonzentration sind in Abbildung 43 aus der Kultivierung CHO-DG44-1 exemplarisch dargestellt. Anhand der beiden Substratverläufe von Glukose und Glutamat sind deutlich die jeweiligen Zufütterungen des *Feed*-Mediums zu erkennen. Insgesamt wurde während der Kultivierung viermal nährstoffreiches Medium hinzugefüttert. Zu Beginn des Prozesses startet die Glukose-Konzentration bei $5,5 \text{ g L}^{-1}$ und fällt nach 48 h auf $3,2 \text{ g L}^{-1}$. Nach *Feed*-Zufuhr steigt die Konzentrationen auf $6,8 \text{ g L}^{-1}$ an und wird anschließend wieder von den Zellen verstoffwechselt. Dieser Verlauf wiederholt sich über den gesamten Prozess, wobei die Glukose-Konzentrationen zwischen $7,25 \text{ g L}^{-1}$ und $4,25 \text{ g L}^{-1}$ liegen. Nach 240 h wurde nicht mehr zugefüttert, um zu untersuchen, ob auch niedrigere Glukose-Konzentrationen durch die Raman-Spektroskopie im Bioprozess überwacht werden können. Die Konzentration sinkt bis zum Ende der Kultivierung auf $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ab.

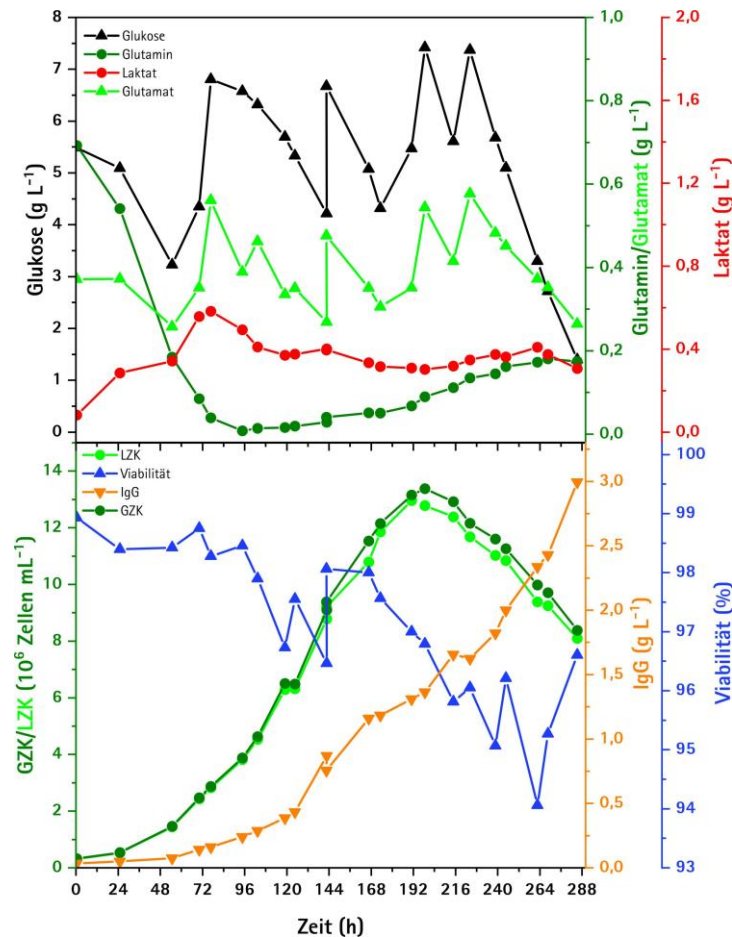


Abbildung 43: Typischer CHO-DG44 Kultivierungsverlauf eines *Fed-Batch*-Prozesses der *offline* Prozessvariablen Gesamt (GZK)- und Lebendzellkonzentration (LZK), Viabilität, Glukose-, Laktat-, Glutamin-, Glutamat-, IgG-Konzentration.

Der Verlauf der Glutamat-Konzentration ähnelt dem Glukose-Profil, da diese wichtige Stickstoffquelle wichtiger Bestandteil des *Feed*-Mediums ist. Die Konzentrationen bewegen sich während des Prozesses zwischen 0,25 und 0,6 g L⁻¹. Die Anfangskonzentration von Glutamin liegt bei 0,7 g L⁻¹ und wird bis zum Beginn der *Fed-Batch*-Phase von den Zellen verstoffwechselt. Anschließend findet ein metabolischer Wechsel statt und die Zellen wandeln Glutamat in Glutamin um. Glutamin wird durch die Glutamin-Synthetase aus dem im *Feed*-Medium vorliegenden Glutamat und Ammonium katalysiert [91]. Die Glutamin-Konzentration steigt bis zum Ende der Kultivierung auf 0,18 g L⁻¹ an. Im Vergleich zu den bereits untersuchten CHO-K1 Zellkultivierungen sind die Laktat-Konzentrationen bei der CHO-DG44 Zelllinie mit maximal 0,6 g L⁻¹ deutlich niedriger. Ein Laktat-*Shift* ist nach 72 h, gleichzeitig mit dem Verbrauch des Glutamins, zu beobachten.

Die Viabilität der Zellen liegt im Vergleich zu den CHO-K1 Zellen sehr hoch. Während des gesamten Prozesses sinkt diese nicht unter 94%. Die Gesamtzellkonzentration erreicht nach 192 h ein Maximum von 14×10^6 Zellen mL^{-1} . Mit steigender Gesamtzellkonzentration nimmt auch die die Produktbildung innerhalb des Prozesses zu. Am Ende des Prozesses wird eine maximale IgG-Konzentration von 3 g L^{-1} erreicht.

6.2 Qualitative Untersuchung der Raman-Spektren

Während der vier CHO-DG44 Zellkultivierungen wurden im 10 min Intervall Raman-Spektren mit der berührungslosen Raman-Prozesssonde aufgezeichnet. Die Messungen wurden durch das Quarzglas in der SIP-sterilisierbaren Messkammer im Bypass des Prozesses durchgeführt. Die Messkammer war an den 2 L Bioreaktor in einem Kreislauf durch Silikonschläuche verbunden, durch den die Zellsuspension während der gesamten Kultivierung kontinuierlich durchgepumpt wurde. Die Sterilbarriere wurde somit nicht beeinträchtigt. Eine Darstellung des genaueren Versuchsaufbaus ist im Anhang zu finden.

Abbildung 44 stellt exemplarisch den gesamten Spektralverlauf im Wellenzahlbereich $350\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ einer CHO-DG44 Kultivierung dar. Der Wasserpeak bei $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ wird im Verlaufe der Kultivierung deutlich kleiner und verschwindet zum Ende der Kultivierung vollständig. In den ersten 50 h sind außerdem deutliche Peaks bei 910 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , 1124 cm^{-1} und $1326\text{--}1375 \text{ cm}^{-1}$ zu sehen. Diese Peaks sind, wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben wurde, dem Glukose-Molekül zuzuordnen. Mit zunehmender Kultivierungsdauer werden diese Signale erheblich schwächer.

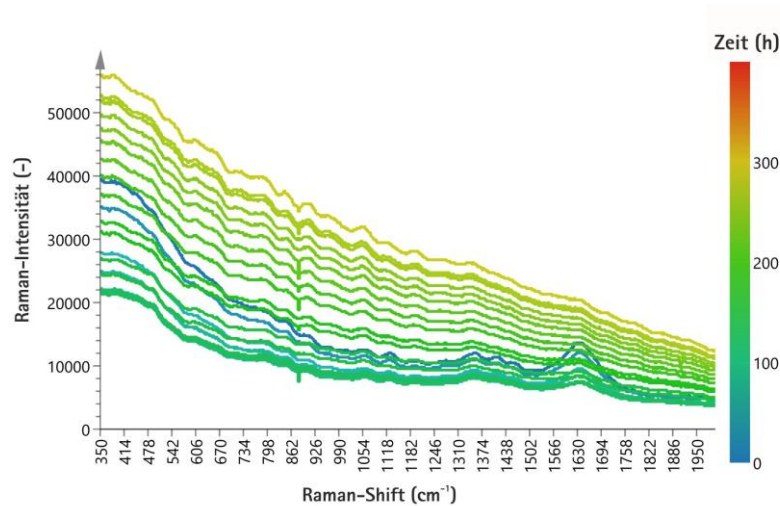


Abbildung 44: Typischer Verlauf der Raman-Spektren während einer CHO-DG44-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.

Die Spektren werden durch eine deutliche Basislinienverschiebung in den Raman-Spektren mit zunehmender Kultivierungsdauer überlagert. Innerhalb der ersten 100 h nimmt die Raman-Intensität der gesamten Spektren ab und steigt anschließend kontinuierlich an. Insgesamt entsteht in den Spektren eine Differenz von ~3000 Intensitätseinheiten während des Kultivierungsprozesses. Ähnliche Beobachtungen sind bereits in der Literatur beschrieben [92, 93]. Die Basislinienverschiebung wird durch die zunehmende Zellkonzentration bzw. Trübung im Bioreaktor verursacht. Zudem nimmt die Autofluoreszenz mit steigender Zellzahl während des Bioprozesses zu, die ebenfalls die Verschiebung der Basislinie beeinflusst. Die Fluoreszenzinterferenzen bringen durch die Basislinienverschiebung ein stärkeres Signal als die Raman-Streuung hervor [94, 95].

Bei der Hauptkomponentenanalyse ohne Datenvorverarbeitung beschreibt die erste PC 99,3% der Gesamtvarianz der spektralen Daten. Es sind ausschließlich Informationen über die Basislinienverschiebung darin enthalten (siehe Anhang). Diese Basislinienverschiebung kann zur Vorhersage der Gesamtzellkonzentration bis 12×10^6 Zellen mL^{-1} verwendet werden. Allerdings ist in der Absterbephase ein systematischer Fehler in der Vorhersage der GZK zu beobachten. Die Absterbephase kann anhand der Informationen aus den Spektraldaten ohne Datenverarbeitung nicht abgebildet werden.

In der zweiten PC werden lediglich 0,7% der Varianz beschrieben, die jedoch chemische Informationen enthalten. Aufgrund der schwachen chemischen Signale und der hohen Basislinienverschiebung sind umfangreiche Datenvorverarbeitungsmethoden notwendig, um die Konzentrationen der Substrate und Metabolite quantitativ aus den Spektren zu bestimmen.

Anhand der Rohdaten lassen sich jedoch bereits Aussagen über den Verlauf des Prozesses anhand von Batch-Trajektorien erstellen. Die Basislinienverschiebung enthält wichtige Informationen über das Zellwachstum. Abweichung von dem durchschnittlichen Zellwachstum können somit frühzeitig erkannt werden. Hierfür wurde für die *Batch Evolution Models (BEM)* eine PLS mit den Spektren gegen die Kultivierungszeit berechnet. Das BEM verwendet 2 PCs, korrespondierend mit $R^2X = 1$, $R^2Y = 0,986$ und $Q^2Y = 0,983$. Abbildung 45 (oben) zeigt die Trajektorien von drei Kultivierungen (CHO-DG44-2, CHO-DG44-3 und CHO-DG44-4) der Score-Werte von PC-1, welche innerhalb der berechneten Standardabweichung verlaufen.

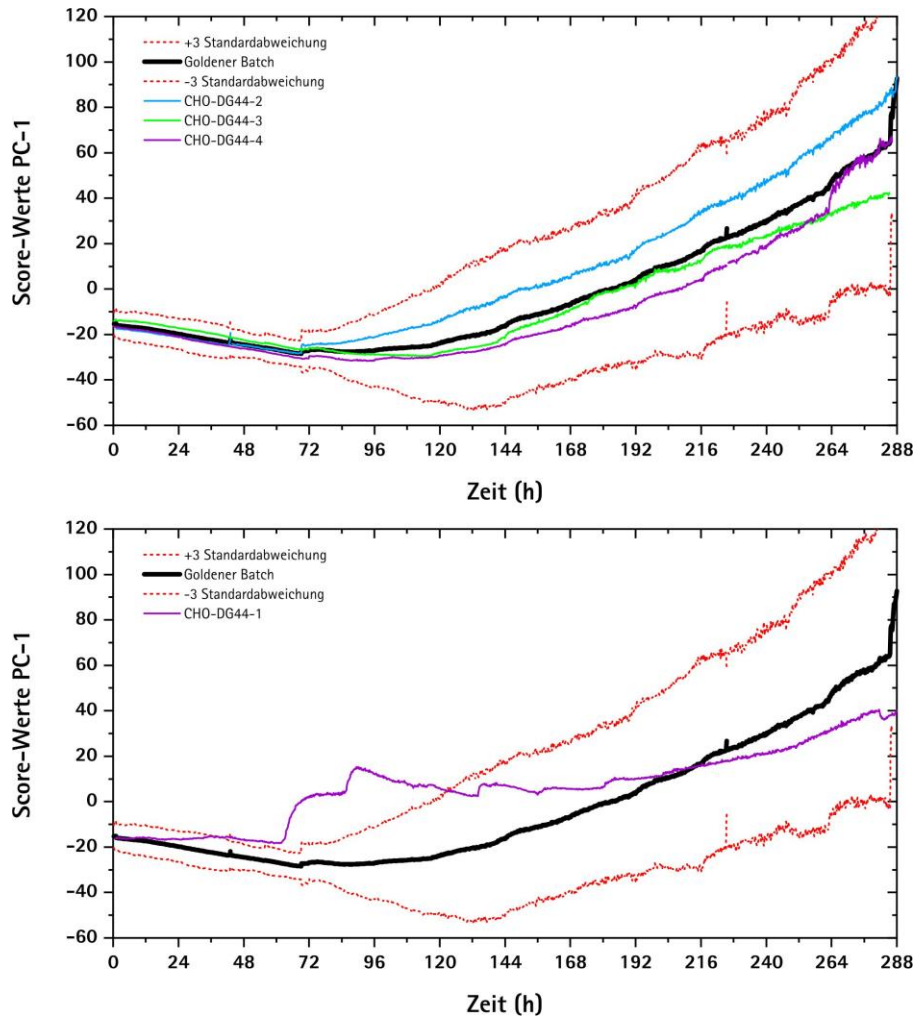


Abbildung 45: Prozesstrajektorien der Raman-Spektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrolllimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung CHO-DG44-1 teilweise außerhalb der Kontrollimits (unten).

Der Bereich innerhalb der Standardabweichungen wird nach 72 h deutlich breiter. Dies ist der Zeitpunkt, bei dem die Zufütterung startet. Durch Varianzen im Feed-Medium, Schwankungen der *Feed*-Zeitpunkte und Schwankungen in den *Feed*-Volumina werden stärkere Unterschiede zwischen den einzelnen Prozessen verursacht.

