

**Entwicklung eines automatisierten, Mikrotiterplatten basierten
Systems für die Suspensions-Zellkultur zur Effizienzsteigerung
der Prozessentwicklung im pharmazeutisch industriellen Umfeld**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biotech. Sven Markert

geboren am 17.07.1982 in Hildesheim

2012

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 08. Oktober 2012

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Entwicklung eines automatisierten, Mikrotiterplatten basierten Systems für die
Suspensions-Zellkultur zur Effizienzsteigerung der Prozessentwicklung im
pharmazeutisch industriellen Umfeld“**

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Master-, Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Oktober 2012

Sven Markert

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheper für die Übernahme der Betreuung meines Promotionsprojektes, die Freiheit bei der Ausgestaltung des Themas sowie die konstruktiven Vorschläge und Anregungen.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich sehr für die unkomplizierte Übernahme des Korreferats trotz der weiten Anreise aus Hohenheim. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Jürgen Alves für die Übernahme des Drittprüfer-Amtes und Prof. Dr. Ursula Rinas für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Dr. Klaus Joeris möchte ich mich ganz herzlich für die Initiierung des Robotik-Projektes und dieses hoch spannende Thema bedanken. Mit seiner Kreativität, seinen Ideen, Ratschlägen und die zahlreichen wertvollen Diskussionen hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Roche Diagnostics GmbH: Sylvia Baumann und Caroline Schuster (Robotik-Gruppe), Angelika Strauch und Markus Habegger (Hochdurchsatz-Analytik), der gesamten Labormannschaft, dem non-GMP-Technikumsbetrieb und dem GMP-Fermentationsbetrieb. Vielen Dank auch für das großartige Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre in und außerhalb der Firma.

Allen Studenten danke ich, die durch Diplom- oder Masterarbeiten einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben: Richard Wetzel, Katrin Möser, Pawel Linke, Swetlana Spielmann und Carsten Musmann.

Vielen Dank an die Feinmechanik- und Elektronik-Werkstatt des TCI Hannover für die super Unterstützung: Friedbert Gellermann, Thorsten Stempel, Thorleif Hentrop sowie Dr. Patrick Lindner für die Hilfe bei allen Fragestellungen rund um die Bildverarbeitung.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich stets auf meinem Lebensweg unterstützt haben und ohne deren Hilfe ich heute nicht da stünde, wo ich jetzt bin.

Herzlicher Dank gebührt auch meiner Freundin Agathe für ihre unermessliche Geduld und die Unterstützung in jeder Situation.

Zusammenfassung

Schlagworte: Automatisierung, Zellkultur, Mikrotiterplatte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein neuartiges Konzept für ein vollständig automatisiertes System für die Suspensions-Zellkultur auf Basis geschüttelter Mikrotiterplatten mit integrierter prozessbegleitender Analytik entwickelt und realisiert werden. Neben dem Aufbau der Anlage war die Etablierung des geschüttelten Mikrotiterplattenformates sowie der Nachweis der Skalierbarkeit zu Bioreaktoren erforderlich um Ergebnisse schnell und effizient transferieren zu können.

Zur Umsetzung des erarbeiteten Automatisierungskonzeptes wurde zunächst die Machbarkeit wesentlicher Aspekte, wie der automatisierten Kulturführung in der geschüttelten Mikrotiterplatte, mit einem teilautomatisierten Testsystem (*Proof of Concept System*) gezeigt. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte anschließend ein vollständig automatisiertes System mit integrierter Analytik und gesteigertem Durchsatz entwickelt werden (Produktivsystem). Als zentrale Komponenten des finalen Systems wurden folgende Komponenten ausgewählt: Ein automatisierter Inkubator mit Orbitalschüttler basierend auf *Computational Fluid Dynamics* (CFD) -Simulationen und ein Plattentransportroboter zur Gewährleistung einer hohen Flexibilität und Modularität. Bei einer Kapazität von bis zu 384 Parallelkultivierungen können die zentralen Kultivierungsparameter mit den integrierten analytischen Methoden vollständig automatisiert untersucht werden. Bei der Etablierung der geschüttelten Mikrotiterplatte als Kultursystem wurde die Herausforderung der Verdunstungsminimierung durch Optimierungsarbeiten an dem Inkubator und dem Einsatz eines neu entwickelten Verschlusssystems bewältigt. Mit Hilfe weiterer CFD-Simulationen konnten die Schüttelbedingungen für verschiedene Mikrotiterplattenformate optimiert werden und die Skalierbarkeit zum Bioreaktor hinsichtlich der verfahrenstechnischen Parameter Stoffübergangskoeffizient und Leistungseintrag gezeigt werden.

Mit dem entwickelten finalen System konnten folgende Ergebnisse im Bereich der Fermentationsentwicklung der Roche Diagnostics GmbH erzielt werden:

- Die Vergleichbarkeit eines Fed-Batches im Mikrotiterplattenformat und Bioreaktoren mit einem Volumen von bis zu 1000 L wurde gezeigt und somit die Skalierbarkeit der Prozesse bestätigt.
- Bei der automatisierten Durchführung eines Optimierungsexperimentes im Rahmen der Medienentwicklung konnte die finale Konzentration eines monoklonalen Antikörpers um 22 % gesteigert und die Ergebnisse anschließend in einem Bioreaktorsystem bestätigt werden.
- Im Rahmen eines Klonauswahlprozesses in der Fed-Batch Prozessführung wurde ein automatisiertes Vorgehen mit einem manuellen verglichen. Der beste Klon wurde dabei nur durch den automatisierten Prozess identifiziert bei einer Beschleunigung dieses Prozesses um vier Wochen.

Abstract

Key words: Automation, cell culture, microtiter plate

We developed an automated, multiwell plate based screening system for cell culture processes. The system is setup to be generic and can utilize multiwell plates of different configurations as bioreactors (6 to 48 wells per plate) in shaken mode. The optimization process of the shaking conditions was based on data from Computational Fluid Dynamics simulations. The screening system is based on off-the-shelf commercial laboratory automation equipment. It is fully automated and handles plate transport, feeding and seeding of cells, daily sampling and preparation of metabolite assays. The automated cell culture system has therefore been proven to be a suitable screening tool for process optimization. The integration of all required analytical instrumentation to perform these metabolic assays into the system enables a hands-off operation and renders the system independent from the analytical capabilities available in development thus preventing a potential bottleneck in sample processing. Suitability of the final system for process development was shown in the following test cases:

- The comparability of results obtained with the multiwell plate based system and bioreactors had to be verified. It could be shown that 6 well plates were predictive for a scale up to a 1,000 L stirred tank reactor (scale factor 1:200,000). The parameter profiles of viable cell density, lactate and product concentration were comparable in multiwell plates and bioreactors (2 L, 10 L and 1,000 L).
- An automated media blend screening was carried out to assess another main area of application. Two seed trains of an antibody producing CHO cell line, media blends of two growth media and two feeding strategies were screened in 120 wells on 6 well plates. An increase in viable cell density and product titer of about 22% in comparison to the reference process was achieved. Several 2 L bioreactor runs using these optimized parameters later confirmed these predicted results.
- Clone selection processes are another field of application. The standard manual protocol was compared to an automated protocol using 96 clones. The automated approach screened the clones in duplicates using shaken 24 well plates and fed-batch mode. Key metabolites were measured daily and the glycosylation pattern was analyzed at harvest for all clones. Furthermore a direct relationship between specific productivity and expression level of the heavy chain of the produced antibody using RT-qPCR technology could be detected. All duplicates showed reproducible performance and the overall top producer was initially identified only by the automated process but later confirmed in the manual process. The automation enabled the screening of a larger number of clones using a process very similar to the final manufacturing process while also providing metabolic profiles.

1. Einleitung	1
2. Einordnung des Themas	2
3. Zielsetzung	2
4. Theoretische Grundlagen	3
4.1. Grundlagen des Aufbaus automatisierter Systeme für tierische Zellkulturen	3
4.1.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes für Zellkulturprozesse	3
4.1.2. Wahl eines Kultursystems zur Automatisierung von Zellkulturprozessen	7
4.1.3. Überblick automatisierbarer Kultursysteme	10
4.1.3.1. Mikrotiterplatten	10
4.1.3.2. Schüttelkolben	12
4.1.3.3. TubeSpin Bioreaktoren	12
4.1.3.4. Bioreaktorsysteme.....	13
4.1.3.5. Mikro-Bioreaktoren	14
4.2. Realisierung des Automatisierungskonzeptes	15
4.2.1. Marktüberblick zu automatisierten Zellkultursystemen	16
4.2.1.1. Bioreaktorsysteme.....	18
4.2.1.2. Mikro-Bioreaktoren	19
4.2.1.3. Erlenmeyer-Schüttelkolben	21
4.2.1.4. TubeSpin Bioreaktoren	21
4.2.1.5. Mikrotiterplatten	22
5. Ergebnisse	24
5.1. Aufbau eines automatisierten Zellkultursystems.....	24
5.1.1. <i>Proof of Concept</i> System.....	24
5.1.1.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes	25
5.1.1.2. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten des Zellkulturmoduls	26
5.1.1.2.1. Automatisierter <i>Liquid Handler</i>	26
5.1.1.2.2. Automatisierter Inkubator für Mikrotiterplatten	27
5.1.1.3. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten des Analytikmoduls.....	28
5.1.1.4. Integration der Hardware und Etablieren der Software-Kommunikation	30
5.1.1.5. Systemfunktionsbeschreibung	31
5.1.1.6. Programmierung und Methodenentwicklung	33
5.1.1.7. Zusammenfassung und Diskussion	36
5.1.2. Produktivsystem.....	38
5.1.2.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes	38
5.1.2.2. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten	39
5.1.2.2.1. Kernsystem für Plattentransport und <i>Liquid Handling</i> mit gemeinsamer Steuersoftware	40
5.1.2.2.2. Analytische Instrumentierung.....	41

5.1.2.2.3. Inkubation	42
5.1.2.2.4. Lagersysteme für Verbrauchsmaterialien	42
5.1.2.3. Inbetriebnahme und Vernetzung der Komponenten	43
5.1.2.4. Systemfunktionsbeschreibung	45
5.1.2.5. Programmierung und Methodenentwicklung	47
5.1.2.5.1. Aufbau der Steuersoftware VWorks	47
5.1.2.5.2. Grundlagen der Programmierung und Methodenentwicklung	48
5.1.2.5.3. Entwicklung einer modularen Methode für einen automatisierten Fed-Batch-Prozess	50
5.1.2.6. Zusammenfassung und Diskussion	53
5.2. Geschüttelte Mikrotiterplatten als Kultursystem	55
5.2.1. <i>Computational Fluid Dynamics</i> -Modellierung	55
5.2.1.1. Anpassung der CFD-Modelle	56
5.2.1.1.1. Experimentelle Ermittlung von Oberflächenspannung und statischen Kontaktwinkeln	56
5.2.1.1.2. Einfluss des statischen Kontaktwinkels auf die Fluidbewegung	59
5.2.1.2. Anwendung der CFD-Modelle zur Auswahl des automatisierten Inkubators	60
5.2.1.3. Ermittlung optimaler Füllvolumina und Schüttelfrequenzen für verschiedene Mikrotiterplattenformate	62
5.2.1.4. Zusammenfassung und Diskussion	64
5.2.2. Maßnahmen zur Verdunstungskontrolle in Mikrotiterplatten	67
5.2.2.1. Abhängigkeit der Verdunstung von der Luftfeuchte des Inkubators	67
5.2.2.2. Bewertung kommerzieller Verschlussysteme für Mikrotiterplatten	68
5.2.2.3. Entwicklung eines automatisierbaren Deckels für Mikrotiterplatten	70
5.2.2.4. Optimierung des Inkubators	70
5.2.2.5. Ermittlung der Verdunstung im nicht automatisierten Inkubator	72
5.2.2.6. Ermittlung der Verdunstung im automatisierten Inkubator	74
5.2.2.7. Zusammenfassung und Diskussion	76
5.2.3. Automatisierte CHO-Kultivierung in verschiedenen Mikrotiterplattenformaten	78
5.2.3.1. Batch-Kultivierung in Mikrotiterplatten	78
5.2.3.2. Fed-Batch Kultivierungen in 6 <i>well</i> und 24 <i>deepwell</i> Platten	80
5.2.3.3. Zusammenfassung und Diskussion	83
5.2.3.4. Vergleichbarkeit der Kultursysteme Mikrotiterplatte und Bioreaktor	84
5.2.3.5. Zusammenfassung und Diskussion Bioreaktorvergleich	88
5.3. Hauptanwendungsgebiete des automatisierten Zellkultursystems im industriellen Umfeld ..	89
5.3.1. Automatisiertes Medien- <i>Blending</i> in der Fed-Batch Prozessführung	89
5.3.1.1. Versuchsaufbau	90
5.3.1.2. Identifizierung des optimalen Setup zur Steigerung der Produktkonzentration	91
5.3.1.3. Beschleunigung des Kultivierungsprozesses durch Erhöhung der Startzellichte ..	94
5.3.1.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse von Mikrotiterplatten in den 2 L Bioreaktor	96
5.3.1.5. Zusammenfassung und Diskussion	97

5.3.2. Automatisierter Klonauswahlprozess in der Fed-Batch Prozessführung	99
5.3.2.1. Versuchsaufbau	99
5.3.2.2. Bewertung der Klone und Identifizierung des besten Klons	101
5.3.2.3. Charakterisierung der Produktqualität anhand des Glykanmusters	105
5.3.2.4. Charakterisierung der Produktbildung mittels Polymerasekettenreaktion	106
5.3.2.5. Zusammenfassung und Diskussion	107
6. Ausblick	109
7. Material und Methoden	112
7.1. Das automatisierte Zellkultursystem	112
7.1.1. <i>Proof of Concept</i> System	112
7.1.1.1. Zellkultur-Modul	112
7.1.1.1.1. Pipettierstation X150	113
7.1.1.1.2. Schüttelinkubator STX44-IC SA	115
7.1.1.2. Analytik-Modul	116
7.1.1.2.1. Pipettierstation Biomek [®] NXP	116
7.1.1.2.2. Fluoreszenzmikroskop IMT-2	117
7.1.1.2.3. Mikrotiterplattenleser Sunrise [™]	118
7.1.1.2.4. Mikrotiterplatten-Waschgerät Columbus	118
7.1.1.2.5. Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten Alps300	119
7.1.2. Produktivsystem	119
7.1.2.1. Plattentransportroboter Direct Drive Robot	120
7.1.2.2. Pipettierstation Bravo	121
7.1.2.3. Schüttelinkubator STX44-IC SA	122
7.1.2.4. Inkubator Cytomat [®] 2C	123
7.1.2.5. Mikrotiterplatten-Waschgerät Elx405 [™]	123
7.1.2.6. Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten PlateLoc	123
7.1.2.7. Zentrifuge VSpin	124
7.1.2.8. Mikrotiterplattenleser Sunrise [™]	124
7.1.2.9. Mikrotiterplattenleser Infinite [®] M200 PRO	124
7.1.2.10. Fluoreszenzmikroskop IMT-2	125
7.1.2.11. Fluoreszenzmikroskop Cellavista [®] Analysesystem	125
7.1.2.12. Lagersystem MiniHub	126
7.1.2.13. Edelstahl-Stapel-Systeme	126
7.1.2.14. Cytomat [®] 800 Hotel	126
7.1.2.15. Sonstige Systeme	126
7.1.2.15.1. Sensor Dish [®] Reader	127
7.1.2.15.2. Easy Drop Standard-System (DSA 15)	127
7.1.2.15.2.1. Kontaktwinkel-Messungen	127
7.1.2.15.2.2. Messung der Oberflächenspannung	128
7.2. Entwicklung einer miniaturisierten und automatisierbaren Analytik	129
7.2.1. Fluoreszenzmikroskopie-basierte Methoden	132

7.2.1.1.	Bestimmung von Lebend- und Gesamtzelldichte	132
7.2.1.1.1.	Assayentwicklung zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzelldichte	132
7.2.1.1.2.	Entwicklung eines Pipettierprotokolls zur automatisierten Durchführung	134
7.2.1.1.3.	Bildaufnahme und -verarbeitung am IMT-2-Fluoreszenzmikroskop	136
7.2.1.1.4.	Anpassung des Zelldichteassays an das Cellavista® Analysesystem	136
7.2.1.2.	Proteinbiosynthese	137
7.2.1.3.	Färbung und Detektion von Organellen	138
7.2.1.4.	Färbung und Detektion apoptotischer Zellen	139
7.2.2.	Absorptions-basierte Methoden	139
7.2.2.1.	Enzymatische Metabolitquantifizierung	140
7.2.2.1.1.	Glukose	140
7.2.2.1.2.	Laktat	140
7.2.2.1.3.	Glutamin	140
7.2.2.1.4.	Glutamat	141
7.2.2.1.5.	Ammonium	141
7.2.2.2.	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	141
7.2.2.3.	Turbidimetrischer Immunoassay	143
7.2.3.	Übersicht zur Durchführung der entwickelten Assays	143
7.2.4.	Polymerasekettenreaktion	144
7.2.4.1.	Isolierung von Ribonukleinsäure zur Implementierung in das automatisierte Zellkultursystem	144
7.2.4.2.	Synthese von <i>complementary DNA</i>	145
7.2.4.3.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	146
7.2.5.	Netzwerk zu anderen Hochdurchsatz-Systemen	148
7.2.5.1.	Konzentrationsbestimmung von Antikörpern durch Interferometrie	148
7.2.5.2.	Detektion und Quantifizierung von Glykanstrukturen	149
7.3.	Verwendete Software	150
7.4.	Verwendete Materialien	151
8.	Literaturverzeichnis	152
9.	Abkürzungsverzeichnis	163
10.	Anhang	166
11.	Lebenslauf	179

1. Einleitung

Der zunehmende Erfolg biopharmazeutischer Proteine bei der Humantherapie führte zu einem schnellen Wachstum des Marktes, welches sich in einem kontinuierlichen Anstieg getesteter und zugelassener Medikamente widerspiegelt [1]. Während 34 Pharmazeutika im Jahr 2011 neu zugelassen wurden, waren es im Jahr zuvor nur 21 [2], die Anzahl zugelassener monoklonaler Antikörper betrug im Jahr 2011 für die Europäische Union 30 und für die Vereinigten Staaten 32 [3]. Dabei stieg die Anzahl monoklonaler Antikörper in klinischen Studien von ungefähr 50 in den Jahren 2000 bis 2004 auf beinahe 100 in den Jahren 2005 bis 2009 [3].

Zur biotechnologischen Produktion dieser komplexen Moleküle werden vorwiegend tierische Zellkulturen eingesetzt, die auf Grund intensiver Entwicklungsarbeiten hohe Ausbeuten von bis zu 10 g/L in robusten Prozessen gewährleisten [4]. Während die Produktionsprozesse in Bioreaktoren mit einem Volumen bis zu 25.000 L erfolgen [7], werden in der Prozessentwicklung vorwiegend kostengünstigere, miniaturisierte und parallele Systeme eingesetzt. Die Mikrotiterplatte gewinnt dabei auf Grund ihrer besonderen Eignung für die Automatisierung und dem hohen Maß an Parallelität zunehmend an Bedeutung [5]. Automatisierte Zellkultursysteme auf Basis von statischen Mikrotiterplatten werden derzeit vor allem in frühen Phasen der biopharmazeutischen Prozessentwicklung wie der Zelllinienentwicklung standardmäßig eingesetzt [16-18,20]. Durch die Möglichkeit zur Untersuchung einer größeren Anzahl von Zellklonen in kürzerer Zeit können Engpässe vermieden und die Effizienz gesteigert werden [19]. Aber auch in dem Bereich der Stammzell-Technologie sind automatisierte Systeme weit verbreitet [9-15]. In den späteren Entwicklungsphasen, wie beispielsweise der Kulturmedienentwicklung oder Prozesscharakterisierung, erfolgt hingegen die Prozessentwicklung routinemäßig auf Basis geschüttelter Kultursysteme wie Erlenmeyer-Schüttelkolben in Fed-Batch Experimenten. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Bioreaktormaßstab muss gewährleistet sein, um den Prozesstransfer bis zur Produktion des biopharmazeutischen Proteins zu ermöglichen. Auf Grund des fehlenden Beweises zur Übertragbarkeit von Ergebnissen geschüttelter Mikrotiterplatten konnte sich jedoch dieses Kultursystem bislang nicht durchsetzen, so dass eine Automatisierung der Prozessentwicklung aktuell nicht weit verbreitet ist. Diese ist aber notwendig zur Durchführung komplexer, statistisch geplanter Versuche um das Prozessverständnis zu verbessern und robustere Prozesse entwickeln zu können. Diese Aspekte gewinnen zunehmend an Bedeutung, da die Produktausbeuten bereits stark gesteigert werden konnten und aktuell die Produktqualitätsmerkmale in den Fokus der Entwicklungsarbeiten rücken [1,7]. Hierzu wird häufig der *Quality by Design* Ansatz gewählt, der wiederum auf die statistische Versuchsplanung zurückgreift [8]. Durch die Automatisierung geschüttelter Mikrotiterplatten können die Forderungen nach einer effizienteren Prozessentwicklung und einer Reduzierung von Markteinführungszeiten neuer biopharmazeutischer Produkte realisiert werden [6].

2. Einordnung des Themas

Die vorliegende Arbeit wurde bei der Roche Diagnostics GmbH an den Standorten München und Penzberg in der technischen Fermentations-Entwicklung (USP) durchgeführt, welche das Bindeglied zwischen Forschung und Produktion darstellt. Neben der Portfolio-Projektarbeit (Entwicklung bis Phase 3 und Transfer in die GMP-Produktion) werden in dieser Abteilung Technologieprojekte bearbeitet. In diesem Rahmen wurde ab dem vierten Quartal 2008 das Projekt zum Aufbau und der Entwicklung eines generischen automatisierten Screeningsystems für die Suspensions Zellkultur mit einer Laufzeit von 3 Jahren begonnen.

3. Zielsetzung

Zur Beschleunigung der Prozessentwicklung, Erhöhung der Robustheit entwickelter Verfahren und Steigerung der Komplexität zu bearbeitender Fragestellungen soll ein generisches, vollständig automatisiertes Screeningsystem für die Suspensions Zellkultur mit integrierter Analytik entwickelt und die Anwendbarkeit im Routinebetrieb der technischen Prozessentwicklung gezeigt werden. Neben der Beschleunigung bisher manueller Prozessabläufe sollen mit Hilfe dieses Systems im Rahmen von Experimenten der Verfahrensentwicklung Ergebnis-Vorhersagen für Bioreaktoren getroffen werden.

Zu Beginn des Projektes war kein geeignetes kommerzielles System verfügbar, daher wird im Rahmen dieser Arbeit ein neues Konzept für ein automatisiertes Zellkultursystem erarbeitet und realisiert. Diese neue Technologie wird auf Basis von Mikrotiterplatten entwickelt, deren Handhabung bei der geschüttelten Inkubation der Zellkulturen sowie der Durchführung analytischer Methoden vollständig automatisiert wird. Neben der Etablierung dieses Kultursystems zur Durchführung von Fed-Batch-Experimenten muss die Vergleichbarkeit anhand von Referenzexperimenten mit Bioreaktoren gezeigt werden (*scale down*). Dies setzt eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsansätze sowie die Erfüllung der Anforderungen an geregelte Laborabläufe nach GEP-Richtlinien voraus. Zur Vermeidung von Engpässen bei der analytischen Bestimmung relevanter Kultivierungsparameter sollen die entsprechende Instrumentierung und Methoden integriert werden und somit ein geschlossenes System bilden. Ein modularer Aufbau ermöglicht dabei einfach sowohl die Verknüpfung der verschiedenen Teilbereiche als auch die Erweiterung durch neue Komponenten und Methoden.

4. Theoretische Grundlagen

4.1. Grundlagen des Aufbaus automatisierter Systeme für tierische Zellkulturen

Bei dem Aufbau eines automatisierten Zellkultursystems handelt es sich um eine komplexe Aufgabe, bei der eine Vielzahl unterschiedlicher Aspekte beachtet werden muss. Das Projekt gliedert sich dabei grob in die folgenden Phasen:

- Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes
- Wahl eines automatisierbaren Kultursystems
- Umsetzung dieses Vorhabens

In dem folgenden Kapitel soll ein Überblick zu diesen Phasen gegeben werden. Die Zusammenstellung der Komponenten sowie der zu automatisierende Ablauf richten sich dabei im Wesentlichen nach den Arbeitsabläufen des entsprechenden Einsatzbereiches, wie beispielsweise der Fermentationsentwicklung.

4.1.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes für Zellkulturprozesse

Im Rahmen der Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes für Zellkulturprozesse werden zentrale Fragestellungen zum generellen Vorgehen und der Art der Systemkomponenten bearbeitet. Des Weiteren muss eine Entscheidung hinsichtlich des Automatisierungsgrades getroffen werden. Dabei können entweder nur Teilschritte eines Gesamtprozesses oder sogar der gesamte Prozess vollständig automatisiert werden. Als letzter Punkt muss die Prozesscharakteristik des Einsatzbereiches definiert werden. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht zu den wichtigsten Faktoren in diesem Prozess.

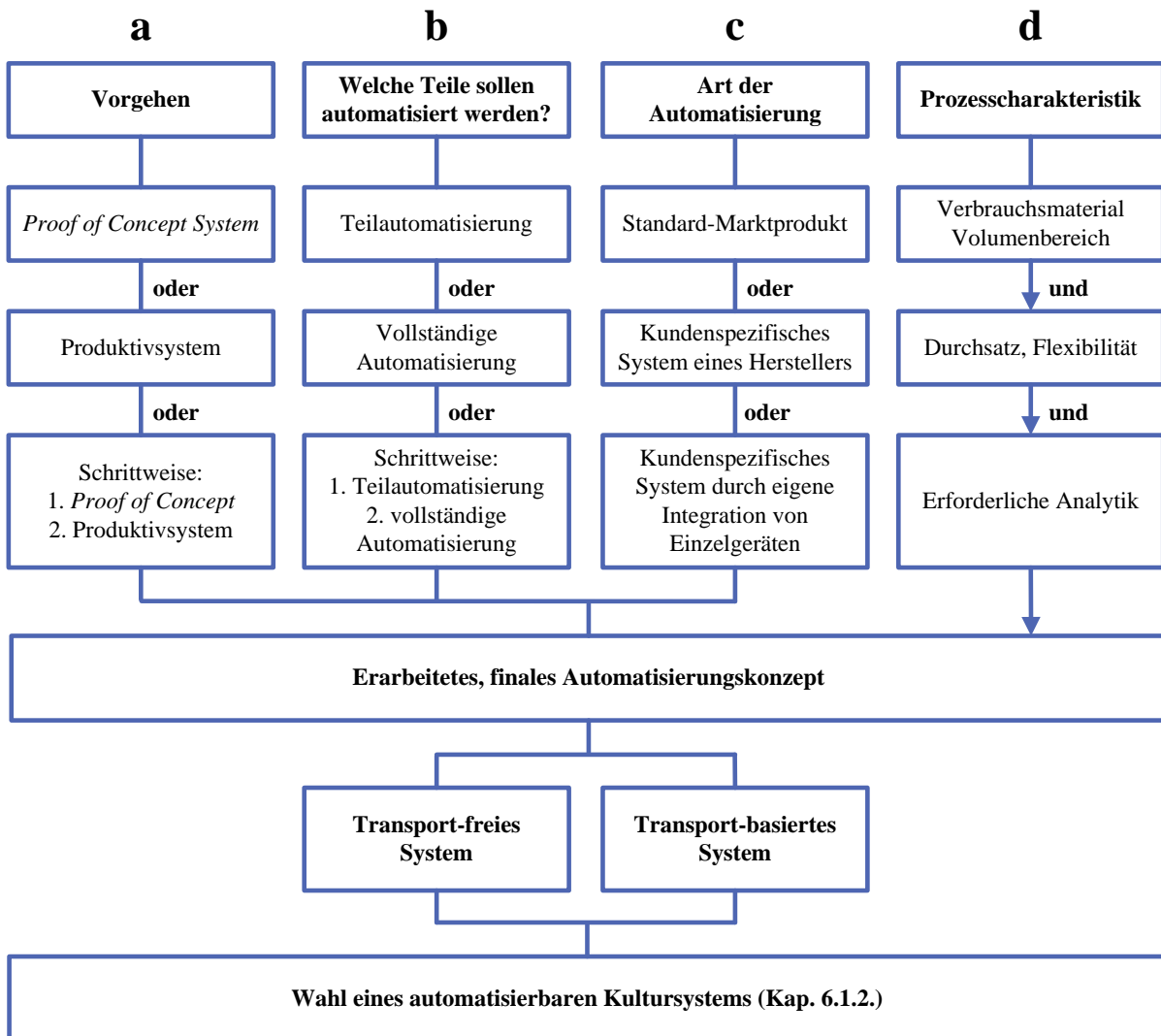


Abbildung 1: Mögliches Ablaufschema zum Erarbeiten eines Konzeptes zum Aufbau einer automatisierten Anlage für Zellkulturprozesse.

Zu Beginn eines Automatisierungsvorhabens muss eine Entscheidung zum allgemeinen Vorgehen getroffen werden. Dabei muss festgelegt werden, ob zunächst die Machbarkeit mit einem, in der Regel teilautomatisierten, *Proof of Concept* (PoC) System gezeigt werden soll oder ob direkt ein komplexeres Produktivsystem mit erhöhtem Durchsatz im Routinebetrieb aufgebaut wird. Dies ist nur möglich, wenn der zu automatisierende Prozess hinreichend charakterisiert ist und die Automatisierung garantiert werden kann.

Der schrittweise Aufbau sieht vor, dass zunächst die Möglichkeit zur Automatisierung mit einem PoC-System getestet wird und bei einem Erfolg die gewonnenen Erkenntnisse zum Aufbau eines Produktivsystems genutzt werden. Dabei werden zunächst Teilbereiche automatisiert und diese nach einer erfolgreichen *Proof of Concept* (PoC) Phase der einzelnen funktionellen Einheiten miteinander verbunden. Bei diesem Konzept ist ebenfalls eine Integration der einzelnen Automatisierungskomponenten zu einer Gesamtanlage möglich. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Steuerungssoftware sowie die Verfügbarkeit von

Gerätetreibern und Schnittstellen zur Kommunikation der Geräte untereinander. Durch die Wahl dieser PoC-Option können Investitionen aufgeteilt, die Funktionalität einer vollständigen Automatisierung schrittweise realisiert und die Erfolgchancen erhöht werden.

Nach dem Festlegen der Vorgehensweise müssen der Automatisierungsgrad und damit die zu automatisierenden Teile bestimmt werden. In der Zellkulturtechnik können folgende Hauptbereiche automatisiert werden:

- **Inkubation:** Die Inkubationseinheit kann über ein robotisches System zur automatisierten Ein- und Auslagerung der Kultursysteme verfügen und über ein Transportsystem mit einer Pipettier-Einheit (*Liquid Handling Unit*) verbunden sein.
- **Liquid Handling:** Innerhalb dieser Einheit werden sämtliche Prozesse zur Entnahme von Proben und der Zugabe von Flüssigkeiten durchgeführt. Idealerweise kann diese Station das Kultursystem öffnen und schließen.
- **Analytik:** In der Analytik-Einheit erfolgen alle erforderlichen Schritte zur Quantifizierung gewünschter Prozessparameter. Diese umfassen die Probenkonditionierung (z.B. Verdünnung), den Transfer auf ein Assay-Format sowie das Auslesen mit einer entsprechenden Detektionseinheit.

Während bei einer Verknüpfung aller Teilbereiche von einer vollständigen Automatisierung gesprochen werden kann [20], erfolgt bei einer Teilautomatisierung häufig ein manueller Transfer der Kultursysteme zwischen den oben beschriebenen funktionellen Einheiten. In diesem Fall bestimmt das während des gesamten Experiments erforderliche Laborpersonal maßgeblich den Durchsatz des Systems [21]. Bei der Verwendung von Bioreaktorsystemen oder Mikro-Bioreaktoren ist kein Transport der Kultursysteme erforderlich. In diesem Fall bedeutet eine vollständige Automatisierung, dass *Liquid Handling* und anschließende Analytik ohne manuellen Eingriff erfolgen. Zentrale Faktoren von teil- und vollständig automatisierten Systemen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Aufstellung zentraler Faktoren von Teil- und vollständig automatisierten Systemen.
- = gering; + = hoch.

Faktor	Teilautomatisierung	Vollständige Automatisierung
Mögliche Komplexität von Experimenten	-	+
Komplexität der Anlage	-	+
Wartungsaufwand und -kosten	-	+
Erreichbarkeit der Einzelgeräte	+	-
Modularität	+	+
Probenmanagement	-	+
Sicherheit des Probenflusses	-	+
Bedarf Laborpersonal an Wochenenden	+	-
Einfluss von Laborpersonal auf den Prozess	+	-

In dem nächsten Schritt nach Festlegung der zu automatisierenden Teile, dem Vorgehen bei diesem Vorhaben sowie der benötigten Hardware, sollte die Entscheidung zur Art der Automatisierung getroffen werden. Eine Möglichkeit stellt die Wahl eines serienmäßig produzierten Marktproduktes dar. Bei dieser Variante handelt es sich um eine Standard-Systemzusammenstellung eines Automatisierungsunternehmens. Daneben gibt es die Möglichkeit zur Verwendung eines kundenspezifischen Systems, welches durch einen Hersteller integriert wird oder es werden Einzelgeräte durch den Kunden selbst zu einer kundenspezifischen Gesamtanlage integriert. Letztere eignet sich insbesondere für den schrittweisen Aufbau einer Anlage. Wichtige Punkte für einen Vergleich dieser Varianten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht zu den möglichen Vorgehensweisen bei dem Aufbau eines automatisierten Zellkultursystems.

Serienmäßig produziertes Marktprodukt	Kundenspezifisches System eines Herstellers	Kundenspezifisches System durch eigene Integration
für breite Masse hergestellt	Kundenanforderung voll erfüllt	Kundenanforderung voll erfüllt
schnell verfügbar, schnell installiert	zeitaufwendige Zusammenstellung, Implementierung	sehr zeitaufwendige Auswahl und Integration von Hard- und Software
validiertes, robustes System	ungetestetes System, Robustheit ist basierend auf Herstellererfahrung zu beweisen	ungetestetes System, Robustheit ist zu beweisen
Hohe Anschaffungskosten	Geringe Anschaffungskosten, da auf ein gefordertes Minimum reduzierte Hard- und Software	Geringe Anschaffungskosten, aber hoher Anteil an Eigenleistung
etablierter Kundensupport	Verantwortlichkeit zu klären, auf Grund von Drittgeräten	Verantwortlichkeit zu klären, auf Grund von Drittgeräten
geringere Flexibilität zur Erweiterung der Anlage	mittlere Flexibilität zur Erweiterung der Anlage	maximale Flexibilität zur Erweiterung der Anlage
hohe Gefahr, dass System nicht mehr Stand der Technik ist	mittlere Gefahr, dass System nicht mehr Stand der Technik ist	geringe Gefahr, dass System nicht mehr Stand der Technik ist
geringer Erkenntnisgewinn bei Automatisierungsfragen	mittlerer Erkenntnisgewinn bei Automatisierungsfragen	hoher Erkenntnisgewinn bei Automatisierungsfragen
Fehlerkorrektur, Wartung in der Regel durch Automatisierer	Fehlerkorrektur, Wartung in der Regel durch Automatisierer	Eigene Fehlerkorrektur, Wartung möglich, da bestes Prozessverständnis
schnelle Amortisierung des Systems	schnelle Amortisierung des Systems	verzögerte Amortisierung des Systems

Der zu automatisierende Prozess sollte sehr gut charakterisiert sein, so dass die zu verwendenden Verbrauchsmaterialien wie Mikrotiterplatten, Röhrchen, Reservoirs sowie die Größenordnung zu pipettierender Volumina und der exakte Probenfluss feststehen. Des Weiteren muss entschieden werden, wie flexibel das System in Bezug auf diese Parameter sein sollte und welcher Durchsatz angestrebt wird. Die erforderliche Analytik mit benötigten

Assays und Detektionseinheiten sollte ebenfalls definiert sein. All diese Punkte sollten bei der Wahl der Komponenten der funktionellen Einheiten Inkubation, *Liquid Handling* und Analytik beachtet werden.

Abschließend muss eine Entscheidung hinsichtlich des Transportkonzeptes getroffen werden. Dabei kann zwischen einem Transport-freien und einem Transport-basierten Konzept unterschieden werden:

- **Transport-frei:** Kultursystem wird nicht transportiert und kann in der Inkubationseinheit von der automatisierten Pipettiereinheit erreicht werden.
- **Transport-basiert:** Kultursystem wird aktiv zwischen den funktionellen Einheiten transportiert.

Während gerührte Bioreaktoren bzw. Mikro-Bioreaktoren in der Regel nach einem Transport-freien Konzept automatisiert werden, erfolgt dies bei geschüttelten Systemen wie Mikrotiterplatten, Schüttelkolben oder TubeSpins Transport-basiert. Die Integration eines Roboters zum Transport der Kultursysteme kann zu einer Erhöhung der Komplexität führen. Gleichzeitig steigert er aber auch die Flexibilität und Modularität der Gesamtanlage. Allerdings ist solch ein Roboter nicht für jede Geometrie der zu transportierenden Kulturgefäße kommerziell erhältlich, wie beispielsweise für den Transport von TubeSpins. In diesem Fall ist ein manueller Transfer erforderlich oder es muss ein speziell angefertigtes System eingesetzt werden. Diese Punkte müssen bei der Wahl eines Kultursystems beachtet werden.

4.1.2. Wahl eines Kultursystems zur Automatisierung von Zellkulturprozessen

Es stehen zahlreiche Kultursysteme für Suspensionskulturen zur Verfügung, wobei insbesondere Einsatzgebiet und zu bearbeitende Fragestellung die Wahl des geeigneten Systems bestimmen. Während in einem Ansatz zum *Screening* wie der Zelllinien-Entwicklung nur geringe Volumina im μL - bis mL -Bereich bei gleichzeitig hohem Grad an Parallelität benötigt werden, kommen im Produktionsumfeld Kultursysteme mit Volumina im m^3 -Maßstab zum Einsatz. Der Informationsgehalt pro Einzelexperiment, aber auch die Komplexität pro Ansatz steigen mit einer Erhöhung des Kulturvolumens und der Abnahme an Parallelität. Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit zwischen der Qualität eines Einzelexperimentes und der Erhöhung des experimentellen Durchsatzes.

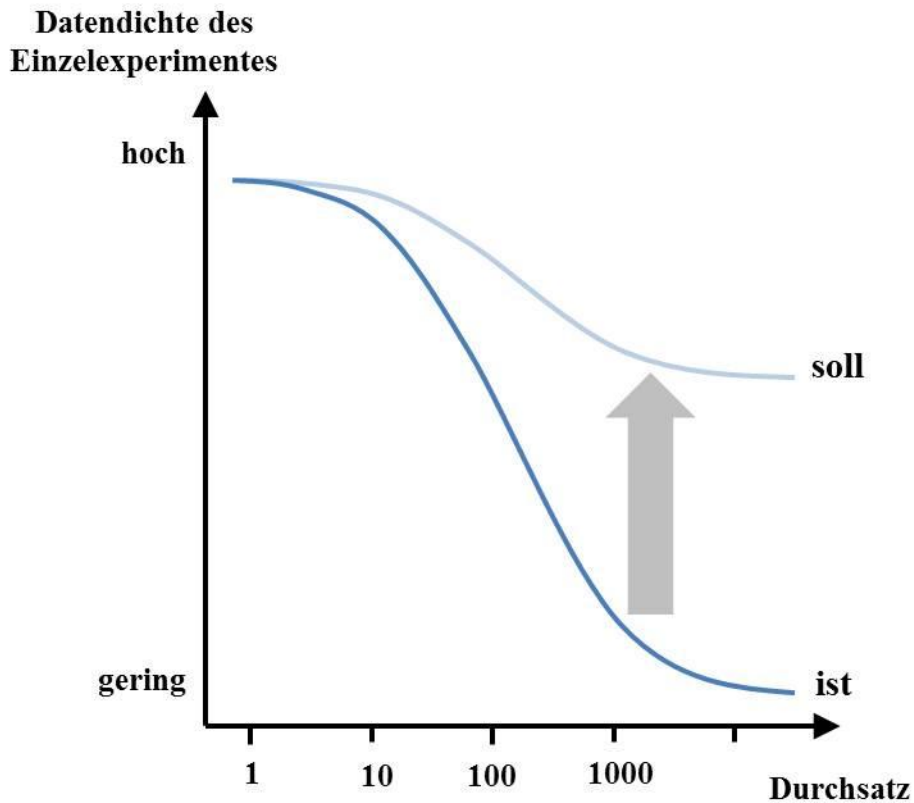


Abbildung 2: Abhängigkeit der Qualität von Einzelerperimenten von dem Durchsatz. Eine Erhöhung des experimentellen Durchsatzes senkt den Informationsgehalt des Einzelerperimentes. Durch die Automatisierung von analytischen Werkzeugen kann eine höhere Datendichte gegenüber manuellen Experimenten (Pfeil) generiert und damit diesem Trend entgegengewirkt werden [Abbildung nach Zimmermann, 22].

Neben dem Maßstab spielen die Aspekte der Prozesskontrolle und -regelung, sowie die Art der Durchmischung eine entscheidende Rolle. Charakteristische Kleinkultursysteme mit großem Potential zur Parallelisierung sind vor allem Mikrotiterplatten, aber auch Erlenmeyerschüttelkolben und TubeSpins. Daher ist die Wahl des Kultursystems zur parallelen Kultivierung ein zentraler Punkt bei dem Aufbau einer automatisierten Zellkulturanlage.

Die Festlegung auf ein System erfolgt in der Regel nach einer erfolgreichen Machbarkeitsstudie, in der die Eignung des Kultursystems gezeigt werden konnte. Dazu zählen vor allem der *scale down* von Prozessen aus dem Bioreaktormaßstab und die Möglichkeit, das System zur Vorhersage für die Prozessentwicklung zu verwenden. Falls in dem näheren Arbeitsumfeld ein neues, bisher ungenutztes Kulturformat verwendet werden soll, muss dieses zunächst im Rahmen einer Studie etabliert werden. Eine Bewertung verschiedener Kultursysteme anhand der für die Automatisierung relevanten Faktoren ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Bewertung von automatisierbaren Kultursystemen anhand ausgewählter, für die Automatisierung entscheidender Faktoren. + = gut/hoch; 0 = mittel; - = schlecht/gering.

	Mikrotiter- platte	Schüttel- kolben	TubeSpin	Mikro- Bioreaktor	Bioreaktor
Durchmischung	geschüttelt	geschüttelt	geschüttelt	gerührt	gerührt
Verwendung von Einwegmaterialien	ja	ja	ja	ja	nein*
Kulturvolumen	-	+	0	-	+
Möglichkeit für präparative Experimente	-	+	0	-	+
Durchsatz	+	0	+	0	-
Flexibilität	+	0	-	0	-
Aufwandseinsparungen bei der Automatisierung	+	-	-	0	-
Preiseffizienz (Anschaffung, Betriebskosten, Personal)	+	0	0	0	-
Verfügbarkeit von Automatisierungs- komponenten	+	-	0	0	-
Probentransport zu anderen automatisierten Systemen / Schnittstellen	+	0	0	0	0
Simplizität des Systems	+	+	+	0	-
Prozesskontrolle	0	0	0	0	+
Setup Zeit (< 2Std)	+	+	+	+	-

* Neben den klassischen, gerührten Glas- und Edelstahl-Systemen steigt zunehmend die Bedeutung von geschüttelten Einwegreaktoren. Diese Systeme sind im Vergleich zu klassischen Systemen nicht so gut charakterisiert und gelten daher nicht als Standard für den *scale up*.

Die **Verwendung von Einwegmaterialien** bringt zahlreiche Vorteile mit sich, wie beispielsweise eine Erhöhung der Flexibilität des Prozesses [23], Reduktion von Anschaffungs- und laufenden Kosten (z.B. verringerter Wartungsaufwand), einer beschleunigten Inbetriebnahme und Wechsel zwischen Experimenten. Durch die zertifizierte Sterilität und Reinheit der Materialien fallen aufwendige Reinigungsprotokolle weg und ein Produktwechsel wird vereinfacht. Das **Kulturvolumen** eines Systems bestimmt die Anzahl an Parallelansätzen und damit den **Durchsatz** pro Fläche. Geringe Kulturvolumina erfordern zudem eine Miniaturisierung der für Bioreaktoren etablierten, analytischen Verfahren und schränken die **Möglichkeit zu präparativen Experimenten** ein. Letzere ermöglichen auf Grund eines höheren Kulturvolumens die Durchführung einer größeren Anzahl analytischer Tests und ermöglichen auf diese Weise eine detailliertere Analyse der Prozesse. Die **Flexibilität** eines Systems beschreibt die Möglichkeit zur Wahl verschiedener Geometrien und Materialeigenschaften der Kultursysteme. Die kommerzielle **Verfügbarkeit von**

Automatisierungskomponenten, die für das ausgewählte Kultursystem ausgelegt sind, führen zu einer erheblichen Verringerung des **Aufwands bei der Automatisierung**. Es müssen keine Speziallösungen entwickelt werden und es können etablierte Komponenten eingesetzt werden. Neben den **Anschaffungskosten** für das Kultursystem spielen laufende Kosten (z.B. für Verbrauchsmaterialien) sowie Personalkosten eine große Rolle für die **Preiseffizienz** des Systems. Ein idealer **Probentransfer** ist gegeben, wenn eine Schnittstelle über ein Probentransfersystem gegeben ist, das unmittelbar und automatisiert weiterverarbeitet werden kann. Die **Simplizität** eines Systems ergibt sich vornehmlich aus der für den Betrieb benötigten Infrastruktur. Neben der Möglichkeit zur **Prozesskontrolle** und -regelung ist die **Setup Zeit** für die Kultursysteme aufgeführt. In allen dargestellten Systemen ist eine *online*-Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) sowie des pH-Wertes möglich. Während in Bioreaktoren Sonden verwendet werden, können in Systemen mit geringerem Kulturvolumen Sensor-Spots eingesetzt werden.

Hinsichtlich dieser Bewertung ist die Mikrotiterplatte bezüglich der Anwendung in Zellkulturen allen anderen Systemen überlegen. Die Automatisierung des klassischen Bioreaktors hingegen gestaltet sich als komplex und ist aus diesem Grund nicht weit verbreitet. Auf Grund der spezifischen Vor- und Nachteile hinsichtlich einer Automatisierung von Schüttelkolben, TubeSpins und Mikro-Bioreaktoren, finden diese jeweils in speziellen Bereichen Anwendung.

4.1.3. Überblick automatisierbarer Kultursysteme

Im Folgenden soll ein Überblick über die gängigen automatisierbaren Kultursysteme gegeben und die Integration dieser in automatisierte Systeme erläutert werden. Dabei werden die jeweiligen speziellen Anforderungen an die Automatisierung geschildert. Zudem werden Probleme und Limitierungen bei einem solchen Vorhaben aufgezeigt.

4.1.3.1. Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten stellen ein vielseitiges Werkzeug naturwissenschaftlicher Forschungs- und Entwicklungsarbeit dar. Der erste Prototyp wurde 1950 von Dr. G. Takatsy [24] präsentiert und seither stetig modifiziert und weiterentwickelt [25,26]. Seit den 1960er Jahren werden die Platten zur Anzucht von Gewebekulturen verwendet [27,28]. In den 1970er Jahren für Platten-basierte Tests wie den *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [29], bis in den 1980er Jahren erste Anwendungen in dem Bereich des *High-Throughput Screenings* (HTS) beschrieben wurden [31,32]. Eine Weiterentwicklung des HTS mit einem Probendurchsatz von 10.000 bis 100.000 Proben pro Tag ist das *ultra-High-Throughput Screening* (uHTS) mit mehr als 100.000 getesteten Proben pro Tag [33]. Die Erhöhung des Durchsatzes war mit einer Miniaturisierung der Mikrotiterplatten-*wells* verbunden, welche zu der Verwendung von 384- bis 1536-*well* Platten führte. 1998 wurde von der *Society for Biomolecular Sciences*

(SBS) eine Definition der Mikrotiterplatten-Geometrie festgelegt, welche eine Verwendung von Platten beliebiger Hersteller auf verschiedenen automatisierten Anlagen ermöglicht [34]. Diese Normierung machte die Mikrotiterplatte zu dem Standard-Werkzeug in der Automatisierung und dem *High Throughput Screening* und bildet seitdem die Grundlage automatisierter Systeme. Dies gewährleistet eine gute Verfügbarkeit von kompatiblen Geräten,

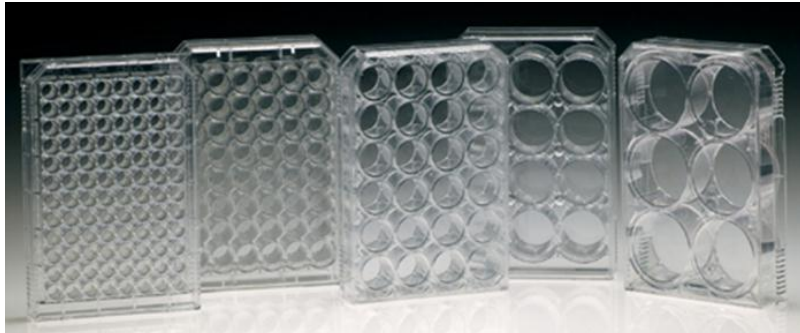


Abbildung 3: Mikrotiterplatten unterschiedlicher Formate [30].

erleichtert den Aufbau einer automatisierten Anlage, reduziert die Komplexität und erfordert daher relativ geringe Investitionen. Die Standardisierung der Mikrotiterplatte ermöglicht auch eine effizientere Gestaltung der Schnittstellen

zu anderen automatisierten Systemen und erleichtert damit den Probentransport. Die Weiterverarbeitung von Proben kann unmittelbar aus dem Übergabeformat ohne arbeitsintensive Zwischenschritte erfolgen. Die stetige Weiterentwicklung der Mikrotiterplatte selbst als auch der zahlreichen Einsatzgebiete führen zu einer sehr guten Verfügbarkeit und Flexibilität bei der Wahl von Geometrien und Materialeigenschaften. Tabelle 48 (s. Anhang Kap. 10.) zeigt die Vielfalt an verfügbaren Mikrotiterplatten.

Zusätzlich gibt es neben diesen Standard-Platten auch zahlreiche Sonderanfertigungen für spezielle Anwendung, wie beispielsweise FlowerPlates (m2plabs, Baesweiler, Deutschland) oder Mikrotiterplatten mit integrierten Schikanen [35] zur verbesserten Durchmischung und Erhöhung der Stoffübergangskoeffizienten. Auf Grund ihrer Größe ist das Arbeitsvolumen der Mikrotiterplatten begrenzt, so dass Arbeiten im präparativen Maßstab nur eingeschränkt möglich sind. Eine Vergößerung des Verhältnisses von Flüssigkeitsoberfläche zu Volumen führt zu einer Erhöhung der Verdunstung in diesem Kultursystem, so dass eine Suche nach geeigneten Mitteln zu Verminderung oder Vermeidung dieser notwendig ist. Durch die Wahl von Mikrotiterplatten mit hohen *wells* (*deepwell* Platten) kann das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen reduziert werden. Außerdem kann auf diese Weise die Anzahl an Reaktoren pro Fläche erhöht werden.

Neben den „klassischen“ Anwendungsbereichen werden Mikrotiterplatten immer öfter als Kultursysteme für Prokaryoten und Eukaryoten eingesetzt [36,37]. Durch das Schütteln der Platten können sowohl die Durchmischung als auch der Gasaustausch deutlich verbessert werden. Dieses große Potential der Mikrotiterplatte führte zu einer intensiven Charakterisierung dieses Kultursystems hinsichtlich verfahrenstechnischer Parameter wie dem volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten ($k_L a$) oder dem volumetrischen Leistungseintrag P/V_L [38-40].

4.1.3.2. Schüttelkolben

Der Erlenmeyer-Schüttelkolben stellt ein weit verbreitetes, gut charakterisiertes und parallelisierbares Kleinkultursystem zur Optimierung von Zellkulturprozessen dar [41,42]. Standardmäßig erfolgen sowohl Transport als auch Beprobung dieses Kultursystems manuell. Nur die geschüttelten Inkubatoren sind hinsichtlich einer Regelung der Parameter Temperatur, Kohlenstoffdioxidkonzentration, Luftfeuchte und Schüttelfrequenz automatisiert [43]. Mit einem Kulturvolumen von 25 mL bis 5 L bieten sie die Möglichkeit für präparative Experimente, wobei der Durchsatz von Mikrotiterplatten nicht erreicht werden kann. Die Kosten pro Ansatz liegen über denen von Mikrotiterplatten aber deutlich unter denen von Bioreaktoren.



Abbildung 4: 500 mL Schüttelkolben [44].

Die Komplexität einer Automatisierung der Schüttelkolben ergibt sich vorwiegend aus der Art des Verschlusssystems (Filterdeckel mit Gewinde) und der Geometrie (konisch). Das Schraubgewinde kann nur von Spezialrobotern geöffnet werden (*decapper*). Standard Pipettierroboter können die Schüttelkolben hingegen nicht bearbeiten, da diese zu hoch sind. Ein Inkubator mit automatisiertem Transportsystem für ein konisches Kultursystem ist nicht standardmäßig verfügbar. All diese Punkte verdeutlichen die Hürden und den Aufwand der zur Automatisierung von Schüttelkolben nötig ist. Auf Grund der schlechten Verfügbarkeit von kompatiblen *Handling*-Systemen muss eine Automatisierung mit speziell angepassten Komponenten

erfolgen. Der Probentransfer zu anderen (automatisierten) Systemen erfordert zusätzliche Schritte in der Vorbereitung, wie das Umfüllen einer Probe von einem Proberöhrchen in eine Mikrotiterplatte, und gestaltet sich daher im Vergleich zu der Mikrotiterplatte komplizierter.

4.1.3.3. TubeSpin Bioreaktoren

Ein weiteres automatisierbares, geschütteltes Kleinkultursystem für Suspensionskulturen stellen der TubeSpin[®] Bioreaktor der Firma TPP (Techno Plastics Products AG, Trasadingen, Schweiz) oder der CultiFlask 50 mL disposable bioreactor (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) dar. Bei diesem handelt es sich um ein zylindrisches 50 mL Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden, welches mit einem Filterdeckel (analog zum Schüttelkolben) verschlossen wird, um Sterilität und Gasaustausch zu gewährleisten. Auf Grund der platzsparenden Geometrie ist dieses System für den mittleren bis hohen Durchsatz geeignet [46]. Gegenüber einem Schüttelkolben mit 250 mL Nominalvolumen kann die Kapazität des Inkubators bei gleichem Innenraum verdreifacht werden, wenn TubeSpins mit einem Nominalvolumen von 50 mL verwendet werden [47]. Diese werden bereits für eine Vielzahl von Parallelexperimenten mit geschüttelten Zellkulturen verwendet [46,48,49], konnten aber

bisher die etablierten Standard-Werkzeug der Zellkulturtechnik, wie Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten, nicht ablösen [50]. Neben der 50 mL-Variante ist auch eine mit einem Nominalvolumen von 600 mL verfügbar.

Die Probleme bei einer Automatisierung der TubeSpins ergeben sich analog zu den Schüttelkolben (vgl. Kap. 4.1.3.2.) aus der Art des Verschlusssystems (Filterdeckel mit Gewinde) und der Geometrie. Auch hier sind für den Transport und das Öffnen des Deckels spezielle Systeme erforderlich. Bei dem Lösungsansatz von Cheung *et al.* [51] wird das TubeSpin mit einem Spezialdeckel verschlossen, der mit einem Septum ausgestattet ist. Dieses



Abbildung 5: CultiFlask 50 mL disposable bioreactor [45].

kann mit Hilfe einer Nadel für die Entnahme einer Probe oder der Zugabe einer Lösung durchstochen werden. Bei der Wahl des Kulturvolumens ist der Anwender zwar eingeschränkt, hat aber auf Grund der Nominalvolumina von 50 mL und 600 mL die Möglichkeit für präparative Experimente. Es handelt sich aktuell bei diesem System um kein Standard-System für den Hochdurchsatz, was die Verfügbarkeit von Automatisierungskomponenten limitiert und durch erforderliche Speziallösungen die Komplexität der Gesamtanlage erhöht. Auch in diesem System ist der Probentransport zu anderen automatisierten Systemen im Vergleich zu Mikrotiterplatten limitiert.

einer Lösung durchstochen werden. Bei der Wahl des Kulturvolumens ist der Anwender zwar eingeschränkt, hat aber auf Grund der Nominalvolumina von 50 mL und 600 mL die Möglichkeit für präparative Experimente. Es handelt sich aktuell bei diesem System um kein Standard-System für den Hochdurchsatz, was die Verfügbarkeit von Automatisierungskomponenten limitiert und durch erforderliche Speziallösungen die Komplexität der Gesamtanlage erhöht. Auch in diesem System ist der Probentransport zu anderen automatisierten Systemen im Vergleich zu Mikrotiterplatten limitiert.

4.1.3.4. Bioreaktorsysteme

Kontrollierte Bioreaktoren stellen das wichtigste System zur industriellen Produktion großer Mengen aktiver biopharmazeutischer Wirkstoffe (API – *Active Pharmaceutical Ingredients*)

mit Hilfe von tierischen Zellkulturen dar. Auf Grund ihres weit verbreiteten Einsatzes sind diese Systeme verfahrenstechnisch sehr gut charakterisiert und dienen als unverzichtbare Standard-Werkzeuge in der Prozessentwicklung. Auf Grund der Datengüte dieser Systeme wäre ein Einsatz in frühen Entwicklungsphasen wünschenswert, allerdings limitieren Kosten, Größe und Komplexität ihre Verwendung bei hoch parallelen Untersuchungen. Eine Automatisierung von Bioreaktoren hinsichtlich der Probenahme und Analytik ist



Abbildung 6: Bioreaktor-System Biostat B-DCU II [45].

mit großem Aufwand verbunden und nur bedingt rentabel. Dementsprechend schlecht ist die Verfügbarkeit entsprechender Komponenten. Weitere Nachteile stellen hohe Anschaffungs- und Betriebskosten sowie ein hoher personeller Aufwand dar, was die Effizienz pro Ansatz sinken lässt. Ebenso ist der Probentransport zu automatisierten Systemen gegenüber einem Mikrotiterplatten-basierten System eingeschränkt und auf Grund der geringen Probenzahl nicht sinnvoll.

Die Vorteile der Bioreaktoren liegen insbesondere in der exakten Regelung aller wichtigen Prozessgrößen und der Möglichkeit zur kontinuierlichen Zuführung von Nährlösungen und Korrekturmitteln (Base, Anti-Schaum usw.). Wesentliche Parameter für die Maßstabsübertragung von Ergebnissen (*scale up / scale down*) stellen der k_{La} -Wert, der Leistungseintrag sowie die Mischzeiten dar. Aber auch fluiddynamische Effekte bedingt durch den Rührer oder statische Einbauten, wie die Bildung von turbulenten Wirbelstrukturen oder der Einfluss abreißender Wirbelschleppen, können idealerweise abgebildet werden. Diese Punkte verdeutlichen die Wichtigkeit dieses Systems für den *scale up* in den m^3 -Produktionsmaßstab.

4.1.3.5. Mikro-Bioreaktoren

Durch eine Miniaturisierung der klassischen Bioreaktoren kann die Parallelität und damit die Entwicklungseffizienz erhöht werden, da der technische und personelle Aufwand mit einer



Abbildung 7: bioREACTOR 48 [55].

Verkleinerung des Arbeitsvolumens in den Milliliter- bis Mikroliterbereich sinken. In diesen als Mikro-Bioreaktor bezeichneten Systemen ist eine Messung und Regelung wichtiger Prozessgrößen analog zum Bioreaktor-System möglich, ebenso verfügen sie über einen Rührer und ermöglichen auf diese Weise eine bessere Übertragbarkeit physikalischer Parameter auf den Prozessmaßstab. Auf Grund dieser Korrelationen finden diese Systeme Anwendung in der Prozessentwicklung

[52,53,54]. Im Vergleich zu Bioreaktoren sind diese Systeme weniger komplex, günstiger in der Anschaffung und eine Automatisierung gestaltet sich weniger aufwendig. Für diese miniaturisierten Systeme ist eine höhere Verfügbarkeit von Automatisierungskomponenten gegeben. In diesen Systemen sind nur eingeschränkt präparative Experimente möglich. Die laufenden Kosten pro Ansatz übersteigen die in geschüttelten Systemen signifikant.

Durch die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren, aber auch durch die Etablierung alternativer hoch paralleler Systeme, können sowohl Informationen schneller und effizienter erhalten als auch Kosten gesenkt werden. Mit Hilfe dieser Parallelsysteme erzielte Ergebnisse müssen in den Prozessmaßstab übertragbar sein, so dass zuverlässige Vorhersagen getroffen werden können. Tabelle 4 fasst die Kernaspekte zu den erläuterten Kultursystemen zusammen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Kernaspekte zu den gebräuchlichsten Kultursystemen.

Kultursystem	Kernaspekte
Bioreaktor	<ul style="list-style-type: none"> - etabliertes Standardsystem zum <i>scale up</i> in den Prozessmaßstab - auf Grund großer Kulturvolumina geeignet für den Einsatz zur Materialbereitstellung - exakte Regelung von Prozessparametern möglich - geringes Maß an Parallelität, arbeitsintensiv
Mikro-Bioreaktor	<ul style="list-style-type: none"> - nicht qualifiziertes Parallelsystem - Bioreaktor-ähnliches Parallelsystem - Mittlerer Durchsatz
Schüttelkolben	<ul style="list-style-type: none"> - qualifiziertes, etabliertes Parallelsystem - auf Grund großer Kulturvolumina geeignet für den Einsatz zur Materialbereitstellung - Automatisierung sehr komplex
TubeSpin	<ul style="list-style-type: none"> - nicht qualifiziertes Parallelsystem - hohes Maß an Parallelität/Durchsatz - Automatisierung sehr komplex
Mikrotiterplatte	<ul style="list-style-type: none"> - nicht qualifiziertes Parallelsystem - höchstes Maß an Parallelität/Durchsatz - Eignung für vollautomatisierte Systeme

4.2. Realisierung des Automatisierungskonzeptes

Nachdem das Konzept zum Aufbau einer automatisierten Zellkulturanlage erarbeitet und das Kultursystem für dieses Vorhaben festgelegt wurde, beginnt die Realisierungsphase des Projektes. Dazu ist ein Marktüberblick erforderlich sowie ein Abgleich der geforderten Spezifikationen mit den verfügbaren Lösungen. Im Rahmen einer Bewertung kommerziell verfügbarer Systeme muss besonderes Augenmerk auf die Flexibilität des Systems gelegt werden.

Für den automatisierten Zellkulturbetrieb ist eine Vielfalt kommerzieller Lösungen erhältlich. Bei diesen kann zum einen zwischen einer teilweisen und einer vollständigen Automatisierung unterschieden werden und zum anderen zwischen der Automatisierung von Kleinkultursystemen und Bioreaktoren. Bei letzteren erfolgt eher eine Parallelisierung zur Erhöhung des Durchsatzes als eine vollständige Automatisierung dieser Systeme.

4.2.1. Marktüberblick zu automatisierten Zellkultursystemen

In dem folgenden Kapitel sollen neben den kommerziell erhältlichen Systemen auch solche vorgestellt werden, die nur in der Literatur beschrieben aber nicht auf dem Markt frei erhältlich sind. Tabelle 5 zeigt eine Auswahl aktuell kommerziell erhältlicher, automatisierter Systeme für die Zellkultur und stellt entscheidende Eckdaten dieser dar.

Die größtmöglichen **Kulturvolumina** erlauben die Systeme Bioreaktor (100 bis 4000 mL) und Schüttelkolben (50 bis 500 mL), während in den Kleinstkultursystemen Mikro-Bioreaktor (0,7 bis 15 mL) und Mikrotiterplatte (100 bis 2000 µL) nur verhältnismäßig geringe Kulturvolumina möglich sind. Mit Ausnahme der Bioreaktoren werden alle anderen Systeme mit Einweg-Materialien (*disposables*) betrieben. Die **Komplexität** der Systeme beschreibt das Netzwerk integrierter Komponenten und die sich daraus ergebende Komplexität der Steuerung und Verschachtelung der Prozesse (*scheduling*) und Wartungsaufwand des Gesamtsystems. Der **Grad der Automatisierung** gibt an, wie viele und welche der folgenden Teile automatisiert sind:

- Transport des Kulturgefäßes (TK), bei Bioreaktorsystemen nicht erforderlich
- *Liquid Handling* (LH)
- integrierte Analytik (IA)

Neben der Art der **Durchmischung** werden noch Angaben zur möglichen Anzahl an **Parallelansätzen** gemacht.

Tabelle 5: Auswahl aktuell kommerziell verfügbarer, automatisierter Systeme für die Zellkultur. Unterteilung nach Hersteller, Art des Kultursystems und Kulturvolumen und die automatisierten Bereiche. Zusätzlich sind die Art der Durchmischung, die Anzahl möglicher Parallelansätze und eine Bewertung der Komplexität dargestellt. Diese Bewertung umfasst schwerpunktmäßig die Bereiche *Scheduling* (Steuerung von Zeitabläufen) und den Wartungsaufwand. n.z.: nicht zutreffend; TK: Transport des Kulturgefäßes (bei Bioreaktorsystemen nicht erforderlich); LH: *Liquid Handling* (setzt sich zusammen aus Probenahme und Zugabe von Flüssigkeiten); IA: integrierte Analytik.

Hersteller, System	Kultursystem	Kulturvolumen	Automatisierte Bereiche			Durchmischung	Parallel-Ansätze	Bewertung der Komplexität
			TK	LH	IA			
Infors, HT Sixfors	Bioreaktor	300 - 500 mL	n.z.	nicht vorhanden	nur online Parameter	Rührer	6	mittel
Biospectra, Clone Screener	Bioreaktor	400 mL	n.z.	teilweise	nur online Parameter	Rührer	32	hoch
Biospectra, Clone Explorer	Bioreaktor	500 - 2500 mL	n.z.	teilweise	nur online Parameter	Rührer	6	mittel
DASGIP, DASbox	Bioreaktor	60 - 250 mL	n.z.	nicht vorhanden	nur online Parameter	Rührer	24+	mittel
DASGIP, Parallel Bioreactor System	Bioreaktor	35 - 4000 mL	n.z.	nicht vorhanden	nur online Parameter	Rührer	16	mittel
Applikon, μ -24	Mikro-Bioreaktor	1 - 7 mL	n.z.	möglich, nicht angeboten	vollständig	Orbitalschüttler	24	mittel
TAP Biosystems, Ambr TM	Mikro-Bioreaktor	10 - 15 mL	n.z.	LH	Zellzählung	Rührer	48	mittel
Seahorse Bioscience, SimCell TM	Mikro-Bioreaktor	700 μ L	vollständig	LH	Transport zu Plattenleser möglich	Rotation	1260	hoch
2mag, bioREACTOR 48	Mikro-Bioreaktor	8 - 15 mL	n.z.	LH	vollständig möglich	Rührer	48	mittel
TAP Biosystems, Sonata TM	Schüttelkolben	50 - 500 mL	vollständig	vollständig	vollständig	Orbitalschüttler	270	sehr hoch
HiTEC ZANG, RAMOS mit FTT	Schüttelkolben	50 - 100 mL	nicht vorhanden	vollständig	nicht vorhanden	Orbitalschüttler	8	mittel
TAP Biosystems Cello TM	Mikrotiterplatte	*	vollständig	vollständig	Zellzählung	keine	10.000	hoch
m2p labs, Biolector	Mikrotiterplatte	100 - 2000 μ L	nicht vorhanden	nicht vorhanden	nur online Parameter	Orbitalschüttler	96	gering
m2p labs, Robolector	Mikrotiterplatte	100 - 2000 μ L	nicht vorhanden	vollständig	nur online Parameter	Orbitalschüttler	96	mittel
PAN Systechn, PanSys4000	Mikrotiterplatte	*	vollständig	vollständig	nur Mikroskop	keine	*	mittel

* keine Herstellerangabe vorhanden.

4.2.1.1. Bioreaktorsysteme

Der Trend im Bereich der Bioreaktorsysteme geht mehr in Richtung einer Parallelisierung als einer Automatisierung der Probenahme und der Analytik. Besonders problematisch gestaltet sich die Probenahme, da es sich bei dem Bioreaktor um ein geschlossenes System handelt. Aktuell bietet die Firma Bayer Technology Services mit dem BaychromAT[®] und der platzsparenden Laborvariante BaychromAT[®] Lab automatisierte Analytik-Module zum Anschluss an Bioreaktoren an. Die Probenahme erfolgt über ein sterilisierbares Ventil mit anschließender Weiterleitung der zellhaltigen Probe an die Analyseninstrumente: ein automatisiertes Zellszählensystem, eine HPLC-Anlage, ein Glukose-Laktat-Analysator sowie ein System zur Bestimmung weiterer Metabolite in dem Zellkulturüberstand.

Bereits in den frühen 1990er Jahren entwickelte die Firma Infors HT (Bottmingen, Schweiz) mit dem Sixfors eines der ersten Parallel-Bioreaktorsysteme. Jeder Reaktor mit einem Kulturvolumen von 300 bis 500 mL ist mit jeweils einer Sonde zur Bestimmung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration ausgestattet.

Der CloneScreener[®] der Firma Biospectra AG besteht aus 32 Bioreaktoreinheiten, die mithilfe von Rührern durchmischt werden und jeweils 400 mL Kulturvolumen fassen. Die Reaktoren werden automatisch angeimpft und beprobt, nach der Fermentation ist die Reinigung der Einheiten vor Ort möglich (*cleaning in place*, CIP) [56]. Eine kleinere Variante bietet die Firma Biospectra mit dem Clone Explorer[®] an. Bei diesem Modell werden sechs Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 500 bis 2500 mL parallel betrieben. Außerdem ist eine Einheit zur *online*-Messung verschiedener Parameter wie Glukose, verschiedene Substrate oder Produkte wie monoklonale Antikörper verfügbar [57].

Mit dem modular aufgebauten und platzsparenden DASbox-System automatisiert die DASGIP AG Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 60 bis 250 mL. Durch die Verbindung von Modulen mit jeweils vier Bioreaktoren kann eine Parallelität von bis zu 24 oder mehr Systemen erreicht werden. Ein weiteres Produkt der DASGIP AG stellt das Parallel Bioreactor System dar, mit dem parallelen Betrieb von 16 Bioreaktoren mit einem Kulturvolumen von 35 bis 4000 mL. Die Reaktoren in beiden Systemen werden temperiert und begast, der pH-Wert sowie die Gelöstsauerstoffkonzentration werden automatisch geregelt. Eine automatisierte Probenahme und Analytik sind nicht integriert [58].

Aktuell ist kein kommerzielles, vollständig automatisiertes Bioreaktorsystem verfügbar. Durch eine Kombination von einzelnen Komponenten kann allerdings eine vollständige Automatisierung dieses Kultursystems erreicht werden, wie beispielsweise durch die Kopplung eines BaychromAT[®] oder BaychromAT[®] Lab an ein Parallel-Bioreaktorsystem. Hier sind derzeit verschiedene Systeme mit maximal 32 parallel arbeitenden Einheiten verfügbar. Die hohe Komplexität macht diese Systeme personal- und wartungsintensiv.

4.2.1.2. Mikro-Bioreaktoren

In dem Bereich der Mikro-Bioreaktoren ist eine Vielzahl an Systemen publiziert und teilweise auch kommerziell verfügbar. Zusätzlich zur Miniaturisierung wurden einige Systeme nahezu vollständig automatisiert. Der Durchsatz mit diesen Systemen ist im Vergleich zum Bioreaktor signifikant erhöht.

Der μ -24 Bioreactor der Firma Applikon Biotechnology (Schiedam, Niederlande) stellt ein kommerzielles System sowohl für Prokaryoten als auch Eukaryoten dar. Bei diesem System befindet sich eine Einwegkassette mit 24 Reaktoren auf einem Orbitalschüttler mit individueller Steuerung der Gaszufuhr (Luft, Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid/Ammoniak), der Temperatur und des pH-Wertes. Außerdem ist eine kontinuierliche Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration, der Temperatur und des pH-Wertes möglich. Dazu befinden sich am Boden jedes Reaktors Sensoren und eine sterile Membran für die Gaszufuhr. Das von Applikon empfohlene Arbeitsvolumen liegt im Bereich von 1 bis 7 mL und die Kassette hat SBS-Format. Ein automatisierter Transport dieses Blocks ist nicht möglich, allerdings könnte durch den manuellen Transfer dieser Einheit auf einen Liquid Handler eine Teilautomatisierung ermöglicht werden [59]. Am Institut für Drucktechnologie der Berner Fachhochschule wurde eine autoklavierbare 24-Kanal Dosiereinheit entwickelt, mit der dieses System auch im Fed-Batch Verfahren betrieben werden kann [60].

Ein weiteres kommerziell erhältliches System stellt das ambrTM von TAP Biosystems (Cambridge, United Kingdom) dar. Mit diesem sollen die wichtigsten physikalischen/mechanischen Charakteristika klassischer Bioreaktoren mit einem Volumen von 10 bis 15 mL abgebildet werden. Dazu ist jeder der bis zu 48 parallel angeordneten Mikro-Bioreaktoren mit einem Rührer und Sensoren zur Messung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration ausgestattet. Eine individuelle Begasung mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid ist möglich und durch die Platzierung der Reaktoren in einen Heizblock auf einem speziellen Pipettierroboter kann das *Liquid Handling* automatisiert werden. Dazu entfernt die *Liquid Handling* Einheit mit einem *decapper* automatisch eine Verschlusskappe des Reaktors und kann anschließend nach Aufnahme einer Pipettenspitze eine Probe entnehmen oder eine Lösung hinzugeben. Die weiterführende Analytik muss größtenteils manuell erfolgen, die Anbindung des Systems an ein Gerät zur Zellzählung ist jedoch möglich [61]. Da für dieses System keine integrierte Analytik verfügbar ist, handelt es sich um ein teilautomatisiertes System [62].

Bei dem SimCellTM System von Seahorse Bioscience Inc. (North Billerica, USA) handelt es sich um ein automatisiertes Zellkultursystem auf der Basis von Mikro-Bioreaktor Arrays (MBA) im SBS-Format, die in einem Inkubator durch Rotation durchmischt werden. Auf einem MBA sind sechs individuelle gasdurchlässige Mikro-Bioreaktoren (MB) mit einem

Füllvolumen von ungefähr 700 μL angeordnet. Zusätzlich verfügt jeder MB über Sensoren zur Messung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration, eine Bestimmung der Gesamtzellichte ist über die Messung von Vorwärtsstreulicht möglich. Das SimCell™ System besteht aus insgesamt fünf Inkubatoren, mit einer Kapazität von jeweils 42 MBA, so dass 1260 Parallelansätze möglich sind. Durch die Verwendung eines Dispensier- und eines Probenahme-Moduls können Nährlösungen und Korrekturmittel zugegeben sowie Proben für weitere Analysen entnommen werden. Eine Integration von Plattenlesern zur Bestimmung der Viabilität oder anderer zellphysiologischer Parameter ist möglich. Der Transport der MBA innerhalb der Plattform erfolgt mit einem zentralen Roboterarm [63,64,65]. Als Nachteile für dieses System werden die Notwendigkeit von speziellem Equipment und Verbrauchsmaterialien sowie ein Problem bei der *scale up* auf Grund von Blasenbildung in den MB beschrieben [66]. Die Reaktorform und die Art der Durchmischung sind untypisch für die Kultivierung von Zellkulturen.

Puskeiler *et al.* [67,68] präsentieren ein hoch paralleles Mikro-Bioreaktorsystem zur automatisierten Kultivierung mikrobieller Systeme, welches als bioREACTOR 48 von der 2mag AG (München, Deutschland) vertrieben wird. In einem beheizbaren Bioreaktorblock befinden sich 48 individuelle Mikro-Bioreaktoren im mL-Maßstab, die über einen Gas-induzierten Rührer durchmischt werden [69] sowie über eine Zuleitung steriler Prozessgase verfügen. Dieser Bioreaktorblock wurde auf dem Deck eines Pipettierroboters montiert, um die Zugabe von Nährlösungen oder Korrekturmitteln sowie eine Entnahme von Proben zu ermöglichen. Zur Bestimmung des pH-Wertes und der Messung der optischen Dichte wurde ein Mikrotiterplattenleser integriert. Auf diese Weise konnte eine vollständige Automatisierung eines gerührten Mikro-Bioreaktorsystems erreicht werden.

Zwei weitere miniaturisierte Systeme beschreiben Harms *et al.* [70]. Die zwei Prototypen weisen jeweils 24 parallele Mikro-Bioreaktoren auf, entweder angeordnet auf einer 24 *well* Platte oder 24 individuelle Reaktoren. Beide Systeme verfügen über einen Rührer, aktive Begasung durch ein Einblasrohr (*sparger*), optische Sensoren zur Bestimmung des pH-Wertes, der Gelöstsauerstoffkonzentration sowie der optischen Dichte. Zusätzlich verfügen sie über ein Probenahmesystem.

Die von Lamping *et al.* [71] beschriebene Miniaturisierung eines Bioreaktors führte bei einem Arbeitsvolumen von 6 mL zu einem Durchmesser vergleichbar zu dem *well* einer Standard 24 *well* Mikrotiterplatte. Unterhalb eines speziell gefertigten Rührers (drei sechsblättrige Turbinen) befindet sich ein *sparger* für die aktive Begasung des Reaktors. Optische Glasfaser-Sonden wurden für die Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH-Wertes sowie zur Messung der Zelldichte verwendet.

Die Vielzahl angebotener und publizierter Mikro-Bioreaktorsysteme veranschaulicht die intensiven Bemühungen zur Miniaturisierung und Durchsatzerhöhung von Bioreaktoren. Für

diese werden vollständig automatisierte Varianten angeboten, welche auf dem Einsatz von automatisierten Liquid Handling Systemen basieren. Somit weisen diese Systeme gegenüber Bioreaktoren eine höhere Flexibilität auf. Die Komplexität dieser Systeme verursacht zum Teil Probleme, wie für das SimCell™ System berichtet, und einen größeren Aufwand bei der Durchsatzerhöhung als bei Mikrotiterplatten basierten Systemen.

4.2.1.3. Erlenmeyer-Schüttelkolben

Auf Grund der in Kapitel 4.1.3.2. beschriebenen Komplexität des Schüttelkolbens gibt es nur eine sehr geringe Auswahl an automatisierten Systemen. Das Sonata System von TAP Biosystems (Cambridge, United Kingdom) stellt dabei aktuell das einzige kommerziell erhältliche, vollständig automatisierte Zellkultur-System für Schüttelkolben dar [72]. Mit diesem System ist es möglich, bis zu 270 Schüttelkolben parallel zu prozessieren. Von der Entnahme des Schüttelkolbens aus dem Inkubator, dem Transport, der Entnahme einer Probe oder Zugabe einer Lösung bis hin zur Zellzählung, Zentrifugation und der Probenlagerung sind sämtliche für die Kulturführung erforderlichen Schritte automatisiert [73]. Die Durchführung einer weiterführenden, prozessbegleitenden Analytik wird für dieses System nicht beschrieben.

Auf Grund der Wichtigkeit des Schüttelkolbens in der Prozessentwicklung gibt es aber auch Bestrebungen, diese Kultursysteme zumindest teilweise zu automatisieren. Ein Beispiel stellt das RAMOS (*Respiratory Activity Monitoring System*) von HiTEC Zang (Herzogenrath, Deutschland) dar, welches acht Parallelansätze mit Abgasanalytik auf einem Orbitalschüttler ermöglicht. Dieses System wird vor allem zur Ermittlung der Sauerstofftransferrate (OTR), der Kohlenstoffdioxidtransferrate (CTR) und dem Respirationskoeffizienten (RQ) eingesetzt. Der Anschluss einer automatischen Zufütterung sowie Probenahme ist mit Hilfe der FluidTrain® Technologie (FTT) möglich. Entnommene Proben können in Standard Probengefäße gefüllt und auf einem Probensammler gesammelt werden.

Des Weiteren wird in der Literatur von Systemen berichtet, die über eine kontinuierliche Zufuhr von Flüssigkeiten verfügen bei gleichzeitiger *online*-Messung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration [74-76]. Eine weitere Möglichkeit zur kontinuierlichen Zufütterung von Nährstoffen stellt der Einsatz von Nährstoff beladenen Hydrogel-Plättchen dar [77].

4.2.1.4. TubeSpin Bioreaktoren

Bei den TubeSpins handelt es sich, wie in Kapitel 4.1.3.3. beschrieben, um ein nicht sehr weit verbreitetes Kultursystem. Dies hat zur Folge, dass sich eine Automatisierung sehr kompliziert gestaltet und daher keine kommerziellen Lösungen vorhanden sind. Cheung *et al.* [51] präsentieren einen Ansatz, bei dem bis zu 96 TubeSpins parallel auf einem Gestell in einem Inkubator kultiviert werden. Durch das Einbringen weiterer Gestelle in den Inkubator

kann der Durchsatz erhöht werden. Zur Beprobung wird das Gestell manuell auf einen *Liquid Handler* transportiert, der mit Pipettieradeln ausgestattet ist und ein in dem TubeSpin-Deckel befindliches Septum durchstechen kann. Auf diese Weise können Proben entnommen und Flüssigkeiten individuell hinzugegeben werden. Nachteilig ist die aufwändige Reinigung der Nadeln, da diese nicht als Einwegartikel zur Verfügung stehen, aber steril sein müssen. Analytische Instrumente wie ein Osmometer für den Hochdurchsatz, ein Durchflusszytometer oder ein Plattenleser können manuell mit Proben beladen werden.

4.2.1.5. Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten stellen den internationalen Standard für die Laborautomatisierung dar und eignen sich auf Grund der hohen Verfügbarkeit an Automatisierungskomponenten für zahlreiche Anwendungen (vgl. Kap. 4.1.3.1.). Auf Grund der großen Auswahl und den individuellen Einsatzbereichen einer automatisierten Anlage stellt die Zusammenstellung der Komponenten einen komplexen Vorgang dar. Im Zellkulturbereich werden automatisierte Anlagen vorwiegend im Bereich der Klonauswahl eingesetzt. Für Anwendung in der nachfolgenden Prozessentwicklung bedient man sich häufig teilautomatisierter Lösungen. Diese Punkte führen zu einer geringen Verfügbarkeit kommerzieller Standardanlagen, meist werden kundenspezifische Sonderlösungen durch die Anbieter entwickelt.

Bei dem CelloTM-System von TAP Biosystems (Cambridge, United Kingdom) handelt es sich um ein System für die automatisierte Durchführung von Klonauswahlprozessen. Es kann Plattenformate von 6 *well* bis 384 *well* bearbeiten. Dieses System eignet sich für adhärente und nicht adhärente Zellen. Es wurde bis dato keine Anwendung im geschüttelten Betrieb beschrieben. Durch die Automatisierung von Plattentransport und *Liquid Handling* wird eine automatische Aussaat von Zellen und die Zugabe von Nährlösungen oder das Ablösen adhärenter Zellen ermöglicht. Die Integration eines Systems zur Messung des Zellwachstums ermöglicht eine direkte Kontrolle der physiologischen Eigenschaften der Kultur. Für weitere Analysen oder zur Zellbankablage können Proben aus dem System ausgeschleust werden [78].

Der Biolector (m2p labs, Baesweiler, Deutschland), besteht aus einer optischen Messeinheit auf einem x-y-Positioniersystem und einer Schütteleinheit in einem MINI-Inkubator. Mit Hilfe der optischen Messeinheit ist ein *online*-Monitoring der Biomassekonzentration über die Streuung von Licht oder die Messung der NADH-Fluoreszenz möglich sowie der Nachweis fluoreszierender Proteine [79]. Diese Einheit wird ebenfalls dazu genutzt, den pH-Wert sowie die Gelöstsauerstoffkonzentration über die am Plattenboden befindlichen Sensor-Spots zu bestimmen. Dazu wird jede einzelne Vertiefung einer Platte einzeln angefahren. Verwendet werden 48 oder 96 *well* Mikrotiterplatten, die mit einer gaspermeablen Folie als Sterilbarriere abgedeckt werden [80]. Bei diesem System handelt es sich um ein eigenständiges (*stand-alone*) System zur Kultivierung einer Mikrotiterplatte [81].

Die automatisierte Weiterentwicklung dieses Systems umfasst den Biolector sowie einen *Liquid Handler* und wird als Robolector bezeichnet. Das gesamte System befindet sich in einer Sterileinhausung. Der *Liquid Handler* kann nach dem automatischen Öffnen des Biolectors eine Probe aus der Kulturplatte entnehmen oder eine Lösung hinzugeben. Dazu muss allerdings die Sterilbarriere der einzelnen *wells* durchstoßen und damit zerstört werden. Eine weiterführende Analytik ist für dieses System nicht verfügbar und es handelt sich um ein teilautomatisiertes System [82].

Mit dem PANsys4000 bietet die Firma PAN System GmbH (Aidenbach, Deutschland) ein automatisiertes System für Zellkulturen mit der Möglichkeit zum *Live-Cell-Imaging* an. Dieses ist mit einer Temperatur und Kohlenstoffdioxidgehalt geregelten Inkubationskammer, einem getrennten *Liquid Handling* System, einem Transportsystem und einem Mikroskop (Phasenkontrast und Fluoreszenz) ausgestattet. Das *Liquid Handling* System verfügt über einen Einzelkanal sowie einen 10-fach Multikanal, der allerdings bei Standard-Mikrotiterplatten im Format von 12x8 *wells* nur begrenzt einsetzbar ist. Durch die Verwendung spezieller Mikrotiterplatten können Messungen von Impedanz, Sauerstoffkonzentration und pH-Wert durchgeführt werden und es besteht die Möglichkeit zur Integration einer speziellen Einheit zur Raman-Spektroskopie. Mit diesem System ist nur eine statische Kultivierung möglich, ein geeignetes Schüttelsystem wird nicht angeboten. Eine weitere Einschränkung im Durchsatz dieses Systems stellt die Verwendung eines Einzelkanal-Pipettierers dar [83].

In diesem Marktüberblick werden keine Systeme berücksichtigt, die ausschließlich für adhärenzte Kulturen angeboten werden und auf die Verwendung von T-Flaschen oder speziellen Flaschen (RoboFlask™, Corning®) ausgerichtet sind. Diese statischen Kultursysteme eignen sich auf Grund der fehlenden Durchmischung und eines zu geringen k_{La} -Wertes nicht für die Kultivierung von Suspensionskulturen. Zu diesen Systemen zählen beispielsweise das Cellerity™ der Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz) oder das SelecT von TAP Biosystems (Cambridge, United Kingdom).

Keine der oben aufgeführten Lösungen stellt eine gute Basis zur hochparallelen und modularen Automatisierung von Zellkulturprozessen im Rahmen der Zielsetzung dieser Arbeit dar. Grundlegend ist entweder der Automatisierungsgrad zu gering oder die Kombination aus der notwendigen geschüttelten Inkubation mit hoher Parallelität ist nicht vorhanden.

5. Ergebnisse

5.1. Aufbau eines automatisierten Zellkultursystems

In den vorangegangenen Abschnitten werden die theoretischen Grundlagen des Aufbaus von Systemen zur automatischen Kultivierung mit integrierter Analytik erläutert. Die Umsetzung dieser in die Praxis soll in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

Die Entwicklung dieser neuen Automatisierungs-Technologie erfordert die Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes sowie ein gutes Verständnis der Grundoperationen und des Zusammenspiels zentraler Komponenten. In einem ersten Schritt soll die Machbarkeit eines automatisierten Fed-Batch-Experiments im Mikrotiterplattenformat mit Hilfe eines *Proof of Concept* (PoC) System bewiesen und die gesammelten Erfahrungen und Expertise zum Aufbau eines Produktivsystems für den Einsatz im Routinebetrieb der Prozessentwicklung genutzt werden. Diese Herangehensweise entspricht dem in Kapitel 4.1.1. beschriebenen schrittweisen Vorgehen.

5.1.1. *Proof of Concept* System

Mit diesem System sollen die Grundlagen zur Zellkulturautomatisierung und zur Durchführung von Fed-Batch-Experimenten in geschüttelten Mikrotiterplatten erarbeitet werden, die in folgenden Bereichen liegen:

- Automatisiertes *Liquid Handling*
- Automatisierte Transportabläufe
- Kommunikation zwischen Hardware-Komponenten

Des Weiteren ist eine miniaturisierte, automatisierte Analytik zur Prozessbeobachtung erforderlich, welche dem erhöhten Durchsatz angepasst ist. Dazu werden Tests für die Quantifizierung von Glukose und Laktat, ein Test zur Bestimmung der Zelldichte und Viabilität sowie ein ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Antikörpern für den Routine-Einsatz entwickelt. Für zusätzliche Tests zur Quantifizierung weiterer Nutrienten und Metabolite, wie Glutamin und Glutamat, wird die Machbarkeit gezeigt und diese sollen ebenfalls innerhalb des Systems zur Verfügung stehen.

Während die Entwicklung dieser analytischen Methoden vorwiegend im Rahmen von Diplom- und Masterarbeiten erfolgt (vgl. Kap. 7.2.), liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf dem Aufbau und der Automatisierung eines Zellkulturmoduls und dem Aufbau eines Analytikmoduls.

Durch eine enge Kooperation mit der Firmen-internen Analytikabteilung wird das Spektrum zu untersuchender Parameter, insbesondere in dem Bereich der Produkt- Quantifizierung und -Charakterisierung, erweitert.

5.1.1.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes

Das PoC-System zeichnet sich vor allem durch eine geringe Komplexität und einen minimierten Kostenaufwand im Vergleich zum angestrebten Produktivsystem aus. Die eingesetzten Komponenten sollen so weit möglich für weitere Entwicklungen zum Produktivsystem genutzt werden können. Dazu wird ein modulares, teilautomatisiertes System entwickelt, bestehend aus einem steril eingehausten, automatisierten Zellkulturmodul mit den Teilbereichen Inkubation und *Liquid Handling* und einem entkoppelten Analytikmodul. Die Verbindung dieser beiden Module erfolgt durch einen manuellen Plattentransport wie in Abbildung 8 dargestellt.

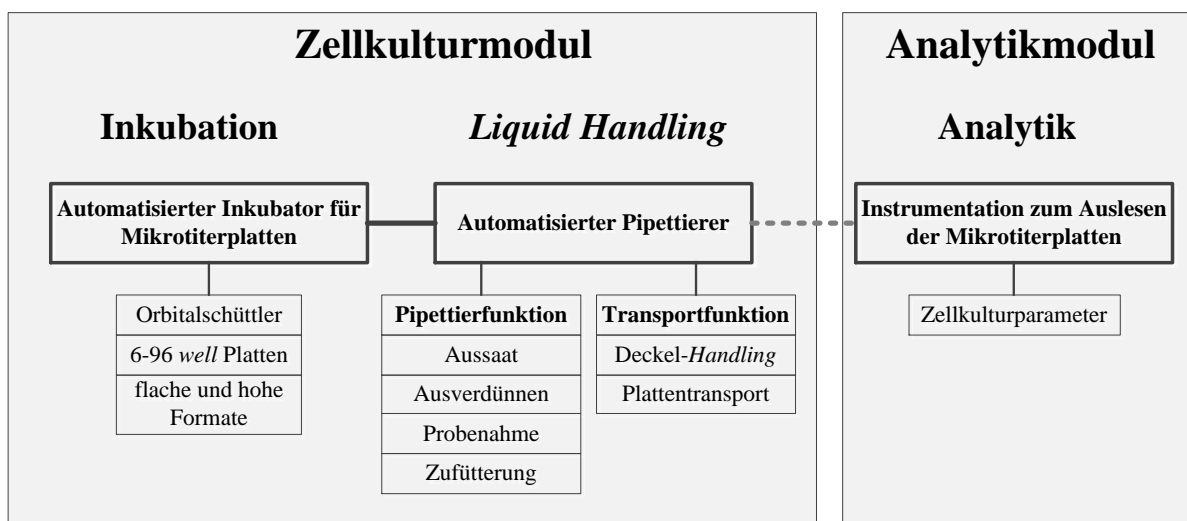


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten des *Proof of Concept* Systems, bestehend aus einem automatisierten Zellkulturmodul und einer entkoppelten Analytik. Der Transfer von Verbrauchsmaterial zwischen den beiden Modulen erfolgt manuell.

Um den Anforderungen an ein kostengünstiges System geringer Komplexität nachzukommen werden Einzel-Geräte durch eigene Integration automatisiert. Der Durchsatz des Systems soll mit bis zu 200 Parallelkultivierungen im geringen bis mittleren Bereich liegen und das System soll auf Basis von 6 well Platten als Kultursysteme etabliert werden. In dem Analytikmodul werden 96 well Mikrotiterplatten eingesetzt, um Limitierungen im Durchsatz zu vermeiden. Schwerpunktmäßig umfasst der Aufbau des PoC-Systems das Hardware-Setup von Zellkultur- und Analytikmodul, die Integration der Geräte mit dem Etablieren der Software-Kommunikation und die Entwicklung von Pipettierprotokollen zur Entnahme einer Probe und Zugabe von Nährlösungen.

5.1.1.2. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten des Zellkulturmoduls

Die Verwendung von 6 *well* Platten erfordert den Einsatz eines *Liquid Handlers* mit spreizbaren Einzelkanälen. Außerdem muss der Transport der Verbrauchsmaterialien gewährleistet sein und eine direkte Verbindung zu einem automatisierten Inkubator mit Orbital-Schüttelfunktion bestehen (vgl. Kap. 5.2.). Zur Durchführung der Analytik in dem Analytikmodul oder durch Kooperationspartner erfolgt der Transfer von Mikrotiterplatten hingegen manuell. Zur Auswahl der Hardware-Komponenten sind eine genaue Analyse des Marktes und eine stetige Bewertung von Komponenten und Angeboten erforderlich.

5.1.1.2.1. Automatisierter Liquid Handler

Auf Grund der steigenden Bedeutung der Laborautomation im Bereich der Biotechnologie stehen dem Anwender eine Vielzahl automatisierter *Liquid Handling* Systeme von zahlreichen Herstellern zur Verfügung. Jedes Systems weist seine individuellen Stärken und Schwächen auf und kann mit einer großen Anzahl an Zubehörteilen ausgestattet werden. In dem PoC-System wird der *Liquid Handler* für den Einsatz im Zellkulturbereich und für das Arbeiten mit 6 *well* Platten ausgewählt. Folgende entscheidende Faktoren führen zu der Wahl des X150 der Xiril AG (Hombrechtikon, Schweiz):

- Einsatz von spreizbaren Einzelkanälen statt 96-Multikanalkopf zur Gewährleistung maximaler Flexibilität bei der Wahl verschiedener Mikrotiterplatten Geometrien.
- Verwendung von Einweg-Spitzen statt befestigter Nadeln. Der Einsatz von Nadeln erfordert effektive Reinigungsprotokolle sowie Validierungsprotokolle zum Nachweis der vollständigen Entfernung von Flüssigkeitsresten oder Zellbestandteilen.
- Wahl eines Systems, das mit Luftdruck statt mit Systemflüssigkeit arbeitet. Mit Systemflüssigkeit arbeitende *Liquid Handler* müssen aufwendig (Zeit, Abfall) gespült werden und es besteht eine erhöhte Kontaminationsgefahr.
- 20-30 % günstiger als vergleichbare Systeme für geringen bis mittleren Durchsatz [84].
- Verfügbarkeit großer Lagerkapazität für Verbrauchsmaterialien auf der Arbeitsfläche. Es werden keine zusätzlichen Komponenten zur Lagerung benötigt.
- Vorliegen des Quellcodes der Steuersoftware Lirix. Ebenso wird die Ansteuerung von Drittgeräten über eine serielle Schnittstelle (RS-232) unterstützt.
- Verfügbarkeit eines Greifwerkzeugs zum Transport von Verbrauchsmaterial.

Die Konfiguration der X150 Workstation wird auf Basis des angestrebten Durchsatzes von bis zu 200 Parallelkultivierungen gewählt und ist in Abbildung 56 in Kapitel 7.1.1.1.1. dargestellt. Es werden zwei Kanäle für ein Volumen bis zu 1 mL gewählt um eine ausreichende Durchmischung der zellhaltigen Proben zu erreichen. Die gewählten 200 μ L-Kanäle werden

vor allem für die Zugabe geringer Volumina von Nährlösungen in einem Fed-Batch Experiment verwendet. Ein Nachteil dieser Konfiguration liegt darin, dass nur zwei *wells* einer Mikrotiterplatte parallel bearbeitet werden können und somit der Durchsatz dieses Systems beschränkt ist. Eine weitere Limitierung zur Durchsatzerhöhung ergibt sich aus der Lagerkapazität für Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise Pipettenspitzenboxen.

5.1.1.2.2. Automatisierter Inkubator für Mikrotiterplatten

Während der Markt für *Liquid Handler* eine große Vielzahl aufweist, stehen in dem Bereich orbital geschüttelter, automatisierter Inkubatoren für Mikrotiterplatten nur zwei Hersteller zur Auswahl: Thermo Fisher Scientific (Langensfeld, Deutschland) mit dem Cytomat Tower Shaker (Cytomat 2 C450-LIN-ToS) und die Liconic AG (Mauren, Liechtenstein) mit dem STX-44 und der „*Orbital Shaking Option*“. Beide Inkubatoren sind mit jeweils zwei Kassetten zur Lagerung der Mikrotiterplatten ausgestattet. Die Konfiguration dieser, d.h. Anzahl und Abstand der Lagerpositionen, ist jeweils frei wählbar und nur in der Kassettenhöhe beschränkt. Zentrale Unterschiede dieser beiden Inkubatoren sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Vergleich zwischen den beiden verfügbaren automatisierten Inkubatoren mit Orbitalschüttler Cytomat 2 C450-LIN-ToS (Thermo Scientific) und STX-44 mit „Orbital Shaking Option“ (Liconic AG) [85,86].

Parameter	Cytomat 2	STX-44	Bemerkung
Antriebstechnik	Kassette auf Eisenkern, die über oszillierendes Magnetfeld geführt wird	Antriebsriemen	Antriebsriemen ist wartungsanfälliger
Exzentrizität	1 mm; 1,5 mm	0,5 mm; 1,5 mm; 3 mm	für 6 <i>well</i> Platten werden 3 mm Exzentrizität benötigt
Generierung von Luftfeuchte	Wasserbad am Boden	Dampfinjektionsdüse am Boden	schnelleres Erreichen der Luftfeuchte durch Dampfinjektion (Daten nicht gezeigt)
Regelung der Frequenz	unabhängig für beide Kassetten	gleich für beide Kassetten	unabhängige Regelung erhöht Flexibilität bei zeitgleicher Inkubation verschiedener Platten-Geometrien

Das zentrale Entscheidungskriterium für den Liconic STX-44 Inkubator stellt die Verfügbarkeit einer großen Exzentrizität von 3 mm dar, welche für die Kultivierung von 6 *well* Platten benötigt wird. Dies kann im Rahmen von *Computational Fluid Dynamics*- (CFD) Simulationen gezeigt werden (vgl. Kap. 5.2.1.2.) Zusätzlich gewährleistet dieser durch die verfügbare Dampfinjektion eine schnelle Generierung sehr hoher Luftfeuchte (größer 95 %) zur Minimierung von Verdunstungseffekten (vgl. Kap. 5.2.2.4.). Die gewählte Konfiguration des Inkubators ist in Kapitel 7.1.1.1.2. dargestellt. Über das STXPanel von Liconic kann dieser angesteuert werden und es können über das Senden von Kurzbefehlen Mikrotiterplatten ein- und ausgeschleust werden. Mit diesem Terminal-Modus kann der

Inkubator direkt angesteuert werden und benötigt keine weitere Steuer-Software (vergleiche Abbildung 68 im Anhang, Kap. 10.). Für die Integration des Inkubators wird eine 100 cm Transferstation gewählt, welche die Mikrotiterplatten von dem Inkubator auf den Arbeitsbereich des *Liquid Handling* Systems transportiert.