In Abbildung 45 unten verlässt Kultivierung CHO-DG44-1 die dreifache Standardabweichung des Golden Batch nach 48 h. Bei dieser Kultivierung wurde bereits früher *Feed*-Medium hinzugefüttert. Außerdem lag die GZK mit $0,74 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} zu diesem Zeitpunkt unterhalb der Konzentration der Referenz-Kultivierungen. Hieraus kann geschlossen werden, dass die lag-Phase dieser Kultivierung länger ange dauert hat und diese Verzögerung spektral

anhand der Batch-Trajektorie zu beobachten ist. Nach 120 h kehrt die Trajektorie der Kultivierung in die dreifache Standardabweichung zurück. Jedoch ist auch hier eine stärkere Abweichung zum „golden Batch“ zu erkennen, welche durch die niedrigere Zellzahl verursacht wird. Die Zellen wuchsen innerhalb dieser Kultivierung schlechter an, da die pH-Sonde in dieser Kultivierung Probleme verursachte. Diese musste häufig nachkalibriert werden, was auch dazu führte, dass der pH-Wert innerhalb der Zellsuspension nicht konstant gehalten werden konnte.

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, die eine Korrektur der Basislinienverschiebung von Raman-Spektren ermöglichen [96]. Ein Ansatz ist die Kombination der Savitzky-Golay Ableitung erster Ordnung mit einer darauffolgenden SNV [92, 93, 97]. Bei der Savitzky-Golay Ableitung wird mit Hilfe eines Polynomfits das Spektrum lokal innerhalb eines definierten Fensters interpoliert [48]. Durch Ableitung dieser Polynome werden die Basislinienverschiebungen eliminiert. Des Weiteren können durch die SNV, die Spektren standardisiert und Störsignale korrigiert werden. Die Methode bietet daher eine Normalisierung der Spektren von mehreren Kultivierungen und eine Reduktion der Varianzen zwischen den Prozessen. Diese Methode zeigte jedoch keine guten Resultate für die mit der berührungslosen Raman-Prozesssonde innerhalb der CHO-DG44 Kultivierungen aufgenommenen Daten (Anhang). Nach dieser Datenvorverarbeitung waren keine Peaks bzw. Signale für die relevanten Analyten in den Spektren zu erkennen.

Somit wurde eine weitere Methode der Datenvorverarbeitung angewandt, die *Asymmetric least square* (ALS) Methode. Die ALS Methode kombiniert eine Glättung mit einer asymmetrischen Gewichtung der Abweichungen von dem glatten Trend der Spektren, um eine effektive Basislinie zu bilden. Diese Methode wird ausführlich von Eilers und Boelens beschrieben [98]. Die Raman-Spektren wurden mit dem im Anhang zu findenden ALS MATLAB Skript bearbeitet. Die vorverarbeiteten Spektren einer Kultivierung sind in Abbildung 46, A grafisch dargestellt. Die Daten zeigen, im Vergleich zu den Rohdaten, deutlich stärker ausgeprägte Signale und eine konstante Basislinie während der Kultivierung.

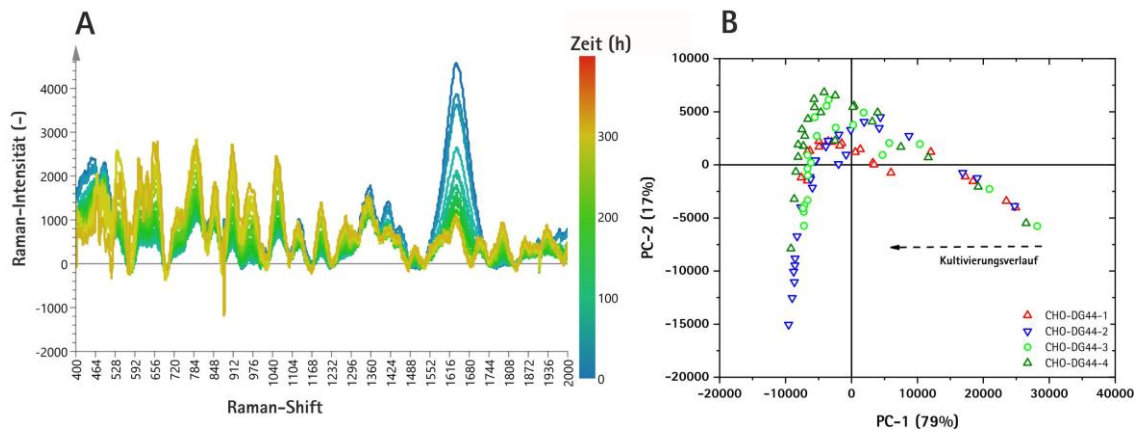


Abbildung 46: Verlauf der ALS-transformierten Raman-Spektren einer CHO-DG44 Kultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an (A). PCA-Scores der ALS-bearbeiteten Raman-Spektren zu den Zeitpunkten der *offline* Referenzwerte von allen 2 L CHO-DG44 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (B).

Anhand der Scores der Hauptkomponentenanalyse ist zu erkennen, dass die mit ALS vorverarbeiteten Spektraldaten einen qualitativ vergleichbaren Trend in den vier CHO-DG44 Kultivierungen besitzen. Die ersten zwei PCs beschreiben zusammen 96% der gesamten spektralen Varianz. Die restliche Varianz besteht aus Messrauschen.

6.3 Quantitative Untersuchung der Raman-Spektren

Für die PLS-Models wurden die ALS vorverarbeiteten Raman-Spektren der Fingerabdruck-Region des Spektrums von 800-1800 cm^{-1} verwendet. Abbildung 47 stellt die Ergebnisse des PLS-Models für die C-Quelle Glukose dar. Mit 4 PLS-Faktoren können die spektralen Glukose-Informationen in den Daten erklärt werden.

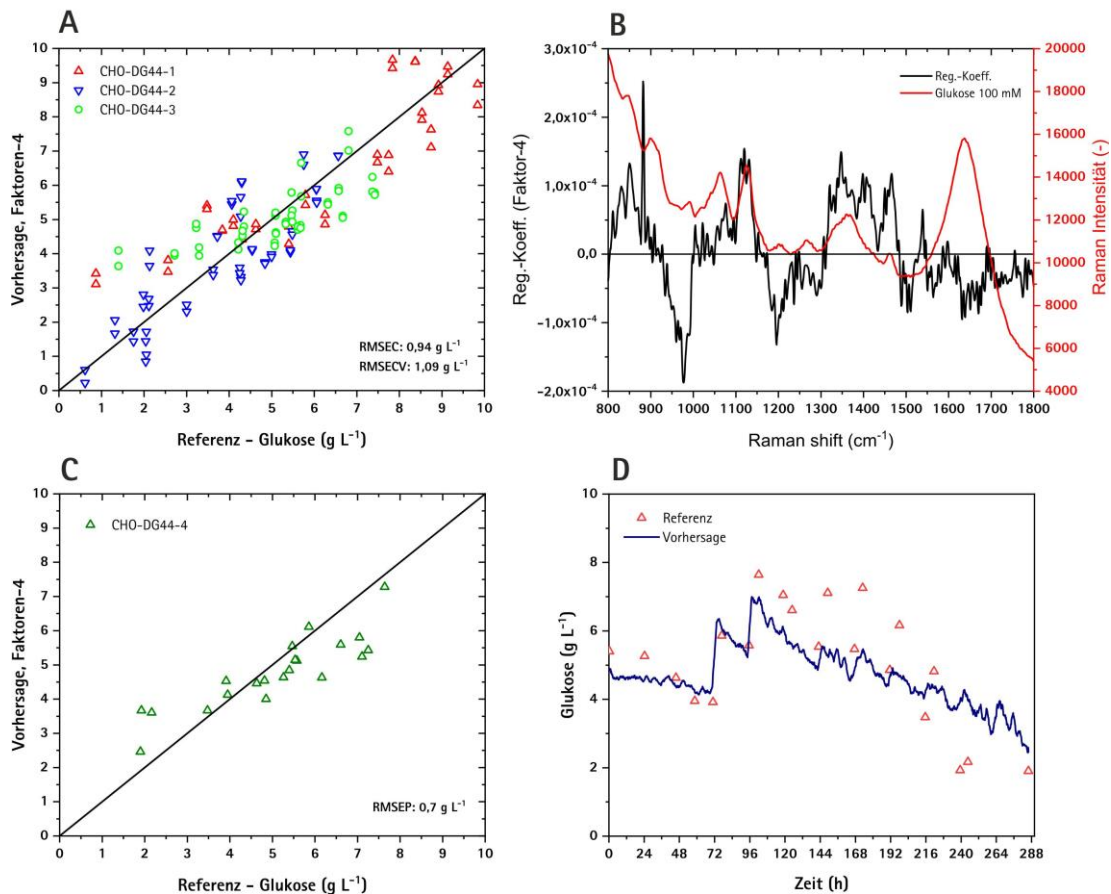


Abbildung 47: PLS Regression der Glukose-Konzentration; Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Glukose-Konzentration gegen die *offline* Referenzen für CHO-DG44-4 (D).

Die mit dem Regressionsmodell vorhergesagten Werte zeigen im Vergleich zu den gemessenen Werten einen R^2 von 0,8 (Abbildung 47, A). Über den gesamten Konzentrationsbereich sind Ungenauigkeiten in der Vorhersage zu erkennen. Die Kalibration des Modells weist einen RMSEC von 0,94 g L⁻¹ und einen RMSEP von 1,09 g L⁻¹ auf. Für eine präzise Glukose-Überwachung sind diese Fehler jedoch zu hoch. Mit dieser Messungenauigkeit könnten die Werte nicht für eine Glukose-Regelung verwendet werden.

Die Regressionskoeffizienten zeigen, dass besonders die Bereiche 910 cm⁻¹, ~1100 cm⁻¹ und 1300-1500 cm⁻¹ zur Vorhersage der Glukose-Konzentration herangezogen werden. Diese Bereiche sind in dem Glukose Fingerprint des reinen Spektrums wiederzuerkennen. Dies bedeutet, dass sich das PLS-Modell hauptsächlich auf die Spektralbereiche, die sich auf die chemische Struktur der Glukose beziehen, stützt.

Die Glukose-Konzentrationen des externen Datensatz von Kultivierung CHO-DG44-4 können mit einem RMSEP von $0,7 \text{ g L}^{-1}$ vorhergesagt werden. Damit liegt der Fehler oberhalb des aus dem DoE ermittelten LOQs von $0,49 \text{ g L}^{-1}$ (Kapitel 4.2). Diese Ergebnisse können durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden. Ein Grund hierfür ist die hohe Komplexität der in der Kultivierung vorliegenden Analyten. Zudem wird die Analyse durch die Autofluoreszenz beeinträchtigt. Die Daten zeigen, dass die Glukose-Konzentrationen in den ersten 144 h recht präzise anhand des Modells vorhergesagt werden können. Die Zufütterungen sind auch deutlich in den vorhergesagten Werten zu erkennen. Nach 144 h sind starke Abweichungen bei den vorhergesagten Werten im Vergleich zu den gemessenen Werten zu sehen. Die vorhergesagten Konzentrationen liegen bis 216 h unterhalb der gemessenen Werte. Anschließend werden höhere Werte durch das PLS-Modell vorhergesagt. Eine Erklärung hierfür ist, dass ab einer gewissen Zellkonzentration die Autofluoreszenz so stark ist, dass chemische Informationen kaum noch erfasst werden können [99]. In den Raman-Spektren ist zu erkennen, dass die Signale für chemische Informationen mit fortschreitender Kultivierungsdauer und steigender Basislinie kleiner werden (siehe Abbildung 44).

Die Daten zeigen, dass die Vorhersage der Glukose nur bis zu einem gewissen Grad ermöglicht werden kann. Wie bereits in dem DoE untersucht wurde, hat auch das Laktat-Molekül einen spezifischen Fingerabdruck im Raman-Spektrum (Kapitel 4.2). Hier wurde ein LOD von $0,29$ und ein LOQ von $0,45 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt. Während CHO-DG44 Kultivierungen liegen die Laktat-Konzentrationen unterhalb von $0,8 \text{ g L}^{-1}$, so dass die Vorhersage aus den Raman-Spektren limitiert ist. Bei einem PLS-Modell, welches sechs Faktoren verwendet, ist deutlich zu erkennen, dass die Analytik an ihre Grenzen kommt (siehe Anhang, Abbildung 56). In den Regressionskoeffizienten ist ein starkes Messrauschen zu sehen. Der Verlauf des Laktat-*Shifts* kann jedoch, mit großen Ungenauigkeiten, abgebildet werden.

Aus den Ergebnissen ergibt sich, dass die Vorhersagen der untersuchten Prozessvariablen aufgrund der schwachen Signale im Raman-Spektrum an ihre Grenzen stoßen. Es wurde daher untersucht, ob durch längere Integrationszeiten stärkere Signale in der Raman-Streuung verursacht werden können. Hierfür wurden die in den bereits beschriebenen Versuchen verwendete Integrationszeit von 50 s mit 75 s und 100 s verglichen.

Abbildung 48 zeigt jeweils die aufgenommenen Raman-Spektren im Medium (A) und der Zellsuspension am Ende einer Kultivierung (B) bei den verschiedenen Integrationszeiten. Hier zeigt sich, dass eine Integrationszeit von 75 s zu Beginn und am Ende der Kultivierung Spektren mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis hervorbringt. Möglicherweise können mit einer Integrationszeit von 75 s präzisere Resultate erzeugt werden. Des Weiteren könnte untersucht werden, ob sich die Qualität der Raman-Spektren verbessert, wenn die Anzahl an Scans pro Messung erhöht wird oder eine andere Wellenlänge zur Anregung der Raman-Streuung gewählt wird. Matthews *et al.* zeigt erste Versuche mit einem Laser von 993 nm [100].

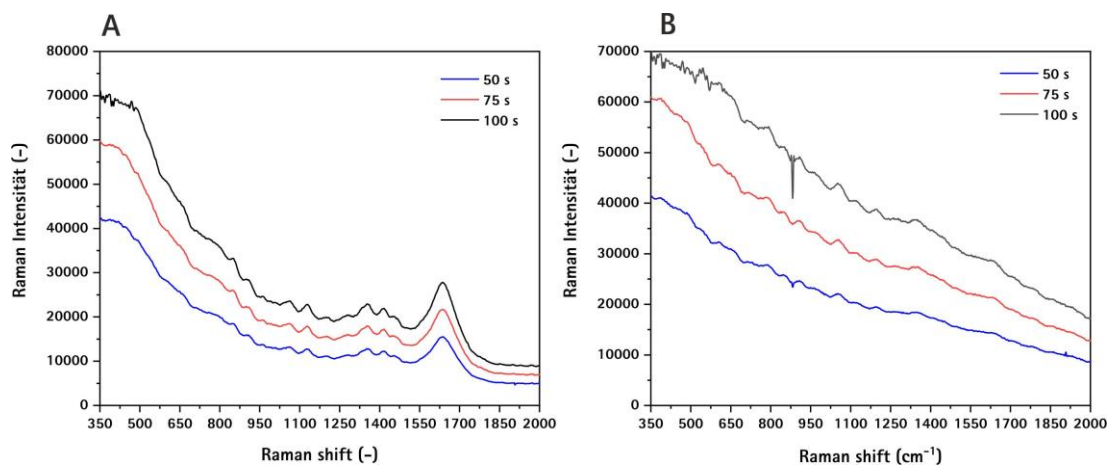


Abbildung 48: Verschiedene Integrationszeiten des Raman-Spektrometers zu Beginn der Kultivierung (A) und am Ende der Kultivierung (B).