5.1.1.3. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten des Analytikmoduls

Die Auswahl der Komponenten für das Analytik-Modul erfolgt auf Basis der analytischen Fragestellung und der nachzuweisenden Analyten. Bei der Zellkultivierung interessieren vor allem die Prozess-charakterisierenden Parameter Lebendzell-dichte sowie Produkt- und Metabolitkonzentrationen. Der Fokus der entwickelten analytischen Methoden liegt dabei auf Absorptions-basierten und Fluoreszenzmikroskopie-basierten Messmethoden in Mikrotiterplatten. Eine Übersicht der analytischen Methoden, die in dem PoC-System zum Einsatz kommen, ist in Tabelle 29 (Kap. 7.2.) gegeben.

Neben einem *Liquid Handler*, der auf die Verwendung von 96 well Mikrotiterplatten ausgelegt ist, werden ein Absorptionsspektrometer und ein Fluoreszenzmikroskop benötigt. Zur Durchführung spezieller Analysen, wie dem ELISA, ist weiterhin ein Waschgerät für Mikrotiterplatten erforderlich. Zur Minimierung von Verdunstungsphänomenen wird zusätzlich ein Gerät zum Verschweißen von Mikrotiterplatten eingesetzt. Neben der Automatisierung der Einzelgeräte soll eine Integration der entwickelten Pipettier- und Auswertungsprotokollen in ein vollständig automatisiertes System mit integrierter Analytik gewährleistet sein. Für den Aufbau des Analytikmoduls werden Hardware-Komponenten aus dem Gerätebestand der Abteilung verwendet, um die Kosten so gering wie möglich zu halten. Diese werden gegebenenfalls modifiziert. Abbildung 9 zeigt die verwendeten Komponenten, die auch in Tabelle 18 (Kap. 7.1.1.) aufgelistet sind.

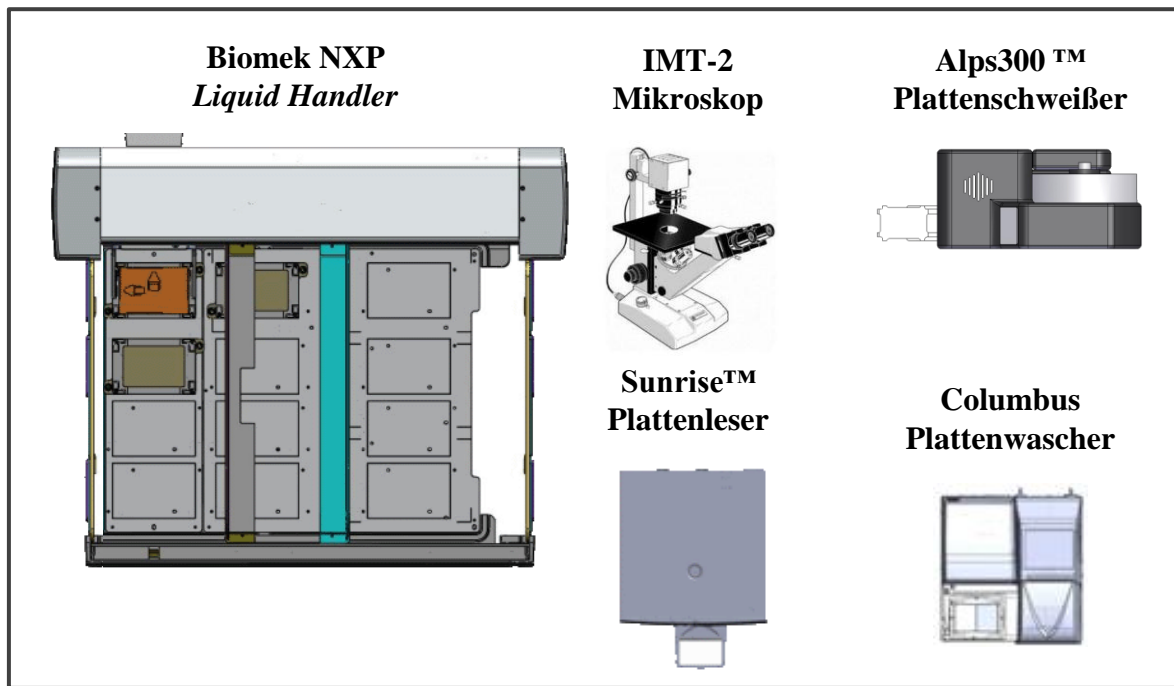


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Einzelkomponenten des entkoppelten Analytikmoduls des *Proof of Concept Systems*, bestehend aus einem *Liquid Handler* mit 96-Multikanalkopf, einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop, einem Mikrotiterplattenleser für Absorption, einem Mikrotiterplatten-Schweißgerät und einem Mikrotiterplatten-Waschgerät. Alle Zeichenelemente werden von Agilent Technologies bezogen mit Ausnahme des Mikroskops [87].

Bei der Arbeit mit 96 *well* Mikrotiterplatten wird ein *Liquid Handler* mit 96-Multikanal-Kopf benötigt, der über die Funktion verfügt, eine einzelne Spalte von Pipettenspitzen aufzunehmen. Dies erleichtert und beschleunigt die Vorbereitung von Verdünnungen. Zur Einsparung von Laborfläche sollte er über eine geringe Standfläche verfügen und zur Gewährleistung der Integration von Drittgeräten offen aufgebaut sein (*open frame desing*). All diese Anforderungen werden von dem Biomek[®] NXP (Beckman Coulter, Krefeld) erfüllt.

Wesentliche Merkmale des zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmikroskop IMT-2 der Firma Olympus stellen ein automatisierter Tisch für Mikrotiterplatten und eine Kamera dar. Die Bildverarbeitungssoftware Image-Pro plus (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA) übernimmt sowohl die Steuerung des Mikroskopsystems als auch die Auswertung aufgenommener Bilder anhand definierter Parameter. Die Automatisierung des für die Bestimmung von Zelldichte und Viabilität der Zellkulturen genutzten Fluoreszenzmikroskops ist in Kapitel 7.1.1.2.2. beschrieben. Auf Grund langer Analysezeiten stellt dieses System eine Durchsatz-limitierende Komponente dar.

Zur Absorptions-basierten Bestimmung der Produkt-, Metabolit- und Nährstoffkonzentration werden Geräte zum Auslesen der Absorption, Waschen und Verschweißen von Mikrotiterplatten benötigt. Der zur Verfügung stehenden Mikrotiterplattenleser Sunrise gewährleistet eine hohe Schnelligkeit und Genauigkeit. Die Geräte zum Waschen (Columbus) und Verschweißen (Alps300[™]) von Mikrotiterplatten werden nur für die

Konzentrationsbestimmung von Antikörpern verwendet. Eine genaue Beschreibung der Funktionalität der Hardware-Komponenten ist in Kapitel 7.1.1.2. gegeben.

5.1.1.4. Integration der Hardware und Etablieren der Software-Kommunikation

Für die Automatisierung des Zellkulturmoduls ist neben der Integration der Hardware-Komponenten *Liquid Handler* und Inkubator die Implementierung der Softwarekommunikation über die Lirix-Steuersoftware erforderlich. Auf diese Weise werden das automatische Aus- und Einschleusen der Zellkulturplatten und der anschließende automatische Transport dieser auf die Arbeitsfläche des X150 ermöglicht. Hier erfolgt anschließend das *Liquid Handling* mit dem Entnehmen einer Probe und in einem Fed-Batch Experiment die Zugabe einer Nährlösung. Dieser Prozess bildet die Grundlage zur Durchführung eines automatisierten Zellkulturprozesses.

Der *Liquid Handler* wird steril (Klasse 2) eingehaust und über eine 100 cm Transferstation mit dem außerhalb der Einhausung platzierten Inkubator verbunden. Dazu wird die Transferstation durch eine seitliche Öffnung der Sterileinhausung geführt und auf der Arbeitsfläche des X150 platziert. Mit dem Greifwerkzeug kann der X150 die Mikrotiterplatte direkt greifen und diese nach der Prozessierung auf die Transferposition zurückstellen (Abbildung 10)

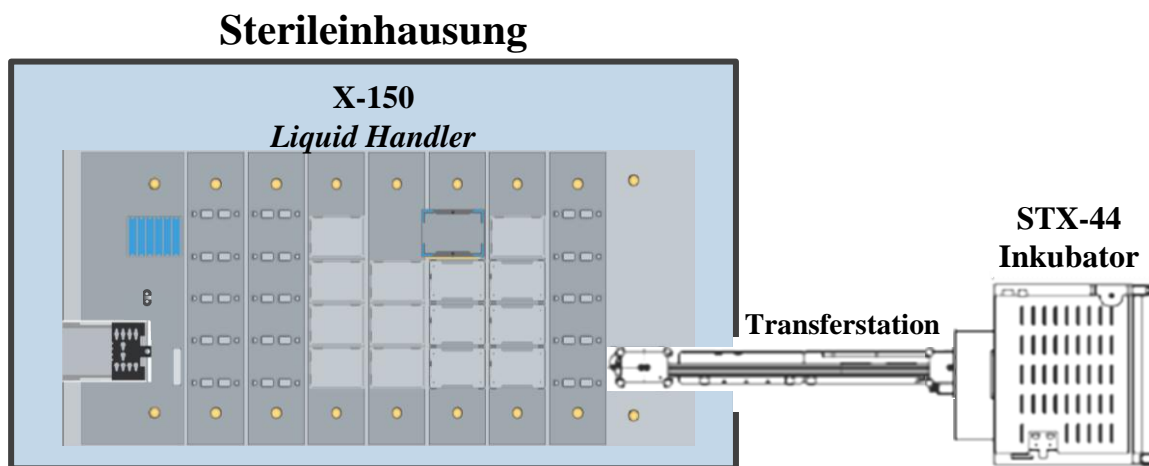


Abbildung 10: Integration des Zellkulturmoduls. Der steril eingehauste *Liquid Handler* ist über eine Transferstation für Mikrotiterplatten mit dem außerhalb der Einhausung platzierten Inkubator verbunden. Zeichenelemente stammen aus der Lirix-Software und von Thermo Scientific.

Zur Etablierung der Software-Kommunikation zwischen *Liquid Handler* und Inkubator werden zunächst die Abmessungen und die Position der Transferstation auf der Arbeitsfläche des X150 definiert um auf diese zugreifen zu können.

In einem zweiten Schritt erfolgt die direkte Ansteuerung des Inkubators über den Befehl „Send RS232 Command“ in der Lirix-Software. Dieser Befehl ermöglicht die Ansteuerung

von Drittgeräten, die über eine serielle Schnittstelle (COM-Port) an den Steuerrechner angeschlossen sind. Durch das Senden der von Liconic zur Verfügung gestellten Kurzbefehle können Mikrotiterplatten aus jeder beliebigen Position der beiden Kassetten aus- und eingeschleust werden. Der Befehl zum Aus- bzw. Einschleusen einer Platte setzt sich aus drei Kurzbefehlen zusammen:

- Definition der Kassette („wr dm0 x“). Dabei definiert x die Nummer der Kassette und kann Werte zwischen 1 und 2 annehmen.
- Definition der Ebene (wr dm5 y). Dabei definiert y die Ebene und kann Werte in Abhängigkeit der gewählten Kassetten-Konfiguration annehmen.
- Aktion zum Ausschleusen („st 1905“) oder Einschleusen („st 1904“).

Liconic gibt für den STX-44 eine Reaktionszeit von 200 ms zur Annahme von Befehlen an, welche bei der Programmierung dieser Befehlsfolge beachtet werden muss. Das zu schnelle, sequentielle Senden einer Folge von Kurzbefehlen führt zu einer fehlerhaften Übermittlung des Gesamtbefehls. Dieses Problem wird durch das Setzen einer Verzögerung von 1 Sekunde nach jedem Kurzbefehl umgangen. Des Weiteren werden bei der Ansteuerung eines Drittgerätes die Definition des belegten COM-Ports sowie die Einstellungen dieses Ports (Tabelle 49 im Anhang, Kap.10.) benötigt. Eine beispielhafte Befehlszeile zum Ausschleusen einer Mikrotiterplatte in der Lirix-Software ist in Abbildung 73 (Anhang, Kap. 10.) dargestellt.

Die Hardware-Komponenten des Analytikmoduls werden nicht integriert und als Einzelgeräte verwendet. Zur Ansteuerung wird die jeweilige Geräte-spezifische Software verwendet (vgl. Tabelle 46, Kap. 7.3.).

5.1.1.5. Systemfunktionsbeschreibung

Der Zusammenhang zwischen dem Aufbau und der Funktionsweise des entwickelten PoC-Systems einerseits und die Einbindung von Kooperationen mit internen Analytikabteilungen andererseits ist in Abbildung 11 dargestellt. Für die Ansteuerung von Zellkultur- und Analytikmodul werden verschiedene Software-Pakete verwendet. Analysedaten werden manuell in eine Datenbank importiert, da die direkte Kommunikation mit der Steuersoftware der eingesetzten Hardware-Komponenten nicht möglich ist. Der Transfer zu dem Analytikmodul erfolgt manuell, während der Plattentransport innerhalb des Zellkulturmoduls automatisiert ist. Dies entspricht einem teilautomatisierten Konzept.

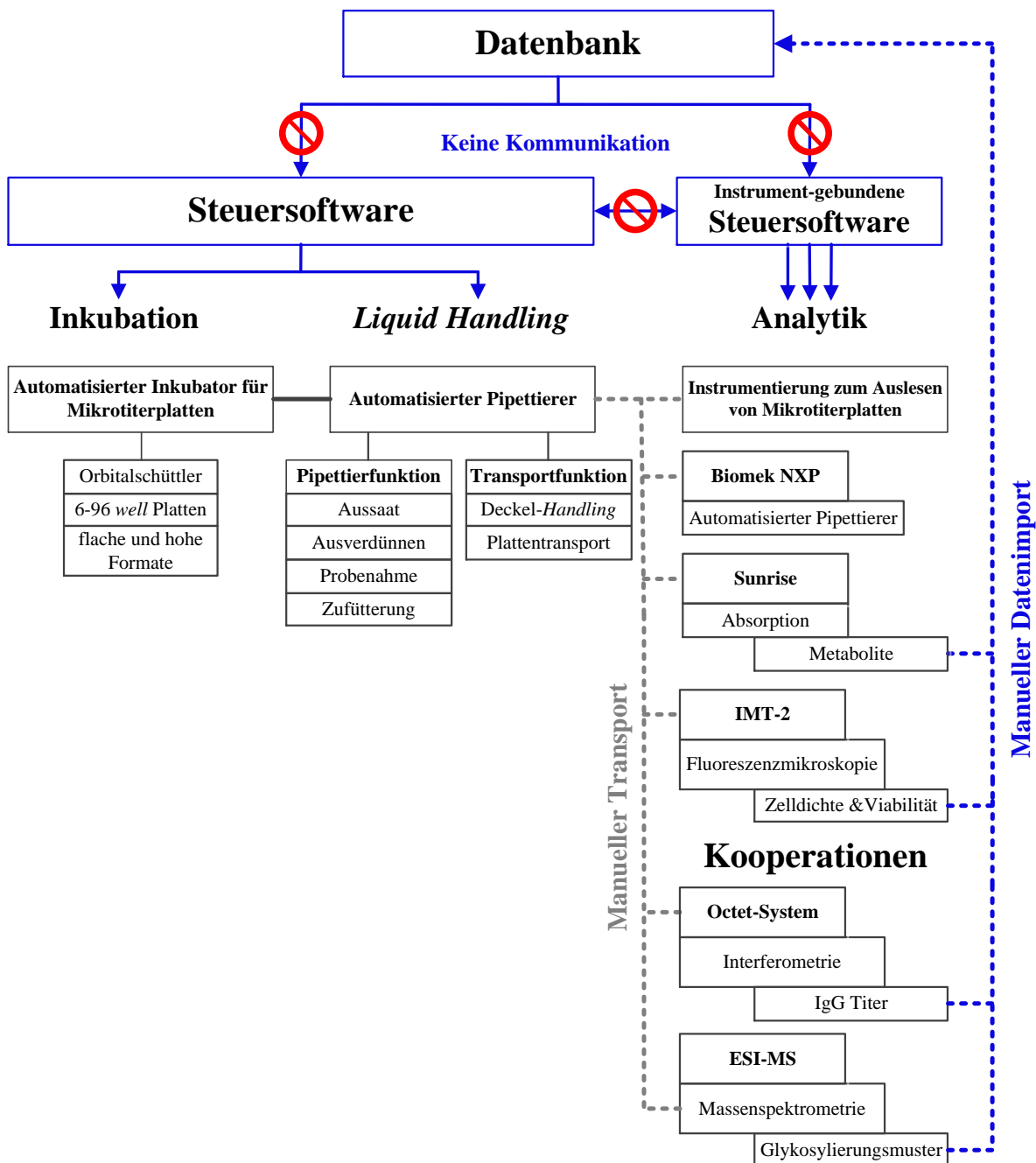


Abbildung 11: Schematische Darstellung von Aufbau und Funktionalität des *Proof of Concept* Systems. Zusätzlich sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Kooperationen mit der Analytik-Fachabteilung der Roche Diagnostics GmbH dargestellt. Das automatisierte Zellkulturmodul, bestehend aus den Teilbereichen Inkubation und *Liquid Handling*, wird über eine Software gesteuert, während die Einzelkomponenten des entkoppelten Analytikmoduls jeweils über die Instrument-gebundene Steuer-Software bedient werden. Es ist keine Software-Kommunikation zwischen diesen beiden Modulen möglich und der Transport von Mikrotiterplatten zwischen diesen sowie zu den Kooperationspartnern erfolgt manuell. Die generierten Messergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert und den jeweiligen Experimenten zugeordnet. Eine Kommunikation zwischen dieser Datenbank und der jeweiligen Steuer-Software ist nicht möglich. IgG: Immunglobulin Typ G; ESI-MS: Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie.

5.1.1.6. Programmierung und Methodenentwicklung

Die Programmierung und Methodenentwicklung für das Zellkulturmodul erfolgt in der Lirix-Steuerungssoftware. Die mehrstufige Architektur der Software ist in Abbildung 12 dargestellt.

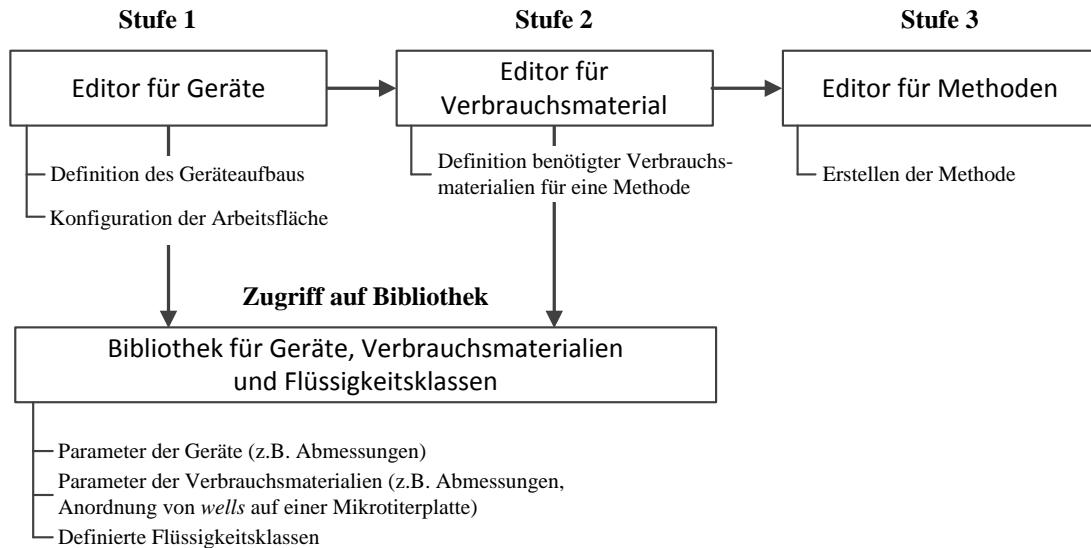


Abbildung 12: Darstellung der mehrstufigen Architektur der Lirix-Software. Die Editoren für Geräte und Verbrauchsmaterial greifen auf eine Software-eigene Datenbank zu. Nach Konfiguration aller erforderlichen Parameter wird eine Methode in dem Methodeneditor erstellt.

Eine *scheduling*-Funktion für die Organisation und Zeitplanung von Prozessen durch die Software ist nicht vorhanden, was zu einer sequentiellen Bearbeitung der programmierten Prozesse führt. Durch Ziehen und Ablegen (*drag and drop*) vordefinierter Aktionen in einem Eingabeassistenten des Editors für Methoden (vergleiche Abbildung 71 im Anhang, Kap. 10.) können Methoden (Arbeitsabläufe) definiert werden. Zu Beginn der Programmierung müssen sämtliche verwendeten Geräte und Materialien in einer Software-eigenen Bibliothek hinterlegt werden, die sämtliche Definitionen von Geräten, Verbrauchsmaterialien und Flüssigkeitsklassen enthält. Für die Verwendung von Mikrotiterplatten der Formate 6 well, 12 well, 24 well und 48 well sowie Reservoirien für Nährlösungen müssen neue Definitionen angelegt werden. Zellkulturmedien und Zufütterlösungen unterscheiden sich in der Regel stark in ihren physikalischen Eigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung) von den vordefinierten, hinterlegten Flüssigkeiten. Die Optimierung von Flüssigkeitsklassen stellt daher einen zentralen Punkt für die Gewährleistung der Pipettiergenauigkeit dar. In Abbildung 69 und Abbildung 70 (Anhang, Kap.10.) sind die zu optimierenden Parameter am Beispiel von Wasser dargestellt. Die genaue Definition der in dieser Arbeit optimierten Flüssigkeitsklassen unterliegt der Geheimhaltung und kann in dieser Arbeit nicht veröffentlicht werden.

Zur Minimierung von Verdunstungseffekten und zur Aufrechterhaltung der Sterilität werden alle Zellkulturplatten mit einem Deckel verschlossen (vgl. Kap. 5.2.2.). Für das Entnehmen einer Probe oder die Zugabe einer Nährlösung muss das Abnehmen und Aufsetzen dieses

Deckels ermöglicht werden. In der Lirix-Software ist jedoch die Verwendung eines Mikrotiterplattendeckels nicht vorgesehen. Zur Lösung dieses Problems ist eine eigene, in Abbildung 13 beschriebene, Entwicklung erforderlich. Die Abläufe in dem Programm der Lirix-Software sind den Abläufen auf der Arbeitsfläche des X150 gegenübergestellt.

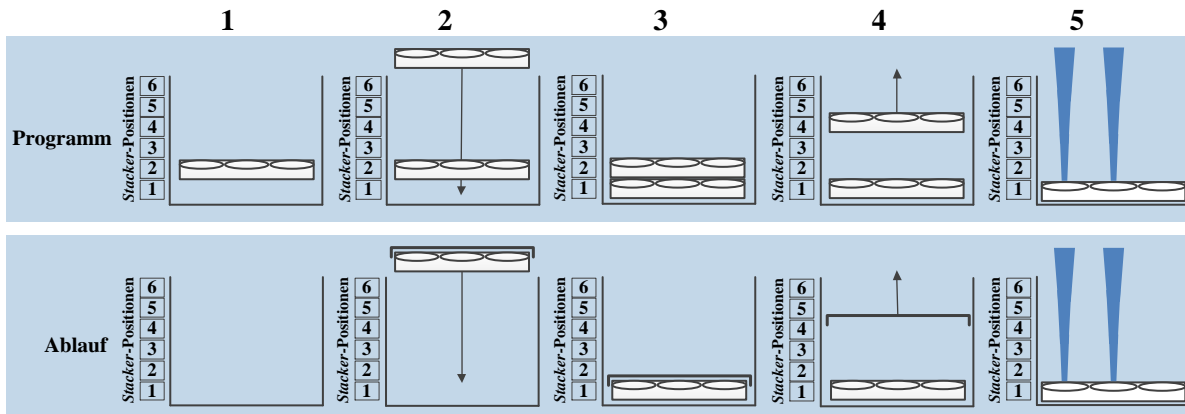


Abbildung 13: Vorgehen bei dem Abnehmen und Aufsetzen eines Mikrotiterplattendeckels mit der Lirix-Software, in der keine Deckel für Mikrotiterplatten vorgesehen sind. In dem oberen Teil ist der Ablauf in dem Programm mit den einzelnen Aktionen beschrieben, in der unteren ist der resultierende Ablauf auf dem Arbeitsbereich des X150 dargestellt. (1) Definition des Deckels als stapelbare Platte auf Position 2 eines *Stackers* in der Software. (2) Die zu bearbeitende Platte wird (mit einem aufgesetzten Deckel) auf Position 1 des *Stackers* gestellt. In dem Programm wird die Platte unter den auf Position 2 liegenden Deckel gestellt. (3) Der Deckel liegt nun auch in dem Programm auf der Platte auf und kann in (4) abgenommen werden. (5) Das *Liquid Handling* in der Platte kann erfolgen.

Eine besondere Schwierigkeit bei dem Pipettieren zellhaltiger Proben liegt in der gleichmäßigen Verteilung der Zellen in der Suspension. Die Zellen beginnen zu sedimentieren, sobald die Zellkulturplatte aus dem orbital geschüttelten Inkubator ausgeschleust wird. Um eine homogene Verteilung der Zellen zu erreichen, wird die Durchmischung der Probe bei gleichzeitigem Mixen (Resuspendieren) und Schütteln (Mikrotiterplatten-Schüttler Teleshake) der Zellsuspension auf dem *Liquid Handler* optimiert. Dabei werden die Parameter Schüttelfrequenz, Position der Pipettenspitzen im *well*, Volumen und Anzahl der Mixschritte variiert. Bei der Optimierung einer automatisierten Methode zur Entnahme einer homogenen zellhaltigen Probe wird wie folgt vorgegangen:

1. Füllen aller *wells* einer 6 *well* Platte mit dem gleichen Volumen einer zellhaltigen Suspension gleicher Zelldichte. Einschleusen der Platte in den STX-44.
2. Geschüttelte Inkubation dieser Platte für 10 Minuten in dem STX-44.
3. Ausschleusen der Platte und Positionierung dieser auf dem Mikrotiterplattenschüttler Teleshake auf der Arbeitsfläche des X150.
4. Starten des Schüttlers.
5. Mixen der Suspension an unterschiedlichen Positionen innerhalb jedes *wells* der Platte.
6. Entnahme einer Probe (500 μ L) in der Mitte jeden *wells* und Bestimmung der Zelldichte für die Proben aller *wells* mit dem Cedex HiRes Analysesystem.

Bei den Punkten 4-6 werden die oben genannten Parameter variiert. Für das Testen eines neuen Parametersatzes wird jeweils eine neue Zellkulturplatte gefüllt. Von einer homogenen Durchmischung und einer reproduzierbaren Probenahme wird ausgegangen, wenn der Variationskoeffizient kleiner 10 % liegt (Daten nicht gezeigt). Nur durch gleichzeitiges Schütteln der Mikrotiterplatte und mehrmaliges Resuspendieren mit einem Volumen von 1 mL an verschiedenen Positionen des *wells* kann eine ausreichende Durchmischung erzielt werden. Die genauen Spezifikationen der Pipettierprotokolle unterliegen der Geheimhaltung. Diese optimierten Einstellungen werden in die Gesamtmethode zur Entnahme einer Probe und Zugabe einer Nährlösung integriert (Abbildung 14). Mit dieser Methode und der verfügbaren Kapazität des Inkubators kann ein Durchsatz von bis zu 204 Parallelkultivierungen erreicht werden.

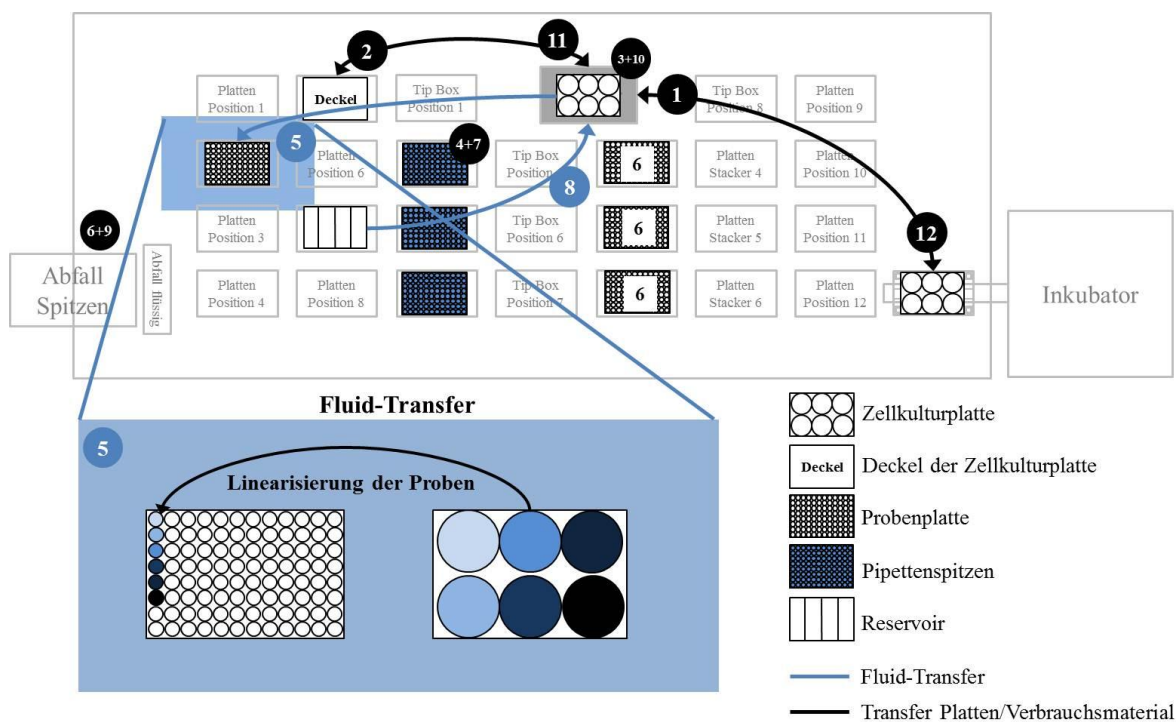


Abbildung 14: Ablauf einer Probenahme mit Zufütterung in dem Zellkulturmodul des Proof of Concept Systems beginnend mit dem Ausschleusen einer Zellkulturplatte aus dem Inkubator.

1. Ausschleusen der Zellkulturplatte und Transport dieser auf den Schüttler des X150.
 2. Abnehmen des Deckels der Zellkulturplatte.
 3. Starten des Schüttlers.
 4. Aufnahme von sterilen Pipettenspitzen für die Entnahme einer Probe.
 5. Resuspendieren der zellhaltigen Suspension und Entnahme einer Probe aus jedem *well* der Zellkulturplatte und Verteilen dieser auf eine 96 *well* Probenplatte, die dem Analytikmodul zugeführt wird.
 6. Abwurf gebrauchter Pipettenspitzen.
- Wiederholung der Punkte 4 bis 6 bis sämtliche *wells* einer Platte bearbeitet sind.**
7. Aufnahme von sterilen Pipettenspitzen für die Zugabe einer Nährlösung.
 8. Zugabe der Nährlösung aus einem Reservoir.
 9. Abwurf gebrauchter Pipettenspitzen.
 10. Stoppen des Schüttlers.
 11. Aufsetzen des Deckels der Zellkulturplatte.
 12. Transport der Zellkulturplatte auf die Transferstation des Inkubators und Einschleusen dieser.

Eine schematische Übersicht zu der verwendeten Methode ist in Abbildung 73 (Anhang, Kap. 10.) gegeben. Der erfolgreiche Einsatz des entwickelten Systems bei der Durchführung von Fed-Batch-Experimenten ist in Kapitel 5.2.3.2. dargestellt. Im Rahmen dieser Experimente wird festgestellt, dass Transportprozesse, die direkt auf einem *Liquid Handling* System durchgeführt werden, viel Zeit benötigen und somit den Durchsatz des Systems einschränken. Die Machbarkeit kann mit den erzielten Ergebnissen der Fed-Batch Experimente bestätigt werden.

5.1.1.7. Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird der erfolgreiche Aufbau eines modularen teilautomatisierten, Mikrotiterplatten basierten *Proof of Concept* Systems zur Durchführung von Fed-Batch Experimenten mit bis zu 204 Parallelkultivierungen beschrieben. Dieser Prototyp wird aus einer bisher unveröffentlichten Kombination aus Hardware-Komponenten zusammengestellt. Mit Hilfe der parallel entwickelten, miniaturisierten Assays können die Kultivierungsparameter Zelldichte, Glukose- und Laktatkonzentration in dem entkoppelten Analytikmodul teilautomatisiert durchgeführt werden.

Zentrale Punkte bei dem Aufbau des Systems stellen die Erarbeitung eines Automatisierungskonzepts, die Auswahl und Bewertung benötigter Hardware-Komponenten, die Integration und die Programmierung von Methoden zum automatisierten Ablauf von Transport- und *Liquid-Handling*-Vorgängen dar. Dabei sind die Wahl eines zur Mikrotiterplatten-Kultivierung geeigneten, automatisierten Inkubators mit Schüttelfunktion sowie das reproduzierbare, automatisierte *Liquid Handling* von Suspensions-Zellkulturen die größten Herausforderungen. Auf Grund von CFD-Simulationsergebnissen (Kap. 5.2.1.2.) und einer Bewertung der verfügbaren Konfigurationen wird der STX-44 von Liconic gewählt. Dieser Inkubator stellt das einzige kommerziell verfügbare System mit einer Exzentrizität von 3 mm dar, welche für die Kultivierung von 6 *well* benötigt wird. Geringe Kosten und die Verfügbarkeit einer Software mit offenem Quellcode sowie der Möglichkeit zur Ansteuerung von Drittgeräten sind die zentralen Punkte, die zu der Wahl des X150 von Xiril geführt haben. Für das Analytikmodul werden Komponenten eingesetzt, die eine schnelle und präzise Durchführung von Assays auf Basis von 96 *well* Mikrotiterplatten ermöglichen. Zu diesem Zweck erfolgt eine zeitgleiche Entwicklung miniaturisierter und automatisierter Methoden zur Quantifizierung von Metaboliten und produziertem Antikörper.

Die Integration der Zellkultur-Komponenten erfolgt in der Steuersoftware des X150 über eine serielle Schnittstelle. Auf diese Weise können Mikrotiterplatten automatisiert ausgeschleust, auf dem *Liquid Handler* prozessiert und anschließend wieder eingeschleust werden. Diese Integration stellt den Grundbaustein zur Durchführung eines automatisierten Fed-Batch-Experimentes dar.

Im Rahmen der Methodenentwicklung werden Grundlagen für das *Liquid Handling* geschaffen sowie Protokolle zur Durchführung eines automatisierten Fed-Batch-Experiments entwickelt. Dabei erfordert das *Liquid Handling* von Zellkulturen eine aufwändige Optimierung von Pipettierprotokollen für die reproduzierbare Entnahme einer zellhaltigen Probe zur Bestimmung der Zelldichte. Nur das mehrmalige Resuspendieren mit einem großen Volumen von 1 mL bei gleichzeitigem orbitalen Schütteln der Zellkulturplatte gewährleistet eine homogene Verteilung der Zellen in der Lösung. Außerdem ist eine Optimierung der Flüssigkeitsklassen erforderlich.

Folgende Punkte können auf Grund der gewählten, eigenen Integration von Einzel-Geräten identifiziert und für die Planung des Produktivsystems berücksichtigt werden:

- Bestimmung des *Liquid Handlers* und des automatisierten Mikroskops als größte Durchsatz-limitierende Komponenten. Es wird eine größere Anzahl an Pipettierkanälen sowie ein schnelleres Mikroskopsystem benötigt.
- Zur Durchsatzerhöhung ist ebenfalls eine möglichst große Lagerkapazität für Verbrauchsmaterial erforderlich, insbesondere für Pipettenspitzenboxen.
- Transportprozesse auf einem *Liquid Handler* sind langsam, die Verwendung eines Plattentransportroboters kann diese Prozesse beschleunigen und bietet eine höhere Flexibilität. Des Weiteren soll die Aufstellfläche des *Liquid Handlers* minimiert werden.
- Zur Vermeidung von Probenverwechslungen durch manuelle Schritte und Sicherstellung der Integrität des Gesamtsystems ist eine integrierte Analytik erforderlich.
- Eine Steuer-Software mit *scheduling*-Funktion kann den Gesamtprozess beschleunigen und effizienter gestalten.

Im Rahmen der Entwicklungsarbeiten zum Aufbau eines *Proof of Concept* Systems wird ein automatisiertes Zellkultursystem mit entkoppelter Analytik zur Durchführung von Fed-Batch Experimenten entwickelt. Außerdem wird eine prozessbegleitende Analytik zur Messung der zentralen Kultivierungsparameter Produkt (Antikörper), Zelldichte, Glukose und Laktat bei einem Durchsatz von bis zu 204 Parallelansätzen auf Basis von 6 well Mikrotiterplatten entwickelt. Die Machbarkeit wird in einem erfolgreich durchgeführten Fed-Batch-Experiment gezeigt und stellt die Grundlage für den Aufbau eines Produktivsystems dar. Hierzu können die gewonnenen Erkenntnisse unmittelbar transferiert werden.

5.1.2. Produktivsystem

Die bei dem Aufbau des *Proof of Concept* Systems erarbeitete fachliche Expertise sowie die gesammelten Erfahrungen im Bereich automatisierter Systeme und dem *Liquid Handling* werden zur Erarbeitung eines Automatisierungskonzepts für ein vollständig automatisiertes Produktivsystem mit integrierter Analytik genutzt. Es soll die Möglichkeit zur eigenständigen Durchführung eines Fed-Batch-Experimentes geschaffen werden. Zuvor optimierte Protokolle sollen auf das Produktivsystem übertragen werden und die Implementierungsphase verkürzen. Zusätzlich sollen die identifizierten Durchsatz-limitierenden Komponenten durch leistungsfähigere ersetzt werden. Das Spektrum analytischer Methoden wird ebenfalls erweitert, neben weiteren Fluoreszenzmikroskopie-basierten Tests zur Detektion von Organellen, der Apoptose oder Charakterisierung der Proteinbiosynthese wird die Polymerasekettenreaktion als Werkzeug zur Transkriptomanalyse eingesetzt. Zur Bestimmung des pH-Wertes wird ein kommerzielles System getestet, welches eine nicht-invasive Messung durch den Einsatz von *sensor spots* in Platten ermöglicht (Presens GmbH, Regensburg, Deutschland). Auf Grund von Problemen mit den angebotenen Zellkulturplatten erfolgt keine Integration dieses Systems (vgl. Kap. 5.2.3.2.).

5.1.2.1. Erarbeitung eines Automatisierungskonzeptes

Im Fokus der Entwicklung des Produktivsystems liegen die Erhöhung des Durchsatzes und die Integration einer prozessbegleitenden Analytik zum Aufbau eines geschlossenen Systems ohne manuelle Eingriffe. Die Bereiche *Liquid Handling* und Analytik stellen im *Proof of Concept* System die wesentlichen Durchsatz-limitierenden Faktoren dar und werden in dem neuen System ersetzt. Zur weiteren Durchsatzerhöhung sollen neben Mikrotiterplatten mit 6 wells auch Formate mit bis zu 48 wells pro Platte zur Kultivierung eingesetzt werden können. Der Schwerpunkt wird auf Grund des guten Verhältnisses zwischen dem großen möglichen Kulturvolumens und einer hohen Reaktordichte auf 24 *deepwell* Platten gelegt (vgl. Kapitel 5.2.). Im Bereich der Analytik sollen Plattenformate bis zu 384 wells pro Platte eingesetzt werden. Zur Nutzung vorhandener Komponenten und der Minimierung von Kosten werden sämtliche Geräte selbst integriert.

Einen weiteren wichtigen Punkt stellt die Flexibilität des Gesamtsystems dar, welche eine stetige Erweiterung der Anlage ermöglichen und somit deren Modularität sicherstellen soll. Dazu wird ein Plattentransportroboter als zentrales Element verwendet, der die funktionalen Einheiten von Inkubation, *Liquid Handling* und Analytik miteinander verbindet. Im Bereich *des Liquid Handlings* wird zur Platzeinsparung nur noch ein Pipettierroboter für Zellkulturarbeiten und die Analytik verwendet, der Mikrotiterplatten in den Geometrien 6 bis 384 wells pro Platte bearbeiten kann. Die Analytikkomponenten zeichnen sich durch kürzere Analysezeiten und die Möglichkeit zur Verwendung von Mikrotiterplatten mit bis zu

384 *wells* pro Platte aus. Außerdem ermöglicht eine verbesserte Ausstattung und die erweiterte Funktionalität dieser Geräte die Implementierung neuer analytischer Methoden. Eine Erhöhung der Lagerkapazität für Verbrauchsmaterialien ermöglicht die Durchführung unbeaufsichtigter Fed-Batch-Experimente an Wochenenden oder Feiertagen.

Die Steuerung der Anlage erfolgt über eine zentrale Software mit *scheduling*-Funktion und der Möglichkeit zur Anbindung einer Datenbank. Auf diese Weise kann die Probenzuordnung optimiert werden, welche ein zentrales Problem teilautomatisierter Systeme darstellt. Aktuell ist kein System kommerziell verfügbar, welches folgende Kriterien erfüllt:

- Orbital geschüttelte Inkubation von Mikrotiterplatten mit 6 bis 48 *wells* pro Platte.
- Integrierte Analytik zur Charakterisierung rekombinanter, tierischer Zellkulturen (z.B. Wachstum, Stoffwechsel, Produktbildung) und deren Produkte (Ausbeute, Qualität).
- Möglichkeit zur eigenen, nachträglichen Integration von Komponenten und Methoden.
- Steuerung dieser Anlage über eine zentrale Software mit Datenbankanbindung.

Die Funktionalität des Produktivsystems soll anhand eines vollständig automatisierten Fed-Batch-Experiments bewiesen werden um die entwickelte Anlage im Routinebetrieb der Prozessentwicklung einsetzen zu können.

5.1.2.2. Identifikation, Bewertung und Auswahl der Hardware-Komponenten

Der Plattentransportroboter sowie der *Liquid Handler* stellen in dem Produktivsystem die zentralen und komplexesten Komponenten mit der höchsten Auslastung dar. Auf Grund des engen Zusammenspiels dieser Hardware-Komponenten erfolgt die Auswahl in Abstimmung mit einer gemeinsamen Steuersoftware des gleichen Herstellers. Auf diese Weise können Probleme vermieden werden, die sich aus der Integration ergeben, wie die Gewährleistung voller Funktionalität oder einer stabilen Software-Kommunikation in der Gesamtanlage. Komponenten geringerer Komplexität und Auslastung, wie Mikrotiterplattenleser, werden oft nicht vom Hersteller eines Plattentransportroboters und eines *Liquid Handlers* angeboten, können aber ohne größeren Aufwand von Drittanbietern bezogen und integriert werden. Neben der Anschaffung neuer Komponenten werden auch solche aus dem PoC-System verwendet. Diese werden bei dem schrittweisen Aufbau des Gesamtsystems der Reihe nach ausgewechselt. Eine zentrale übernommene Komponente stellt der orbital geschüttelte Inkubator STX-44 dar.

5.1.2.2.1. Kernsystem für Plattentransport und Liquid Handling mit gemeinsamer Steuersoftware

Mit der Entscheidung für ein System mit einem zentralen Plattentransportroboter können bereits einige Anbieter ausgeschlossen werden, die bei der Vorlage eines Pflichtenhefts kein System angeboten haben (z.B. Beckman Coulter, CyBio, Hamilton, Tecan, Xiril). Zur Verfügung stehende und für die nähere Auswahl bestimmte Roboter-Systeme sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Dabei wird die Firma Peak Robotics, Colorado, USA nicht aufgeführt, da sie weder eine eigene *scheduling*-Software noch einen *Liquid Handler* anbietet. Die Plattentransportroboter der KinedX-Serie werden standardmäßig in die Software von Drittanbietern integriert. Dieses hat den Nachteil, dass in der Regel nur Hauptfunktionen des Roboters integriert sind und keine volle Funktionalität gegeben ist, die gerade für Transportroboter zur Nutzung der vollständigen Flexibilität gewünscht ist. Für den weiteren Auswahlprozess erfolgt ein Vergleich der drei Komponenten Plattentransportroboter, *Liquid Handler* und Software.

Tabelle 7: Zur Verfügung stehende Komponenten der näheren Auswahl zum Aufbau des Kernsystems mit einem zentralen Plattentransportroboter.

Firma	Plattentransportroboter	Liquid Handler	Software
Agilent Technologies	Direct Drive Robot	Bravo Automated Liquid Handling Platform	VWorks
Caliper Life Sciences	Twister® II	Sciclone-Serie	iLink Pro
Thermo Scientific	CataLyst-5	kein eigener <i>Liquid Handler</i> verfügbar, Integration von Drittgeräten	Momentum™
Hudson Robotics	PlateCrane EX	verfügbare <i>Liquid Handler</i> sind ungeeignet für analytische Methoden mit hohem Durchsatz	SoftLinX™

Nur die Firmen Agilent Technologies und Caliper Life Sciences bieten eigene Produkte für alle drei benötigten Komponenten an. Während Thermo Scientific keinen eigenen Liquid Handler herstellt, sind bei Hudson Robotics nur Einkanal-Systeme verfügbar, die nicht für den hohen Durchsatz auf Basis von 96 oder 384 *well* Platten geeignet sind. Eine detaillierte Auflistung geforderter Spezifikationen ist in Tabelle 50 (Anhang, Kap. 10.) zusammengefasst. Im Folgenden werden die zentralen Punkte erläutert, die zur Wahl eines Agilent-Systems geführt haben.

Direct Drive Robot (DDR):

- Schnellster Plattentransportroboter auf dem Markt durch unbegrenzte Rotation um 360° und Direktantriebstechnik. Es wird eine Beschleunigung von Abläufen ermöglicht. Im Vergleich zu gängigen Sechachs-Robotern ist dieses System günstig.
- Einfacher Modus zur Definition von Positionen (*teaching-mode*). Verringerung des Aufwands bei der Integration von Neugeräten, Optimierung von Abläufen und Wahrung der Flexibilität und Modularität.

Bravo Automated Liquid Handling Platform:

- Einziges 96-Kanal-Kopf-System auf dem Markt mit der Möglichkeit zur Aufnahme einzelner oder beliebiger Anordnungen von Pipettenspitzen. Dies ist erforderlich um 6 bis 384 *well* Platten bearbeiten zu können. Alle *Liquid Handler* anderer Hersteller benötigen dafür ein teureres und größeres 2-Kopf-System (z.B. 96-Kanal-Kopf kombiniert mit einem spreizbaren 8 bis 16-Kanal-Kopf).
- Geringe Aufstellfläche (*footprint*).

VWorks Automation Control:

- Verfügt über eine *scheduling*-Funktion.
- Vollständige Kontrolle sämtlicher Funktionen des Direct Drive Robots und der Bravo Automated Liquid Handling Platform. Zusätzlich ist ein Diagnostic-Modus vorhanden, der eine manuelle Steuerung der Geräte und das Ausführen von Befehlen während eines laufenden Prozesses ermöglicht. Dieser bietet eine hohe Flexibilität, insbesondere bei der Fehlerbehandlung.

5.1.2.2.2. Analytische Instrumentierung

Das Cellavista[®] Analysesystem (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) ist ein kommerzielles, automatisiertes Fluoreszenzmikroskop und erhöht auf Grund eines automatisierten Objektivrevolvers und eines automatisierten Filterwechslers die Flexibilität bei dem Routine-Einsatz und der Entwicklung neuer Assays. Ebenso wird der Durchsatz mit diesem System im Vergleich zum vorher verwendeten IMT-2 Fluoreszenzmikroskop auf Grund reduzierter Analysezeiten erhöht. Ein wichtiges Entscheidungskriterium ist, dass dieses System von der Roche Diagnostics GmbH vermarktet wird.

Der Mikrotiterplattenleser Infinite[®] M200 PRO (Tecan Group Ltd. Männedorf, Schweiz) ist mit Monochromatoren zur Messung von Absorption und Fluoreszenz ausgestattet. Die hohe Präzision und Schnelligkeit dieses Systems sowie die Verfügbarkeit eines Moduls für die Begasung des Innenraums mit CO₂ stellen die wichtigsten Kriterien zur Wahl dieses Systems dar.

Als Ersatz für das Mikrotiterplatten-Waschgerät Columbus von Tecan wird der Elx405™ der Firma BioTek gewählt. Durch den Waschkamm (96-Kanal-Dual-Action™) wird neben einer Durchsatzerhöhung auch die Präzision des Waschvorgangs durch eine getrennte Steuerung der Aspirier- und Dispensiervorgänge erhöht. Außerdem bietet BioTek eine Ultraschallreinigung für die Kanäle an, die im automatisierten Betrieb über mehrere Wochen zur Vermeidung der Verblockung von Kanälen notwendig ist.

Mit der VSpin bietet Agilent Technologies die kleinste automatisierbare Zentrifuge mit einer Kapazität von zwei Mikrotiterplatten auf dem Markt an. Außerdem können auf der Zentrifuge weitere Geräte aufgestellt werden, was zu einer weiteren Platzeinsparung führt. Bei dem Mikrotiterplattenschweißgerät Plate Loc von Agilent kann auf Grund der geringeren Aufstellfläche eine weitere Platzeinsparung erreicht werden. Neben diesen Punkten spielt ein geringer Preis eine weitere Rolle.

Während der Entwicklungsarbeiten werden folgende analytische Komponenten des *Proof of Concept Systems* schrittweise ausgetauscht:

- Cellavista® Analysesystem ersetzt das automatisierte IMT-2-Mikroskop
- Infinite® M200 PRO ersetzt den Sunrise™
- Elx405™ ersetzt den Columbus
- PlateLoc ersetzt den Alps300™

Das für die jeweilige Applikation verwendete System wird in den entsprechenden Kapiteln erwähnt. Sämtliche auf dem Produktivsystem verwendete analytische Methoden sind in Tabelle 29 (Kap. 7.2.) zusammengefasst.

5.1.2.2.3. Inkubation

Neben dem orbital geschüttelten STX-44 Inkubator von Liconic (vgl. Kap. 5.1.1.2.2.) zur Kultivierung von Zellkulturen in Mikrotiterplatten wird ein gekühlter statischer Inkubator zur Lagerung von Reagenzien integriert. Ein Vergleich der angebotenen Modelle von Liconic und Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland) ergibt keine signifikanten Unterschiede. Die Wahl fällt auf den Cytomat® 2C von Thermo Scientific, da es das günstigste System ist und zudem ein lokaler Service in Deutschland verfügbar ist.

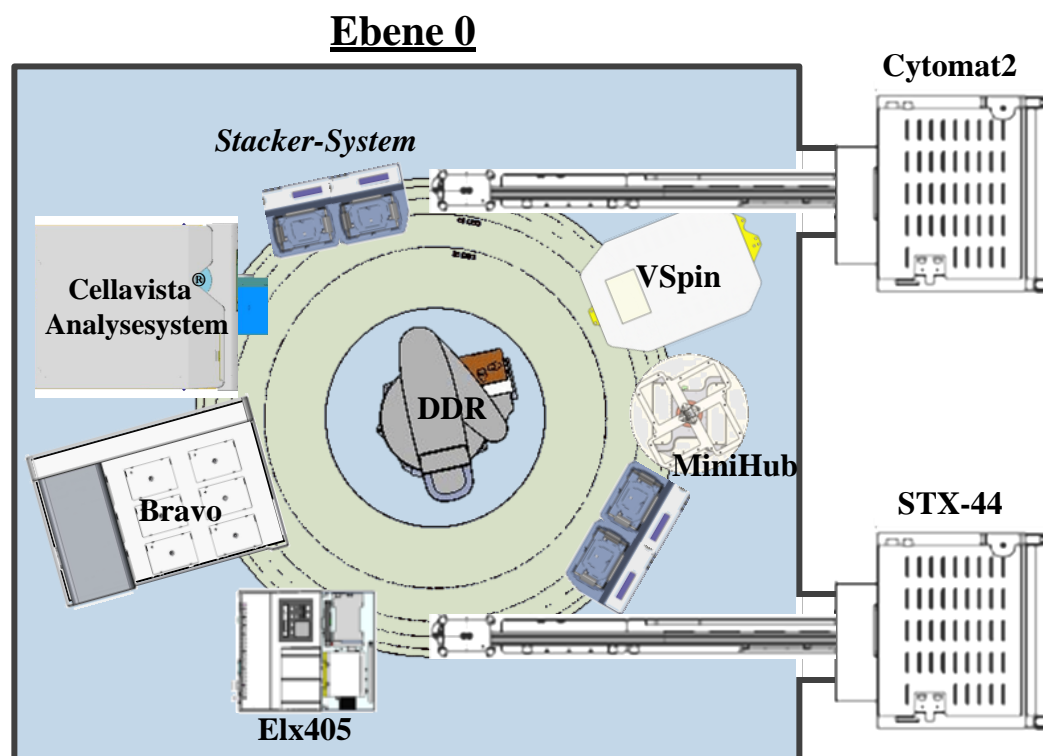
5.1.2.2.4. Lagersysteme für Verbrauchsmaterialien

Zur Vermeidung manueller Eingriffe in das System während des Betriebs und zur Durchführung unbeaufsichtigter Experimente an Wochenenden ist eine große Lagerkapazität für Mikrotiterplatten und Pipettenspitzen erforderlich. Diese wird im Produktivsystem im Laufe der Entwicklung stetig erweitert. Zu Beginn werden Regal-Systeme (*Stacker*) aus Edelstahl mit einer Kapazität für 48 Mikrotiterplatten und 7 Pipettenspitzenboxen verwendet, die direkt von Agilent Technologies als Zubehör bezogen werden. Danach wird der MiniHub

von Agilent als effizientes System mit geringer Aufstellfläche und hoher Lagerkapazität für bis zu 24 Pipettenspitzenboxen integriert. Mit dem Cytomat[®]800 Hotel von Thermo Scientific wird in der finalen Phase dieser Arbeit ein Lagersystem für bis zu 153 Mikrotiterplatten oder 63 Pipettenspitzenboxen, verteilt auf neun Kassetten integriert und der Vollausbau erreicht. Die Konfiguration der Kassetten kann frei gewählt werden und ermöglicht einen optimierten Einsatz für die jeweilige Applikation. Wesentliche Auswahlkriterien sind der Preis und die Verfügbarkeit eines lokalen Kundenservices. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Hardware-Komponenten sowie die jeweils gewählte Konfiguration sind in Kapitel 7.1.2. dargestellt.

5.1.2.3. Inbetriebnahme und Vernetzung der Komponenten

Zur Integration der Komponenten werden die Einzelgeräte in einer Sterilwerkbank der Klasse 2 mit Abluftfilter (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) um den zentral platzierten Plattentransportroboter ausgerichtet und befestigt (Abbildung 15). Die Inkubatoren befinden sich wie im PoC-System außerhalb der Sterilwerkbank und werden jeweils über eine 100 cm Transferstation integriert. Die Inkubatoren sind durch Tunnel mit der Sterileinhausung verbunden.



Ebene 1

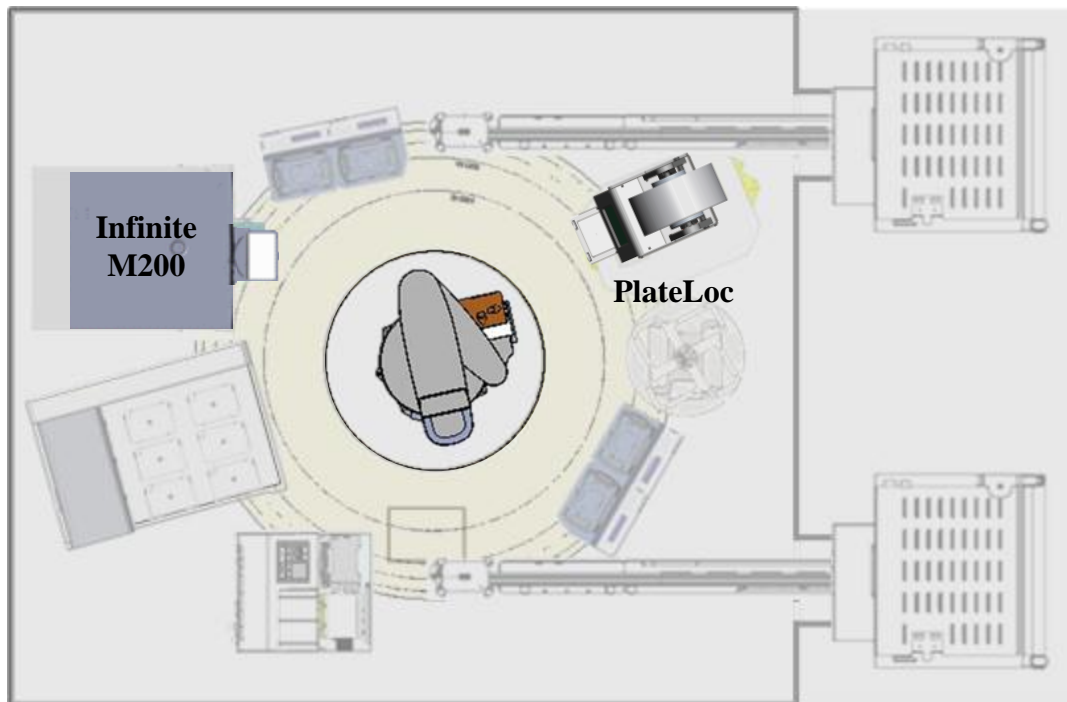


Abbildung 15: Schematische Darstellung des finalen Produktivsystems. Ebene 0 repräsentiert die auf der Werkbank befestigten Komponenten, in Ebene 1 befinden sich gestapelte Komponenten. Die Ebene unterhalb der Werkbank (Ebene -1) ist nicht dargestellt. Hier befindet sich das Cytomat[®] 800 Hotel für Verbrauchsmaterial mit einer senkrechten Transferstation, die auf Ebene 0 führt. Sämtliche Komponenten mit Ausnahme der Inkubatoren sind steril eingehaust (Sterilwerkbank der Klasse 2, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH). Der Plattentransportroboter in der Mitte des Systems kann auf alle Komponenten aus Ebene 0 und 1 zugreifen und verbindet diese miteinander. Die außerhalb der Sterileinhausung platzierten Inkubatoren werden über Transferstationen integriert. Der Infinite[®] M200 PRO steht auf dem Cellavista[®] Analysesystem und der PlateLoc auf der Zentrifuge.

Zum Anschluss der einzelnen Komponenten an einen Steuerrechner werden serielle RS-232 und USB sowie Ethernet-Verbindungen genutzt. Ein Vorteil von Ethernet-Verbindungen liegt in der schnelleren Datenübertragung. Allerdings unterstützen nicht alle Gerätehersteller diese Schnittstelle. Tabelle 51 (Anhang, Kap. 10.) fasst die in dem Produktivsystem genutzten Schnittstellen zusammen.

Um die einzelnen Komponenten in der VWorks-Software ansteuern zu können, werden Gerätetreiber von Agilent Technologies benötigt. Dabei entstehen Kosten für Treiber zur Ansteuerung von Drittgeräten wogegen solche für Agilent-Produkte kostenfrei zur Verfügung stehen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Geräte über die Programmiersprache Java anzusteuern. Dazu werden Makros als Batch-Dateien erstellt, die ein Programm direkt auf dem Steuerrechner starten. Eine Netzwerkverbindung ist erforderlich, wenn ein Programm auf einem separaten Computer gestartet werden soll. Batch-Dateien können nicht direkt auf anderen Rechner ausgeführt werden (*remote*), sondern starten zunächst einen Windows-Prozess (*task*). Diese Windows-Task-Funktion erlaubt die automatische Ausführung von Programmen oder Batch-Dateien, welche wiederum die zu gewünschte Geräte-Software

starten. Auf diese Weise kann auch das automatisierte IMT-2 Fluoreszenzmikroskop in das Produktivsystem integriert werden, da die ressourcen-intensive Bildverarbeitungssoftware Image-Pro plus (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA) auf einem separaten Computer ausgeführt werden muss [88]. Die Ansteuerung des Cellavista[®] Analysesystems erfolgt nach dem gleichen Schema.

Die erfolgreiche Integration der Hardware-Komponenten ermöglicht die Ansteuerung aller Geräte des Produktivsystems und bildet die Grundlage zur Methodenoptimierung vollständig automatisierter Prozesse.

5.1.2.4. Systemfunktionsbeschreibung

Mit dem Produktivsystem wird ein geschlossenes, vollständig automatisiertes System mit Datenbankbindung entwickelt (Abbildung 16). Dies ermöglicht die Rückverfolgbarkeit und das Potential zur Rückkopplung mit der Steuerungssoftware zur Regelung von analysierten Prozessgrößen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Grundlagen zur Etablierung der Kommunikation zwischen Datenbank und Steuerungssoftware geschaffen, welche sich aktuell in der Implementierungsphase befindet. Sämtliche Komponenten des Produktivsystems werden von einer zentralen Software gesteuert und die Schnittstelle zur Analytik ist automatisiert. Im Gegensatz zum PoC-System erfolgen die vorbereitenden Schritte für die Analytik nun auf einem zentralen *Liquid Handler*. Letzte manuelle Schritte in dem System sind die Einbindung des LightCycler[®] 480 Instruments (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) für die Polymerasekettenreaktion sowie die Schnittstelle zu den Systemen der internen Kooperationspartner. Die Automatisierung dieser Schritte ist nicht lohnend, da diese maximal einmal täglich durchgeführt werden (*low value automation*). Der Informationsfluss von den Auslesegeräten der integrierten Analytik zur Datenbank erfolgt automatisiert. Daten der Kooperationspartner werden über ein CSV (*Comma Separated Values*) -Datenformat importiert. Ein direkter Vergleich zwischen dem *Proof of Concept* und dem Produktiv System ist in Abbildung 74 (Anhang, Kap. 10.) gegeben.

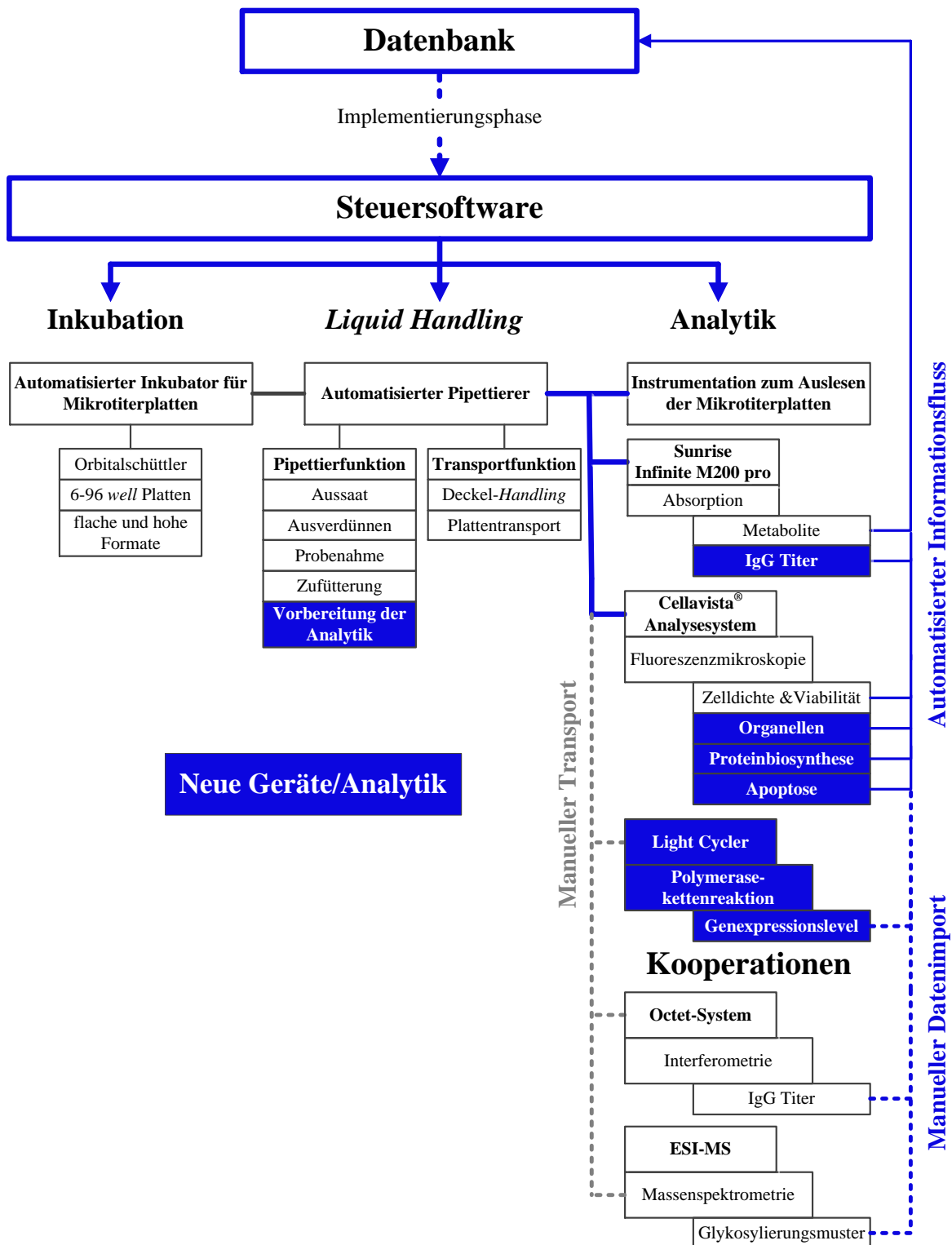


Abbildung 16: Schematische Darstellung von Aufbau und Funktionalität des Produktivsystems sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Kooperationen mit der Analytik-Fachabteilung der Roche Diagnostics GmbH. Das vollständig automatisierte Zellsystem setzt sich aus den Teilen Inkubation, *Liquid Handling* und Analytik zusammen, die von einer zentralen Software gesteuert werden. Farblich hervorgehoben sind neu integrierte Geräte und analytische Methoden verglichen mit dem *Proof of Concept* System sowie automatisierte Informationsflüsse. Der Plattentransport innerhalb des Gesamtsystems erfolgt automatisiert, zur Analytik der Kooperationspartner erfolgt ein manueller Transport. Die Analyseergebnisse werden in einer zentralen Datenbank gesammelt, die der Steuersoftware zugänglich ist. Die Kommunikation zwischen Datenbank und Steuersoftware befindet sich in der Implementierungsphase. IgG: Immunglobulin Typ G; ESI-MS: Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie.

5.1.2.5. Programmierung und Methodenentwicklung

Die Steuerungssoftware VWorks unterscheidet sich von der im PoC-System verwendeten Lirix-Software vor allem darin, dass sie über eine *scheduling*-Funktion verfügt und die parallele Ansteuerung von Geräten und Ausführung von Prozessen ermöglicht. Des Weiteren ist in der VWorks die Verwendung von Mikrotiterplatten-Deckeln vorgesehen, so dass hier keine eigene Entwicklung erforderlich ist. Befehle werden wie in der Lirix als graphische Symbole über *drag and drop* in das Programmierfenster eingefügt und anschließend parametrisiert werden.

5.1.2.5.1. Aufbau der Steuerungssoftware VWorks

Der Einsatz eines *Schedulers* ermöglicht eine Beschleunigung durch selbständige Prozessoptimierung der Abläufe bei gleichzeitiger Gewährleistung eines hohen Maßes an Flexibilität. Dies zeigt sich in der Möglichkeit, zusammengehörige Prozessschritte zu einem kollektiven Makro zu fassen und je nach Anforderung verschiedene Gesamtprozesse aufzusetzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Gesamtmethode bestehend aus mehreren Makros zur Prozessierung einer Zellkulturplatte mit integrierter Analytik entwickelt. Dabei können vor dem Starten der Methode die einzelnen Makros (Module) individuell ausgewählt werden. Die zentrale Steuerung über die VWorks erlaubt eine Rückverfolgung und Zuordnung der generierten Analyse-Daten zu den Kulturplatten. Die Komplexität des Probenflusses für die entwickelte Methode des Produktivsystems und die sich daraus ergebende Notwendigkeit der Probenrückverfolgung in einem automatisierten System ist in Abbildung 75 (Anhang, Kap. 10.) dargestellt.

Die Methodenentwicklung für das Produktivsystem erfolgt schrittweise, da im Verlauf des Systemaufbaus neue Komponenten nachträglich integriert und in die Methoden (*Protocol Files*) eingebunden werden. Der grundlegende Aufbau der VWorks Steuerungssoftware sowie die Vorgehensweise zur Integration neuer Hardware-Komponenten, Erstellen und Ausführen neuer Methoden ist in Abbildung 17 dargestellt.

Nach erfolgreichem Aufbau des Systems (Inbetriebnahme und Vernetzung) ist die Erstellung einer Geräte-Datei (*Device-File*) und das Anlegen gerätespezifischer Profile erforderlich, um diese für die Methodenerstellung verwenden zu können. Dieses Vorgehen muss ebenfalls bei einer späteren Integration von neuer Hardware wiederholt werden. Dabei erfordert jede Modifikation des *Device-Files* die Erstellung einer neuen Methode. Nach der Programmierung wird die Methode kompiliert und im Simulationsmodus auf Fehler getestet. Zur Ausführung einer fehlerfrei simulierten Methode muss das erstellte *Device-File* geöffnet, die Geräte initialisiert und dann die auszuführende Methode in der Software geöffnet werden.

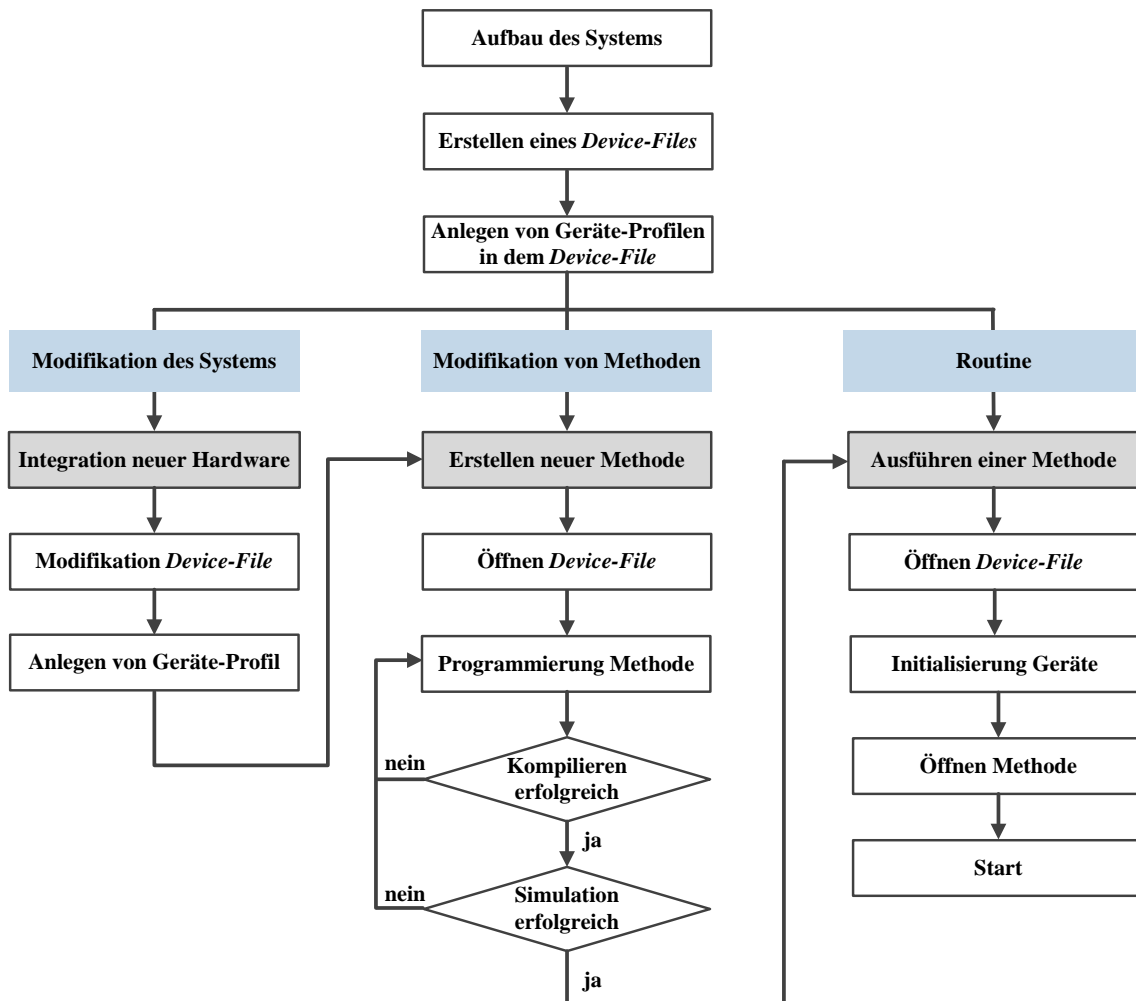


Abbildung 17: Aufbau der VWorks Steuer software und Darstellung der Vorgehensweisen zur Modifikation des Systems durch Integration neuer Hardware-Komponenten sowie des Erstellens und Modifizierens und des Ausführens von Methoden.

Begriffserklärungen:

- **Device-File:** Diese von dem Anwender angelegte Datei enthält sämtliche verwendete Hardware-Komponenten des automatisierten Systems.
- **Profil:** Gerätespezifische Konfigurationen und die gewählte Verbindung (seriell oder Ethernet) werden in den Geräte-Profilen festgelegt. Für einen Inkubator wird hier beispielsweise die Konfiguration der Kassetten definiert.
- **Initialisierung:** Vor Verwendung der Geräte müssen diese initialisiert werden. Bewegbare Geräte fahren in ihre Ausgangsposition.
- **Kompilieren:** Überprüfung der Methode auf Syntaxfehler
- **Simulation:** Dieser Modus simuliert den Ablauf der erstellten Methoden ohne die Befehle auf der Hardware auszuführen (virtueller Durchlauf).

5.1.2.5.2. Grundlagen der Programmierung und Methodenentwicklung

Zur Erstellung einer Methode wird zunächst das *Device-File* mit den benötigten Geräten geöffnet und anschließend ein neues *Protocol-File* erstellt, in dem die Methode programmiert wird. Durch *drag and drop* werden graphische Befehlssymbole in das Programmierfenster bewegt und parametrisiert. Dabei wird jedes in der Methode verwendete Verbrauchsmaterial als

eigene Prozesslinie angelegt, die in zwei Ebenen unterteilt ist. In Abbildung 18 ist beispielhaft eine Methode zur Entnahme einer Probe aus jedem *well* einer 24 *deepwell* Zellkulturplatte mit der anschließenden Zugabe einer Nährlösung dargestellt. In der oberen Ebene (*main process*) erfolgt die Ansteuerung von Geräten, in der unteren Ebene (*subprocesses*) wird das Liquid Handling programmiert. Die Verknüpfung verschiedener Prozesslinien, d.h. die Verknüpfung der Verbrauchsmaterialien miteinander, erfolgt ausschließlich über die *subprocesses*. Nur auf dieser Ebene findet eine Interaktion zwischen dem verwendeten Material, wie Mikrotiterplatten, statt.

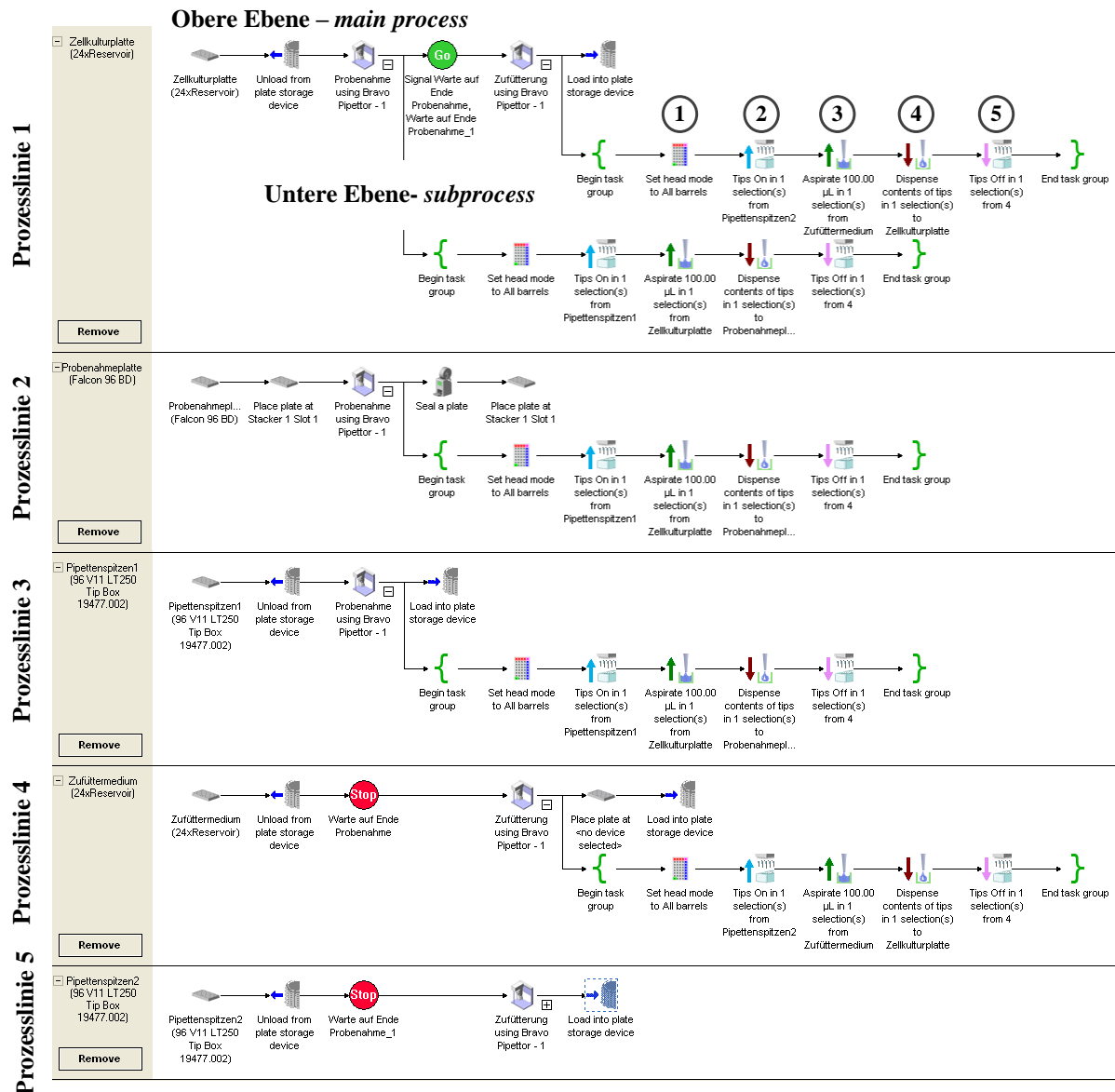


Abbildung 18: *Protocol-File* der VWorks, in dem eine Methode zur Entnahme einer Probe aus jedem *well* einer 24 *deepwell* Zellkulturplatte mit anschließender Zugabe einer Zufütterlösung erstellt wird. Bildschirmaufnahme von der VWorks Automation Control. Ein Standard-Pipettierprozess setzt sich aus folgenden Befehlen zusammen (1) Definieren der aufzunehmenden Pipettenspitzen (Anzahl, Anordnung) durch „Set head mode“. (2) Aufnahme der Pipettenspitzen aus der spezifizierten Pipettenspitzenbox über „Tips On“. (3) Aspirieren einer Flüssigkeit an einer spezifizierten Position einer Mikrotiterplatte oder eines Reservoirs über „Aspirate“. (4) Dispensieren der Flüssigkeit in einer spezifizierten Position einer Mikrotiterplatte oder Reservoir über „Dispense“. (5) Abwerfen der gebrauchten Pipettenspitzen in den Abfall über „Tips Off“.

Neben den zu definierenden Parametern für die Einzelbefehle, wie dem zu transferierenden Volumen oder der Wahl der Flüssigkeitsklasse, können zusätzliche Java-Befehle implementiert werden, die eine Verwendung von Variablen ermöglichen. Auf diese Weise kann für das zu aspirierende Volumen eine Variable gewählt werden, die vor dem Start der Methode mit einem Wert belegt wird. Die VWorks beginnt nun über die *scheduling*-Funktion alle Prozesslinien der Methode gleichzeitig zu starten und die einzelnen Befehle zeitlich zu optimieren. Eine Priorisierung oder die Vorgabe einer festen Reihenfolge von Prozessabläufen erfolgt über das Setzen von „Stop“- und „Go“-Signalen. Ein mit „Stop“ unterbrochener Prozess wartet, bis das zugehörige „Go“-Signal erreicht wird.

5.1.2.5.3. Entwicklung einer modularen Methode für einen automatisierten Fed-Batch-Prozess

Zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung bietet die Firma Agilent Technologies kein System zur automatisierten Prozessierung geschüttelter Zellkulturen an. Daher müssen die Methoden von Grund auf entwickelt und die Prozessabläufe optimiert werden. Des Weiteren müssen die mit dem PoC-System entwickelten Pipettierprotokolle auf ein neues *Liquid Handling* System anderer Konfiguration (von einem Einzelkanal-System mit 2 x 1 mL-Kanälen auf ein System mit 96 x 250 µL-Kanälen) transferiert werden. Dieser Wechsel erfordert auf Grund der geringeren möglichen Pipettier-Volumina eine erneute Optimierung der Durchmischung der Zellsuspension. Dazu wird wie in Kapitel 5.1.1.6. beschrieben vorgegangen und neben den Resuspendierschritten (Volumina, Anzahl der Wiederholungen, Ort des Resuspendierens) auch die Frequenz des Mikrotiterplattenschüttlers auf der Arbeitsfläche des *Liquid Handlers* und die Definition der Flüssigkeitsklassen angepasst (Daten unterliegen der Geheimhaltung).

Die manuelle Priorisierung von Prozessen durch das Setzen von „Stop“- und „Go“-Signalen behindert die automatische Prozessoptimierung durch den *Scheduler*. Diese Priorisierungen sind jedoch erforderlich, um die Standzeiten der Zellkulturplatten außerhalb des Inkubators so gering wie möglich zu halten

Zur Identifizierung des optimalen Zeitpunkts für diese Signale ist ein hohes Maß an Entwicklungsarbeit erforderlich, da nicht optimal gewählte Zeitpunkte zu einem sogenannten „*deadlock*“ mit sofortigem Abbruch der Methode führen. Dabei ist zu beachten, dass stets sämtliche zusammengehörige Prozesslinien gleichermaßen mit diesen Aktivitäten versehen werden.

Die Programmierung in Java wird dazu genutzt, eine Methode zu entwickeln, in der einzelne Makros selektiv ausgewählt werden können. Dies wird über einen Java-Kurzbehehl zum Überspringen einer Aktion („*task.skip*“) in Verbindung mit einer Bedingung („*if then else*“) und die Nutzung von Schleifen bewerkstelligt. Gesetzte Variablen werden bei der Initialisierung der Methode abgefragt. So kann beispielsweise das Makro „Probenahme“ der Gesamtmethode übersprungen und die ausgewählten Zellkulturplatten nur mit einer

Nährlösung gefüllt werden. In Abbildung 19 ist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode schematisch dargestellt. In der Hauptroutine erfolgen die Abfragen zur Durchführung des jeweiligen Makros. Die zentralen Einzelkomponenten sind in den zugehörigen Sub-Routinen dargestellt. Zusätzlich ist neben dem jeweiligen Gerät auch der automatisierte Datentransfer der Auslesegeräte skizziert. Die von den Kooperationspartnern erhaltenen Daten werden manuell in die Datenbank importiert. Als letzter Punkt ist die Anzahl notwendiger Transportprozesse für das jeweilige Modul gezeigt, welche die Notwendigkeit eines schnellen Transportsystems für die Verbrauchsmaterialien verdeutlicht. Für das Makro „Probenahme“ sind alle erforderlichen Transportprozesse beispielhaft dargestellt. Die Details zu den entwickelten Methoden unterliegen der Geheimhaltung.

Die erfolgreiche Durchführung mehrerer Fed-Batch-Experimente bestätigt den Erfolg bei dem Aufbau des Systems und der Methodenentwicklung. Es steht ein breites Spektrum analytischer Methoden sowohl für den Routine-Einsatz als auch für spezielle Fragestellungen zur Verfügung (vergleiche Tabelle 27). Ergebnisse dieser Kultivierungen sind in den Kapiteln 5.2.3. und 5.3. erläutert.

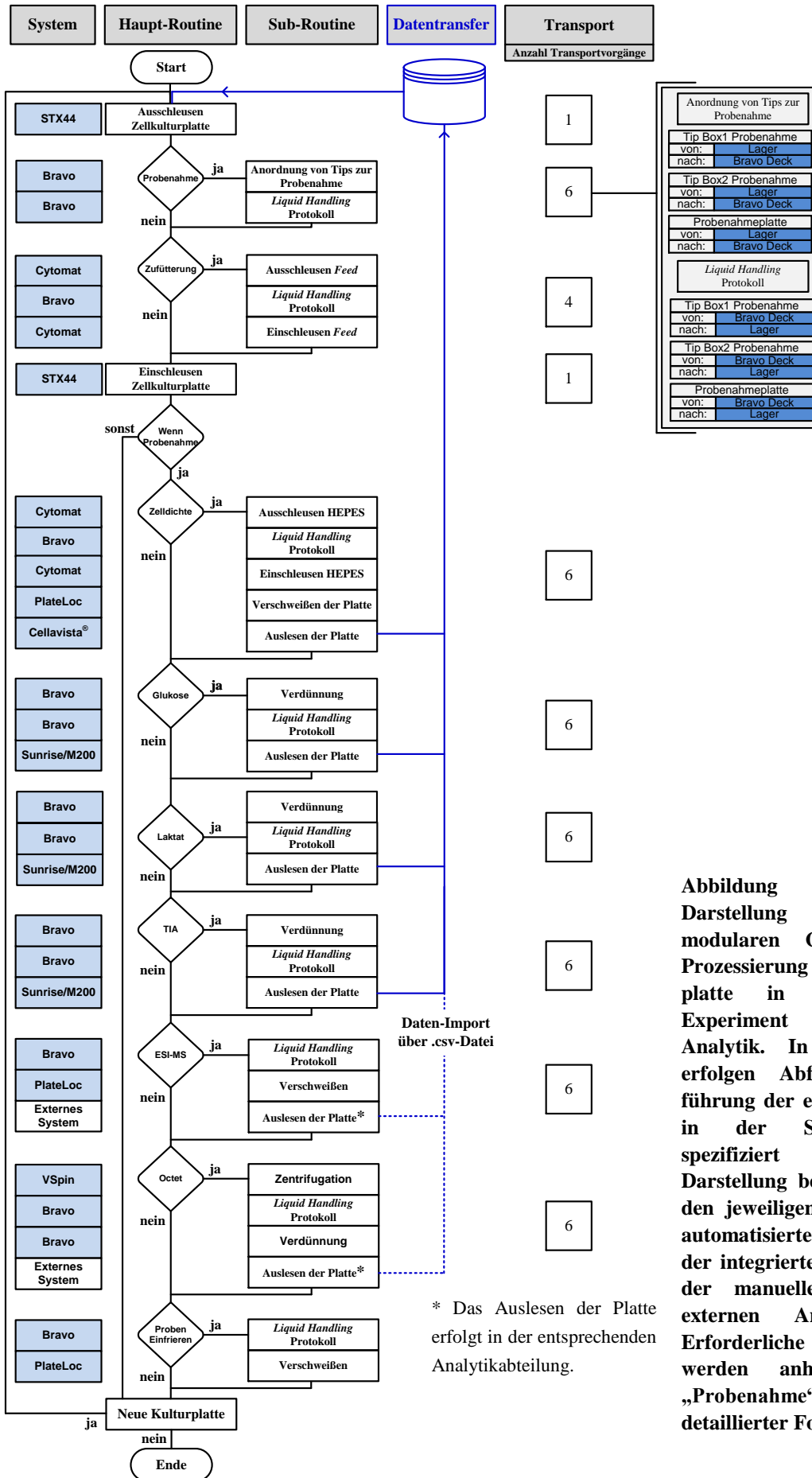


Abbildung 19: Schematische Darstellung der entwickelten modularen Gesamtmethode zur Prozessierung einer Zellkulturplatte in einem Fed-Batch-Experiment mit integrierter Analytik. In der Hauptroutine erfolgen Abfragen zur Durchführung der einzelnen Makros, die in der Sub-Routine näher spezifiziert sind. Neben der Darstellung beteiligter Systeme an den jeweiligen Prozessen sind der automatisierte Datentransfer (blau) der integrierten Komponenten und der manuelle Datenimport der externen Analytik dargestellt. Erforderliche Transport-prozesse werden anhand des Moduls „Probenahme“ beispielhaft in detaillierter Form dargestellt.

5.1.2.6. Zusammenfassung und Diskussion

Für den Aufbau des Produktivsystems sowie für die Etablierung geeigneter *Liquid Handling* Protokolle und optimierter Prozessabläufe können die mit Hilfe des *Proof of Concept* Systems gewonnenen Erkenntnisse erfolgreich genutzt werden. Dabei werden die Aufbau- und Implementierungsphase bei gleichzeitig gesenkten Kosten entsprechend stark verkürzt. Mit dem entwickelten Produktivsystem können unbeaufsichtigte Fed-Batch-Experimente von bis zu 384 Parallelkultivierungen in 24 *deepwell* Mikrotiterplatten mit integrierter Analytik durchgeführt werden. Zusätzliche Prozessinformationen können durch die Etablierung von Schnittstellen zur Analytikabteilung der Roche Diagnostics GmbH im Hochdurchsatz gewonnen werden (Charakterisierung der Produktqualität). Das entkoppelte Analytikmodul des *Proof of Concept* Systems steht weiterhin für die Entwicklung neuer analytischer Methoden zur Verfügung, die nach erfolgreicher Machbarkeitsstudie in das Produktivsystem integriert werden können.

Die in dem *Proof of Concept* System identifizierten Durchsatz-limitierenden Komponenten werden in dem Produktivsystem durch leistungsfähigere ersetzt, was eine Verdopplung des Durchsatzes ermöglicht. Als zentrale Komponenten werden der *Liquid Handler*, das Mikroskop sowie die Lagerkapazität für Verbrauchsmaterialien ermittelt.

Durch die Wahl eines schnellen Plattentransportroboters, flexiblen *Liquid Handler* und einer leistungsfähigen Steuersoftware wird der Grundstein zur Modularität eines Systems mit hohem Durchsatz gelegt. Die geforderte Erweiterbarkeit mit Hardware-Komponenten oder analytischen Methoden ist ebenfalls gewährleistet. Abbildung 20 zeigt schematisch den finalen Aufbau des Kernsystems.

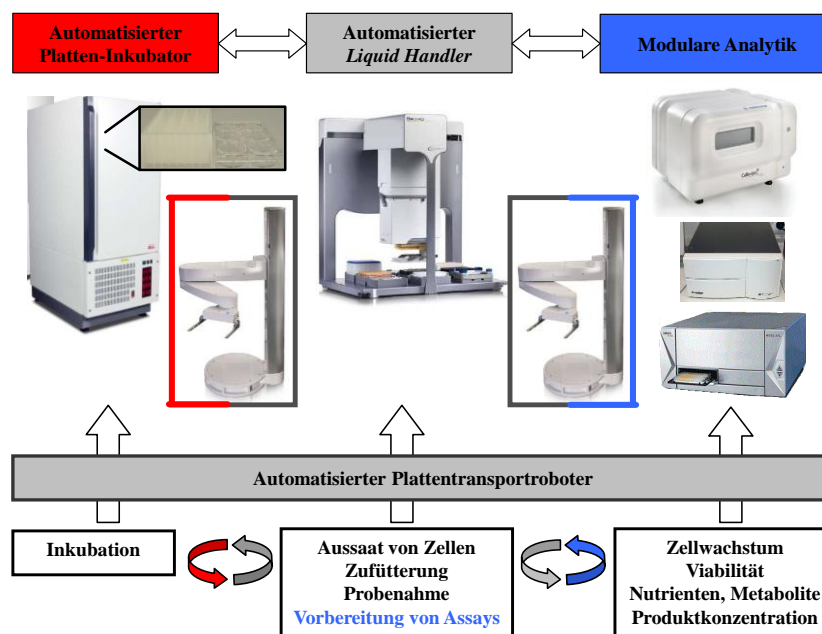


Abbildung 20: Schematische Darstellung zentraler Komponenten des final entwickelten Produktivsystems. Der automatisierte Plattentransportroboter verbindet die funktionellen Einheiten Inkubation, *Liquid Handling* und Analytik miteinander [modifiziert nach 89].

Eine besondere Herausforderung bei dem Aufbau des Produktivsystems stellt die Methodenentwicklung dar. Aktuell wird kein vergleichbares System kommerziell angeboten, so dass die Methoden von Grund auf programmiert werden müssen. Von Agilent Technologies zur Verfügung gestellte Beispielmethode weisen ein zu geringes Maß an Flexibilität auf und können für die Entwicklung nicht verwendet werden. Folgende zentrale Punkte werden bei der Programmierung einer variablen und modularen Gesamtmethode zur Prozessierung von Zellkulturplatten in einem Fed-Batch-Experiment mit integrierter Analytik identifiziert:

- Optimierung der Flüssigkeitsklassen und Anpassung des *Liquid Handling* an Zellkulturen.
- Priorisierung von Prozessen zur zeitlichen Minimierung der Standzeit einer Zellkulturplatte außerhalb des Inkubators.
- Modularität der Gesamtmethode erfordert eine komplexe Programmierung in Java.

Nur durch das Zusammenspiel von Variablen und Java-Elementen können die geforderte Flexibilität und Modularität dieser Methode geschaffen werden. Die verwendete *scheduling*-Software VWorks erfüllt diese Anforderungen.

Unter Berücksichtigung industrieller Vorgaben wird ein neues, vollständig automatisiertes System mit integrierter Analytik zur Durchführung von Fed-Batch-Experimenten in Mikrotiterplatten entwickelt. Mit einem Durchsatz von 384 Parallelansätzen in 24 *deepwell* Mikrotiterplatten können zentrale Kultivierungsparameter durch Einsatz eines breiten analytischen Spektrums prozessbegleitend beobachtet werden. Die für den Systemaufbau und die Erhöhung des Durchsatzes erforderlichen Erkenntnisse können direkt aus dem zuvor entwickelten *Proof of Concept* System abgeleitet werden. Das finale entwickelte System wird im Routinebetrieb der Prozessentwicklung eingesetzt.

5.2. Geschüttelte Mikrotiterplatten als Kultursystem

Aktuelle Publikationen berichten vorwiegend von der Kultivierung mikrobieller Systeme in Mikrotiterplatten [90-92]. Deren Einsatz für Suspensions-Zellkulturen wird dagegen im Allgemeinen nur selten beschrieben [93]. Sie werden vor allem als statische Kultursysteme für adhärente Kulturen eingesetzt. Aus dieser Form der Kultivierung resultiert allerdings ein nicht ausreichender Gasaustausch für das Erreichen hoher Zelldichten bei Suspensions-Kulturen [94]. Daher ist zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung der Zellen das Schütteln der Kultursysteme notwendig [95]. Die Durchführung geschüttelter Kultivierungen in Mikrotiterplatten erfolgt in der Regel manuell [96-98] und die in der Literatur beschriebenen, automatisierten Lösungen ermöglichen die Kultivierung nur einer einzelnen Mikrotiterplatte, was den Durchsatz stark limitiert [99-101]. Für nicht automatisierte Systeme wird in der Literatur oft die Verwendung von Inkubatoren mit einer großen Exzentrizität beschrieben [95,97,98], die sonst bei der Kultivierung von Erlenmeyer-Schüttelkolben verwendet werden [96]. Für diese Inkubatoren wird keine Verbindung zu automatisierten *Liquid Handling* Systemen beschrieben.

Vor diesem Hintergrund erfordert die Automatisierung des hoch parallelen Kultursystems Mikrotiterplatte [102-104] eigene Untersuchungen zur Auswahl eines geeigneten Schüttelinkubators und zur Optimierung der Schüttelparameter. Dabei sollten entscheidende verfahrenstechnische *scale up* Parameter wie der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_{L,a}$ und der volumetrische Leistungseintrag P/V_L ermittelt und mit Standardsystemen der Prozessentwicklung verglichen werden [105-107]. Auf Grund der Wichtigkeit, Verdunstungseffekte in den Platten zu minimieren, müssen die verwendeten Plattenformate unter den optimierten Schüttelbedingungen untersucht werden und Maßnahmen zur Minimierung der Verdunstung getroffen werden. Der Erfolg dieser Entwicklungsarbeiten sollte anhand von Kultivierungen in verschiedenen Plattenformaten bewiesen werden.

Für die Zellkultivierung werden Mikrotiterplatten mit verhältnismäßig großem Kulturvolumen (6 *well* und 24 *deepwell* Platten) verwendet, um ein ausreichendes tägliches Probevolumen für Analysen zu entnehmen und so die Qualität der Einzelexperimente zu erhöhen (vergleiche Abbildung 2). Außerdem werden weitere Plattenformate mit dem Potential zur Durchsatzerhöhung getestet und für den Einsatz im automatisierten Betrieb vorbereitet.

5.2.1. Computational Fluid Dynamics-Modellierung

Auf Grund keiner aktuell verfügbaren Publikationen zu automatisierten, Kassetten-basierten Inkubatoren mit Orbitalschüttler zur Kultivierung in Mikrotiterplatten erfolgt die Auswahl des zu integrierenden Inkubators anhand von *Computational Fluid Dynamics* (CFD) Simulationen, die im Rahmen einer mehrjährigen Kooperation von der Münchner FluidDyna GmbH

durchgeführt werden. Zur Simulation der turbulenten Fluidbewegungen wird ein *Reynolds Averaged Navier Stokes* (RANS) Modell entwickelt. Für die verwendeten Kultursysteme werden Netze mit folgender Anzahl an Zellen generiert:

- Schüttelkolben: 500.000 Zellen
- 6 *well* Mikrotiterplatte: 480.000 Zellen
- 24 *deepwell* Mikrotiterplatte: 1.350.000 Zellen

Außerdem werden die CFD-Modelle zur Ermittlung optimaler Füllvolumina und Schüttelfrequenzen verwendet. Dazu werden im Rahmen dieser Arbeit experimentelle Daten zu den Materialeigenschaften der verwendeten Platten erhoben um die CFD-Modelle der FluiDyna GmbH an die verwendeten Materialien anzupassen. Die Ergebnisse werden der FluiDyna GmbH zur Verfügung gestellt und in den Modellen berücksichtigt. Die im Rahmen der CFD-Modellierung berechneten *scale up* Parameter k_{La} und P/V_L werden mit denen von Schüttelkolben und Bioreaktoren verglichen.

Der zu integrierende Inkubator soll sowohl für 6 *well* als auch für 24 *deepwell* Platten geeignet sein. Bei der Auswahl dieses spielen vor allem der Kreisbahnradius der Schüttelbewegung (Exzentrizität) und die maximal mögliche Frequenz eine Rolle.

5.2.1.1. Anpassung der CFD-Modelle

Zur Charakterisierung der verwendeten Materialien werden die Oberflächenspannung des verwendeten Zellkulturmediums und der resultierende statische Kontaktwinkel bei Benetzung der Mikrotiterplatte mit diesem Medium ermittelt. Diese beiden Parameter beeinflussen maßgeblich das Benetzungsverhalten einer Oberfläche und beeinflussen damit die Fluidbewegung in einem geschüttelten System. Die Messung dieser beiden Parameter erfolgt mit dem EasyDrop Standard-System (DSA 15) der Firma Krüss Optronic GmbH (vgl. Kap. 7.1.2.15.2.). Ein Einfluss der Viskosität des Mediums auf den k_{La} -Wert konnte bisher nicht nachgewiesen werden, daher wird dieser Parameter nicht untersucht. Eine Erhöhung der Viskosität führt nur zu einem dickeren Flüssigkeitsfilm [38,108].