6.4 Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Untersuchung der Raman-Spektren

Die qualitative Untersuchung der Raman-Spektren zeigte, dass mit Hilfe von *Batch Evolution* Modellen Prozessabweichungen innerhalb von Kultivierungen erkannt werden können. Hierfür können die Spektren für eine qualitative Prozesstrajektorie herangezogen werden. Eine quantitative Bioprozessüberwachung von wichtigen Analyten, wie zum Beispiel der Glukose, ist mit diesen Einstellungen der Prozesssonde nur bedingt möglich. Die Vorhersagefehler sind für eine Überwachung zu groß. Die Qualität der Spektren müsste durch Veränderungen der Integrationszeiten bzw. durch die Anzahl der Scans pro Messung

optimiert werden, um für eine quantitative Bioprozessüberwachung verwendet werden zu können.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die 2D-Fluoreszenz, UV/VIS- und die berührungslose Raman-Spektroskopie für die Bioprozessüberwachung von Säugetierzellkultivierungen erfolgreich evaluiert.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein SIP- (engl. *Sterilization-in-Place*) Bypass-System entwickelt, welches die Adaption verschiedener spektroskopischer Sensoren an unterschiedliche Reaktorsysteme ermöglicht, ohne die Sterilität des Prozesses zu gefährden. Aufgrund der unterschiedlichen Messprinzipien wurden für die UV/VIS-, 2D-Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie unterschiedliche Bypass-Kammern entwickelt. Die Sterilität des Systems konnte anhand von verschiedenen Kultivierungen im 2 L und 10 L-Maßstab erfolgreich nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die spektroskopischen Messungen innerhalb der jeweiligen Messkammer für die Bioprozessüberwachung verwendet werden konnten. Das System ermöglicht einen Modelltransfer zwischen unterschiedlichen Systemen. Eine weitere Möglichkeit könnte die Implementierung innerhalb des *Scale-up* von der Prozessentwicklung bis hin zum Produktionsmaßstab sein. Das SIP-Bypass-System ermöglichte erstmals die Sterilisation vor Ort von spektroskopischen Sonden, die nicht von dem Lichtleiter gelöst werden können und somit auch die Adaption an Glasreaktoren oder auch modernen Einwegbioreaktoren.

In Vorversuchen wurden die spektroskopischen Methoden zunächst qualifiziert und hinsichtlich der Spezifität und Selektivität, in Bezug auf die in Säugetierzellkultivierungen relevanten Analyten, untersucht. Ein besonderer Fokus lag hier auf der Fragestellung, ob die Analyten Protein, NADH, NAD, Riboflavin, FAD und Pyridoxin in komplexen Lösungen nebeneinander detektierbar sind. Hierfür wurden Versuchspläne nach den Prinzipien des DoEs erstellt, bei denen die einzelnen Konzentrationsstufen keine Korrelation untereinander haben. Basierend auf den Spektraldaten wurden chemometrische Modelle erstellt und die

Detektionsgrenzen (LOD und LOQ) für die Analyten der jeweiligen spektroskopischen Methode ermittelt.

Die Ergebnisse für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zeigen, dass diese Messmethode eine hohe Spezifität und Selektivität hinsichtlich der Analyten BSA, NADH und Riboflavin aufweisen. Diese Analyten konnten nebeneinander in komplexen Lösungen mit jeweils einem LOQ unterhalb der typischen Konzentrationsbereiche in CHO-Zellkultivierungen gemessen werden. Die Ergebnisse der UV/VIS-Spektroskopie zeigten hingegen ausschließlich eine gute Qualität für die Detektion von BSA und DNA in komplexen Lösungen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Technik insbesondere bei der Überwachung von Prozessschritten im *Downstream processing* angewandt werden könnte. Eine mögliche Anwendung könnte die Überwachung einer präparativen Chromatographie sein [101]. Bei der Raman-Spektroskopie wurde zunächst untersucht, ob die relevanten Analyten Protein, Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat mit Hilfe der berührungslosen Raman-Abstandssonde durch das Schauglas der Bypass-Kammer detektierbar sind. Hierbei zeigten alle Analyten in Reinstlösung stoffspezifische Signale und somit einen spezifischen Fingerabdruck. In komplexen Lösungen konnten mit Hilfe der berührungslosen Raman-Spektroskopie die Analyten Glukose, Laktat und das Modellprotein BSA nebeneinander detektiert werden.

Der Hauptteil dieser Arbeit besteht aus der qualitativen und quantitativen Untersuchung der jeweiligen Spektraldaten aus den durchgeführten CHO-Zellkultivierungen im 2 L und 10 L-Maßstab. Für die Evaluierung der 2D-Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektroskopie wurden sieben Kultivierungen mit der CHO-K1 Ziellinien im 10 L Edelstahlbioreaktor durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass mit Hilfe des Verlaufs der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten der Wellenlängenregion für NADH, Sauerstofflimitierungen innerhalb der Kultivierung beobachtet werden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt des Laktat-*Shifts* durch die Verläufe der rel. Fluoreszenzintensitäten der Wellenlängenregionen für die Rayleigh-Streuung, NADH und der aromatischen Aminosäuren ermittelt werden kann. Anhand von Prozesstrajektorien konnten für alle spektroskopischen Methoden, basierend auf den Varianzen in den Spektraldaten, ohne das Vorhandensein von offline Referenzdaten, frühzeitige Abweichungen des Prozesses erkannt werden. Somit konnten unter anderem Sauerstofflimitierungen oder Kontaminationen ohne eine Probenahme gesehen werden.

Darüber hinaus könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Nährstofflimitierungen oder pH-Wert Schwankungen anhand von Prozesstrajektorien oder dem Verlauf der normalisierten rel. Fluoreszenzintensitäten erkannt werden können.

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren haben ergeben, dass die Gesamtzellkonzentration, die Lebendzellkonzentration und Viabilität der Zellen vorhergesagt werden können. Hierbei wurden fünf Kultivierungen für die Modellerstellung und eine weitere Kultivierungen für die externe Validierung verwendet. Die Ergebnisse zur Überwachung der Viabilität sind besonders hervorzuheben, da diese schwer zugängliche biologische Prozessvariable ansonsten nur bedingt *in-line* überwacht werden kann. Die UV/VIS-Spektroskopie ermöglicht es, die Gesamtzellkonzentration innerhalb der CHO-Zellkultivierungen *in-line* zu überwachen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen können zellkonzentration-basierte Zufütterungsstrategien aufgebaut werden.

Eine weitere große Herausforderung stellte die Untersuchung Nekrose und Apoptose innerhalb von CHO-Zellkultivierungen dar. Um den apoptotischen und nekrotischen Zelltod zu untersuchen, wurde in Rahmen dieser Arbeit die Apoptose der Zellen durch die Zugabe des Chemotherapeutikums Cisplatin künstlich in 2 L-Kultivierungen induziert. Durch Verwendung des entwickelten SIP-Bypass-Systems konnte die 2D-Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektroskopie zur Überwachung an den Bioprozess erfolgreich angebunden werden. Als Referenzanalytik wurde der Zelltod durchflusszytometrisch mittels Fluoreszenzmarkierungen analysiert. Hierbei konnten vor allem in den 2D-Fluoreszenzspektren, Veränderungen des Streulichts aufgrund der Zellmorphologie, die sich im Verlaufe des Zelltods verändert, erkannt werden. Die quantitative Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen konnte aufgrund der hohen Überschneidung der beiden Zellstadien nur begrenzt realisiert werden. In nachfolgenden Arbeiten müssten diese Beobachtungen und Zusammenhänge näher untersucht werden. Eine Möglichkeit dazu ist eine Erhöhung der Referenzanalytik, die zu einer höheren Datendichte und einem besseren Verständnis beitragen könnte.

In einem weiteren Teilbereich dieser Arbeit wurde die berührungslosen Raman-Spektroskopie in vier 2 L *Fed-Batch* Kultivierungen im Glasbioreaktor mit der Antikörper-produzierenden CHO-DG44 Ziellinie evaluiert. Hierbei wurde das entwickelte SIP-Bypass-System an den Bioreaktor installiert und durch das Schauglas, einer mit Zellsuspension durchfluteten

Messkammer, gemessen. Mit Hilfe von *Batch Evolution* Modellen konnten aus den Raman-Spektren Prozess trajektorien erstellt werden, die Prozessabweichungen aufdecken können. Eine quantitative Bioprozessüberwachung von wichtigen Analyten, wie zum Beispiel der Glukose, war mit den verwendeten Einstellungen der Prozesssonde nur bedingt möglich. Da jedoch für allen untersuchten Analyten in den Vorversuchen ein spezifischer Fingerabdruck mit Hilfe der berührungslosen Raman-Spektroskopie erfasst werden konnte, zeigt diese Methode großes Potenzial für die Überwachung von Säugetierzellkultivierungen. In weiteren Experimenten müssten verschiedene Einstellungen, wie z.B. unterschiedliche Integrationszeiten und die Anzahl an Scans, untersucht werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die drei untersuchten spektroskopischen Methoden erfolgreich für die Bioprozessüberwachung evaluiert werden. Es wurden die Möglichkeiten und Grenzen der jeweiligen Methode untersucht und dargestellt. Die Evaluierung der drei spektroskopischen Methoden zeigte, dass die multimodale Spektroskopie für eine simultane Analyse von chemischen und biologischen Prozessvariablen verwendet werden kann. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Implementierung von *real-time* Bioprozessüberwachung innerhalb der Ziele aus der PAT Initiative nach vorne zu bringen.

8 Anhang

8.1 Materialien

In dem folgenden Kapitel werden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte aufgelistet.

8.1.1 Chemikalien

Tabelle 9: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, München
L(-)-Milchsäure Lithiumsalz	VWR International GmbH, Darmstadt
D(+)-Glukose wasserfrei	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG
Trypanblau-Lösung (0,4%)	VWR International GmbH, Darmstadt
Cisplatin	Sigma-Aldrich, München
LDH Cytotoxicity Dection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
APC Annexin V	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, USA
NADH	Sigma-Aldrich, München
Riboflavin	Sigma-Aldrich, München
Pyridoxin	Sigma-Aldrich, München
NAD	Sigma-Aldrich, München
DNA aus Heringssperma	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, Darmstadt

8.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
0,2 µm Luftfilter	Sartolab® P20	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
10 Liter Edelstahlreaktor	BIOSTAT® Cplus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
2 L Glasreaktor	Univessel®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
96-Well-Platte	TC Platte 96 Well Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Analysenwaage	AC 210 S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Analysenwaage	CP8201	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Autoklav	System V-150	Systeme GmbH, Wettbergen
Automatischer Zellzähler	Cedex	Roche Diagnostics AG, Penzberg
Autosampler	Div. Bauteile nach [51]	Institut für Technische Chemie, Hannover
Biochemischer Analysator	YSI 2950	YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA
Durchflussszytometer	BD Accuri™ C6	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Einkanal-Pipette	Reference, Research	Eppendorf AG, Hamburg
Glasflaschen	Schott Duran®	Schott AG, Mainz
Hamsterovarienzellen	CHO-K1-HP	AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld
Hamsterovarienzellen	CHO-DG44	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
HPLC	Hitachi Chromaster	VWR International GmbH, Darmstadt
Ingold-Probenahmeventil	SCV 25	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Inkubator	HERAcell 240, CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Klebefilm	Parafilm® M	VWR International GmbH, Darmstadt
Luftfilter	Midisart®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Membranventile für das SIP- Bypass-System	Gemü 601	Gemü Gebr. Müller Apparatebau GmbH & Co. KG, Ingelfingen
Messkammerbeschichtung	TiAIN	Feilen Pieper, Wagenfeld
Messzylinder	Diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt
Nutschenfilter	514-0342	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Elektrode	Easyferm® plus	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
pH-Meter	HI 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipettenspitzen	Diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt

Pipettierhelfer	Accu-jet pro®	Brand GmbH & Co. KG, Karlsruhe
pO ₂ -Sonde	Oxyferm® FDA	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Probenröhrchen	PP 14 mL 100x16 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Protein-A Säule	Poros A20	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pumpen	IPC 4	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Raman-Spektrometer	MultiSpec® Raman	Tec5 AG, Oberursel
Reaktorsteuerung	BIOSTAT® Bplus DCU	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sacova-Ventil	Safe Coupling Valve	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sartorius Schlauchverbinder	BioWelder® Konnektor	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Schlauch für Schweißgerät	C-Flex®	Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich
Schläuche	Silikonschläuche	VWR International GmbH, Darmstadt
Schüttelkolben	Erlenmeyer Corning®	VWR International GmbH, Darmstadt
Software für MVDA	The Unscrambler® X.10.1	CAMO Software AS, Oslo, Norwegen
Software für MVDA	SIMCA 15	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
UV-VIS Spektrophotometer	Genesys 10S	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellkulturmedium	CHOMACS CD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifuge	5702	Eppendorf AG, Hamburg

8.2 Methoden

In dem folgenden Kapitel werden alle in dieser Arbeit durchgeführten Methoden beschrieben.

8.2.1 Reaktorkultivierungen

8.2.1.1 Herstellung der Kryokulturen von Säugerzellen

Für die Herstellung von Kryokulturen wurden 10^7 Zellen pro Kryogefäß (1,6 mL) mit Kryomedium (CHOMACS CD, 10% DMSO) resuspendiert und in die Kryogefäße überführt. Die Kryokulturen wurden zunächst in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß gestellt und anschließend bei -80°C für 24 Stunden gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Kryokulturen in den Gefäßen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

8.2.1.2 Vorkultur – CHO-K1

Für jede Reaktorkultivierung wurde eine CHO-K1 (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) Kultur aus der *Working Cell Bank* (WCB), die in flüssigem Stickstoff gelagert sind, aufgetaut.

Die Zellen im Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C kurz erwärmt, und im Anschluss wurden die aufgetauten Zellen in 10 mL kaltes Zellkulturmedium (CHOMACS CD, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) überführt. Um das zelltoxische DMSO aus der Kryokultur zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 200 g). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einen Schüttelkolben mit 30 mL Zellkulturmedium mit Zugabe von 8 mM L-Glutamin suspendiert. Der Schüttelkolben mit den enthaltenen Zellen wurde in einem CO₂ Inkubator (37°C, 5% CO₂, 160 rpm, 95% relative Luftfeuchte) inkubiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation ist eine Zellkonzentration von ungefähr 1×10^7 Zellen mL⁻¹ erreicht und die Zellen wurden auf eine Zellkonzentration von 4×10^5 Zellen mL⁻¹ in frisches Medium passagiert. Nach weiteren 3-4 Inkubationstagen wurden die Zellen im letzten Schritt auf 250 mL Schüttelkolben mit jeweils 100 mL Zellkulturmedium passagiert. Erreichen die Zellen nach 3-4 Tagen eine Zellkonzentration von $5-8 \times 10^6$ Zellen mL⁻¹, wird das notwendige Volumen der Zellsuspension berechnet, um den jeweiligen Bioreaktor zu inokulieren.