5.2.1.1.1. Experimentelle Ermittlung von Oberflächenspannung und statischen Kontaktwinkeln

Die Messung der Oberflächenspannung des verwendeten Zellkulturmediums erfolgt mit der Methode des hängenden Tropfens bei Raumtemperatur. Zunächst wird zur Überprüfung der Genauigkeit die Oberflächenspannung von Wasser gemessen und der publizierte Wert von 72,75 mN/m bei 20 °C kann mit einem Messwert von 72 mN/m bestätigt werden [109]. Für das standardmäßig eingesetzte Zellkulturmedium ergibt sich ein Wert von $51,4 \pm 0,3$ mN/m, gemittelt aus 20 Einzelmessungen. Diese Größenordnung kann für weitere Zellkulturmedien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wird der Verlauf der Oberflächenspannung

von zellhaltigem und zellfreien Kulturüberstand während eines 14-tägigen Fed-Batch Experimentes bestimmt. Es kann keine signifikante Änderung im Vergleich mit dem Startmedium beobachtet werden. Ebenso kann kein Unterschied zwischen zellhaltiger und zellfreier Probe festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Kontaktwinkel wird ebenfalls das EasyDrop System eingesetzt. Dazu werden mit Hilfe einer Kapillare Einzeltropfen des Zellkulturmediums oder Wasser bei Raumtemperatur auf dem jeweiligen Mikrotiterplatten-Material abgesetzt. Zur Untersuchung der Konsistenz des Mikrotiterplattenmaterials innerhalb einer Platte werden zunächst die Kontaktwinkel für alle Einzel-wells von zwei 6 well Platten gleichen Typs bestimmt. Die Mittelwerte aus einer 8-fach-Messung mit Zellkulturmedium bei Raumtemperatur sind in Tabelle 8 für jedes well dargestellt. Die ermittelten Kontaktwinkel zeigen eine sehr gute Übereinstimmung sowohl innerhalb einer Platte als auch zwischen zwei verschiedenen Platten. Der Variationskoeffizient liegt für sämtliche Messungen kleiner 2 %.

Tabelle 8: Mit dem EasyDrop System ermittelte Kontaktwinkel für sämtliche Vertiefungen von zwei 6 well Platten gleichen Typs (Costar® 6 well not treated) bei Benetzung mit Zellkulturmedium. Alle wells werden in 8-fach-Bestimmung gemessen und der Mittelwert gebildet. Zusätzlich sind die Mittelwerte für die jeweilige Platte berechnet.

Platte/well	Kontaktwinkel [°]	Variationskoeffizient [%]
6 well Platte 1		
well 1	64,6 ± 0,6	0,9
well 2	65,1 ± 0,5	0,7
well 3	64,7 ± 1,0	1,5
well 4	65,0 ± 0,6	0,9
well 5	64,8 ± 0,7	1,1
well 6	65,2 ± 0,8	1,2
Mittelwert aller wells	64,9	
6 well Platte 2		
well 1	64,4 ± 0,8	1,3
well 2	64,7 ± 0,8	1,3
well 3	64,2 ± 0,4	0,6
well 4	64,2 ± 0,9	1,4
well 5	64,4 ± 0,6	0,9
well 6	64,5 ± 0,6	0,9
Mittelwert aller wells	64,4	

Neben der Untersuchung zur Konsistenz der 6 well Platten werden die Kontaktwinkel sämtlicher in dieser Arbeit verwendeter Kulturplatten gemessen. Dazu werden Einzeltropfen des verwendeten Zellkulturmediums und Wassers bei Raumtemperatur auf das jeweilige Material gegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Jeder Wert repräsentiert den

Mittelwert einer 8-fach-Bestimmung. Zusätzlich sind die gemessenen Kontaktwinkel für einen Erlenmeyer-Schüttelkolben als Referenz und für eine Hydrogel-beschichtete 6 well Platte dargestellt.

Je nach Mikrotiterplatten-Hersteller werden unterschiedliche Kontaktwinkel erhalten. Für die Polystyrol-Platten der Marke Corning werden Kontaktwinkel von 65 ° für Zellkulturmedium erhalten während die Polystyrol-Platten von Greiner bio-one einen Kontaktwinkel von 36 ° und 39 ° für Zellkulturmedium ergeben. Für die verwendete 24 *deepwell* Polypropylen-Platte von Porvair Sciences resultiert bei einer Benetzung mit Zellkulturmedium der im Vergleich größte Kontaktwinkel von 82 °. Der Kontaktwinkel aller Platten bei einer Benetzung mit Wasser liegt ungefähr 10 ° bis 20 ° über dem bei einer Benetzung mit Zellkulturmedium.

Tabelle 9: Kontaktwinkel bei der Benetzung der verwendeten Zellkulturplatten mit Zellkulturmedium und Wasser. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 8-fach-Bestimmung bei Raumtemperatur.

Plattentyp	Kontaktwinkel Medium	Kontaktwinkel Wasser
	[°]	[°]
6 well (Corning Costar®)	64,7 ± 0,73	81,6 ± 1,6
24 deepwell (Porvair Sciences)	82,1 ± 1,4	93,4 ± 3,4
12 well (Greiner bio-one)	39,0 ± 1,7	56,9 ± 2,4
24 well (Greiner bio-one)	36,3 ± 2,7	56,0 ± 1,8
48 well (Corning Costar®)	64,6 ± 3,0	80,4 ± 1,4
Erlenmeyer-Schüttelkolben (Corning)	61,1 ± 1,2	nicht gemessen
6 well ultra low attachment (Corning Costar®)	11,3 ± 2,5	nicht gemessen

Abbildung 21 zeigt beispielhaft die resultierenden Kontaktwinkel bei einer Benetzung der Hydrogel-beschichteten *ultra low attachment* Platte und der Polypropylen-Platte mit Zellkulturmedium.

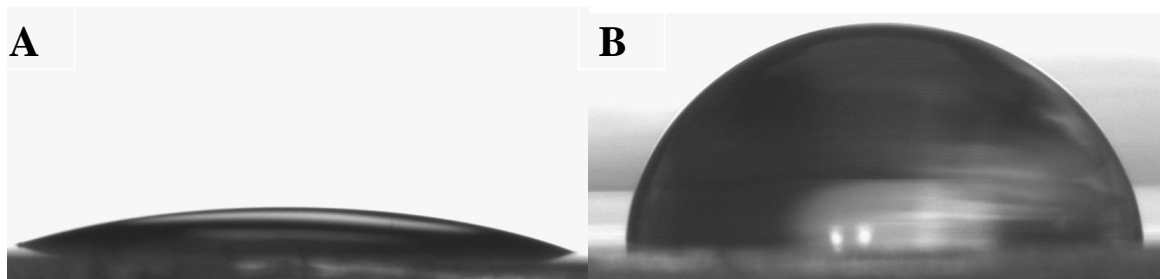


Abbildung 21: Resultierende Kontaktwinkel bei (A) nahezu vollständiger Benetzung einer hydrogel-beschichteten 6 well Platte (*ultra low attachment*) und (B) schlechter Benetzung einer 24 deepwell Polypropylen-Platte mit Zellkulturmedium. Aufnahmen erfolgen mit dem EasyDrop.

5.2.1.1.2. Einfluss des statischen Kontaktwinkels auf die Fluidbewegung

Nach Ermittlung der statischen Kontaktwinkel wird mit Hilfe der CFD-Modellierung der Einfluss auf den Stoffübergangskoeffizienten k_{La} und den Leistungseintrag P/V_L bei einer geschüttelten 6 well Platte (Costar[®] 6 well not treated) ermittelt. Der Berechnung wird eine Exzentrizität von 25 mm und ein Füllvolumen von 5 mL Zellkulturmedium pro well zugrunde gelegt. Das resultierende Flüssigkeitsprofil in den wells bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm ist in Abbildung 22 dargestellt. Während bei Kontaktwinkeln von 30 ° und 50 ° Flüssigkeit aus den wells austritt, wird diese bei einem Kontaktwinkel von 70 ° in dem well gehalten. Die Geschwindigkeit der Flüssigkeit liegt auf Grund der gleichen Schüttelfrequenz bei allen berechneten Fällen in der gleichen Größenordnung.

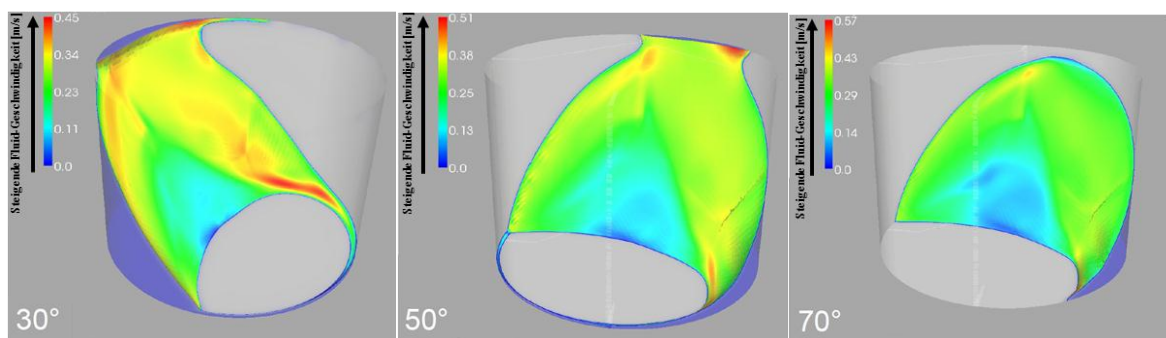


Abbildung 22: Abhängigkeit des Flüssigkeitsprofils von dem statischen Kontaktwinkel bei konstanter Exzentrizität, Schüttelfrequenz und einem Füllvolumen von 5 mL pro Vertiefung in einer 6 well Platte [Abbildung modifiziert nach FluidDyna].

Der Einfluss des statischen Kontaktwinkels auf die berechneten Parameter k_{La} und P/V_L ist in Tabelle 10 dargestellt. Dabei wird der Kontaktwinkel von 50 ° für den Vergleich als Referenz herangezogen. Eine Vergrößerung des Kontaktwinkels führt zu einer Verringerung des k_{La} -Wertes. Dieser Effekt ist bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm stärker ausgeprägt als bei 125 rpm. Der Einfluss des Kontaktwinkels auf den Leistungseintrag ist bei 125 rpm nicht signifikant, jedoch bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. Hier steigt dieser um 9,6 % bei einer Verringerung des Kontaktwinkels und verringert sich um 10,9 % bei einer Vergrößerung des Kontaktwinkels bezogen auf die Referenz.

Tabelle 10: Abhängigkeit der Parameter k_{La} und P/V_L von dem statischen Kontaktwinkel bei zwei Schüttelfrequenzen. Die Simulation basiert auf der Geometrie einer 6 well Platte mit einem Füllvolumen von 5 mL Zellkulturmedium pro well, die bei einer Exzentrizität von 25 mm geschüttelt wird.

Parameter	125 rpm			200 rpm		
	30 °	50 °	70 °	30 °	50 °	70 °
Statischer Kontaktwinkel	30 °	50 °	70 °	30 °	50 °	70 °
k_{La}	+ 7,7 %	100 %	- 5,1 %	+ 17,7 %	100 %	- 11,5 %
P/V_L	- 1,2 %	100 %	+ 1,8 %	+ 9,6 %	100 %	- 10,9 %

Die Untersuchungen der Oberflächenspannung und des statischen Kontaktwinkels zeigen die Wichtigkeit der Charakterisierung verwendeter Materialien. Der Kontaktwinkel als Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche stellt dabei ein entscheidendes Kriterium bei Untersuchungen von Flüssigkeitsprofilen dar und bildet die Grundlage zur exakten Ermittlung des k_{La} -Wertes und des Leistungseintrags. Mit Hilfe dieser experimentell ermittelten Daten kann die Genauigkeit der CFD-Modelle der FluiDyna GmbH erhöht werden.

5.2.1.2. Anwendung der CFD-Modelle zur Auswahl des automatisierten Inkubators

Im Bereich automatisierter, Kassetten-basierter Inkubatoren stehen nur zwei Modelle zur Verfügung. Der STX-44 von Liconic mit einer maximalen Exzentrizität von 3 mm und der Cytomat Tower Shaker von Thermo Scientific mit einer maximalen Exzentrizität von 1,5 mm (vgl. Kap. 5.1.1.2.2.). Neben diesen beiden Werten wird eine Exzentrizität von 6 mm untersucht, die im Fall einer negativen Bewertung der vorher genannten Inkubatoren als Sonderlösung angefertigt werden könnte. Diese Berechnungen erfolgen vor der Ermittlung der Oberflächenspannung und der Kontaktwinkel, so dass diese nicht berücksichtigt werden.

Die Ermittlung der Parameter k_{La} und P/V_L für geschüttelte Mikrotiterplatten stellen die zentralen Auswahlkriterien für den Inkubator dar. Diese Parameter sollen vergleichbar zu denen von Schüttelkolben sein. Außerdem soll die Bewertung der Fluidbewegung Aufschlüsse darüber geben, ob sich die Flüssigkeit bei den gewählten Parameterkombinationen „in Phase“ oder „außer Phase“ befindet. Ist eine Flüssigkeit „außer Phase“, verbleibt ein Großteil der Flüssigkeit am Boden des *wells* und es erfolgt keine effektive Durchmischung. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch einen sehr geringen volumenbezogenen Leistungseintrag P/V_L [98,110]. Haupteinflussfaktor für dieses Phänomen ist dabei der Schütteldurchmesser [110].

Die Berechnungen basieren auf einer 6 *well* Platte (Costar® 6 *well not treated*) mit einem Füllvolumen von 8 mL Wasser pro *well* bei 37 °C. Dies entspricht 50 % des Nominalvolumens. In Tabelle 11 sind die mit Hilfe der CFD-Modelle der FluiDyna GmbH untersuchten Parameterkombinationen aus Exzentrizität und Schüttelfrequenzbereich dargestellt.

Tabelle 11: Mit Hilfe der CFD-Modelle untersuchte Parameterkombinationen aus Exzentrizität und Schüttelfrequenzbereich. Letzterer ergibt sich aus der technischen Machbarkeit verfügbarer Inkubatoren.

Exzentrizität [mm]	Frequenzbereich [rpm]
1,5	300 – 1200
3	175 – 400
6	90 – 200

Die Simulationsergebnisse des Flüssigkeitsprofils in den Vertiefungen der 6 well Platte sind in Abbildung 23 dargestellt. Bei dem orbitalen Schütteln mit einer Exzentrizität von 1,5 mm ist bis zu einer Frequenz von 600 rpm keine Flüssigkeitssichel, die an der Innenseite des wells entlang läuft, zu erkennen. Der Großteil der Flüssigkeit verbleibt am Boden des wells und tritt ab einer Frequenz von 900 rpm aus dem well aus. Die Flüssigkeit folgt keiner geordneten Bahn. Bei einer Exzentrizität von 3 mm ist bei 175 rpm noch keine signifikante Bewegung der Flüssigkeit zu erkennen. Erst ab 250 rpm bildet sich eine umlaufende Flüssigkeitssichel aus, die ab einer Schüttelfrequenz von 325 rpm über den Rand des wells steigt. Während bei 90 rpm und einer Exzentrizität von 6 mm keine Bewegung der Flüssigkeit zu erkennen ist, steigt die Höhe der Flüssigkeitssichel mit einer Erhöhung der Schüttelfrequenz stetig an und tritt ab 200 rpm aus dem well aus.

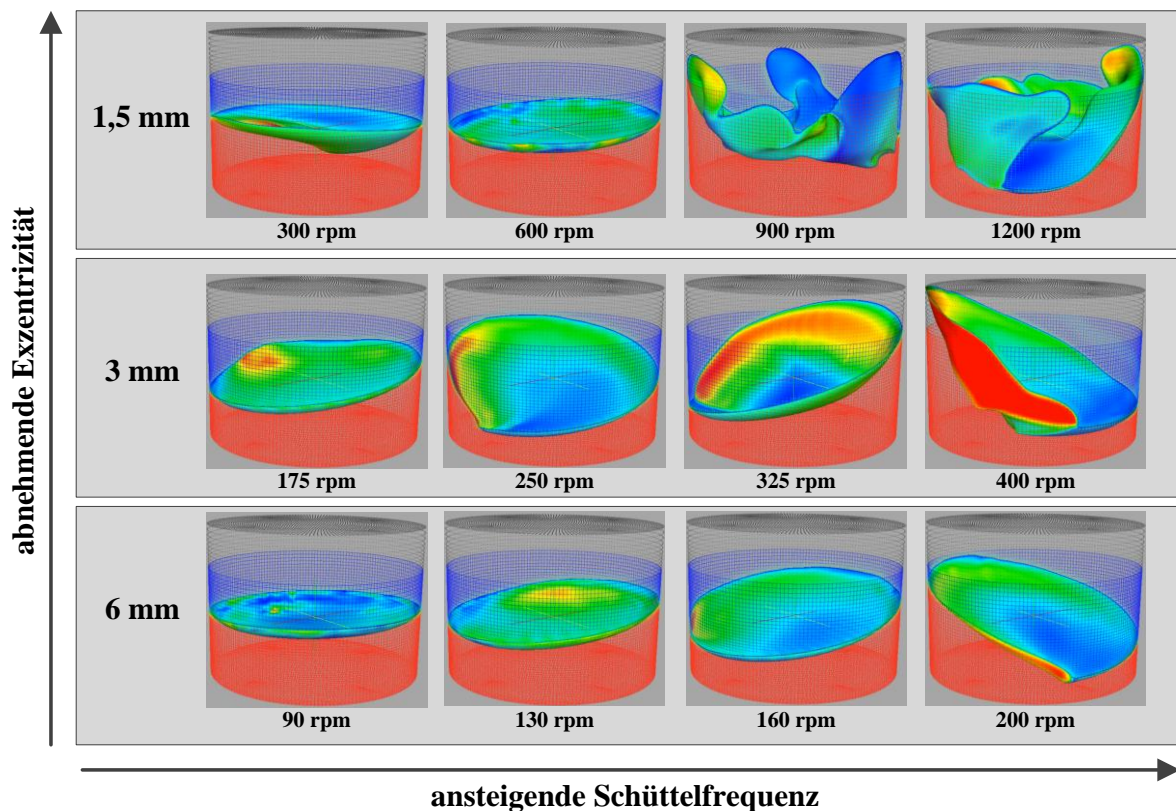


Abbildung 23: Darstellung des Flüssigkeitsprofils in den Vertiefungen einer 6 well Platte in Abhängigkeit von den Exzentrizitäten 1,5 mm, 3 mm und 6 mm der Schüttelbewegung und der Frequenz. Das Messgitter für die Flüssigphase ist rot dargestellt, das Gitter für die Gasphase in blau [Abbildungen modifiziert nach Fluidyna].

Die mit Hilfe der CFD-Modellierung berechneten Werte für den volumenbezogenen Leistungseintrag P/V_L und den volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ in Abhängigkeit von der gewählten Schüttelfrequenz bei den untersuchten Exzentrizitäten von 1,5 mm, 3 mm und 6 mm sind in Abbildung 24 dargestellt. Bei einer Exzentrizität von 6 mm ist erst bei einer Schüttelfrequenz von 200 rpm ein Anstieg von P/V_L zu erkennen, während der $k_L a$ -Wert bereits bei geringeren Frequenzen auf das Maximum von 9 h^{-1} bei 200 rpm

steigt. Eine Erhöhung des Leistungseintrags ist bei einer Exzentrizität von 3 mm und 250 rpm zu erkennen. Das absolute Maximum von 826 W/m^3 liegt bei 400 rpm, wobei der k_{La} -Wert bei dieser Schüttelfrequenz 17 h^{-1} beträgt. Bei einer Exzentrizität von 1,5 mm steigen P/V_{L} und k_{La} bis zu einer Schüttelfrequenz von 300 rpm vergleichbar zur Exzentrizität 3 mm an. Allerdings wird hier nur eine unkontrollierte Flüssigkeitsbewegung erreicht, so dass diese Daten nicht für einen direkten Vergleich verwendet werden können.

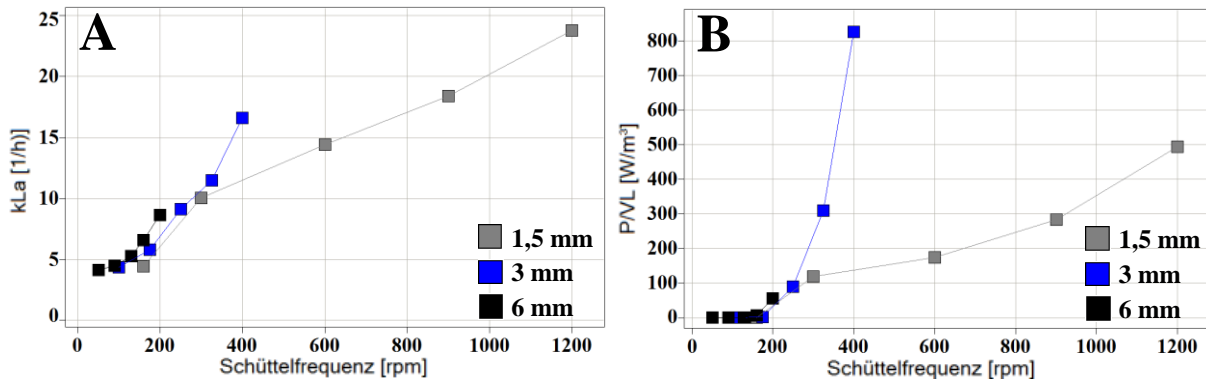


Abbildung 24: CFD-Modell-basierte Berechnungen des (A) volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten k_{La} und (B) volumenbezogenen Leistungseintrags P/V_{L} in Abhängigkeit von der Schüttelfrequenz bei den Exzentrizitäten von 1,5 mm, 3 mm und 6 mm. Simuliert wird eine 6 well Platte mit einem Füllvolumen von 8 mL Wasser pro well.

Mit Hilfe der CFD-Modellierung kann somit die Auswahl des automatisierten Inkubators erfolgen. Eine Exzentrizität von 1,5 mm, wie sie der Cytomat Tower Shaker von Thermo Scientific bietet, ist für eine Kultivierung in 6 well Platten ungeeignet, da sich keine umlaufende Flüssigkeitssichel ausbildet. Daher wird der STX-44 von Liconic gewählt, der mit der minimal erforderlichen Exzentrizität von 3 mm ausgestattet werden kann und eine maximale Schüttelfrequenz von 400 rpm erreicht.

5.2.1.3. Ermittlung optimaler Füllvolumina und Schüttelfrequenzen für verschiedene Mikrotiterplattenformate

Von der Fluidyna GmbH werden CFD-Modelle für einen 250 mL Erlenmeyer-Schüttelkolben, 6 well und 24 deepwell Platten erstellt. Das Modell für die 24 deepwell Platten wird erst in einer späteren Projektphase erstellt, daher wird hier nur eine Schüttelfrequenz von 350 rpm bei 3 mm Exzentrizität untersucht. Mit den getesteten Parametern sollen idealerweise für die Mikrotiterplatten zu Schüttelkolben und Bioreaktoren vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Der Leistungseintrag eines 2 L Bioreaktors bei der Kultivierung tierischer Zellen wird von Möser mit 360 bis 570 W/m^3 angegeben bei einem k_{La} -Wert von 10 bis 15 h^{-1} [111]. Bei einem Füllvolumen von 8 mL pro well in der 6 well Platte wird dieser k_{La} -Wert nur bei maximaler Schüttelfrequenz von 400 rpm erreicht bei einem Leistungseintrag, der 40 % über dem des 2 L Bioreaktors liegt. Um den Inkubator nicht dauerhaft bei maximaler Schüttelfrequenz betreiben zu müssen, wird das Füllvolumen in der 6 well Platte reduziert.

Dies führt zu einem größeren Verhältnis von Flüssigkeitsoberfläche zu Volumen und damit zu einem höheren k_{La} -Wert.

Die Berechnungen des k_{La} -Werts und P/V_L für die Kulturvolumina von 4 mL und 5 mL pro *well* in den beiden Mikrotiterplattenformaten sowie 50 mL und 125 mL in dem Schüttelkolben sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Platten werden bei einer Exzentrizität von 3 mm geschüttelt, die Schüttelkolben bei 25 mm. Dabei werden in der 6 *well* Platte bei den untersuchten Volumina die höchsten k_{La} -Werte mit einem Maximum von 220 h^{-1} erreicht. Für Schüttelkolben und 24 *deepwell* Platte wird hingegen ein maximaler k_{La} von 59 h^{-1} bzw. 67 h^{-1} berechnet. Der Leistungseintrag ist bei den getesteten Parametern in der 24 *deepwell* Platte am geringsten, in 6 *well* Platte und Schüttelkolben werden dagegen vergleichbare Werte erzielt.

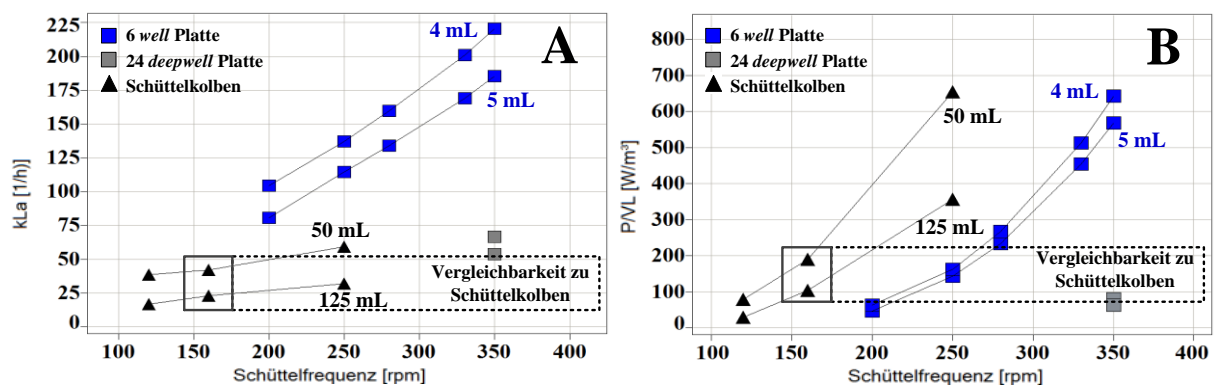


Abbildung 25: Mit Hilfe der CFD-Modelle berechnete Abhängigkeit der (A) k_{La} -Werte und (B) P/V_L von der Schüttelfrequenz für die Kultursysteme 6 *well* Platte und 24 *deepwell* Platte mit 4 mL und 5 mL Kulturvolumen sowie für einen 250 mL-Schüttelkolben mit Füllvolumen 50 mL und 125 mL.

Für den *scale down* sollte versucht werden, die Parameter k_{La} und P/V_L zwischen den Kultursystemen gleich zu halten. Der k_{La} -Wert des Schüttelkolbens und eines 2 L Bioreaktors werden bei einer Kultivierung in der Mikrotiterplatte übertroffen. Durch die Wahl des Füllvolumens und der Schüttelfrequenz können hingegen für den Parameter Leistungseintrag vergleichbare Werte zu einem Schüttelkolben eingestellt werden. Eine Anpassung des Leistungseintrags an den 2 L Bioreaktor ist nur für die 6 *well* Platte möglich. Es werden folgende Parameter für die Kultivierungen der vorliegenden Arbeit eingestellt:

- 6 *well* Platte: 5 mL pro *well* bei einer Schüttelfrequenz von 250 rpm
- 24 *deepwell* Platte: 5 mL pro *well* bei einer Schüttelfrequenz von 350 rpm

Die Berechnungen für den k_{La} -Wert des Schüttelkolbens stimmen mit experimentell ermittelten Daten der Fermentationsentwicklung überein und bestätigen die Güte der CFD-Modelle (Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich berechneter und gemessener Werte für $k_L a$ und P/V_L im 250 mL Schüttelkolben bei zwei Füllvolumina und zwei Schüttelfrequenzen bei einer Exzentrizität von 25 mm.

Füllvolumen [mL]	Schüttelfrequenz [rpm]	P/V_L [W/m ³]		$k_L a$ [h ⁻¹]	
		berechnet	gemessen	berechnet	gemessen
50	160	190	181	42	36
50	250	654	631	59	61
125	160	104	98	23	17
125	250	357	343	32	28

Die zu verwendenden Schüttelbedingungen und Füllvolumina der zusätzlich getesteten Plattenformate 12 *well*, flache 24 *well* und 48 *well* (vgl. Kap. 5.2.3.1.) werden hingegen ohne Hilfe dieser Modelle ermittelt. Diese Plattenformate werden stattdessen mit unterschiedlichen Volumina gefüllt und bei einer Exzentrizität von 3 mm mit variierender Frequenz geschüttelt. Mittels optischer Sichtkontrolle wird die maximale Schüttelfrequenz für das entsprechende Volumen ermittelt. Diese ist erreicht, wenn die Flüssigkeitssichel die maximale Steighöhe aufweist und keine Flüssigkeit aus dem *well* austritt. Tabelle 13 zeigt die ermittelten optimalen Parameter dieser Untersuchung.

Tabelle 13: Ermittelte optimale Volumina und Schüttelfrequenzen nicht im Routinebetrieb verwendeter Mikrotiterplattenformate.

Plattentyp	Füllvolumen pro <i>well</i>	Nominalvolumen	Schüttelfrequenz
	[mL]	[mL]	[rpm]
12 <i>well</i> (Greiner bio-one)	2,5	6,0	400
24 <i>well</i> (Greiner bio-one)	1,0	3,5	400
48 <i>well</i> (Corning Costar®)	0,5	1,6	400

Die CFD-Modelle ergeben für 6 *well* und 24 *deepwell* Platten zu Schüttelkolben und 2 L Bioreaktoren vergleichbare oder höhere $k_L a$ -Werte. Der Leistungseintrag der 6 *well* Platten ist dem Schüttelkolben oder 2 L Bioreaktor vergleichbar. Bei 24 *deepwell* Platten ist dieser unter den untersuchten Bedingungen etwas geringer. Für die zusätzlichen, nicht routinemäßig eingesetzten Plattenformate werden zunächst experimentell nur die optimalen Schüttelbedingungen ermittelt.

5.2.1.4. Zusammenfassung und Diskussion

Als wichtigste Eingangsparameter für die CFD-Modelle der FluiDyna GmbH werden die Oberflächenspannung des verwendeten Zellkulturmediums und der statische Kontaktwinkel bei Benetzung der Mikrotiterplatten mit dem Medium bestimmt. Die Oberflächenspannung liegt mit 51,4 mN/m unterhalb der von Wasser, was auf das Vorhandensein oberflächenaktiver Stoffe wie Poloxamere oder Polyvinylalkohol im Medium zurückzuführen

ist. Dies führt zu einer besseren Benetzung der untersuchten Mikrotiterplatten [112]. Neben den physikalischen Eigenschaften der verwendeten Flüssigkeit beeinflussen das Material (z.B. Polystyrol, Polypropylen) und die Beschichtung (z.B. Hydrogel) die Oberflächenbenetzbarkeit. Eine vollständige Benetzung führt dabei zu einer Erhöhung des k_{La} -Wertes und verbessert damit den Sauerstofftransfer in die Flüssigphase [112, 38]. Der Flüssigkeitsfilm am Rand des Kulturgefäßes agiert hier als zusätzliche Austauschfläche [38]. Der maximale k_{La} -Wert ist in einem *well* erreicht, wenn die Flüssigkeitssichel am oberen Rand des *wells* entlangläuft. Eine Erhöhung der Schüttelfrequenz würde zu einem Austreten der Flüssigkeit führen. Bei guter Benetzung wird dieser schon bei geringeren Schüttelfrequenzen erreicht. Dies spielt dann eine Rolle, wenn die maximale Schüttelfrequenz des Inkubators nicht für das Erreichen des erforderlichen k_{La} -Wertes ausreicht. In diesem Fall kann durch die Wahl eines (durch das verwendete Medium) besser benetzbaren Materials der Gasaustausch verbessert werden. Aus diesen Gründen ist es notwendig, experimentelle Vorversuche mit den später verwendeten Materialien durchzuführen. Mit Hilfe der ermittelten Daten können die CFD-Modelle an die in dieser Arbeit verwendeten Materialien angepasst werden.

Aktuelle Publikationen beschreiben überwiegend den Einsatz von Orbitalschüttlern mit Exzentrizitäten von 6 mm, 12,5 mm und 25 mm, welche nicht mit einer automatisierten Ein- und Auslagerung von Mikrotiterplatten erhältlich sind. Die geschüttelte Kultivierung in 6 *well* oder 24 *deepwell* Platten im vollständig automatisierten System wird nicht beschrieben und erfordert eine Bewertung aller kommerziell verfügbarer Inkubatoren. Mit Hilfe der CFD-Modelle wird ermittelt, dass für die Kultivierung in 6 *well* Platten eine Exzentrizität von mindestens 3 mm erforderlich ist. Nur der STX-44 der Firma Liconic bietet diese Exzentrizität und wird daher in dem automatisierten Zellkultursystem integriert.

Die Ermittlung optimaler Füllvolumina und Schüttelfrequenzen, welche neben der Exzentrizität Haupteinflussfaktoren auf den k_{La} geschüttelter Kultursysteme darstellen [38], erfolgt für die routinemäßig zur Zellkultivierung eingesetzten 6 *well* und 24 *deepwell* Platten mit Hilfe der CFD-Modelle. Für weitere, nicht routinemäßig eingesetzte Plattenformate wird das maximale Füllvolumen für eine Kultivierung experimentell ermittelt. Die Wichtigkeit dieser Optimierungen ergibt sich aus dem Phänomen des biphasischen Verhaltens, welches bei Mikrotiterplatten beobachtet wurde. Eine Bewegung der Flüssigkeit erfolgt erst ab einer kritischen Schüttelfrequenz. Diese ist erreicht, wenn die Zentrifugalkraft die Arbeit aufbringt, die zur Überwindung der Oberflächenspannung benötigt wird [38]. Tabelle 14 stellt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Parameter sowie den k_{La} und P/V_L für die Routine-Zellkulturplatten zusammen. Als Referenz sind die Daten für einen 2 L Bioreaktor und einen 250 mL Schüttelkolben dargestellt.

Tabelle 14: Zusammenfassung optimierter und in dieser Arbeit verwendeter Parameter zur Kultivierung in Mikrotiterplatten. Hervorgehoben sind routinemäßig verwendete Plattentypen. Für nicht routinemäßig eingesetzte werden keine CFD-Modelle erstellt, daher sind keine Werte für die Parameter k_{La} und P/V_L verfügbar. Zum Vergleich sind ein 2 L Bioreaktor und ein Schüttelkolben mit Standard-Parametern angegeben.

Plattentyp	Füllvolumen [mL]	Schüttelfrequenz [rpm]	k_{La} [h ⁻¹]	P/V_L [W/m ³]
6 well (Corning Costar [®])	5	250	114,5	144,3
24 deepwell (Porvair Sciences)	5	350	53,7	63,2
12 well (Greiner bio-one)	2,5	400	k.A.	k.A.
24 well (Greiner bio-one)	1	400	k.A.	k.A.
48 well (Corning Costar [®])	0,5	400	k.A.	k.A.
2 L Bioreaktor	1200	k.A.	10 - 15	360 - 570
250 mL Schüttelkolben	125	160	23	104

Ein weiteres Ziel der hydrodynamischen Untersuchungen ist die Überprüfung der Skalierbarkeit des Kultursystems. Dazu werden die etablierten verfahrenstechnischen Parameter k_{La} -Wert und Leistungseintrag berechnet und mit denen für Schüttelkolben und für Bioreaktoren verglichen. Weil der Sauerstoffbedarf tierischer Zellkulturen deutlich unterhalb dem von Mikroorganismen liegt, ist hier die Größenordnung des k_{La} -Wertes weniger entscheidend [113]. Bareither *et al.* geben für die Kultivierung von Zellkulturen einen erforderlichen k_{La} von 1-15 h⁻¹ an [56]. Dieser Bereich kann für die untersuchten 6 well und 24 deepwell Platten in der Berechnung übertroffen werden.

Die ermittelten k_{La} -Werte der Platten liegen mit 54 bis 115 h⁻¹ bis zu einer Größenordnung über denen im Bioreaktor (10 bis 15 h⁻¹), so dass keine Sauerstofflimitierung der Zellen zu erwarten ist. Der Leistungseintrag spielt besonders bei Zellkulturen eine Rolle, die empfindlich gegenüber Scherbeanspruchungen sind. Zunächst werden Schüttelbedingungen und Füllvolumina für die Mikrotiterplatten gewählt, die zu einem vergleichbaren Leistungseintrag im Schüttelkolben führen. Eine Anpassung an den 2 L Bioreaktor ist für 6 well Platten möglich, für 24 deepwell hingegen nicht. In Letzteren wird ein geringerer Leistungseintrag erreicht.

Mit Hilfe eines Kooperationspartners werden CFD-Modelle entwickelt, die zur Auswahl eines automatisierten, geschüttelten Inkubators eingesetzt werden. Zusätzlich werden mit Hilfe dieser Modelle optimale Füllvolumen und Schüttelfrequenzen für 6 well und 24 deepwell Mikrotiterplatten ermittelt sowie der k_{La} -Wert und Leistungseintrag berechnet. Auf Basis dieser verfahrenstechnischen Parameter können erste Ergebnisse für die Skalierbarkeit der Mikrotiterplatten erzielt und diese als Kultursystem etabliert werden.

5.2.2. Maßnahmen zur Verdunstungskontrolle in Mikrotiterplatten

Bei der Wahl eines miniaturisierten Kultursystems wie der Mikrotiterplatte spielen Verdunstungseffekte eine zentrale Rolle. Diese nehmen mit einer Vergrößerung des Verhältnisses von Gasaustauschfläche zum verwendeten Kulturvolumen sowie durch das Schütteln der Mikrotiterplatten zu. Neben der Möglichkeit, ein geeignetes Verschlusssystem zu verwenden, können Optimierungen an der Inkubationseinheit zur Erhöhung und gleichmäßigen Verteilung der Luftfeuchte vorgenommen werden. Folgende Anforderungen müssen von einem Verschlusssystem erfüllt werden [97]:

- Verminderung der Verdunstung
- Hohe Reproduzierbarkeit und geringe Variationen aller *wells* einer Mikrotiterplatte
- Gewährleistung eines ausreichenden Gasaustauschs vor allem für Sauerstoff
- Vermeidung von Kontaminationen

Des Weiteren muss das automatische Öffnen und Verschließen der Mikrotiterplatten bei dem Einsatz in vollständig automatisierten Systemen gewährleistet werden.

5.2.2.1. Abhängigkeit der Verdunstung von der Luftfeuchte des Inkubators

In dem STX-44 wird die Abhängigkeit der Verdunstung von der Luftfeuchte im Inkubatorinnenraum untersucht. Dazu werden jeweils vier 6 *well* Platten mit dem mitgelieferten Plastikdeckel verschlossen und bei 37 °C, 250 rpm und einer relativen Luftfeuchte von 50 %, 75 % und 95 % inkubiert. Die *wells* werden jeweils mit 5 mL Zellkulturmedium gefüllt und täglich die Osmolalität mit dem Osmomat 030 (Gonotec GmbH Berlin) als Indikator zur Verdunstung ermittelt. Abbildung 26 zeigt den zeitlichen Verlauf der Osmolalität (jeweils Mittelwerte der 6 *well* Platten) bei den drei getesteten Luftfeuchte-Einstellungen. Bei allen Platten ist ein linearer Anstieg der Osmolalität zu erkennen, eine Erhöhung der Luftfeuchte führt dabei zu einem geringeren Anstieg dieser. Die Werte weisen mit Abnahme der Luftfeuchte eine zunehmende Streuung auf.

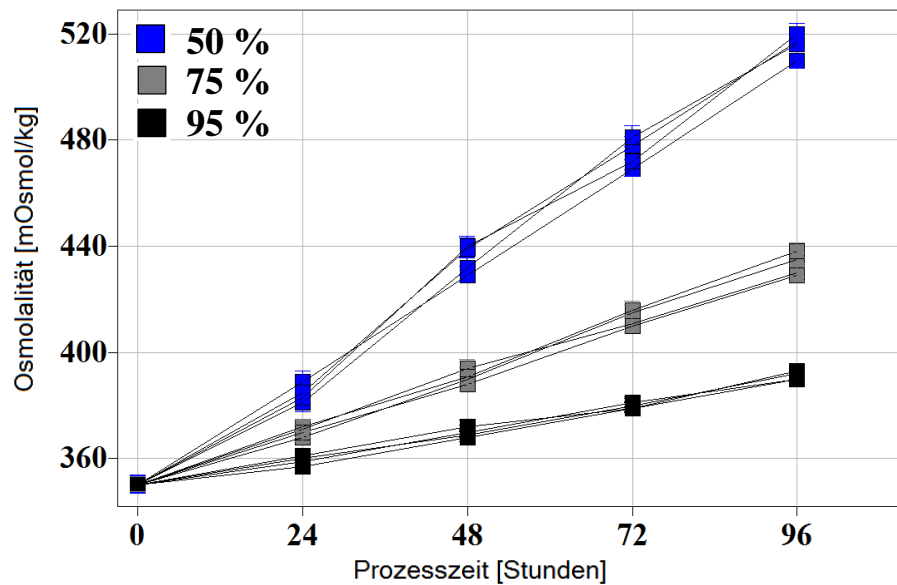


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Osmolalität bei der Inkubation von jeweils vier 6 well Platten mit Plastikdeckel bei 50 %, 75 % und 95 % relativer Luftfeuchte. Dargestellt sind die Mittelwerte für die Platten.

5.2.2.2. Bewertung kommerzieller Verschlussysteme für Mikrotiterplatten

Ein vielversprechendes System stellt das von Duetz *et al.* beschriebene „well-closure system“ dar [36]. Dieses nutzt sogenannte *sandwich cover*, die aus einem Edelstahldeckel bestehen, in den ein Mikrofaser-Filter, ein 0,3 μm Sterilfilter und eine Silikonschicht mit Löchern über den Vertiefungen eingelegt wird (Abbildung 27). Neben den normalen *sandwich covers* sind auch solche zur weiteren Verringerung der Verdunstung verfügbar. Diese wird durch kleinere Löcher in der Silikonschicht erreicht. Geringe Verdunstungsraten bei ausreichender Sauerstoffversorgung und Vermeidung von Kontaminationen sind wesentliche Stärken dieses Systems. Allerdings muss dieses manuell in eine Halterung eingespannt werden und eignet sich daher nicht für vollständig automatisierte Prozesse.

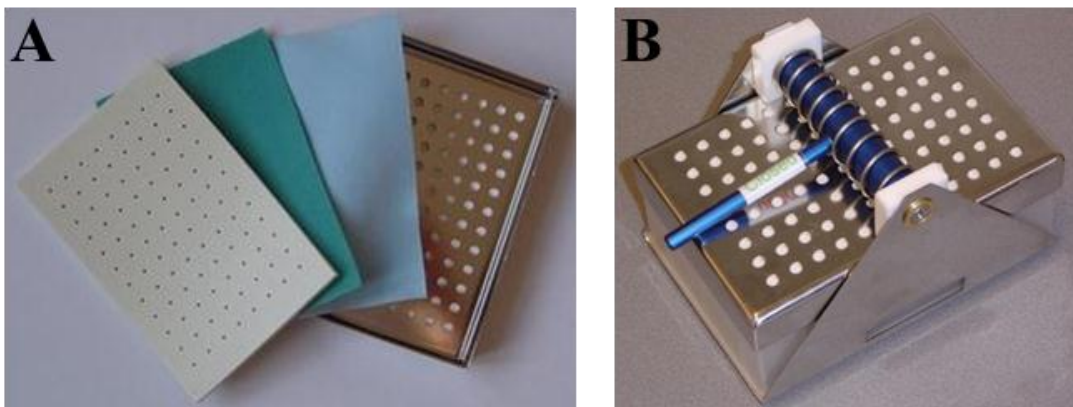


Abbildung 27: Well-closure system mit (A) *sandwich cover* für eine 96 well Platte und (B) Halterung zum manuellen Einspannen [114].

Eine weitere Möglichkeit zur Minimierung der Verdunstung bieten gaspermeable Klebefolien (Abbildung 28). Zimmermann testete bereits verschiedene Typen [115]. Ein Einsatz dieser in voll automatisierten Prozessen ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da zur Entnahme einer Probe die Folie durchstoßen werden muss und damit die Sterilbarriere zerstört wird.



Abbildung 28: Gaspermeable Klebefolie [116].

Neben diesen Sonderlösungen stehen zwei Systeme zur Verfügung, die sich für den automatisierten Einsatz eignen. Der MicoClime™ *environmental lid* der Firma Labcyte Inc. (Sunnyvale, USA) besitzt eine Flüssigkeits-speichernde Matrix an der Deckelinnenseite, die vor dem Gebrauch mit sterilem Wasser gefüllt werden muss (Abbildung 29A). Auf diese Weise soll innerhalb der Platte eine Wasserdampf-gesättigte Atmosphäre geschaffen werden. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Systemen werden mit dem MicoClime™ *environmental lid* nicht die einzelnen *wells* verschlossen. Der Deckel liegt nur auf dem Rand der Mikrotiterplatte auf und verschließt die *wells* nicht einzeln.



Abbildung 29: (A) MicoClime™ *environmental lid* [117]. (B) Standard-Plastikdeckel einer 6 well Platte [118].

Die kostengünstigste Alternative stellt der Standard-Plastikdeckel der Mikrotiterplatten dar (Abbildung 29B). Dieser liegt wie der MicoClime™ *environmental lid* nur auf dem Rand der Platte auf und verschließt die *wells* nicht einzeln.

5.2.2.3. Entwicklung eines automatisierbaren Deckels für Mikrotiterplatten

Es ist kein kommerzielles System verfügbar, welches sowohl die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte einzeln verschließt als auch automatisierbar ist. Daher wird zur Etablierung der Mikrotiterplatten-Kultivierung ein automatisierbarer Deckel zur Vermeidung von Verdunstungseffekten und Kreuzkontaminationen entwickelt, der in der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover gefertigt wird (Abbildung 30). Dieser kann aus einer Grundplatte aus Metall (z.B. Edelstahl oder Aluminium) oder Plastik (z.B. Polyoxymethylen) gefertigt werden, die über jeder Vertiefung mit einer Bohrung versehen ist. Der Durchmesser der Bohrung richtet sich nach der erforderlichen Gasaustauschfläche.

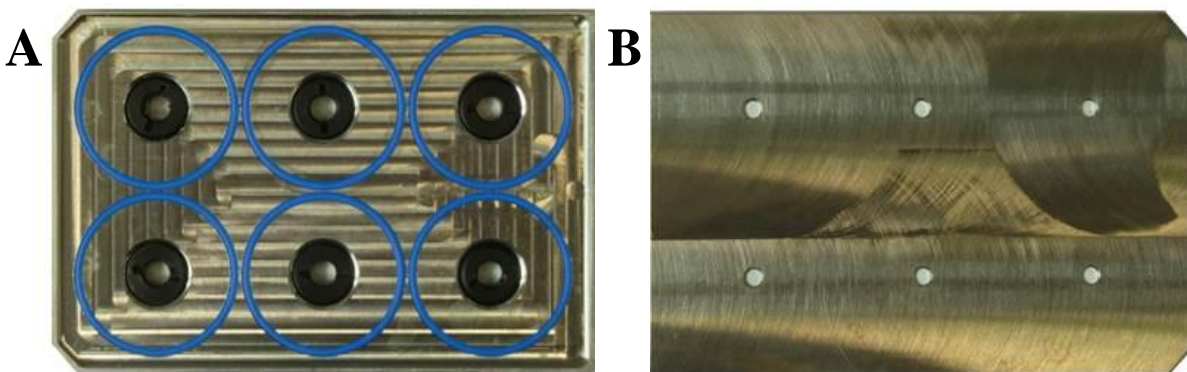


Abbildung 30: Automatisierbarer Deckel für eine 6 well Platte. (A) Innenansicht mit 6 O-Ringen, welche die einzelnen wells abdichten. In die Bohrungen über den wells wird ein PTFE-Filter eingesetzt und mit einem Plastikverschluss (schwarz) fixiert. (B) Außenansicht mit Bohrungen über den wells. Der Durchmesser kann in Abhängigkeit von dem Sauerstoffbedarf einer Kultur angepasst werden.

Auf der Innenseite dieser Bohrungen ist ein Innengewinde, in welches ein Verschluss zum Fixieren eines Sterilfilters aus Polytetrafluorethylen (PTFE) mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen) geschraubt werden kann. Das Einbringen von Dichtungen (z.B. O-Ringen) ermöglicht den gleichmäßigen Verschluss der einzelnen wells einer Mikrotiterplatte sowie eine definierte Gasaustauschfläche pro Vertiefung. Der fertig montierte Deckel kann autoklaviert werden.

5.2.2.4. Optimierung des Inkubators

Entscheidende Voraussetzungen für eine Minimierung der Verdunstung sind die Wahl eines Inkubators mit der Möglichkeit zur Generierung einer möglichst hohen relativen Luftfeuchte von mehr als 95 %. Zusätzlich soll die Tür zum Ein- und Ausschleusen der Mikrotiterplatten möglichst klein sein. Auf diese Weise kann die Abnahme der Luftfeuchte im Inkubatorinnenraum beim Öffnen des Inkubators minimiert werden. Diese Voraussetzungen werden von dem im automatisierten Zellkultursystem eingesetzten automatisierten Inkubator STX-44 der Firma Liconic erfüllt. Die Optimierungsarbeiten umfassen vor allem

Modifikationen des Inkubatorinnenraums. Aus Geheimhaltungsgründen können diese Arbeiten nicht näher spezifiziert werden.

Abbildung 31 zeigt den Verlauf der relativen Luftfeuchte in dem Inkubatorinnenraum bei dem Öffnen der Tür in einem Intervall von 60 Sekunden für die Dauer von 6 Sekunden zum Ein- oder Ausschleusen einer Mikrotiterplatte. Unterhalb von 96 % relativer Luftfeuchte setzt die Regelung ein und es wird Wasserdampf über die Dampfneinjektionsdüse am Boden des Inkubators eingeleitet. Es werden Werte größer als 95 % erreicht, wogegen Werte unter 94 % nicht beobachtet werden. Die Temperatur beträgt konstant 37 °C.

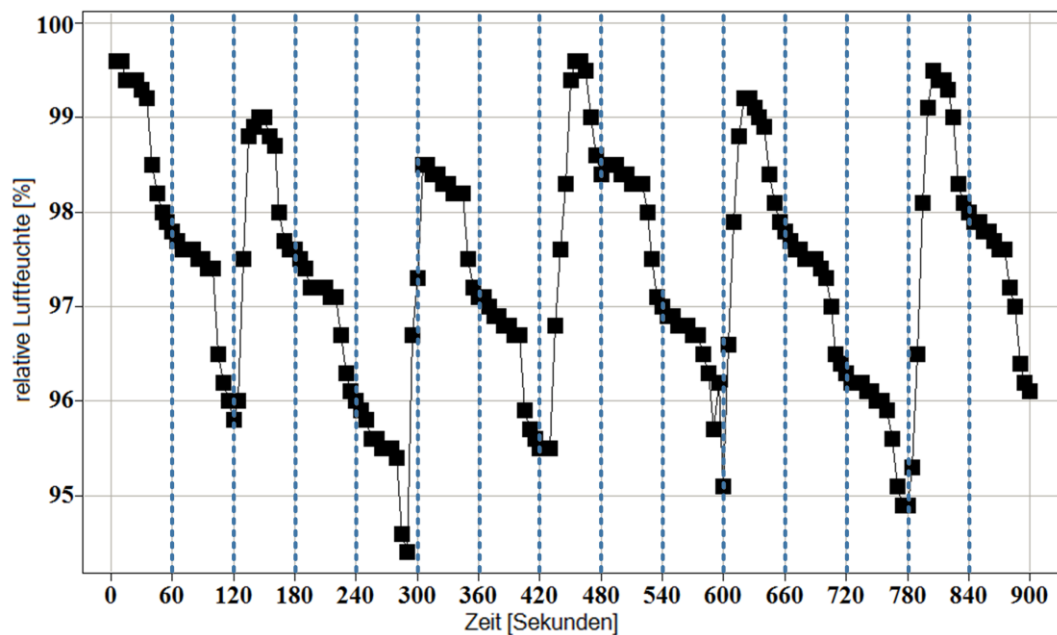


Abbildung 31: Verlauf der relativen Luftfeuchte in dem Innenraum des automatisierten Inkubators STX-44 bei Einstellung von 37 °C und 99 % Luftfeuchte. Die Tür zum Ein- und Ausschleusen einer Mikrotiterplatte wird in einem Intervall von 60 Sekunden geöffnet, beginnend zum Zeitpunkt $t = 0$ Sekunden.

Neben der Kultivierung im automatisierten System soll auch eine Inkubationsmöglichkeit außerhalb des Systems zur Verfügung stehen. Für diesen Zweck wird der nicht automatisierte Inkubator ISF-1X der Firma Kühner (Birsfelden, Schweiz) eingesetzt und charakterisiert. Dieser kann nicht durch vergleichbare Maßnahmen optimiert werden und wird im nicht modifizierten Zustand zur Mikrotiterplatten-Kultivierung eingesetzt. Zur Generierung der Luftfeuchte nutzt dieser ein Wasserbad im hinteren Bereich des Gerätes. Ein weiterer Unterschied zu dem STX-44 liegt in der Größe der Tür. Die Fläche dieser ist bei dem ISF-1X ungefähr um den Faktor 14 größer.

Um den Einfluss des Türöffnens auf die Luftfeuchte in dem Inkubator zu untersuchen wird die Tür bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte in einem Intervall von 1 Minute für 7 Sekunden geöffnet und somit das Entnehmen oder Einbringen einer Platte nachgestellt. In Abbildung 32 ist der zeitliche Verlauf der Luftfeuchte dargestellt. Durch das Öffnen der Tür sinkt die Luftfeuchte schnell auf ein Minimum von 42 %. Um den Ausgangswert von 95 % zu

erreichen ist eine Wartezeit von 10 Minuten ohne Öffnen der Tür erforderlich (in der Abbildung ab 300 Sekunden).

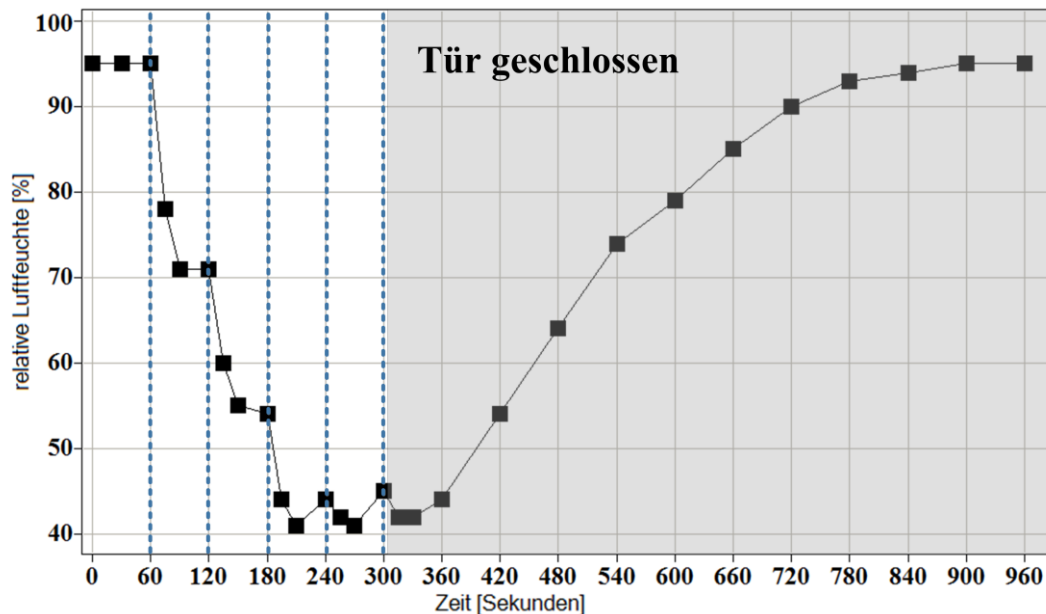


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Luftfeuchte in dem ISF-1X bei dem Öffnen der Tür in einem Intervall von 60 Sekunden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte, beginnend zum Zeitpunkt $t = 60$ Sekunden. Zum Zeitpunkt $t = 300$ Sekunden wird die Tür das letzte Mal geöffnet.

Anhand dieser Untersuchungen kann die Wichtigkeit einer möglichst kleinen Tür zum Ein- und Ausschleusen von Mikrotiterplatten und das Vorhandensein einer schnellen Regelung der Luftfeuchte bestätigt werden.

5.2.2.5. Ermittlung der Verdunstung im nicht automatisierten Inkubator

In dem nicht automatisierten Inkubator ISF-1X (Kühner AG, Schweiz) werden zur Minimierung der Verdunstung verschiedene Verschlussysteme für 6 *well* Platten getestet. Neben dem Standard Plastikdeckel der Mikrotiterplatten werden eine Klebefolie (*Breathable Sealing Membrane*, Nunc, Wiesbaden), der *MicroClimate™ environmental lid* (Labcyte, USA) und der neu entwickelte Edelstahldeckel (vgl. Kap. 5.2.2.3.) getestet. Der Fokus dieses Experiments liegt in der Verwendung von Verschlussystemen, die auch in dem automatisierten Inkubator eingesetzt werden können. Das *well-closure system* muss hingegen auf einem Schütteltablar fixiert werden und wird in diesem Experiment nicht getestet.

Die Verdunstung wird wie in Kapitel 5.2.2.1. beschrieben über die Messung der Osmolalität ermittelt. Dazu werden die einzelnen *wells* mit jeweils 5 mL Zellkulturmedium gefüllt und die Osmolalität für die Dauer eines einwöchigen Batch-Experimentes gemessen. Abbildung 33 zeigt den Verlauf der Osmolalität für die einzelnen Vertiefungen der 6 *well* Platten mit den

getesteten Verschlussystemen. Die Platten werden bei einer Exzentrizität von 25 mm bei 140 rpm, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

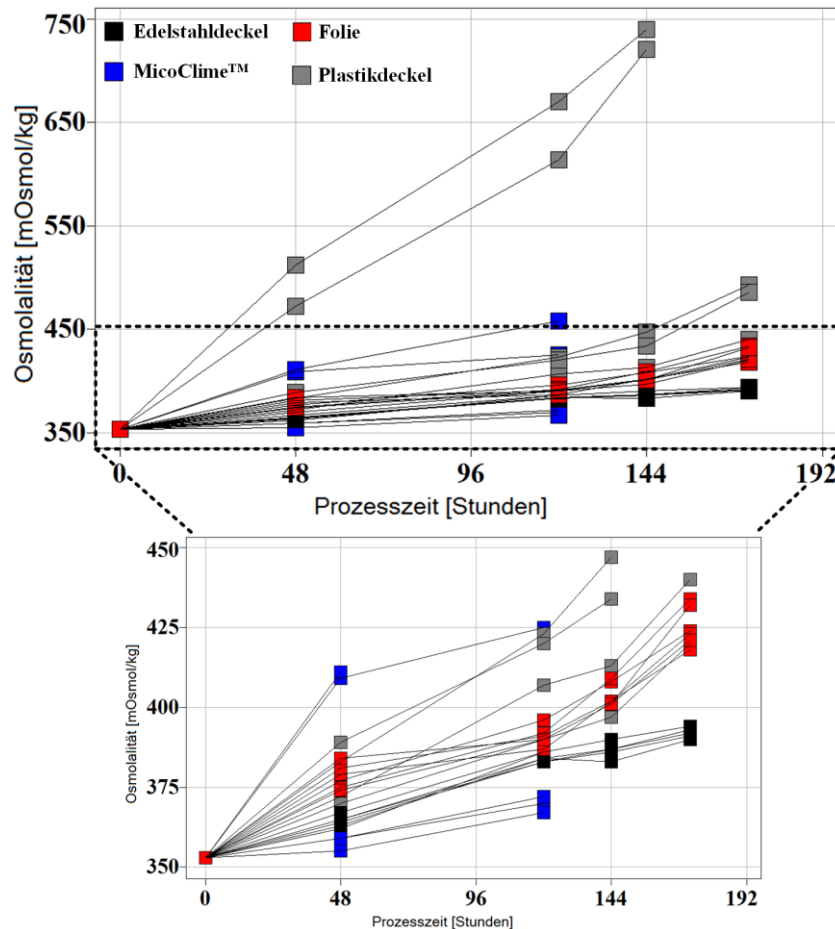


Abbildung 33: Verlauf der Osmolalität für die verschiedenen getesteten Verschlussysteme für 6 well Platten in dem ISF-1X bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 140 rpm bei einer Exzentrizität von 25 mm. Der Bereich von 350 bis 450 mOsmol/kg ist über den zeitlichen Verlauf vergrößert dargestellt.

Während in den wells, die mit dem Plastikdeckel verschlossen sind, die höchsten Verdunstungen und größten Streuungen zwischen den Vertiefungen zu beobachten sind, minimieren MicoClime™ Deckel und Folie die Verdunstung und die Streuung deutlich. Die geringste Verdunstung ist bei den wells zu beobachten, die mit dem Edelstahldeckel verschlossen sind. Außerdem ist hier auch die geringste Streuung festzustellen.

Auf Grund von Kontaminationen in allen wells der MicoClime™ Platte nach 120 Stunden sowie zwei wells der Platte mit Plastikdeckel nach 48 Stunden wird das Experiment für diese Platten abgebrochen. Eine Wiederholung des Experimentes ergibt vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich Verdunstungseffekten und Kontaminationen (Daten nicht gezeigt).

Ab 120 Stunden wird das Intervall zur Entnahme einer Probe auf 24 Stunden verkürzt. Für die Verschlussysteme Plastikdeckel und Folie führt dies zu einem stärkeren Anstieg der

Osmolalität. Es ist kein Einfluss auf die Verdunstung in der Platte mit dem Edelstahldeckel festzustellen.

Das *well-closure system* ist für die Verwendung in einem Brutschrank mit Schütteltablar vorgesehen und wird daher nur in dem ISF-1X verwendet. Dabei werden jeweils die normalen *sandwich cover* und die zum Erreichen einer geringeren Verdunstung in der Nähe der Tür (vorne) und im hinteren Teil des Inkubators (hinten) positioniert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C, 85 % relative Luftfeuchte und einer Frequenz von 350 rpm bei einer Exzentrizität von 3 mm. Zur Ermittlung der Verdunstung werden die Platten täglich gewogen. Tabelle 15 zeigt die mittlere Verdunstung für die jeweilige Platte.

Tabelle 15: Gravimetrische Bestimmung der Verdunstung für die *sandwich cover* des *well-closure systems* im ISF-1X bei 37 °C und 85 % relative Luftfeuchte. Die Platten werden mit einer Exzentrizität von 3 mm bei 350 rpm geschüttelt [119].

<i>sandwich cover</i>	Position	Mittlere Verdunstung [µL/well/Tag]	Herstellerangabe [114]* [µL/well/Tag]
normal	vorne	28,8	50
geringere Verdunstung	vorne	20,3	16
normal	hinten	22,5	50
geringere Verdunstung	hinten	18,3	16

* bei 30 °C und 50 % Luftfeuchte, keine Angabe zu Schüttelparametern

In dem ISF-1X kann eine Abhängigkeit der Verdunstung von der Positionierung der Platte im Innenraum festgestellt werden. Eine Inkubation in Nähe der Tür führt zu höheren Verdunstungsraten als im hinteren Bereich. Diese Positionsabhängigkeit kann auch für die Verschlusssysteme MicroClime™ *environmental lid*, Folie und Plastikdeckel bestätigt werden. Bei Verwendung des Edelstahldeckels tritt dieser Effekt nicht auf (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.6. Ermittlung der Verdunstung im automatisierten Inkubator

Die Ermittlung des verdunsteten Flüssigkeitsvolumens im automatisierten Inkubator erfolgt mit den optimierten Inkubatoreinstellungen und Verwendung eines Standard Plastikdeckels für die Mikrotiterplatten. Dieser stellt die kostengünstigste Lösung dar und wird daher auf seine Verwendbarkeit geprüft. Auf Grund der Wichtigkeit der Verdunstungscharakterisierung werden zur Gewährleistung eines hohen Maßes an Präzision zwei Herangehensweisen gewählt:

1. Experiment-basiert: Bestimmung der Verdunstung in einem Beispiel-Experiment.
2. Datenbank-basiert: Messung der *well*-Volumina am Ende sämtlicher Experimente und Berechnung des verdunsteten Volumens und Einrichten einer Datenbank mit den Ergebnissen.

Zur Ermittlung des Volumens verdunsteter Flüssigkeit über die Messung der Osmolalität werden jeweils vier 6 *well* und 24 *deepwell* Mikrotiterplatten in dem geschüttelten Inkubator platziert und mit Zellkulturmedium (348 mOsmol/kg) gefüllt. Die Osmolalität der automatisiert entnommenen Proben wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Osmomat 030 (Gonotec GmbH Berlin) in einer 1:4 Verdünnung mit sterilem Reinstwasser gemessen. Zu Beginn des Experimentes beträgt die Osmolalität 348 mOsmol/kg. In Tabelle 16 sind die Mittelwerte für die jeweilige Mikrotiterplatte dargestellt und der Anstieg der Osmolalität von einem Messtag zum folgenden. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchte größer 95 % (Sollwert 99 %) mit einer Schüttelfrequenz von 250 rpm für 6 *well* Platten und 350 rpm für 24 *deepwell* Platten.

Tabelle 16: Ermittelte Osmolalität für 6 *well* und 24 *deepwell* Platten an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur Ermittlung der Verdunstung. Für 6 *well* Platten repräsentiert jeder Messwert 6 Vertiefungen, für die 24 *deepwell* Platten repräsentiert jeder Messwert 16 Vertiefungen, welche über die gesamte Platte verteilt liegen.

Platte	Osmolalität #1 [mOsmol/kg]	Anstieg [%]	Osmolalität #2 [mOsmol/kg]	Anstieg [%]	Osmolalität #3 [mOsmol/kg]	Anstieg [%]
6 <i>well</i> Platte 1	357 ± 2,3	2,6	366 ± 2,1	2,5	377 ± 1,7	3,0
6 <i>well</i> Platte 2	356 ± 2,5	2,3	368 ± 2,0	3,4	376 ± 2,1	2,2
6 <i>well</i> Platte 3	356 ± 2,2	2,3	366 ± 1,5	2,8	379 ± 2,3	3,6
6 <i>well</i> Platte 4	358 ± 1,9	2,9	367 ± 2,5	2,5	377 ± 2,1	2,7
24 <i>deepwell</i> Platte 1	352 ± 1,6	1,1	356 ± 1,8	1,1	359 ± 1,8	0,8
24 <i>deepwell</i> Platte 2	351 ± 1,3	0,9	354 ± 1,6	0,9	358 ± 1,2	1,1
24 <i>deepwell</i> Platte 3	354 ± 1,2	1,7	357 ± 1,4	0,8	362 ± 1,7	1,4
24 <i>deepwell</i> Platte 4	354 ± 1,9	1,7	357 ± 1,5	0,8	361 ± 1,8	1,1

Der Anstieg der Osmolalität in den 6 *well* Platten beträgt im Mittel 10,25 mOsmol/kg pro Tag. Dies entspricht bei einem Füllvolumen von 5 mL 2,8 % pro Vertiefung und Tag. Bei den 24 *deepwell* Platten beträgt der mittlere Anstieg der Osmolalität 3,6 mOsmol/kg pro Tag. Dies entspricht bei einem Füllvolumen von 4 mL 1 % pro Vertiefung und Tag. Die Verdunstung in den Eck-*wells* ist gegenüber denen in der Plattenmitte leicht erhöht, die Abweichung liegt bei 6 *well* Platten kleiner 3 % und bei 24 *deepwell* Platten geringer als 2 % (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich werden die MicoClime™ Deckel von Labcyte im automatisierten Betrieb getestet. Die mit diesen Systemen ermittelten Verdunstungsraten sind mit denen der Standard Plastikdeckel vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Da der MicoClime™ Deckel keinen Vorteil bringt und höhere Kosten verursacht, werden diese nicht weiter verwendet.

Mit Hilfe der fortlaufend generierten Daten und dem Einrichten einer Datenbank wird für die 6 *well* Platten mit einem Kulturvolumen von 5 mL pro *well* anhand von mehr als 2000 Datenpunkten eine Verdunstung von 150 µL pro *well* und Tag berechnet [111]. Dies

entspricht 3 % pro Tag bezogen auf das Startvolumen. Für die verwendeten 24 *deepwell* Platten werden mehr als 1000 Datenpunkte ausgewertet und es ergibt sich bei einem Kulturvolumen von 4 mL pro *well* eine Verdunstung von 50 μ L pro *well* und Tag. Dies entspricht 1,25 % pro Tag. Der Variationskoeffizient liegt bei beiden Plattenformaten kleiner 5 % (Daten nicht gezeigt).

Der Verdunstungsausgleich erfolgt entweder durch die Zugabe einer verdünnten Nährlösung in einem Fed-Batch-Experiment oder durch die Zugabe von sterilem Reinstwasser. Die Zugabe erfolgt nur, wenn die Platten zur Entnahme einer Probe oder Zugabe einer Nährlösung ausgeschleust werden.

5.2.2.7. Zusammenfassung und Diskussion

Die Verdunstung spielt besonders in geschüttelten Kultursystemen eine große Rolle, da sie zu einem Anstieg der Osmolalität führt und damit negative Effekte auf die Zellkultur haben kann [120,121]. Besonders in Systemen wie Mikrotiterplatten, mit einem großen Verhältnis von Flüssigkeitsoberfläche zu Kulturvolumen, ist diese erhöht und erfordert besondere Maßnahmen zur Minimierung. Wesentliche Einflussfaktoren stellen der Inkubator und das Verschlusssystem der Mikrotiterplatte dar.

Zur Mikrotiterplattenkultivierung werden zwei Inkubatoren getestet, der STX-44 für den Einsatz im automatisierten Zellkultursystem und der nicht automatisierbare ISF-1X für Kultivierungen außerhalb des Systems. Als entscheidende Punkte zur Minimierung der Verdunstung werden das Vorhandensein einer kleinen Tür zum Ein- und Ausschleusen von Mikrotiterplatten und die Möglichkeit zur Generierung einer hohen Luftfeuchte in kurzer Zeit identifiziert. Diese Kriterien werden nur vom automatisierten STX-44 erfüllt, der über eine Dampfinjektionsdüse statt eines Wasserbads und eine um den Faktor 14 kleinere Tür verfügt. Durch zusätzliche Optimierungen des Inkubatorinnenraums zur Erhöhung und gleichmäßigen Verteilung der Luftfeuchte in dem Innenraum kann eine signifikante Reduzierung der Verdunstung erreicht werden. Dies ermöglicht den Einsatz kostengünstiger Plastikdeckel als Steril- und Verdunstungsbarriere. Der ISF-1X kann hingegen nicht vergleichbar optimiert werden, so dass die Bedeutung des Verschlusssystems der Mikrotiterplatten steigt. Im Vergleich zu automatisierbaren kommerziellen Systemen, wie gaspermeable Folien, Plastikdeckeln oder dem MicroClime™ Deckel werden die am Besten reproduzierbaren Ergebnisse bei minimaler Verdunstung mit einem Deckel erzielt, der im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wird. Der Standard Plastikdeckel kann in diesem Inkubator nicht verwendet werden. Ein weiteres System für den nicht automatisierten Betrieb stellt das kommerzielle *well-closure system* dar. Dieses muss auf einem Schütteltablett fixiert und manuell be- und entladen werden. Für dieses System können in dem ISF-1X die Herstellerangaben zur Verdunstung in 24 *deepwell* Platten mit dem Deckel für geringe Verdunstung von 16 μ L pro *well* und Tag bestätigt werden [114]. Zu anderen Verschlusssystemen, insbesondere zur

geschüttelten Kultivierung in 6 *well* Platten, ist aktuell keine Literatur für einen direkten Vergleich vorhanden.

Die Verdunstung in 6 *well* und 24 *deepwell* Platten wird im automatisierten Inkubator sowohl experimentell als auch über eine erstellte Datenbank bestimmt, in der die verdunsteten Volumina sämtlicher Kultivierungen hinterlegt sind. Ein hoher Übereinstimmungsgrad der experimentellen Daten mit denen der Datenbank verdeutlicht die hohe Zuverlässigkeit und Präzision der ermittelten Werte. In dem STX-44 wird für 6 *well* Platten eine mittlere Verdunstung von 3 % pro Tag bezogen auf ein Volumen von 5 mL pro *well* erhalten, in 24 *deepwell* Platten verdunstet bei einem Volumen von 4 mL pro *well* 1,25 % pro Tag. Wie in der Literatur beschrieben, ist die Verdunstung am Rand der Platten höher als in der Mitte [93,122], liegt aber für beide Plattentypen bei kleiner 3 %. Auf Grund des größeren Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen ist die Verdunstung in 6 *well* Platten höher als in 24 *deepwell* Platten. Auf Grund geringer Verdunstungsraten mit dem Standard-Plastikdeckel ist eine Verwedung des teureren Edelstahldeckels in dem automatisierten Inkubator nicht notwendig.

Eine Verdunstung ist bei der Verwendung von Mikrotiterplatten als Kultursystem nicht zu verhindern, da diese kein geschlossenes System repräsentieren. Daher müssen Maßnahmen getroffen werden, die diese verringern und vor allem vergleichbare Bedingungen innerhalb einer Platte garantieren. Zur Berechnung eines Flüssigkeitsausgleichs ist eine intensive Charakterisierung der Verdunstungsphänomene notwendig.

Durch die entwickelten Maßnahmen zur Minimierung der Verdunstung wird eine wichtige Voraussetzung zur automatisierten und reproduzierbaren Kultivierung in 6 *well* und 24 *deepwell* Mikrotiterplatten unter sterilen Bedingungen geschaffen. Eine Optimierung des Inkubators zur Gewährleistung einer hohen und gleichmäßig verteilten Luftfeuchte in dem Innenraum ermöglicht die Verwendung von kostengünstigen Plastikdeckeln. Ist eine solche Optimierung nicht möglich, kann ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter Deckel eingesetzt werden. Die exakte Quantifizierung des verdunsteten Volumens ermöglicht einen Flüssigkeitsausgleich. Die in diesem Kapitel unter optimierten Bedingungen ermittelten Verdunstungsraten werden für sämtliche folgende, automatisierte Experimente in geschüttelten Mikrotiterplatten verwendet. Diese betragen für 6 *well* Platten 150 μ L pro *well* und Tag und für 24 *deepwell* Platten 50 μ L pro *well* und Tag.

5.2.3. Automatisierte CHO-Kultivierung in verschiedenen Mikrotiterplattenformaten

Zur Überprüfung der optimierten Schüttelbedingungen sowie der entwickelten Maßnahmen zur Minimierung der Verdunstung werden Kultivierungen mit CHO-Zellen in verschiedenen Mikrotiterplattenformaten durchgeführt. Dabei wird eine Satzkultivierung (Batch) ohne Zufütterung zur Etablierung verschiedener Plattenformate vorgenommen. Weitergehende Untersuchungen zu den routinemäßig eingesetzten *6 well* und *24 deepwell* Platten erfolgen im Zulaufverfahren (Fed-Batch) mit der Zufütterung von Nährlösungen. Es soll die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Plattenformaten hinsichtlich des Zellwachstums überprüft sowie Variationen innerhalb einer Platte ermittelt werden. Für die *6 well* und *24 deepwell* Platten wird zusätzlich die Produktbildung in dem Fed-Batch Experiment untersucht. Dabei werden die in zusammengefassten Füllvolumina und Schüttelfrequenzen gewählt. Die gesamte Kulturführung erfolgt für alle Mikrotiterplattenformate vollständig automatisiert und umfasst alle Aktionen von dem Ausschleusen einer Platte aus dem Inkubator über die Probenahme und Zufütterung bis zum Einschleusen der Platte in den Inkubator. Zur Bestimmung der Zelldichte wird das automatisierte Fluoreszenzmikroskop IMT-2 verwendet. Die Produktkonzentration wird über die Kooperation mit der Analytikabteilung an einem Octet-System ermittelt.

Aus Geheimhaltungsgründen sind die dargestellten Lebendzellichten und Produktkonzentrationen mit einem Korrekturfaktor versehen.

5.2.3.1. Batch-Kultivierung in Mikrotiterplatten

Zur Etablierung der Mikrotiterplattenformate *6 well*, *12 well*, *24 well*, *24 deepwell* und *48 well* wird eine Batch-Kultivierung durchgeführt. Dieses Experiment legt die Grundlagen für den späteren Einsatz der getesteten Mikrotiterplatten im automatisierten Zellkultursystem. Die Bewertung erfolgt anhand des Zellwachstums und wird mit einer Referenzkultivierung im Schüttelkolben (3 Replikate) verglichen. Alle getesteten Plattenformate sowie die Schüttelkolben werden mit der gleichen Vorkultur angeimpft. Für dieses Experiment erfolgt kein Verdunstungsausgleich, da die Verdunstung für die nicht routinemäßig verwendeten *12 well*, *24 well* und *48 well* Platten im Vorfeld nicht ermittelt wurde. Die Durchführung erfolgt mit dem *Proof of Concept* System.

Der Verlauf der mittleren Lebendzellichte ist sowohl für alle getesteten Plattenformate als auch für die Referenz vergleichbar (Abbildung 34). Von der gleichen Vorkultur mit einer Lebendzellichte von 4 % ausgehend wachsen die Zellen auf ein Maximum von 94 % nach 192 Stunden. Dabei repräsentieren die Fehlerbalken die jeweilige Varianz innerhalb einer Platte. Der maximale Fehler beträgt $\pm 4,7\%$ bei der 48 well Platte und liegt damit für alle Formate unterhalb von 5 %.

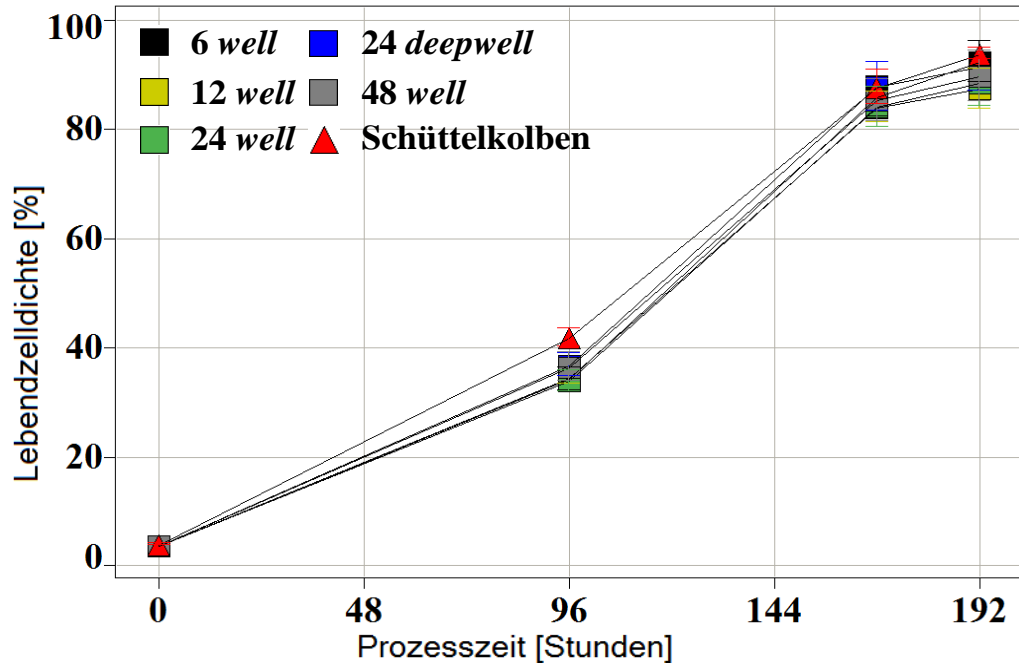


Abbildung 34: Verlauf der mittleren Lebendzellichte verschiedener Mikrotiterplattenformate in einem Batch-Prozess. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Anzahl gemittelter wells für den jeweiligen Plattentyp. Für die Schüttelkolben werden drei Replikate untersucht.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Kultivierung in verschiedenen Platten des gleichen Formats werden im Rahmen dieses Batch-Experimentes jeweils zwei Platten der Formate 12 well, 24 well, 24 deepwell und 48 well sowie sechs Platten des 6 well Formats untersucht. Auf Grund unterschiedlicher Schüttelfrequenzen werden die Experimente nacheinander durchgeführt und nicht die gleiche Vorkultur verwendet. Der Verlauf der mittleren Lebendzellichte ist in Abbildung 35 dargestellt und zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit des Zellwachstums in den wells sämtlicher getesteter Platten.

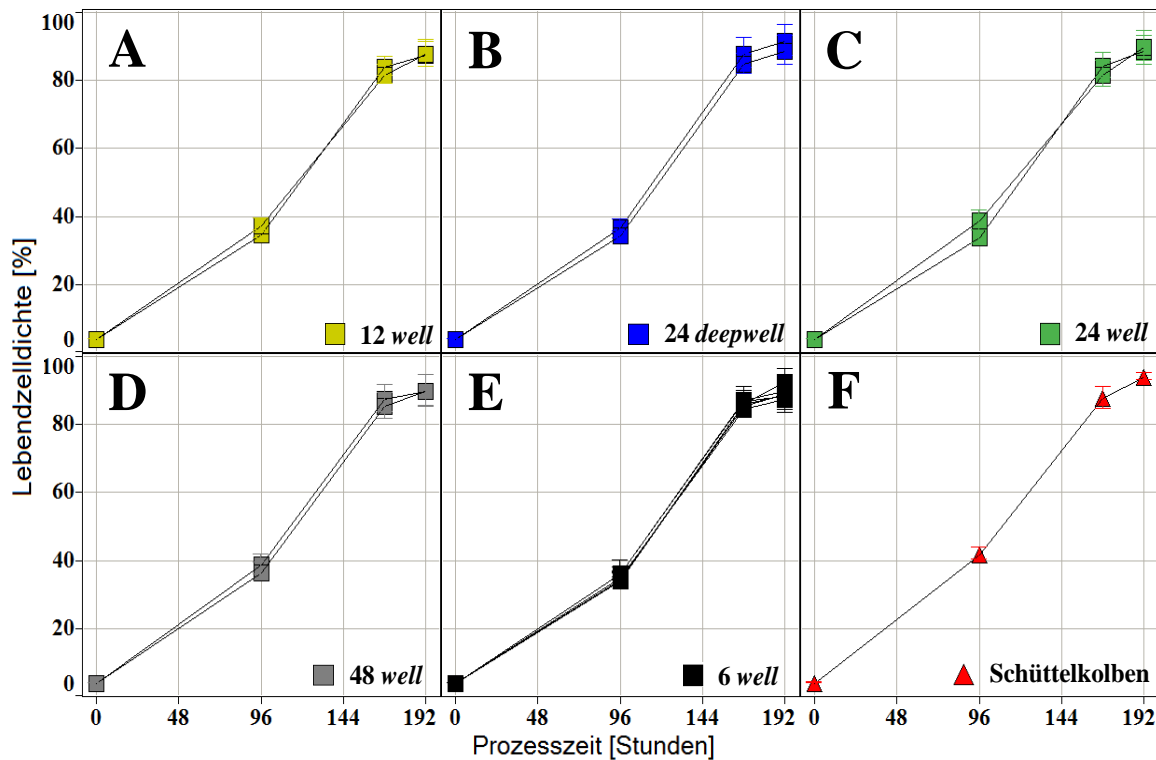


Abbildung 35: Verlauf der mittleren Lebendzellichte verschiedener Mikrotiterplattenformate in einem Batch-Prozess. Dargestellt sind die Verläufe der Mittelwerte für jeweils zwei Platten der Formate (A) 12 well, (B) 24 deepwell, (C) 24 well, und (D) 48 well sowie für (E) sechs Platten des 6 well Formats und (F) drei Schüttelkolben. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Anzahl gemittelter wells bzw. Schüttelkolben für das jeweilige Kultursystem.

Auf diese Weise kann bestätigt werden, dass die Zellkultivierung im Batch-Prozess in den Mikrotiterplatten der Formate 6 well, 12 well, 24 well, 24 deepwell und 48 well möglich ist und vergleichbare Ergebnisse zu einem Schüttelkolben liefert. Diese hohe Reproduzierbarkeit, die bei Kultivierung in verschiedenen Platten gleichen Formats und bei einem Vergleich unterschiedlicher Formate gegeben ist, unterstützt dieses Ergebnis. Für dieses Batch-Experiment erfolgt keine Bestimmung der Produktkonzentration.

5.2.3.2. Fed-Batch Kultivierungen in 6 well und 24 deepwell Platten

Das Fed-Batch-Experiment mit 6 well und 24 deepwell Platten erfolgt vollständig automatisiert in dem Produktivsystem. Die Zugabe der Zufütterlösung beginnt nach 72 Stunden und erfolgt täglich. Für den direkten Vergleich und die nähere Untersuchung dieser Formate werden jeweils zwei Platten gleichen Formats eingesetzt und neben der Lebendzellichte die Produktkonzentration ermittelt. In diesem Experiment erfolgt der Verdunstungsausgleich wie in Kapitel 5.2.2.6. beschrieben durch Zugabe von sterilem Reinstwasser. Die Kultivierungen erfolgen nacheinander, daher wird für jedes Plattenformat eine neue Vorkultur verwendet.

Der Verlauf der Lebendzellichte der Kultivierung in beiden Plattenformaten ist in Abbildung 36 dargestellt. Dabei ist ein vergleichbares Zellwachstum in beiden Formaten und auch

innerhalb der jeweiligen Platte festzustellen. Die lag-Phase in der 24 *deepwell* Platte ist gegenüber der 6 *well* Platte um 48 Stunden verlängert. Nach 288 Stunden wird in beiden Formaten die maximale Lebendzelldichte von 88 % und 96 % für die 24 *deepwell* Platten und 95 % und 98 % für die 6 *well* Platten erreicht. Die Messungen für die einzelnen Vertiefungen der Platten zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Dies bestätigt eine hohe Aussagekraft dieses Experimentes.

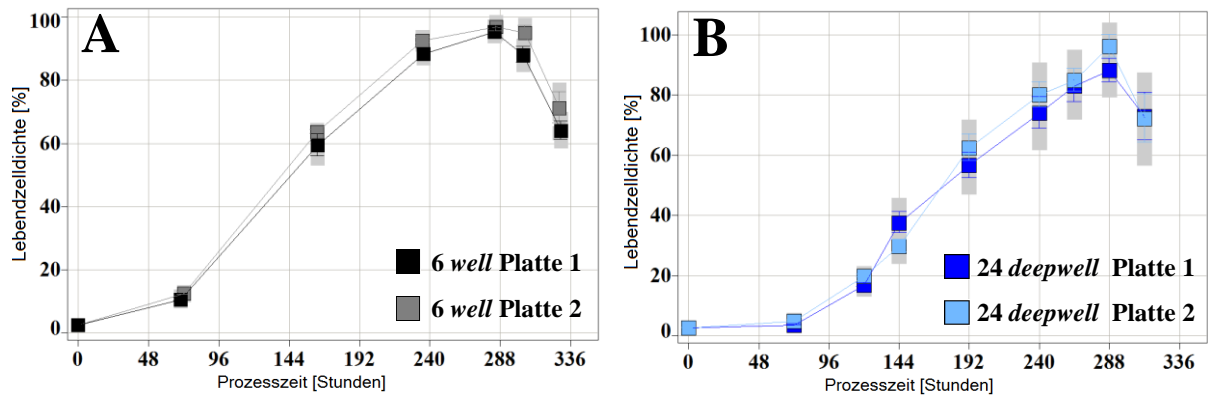


Abbildung 36: Verlauf der Lebendzelldichte während einer automatisierten Fed-Batch-Kultivierung. Hervorgehoben sind die Mittelwerte für die jeweilige Mikrotiterplatte mit der resultierenden Standardabweichung aus der Messung der einzelnen Vertiefungen, die im Hintergrund dargestellt sind für (A) zwei 6 *well* Platten. (B) zwei 24 *deepwell* Platten.

Abbildung 37 zeigt den Verlauf der Produktkonzentration für die 6 *well* und 24 *deepwell* Platten. Auf Grund begrenzter Kapazität bei der Bestimmung werden für die 24 *deepwell* Platten nur die letzten vier Tage der Kultivierung untersucht. Sowohl die Darstellung der Verläufe für die einzelnen *wells* als auch die der Mittelwerte zeigt eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den beiden getesteten Plattenformaten. Die ermittelten Abweichungen innerhalb einer Platte sind geringer als die für die Lebendzelldichte (vergleiche Abbildung 36). Dies könnte daran liegen, dass sich der automatisierte Assay zur Bestimmung der Lebendzelldichte in Entwicklung befindet, wogegen die Messung der Produktkonzentration mit einer Standard-Methode erfolgt. Die maximale Produktkonzentration am Ende der Kultivierung beträgt im Mittel für die 6 *well* Platten 92 % gegenüber 88 % für die 24 *deepwell* Platten.

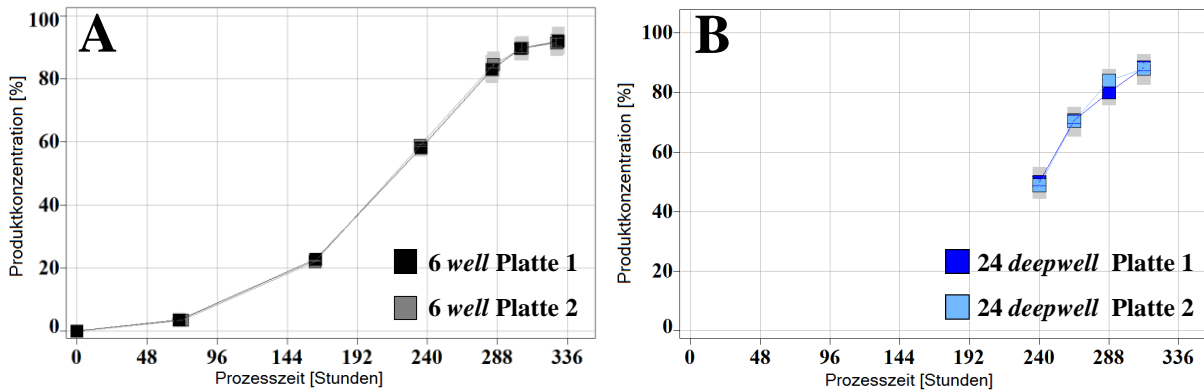


Abbildung 37: Verlauf der Produktkonzentration während einer automatisierten Fed-Batch-Kultivierung. Hervorgehoben sind die Mittelwerte für die jeweilige Mikrotiterplatte mit der resultierenden Standardabweichung aus der Messung der einzelnen Vertiefungen, die im Hintergrund dargestellt sind für (A) zwei 6 well Platten. (B) zwei 24 deepwell Platten.

Zusätzlich erfolgt ein Vergleich zwischen einer geschüttelten und einer statischen Fed-Batch-Kultivierung in 6 well Platten. Da der k_{La} -Wert bei den statischen Platten gegenüber den geschüttelten deutlich verringert ist und sich die Zellen am Boden des wells ablagern, wird das Kulturvolumen der statischen Platten auf 2 mL pro well reduziert. Auf diese Weise wird die Diffusionsstrecke für die Gase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid verringert. In Abbildung 38 ist der Verlauf der Lebendzellichte (A) und der Produktkonzentration (B) für den Vergleich einer geschüttelten und einer statischen Kultivierung in einer 6 well Platte dargestellt. Während die Kulturen unter geschüttelten Bedingungen ein vergleichbares Zellwachstum und eine vergleichbare Produktbildung zu Abbildung 37 zeigen, ist die statische Kultivierung durch eine um den Faktor 6 geringere maximale Lebendzellichte sowie ein frühes Absterben nach 240 Stunden gekennzeichnet. Die maximale Produktkonzentration liegt für die statische Kultur unter 20 %.

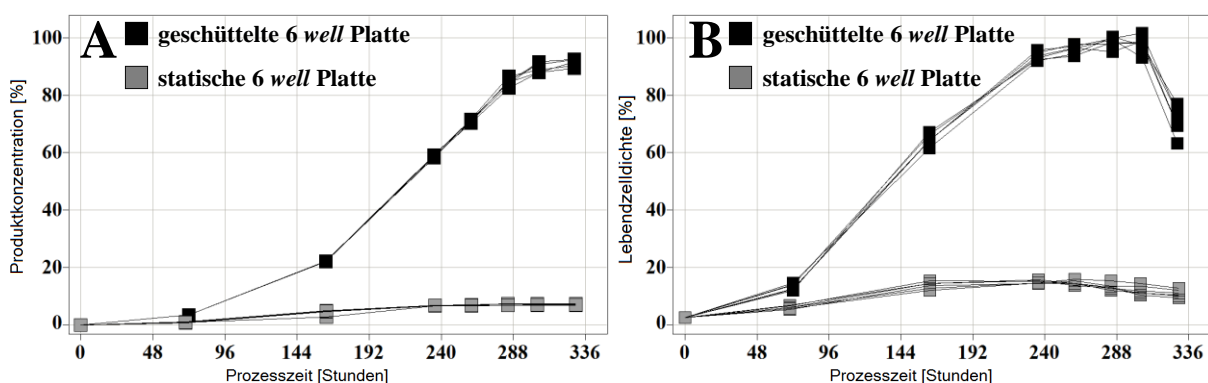


Abbildung 38: Verlauf der (A) Lebendzellichte und (B) für den Vergleich einer geschüttelten und einer statischen Kultivierung in einer 6 well Platte.

In einem weiteren Fed-Batch Experiment wird der Einsatz des SensorDish Reader der Firma Presens zur optischen Bestimmung des pH-Wertes in 6 well Platten getestet. Die Zellen weisen in den von Presens zur Verfügung gestellten Platten eine lag-Phase von 5 Tagen auf

und erreichen nur 50 % der Lebendzellendichte eines Referenzexperimentes (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse können in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. Da zum Zeitpunkt der Arbeiten kein alternatives kommerzielles System zur optischen pH-Wertbestimmung in Mikrotiterplatten verfügbar ist, wird dieser Parameter in dem Produktivstem nicht bestimmt. Stattdessen wird die Pufferkapazität der verwendeten Zellkulturmedien entsprechend den Anforderungen angepasst.

5.2.3.3. Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen einer Batch-Kultivierung kann mit den Mikrotiterplattenformaten *6 well*, *12 well*, *24 well*, *24 deepwell* und *48 well* ein vergleichbares Zellwachstum zum Schüttelkolben erzielt werden, so dass diese als automatisiertes Kultursystem eingesetzt werden können. Solche Plattenformate mit geringem Kulturvolumen eignen sich besonders für die Durchführung einer großen Anzahl paralleler Experimente bei der Ermittlung einer geringen Prozessinformationsdichte, während Formate mit einem höherem Kulturvolumen ein breites Spektrum analytischer Untersuchungen ermöglichen. Auf Grund des Fokus der vorliegenden Arbeit auf *6 well* und *24 deepwell* Platten werden diese zusätzlich in einem Fed-Batch-Experiment detaillierter untersucht. Dabei kann eine hohe Vergleichbarkeit bezüglich des Zellwachstums und der Produktbildung festgestellt werden. Die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse ist sowohl innerhalb einer Platte als auch bei dem direkten Vergleich mehrerer Platten hoch. Dieses Experiment bestätigt die Erkenntnisse aus der Batch-Kultivierung. Ein in der Literatur beschriebener negativer Effekt auf die Kultivierung bei der Verwendung von *24 deepwell* Platten aus Polypropylen [98] kann nicht bestätigt werden. In einem weiteren Fed-Batch Experiment kann die Notwendigkeit des Schüttelns in einem direkten Vergleich zwischen geschüttelter und statischer Kultur bestätigt werden. Durch die fehlende Durchmischung ist der Gasaustausch verringert und die Zellen werden nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Dies führt zu einem schnelleren Absterben der Zellen. Die maximal erreichten Zelldichten liegen um Faktor 5 unterhalb derer für eine geschüttelte Kultivierung.

Mit diesen Ergebnissen können die Optimierungsarbeiten bezüglich der Schüttelparameter (Kap. 5.2.1.3.) sowie der Maßnahmen zur Minimierung der Verdunstung (Kap. 5.2.2.) als erfolgreich bewertet werden. Diese gewährleisten eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Batch und Fed-Batch Prozess. Erzielte Ergebnisse sind sowohl innerhalb der jeweiligen Kulturplatte als auch zwischen verschiedenen Mikrotiterplattenformaten sehr gut vergleichbar. Die geschüttelte Mikrotiterplatte wird als Kultursystem für CHO-Zellkulturen zur Durchführung von automatisierten Batch- und Fed-Batch-Experimenten etabliert und die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente bilden die Grundlage für den weiteren Einsatz des automatisierten Zellkultursystems in der Prozessentwicklung.

5.2.3.4. Vergleichbarkeit der Kultursysteme Mikrotiterplatte und Bioreaktor

Die Vergleichbarkeit der Kultursysteme Mikrotiterplatte und Bioreaktor stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung eines automatisierten Systems für den prädiktiven *scale up* dar. Für den Beweis der Vergleichbarkeit von Ergebnissen sollen zwei Fed-Batch-Kultivierungen mit einer CHO-Suspensionskultur automatisiert im *Proof of Concept* System durchgeführt und die Ergebnisse mit denen aus Bioreaktoren verschiedenen Maßstabs verglichen werden. Als zentrale Bewertungskriterien dienen die Verläufe der Lebendzellichte und der Produktkonzentration. Zusätzlich wird die Konzentration der Metabolite Glukose und Laktat prozessbegleitend bestimmt.

Im Rahmen von Fed-Batch Prozessen mit einer kontinuierlichen Zufütterung von zwei Nährlösungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten starten, werden die Ergebnisse von 6 *well* Platten mit einem Füllvolumen von 5 mL pro *well* mit Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L verglichen. Die Betreuung der Bioreaktoren erfolgt durch die Abteilung der technischen Fermentations-Entwicklung. Bei diesem Versuch werden zwei Prozessvarianten in dem Bereich der Kulturmedienentwicklung getestet, wobei Variante B den optimierten Prozess beschreibt. Der experimentelle Aufbau dieser Vergleichskultivierung wird von einer Gruppe der Entwicklungsabteilung vorgegeben und ist in Abbildung 39 dargestellt.