8.2.1.3 Vorkultur – CHO-DG44

Bei der Vorkultur der CHO-DG44 Zelllinie wurde für jede Reaktorkultivierung ein Kryoröhrchen aus der WCB aufgetaut, in 10 mL Medium überführt und für 3 min bei Raumtemperatur und 190 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet resuspendiert und in einen 500 mL Schüttelkolben mit 150 mL Zellkulturmedium + 15 nM Methotrexat (MTX) überführt. MTX wird als Selektionsmarker eingesetzt. Die Zellsuspension wurde für 3-4 Tage in einem Inkubator kultiviert (36,8°C, 7,5% CO₂, 120 rpm, 85% relative Luftfeuchtigkeit). Anschließend wurden die Zellen wieder in frisches Zellkulturmedium überführt und weiter inkubiert. Nach der dritten Passage wurde das benötigte Volumen der Zellsuspension für die Reaktorkultivierung berechnet.

8.2.1.4 2 Liter Reaktorkultivierung – CHO-K1

Bei der Vorbereitung für die Reaktorkultivierung wurde der 2 L-Glasreaktor (Univessel®, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) zusammen mit allen benötigten Sonden, Schläuchen, Filtern, Vorlage- und Inokulationsgefäßen im Autoklav bei 121°C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert. Das Zellkulturmedium und sämtliche Zusätze wurden unter der Sterilbank durch Einsatz von Nutschenfiltern (0,2 µm) sterilfiltriert. In den Bioreaktor wurden

1,8 L Medium mit Zugabe von 8 mM L-Glutamin steril hineingeführt. Vor der Inokulation musste das Medium auf 37°C vortemperiert sein und der pH-Wert auf 7,1 eingestellt werden. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Sparger- und Kopfraumbegasung mussten manuell eingestellt werden, da das Biostat Bplus-System keinen Durchflussregler besitzt. Daher erfolgte die O₂- und CO₂-Begasung über den Ringsparger mit 1-2 Normliter x h⁻¹ (ideal 30-50 ccm) und die Luftzugabe über den Kopfraum mit 4 Normliter x h⁻¹ (ideal 200 ccm).

8.2.1.5 10 L Reaktorkultivierung – CHO-K1

Für die Vorbereitung des 10 L-Edelstahlreaktors (BIOSTAT® Cplus, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) wurden alle benötigten Schläuche, Sacova-Ventile, Vorlagen- und Inokulationsbehälter im Autoklav bei 121°C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert. Im Anschluss wurden die sterilen mit Aluminiumfolie eingepackten Sacova-Ventile unter der Sterilbank geschlossen und an den Reaktor installiert. Vor der Sterilisation wurden alle Sonden und Spektrometer an den Reaktor angeschlossen und der Reaktor mit 7 L 1 x PBS-Lösung befüllt. Anschließend wurde der Reaktor über das automatische Sterilisationsprogramm sterilisiert. Nach erfolgreicher Sterilisation wurde die pH-Sonde nachkalibriert und die PBS-Lösung durch das Bodenablassventil abgelassen. Der Reaktor wurde anschließend mit Zellkulturmedium befüllt. Hierzu wurde das Medium und L-Glutamin unter der Sterilbank über einen 0,2 µm Nutschenfilter in die autoklavierten Vorlageflaschen filtriert. Das Medium wurde über die Schläuche in den Reaktor überführt. Bevor die Zellen hinzugegeben wurden, wurde das Zellkulturmedium im Reaktor auf 37°C temperiert. Zeitgleich wurde das benötigte Volumen für die Inokulation von 4 x 10⁵ Zellen mL⁻¹ berechnet. Im Anschluss wurde der Reaktor mit den Zellen inokuliert und mit Medium auf 7,5 L aufgefüllt. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 11 aufgelistet. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 49 veranschaulicht.

Tabelle 11: Kultivierungsbedingungen für CHO-K1 im 2 L und 10 L- Bioreaktor.

Parameter	Eigenschaft
Kulturmedium	CHOMACS CD + 8 mM L-Glutamin
Rührer	100 – 200 rpm (pO ₂ -Regelung)
Rührwerk	Rushton Turbine oberhalb des Mediums zur Schaumentfernung, Schrägblatt-Rührer unterhalb der Oberfläche, Rushton Turbine am unteren Ende der Rührwelle
Temperatur	37°C
pH-Wert	7,1
pH-Regelung	Säure: CO ₂ (via Sparger), Base: 1 M Na ₂ CO ₃
Begasung	pO ₂ 40% Luftsättigung; Kaskadenregler: Sauerstoff-Zugabe und Rührerdrehzahl
Überdruck	Kein Überdruck im Kopfraum
Inokulum	4 x 10 ⁵ Zellen mL ⁻¹

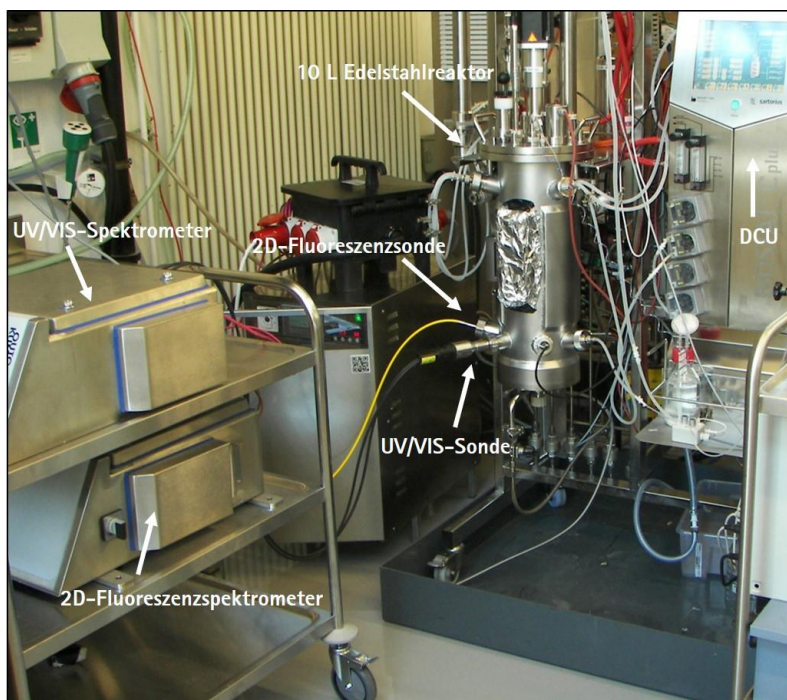


Abbildung 49: Versuchsaufbau der 10 L Reaktorkultivierungen.

8.2.1.6 2 L Reaktorkultivierung – CHO-DG44

Der Reaktor wurde, wie in Kapitel 8.2.1.4 beschrieben, vor der Kultivierung, vorbereitet und autoklaviert. Nach der Sterilisation wurde der 2L-Reaktor mit Produktionsmedium aufgefüllt und auf 36,8°C temperiert. Anschließend wurde dieser mit einer Zellkonzentration von 3×10^5 Zellen mL⁻¹ angeimpft. Das Arbeitsvolumen der Kultivierung beträgt zu Beginn 1,3 L. Die Zugabe von O₂ und CO₂ erfolgte durch ein Belüftungsrohr mit Ringsparger. Die Kultivierungsbedingungen und Zusammensetzungen der verschiedenen Medien und Lösungen sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 12: Kultivierungsbedingungen für CHO-DG44 im 2 L- Bioreaktor.

Parameter	Eigenschaft
Maximales Arbeitsvolumen	2 L
Startvolumen nach Inokulation	1,3 L
Basal-Medium	Produktionsmedium
Feed-Medium	Feed-Medium A (ca. 0,49 L), Feed-Medium B (ca. 0,05 L)
Temperatur	36,8°C
pH	7,1
O ₂	60%
Rührerdrehzahl	433 rpm
Kulturdauer	12 Tage
Inokulation	3×10^5 Zellen mL ⁻¹

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Inhaltsstoffe	Konzentration	Bezugsquelle
Feed-Medium A		
CHOKO FMA	154, 12 g L ⁻¹	Sigma-Aldrich, München
NaOH	3,148 g L ⁻¹	Merck, Darmstadt
Feed-Medium B		
CHOKO FMB	94,6 g L ⁻¹	Sigma-Aldrich, München
NaOH	32,1 g L ⁻¹	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose, wasserfrei	40% (w/v)	Merck, Darmstadt

8.2.2 Offline Analytik

In diesem Kapitel werden die verwendeten offline Analytik-Methoden beschrieben. Für die reproduzierbare offline Analytik und Probenahme sind vergleichbare Ausführungen unabdingbar.

8.2.2.1 Probenahme

Die manuelle Probenahme aus dem 2 L-Reaktor geschieht über ein Steigrohr mit Luer-Lock-Septum. Zunächst wurde das Septum mit 70% Isopropanol besprüht und ein Vorlauf von ca. 5 mL mit einer sterilen Spritze entnommen und verworfen. Im Anschluss wurde das Septum wieder mit Isopropanol desinfiziert und die eigentliche Probe von 10 mL wurde mit einer neuen sterilen Spritze entnommen. Die Probe wurde zeitnah an den jeweiligen Analysatoren analysiert.

Die Probeentnahme am 10 L-Edelstahlbioreaktor erfolgte durch die von Tim Lücking entwickelte Automatisierungsplattform [51]. Die Probenahme erfolgte automatisch alle 4 Stunden mit einem Volumen von 10 mL für jede Probe. Die entnommene Probe wurde bei 4°C im Probensammler gelagert und anschließend am gleichen Tag analysiert.

8.2.2.2 Zellkonzentrationsmessungen und Viabilitätsmessungen

Die Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität erfolgte durch den automatischen Zellzähler Cedex (Roche Innovatis AG, Penzberg). Hierfür wurden jeweils 1 mL Zellsuspension in ein Probengefäß pipettiert. Das Messprinzip basiert auf mikroskopischen Aufnahmen von Zellen innerhalb einer Durchflusszelle. Durch eine automatische Färbung der Zellen mit Trypanblau kann zwischen lebenden und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Die Zählungen der lebenden und nekrotischen Zellen sowie die Viabilität erfolgte mittels Bildauswertalgorithmus. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung mit der Einstellung „*superior*“, bei der jeweils 30 Bildaufnahmen pro Probe analysiert und berechnet. Bei einer Überschreitung von 1×10^7 Zellen mL⁻¹ wurde die Zellsuspension mit 1 x PBS manuell vor der Analyse verdünnt.

8.2.2.3 Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen

Die quantitative Messung der Glukose-, Laktat-, Glutamat- und Glutaminkonzentration erfolgte mit dem Analysator YSI 2950 (Kreienbaum Wissenschaftliche Meßsysteme e.K.,

Langenfeld). Vor der Analyse wurden die Zellen bei allen Proben jeweils abzentrifugiert (5 min, 200 g). Für jede Messung wurden 500 μL unverdünnter Probe verwendet. Da immer nur zwei Analyten gleichzeitig gemessen werden konnten, wurden jeweils Proben für Glutamin und Glutamat eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam analysiert. Die Analyse erfolgte durch Analyten spezifische Membranen auf denen ein Enzym (z.B. Glukoseoxidase für die Glukosemessung) immobilisiert war, welches das Substrat umsetzte und Wasserstoffperoxid dabei freisetzte. Das Wasserstoffperoxid wurde daraufhin an einer Platin-Elektrode zu Sauerstoff oxidiert. Der dabei entstehende Strom wurde gemessen und war proportional zur Analytkonzentration. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

8.2.2.4 Bestimmung der Antikörperkonzentrationen

Die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen IgG (Immunglobuline G) aus den CHO-DGG44 Kultivierungen wurden mittels HPLC (eng. *High pressure liquid chromatography*) bestimmt. Vor der Analyse wurden die Zellen bei 5 Minuten mit 200 g abzentrifugiert. Die Proben bis zum Kultivierungstag 5 wurden unverdünnt analysiert. Die Proben von Kultivierungstag 6–10 wurden im Verhältnis 1:10 und die Proben von Tag 11 und 12 im Verhältnis 1:20 mit Äquilibrationpuffer vor der Analyse verdünnt. Daraufhin wurden alle Proben mit Hilfe eines 0,22 μm Spritzenvorsatzfilter filtriert und jeweils 100 μL in eine HPLC-Mikroflasche überführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine Protein A-Säule (Poros A20, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Nach dem Einbau der Säule wurde das System zunächst 10 Minuten mit dem Äquilibrationpuffer gespült. Die vorbereiteten Proben wurden anschließend durch den automatischen Probennehmer auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} für eine Minute mit dem Äquilibrationpuffer äquilibriert. Im Anschluss folgte die chromatographische Trennung durch Zugabe des Elutionspuffers über einen linearen Gradienten bis innerhalb von einer Minute 100% Elutionspuffer auf der Säule erreicht waren. Die Elution erfolgte in 3 Minuten. Daraufhin wurde die Säule mit dem Äquilibrationpuffer gespült. Die Protein-A Säule wurde nach jeder fünften Probe 5 Minuten reäqualibriert. Der eluierte Antikörper wurde durch einen Diodenarraydetektor bei 280 nm detektiert. Die jeweiligen Konzentrationen wurden anhand der Peaks durch die Software OpenLAB control automatisch berechnet. In Tabelle 14 sind die verwendeten Puffer aufgelistet.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Puffer für die Protein A HPLC.

Puffer	Chemikalie	Menge
Äquilibriumspuffer, pH 7, 1 L	0,5 M Natriumdihydrogenphosphat	390 mL
	0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat	610 mL
	500 mM Natriumchlorid	22 g
Elutionspuffer, pH 2, 1 L	100 mM	1000 mL
	1,5 M Natriumchlorid	66 g

8.2.2.5 Durchflusszytometrische Analyse von nekrotischen und apoptotischen Zellen

Die Detektion von nekrotischen und apoptotischen Zellen erfolgte durch eine durchflusszytometrische Analyse. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer (BD Acuri B6) hinsichtlich ihrer Streuung und Fluoreszenz untersucht. Die Apoptose und Nekrose wurde mittels eines Apoptose-Kits (BD Pharmingen™) analysiert. Zur Vorbereitung wurden 1 mL Zellsuspension zentrifugiert (0,2 g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig mit 1 x PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und mit 1 x Bindungspuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1,5 µL Propidiumiodid (PI) und 5 µL APC-Annexin V für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Danach wurden die Zellen durch ein Nyloonsieb gegeben und durchflusszytometrisch analysiert. Im Durchflusszytometer wurden die gefärbten Zellen mit einem 488 nm Argon-Laser analysiert. Apoptotische, APC-Annexin V gefärbte Zellen wurden mittels 675/25 nm Bandpassfilter detektiert und nekrotisch PI gefärbte Zellen wurden mittels 585/40 nm Bandpassfilter detektiert. Für jede Probe wurden jeweils 10.000 Ereignisse analysiert. Eine Auswertung erfolgte mit der BD Acuri C6 Software (v.1.0).

8.2.2.6 LDH-Messungen

Die Freisetzung von der Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Säugetierzellen ist eine Kenngröße für die Schädigung der Zellmembran und damit auch der Nekrose. Das freigesetzte Enzym wurde mit Hilfe des LDH-Assay (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ermittelt. Die Messung basiert auf der durch LDH katalysierten Reaktion von NAD⁺ zu NADH. In der Folgereaktion wurde ein Proton von NADH auf das Tetrazoliumsalz übertragen. Diese Übertragung führte zu einem Farbumschlag,

welcher photometrisch messbar war. Für die Analyse wurde jeweils 100 μL der zellfreien Probe mit 100 μL des Testreagenz gemischt und in eine 96-Well-Platte transferiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion mit der 25 μL Stopp-Lösung abgebrochen. Anschließend wurde der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch in einem Plattenleser vermessen. Zusätzlich wurde eine Blindprobe ohne Testreagenz vermessen. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des LDHs wurde die Enzymaktivität bestimmt.