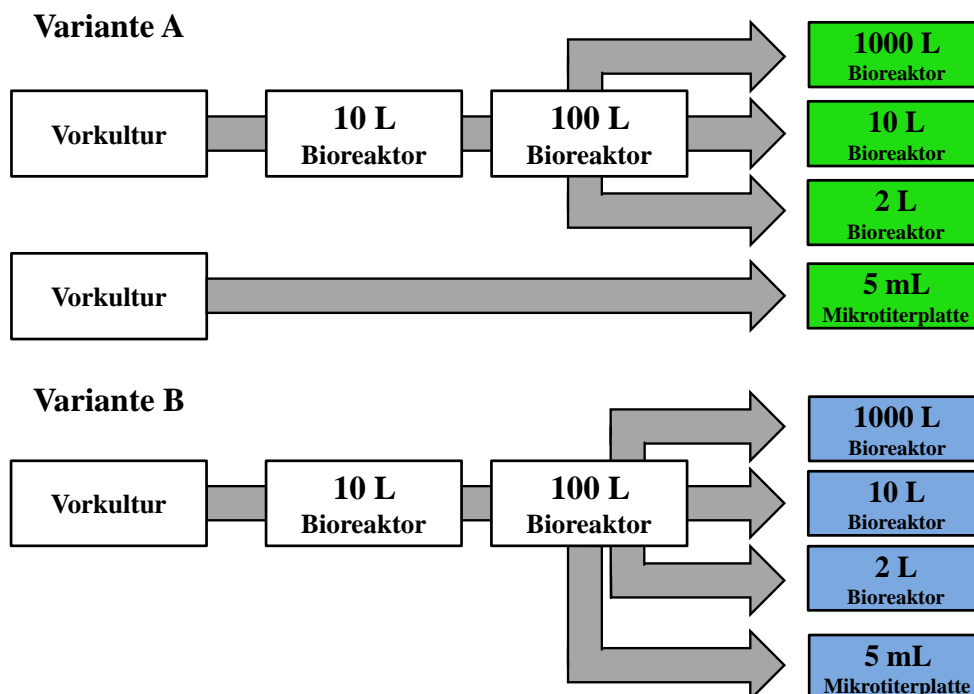


Abbildung 39: Vorkulturführung für das Fed-Batch Experiment zur Vergleichskultivierung in 6 *well* Platten und Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L. Für die Mikrotiterplatte werden alle 6 *wells* als Replikate verwendet, der Mittelwert dient dem direkten Vergleich. Prozessvariante A repräsentiert den Standard-Prozess des verwendeten CHO-Klons mit einer separaten Vorkultur für die Mikrotiterplatte, bei Prozessvariante B wird eine optimierte Medienzusammensetzung getestet. Bei dieser Variante stammt die Vorkultur für alle Versuche aus einem 100 L Bioreaktor

Während Prozessvariante A den Standard-Prozess für den eingesetzten CHO-Klon repräsentiert, wird in Prozessvariante B eine optimierte Zusammensetzung des Wachstumsmediums getestet. Die Vorkultur unterscheidet sich zwischen den beiden Varianten insofern, als dass bei dem Standardprozess eine andere Vorkultur für die Mikrotiterplatte und die Bioreaktoren verwendet wird. Bei Variante B werden alle Kultursysteme aus der gleichen Vorkultur aus einem 100 L Bioreaktor angeimpft. Es werden zwei Zufüttermedien verwendet, wobei das erste nach 72 Stunden und das zweite nach 144 Stunden kontinuierlich bis zum Prozessende zugegeben wird.

Es ergeben sich folgende prozessbedingte Unterschiede zwischen Mikrotiterplatten und Bioreaktoren:

- Das im Bioreaktor mit kontinuierlichem Volumenstrom zugegebene Zufüttermedium wird in der Mikrotiterplatte täglich als einmaliger Bolus zugegeben.
- Da das Zufüttervolumen prozentual auf das Ausgangsvolumen berechnet wird, steigt bei gleichem geringem Probenahmenvolumen in allen Maßstäben das Gesamtvolumen in dem 1000 L Bioreaktor am stärksten an. In den Mikrotiterplatten gilt Probenahmenvolumen = Zufüttervolumen, so dass das Gesamtvolumen über den gesamten Prozess bei 5 mL liegt.
- Die Bestimmung der Lebendzell-dichte erfolgt für die Bioreaktoren an dem Cedex Analysesystem, für die Mikrotiterplatten an dem IMT-2 Mikroskop.
- Für den Vergleich wird jeweils eine 6 *well* Platte mit 6 Replikaten eingesetzt, daher resultieren die dargestellten Messwerte aus einer Mittelwertbildung aller 6 *wells*.

In Abbildung 40 ist der Verlauf der Lebendzell-dichte für alle getesteten Kultursysteme dargestellt. Es ist für beide getesteten Prozessvarianten ein vergleichbares Zellwachstumsverhalten zu erkennen. Die maximale Lebendzell-dichte wird zur gleichen Zeit zwischen 239 und 257 Stunden erreicht. Bei den Mikrotiterplatten ist eine um 24 Stunden verlängerte lag-Phase zu beobachten. Anhand der maximalen Lebendzell-dichte kann sowohl in der Mikrotiterplatte als auch in dem 1000 L Bioreaktor eine Verbesserung für Prozessvariante B festgestellt werden. Die maximale Lebendzell-dichte liegt in diesen Kultursystemen 30-37 % über denen des Standard-Prozesses.

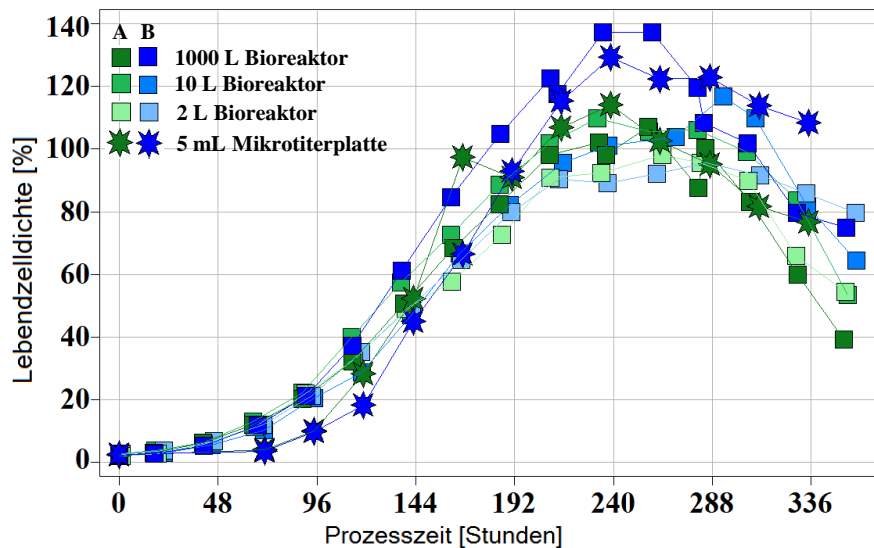


Abbildung 40: Verlauf der Lebendzellidichte für den Vergleich der Kultivierung in 6 well Mikrotiterplatten und Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L. Die dargestellten Messwerte der 6 well Platte repräsentieren den Mittelwert aller 6 wells.

Zur Bestimmung der Produktkonzentration mittels Protein A-HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) kann auf Grund des benötigten Volumens für die Mikrotiterplatten nur am Kulturende eine Messung durchgeführt werden. Die Kooperation mit der Analytikgruppe und damit die Messung mit dem Octet-System (vgl. Kap. 7.2.5.1.) sind zum Zeitpunkt dieses Experiments noch nicht etabliert. Der Verlauf der Produktkonzentration ist in Abbildung 41 dargestellt. Bis zu einer Prozesszeit von 185 Stunden ist für beide Prozessvarianten eine vergleichbare Produktbildung zu beobachten. Mit fortschreitender Kulturdauer zeichnen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Prozessvarianten ab, wobei die höchste Produktkonzentration von 130 % bei der optimierten Variante B erhalten wird. Die maximale Produktkonzentration für Variante A beträgt 105 %. Diese Prozessoptimierung ist von dem 5 mL Mikrotiterplatten-Maßstab bis hin zum 1000 L Bioreaktor-Maßstab zu beobachten.

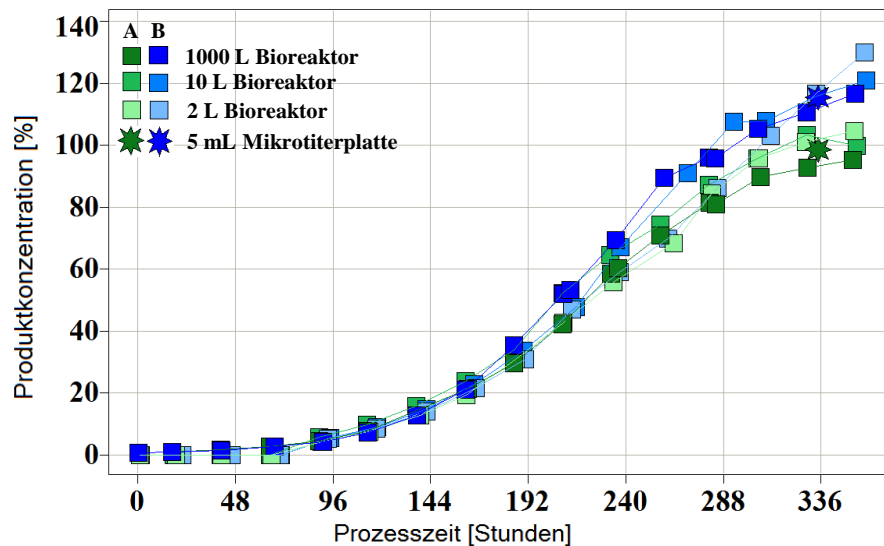


Abbildung 41: Verlauf der Produktkonzentration für den Vergleich der Kultivierung in 6 well Mikrotiterplatten und Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L. Die dargestellten Messwerte der 6 well Platte repräsentieren den Mittelwert aller 6 wells.

Die Konzentrations-Verläufe der Metabolite Glukose und Laktat sind in Abbildung 42 dargestellt. Die Verläufe sind in allen getesteten Kultursystemen und Maßstäben vergleichbar. In dem Standard-Prozess (Variante A) sinkt die Glukosekonzentration nach 140 Stunden auf ungefähr 35 % und steigt anschließend nach Start der zweiten, Glukose-haltigen Nährlösung bei Mikrotiterplatte, 2 L, und 10 L Bioreaktor wieder an. Im 1000 L Bioreaktor sinkt die Glukosekonzentration auch nach 144 Stunden weiter bis an den Zeitpunkten 230 und 280 Stunden eine konzentrierter Glukoselösung als Bolus zugegeben wird. Für Prozessvariante B ist in allen Kultursystemen ein vergleichbarer Verlauf zu beobachten. Die Laktatkonzentration steigt in beiden Prozessvarianten und allen Kultursystemen vergleichbar an und erreicht nach einer Prozesszeit von 168 Stunden ein Plateau mit einem Maximum von 191 %. Während für Prozessvariante A nach 240 Stunden ein zweiter Anstieg der Laktatkonzentration festzustellen ist, bleibt diese bei Variante B bis zum Prozessende auf einem konstanten Wert von 100 %.

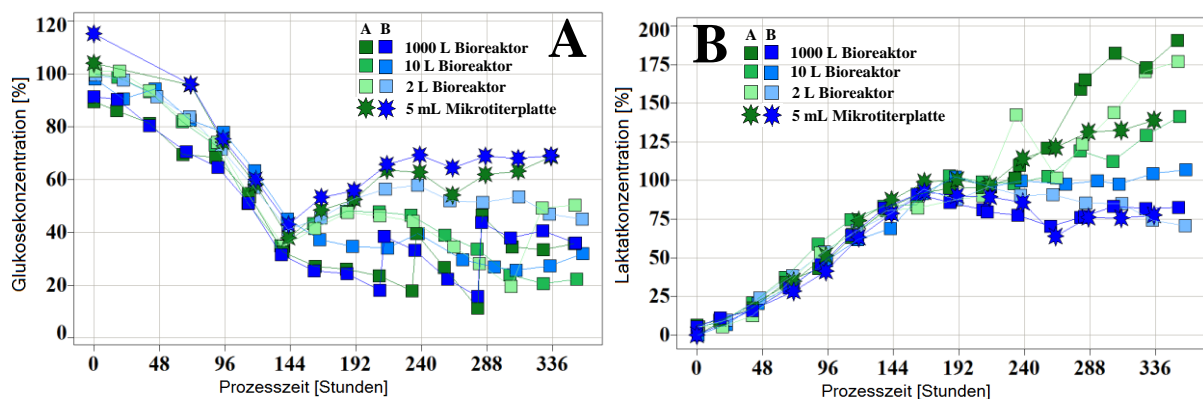


Abbildung 42: Verlauf der (A) Glukosekonzentration und (B) Laktatkonzentration für den Vergleich der Kultivierung in 6 well Mikrotiterplatten und Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L. Die dargestellten Messwerte der 6 well Platte repräsentieren den Mittelwert aller 6 wells.

5.2.3.5. Zusammenfassung und Diskussion Bioreaktorvergleich

Im Rahmen eines Fed-Batch Experimentes zur Medienoptimierung wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von 6 *well* Platten und Bioreaktoren der Maßstäbe 2 L, 10 L und 1000 L bewiesen. Die Auswirkung einer Prozessoptimierung kann in allen getesteten Kultursystemen gleichermaßen beobachtet werden, das zentrale Bewertungskriterium stellt hierfür die erreichte maximale Produktkonzentration am Prozessende dar. Eine Messung sämtlicher Proben mit derselben Methode (ProteinA-HPLC) garantiert dabei ein hohes Maß an Vergleichbarkeit. Während für alle Kultursysteme eine vergleichbare Wachstumscharakteristik erhalten wird, unterscheiden sich die maximal erreichten Lebendzellichten. Die beobachteten Abweichungen zwischen Mikrotiterplatte und Bioreaktor sowie zwischen den verschiedenen Bioreaktor-Maßstäben resultieren aus der Messung der Proben durch verschiedene Operatoren an verschiedenen Zellzählssystemen. So werden die Lebendzellichten für die Bioreaktoren mit Hilfe der automatisierten Trypanblau-Färbung mit dem Cedex Analysesystem bestimmt. Für die Messung der Mikrotiterplatten-Proben wird die in dem automatisierten Zellkultursystem integrierte fluoreszenzbasierte Zellzählung verwendet. Dieses System ist zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch in der Implementierungsphase, was ebenfalls zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung führen kann. Vergleichbare Verläufe der Glukose- und Laktatkonzentration in allen getesteten Kultursystemen bestätigen die Ergebnisse der Produktkonzentration und der Lebendzellichte. Mit diesen Ergebnissen kann die Skalierbarkeit mit einem Verhältnis von 1:200.000 für geschüttelte Mikrotiterplatten an einem direkten experimentellen Vergleich zu Bioreaktoren mit einem Kulturvolumen von bis zu 1000 L bewiesen werden. Dieser Beweis stellt die Grundlage für den Einsatz dieses Kultursystems zur Vorhersage von Ergebnissen in der Prozessentwicklung dar. Außerdem kann der automatisierte Prozess zur Kulturführung und Analytik etabliert und die Machbarkeitsstudie für den Einsatz miniaturisierter analytischer Methoden als erfolgreich bewertet werden. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage zur Untersuchung der Hauptanwendungsgebiete des automatisierten Zellkultursystems.

Mit Hilfe des entwickelten automatisierten Zellkultursystems kann die Vergleichbarkeit einer automatisierten Fed-Batch Kultivierung im Mikrotiterplattenformat zu Bioreaktoren mit einem Volumen von bis zu 1000 L anhand der Kultivierungsparameter Lebendzellichte, Produktkonzentration sowie Glukose- und Laktatkonzentration gezeigt werden. Dieser erfolgreiche *scale down* der Mikrotiterplatte mit einem Verhältnis von 1:200.000 ermöglicht den Einsatz dieses Kultursystems zur Vorhersage von Bioreaktor-Ergebnissen.

5.3. Hauptanwendungsgebiete des automatisierten Zellkultursystems im industriellen Umfeld

Nach dem erfolgreichen Aufbau des automatisierten Zellkultursystems und der Etablierung der geschüttelten Mikrotiterplatte als *scale down* System zum Bioreaktor sollen Hauptanwendungsgebiete aufgezeigt und das entwickelte System eingesetzt werden. Anwendungsgebiete mit der Notwendigkeit für einen hohen Durchsatz liegen sowohl in der frühen als auch der späteren Phase einer Prozessentwicklung. Zu den frühen zählen beispielsweise Klonauswahlprozesse bei denen zahlreiche Klone hinsichtlich der Produktbildung bewertet werden oder Experimente aus dem Bereich der Medienentwicklung in späteren Phasen. Hier stehen die Identifizierung neuer Mediensupplemente und die Ermittlung optimaler Konzentrationsbereiche im Vordergrund. Gerade für diesen Aspekt wird häufig die statistische Versuchsplanung zur Erstellung komplexer, voll faktorieller Versuchsdesigns verwendet, die einen großen experimentellen Umfang erfordern.

5.3.1. Automatisiertes Medien-*Blending* in der Fed-Batch Prozessführung

Die Entwicklung von optimierten Zellkulturmedien spielt eine zentrale Rolle bei der Produktion biopharmazeutischer Proteine. Dabei beeinflussen die Wachstums- und Zufüttermedien sowohl die Produktbildungsraten der Zellkulturen als auch die Produktqualität [123,124]. Auf Grund der Komplexität der Medienformulierungen gestaltet sich der Optimierungsprozess jedoch als zeit- und arbeitsaufwendig. Durch den Einsatz von *scale down* Systemen für die Zellkultur kombiniert mit der statistischen Versuchsplanung können die Entwicklungszeiten deutlich verkürzt werden [125-127]. Dieser Ansatz ermöglicht die parallele Untersuchung zahlreicher Medienzusammensetzungen und bietet zusätzlich die Möglichkeit, aus einem großen Datensatz die optimalen Bedingungen gesichert zu bestimmen [128]. Neben diesem Ansatz können über spezielle Versuchsplanungen, wie beispielsweise *one factor at a time*-Analysen, viele Medienbestandteile auf Limitierungen und sogar deren Verbrauchskinetiken untersucht werden. Weitere Herangehensweisen nutzen die *spent media* Analyse oder das Medien-*Blending* [128]. Letzteres wird mit Hilfe des automatisierten Zellkultursystems durchgeführt und im Folgenden beschrieben. In dem durchgeführten Experiment soll die optimale Kombination aus einem Wachstumsmedium, einem Zufüttermedium und der Adaptation der Vorkultur identifiziert werden. Als Vergleich dient der Standardprozess für die gewählte Zelllinie. Das identifizierte *Setup* soll in einem anschließenden Experiment im 2 L Bioreaktormaßstab überprüft werden.

Aus Geheimhaltungsgründen wird eine Normalisierung der Ergebnisse auf den Standardprozess durchgeführt, der als Referenz dient.

5.3.1.1. Versuchsaufbau

Für die Durchführung eines automatisierten Medien-*Blending* Experiments für eine Antikörper-produzierenden CHO-Zelllinie wird der in Abbildung 43 dargestellte experimentelle Aufbau gewählt. Auf dem *Blend* zweier Wachstumsmedien werden zwei Zufüttermedien und die Vorkultur-Adaptation an die beiden Wachstumsmedien voll faktoriell untersucht. Dazu werden die Wachstumsmedien in 25 % Stufen gemischt und für jede Mischungsstufe neben der Abhängigkeit von der Vorkultur-Adaptation die beiden Zufüttermedien getestet. Das Experiment wird in 6 *well* Platten durchgeführt, so dass sich ein Versuchsumfang von 20 Platten mit insgesamt 120 *wells* ergibt. Dabei repräsentiert jede 6 *well* Platte eine Prozessbedingung und dient daher als 6-faches Replikat. Als Referenzprozess dient die Kombination: adaptierte Vorkultur an Medium 1, 100 % Wachstumsmedium 1 und Zufüttermedium 1.

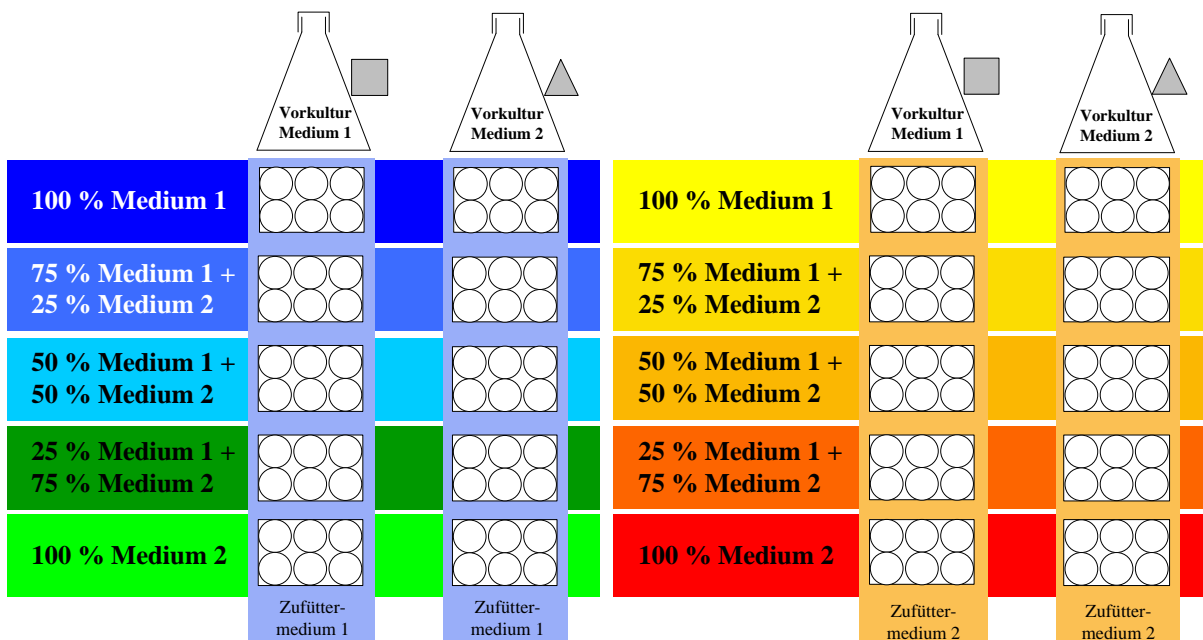


Abbildung 43: Experimenteller Aufbau des automatisierten Medien-*Blending* in der Fed-Batch Prozessführung auf Basis von geschüttelten 6 *well* Platten. Es wird der Einfluss der Parameter Wachstumsmedium, Zufütterlösung und Adaptation der Vorkultur auf das Zellwachstum und die Produktbildung einer Antikörper-produzierenden CHO-Zelllinie untersucht. Die beiden Wachstumsmedien werden in 25 % Stufen gemischt und für jede Mischung der Einfluss der Vorkultur-Adaptation an das jeweilige Wachstumsmedium untersucht. Zusätzlich werden für jeden Ansatz zwei Zufütterlösungen getestet, so dass ein voll faktorieller Aufbau resultiert. Jede 6 *well* Platte repräsentiert eine Prozessbedingung, zur Auswertung werden die Mittelwerte verwendet.

Dieses Experiment wird vollständig automatisiert auf dem Produktivsystem durchgeführt. Die integrierte prozessbegleitende Analytik wird täglich für sämtliche Ansätze durchgeführt. Dazu werden die Parameter Lebendzellichte, Glukose- und Laktatkonzentration automatisiert gemessen, die Ermittlung der Produktkonzentration ab einer Prozesszeit von 288 Stunden übernimmt die Analytikabteilung mit dem Octet-System.

5.3.1.2. Identifizierung des optimalen Setup zur Steigerung der Produktkonzentration

Die Ergebnisse der täglichen Lebendzellichte-Bestimmung sind in Abbildung 44 für jedes einzelne *well* sowie die Mittelwerte für die jeweilige 6 *well* Platte dargestellt. Bei der Darstellung der einzelnen Messwerte können keine Ausreißer identifiziert werden, so dass eine hohe Plausibilität der Daten gewährleistet ist. Die deutlichsten Unterschiede in dem Zellwachstum sind zwischen den beiden Zufütterlösungen unabhängig vom Wachstumsmedium oder der Adaptation der Vorkultur zu erkennen. Während mit Zufütterlösung 1 eine maximale Lebendzellichte von 192 % nach 268 Stunden erreicht wird, liegt diese für Zufütterlösung 2 unterhalb des Referenzprozesses bei maximal 65 % und wird bereits nach 144 Stunden erreicht. Ebenso ist ein Einfluss auf das Zellwachstum durch das verwendete Wachstumsmedium zu erkennen. Für die 50/50 Mischung sowie 25 % Medium 1 und 75 % Medium 2 werden die höchsten Lebendzellichten erhalten. Den geringsten Einfluss hat die Adaptation der Vorkultur. Dabei führt die Adaptation an Medium 2 zu einem besseren Zellwachstum als die Adaptation an Medium 1. Dieser Effekt ist bei einem Vergleich sämtlicher Medienmischungen mit der Zugabe von Zufütterlösung 1 zu beobachten. Die beiden folgenden Kombinationen der getesteten Parameter führen zu der höchsten Lebendzellichte in dem Experiment:

- 50 % Medium 1 und 50 % Medium 2, Adaptation an Medium 2, Zufüttermedium 1
- 25 % Medium 1 und 75 % Medium 2, Adaptation an Medium 2, Zufüttermedium 1

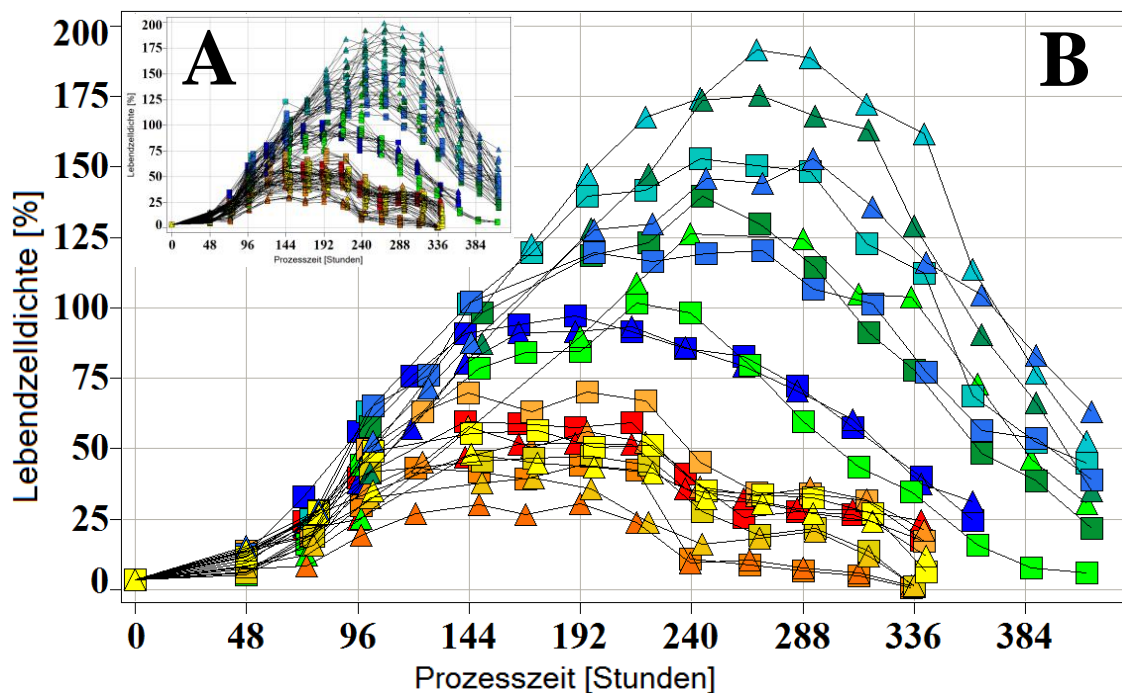


Abbildung 44: Verlauf der Lebendzellichte für (A) sämtliche Einzel-wells der 6 well Platten und (B) Mittelwert für die jeweilige 6 well Platte in dem automatisierten Medien-Blending Experiment. Die Werte sind auf den Standardprozess normalisiert. Für die Legende siehe Abbildung 43.

Abbildung 45 zeigt den Verlauf der Produktkonzentration. Die größten Unterschiede sind bei einem Vergleich der beiden Zufüttermedien zu erkennen. Während bei der Verwendung von Zufüttermedium 1 nur 24 % der Produktkonzentration bezogen auf den Standardprozess erhalten werden, kann mit den Kombinationen 50 % Medium 1 + 50 % Medium 2 und 25 % Medium 1 + 75 % Medium 2, Zufüttermedium 1 und Adaptation an Medium 2 die Produktkonzentration um 22 % gesteigert werden. Den größten Einfluss auf die Produktkonzentration hat die Wahl des Zufüttermediums, das Wachstumsmedium hat den zweitgrößten Effekt. Bei einem Vergleich des Adaptationsmediums werden mit Medium 2 in allen Fällen die höhere Produktkonzentration erreicht. Die höchsten Produktkonzentrationen werden mit den folgenden Parameterkombinationen erhalten:

- 50 % Medium 1 und 50 % Medium 2, Adaptation an Medium 2, Zufüttermedium 1
- 25 % Medium 1 und 75 % Medium 2, Adaptation an Medium 2, Zufüttermedium 1

Diese Kombinationen stimmen mit denen überein, die für die Bewertung der Lebendzellichten identifiziert werden konnten. Der Prozess für Zufüttermedium 1 wird auf Grund der geringen Lebendzellichte der Kultur und der stagnierenden Produktkonzentration nach 336 Stunden abgebrochen.

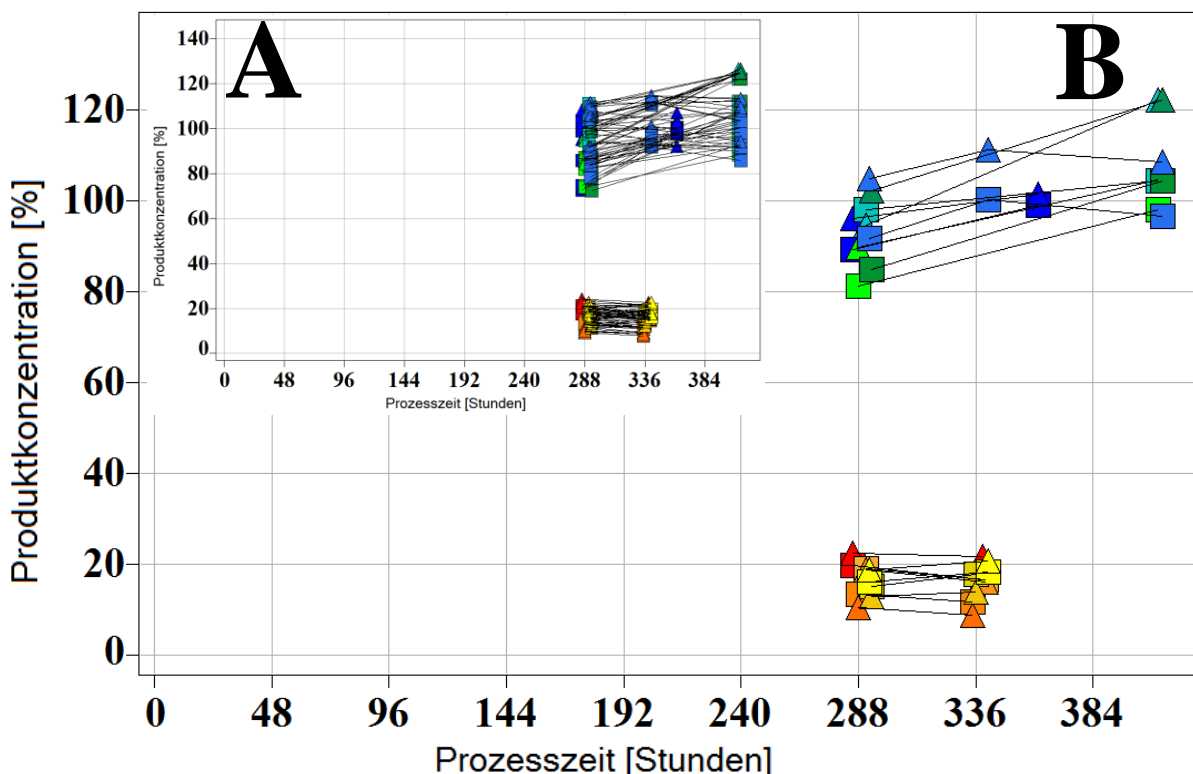


Abbildung 45: Verlauf der Produktkonzentration für (A) sämtliche Einzel-wells der 6 well Platten und (B) Mittelwert für die jeweilige 6 well Platte in dem automatisierten Medien-Blending Experiment. Die Werte sind auf den Standardprozess normalisiert. Für die Legende siehe Abbildung 43.

Vergleichbar zu den Verläufen der Lebendzellichte und der Produktkonzentration werden die größten Unterschiede bei den Konzentrationsverläufen von Glukose und Laktat zwischen den verwendeten Zufüttermedien beobachtet (Abbildung 46 und Abbildung 47). Diese enthalten beide Glukose, so dass auf Grund des schlechten Zellwachstums mit Zufüttermedium 2 die Glukosekonzentration während des Prozesses stetig steigt. Die Laktatkonzentration steigt auf einen Wert von 20 % und bleibt bis Prozessende konstant. Dabei ist die Laktatbildung unabhängig von dem Wachstumsmedium oder der Adaptation der Vorkultur. Die Messung der Glukose- und Laktatkonzentration wird für die Ansätze mit Zufüttermedium 2 nach 336 Stunden beendet, da die Lebendzellichten bereits unter 30 % liegen.

Für die Kulturen mit Zufüttermedium 1 wird eine Abhängigkeit der Glukose- und Laktatkonzentration von dem Wachstumsmedium und der Vorkultur-Adaptation beobachtet. Vergleichbar mit dem Verlauf der Lebendzellichten sinkt die Glukosekonzentration bis Prozessende auf ein Minimum unter 20 %. Die Laktatbildung wird vom Wachstumsmedium beeinflusst, die geringste Konzentration wird für die am besten wachsenden und produzierenden Zellen erhalten. Bei diesen ist ebenfalls eine Abnahme der Laktatkonzentration nach 244 Stunden zu beobachten. Auf Grund technischer Probleme ist die Messung der Laktatkonzentration nur bis zu einer Prozesszeit von 340 Stunden möglich.

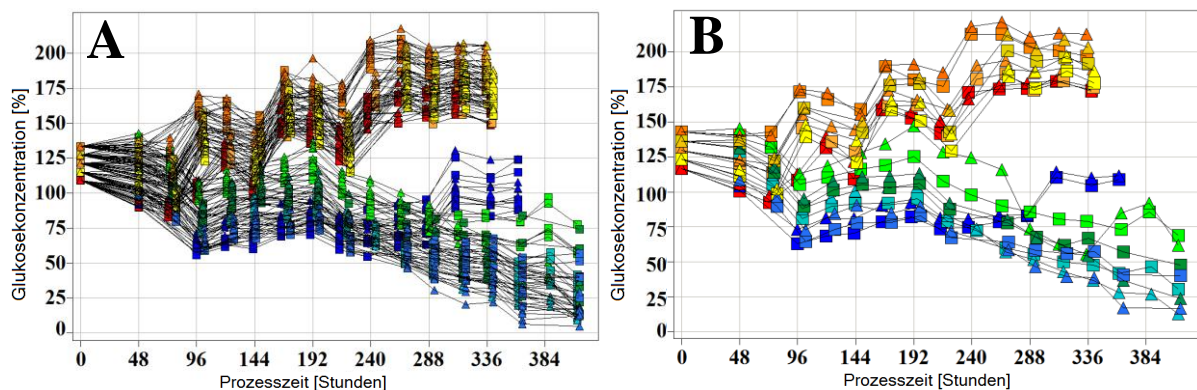


Abbildung 46: Verlauf der Glukosekonzentration für (A) sämtliche Einzel-wells der 6 well Platten und (B) Mittelwert für die jeweilige 6 well Platte in dem automatisierten Medien-Blending Experiment. Für die Legende siehe Abbildung 43.

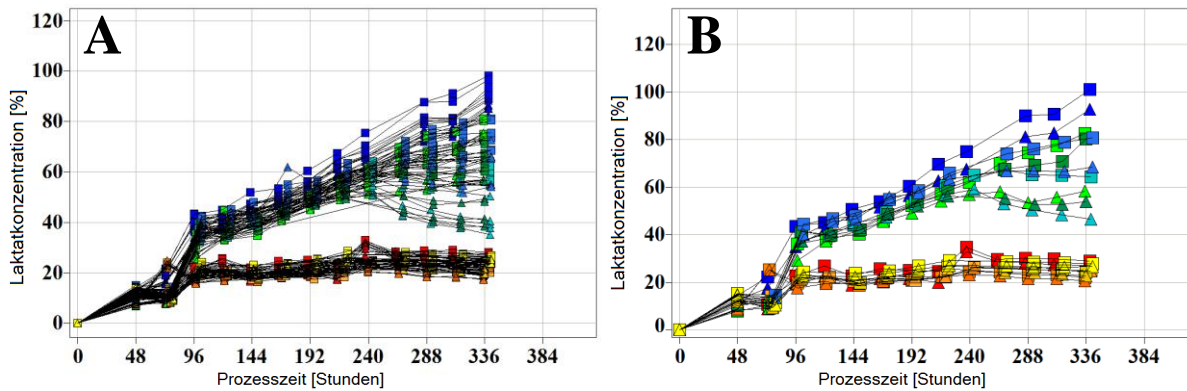


Abbildung 47: Verlauf der Laktatkonzentration für (A) sämtliche Einzel-wells der 6 well Platten und (B) Mittelwert für die jeweilige 6 well Platte in dem automatisierten Medien-Blending Experiment. Für die Legende siehe Abbildung 43.

Die automatisierte Durchführung des Medien-Blendings erlaubt eine voll faktorielle Untersuchung der drei Parameter Wachstumsmedien-Mischung, Zufüttermedium und Adaptation der Vorkultur. Dabei kann eine optimale Parameterkombination identifiziert werden, mit der in einem 17-tägigen Prozess die maximale Produktkonzentration bezogen auf den Referenz-Prozess um 22 % gesteigert werden kann. Mit diesem Experiment werden die automatisierte Durchführung eines Fed-Batch Experimentes mit 120 Parallelansätzen und die integrierte Analytik für die Kultivierungsparameter Lebendzellichte, Glukose- und Laktatkonzentration etabliert.

5.3.1.3. Beschleunigung des Kultivierungsprozesses durch Erhöhung der Startzellichte

Mit der in dem vorigen Kapitel identifizierten optimalen Kombination aus Wachstumsmedium, Zufüttermedium und Adaptation der Vorkultur kann eine Erhöhung der Produktkonzentration um 22 % erreicht werden. Auf Grund einer langen Kulturdauer von 408 Stunden soll dieser Prozess beschleunigt werden. Es wird parallel in einem 2 L Bioreaktorsystem sowie in zwei 6 well Platten überprüft, ob dies durch eine Erhöhung der Start-Lebendzellichte erreicht werden kann. Dabei erfolgt die Kulturführung für die 6 well Platten vollständig automatisiert mit dem Produktivsystem. Die Betreuung der Bioreaktoren wird von Mitarbeitern der Abteilung Fermentationsentwicklung übernommen. Für beide Kultursysteme wird der Standard-Prozess mit 100 % Wachstumsmedium 1, Zufüttermedium 1 und Adaptation an Medium 1 verwendet (vgl. Kap. 5.3.1.1.).

Abbildung 48 zeigt den Verlauf der Lebendzellichte in einem 2 L Bioreaktor und zwei 6 well Platten mit erhöhter Start-Lebendzellichte. Zusätzlich ist eine 6 well Platte mit geringer Animpfzellichte und dem Standard-Prozess aus Kapitel 5.3.1.2. als Referenz dargestellt. Die Wachstumscharakteristik der Zellen ist sehr gut vergleichbar zwischen dem 2 L Bioreaktor und den 6 well Platten, ein Versatz bei den absoluten Werten ist auf den Einsatz verschiedener

Zellzählsysteme und Methoden zurückzuführen (Bioreaktor = Trypanblau-Methode am Cedex Analysesystem, 6 well Platte = fluoreszenzbasierte Methode am IMT-2 Mikroskop).

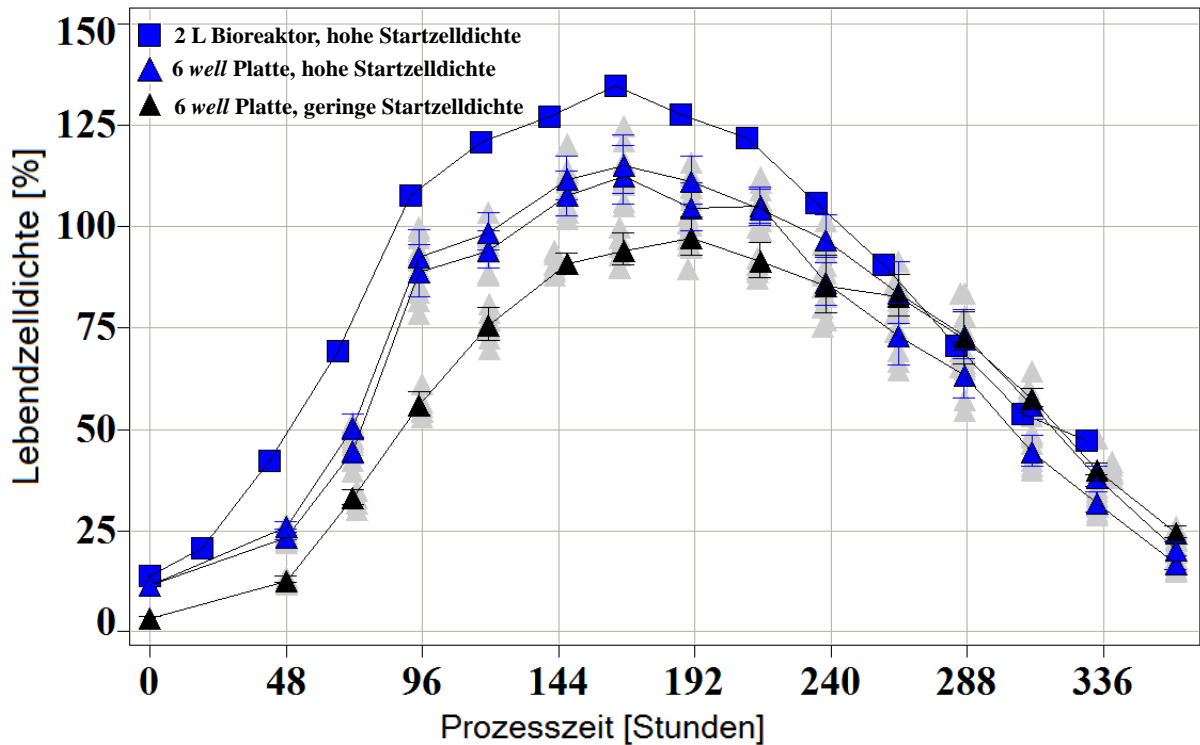


Abbildung 48: Verlauf der Lebendzellichte in einem 2 L Bioreaktor und 6 well Platten mit erhöhter Start-Lebendzellichte. Als Referenz ist eine 6 well Platte mit geringer Start-Lebendzellichte aus dem Medien-Blending Experiment (Kap. 5.3.1.2.) dargestellt (schwarz). Für die 6 well Platten sind die resultierenden Standardabweichungen aus den Messungen der 6 einzelnen wells dargestellt. Zusätzlich sind im Hintergrund die Verläufe der einzelnen wells dargestellt.

Eine Erhöhung der Animpfzellichte führt in beiden Kultursystemen zu einer Verkürzung der lag-Phase, einem beschleunigten Zellwachstum und einer höheren maximalen Lebendzellichte gegenüber einem Referenzprozess mit geringer Animpfzellichte. Die Darstellung der Messwerte für die einzelnen Vertiefungen der 6 well Platten zeigt eine sehr gute Übereinstimmung innerhalb einer Platte sowie zwischen zwei Platten.

In Abbildung 49 ist der Verlauf der Produktkonzentration für den 2 L Bioreaktor sowie für die 6 well Platten dargestellt. Die Mittelwerte der Platten sind hervorgehoben, die Messungen der einzelnen wells sind im Hintergrund ausgegraut erkennbar. Gegenüber dem Referenzprozess mit einer geringen Animpfzellichte in der Mikrotiterplatte führt eine Erhöhung der Animpfzellichte zur Steigerung der maximalen Produktkonzentration um 13 %, die 48 Stunden früher erreicht wird.

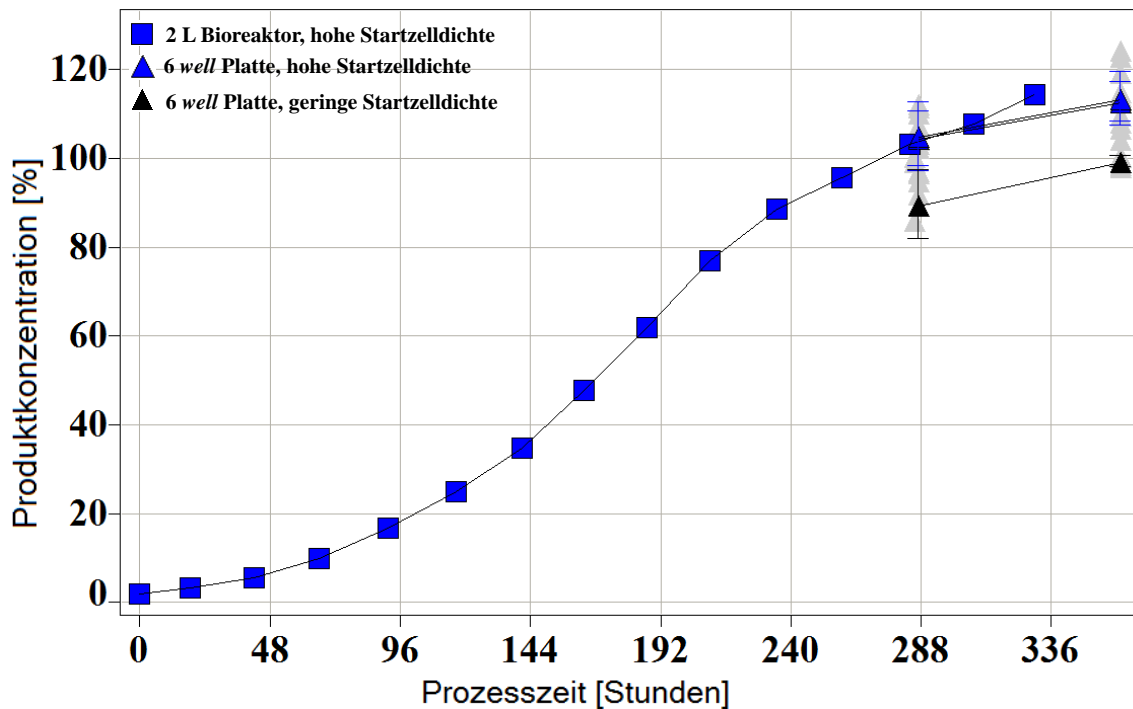


Abbildung 49: Verlauf der Produktkonzentration in einem 2 L Bioreaktor und 6 well Platten mit erhöhter Start-Lebendzelldichte. Als Referenz ist eine 6 well Platte mit geringer Start-Lebendzelldichte aus dem Medien-Blending Experiment (Kap. 5.3.1.2.) dargestellt (schwarz). Für die 6 well Platten sind die resultierenden Standardabweichungen aus den Messungen der 6 einzelnen wells dargestellt. Zusätzlich sind im Hintergrund die Verläufe der einzelnen wells dargestellt.

Eine Erhöhung der Animpfzelldichte führt zu einem beschleunigten Zellwachstum mit dem Erreichen höherer maximaler Lebendzellichten. Es kann zusätzlich die maximale Produktkonzentration früher erreicht und gesteigert werden. Dieser Effekt kann sowohl in einem 2 L Bioreaktor als auch in Mikrotiterplatten im 6 well Format beobachtet werden. Daher eignet sich eine Erhöhung der Animpfzelldichte zur Verkürzung eines Kultivierungsprozesses. Mit diesem Experiment kann gezeigt werden, dass auch eine Übertragbarkeit für Prozesskinetiken gegeben ist.

5.3.1.4. Übertragbarkeit der Ergebnisse von Mikrotiterplatten in den 2 L Bioreaktor

In einem anschließenden Experiment sollen die Vorhersagen aus den automatisierten Kultivierungen in Mikrotiterplatten in einem 2 L Bioreaktorsystem überprüft werden. Dazu werden die beiden in Kapitel 5.3.1.2. ermittelten besten Parameterkombinationen transferiert und das Experiment mit einer hohen Animpfzelldichte durchgeführt. Es werden beide Vorkultur-Adaptationen getestet, so dass sich folgende Kombinationen ergeben:

- 50 % Medium 1 und 50 % Medium 2, Adaptation an Medium 1 und 2, Zufüttermedium 1
- 25 % Medium 1 und 75 % Medium 2, Adaptation an Medium 1 und 2, Zufüttermedium 1

Als Referenz dient ein Bioreaktor mit dem Standard-Prozess (vgl. Kap. 5.3.1.1.) und hoher Animpfzellichte. Die Bioreaktorkultivierungen werden von einer Gruppe der Entwicklungsabteilung durchgeführt.

Den Verlauf der Produktkonzentration für die getesteten Parameter in dem 2 L Bioreaktorsystem zeigt Abbildung 50. Im Vergleich zu dem Referenzprozess kann mit der vorhergesagten optimalen Medien-Kombination und Vorkultur-Adaptation die maximale Produktkonzentration um 18 % gesteigert werden. Außerdem kann die vorhergesagte Prozessbeschleunigung von 48 Stunden bestätigt werden. Ebenso ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der Abstufung der Produktkonzentration für die getesteten Parameter-Kombinationen gegeben. Eine Adaptation der Vorkultur an Medium 2 liefert jeweils die höhere Produktkonzentration.

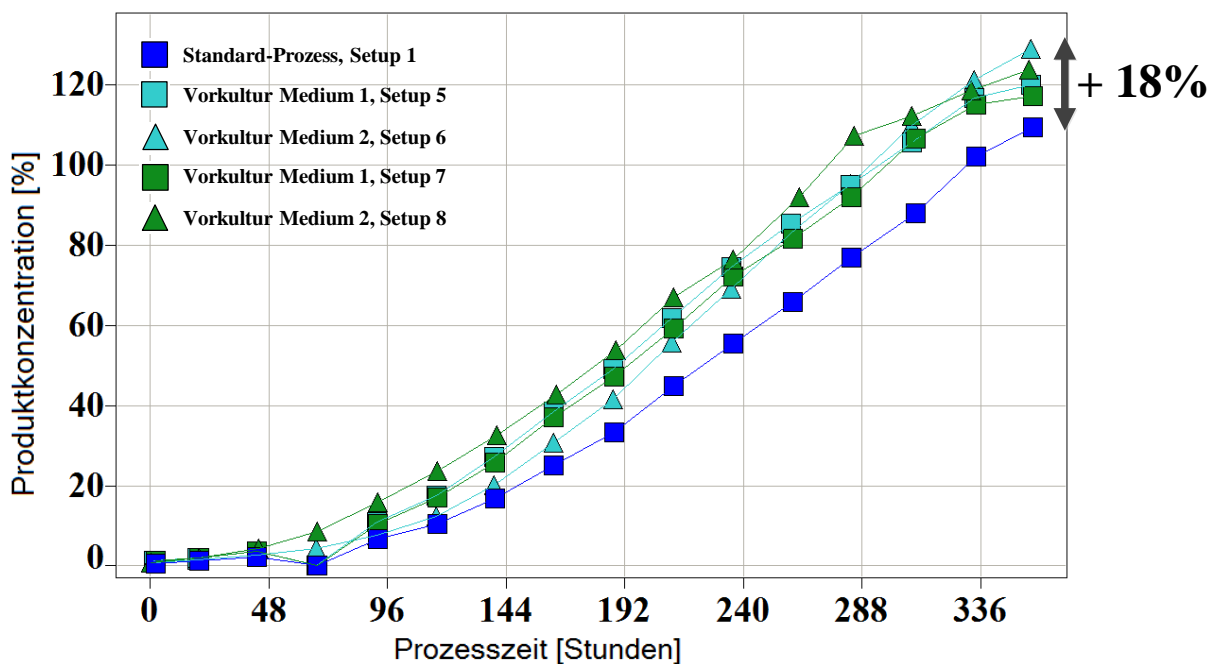


Abbildung 50: Verlauf der Produktkonzentration in 2 L Bioreaktorsystemen zur Überprüfung der Vorhersagen aus Mikrotiterplatten.