8.2.2.7 SIP-Bypass-System

Im Folgenden werden der Aufbau und die Anwendung des SIP-Bypass-Systems beschrieben. Zunächst wurde der Glasbioreaktor oder das Sacova-Ventil[®] des Edelstahlbioreaktors jeweils über einen Silikonschlauch mit der Schlaucholive an den beiden Membranventil-Kombinationen verbunden (Abbildung 50, A). Auf der anderen Seite der Membranventil-Kombination wurden über den Tri-Clamp Stutzen jeweils ein Sterilfilter angebracht, sodass hier eine Sterilbarriere nach dem Autoklavieren vorlag. Das Membranventil 1 (Abbildung 50, A) war geöffnet. Das Membranventil 2 war geschlossen. Mit dieser Einstellung wurde das System im Autoklav sterilisiert. Dadurch wurde die Wegstrecke vom Silikonschlauch bis Sterilfilter sterilisiert.

Anschließend wurde das Membranventil 1 jeweils an beiden geschlossen, die Sterilfilter am Tri-Clamp-Anschluss entfernt und die Messkammer mit angeschlossener Sensorik mittels der Tri-Clamp zwischen die beiden Membranventil-Kombinationen angeschlossen. Die Membranventile 2 wurden geöffnet und an den Heizedampf-Generator mittels Stahlschläuche verbunden (Abbildung 50, B). Anschließend wurde das Bypass-System mit angeschlossenen Messkammern und Sonden, 25 min mit Heizedampf sterilisiert. Die mit den roten Pfeilen markierte Wegstrecke war nun steril. Die beiden Membranventile 2 wurden direkt nachdem der Heizedampf abgestellt wurde geschlossen. Jetzt war die komplette rot gestrichelte Strecke (Abbildung 50, C) steril und die Zellsuspension aus dem Bioreaktor konnte durch das SIP-Bypass-System gefördert (Volumenstrom 4 ml/min) werden. Dabei konnten spektroskopische Messungen in den Messkammern durchgeführt werden. Die technischen Zeichnungen der Messkammern sind in Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt.

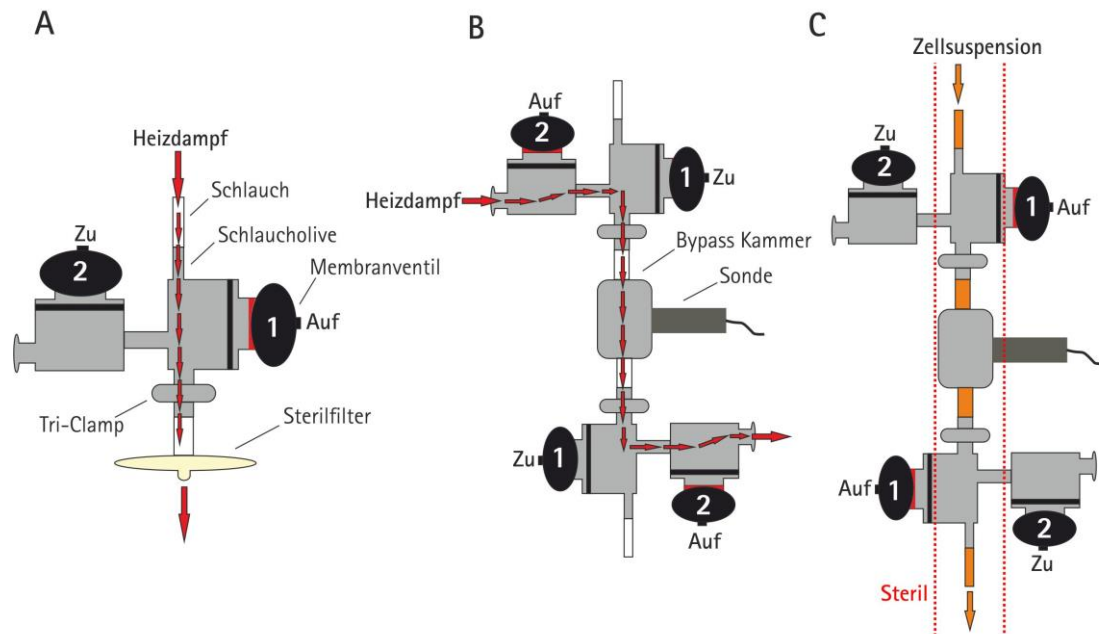


Abbildung 50: Sterilisation des SIP-Bypass-Systems. **A:** Membranventile werden mit angeschlossenen Silikonschläuchen und Sterilfilter autoklaviert. Membranventil 2 ist dabei geschlossen und Membranventil 1 geöffnet, damit Heizdampf die Strecke bis zum Sterilfilter sterilisieren kann **B:** Nach dem Autoklavieren werden die Membranventile 1 geschlossen, der Sterilfilter entfernt und die Messkammer zwischen die beiden Membranventile installiert. Die Membranventile 2 werden geöffnet, an Heizdampf angeschlossen und 25 min durchströmt. Anschließend werden die Membranventile 2 wieder geschlossen. **C:** Die nach dem Autoklavieren geschlossenen Ventile 2 werden wieder geöffnet und die Zellsuspension kann durch das sterile Bypass-System gefördert werden.

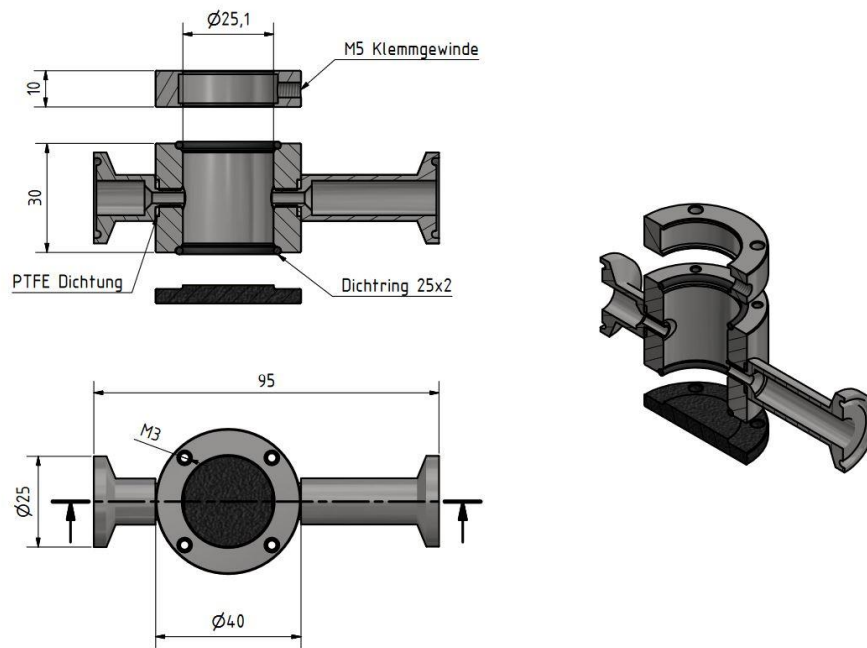


Abbildung 51: Technische Zeichnung der Messkammer für die 2D-Fluoreszenz-Sonde.

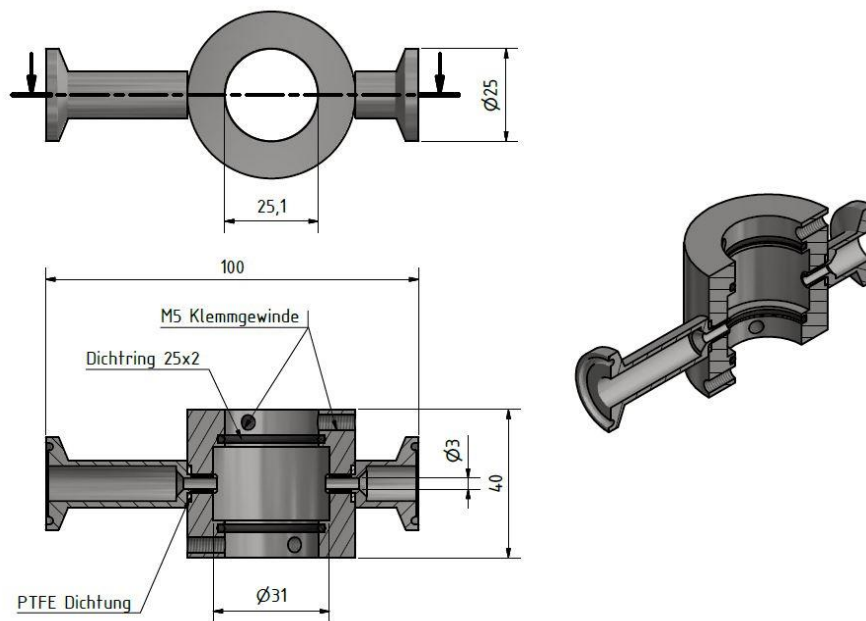


Abbildung 52: Technische Zeichnung der Messkammer für die UV/VIS-Sonde.

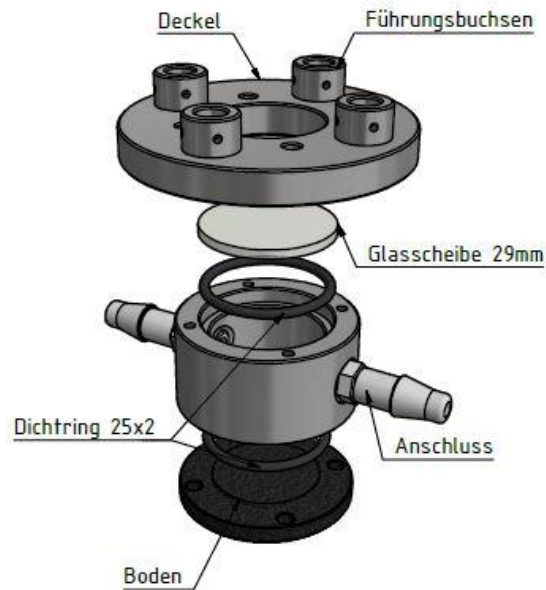


Abbildung 53: Technische Zeichnung der Messkammer für die Raman-Sonde.

8.2.3 Multivariate Datenanalyse

Die multivariate Datenanalyse wurde mit Hilfe der Software The Unscrambler® X.10.1 (CAMO Software AS, Oslo, Norwegen) durchgeführt. Die in dieser Arbeit dargestellten *Batch Evolution* Modelle wurden mit Hilfe der Software SIMCA 15 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) erstellt.

8.2.3.1 Fehlerberechnungen

Bei der multivariaten Datenanalyse wird als Fehlerangabe die Wurzel aus dem mittleren quadratischen Fehler angegeben. Der Fehler wird als RMSE (*Root Mean Square Error* = Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler) bezeichnet. Die Berechnung des RMSE erfolgt mit nachfolgender Gleichung 6:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (6)$$

Der Fehler wird aus der Anzahl im Modell verwendeten Proben n , den Referenzwerten y und den aus dem multivariaten Modell berechneten \hat{y} -Werten berechnet. Die Leistungsfähigkeit der Modelle wird in dieser Arbeit durch verschiedene Fehlerangaben bewertet [48]:

- Mittlerer Fehler der Kalibration → RMSEC
- Mittlerer Fehler der Kreuzvalidierung → RMSECV
- Mittlerer Fehler der Vorhersage → RMSEP (aus einem Validierset, welches nicht Teil der Kalibration ist)

8.2.4 Datenvorverarbeitungsmethoden

8.2.4.1 Standardisierung der Spektren (Standard Normal Variate Transformation – SNV)

Mit Hilfe der SNV-Transformation können Streueffekte innerhalb der Spektren korrigiert werden. Hierbei wird der Mittelwert und die Standardabweichung der Spektrenwerte eines kompletten Spektrums berechnet [48]. Dafür wird für jede gemessene Absorption x_i bei der Wellenzahl i der Wert $x_{i,SNV}$ mit folgender Formel berechnet:

$$x_{i,SNV} = \frac{(x_i - \bar{x})}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}{p-1}}} \quad (7)$$

Hierbei ist \bar{x} der Mittelwert über alle Absorptionen bei allen gemessenen Wellenlängen des Spektrums. In der Gleichung steht die Standardabweichung über alle Spektrenwerte im Nenner. Die Spektren werden ungefähr in einen Wertebereich von -2 bis 2 transformiert, da sich bei den Spektren ca. 95% der Werte im Bereich von ca. +/-2 der Standardabweichungen vom Mittelwert befinden [48].

8.2.4.2 Asymmetric least square (ALS) Glättung

Die *Asymmetric least square* (ALS) ist eine Methode zur Basislinienkorrektur von Spektren. Die ALS Methode kombiniert eine Glättung mit einer asymmetrischen Gewichtung der Abweichungen von dem glatten Trend der Spektren, um eine effektive Basislinie zu bilden. Diese Methode wird ausführlich von Eilers und Boelens beschrieben [98]. Die Rohdaten wurden mit dem folgenden ALS MATLAB Skript bearbeitet:

```

MATLAB (R2015a) Skript nach Eilers und Boelens
function z = ALS(y, lambda, p)
% Estimate baseline with ALS in Matlab

N = length(y);
D = diff(speye(N),2);
w = ones(N,1);
for i = 1:10
W = spdiags(w,0,N,N);
% Cholesky decomposition
C = chol(W + lambda * D' * D);
z = C \ (C \ (w.*y));
w = p * (y>z) + (1-p)*(y<z);
end

lambda = 10000000;
%ratio = 0.1;
p = 0.01;
Data = dlmread('cellca4.csv', ';', 0, 1);
Wavelength = Data(1,1:end-1);
Spectra = Data(2:end,1:end-1);

cc = jet(size(Spectra,1));
for i = 1: size(Spectra,1)
y = Spectra(i,:);
%z1 = baseline(y, lambda, ratio);
z2 = ALS(y, lambda, p);
VSpektren(i,:) = y - z2;
%plot(Wavelength,y,'k-',Wavelength,z1,'b-', Wavelength, z2, 'r-' )
%result = input('prompt');
plot(Wavelength,VSpektren(i,:), 'color', cc(i,:));
hold on
end
dlmwrite('VS4_ALS_test109_0.15.csv', VSpektren, ';');

```

8.2.4.3 Berechnung des LOD und LOQ aus multivariaten Daten

Mit Hilfe der PLS-Regression wurden Kalibrationen erstellt, um unbekannte Proben vorherzusagen. Die Messmethoden wurden hinsichtlich einer Detektionsgrenze (eng. *Limit of detection*; LOD) und der verlässlichen Vorhersage (eng. *Limit of quantification*; LOQ) bewertet. Dabei beschreibt der LOD die unterste Konzentration eines Analyten, die noch detektiert werden kann. Der LOQ gibt Auskunft über die Konzentration, welche sicher quantifiziert werden kann [102]. Für multivariate Daten wird der LOD und LOQ wie folgt berechnet:

$$y_{LOD} = b_0 + r_b^T * b * 3s_b^T * b \quad (8)$$

$$y_{LOD} = b_0 + r_b^T * b * 10s_b^T * b \quad (9)$$

In der Gleichung stehen b und b_0 für die Regressionskoeffizienten der PLS-Regression, r_b^T für die gemittelten Spektren der Blindprobe und s_b^T für die Standardabweichung jeder Variablen in der Blindprobe.

8.2.5 Erstellung von statistischen Versuchsplänen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Prinzipien der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*; DoE) zur Erstellung linear unabhängiger Messbereiche genutzt, um die Selektivität der einzelnen Messmethoden zu analysieren. Die Versuchspläne wurden mit Hilfe des von Frau Dr. Dörte Solle entwickelten MATLAB Skript erstellt. Nachfolgend wird das verwendete Skript gezeigt:

```

clc; clear all; close all;

%% Programmparameter
a = 3; % Anzahl der Analyten
k = 5; % Anzahl der Konzentrations-Levels
Level = [0 0.05 0.1 0.5 1]; % Konzentrationsstufen (1 = höchste Konzentrationsstufe)
M = 3; % mittlere Konzentration für Zentralversuche
MLevel = Level(M); % mittlere Konzentrationsstufe
MaxKon = [0.0001 0.0001 0.00001]; % Maximalkonzentration für die einzelnen Analyten
r = 3; % Anzahl der Kalibrationssets
iter = 1000;
iter2 = 100;

%% Start
X = zeros(k,a); % Initialisierung der Matrix
XLevel = zeros(k,a); % Initialisierung der LevelMatrix
warning off;

test = true; % Abbruchkriterium für die While-Schleife
Limit = 0.01; % Abbruchkriterium für Güte
s = 0; % Schleifenindex
MaxCorr = 1; % Maximale Korrelation
XbestAll(1,1:2*a)=[[MLevel*MaxKon], [ones(1,a)*M]]; % Initialisierung der Ergebnismatrix mit
vollständiger Korrelation

%% Hauptschleife
while test
    s = s+1; % Iteration der While-Schleife
    for l = 1:r % Für r Kalibrationssets
        y = -1; % Optimierungskriterium: erkl. Varianz der a-ten PC
        y2 = -1;
    end
end

```

```

for j = 1:iter % Für bis zu 1000 verschiedene Möglichkeiten

    %% Erzeuge zufällige x Matrix von Konzentrationskombinationen
    for i = 1:a % Für jeden Analyten
        X(:,i) = (randperm(k)-1)'; % zufällige Konz-Levels
    end;
    for i = 1:k
        index = X==i-1;
        for i2 = 1:a
            XLevel(:,i2) = XLevel(:,i2) + index(:,i2)*Level(i)*MaxKon(i2); %nach Konzentrationsstufen
        end
    end
end

%% PCA
[coefs,scores,variances,t2] = princomp(X);
if (variances(a) > y) % Wenn Varianz der letzten PC größer als vorher
    y2=variances(a-1); % Varianz der Vorletzten Hauptkomponente
    y = variances(a);
    Xbest = X;
    XbestL = XLevel;
    j;
    %% Erklärte Varianz pro Hauptkomponente (HK) anzeigen
    % percent_explained = 100*variances/sum(variances);
    % pareto(percent_explained);
    % xlabel('Hauptkomponente');
    % ylabel('Erklärte Varianz (%)');
    % drawnow;
elseif(variances(a) == y && variances(a-1)>y2) % Wenn die Varianz der vorletzten PC größer
als vorher
    y2=variances(a-1);
    Xbest = X;
    XbestL = XLevel;
    j;
    %% Erklärte Varianz pro Hauptkomponente (HK) anzeigen
    % percent_explained = 100*variances/sum(variances);
    % pareto(percent_explained);
    % xlabel('Hauptkomponente');
    % ylabel('Erklärte Varianz (%)');
    % drawnow;
end;
end;
XbestAll((l-1)*(k+1)+2:(l-1)*(k+1)+k+1,:)= [XbestL Xbest];
XbestAll((l-1)*(k+1)+k+2,:)= [MLevel*MaxKon ones(1,a)*M];
end;

Test = max(max(abs(corrcoef(XbestAll(:,a+1:2*a))))-abs(diag(diag(corrcoef(XbestAll(:,a+1:2*a))))));
if (Test < MaxCorr)
    MaxCorr = Test
    RM = XbestAll;
    xlswrite('File.xls',RM);
end

```

```

if Test<Limit
  test = false;
end
if s>iter2
  test = false;
end
end

```

8.2.6 Ergänzende Daten

In diesem Kapitel sind ergänzende Daten sowie die in dieser Arbeit verwendeten statistischen Versuchspläne dargestellt.

8.2.6.1 Statistische Versuchspläne

Tabelle 15: Versuchsplan für die UV/VIS- und 2D-Fluoreszenzspektroskopie.

Lösung	NADH [mg/L]	NAD [mg/L]	Riboflavin [mg/L]	FAD [mg/L]	Pyridoxin [mg/L]	BSA [g/L]
1	0,325	4	0,03	0,01	0,03	0,2
2	0	10	0,075	0	0,03	0
3	0,13	0	0	0,0025	0,15	1
4	0,65	1	0,03	0,01	0	0,5
5	1,3	20	0,0075	0,025	0,0075	0,05
6	0,325	4	0,15	0,05	0,075	0,2
7	0,325	4	0,03	0,01	0,03	0,2
8	0	4	0,075	0,025	0,0075	1
9	0,65	1	0,03	0	0,15	0,05
10	0,13	20	0,0075	0,01	0	0,5
11	1,3	10	0	0,0025	0,075	0,2
12	0,325	0	0,15	0,05	0,03	0
13	0,325	4	0,03	0,01	0,03	0,2
14	0,13	1	0,0075	0,0025	0,03	0,2
15	1,3	10	0,15	0	0,15	0,5
16	0,65	0	0	0,025	0	1
17	0,325	20	0,075	0,01	0,0075	0
18	0	4	0,03	0,05	0,075	0,05
19	0,325	4	0,03	0,01	0,03	0,2

Tabelle 16: Versuchsplan für die Raman-Spektroskopie.

Lösung	Glukose [g/L]	Glutamin [g/L]	Glutamat [g/L]	Laktat [g/L]	BSA [g/L]
1	3,75	0,75	0,25	2	1,5
2	3,75	0,375	0,375	0	1,5
3	1,875	0	0,5	4	2,25
4	0	1,5	0,125	2	0,75
5	5,625	0,75	0,25	1	0
6	7,5	1,125	0	3	3
7	3,75	0,75	0,25	2	1,5
8	1,875	0,75	0,375	2	0
9	5,625	1,5	0,5	1	1,5
10	3,75	0	0,25	0	2,25
11	0	1,125	0	3	3
12	7,5	0,375	0,125	4	0,75
13	3,75	0,75	0,25	2	1,5
14	1,875	1,5	0,375	1	0,75
15	5,625	0,375	0,125	4	0
16	3,75	0	0	0	2,25
17	0	0,75	0,25	3	1,5
18	7,5	1,125	0,5	2	3
19	3,75	0,75	0,25	2	1,5
PBS	0	0	0	0	0

8.2.6.2 Qualitative Untersuchung der 2D-Fluoreszenzspektren mit Hilfe der PCA

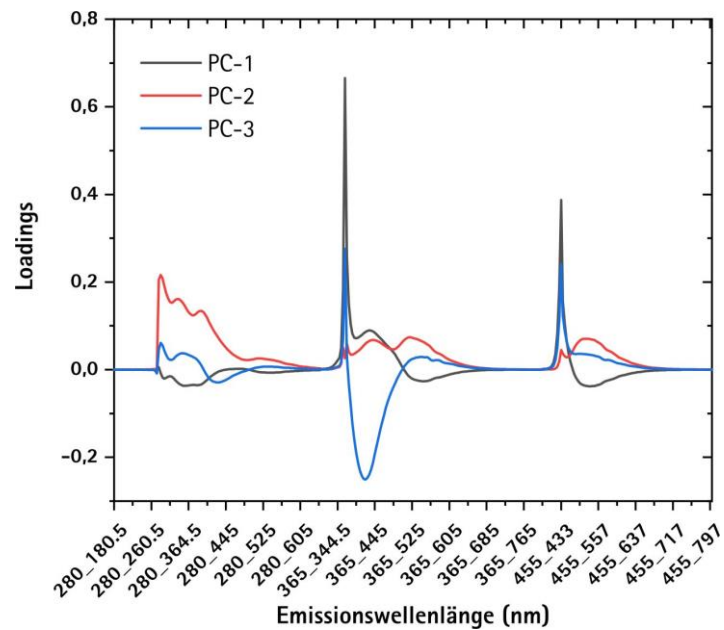


Abbildung 54: Loadings der 2D-Fluoreszenzspektren von PC-1 (91% Erklärungsanteil), PC-2 (7% Erklärungsanteil) und PC-3 (1% Erklärungsanteil).

8.2.6.3 Analyse der UV/VIS-Spektren

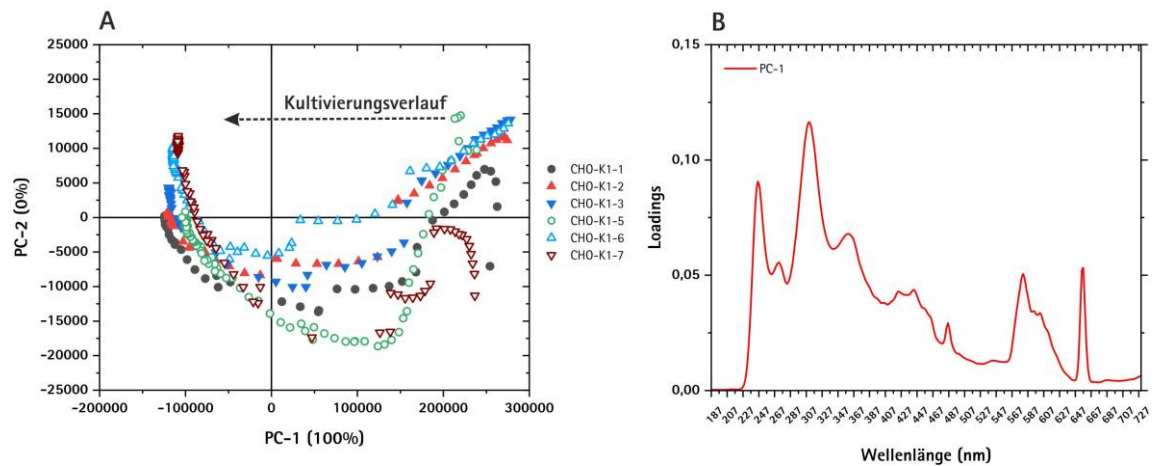


Abbildung 55: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren ohne Datenvorverarbeitung zu den Zeitpunkten der *offline* Referenzwerte von allen 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (A) und der zugehörigen Loadings (B).

8.2.6.4 Quantitative Untersuchung der Raman-Spektren

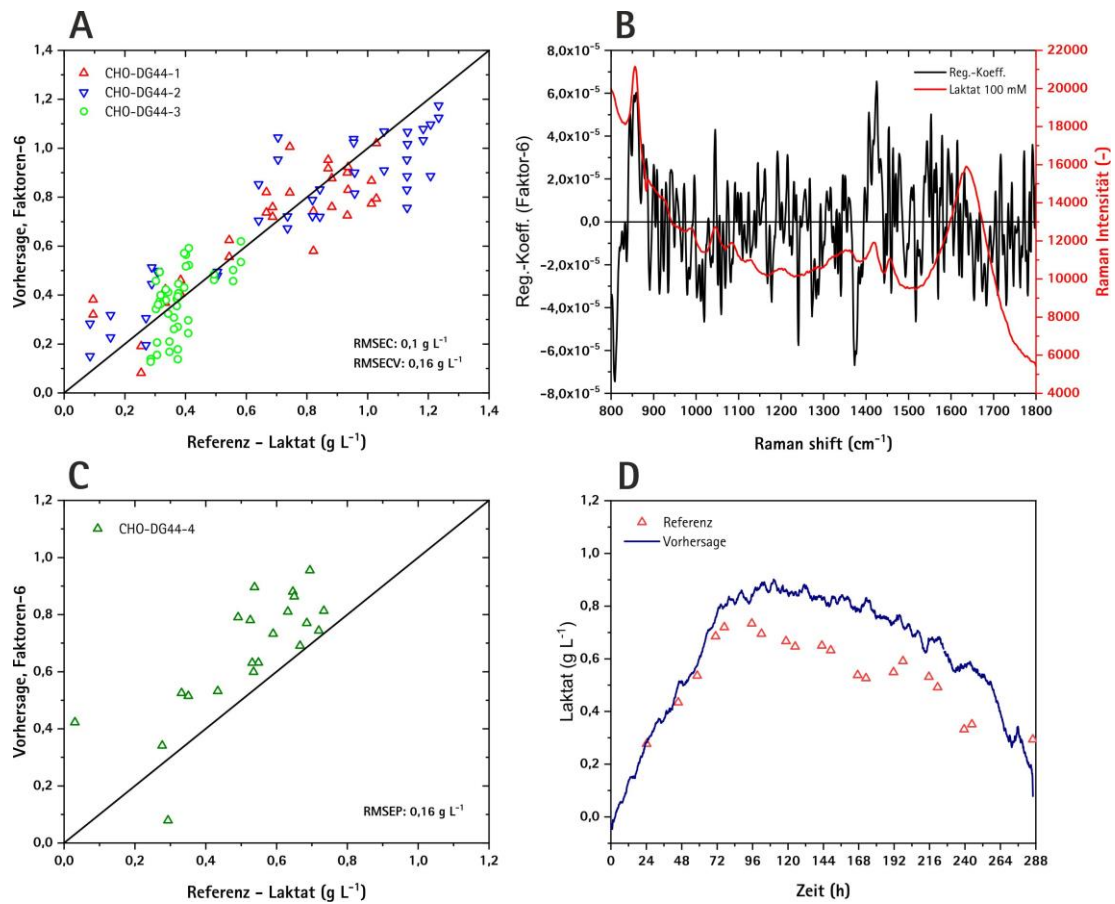


Abbildung 56: Raman Ergebnisse für die Laktat-Konzentration; Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Laktat-Konzentration gegen die *offline* Referenzen für CHO-DG44-4 (D).

9 Literaturverzeichnis

1. Lücke J, Bädeker M, Hildinger M (2014) Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2014. Bost Consult Gr 61
2. Chmiel H (Hrsg.), Briechele S u. . (2014) Bioprozesstechnik 3.Auflage
3. Puck TT (1958) Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med.* doi: 10.1084/jem.108.6.945
4. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* doi: 10.1038/256495a0
5. Jackson DA, Symons RH, Berg P (1972) Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci.* doi: 10.1073/pnas.69.10.2904
6. Kim JY, Kim YG, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:917–930 . doi: 10.1007/s00253-011-3758-5
7. Kantardjieff A, Zhou W (2014) Mammalian cell cultures for biologics manufacturing. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* doi: 10.1007/10_2013_255
8. Reinhart D, Damjanovic L, Kaisermayer C, Kunert R (2015) Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-015-6514-4
9. Bielser JM, Wolf M, Souquet J, Broly H, Morbidelli M (2018) Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. *Biotechnol. Adv.*
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2013) *Biochemie*
11. Märkl IH (1994) Animal cell culture technology. *J. Biotechnol.*
12. Warburg O (1956) On Origin of Cancer Cells. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.123.3191.309
13. Hu W-S, Zhou W, Seth G, Ozturk S, Zhang C (2012) *Cell Culture Bioprocess Engineering*
14. Martínez VS, Dietmair S, Quek LE, Hodson MP, Gray P, Nielsen LK (2013) Flux balance

- analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnol Bioeng*. doi: 10.1002/bit.24728
15. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol*. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62312-8
 16. Singh RP, Al-Rubeai M, Gregory CD, Emery AN (1994) Cell death in bioreactors: A role for apoptosis. *Biotechnol Bioeng*. doi: 10.1002/bit.260440608
 17. Darzynkiewicz Z, Traganos F (1998) Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. doi: 10.1007/BFb0102305
 18. Cotter TG, Al-Rubeai M (1995) Cell death (apoptosis) in cell culture systems. *Trends Biotechnol*. doi: 10.1016/S0167-7799(00)88926-X
 19. Goswami J, Sinsky AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DIC (1999) Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<632::AID-BIT2>3.0.CO;2-I
 20. Krampe B, Al-Rubeai M (2010) Cell death in mammalian cell culture: Molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*
 21. Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.*
 22. Bluma A, Höpfner T, Lindner P, Rehbock C, Beutel S, Riechers D, Hitzmann B, Scheper T (2010) In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: State of the art. *Anal. Bioanal. Chem.*
 23. Biechele P, Busse C, Solle D, Scheper T, Reardon K (2015) Sensor systems for bioprocess monitoring. *Eng Life Sci* 15:469–488 . doi: 10.1002/elsc.201500014
 24. Scheper T (1991) *Bioanalytik: Messung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren*
 25. Claßen J, Aupert F, Reardon KF, Solle D, Scheper T (2016) Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Anal Bioanal Chem*. doi: 10.1007/s00216-016-0068-x
 26. FDA USD of H and HS (2004) *Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. 16
 27. Ich (2009) *Pharmaceutical Development Q8. ICH Harmon Tripart Guidel*
 28. U. S. Food and Drug Administration/Center for Biologics Evaluation and Research (2006) *Guidance for Industry. Q9 Quality Risk Management*. Food Drug Adm

29. International Conference on Harmonisation (ICH) Expert Working Group (2008) Pharmaceutical Quality System Q10. Int Conf Harmon Tech Requirments Regist Pharm Hum Use. doi: EMEA/CHMP/ICH/214732/2007
30. Schmidt W Werner Schmidt Optische Spektroskopie
31. Lourenço ND, Lopes JA, Almeida CF, Sarraguça MC, Pinheiro HM (2012) Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: A review. Anal Bioanal Chem 404:1211–1237 . doi: 10.1007/s00216-012-6073-9
32. Sandor M, Rüdinger F, Bienert R, Grimm C, Solle D, Scheper T (2013) Comparative study of non-invasive monitoring via infrared spectroscopy for mammalian cell cultivations. J Biotechnol 168:636–645 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.002
33. Hesse M, Meier H, Zeeh B (2005) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
34. Kessler RW (2006) Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis. In: Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis. pp 3–10
35. Schmid F (2001) Biological Macromolecules : UV-visible Spectrophotometry. Encycl Life Sci 1–4 . doi: 10.1038/npg.els.0003142/abstrac
36. Illarionova EA, Illarionov AI, Nikonovich OL (2017) UV absorption spectra and the physical nature of the optical properties of pyridoxine hydrochloride. Bull Russ Acad Sci Phys 81:1269–1272 . doi: 10.3103/S1062873817100136
37. Faassen SM, Hitzmann B (2015) Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. Sensors (Switzerland) 15:10271–10291 . doi: 10.3390/s150510271
38. Valeur B (2001) Molecular Fluorescence Principles and Applications
39. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E (1996) QUANTITATIVE OPTICAL SPECTROSCOPY FOR TISSUE DIAGNOSIS. Annu Rev Phys Chem. doi: 10.1146/annurev.physchem.47.1.555
40. Bottirolì G, Croce a C, Locatelli D, Marchesini R, Pignoli E, Tomatis S, Cuzzoni C, Di Palma S, Dalfante M, Spinelli P (1995) Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive "ex vivo" study. Lasers Surg Med
41. Faassen SM, Hitzmann B (2015) Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling

- for bioprocess monitoring. *Sensors* (Switzerland)
42. Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy
 43. Stärk E, Hitzmann B, Schügerl K, Scheper T, Fuchs C, Köster D, Märkl H (2002) In-situ-fluorescence-probes: a useful tool for non-invasive bioprocess monitoring. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74:21–38 . doi: 10.1007/3-540-45736-4_2
 44. Menzies AC (1930) The Raman effect. *Nature*. doi: 10.1038/125205a0
 45. Ozaki Y, Šašić S (2007) Introduction to Raman Spectroscopy. *Pharm. Appl. Raman Spectrosc.*
 46. Solle D, Hitzmann B, Herwig C, Pereira Remelhe M, Ulonska S, Wuerth L, Prata A, Steckenreiter T (2017) Between the Poles of Data-Driven and Mechanistic Modeling for Process Operation. *Chemie-Ingenieur-Technik*
 47. Kessler RW (2006) Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis
 48. Kessler W (2013) Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik
 49. Braun F, Schalk R, Brunner J, Eckhardt HS, Theuer M, Veith U, Hennig S, Ferstl W, Methner FJ, Beuermann T, Gretz N, Rädle M (2016) Nicht-invasive Prozesssonde zur Inline-Ramananalyse durch optische Schaugläser. *Tech Mess*. doi: 10.1515/teme-2016-0011
 50. Rao G, Moreira A, Brorson K (2009) Disposable bioprocessing: The future has arrived. *Biotechnol Bioeng* 102:348–356 . doi: 10.1002/bit.22192
 51. Lücking TH (2015) Entwicklung einer universellen Bypass- Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen
 52. Fda (2004) Sterile Drug Products Current Good Manufacturing Practice Guidance for Industry. *Filtration* 1–63
 53. Hühner J, Ingles-Prieto Á, Neusüß C, Lämmerhofer M, Janovjak H (2015) Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in mammalian model cells by CE with LED-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. doi: 10.1002/elps.201400451
 54. Ghorbaniaghdam A, Henry O, Jolicoeur M (2013) A kinetic-metabolic model based on cell energetic state: Study of CHO cell behavior under Na-butyrate stimulation.

- Bioprocess Biosyst Eng. doi: 10.1007/s00449-012-0804-3
55. Siegel JM, Montgomery GA, Bock RM (1959) Ultraviolet absorption spectra of DPN and analogs of DPN. Arch Biochem Biophys. doi: 10.1016/0003-9861(59)90124-9
 56. Vasko PD, Blackwell J, Koenig JL (1972) Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. Carbohydr Res. doi: 10.1016/S0008-6215(00)82690-7
 57. André S, Lagresle S, Hannas Z, Calvosa É, Duponchel L (2017) Mammalian cell culture monitoring using *in situ* spectroscopy: Is your method really optimised? Biotechnol Prog. doi: 10.1002/btpr.2430
 58. Cassanas G, Morssli M, Fabrègue E, Bardet L (1991) Vibrational spectra of lactic acid and lactates. J Raman Spectrosc. doi: 10.1002/jrs.1250220709
 59. Stewart S, Fredericks PM (1999) Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. doi: 10.1016/S1386-1425(98)00294-7
 60. Wen ZQ (2007) Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. J. Pharm. Sci.
 61. Ettah I, Ashton L (2018) Engaging with Raman Spectroscopy to Investigate Antibody Aggregation. Antibodies. doi: 10.3390/antib7030024
 62. Zagari F, Jordan M, Stettler M, Broly H, Wurm FM (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity. N Biotechnol 30:238–245 . doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.021
 63. Teixeira AP, Portugal CAM, Carinhas N, Dias JML, Crespo JP, Alves PM, Carrondo MJT, Oliveira R (2009) In situ 2D fluorometry and chemometric monitoring of mammalian cell cultures. Biotechnol Bioeng 102:1098–1106 . doi: 10.1002/bit.22125
 64. Callis PR, Liu T (2004) Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Yields for Tryptophan in Proteins. J Phys Chem B 108:4248–4259 . doi: 10.1021/jp0310551
 65. Teixeira AP, Oliveira R, Alves PM, Carrondo MJT (2009) Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. Biotechnol Adv 27:726–732 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.003
 66. Heikal AA (2010) Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. Biomark Med 4:241–263 . doi: 10.2217/bmm.10.1
 67. BESSEY OA, LOWRY OH, LOVE RH (1949) The fluorometric measurement of the

- nucleotides of riboflavin and their. *J Biol Chem* 180:755–769
68. Marose S, Lindemann C, Scheper T (1998) Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy : A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring. 1957:
69. Lao M, Toth D (1997) Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a recombinant chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Prog* 13:688–691
70. Schwab K, Amann T, Schmid J, Handrick R, Hesse F (2016) Exploring the capabilities of fluorometric online monitoring on chinese hamster ovary cell cultivations producing a monoclonal antibody. *Biotechnol Prog* 32:1592–1600 . doi: 10.1002/btpr.2326
71. de Marcos S, Galbán J, Alonsa C, Castillo JR (1997) Intrinsic molecular fluorescence of lactate dehydrogenase: an analytical alternative for enzymic determination of pyruvate. *Analyst* 122:355–9 . doi: 10.1039/a606508b
72. Pan X, Dalm C, Wijffels RH, Martens DE (2017) Metabolic characterization of a CHO cell size increase phase in fed-batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:8101–8113 . doi: 10.1007/s00253-017-8531-y
73. Mulvey CS (2011) Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 2: early spectral changes during apoptosis are linked to apoptotic volume decrease. *J Biomed Opt.* doi: 10.1117/1.3644911
74. Butler M (2005) Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:283–291 . doi: 10.1007/s00253-005-1980-8
75. Han YK, Kim Y-G, Kim JY, Lee GM (2010) Hyperosmotic stress induces autophagy and apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Bioeng* 105:n/a-n/a . doi: 10.1002/bit.22643
76. Kim JY, Kim YG, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:917–930 . doi: 10.1007/s00253-011-3758-5
77. Han YK, Ha TK, Lee SJ, Lee JS, Lee GM (2011) Autophagy and apoptosis of recombinant Chinese hamster ovary cells during fed-batch culture: Effect of nutrient supplementation. *Biotechnol Bioeng* 108:2182–2192 . doi: 10.1002/bit.23165
78. Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman a (1994) The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ*

- 5:983–93
79. Siddik ZH (2003) Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265–7279 . doi: 10.1038/sj.onc.1206933
 80. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31:1869–1883 . doi: 10.1038/onc.2011.384
 81. Coon EA, Benarroch EE (2018) DNA damage response. *Neurology* 10.1212/WNL.0000000000004989 . doi: 10.1212/WNL.0000000000004989
 82. Mariño G, Kroemer G (2013) Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res.*
 83. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers M (1994) Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood.* doi: ISSN 0257-7712
 84. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM (1998) Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*
 85. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997) Bcl-x(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* doi: 10.1016/S0092-8674(00)80450-X
 86. Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*
 87. Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.*
 88. Mulvey CS, Sherwood CA, Bigio IJ (2009) Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative real-time monitoring of apoptosis in living cells. *J Biomed Opt.* doi: 10.1117/1.3259363
 89. Farhat G, Mariampillai A, Yang VXD, Czarnota GJ, Kolios MC (2011) Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* doi: 10.1117/1.3600770
 90. Gendron MC, Schrantz N, Métivier D, Kroemer G, Maciorowska Z, Sureau F, Koester S, Petit PX (2001) Oxidation of pyridine nucleotides during Fas- and ceramide-induced

- apoptosis in Jurkat cells: correlation with changes in mitochondria, glutathione depletion, intracellular acidification and caspase 3 activation. *Biochem J.* doi: 10.1042/0264-6021:3530357
91. Stryer L (2010) *Stryer Biochemistry*
 92. Whelan J, Craven S, Glennon B (2012) In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors. *Biotechnol Prog* 28:1355–1362 . doi: 10.1002/btpr.1590
 93. Berry B, Moretto J, Matthews T, Smelko J, Wiltberger K (2015) Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biotechnol Prog* 31:566–577 . doi: 10.1002/btpr.2035
 94. Huang J, Romero-Torres S, Moshgbar M (2010) Practical considerations in data pre-treatment for NIR and Raman spectroscopy. *Am. Pharm. Rev.*
 95. Bocklitz T, Walter A, Hartmann K, Rösch P, Popp J (2011) How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? *Anal Chim Acta.* doi: 10.1016/j.aca.2011.06.043
 96. He S, Zhang W, Liu L, Huang Y, He J, Xie W, Wu P, Du C (2014) Baseline correction for Raman spectra using an improved asymmetric least squares method. *Anal Methods.* doi: 10.1039/c4ay00068d
 97. Abu-Absi NR, Kenty BM, Cuellar ME, Borys MC, Sakhamuri S, Strachan DJ, Hausladen MC, Li ZJ (2011) Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe. *Biotechnol Bioeng* 108:1215–1221 . doi: 10.1002/bit.23023
 98. Eilers PHC, Boelens HFM (2005) Baseline Correction with Asymmetric Least Squares Smoothing. Tech Report, Leiden Univ Med Centre, Netherlands. doi: 10.1021/ac034173t
 99. Rowland-Jones RC, van den Berg F, Racher AJ, Martin EB, Jaques C (2017) Comparison of spectroscopy technologies for improved monitoring of cell culture processes in miniature bioreactors. *Biotechnol Prog.* doi: 10.1002/btpr.2459
 100. Matthews TE, Smelko JP, Berry B, Romero-Torres S, Hill D, Kshirsagar R, Wiltberger K (2018) Glucose Monitoring and Adaptive Feeding of Mammalian Cell Culture in the Presence of Strong Autofluorescence by near Infrared Raman Spectroscopy.

Biotechnol. Prog.

101. Rüdert M, Briskot T, Hubbuch J (2017) Advances in downstream processing of biologics – Spectroscopy: An emerging process analytical technology. *J. Chromatogr. A*
102. Thomsen V, Schatzlein D, Mercurio D, K (2003) Limits of Detection in Spectroscopy. *Pure Appl Chem* 18:112–114 . doi: Article

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der zentralen Stoffwechselwege von tierischen Zellen	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Charakteristika der Zellen bei der Nekrose und Apoptose.....	8
Abbildung 3: Taxonomie von Prozesssensoren: <i>Inline</i> , <i>atline</i> und <i>offline</i>	10
Abbildung 4: Übersicht von Wellenlängenbereichen für die spektroskopische Bioprozessüberwachung.....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Wechselwirkungen zwischen Licht mit Molekülen, Flüssigkeiten und Festkörpern in einer Probe.	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung der elektronischen Anregung eines Moleküls in der UV/VIS-Spektroskopie.....	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung der elektronischen Zustände von Elektronen.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Raman-Effekts.	21
Abbildung 9: Schematische Übersicht der multivariaten Datenanalyse (MVDA).....	22
Abbildung 10: Schematische Darstellung der PLS und der jeweiligen Matrizen.....	24
Abbildung 11: Verwendetes UV/VIS-Prozessspektrometer mit angeschlossener Transmissionssonde (A) und einem Blick in das Innere des Spektrometers (B).....	28
Abbildung 12: Verwendetes 2D-Fluoreszenzspektrometer mit über einen Lichtleiter angeschlossener Prozesssonde (A) und einem Blick in das Innere des Spektrometers (B).....	29
Abbildung 13: Berührungslose Raman-Prozesssonde angeschlossen an einen 2 L Bioreaktor.	31
Abbildung 14: Edelstahl Bypass-Messkammern für die UV/VIS- (links), 2D-Fluoreszenz- (Mitte) und Raman-Spektroskopie (rechts).....	32
Abbildung 15: Schematische Darstellung des SIP-Bypass-Systems mit adaptierter Prozesssonde im Sterilisationsbetrieb (A) und im Kultivierungsbetrieb (B).....	35
Abbildung 16: Skalierbarkeit der SIP-Bypass-Kammer: 2D-Fluoreszenz PCA-Scores der Spektren für zwei Kultivierungen im 10 L (K1, K2) und zwei Kultivierungen im 2 L Bioreaktor (K3, K4).....	36

Abbildung 17: BSA-Referenz gegen PLS-Vorhersage für 2D-Fluoreszenz (A) und UV/VIS (C); Vergleich zwischen dem PLS-Regressionskoeffizient und dem Reinstspektrum von BSA für 2D-Fluoreszenz (B) und UV/VIS (D).....	39
Abbildung 18: 2D-Fluoreszenz; Referenz gegen PLS-Vorhersage jeweils für Riboflavin (A) bzw. NADH (C); Vergleich der PLS-Regressionskoeffizient mit dem Reinstspektrum von Riboflavin (B) bzw. NADH (D).	41
Abbildung 19: UV/VIS; Referenz gegen PLS-Vorhersage jeweils für BSA (A) bzw. DNA (C); Vergleich jeweils zwischen dem PLS-Regressionskoeffizient und dem Reinstspektrum von BSA (B) bzw. DNA (D).	43
Abbildung 20: Raman-Spektren der 100 mM Reinstlösungen von Glukose (A), Laktat (B), Glutamin (C) und Glutamat (D).	45
Abbildung 21: Glukose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS- Regressionskoeffizienten und Glukose-Referenzspektrum (B).....	48
Abbildung 22: Laktat – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS- Regressionskoeffizienten und Laktat-Referenzspektrum (B).....	49
Abbildung 23: BSA – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS- Regressionskoeffizienten und BSA-Referenzspektrum (B).....	50
Abbildung 24: Typischer CHO-K1 Kultivierungsverlauf eines <i>Fed-Batch</i> -Prozesses der <i>offline</i> Prozessvariablen Gesamt (GZK)- und Lebendzellkonzentration (LZK), Viabilität (A), Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentration (B).....	52
Abbildung 25: <i>Offline</i> Referenzmessungen von sechs CHO-K1 Zellkultivierungen. Gesamtzellkonzentration (GZK) (A), Lebendzellkonzentration (LZK) (B), Viabilität (C), Laktatkonzentration (D).....	54
Abbildung 26: Typischer Verlauf der 2D-Fluoreszenzemissionspektren für die Exzitationswellenlängen von 280 (links), 365 (Mitte) und 455 nm (rechts) während einer CHO-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.	56
Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der normalisierten rel. Fluoreszenzintensität (RFI) der NADH- Wellenlängenregion ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 365/437$) und die Gelöst-Sauerstoffkonzentration in der Kultivierung CHO-K1-5.....	57
Abbildung 28: PCA-Scores der 2D-Fluoreszenzspektren zu den Zeitpunkten der <i>offline</i> Referenzwerte von 6 verschiedenen 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen. A: PC-2 gegen PC-1, C:	

PC-3 gegen PC-1, B: Verlauf der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) der Wellenlängenregion für NADH, der Rayleigh-Streuung und der <i>offline</i> Werte für Laktat, TZK und LZK, D: Verlauf von der RFI für Riboflavin, Tyrosin, Tryptophan, Pyridoxin und der <i>offline</i> Werte für Laktat und der Viabilität. Die vertikale gestrichelte Linie bei 110 h markiert das Minimum der <i>Score</i> -Werte in der zweiten PC.	59
Abbildung 29: Prozesstrajektorien anhand der 2D-Fluoreszenzspektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrolllimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung mit Sauerstofflimitierung (CHO-K1-5) und kontaminierte Kultivierung außerhalb der Kontrolllimits (unten).....	63
Abbildung 30: Typischer Verlauf der UV/VIS-Spektren anhand der Signalintensität in <i>Counts</i> (A) und die Umrechnung in die rel. Absorption (rel. AU) (B) während einer CHO-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.....	64
Abbildung 31: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren zu den Zeitpunkten der <i>offline</i> Referenzwerte von sechs 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (A) und der zugehörigen <i>Loadings</i> (B).....	65
Abbildung 32: Prozesstrajektorien anhand der UV/VIS-Spektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrolllimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung mit Sauerstofflimitierung (CHO-K1-5) und kontaminierte Kultivierung außerhalb der Kontrolllimits (unten).....	67
Abbildung 33: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Gesamtzellkonzentration (GZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der GZK gegen die <i>offline</i> Referenzwerte für CHO-K1-3 (D).....	69
Abbildung 34: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Lebendzellkonzentration (LZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der LZK gegen die <i>offline</i> Referenzwerte für CHO-K1-3 (D).....	72
Abbildung 35: 2D-Fluoreszenz Ergebnisse für die Viabilität; Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Viabilitäten gegen die <i>offline</i> Referenzen für CHO-K1-3 (D).....	73
Abbildung 36: UV/VIS Ergebnisse für die Gesamtzellkonzentration (GZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der GZK gegen die <i>offline</i> Referenzen für CHO-K1-3 (D).....	75

Abbildung 37: UV/VIS Ergebnisse für die Lebendzellkonzentration (LZK); Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der LZK gegen die <i>offline</i> Referenzen für CHO-K1-3 (D).....	77
Abbildung 38: Ergebnis der Durchflusszytometrie mit APC-Annexin-V Färbung und Propidiumiodid Färbung von CHO-K1-Zellen nach Cisplatin-Induktion (70 μ M). Jeder Punkt steht für eine detektierte Zelle. A: Direkt nach Cisplatin-Induktion (96% Viable Zellen, 0,7% Apoptotische Zellen, 3,3% Nekrotische Zellen); B: 24 h nach Cisplatin-Induktion (61% Viable Zellen, 23% Apoptotische Zellen, 16% Nekrotische Zellen); C: 46 h nach Induktion (28% Viable Zellen, 17% Apoptotische Zellen, 55% Nekrotische Zellen).	80
Abbildung 39: Verlauf einer CHO-K1 Kultivierung mit Cisplatin-Induktion (70 μ M) nach 95 h.	81
Abbildung 40: PCA-Scores der 2D-Fluoreszenzspektren von zwei CHO-K1 Kultivierungen im 2 L Bioreaktor mit Induktion des Zelltods durch Cisplatin. A: PC-3 gegen PC-1, B: Verlauf der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) der Wellenlängenregion für NADH, der Rayleigh-Streuung, Tryptophan und der <i>offline</i> Werte aus den Durchflusszytometrie-Analysen von CHO-K1-A1. Die rote gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt des Wendepunktes nach Cisplatin-Induktion in PC-3.....	82
Abbildung 41: Morphologische Veränderungen der CHO-Zellen durch Cisplatin-Induktion. A: Runde viable Zellen, direkt nach Cisplatin-Induktion; B: Apoptotische Zelle 24 h nach Induktion; C: Nekrotische Zelle mit 46 h nach Induktion; D-F: Durchflusszytometrisch erfasste Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) zu denselben Zeitpunkten; G: Histogramme der Größenverteilung (FSC) zu denselben Zeitpunkten.....	83
Abbildung 42: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren von zwei CHO-K1 Kultivierungen im 2 L Bioreaktor mit Induktion des Zelltods durch Cisplatin (A), <i>Loading</i> -Werte von PC-1 und PC-2 (B).....	85
Abbildung 43: Typischer CHO-DG44 Kultivierungsverlauf eines <i>Fed-Batch</i> -Prozesses der <i>offline</i> Prozessvariablen Gesamt (GZK)- und Lebendzellkonzentration (LZK), Viabilität, Glukose-, Laktat-, Glutamin-, Glutamat-, IgG-Konzentration.....	88
Abbildung 44: Typischer Verlauf der Raman-Spektren während einer CHO-DG44-Zellkultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an.....	90

Abbildung 45: Prozesstrajektorien der Raman-Spektren: Optimale Verläufe dreier Kultivierungen mit dem „Goldenen Batch“ und Kontrollimits (\pm Standardabweichung) (oben); Kultivierung CHO-DG44-1 teilweise außerhalb der Kontrollimits (unten).....	92
Abbildung 46: Verlauf der ALS-transformierten Raman-Spektren einer CHO-DG44 Kultivierung. Der Farbgradient von blau bis rot gibt die Prozesszeit an (A). PCA-Scores der ALS-bearbeiteten Raman-Spektren zu den Zeitpunkten der <i>offline</i> Referenzwerte von allen 2 L CHO-DG44 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (B).....	94
Abbildung 47: PLS Regression der Glukose-Konzentration; Kreuzvalidierung (A); Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Glukose-Konzentration gegen die <i>offline</i> Referenzen für CHO-DG44-4 (D).....	95
Abbildung 48: Verschiedene Integrationszeiten des Raman-Spektrometers zu Beginn der Kultivierung (A) und am Ende der Kultivierung (B).....	97
Abbildung 49: Versuchsaufbau der 10 L Reaktorkultivierungen.....	107
Abbildung 50: Sterilisation des SIP-Bypass-Systems. A: Membranventile werden mit angeschlossenen Silikonschläuchen und Sterilfilter autoklaviert. Membranventil 2 ist dabei geschlossen und Membranventil 1 geöffnet, damit Heizedampf die Strecke bis zum Sterilfilter sterilisieren kann B: Nach dem Autoklavieren werden die Membranventile 1 geschlossen, der Sterilfilter entfernt und die Messkammer zwischen die beiden Membranventile installiert. Die Membranventile 2 werden geöffnet, an Heizedampf angeschlossen und 25 min durchströmt. Anschließend werden die Membranventile 2 wieder geschlossen. C: Die nach dem Autoklavieren geschlossenen Ventile 2 werden wieder geöffnet und die Zellsuspension kann durch das sterile Bypass-System gefördert werden.....	113
Abbildung 51: Technische Zeichnung der Messkammer für die 2D-Fluoreszenz-Sonde.....	114
Abbildung 52: Technische Zeichnung der Messkammer für die UV/VIS-Sonde.....	114
Abbildung 53: Technische Zeichnung der Messkammer für die Raman-Sonde.....	115
Abbildung 54: <i>Loadings</i> der 2D-Fluoreszenzspektren von PC-1 (91% Erklärungsanteil), PC-2 (7% Erklärungsanteil) und PC-3 (1% Erklärungsanteil).....	122
Abbildung 55: PCA-Scores der UV/VIS-Spektren ohne Datenvorverarbeitung zu den Zeitpunkten der <i>offline</i> Referenzwerte von allen 10 L CHO-K1 Zellkultivierungen mit PC-2 gegen PC-1 (A) und der zugehörigen <i>Loadings</i> (B).....	122

Abbildung 56: Raman Ergebnisse für die Laktat-Konzentration; Kreuzvalidierung (A);
Regressionskoeffizienten (B); externe Validierung (C); Vorhersage der Laktat-Konzentration
gegen die *offline* Referenzen für CHO-DG44-4 (D)..... 123

11 Unterstützende Arbeiten

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

Bachelorarbeit

Jonathan Nyenhuis: Evaluierung der Raman-Spektroskopie zur Überwachung von CHO-Zellkultivierungen. Mai – Juni 2018. Teilergebnisse sind in Kapitel 4.26 und 6 verwendet worden.

12 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Fachartikel (peer reviewed)

J. Classen, F. Aupert, KF. Reardon, D. Solle, T. Scheper, Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016

J. Classen, A. Graf, F. Aupert, D. Solle, M. Hoehse, T. Scheper, A novel LED-based 2D-Fluorescence spectroscopy system for in-line bioprocess monitoring of chinese hamster ovary cell cultivations – Part II, *Engineering in Life Sciences*, 2019

A. Graf, J. Classen, D. Solle, B. Hitzmann, K. Rebner, M. Hoehse, A novel LED-based 2D-Fluorescence spectroscopy system for in-line bioprocess monitoring of chinese hamster ovary cell cultivations – Part I, *Engineering in Life Sciences*, 2019

Vorträge

J. Classen, F. Aupert, D. Solle, T. Scheper, 2D-Fluorescence and UV/VIS spectroscopy for in-line bioprocess monitoring of CHO cell cultivations, *Analytica*, München, 2018

J. Classen, F. Aupert, D. Solle, T. Scheper, 2D-Fluorescence and UV/VIS spectroscopy for in-line bioprocess monitoring of CHO cell cultivations, 12. *Interdisziplinäres Doktorandenseminar Arbeitskreis Prozessanalytik*, Berlin, 2018

Posterbeiträge

J. Classen, D. Solle, T. Scheper, Multimodal spectroscopic bioprocess monitoring for in-line detection of CHO cell viability, *Herbstkolloquium Arbeitskreis Prozessanalytik*, Hannover, 2018

J. Classen, C. Lux, S. Deder, H.S. Eckhardt, D. Solle, T. Scheper, Non-contact raman spectroscopy for bioprocess monitoring of CHO cell cultivations, *Herbstkolloquium Arbeitskreis Prozessanalytik*, Hannover, 2018

J. Classen, D. Solle, T. Scheper, Multimodal spectroscopic bioprocess monitoring for in-line detection of CHO cell viability, *Dechema Himmelfahrtstagung*, Ulm, 2017

J. Classen, D. Solle, T. Scheper, Spektroskopische Bioprozessüberwachung von CHO-Zellkultivierungen, *ProcessNet*, Aachen, 2016

J. Classen, S. Lu, M. Sandor, D. Solle, T. Scheper, Spectroscopic bioprocess monitoring and control of CHO cell cultivations, 4th *BioProScale Symposium*, Berlin, 2016

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jens Lukas Claßen
Geburtstag und -ort: 13.09.1988 in Mönchengladbach, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische und schulische Ausbildung

10/2015 – 11/2018 Leibniz Universität Hannover, Promotion in Technischer Chemie
Hannover, Deutschland
04/2013 – 08/2015 Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Master of
Science (RWTH) in Molekulare u. Angewandte Biotechnologie
Aachen, Deutschland
10/2009 – 04/2013 Fachhochschule Aachen, Bachelor of Science in Biotechnologie
Jülich, Deutschland
1998 – 2008 Gymnasium Jüchen, Allgemeine Hochschulreife
Jüchen, Deutschland