5.3.1.5. Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die erfolgreiche Durchführung eines automatisierten Medien-*Blending* Experimentes mit dem automatisierten Zellsystem erläutert. Dabei werden mit der integrierten Analytik täglich die Kultivierungsparameter Lebendzellichte, Glukose- und Laktatkonzentration bestimmt. Die Messung der Produktkonzentration erfolgt in der Analytikabteilung.

Im Rahmen der Parallelkultivierung von 120 Ansätzen wird eine optimale Kombination aus einer Mischung von zwei Wachstumsmedien, zwei Zufüttermedien und der Vorkultur-Adaptation identifiziert. Diese führt zu einer Erhöhung der maximalen Lebendzellichte um 84 % sowie der Produktkonzentration um 22 % gegenüber dem Standard-Prozess. Die Wahl

des Zufüttermediums hat dabei den größten Einfluss. Bei Wahl des ersten Konzentrates spielt das verwendete Wachstumsmedium die entscheidende Rolle für das Erreichen der maximalen Produktkonzentration, die Vorkultur-Adaptation hat dagegen einen geringeren Einfluss. Der Einsatz von Zufüttermedium 2 führt im Vergleich zum Standard-Prozess zu einem schlechteren Zellwachstum und geringeren Produktkonzentrationen, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wird. Die Ergebnisse der Metabolitkonzentrationsbestimmungen zeigen eine Beeinflussung des Glukosestoffwechsels durch das verwendete Medium in Form einer medienabhängigen Laktatbildung. Ein direkter Zusammenhang zwischen einem Überschuss an Glukose und der vermehrten Bildung von Laktat kann hingegen nicht festgestellt werden. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bestätigt die Möglichkeit zur Verwendung der analytischen Methoden im Routinebetrieb.

In einem Vorexperiment zur Untersuchung der Prozessbeschleunigung durch eine Erhöhung der Start-Lebendzellichte werden sowohl in der 6 *well* Platte, als auch einem 2 L Bioreaktor vergleichbare Ergebnisse erzielt. Eine Erhöhung der Animpfzellichte führt zu einer Beschleunigung des Kultivierungsprozesses um 48 Stunden und ermöglicht eine Steigerung der maximalen Lebendzellichte um 20 % sowie der Produktkonzentration um 15 %.

Diese Vorhersagen aus den Mikrotiterplatten-Kultivierungen werden abschließend auf ein 2 L Bioreaktorsystem übertragen. Dazu wird das optimale *Setup* des automatisierten Medien-*Blendings* gewählt sowie die Animpfzellichte erhöht. Die Ergebnisse aus fünf 2 L Bioreaktoren bestätigen die Vorhersagen, dass die Produktkonzentration durch Wahl der optimalen Medien-Kombination um 18 % bezogen auf den Standardprozess gesteigert und der Prozess zudem um 48 Stunden verkürzt werden kann.

Mit zwei automatisierten Fed-Batch-Experimenten in 6 *well* Platten kann eine Prozessoptimierung anhand der Parameter Lebendzellichte und Produktkonzentration identifiziert werden. Die Vorhersagen zur Steigerung der Produktkonzentration um 22 % und einer Verkürzung des Prozesses um 48 Stunden können direkt auf Bioreaktoren im 2 L Maßstab übertragen werden. Es wird der erfolgreiche Transfer von Ergebnissen aus dem automatisierten Zellkultursystem auf ein Bioreaktorsystem gezeigt.

5.3.2. Automatisierter Klonauswahlprozess in der Fed-Batch Prozessführung

Die Auswahl von Zellklonen stellt den größten Engpass bei der Generierung einer Zelllinie mit hoher Produktbildung dar und nimmt normalerweise einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten in Anspruch [129]. Nach der Transfektion mit dem Gen, welches das gewünschte Produkt codiert, werden die Zellen in Mikrotiterplatten mit Hilfe der *limiting dilution*-Methode ausgesät und Einzelklone isoliert [130]. Während die Primärauswahl von einer großen Anzahl an Klonen statisch im Plattenformat von 96 *well* bis 6 *well* erfolgt, wird die Auswahl einzelner Klone danach in Batch-Prozessführung unter geschüttelten Bedingungen weiter eingeengt [131]. Für die anfängliche Untersuchung einer größeren Anzahl an Klonen werden häufig 384 *well* Platten eingesetzt. Da aber der Fed-Batch Prozess die vorherrschende Prozessform zur Produktion rekombinanter Proteine darstellt [132] und sich das Verhalten der einzelnen Klone in Batch und Fed-Batch Prozess unterscheiden kann, sollte der Auswahlprozess idealerweise unter Zufütterung von Nährstoffen erfolgen [131]. Die Möglichkeit, eine größere Anzahl an Klonen zu einem früheren Zeitpunkt in *scale down* Systemen mit Zufütterung zu untersuchen, erhöht die Chance, den besten Klon auszuwählen [133].

In einem Vorexperiment zur Untersuchung des Einflusses der Prozessführung auf die Klonauswahl kann bestätigt werden, dass sich die Bewertung der Klone in einem Batch und einem Fed-Batch Experiment unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Durchführung von Fed-Batch Experimenten unter geschüttelten Bedingungen zur Klonauswahl.

5.3.2.1. Versuchsaufbau

Zur Beschleunigung eines Klonauswahlprozesses einer Antikörper-produzierenden Zelllinie und zur Erhöhung der Chancen, den besten Klon zu identifizieren, wird ein automatisiertes Fed-Batch-Experiment mit dem Produktivsystem in einer frühen Phase der Klonauswahl durchgeführt. Dieses Experiment wird mit einem manuellen Vorgehen verglichen, welches von der Forschungsabteilung der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt wird. Abbildung 51 zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

Bei dem manuellen Prozess wird nach einem Standardvorgehen verfahren, bei dem die Anzahl der Klone ausgehend vom 384 *well* Plattenformat bis zur 6 *well* Platte in Batch-Experimenten reduziert wird. Die Produktkonzentration am Ende des Prozesses stellt das Bewertungskriterium für die Auswahl dar. Bis zu der Stufe der 6 *well* Platte erfolgt die Auswahl unter statischen Bedingungen. Nur die 18 Klone mit den besten Produktbildungseigenschaften werden anschließend in einem Fed-Batch Experiment in Schüttelkolben bewertet. Für den manuellen Prozess steht das Cedex Analysesystem zur

Verfügung, dieses kann aber auf Grund des zu geringen maximalen Probevolumens nicht für eine Zellzählung in Mikrotiterplatten verwendet werden. Daher wird für das Ausverdünnen der Kulturen zwischen den einzelnen Stufen in den Batch-Experimenten ein fixes Verhältnis von neuem Kulturmedium und zellhaltiger Suspension für die gesamte Platte gewählt. Aus diesem Vorgehen resultiert eine unterschiedliche Animpfzellendichte für die einzelnen Klone in jeder neuen Stufe von der 384 *well* Platte bis hin zur 6 *well* Platte. Bei diesem Vorgehen erfolgt die Bewertung der Klone auf Basis der Produktivität, die Selektion erfolgt hingegen basierend auf dem Zellwachstum. Auf diese Weise werden im Auswahlprozess Klone mit einer hohen spezifischen Produktbildungsrate verloren, da diese über die Stufen hinweg ausverdünnt werden. Eine Zellzählung erfolgt erst für die Fed-Batch Experimente in den Schüttelkolben. Erst diese Experimente werden mit der gleichen Lebendzellendichte für alle Klone gestartet. Für dieses Problem ist im manuellen Prozess keine Lösung möglich.

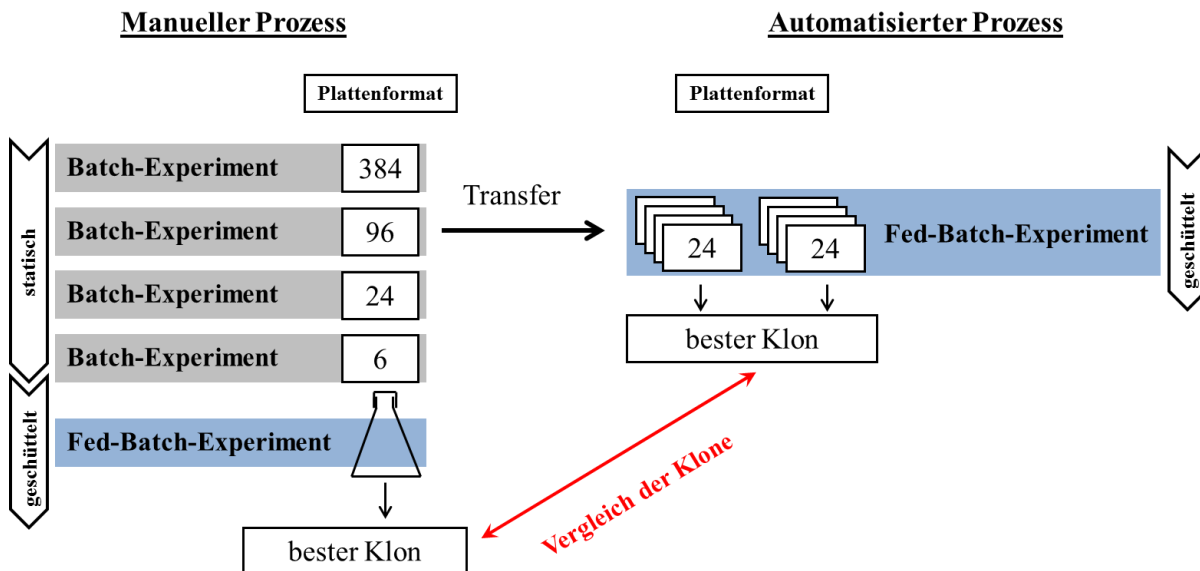


Abbildung 51: Schematische Darstellung des manuellen und automatisierten Klonauswahlprozesses. In dem manuellen Prozess wird die Anzahl der Klone in Batch-Experimenten unter statischen Bedingungen von der 384 *well* Platte bis zur 6 *well* Platte reduziert. Final wird in einem Fed-Batch Experiment im Schüttelkolben der beste Klon identifiziert. Für den automatisierten Prozess werden auf Stufe der 96 *well* Platte 96 Klone in Duplikaten in insgesamt 8 Platten im 24 *deepwell* Format transferiert und der beste Klon im geschüttelten Fed-Batch Experiment ermittelt. Die identifizierten Klone aus manuellem und automatisiertem Prozess werden nach Abschluss des jeweiligen, zeitlich versetzt gestarteten Fed-Batch Experimentes miteinander verglichen.

Für den automatisierten Prozess werden bereits auf Stufe der 96 *well* Platte 96 Klone in Doppelbestimmung auf 24 *deepwell* Platten transferiert und ein Fed-Batch Experiment unter geschüttelten Bedingungen gestartet. Zur Wahrung der Vergleichbarkeit von automatisiertem und manuellem Prozess wird dieses Experiment ebenfalls mit undefinierter Lebendzellendichte für alle Klone gestartet. Die Durchführung in dem automatisierten Zellkultursystem ermöglicht eine tägliche Analyse der Lebendzellendichte und der Konzentrationen von Glukose

und Laktat. Auf diese Weise kann der beste Klon auf Basis einer höheren Datendichte bezogen auf den manuellen Prozess vier Wochen schneller identifiziert werden.

Als finale Auswahlkriterien werden eine hohe Produktkonzentration sowie eine gute spezifische Produktbildungsrate am Ende des 14-tägigen Fed-Batch Experimentes definiert. Am Ende des jeweiligen Experimentes werden die 18 besten Klone aus dem automatisierten und dem manuellen Prozess verglichen. Zusätzlich sollen für den automatisierten Prozess Analysen zur Charakterisierung der Produktqualität durchgeführt und die Polymerasekettenreaktion etabliert werden. Mit Hilfe dieser Technologie soll das Expressionslevel für die schwere und die leichte Kette des produzierten Antikörpers bestimmt und mit der spezifischen Produktbildungsrate korreliert werden. Bei einer erfolgreichen Korrelation könnte der Einsatz dieser Technologie Klonauswahlprozesse bereits in frühen Phasen weiter beschleunigen und die Auswahl des besten Klons zusätzlich absichern.

5.3.2.2. Bewertung der Klone und Identifizierung des besten Klons

Zur Ermittlung der spezifischen Produktbildung erfolgt die Lebendzell-dichtebestimmung im automatisierten Experiment täglich ab einer Prozesszeit von 96 Stunden für alle Klone und deren Replikate (192 Ansätze). Ebenso wird der Verlauf der Produktkonzentration durch Mitarbeiter der Analytikabteilung am Octet-System für die letzten 120 Stunden des Experimentes ermittelt. Für die Replikate erfolgt nur am Ende des Experimentes eine Messung zur Verifizierung dieses Datenpunktes. Abbildung 52 zeigt sämtliche Messwerte für die Lebendzell-dichte und Produktkonzentration. Hervorgehoben sind die drei Klone mit der höchsten Produktkonzentration (Klon 5, Klon 83 und Klon 91) sowie exemplarisch zwei weitere mit geringerer Produktkonzentration und unterschiedlichem Zellwachstum. Die dargestellten Werte sind aus Geheimhaltungsgründen jeweils auf die höchste erreichte Lebendzell-dichte und Produktkonzentration normalisiert.

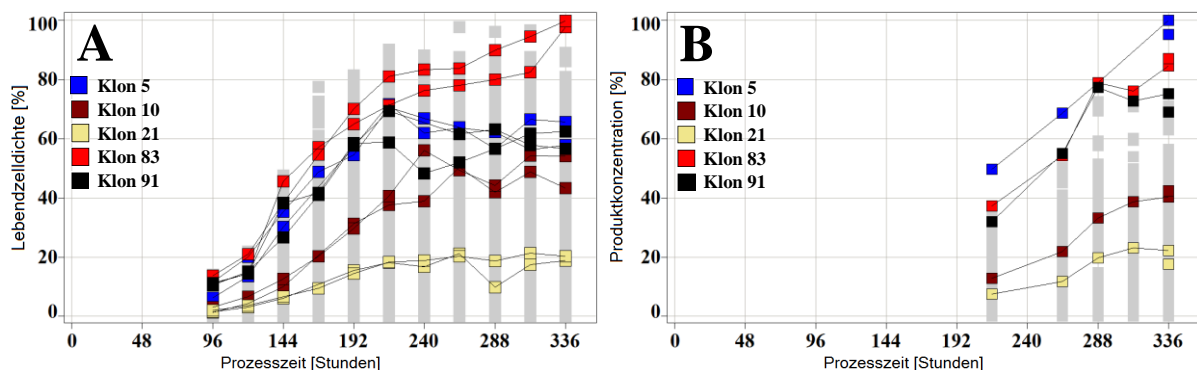


Abbildung 52: Verlauf der (A) Lebendzell-dichte für die 96 Klone mit Replikaten und (B) Produktkonzentration für die 96 Klone mit Messung der Replikate an dem letzten Kulturtag in dem automatisierten Klonauswahlprozess. Hervorgehoben sind die drei Klone mit der höchsten Produktkonzentration sowie exemplarisch zwei Klone mit schlechterem Wachstum und geringerer Produktkonzentration.

Ein Vergleich der Klone anhand der Lebendzellichte zeigt große Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums. Dabei sind 29 der 96 Klone nicht gewachsen, d.h. die Lebendzellichte für diese liegt unter 5 %. Während Klon 83 die höchste erreichte Lebendzellichte von 100 % erreicht, liegt die maximale Produktkonzentration unterhalb derer des schlechter wachsenden Klon 5, der im Prozess die höchste Produktkonzentration erreicht. Die jeweiligen Replikate zeigen vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Zellwachstums und der Produktbildung. Anhand der Ermittlung eines Verlaufes für die beiden Parameter kann das Potential der einzelnen Klone besser abgeschätzt werden. So zeigt sich beispielsweise für Klon 48 bei stagnierender Lebendzellichte nach 216 Stunden nur ein geringer Anstieg der Produktkonzentration, die nach 288 Stunden stagniert. Klon 5 erreicht nach 216 Stunden ebenfalls die maximale Lebendzellichte, zeigt aber bis zum Ende des Experimentes eine steigende Produktkonzentration. Eine Verlängerung der Experimentdauer könnte in diesem Fall zu einem noch höheren Titer führen. Zum Zeitpunkt stagnierenden Zellwachstums könnten hingegen weitere Nährlösungen zugefüttert werden. Die Verläufe der Lebendzellichte und Produktkonzentration für die übrigen Klone soll zum einen die Vielfalt der Wachstums- und Produktbildungscharakteristika zeigen. Zum anderen verdeutlichen diese Ergebnisse die Wichtigkeit der Produktkonzentration als zentralen Bewertungsparameter.

In einer weiteren Darstellungsweise können diese Beobachtungen bestätigt und zusätzliche Informationen zur Reproduzierbarkeit veranschaulicht werden. Dazu sind in Abbildung 53 für sämtliche Klone der 8 Kulturplatten im 24 *deepwell* Format die Korrelation von maximaler Lebendzellichte und maximaler Produktkonzentration dargestellt. Diese Darstellungsweise auf Basis der Mikrotiterplattenbelegung verdeutlicht noch einmal die Vergleichbarkeit von Zellwachstum und Produktbildung für die Klone in Duplikaten.

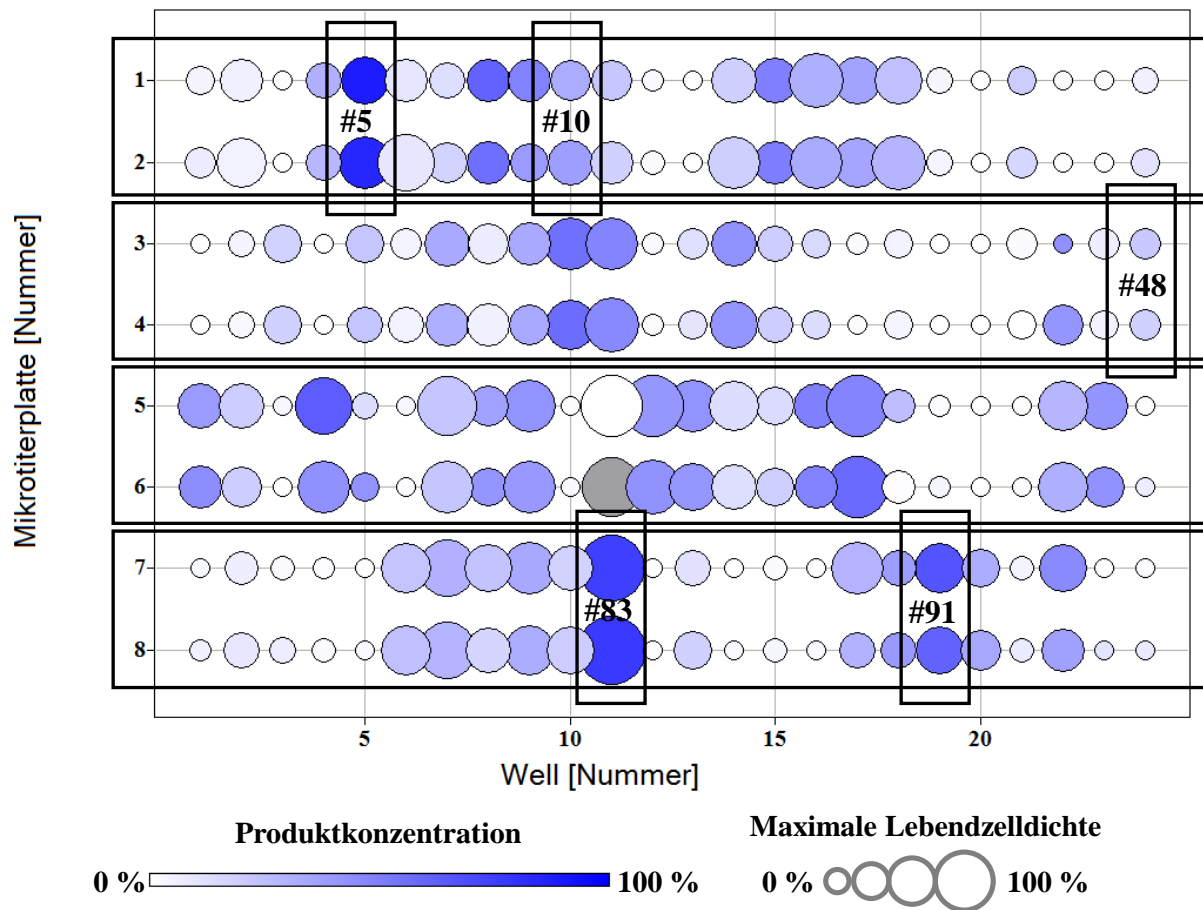


Abbildung 53: Zusammenhang zwischen maximaler Lebendzellendichte und Produktkonzentration für die untersuchten 96 Klone. Die 24 wells der einzelnen Platten sind in einer Reihe dargestellt und zusammengehörige Duplikate der Mikrotiterplatten umrahmt. Die Größe der Kreise symbolisiert die maximale Lebendzellendichte während die Intensität der Blau-Färbung die Produktkonzentration widerspiegelt. Ein großer Kreis mit intensiver Färbung repräsentiert einen Klon mit hoher maximaler Lebendzellendichte und einer hohen Produktkonzentration.

Anhand dieser Darstellung kann ebenfalls Klon 5 als bester Klon mit höchster maximaler Produktkonzentration und höchster spezifischer Produktbildungsrate identifiziert werden. Die in dem automatisierten Fed-Batch Experiment ermittelten 18 Klone mit den höchsten maximalen Produktkonzentrationen sind in Tabelle 17 dargestellt. Zusätzlich sind die 18 Klone mit der höchsten maximalen Produktkonzentration des manuellen Prozesses zum Vergleich aufgeführt.

Tabelle 17: Rangliste der 18 Klone mit der höchsten maximalen Produktkonzentration in dem automatisierten und dem manuellen Prozess. Der Übereinstimmungsgrad zwischen manuellem und automatisiertem Prozess liegt bei 67 %, die Bewertungsreihenfolge unterscheidet sich jedoch. Der Klon mit der höchsten Produktkonzentration von 100 % wird nur in dem automatisierten Prozess identifiziert. Hervorgehoben sind die besten Klone des automatisierten Prozesses, nicht übereinstimmende Klone zwischen automatisierten und manuellen Prozess sind ausgegraut.

Rangliste	automatisierter Prozess		manueller Prozess	
	Klon	Max. Produktkonzentration [%]	Klon	Max. Produktkonzentration [%]
1	5	100	8	72
2	83	87	52	61
3	91	75	66	61
4	52	71	34	54
5	8	69	57	51
6	34	63	91	50
7	15	56	15	47
8	64	56	60	46
9	9	55	59	46
10	35	54	83	45
11	94	54	94	44
12	65	54	16	42
13	59	50	35	40
14	38	48	38	38
15	49	47	65	37
16	71	47	49	34
17	57	47	64	26
18	60	46	81	18

Der direkte Vergleich von automatisiertem und manuellem Prozess ergibt eine Übereinstimmung von 67 % bei gleichzeitig unterschiedlicher Rangliste der 18 Klone mit der höchsten Produktkonzentration. Der insgesamt beste Produzent, Klon 5, liefert eine Produktkonzentration von 28 % über der des besten Klons aus dem manuellen Prozess und wird auch nur in dem automatisierten Prozess identifiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse wird Klon 5 erneut in einem manuellen Fed-Batch Experiment getestet und kann auch hier nachträglich als bester Klon identifiziert werden. Da dieses Experiment 6 Wochen nach dem automatisierten Fed-Batch Experiment durchgeführt wird und die Klone stetig in Kultur gehalten werden, spricht dieses Ergebnis auch für eine hohe Stabilität dieses Klons. Instabile Klone hingegen sind durch eine Minimierung oder sogar den Verlust der Produktivität gekennzeichnet und können nicht für Produktionsprozesse verwendet werden. Differenzen in den absoluten Werten der Produktkonzentration könnten aus den unterschiedlichen Lebendzellichten zu Beginn des automatisierten und des manuellen Fed-Batch Experimentes resultieren.

Die prozessbegleitende Analyse der Konzentration von Glukose und Laktat zeigt ebenfalls große Unterschiede der untersuchten Klone hinsichtlich des Stoffwechsels. Während einige Klone gebildetes Laktat wieder verstoffwechseln, ist bei anderen ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Prozessende zu beobachten. Diese Charakteristika des Stoffwechsels werden durch die Duplikate bestätigt (vergleiche Abbildung 76 und Abbildung 77 im Anhang, Kap. 10.).

5.3.2.3. Charakterisierung der Produktqualität anhand des Glykanmusters

Zur Charakterisierung der Produktqualität werden am Ende des automatisierten Fed-Batch Experimentes in der Analytikabteilung der Roche Diagnostics GmbH mit einer automatisierten, Massenspektrometrie-basierten Methode die N-Glykan-Muster des Antikörpers für alle Klone bestimmt (Abbildung 54). Ein Vergleich der Ergebnisse für die Duplikate zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung und bestätigt eine hohe Reproduzierbarkeit. Auf Grund zu geringer Produktkonzentrationen können die N-Glykan-Muster für einige Klone nicht ermittelt werden. Diese sind aber ohnehin nicht für die spätere Auswahl interessant. Außerdem sind bei vereinzelt Messungen Probleme aufgetreten, so dass teilweise keine Duplikate bestimmt werden können. Die verwendete Analyse-Methode befindet sich zum Zeitpunkt der Messung in der Implementierungsphase.

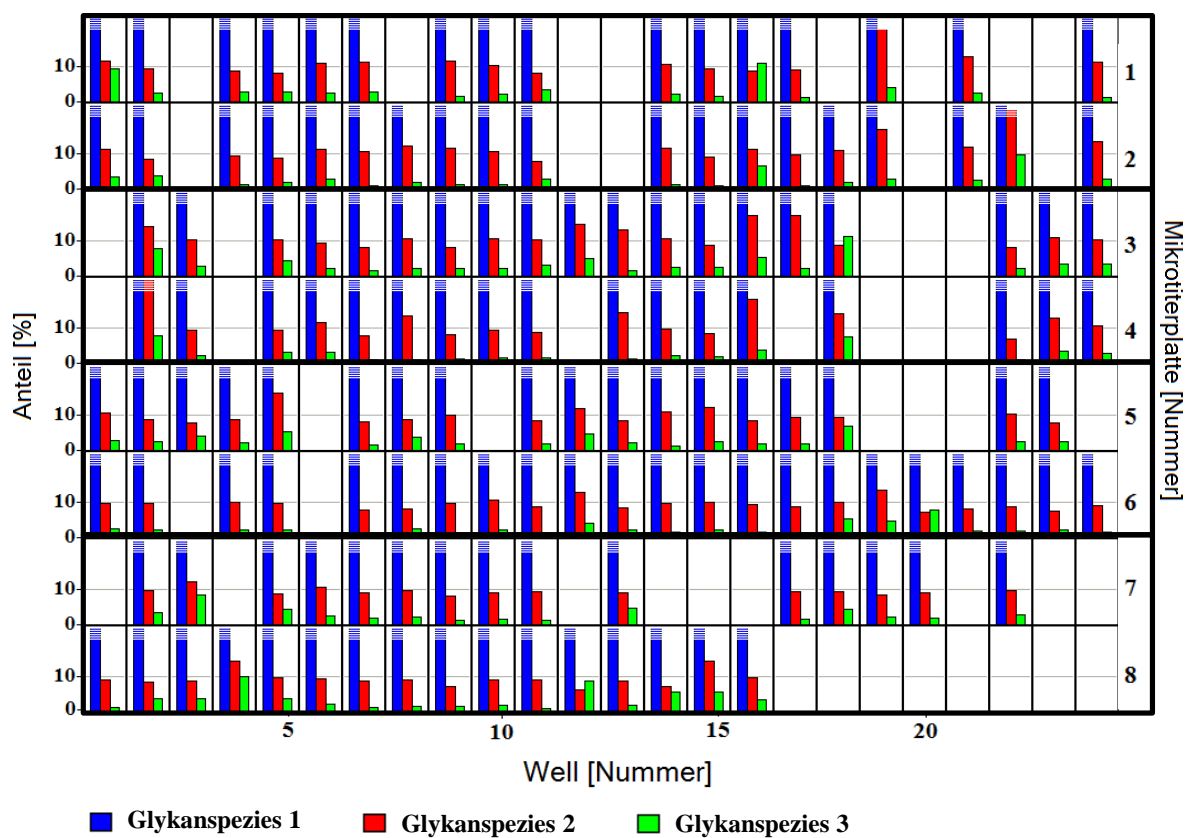


Abbildung 54: N-Glykan-Muster der 96 Klone in Duplikaten aus dem automatisierten Fed-Batch Experiment. Für einige Proben können auf Grund zu geringer Produktkonzentrationen oder Problemen bei der Messung keine Ergebnisse ermittelt werden.

Diese Ergebnisse zeigen Unterschiede der untersuchten Klone hinsichtlich der N-Glykan-Muster der Antikörper. Mit Hilfe dieser Technologie können bereits in einer frühen Phase wertvolle Informationen zur Produktqualität gewonnen werden. Diese Informationen könnten als zusätzliches Bewertungskriterium zur Auswahl des besten Klons für den gewünschten Prozess genutzt werden.

5.3.2.4. Charakterisierung der Produktbildung mittels Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) wird von Spielmann im Rahmen der Diplomarbeit das Expressionslevel für die leichte und die schwere Kette des produzierten Antikörpers von 37 Klonen bestimmt [134]. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden anhand der relativen Quantifizierung zu einem Referenzgen ausgewertet. Dazu wird das nicht regulierte Haushaltsgen *eIF3i* verwendet, welches als robuste Referenz etabliert werden konnte. Die Korrelation von spezifischer Produktbildungsrate mit dem normalisierten Expressionslevel für die leichte und die schwere Kette des Antikörpers ist in Abbildung 55 dargestellt. Es kann keine Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von dem Expressionslevel der leichten Kette festgestellt werden. Das Bestimmtheitsmaß liegt für diese Korrelation bei $R^2 = 0,18$. Dagegen wird eine Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von dem Expressionslevel der schweren Kette mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,80$ beobachtet.

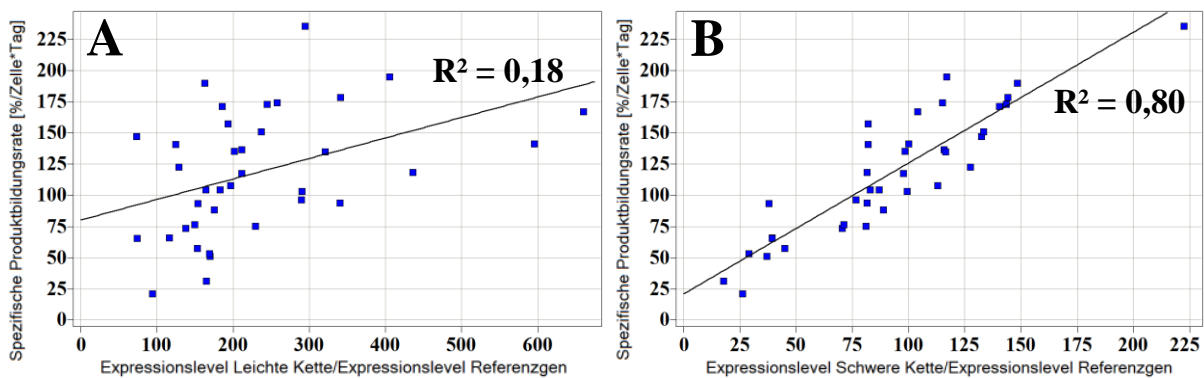


Abbildung 55: Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von 37 Klonen des automatisierten Fed-Batch Experimentes von dem Expressionslevel der (A) leichten Kette und (B) schweren Kette des produzierten Antikörpers.

Mit diesen Ergebnissen kann der Einsatz der RT-qPCR-Technologie in einem automatisierten Fed-Batch Experiment etabliert werden. Die Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von dem Expressionslevel der schweren Kette des Antikörpers kann als zusätzliches Bewertungskriterium zur Klonauswahl herangezogen werden.

5.3.2.5. Zusammenfassung und Diskussion

In einem Vorexperiment zur Untersuchung der Auswirkung der Prozessführung auf den Klonauswahlprozess können publizierte Ergebnisse bestätigt werden [131]. Die Bewertung von Klonen in Batch und Fed-Batch Experiment liefert unterschiedliche Ergebnisse, so dass die Klonauswahl in der späteren Prozessform des Produktionsprozesses erfolgen sollte. Die Auswahl des richtigen Klons stellt den Grundstein für eine erfolgreiche Prozessentwicklung dar. Durch die Möglichkeit zur gezielten Auswahl eines Klons mit vordefinierten zellphysiologischen Charakteristika oder einer geforderten Produktqualität kann der passende Klon für den gewünschten Prozess ausgewählt werden.

In diesem Kapitel wird die erfolgreiche Durchführung eines automatisierten, Mikrotiterplatten-basierten Fed-Batch Experimentes in einer frühen Phase eines Klonauswahlprozesses mit 96 Klonen in Duplikaten beschrieben. Dieses Vorgehen gewährleistet ein hohes Maß an Sicherheit bei der Bewertung und Auswahl der besten Klone. Die Automatisierung ermöglicht dabei eine Verkürzung des Klonauswahlprozesses um vier Wochen gegenüber einem manuellen Referenzprozess, bei dem die finale Auswahl der Klone im Schüttelkolben erfolgt. Ein Vergleich der 18 Klone mit den höchsten Produktkonzentrationen zwischen dem automatisierten und manuellen Prozess liefert eine Übereinstimmung von 78 %. Der Klon mit der höchsten Produktkonzentration im Gesamtprozess liefert gegenüber dem besten Klon des manuellen Prozesses einen 28 % höheren Titer und wird nur in dem automatisierten Fed-Batch Experiment identifiziert. In einem nachfolgenden Fed-Batch Experiment kann dieser auch in dem manuellen Prozess als bester Klon bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen eine gute Stabilität dieses Klons, der die höchste spezifische Produktbildungsrate aller untersuchten Klone aufweist. Eine Instabilität bei ausgewählten Klonen kann hingegen zu Problemen bei der Ausbeute, der Produktqualität (z.B. N-Glykan-Muster) oder der Zulassung durch eine Behörde führen [135,136]. Eine unterschiedliche Rangliste der bewerteten Klone zwischen automatisiertem und manuellem Prozess könnte aus den Startbedingungen des jeweiligen Fed-Batch Experimentes resultieren. Während in dem automatisierten Prozess mit einer für die einzelnen Klone unterschiedlichen Lebendzellichte gestartet wird, erfolgt für das manuelle Fed-Batch Experiment eine Aussaat der Klone bei gleicher Lebendzellichte. Eine zu geringe Lebendzellichte zu Beginn des Experimentes könnte die Ursache dafür sein, dass 30 % der getesteten Klone ein sehr schlechtes Zellwachstum über das gesamte Experiment gezeigt haben.

Eine Bestimmung der N-Glykan-Muster der Antikörper zur Produktcharakterisierung ergibt große Unterschiede für die untersuchten Klone. Für die Duplikate der jeweiligen Klone werden dabei vergleichbare Ergebnisse erhalten, so dass die Aussagekraft der Daten als hoch einzustufen ist. Das Einbinden dieser Analytik in frühe Phasen der Klonauswahl könnte ein

wichtiges Bewertungskriterium liefern, wenn die Produktqualität im Fokus der Entwicklungsarbeit steht. Die Produktqualität spielt insbesondere bei Proteinen eine Rolle, die komplexer und größer als Antikörper sind. Durch den Einsatz der RT-qPCR kann eine Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsrate von dem Expressionslevel der schweren Kette des produzierten Antikörpers beobachtet werden. Mit diesen Ergebnissen kann zum einen die qPCR-Technologie für automatisierte Fed-Batch Kultivierungen im Mikrotiterplattenformat etabliert werden und zum anderen ein weiteres Bewertungskriterium für Klonauswahlprozesse identifiziert werden.

Die Vorteile eines automatisierten gegenüber einem manuellen Fed-Batch Experiment zur Klonauswahl liegen vor allem in der Möglichkeit zur Identifizierung des besten Klons in der finalen Prozessform bei verkürzter Dauer der Klonauswahl. Weiterhin kann die Anzahl untersuchter Klone und damit die Chance, den besten Klon zu identifizieren, stark erhöht werden. Die Implementierung einer großen Anzahl analytischer Methoden und die Generierung einer hohen Datendichte sichern die Auswahl des besten Klons zusätzlich ab. Außerdem können auf diese Weise neue Bewertungskriterien definiert werden.

Mit Hilfe der Automatisierung kann in einem Klonauswahlprozess eine größere Anzahl an Klonen zu einem früheren Zeitpunkt in der Fed-Batch Prozessführung bewertet werden. Dies ermöglicht eine Verkürzung der Klonselektion um vier Wochen. Außerdem wird der beste Klon mit den besten Produktbildungseigenschaften identifiziert, der nicht in einem manuellen Referenzprozess ermittelt werden kann. Die Möglichkeit zur Durchführung des Experimentes mit Replikaten und die Verfügbarkeit eines großen Spektrums analytischer Methoden zur täglichen Prozessbeobachtung garantieren dabei die Absicherung der Klonauswahl. Mit der Etablierung der automatisierten N-Glykan-Bestimmung zur Produktcharakterisierung und der RT-qPCR zur Expressionsanalyse von leichter und schwerer Kette des produzierten Antikörpers können wichtige zusätzliche Kriterien zur Klonbewertung identifiziert werden.

6. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein vollständig automatisiertes System für die tierische Suspensions-Zellkultur entwickelt, welches in Zukunft in dem Routinebetrieb der technischen Entwicklung eingesetzt wird. Dieses System verfügt über eine integrierte Analytik zur Beobachtung zentraler Kultivierungsparameter. Weitere Entwicklungen könnten in folgenden Bereichen erfolgen:

- Erweiterung des analytischen Spektrums zur Prozessbeobachtung
- Erweiterung des Systems durch Integration neuer Hardware-Komponenten
- Erweiterung des Anwendungsspektrums

Erweiterung des analytischen Spektrums zur Prozessbeobachtung

In dem Bereich der Prozessbeobachtung konnte bisher kein kommerzielles System zur Bestimmung des pH-Wertes erfolgreich implementiert werden. Zur Bestimmung dieses Parameters können Absorptions- oder Fluoreszenz-basierte Messungen auf Basis von pH-Wert sensitiven Farbstoffen mit den vorhandenen Ausleseeinheiten durchgeführt werden. Eine Alternative bieten nicht invasive, optische Messverfahren, bei denen eine Farbänderung von pH-Indikatoren im sichtbaren Wellenlängenbereich kamerabasiert detektiert wird. Die Messung des pH-Wertes bildet die Grundlage für den Aufbau einer Regelung dieses Kultivierungsparameters.

Außerdem bietet die vorhandene analytische Instrumentierung des Systems die Möglichkeit zur Etablierung weiterer Absorptions- oder Fluoreszenz-basierter Methoden zur Prozessbeobachtung auf Basis von Mikrotiterplatten. Im Bereich der Medienentwicklung interessiert vor allem die Quantifizierung von Substraten, Stoffwechselprodukten oder Kofaktoren, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Vitamine oder Salze.

Der eingesetzte Mikrotiterplattenleser verfügt über die Möglichkeit zur Aufnahme von 2D-Fluoreszenzspektren. Mit Hilfe dieser Technik könnten nicht invasiv Veränderungen in der Medien-Umgebung der Zellkulturen detektiert und durch Anwendung der multivariaten Datenanalyse die Konzentration einzelner Komponenten und deren Kinetik im Verlauf eines Experimentes ermittelt werden. Der hohe Durchsatz des entwickelten Systems ermöglicht die Generierung einer hohen Datendichte und gewährleistet damit eine statistische Absicherung erstellter Modelle.

Eine Hardware-Erweiterung des Systems könnte in dem Bereich der Analytik erfolgen oder der Steigerung des Durchsatzes dienen. Neue analytische Komponenten könnten beispielsweise zur Charakterisierung der Produktqualität eingesetzt werden. Durch die

Integration einer HPLC-Anlage oder einer Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie könnten direkt auf dem automatisierten Zellkultursystem Analysen zur Ladungsverteilung, dem Glykosylierungsmuster oder der Aggregation von Proteinen untersucht werden. Außerdem könnte durch die Verwendung einer HPLC-Anlage die Messgenauigkeit gegenüber bestehenden Absorptions- oder Fluoreszenz-basierter Methoden erhöht werden. Diese Hardware-Komponenten sind bereits für den Einsatz in automatisierten Systemen vorbereitet und mit einem *Autosampler* verfügbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bereits die Polymerasekettenreaktion zur Durchführung auf dem entwickelten System vorbereitet. Durch die Integration eines LightCycler[®] Instruments könnten prozessbegleitend Analysen zum Gen-Expressionsprofil der Zellkulturen durchgeführt werden.

Erweiterung des Systems durch Integration neuer Hardware-Komponenten

Das finale entwickelte System bietet eine Kapazität von bis zu 384 Parallelkultivierungen im 24 *deepwell* Format. Die Voraussetzungen für eine Durchsatzerhöhung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den modularen Aufbau geschaffen. Es könnte beispielsweise ein zusätzlicher Inkubator mit Schüttelfunktion integriert werden. Eine weitere Durchsatzerhöhung könnte durch die Verwendung von 96 *deepwell* Platten erreicht werden. Mit diesem Plattenformat kann in Zusammenhang mit dem derzeitig eingesetzten 96-Kanal-Pipettierer der maximale Durchsatz erreicht werden.

Zur Etablierung der 96 *deepwell* Platte als Kultursystem ist eine ausreichende Charakterisierung dieses Plattenformats erforderlich. Diese erfordert die Ermittlung der optimalen Füllvolumina und Schüttelfrequenzen sowie einen Vergleich der verfahrenstechnischen Parameter $k_L a$ und P/V_L mit Schüttelkolben und Bioreaktoren. Die Grundlagen für diese Arbeiten wurden bereits in dieser Arbeit durch die Entwicklung generischer CFD-Modelle geschaffen.

Eine weitere Erhöhung der Anzahl parallel zu bearbeitender Kultivierungsplatten erfordert den Einsatz eines zusätzlichen *Liquid Handlers*, der mit einem 384-Kanal-Kopf ausgestattet sein sollte. Dieser sollte ausschließlich für die analytischen Tests im 384 *well* Format eingesetzt werden, während der 96-Kanal-Pipettierer für sämtliche Zellkulturarbeiten verwendet wird. Dazu ist eine Anpassung der Tests an dieses miniaturisierte Format erforderlich.

Erweiterung des Anwendungsspektrums

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der erfolgreiche Einsatz des entwickelten automatisierten Zellkultursystems für die Medienentwicklung und für einen Klonauswahlprozess gezeigt. Der Durchsatz und das verfügbare analytische Spektrum des Systems ermöglichen vor allem in dem Bereich der Medienoptimierung weitere Ansätze.

Neben dem durchgeführten Medien-*Blending* könnten Wachstums- oder Zufüttermedien in Blöcke (Stammlösungen) aufgeteilt und mit Hilfe spezieller Algorithmen oder basierend auf analytischen Daten variiert werden. Identifizierte einzelne Medienbestandteile könnten anschließend titriert und selektiv hinsichtlich Limitierungen oder Inhibierungen untersucht werden. Dieses Vorgehen ermöglicht ebenfalls die Ermittlung von Substratverbrauchskinetiken und die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen einzelnen Medienkomponenten.

Weitere mögliche Anwendungsgebiete liegen in dem Bereich von Robustheitsstudien, der Stabilitätskontrolle von Zellbanken oder der Kultivierung transienter Zelllinien. Das automatisierte Zellkultursystem bietet außerdem die Möglichkeit zur gezielten Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Produktqualität. Auf Grund des hohen Durchsatzes und der damit verbundenen hohen Datendichte eignet sich das automatisierte Zellkultursystem ebenfalls zur Charakterisierung und Validierung von Prozessen.

7. Material und Methoden

7.1. Das automatisierte Zellkultursystem

Der Aufbau des automatisierten Zellkultursystems erfolgt wie in Kapitel 5.1. beschrieben in einem 2-stufigen Prozess. Dazu wird zunächst ein *Proof of Concept* (PoC) System entwickelt um die technische Machbarkeit zu beweisen und die geschüttelte Mikrotiterplatte als automatisiertes Kultursystem zu etablieren. Auf Basis dieses PoC-Systems wird anschließend ein vollständig automatisiertes Produktivsystem mit gesteigertem Durchsatz entwickelt. In dem folgenden Kapitel sollen die einzelnen Komponenten dieser beiden Systeme erläutert werden.

7.1.1. Proof of Concept System

Bei dem teilautomatisierten PoC-System werden parallel zwei Einheiten entwickelt, das Zellkulturmodul in einem sterilen Bereich und das Analytikmodul im unsterilen Bereich. Diese beiden Module sind nicht direkt miteinander verbunden, ein Transfer der Probenplatte erfolgt manuell auf Basis einer 96 *well* Mikrotiterplatte mit Rundboden (BD Falcon™ 353910). Das PoC-System umfasst die in Tabelle 18 aufgeführten Komponenten.

Tabelle 18: Komponenten des *Proof of Concept* Systems. Die Verbindung von Zellkultur- und Analytik-Modul ist nicht automatisiert.

Komponente	Hersteller	Beschreibung	Modul
X150	Xiril	Pipettierer mit 4 spreizbaren Kanälen	Zellkultur
STX44-IC SA	Liconic	Automatisierter Schüttel-Inkubator	Zellkultur
Biomek® NXP	Beckman Coulter	Pipettierer mit 96-Multikanalkopf	Analytik
IMT-2	Olympus	Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop	Analytik
Sunrise™	Tecan	Filter-basierter Mikrotiterplatten-Leser für Absorptionsmessungen	Analytik
Columbus	Tecan	Mikrotiterplatten-Waschgerät, 16 Kanäle	Analytik
Alps300™	ABgene® Thermo Scientific	Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten	Analytik

7.1.1.1. Zellkultur-Modul

Die Sterilität des Zellkulturmoduls wird durch den Aufbau der Komponenten in einer Sterilwerkbank der Klasse 2 gewährleistet. Dieses Modul setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen, welche nacheinander bestellt und integriert werden. Die Prozessabläufe innerhalb des Zellkultur-Moduls sind vollständig automatisiert.

7.1.1.1.1. Pipettierstation X150 (Xiril AG, Hombrechtikon, Schweiz)

Die X150 Workstation stellt die größte verfügbare Variante der Firma Xiril dar. Sie ermöglicht das automatische Pipettieren sowie den Transport von Verbrauchsmaterial innerhalb des in Tabelle 19 dargestellten Bereiches. Der Arbeitsbereich jeder Xiril-Workstation ist für den Gebrauch von Mikrotiterplatten im SBS-Format optimiert [137].

Tabelle 19: Außenmaße und Arbeitsbereich der X150 Workstation.

Dimension	Außenmaße	Arbeitsbereich
	[mm]	[mm]
X-Richtung	1600	1100
Y-Richtung	700	400
Z-Richtung	720	118

Die in dieser Arbeit verwendete Workstation wird wie folgt konfiguriert.

- 4-Kanal Pipettierarm mit jeweils zwei Kanälen für die Volumenbereiche:
 - 2 μL bis 250 μL
 - 10 μL bis 1000 μL

Die Kanäle können unabhängig in Y- und Z-Richtung bewegt werden und erlauben das Pipettieren von Flüssigkeiten mit sterilen oder unsterilen Einweg-Pipettenspitzen (*disposable tips*) mit oder ohne Filter der Firma Rainin (RT-250S und RT-1000S).

Tabelle 20 zeigt die von Xiril angegebenen Werte zur Pipettiergenauigkeit.

Tabelle 20: Von Xiril angegebene Werte zur Präzision (Wiederholgenauigkeit, ermittelt durch mehrmalige Wiederholung des Pipettierschritts unter Verwendung gleicher Parameter) und der Genauigkeit (Grad der Übereinstimmung zwischen Soll- und Ist-Wert) der beiden Pipettierkanäle des X150.

Pipettierkanal	Volumen [μL]	Präzision [% CV]	Genauigkeit [\pm %]
250 μL	20	1	2,5
	200	0,5	1
1000 μL	100	1	3
	1000	0,5	1

- Greifwerkzeug zum Transport von Mikrotiterplatten und Reservoiren im SBS-Format bis 400 g. Dieses wird mit den zwei kleinen (2 μL bis 250 μL) Pipettierkanälen aufgenommen. Der Transport von befestigten Reservoiren sowie Pipettenspitzen-Boxen ist mit diesem Werkzeug nicht möglich.

- Konfiguration der Oberfläche (vergleiche Abbildung 56):
 - 12 Standard-Positionen für Mikrotiterplatten und Reservoirre in SBS-Format.
 - 8 Positionen für Pipettenspitzen-Boxen.
 - 6 Stapelvorrichtungen (*Stacker*) für die Vorlage von jeweils 6 Mikrotiterplatten im SBS-Format.
 - 1 Mikrotiterplatten-Schüttler (Variomag Teleshake, Inheco, Martinsried, Deutschland) mit einer Exzentrizität von 1 mm und einer Schüttelfrequenz von 100 bis 2000 rpm.
 - Jeweils einen Abfall für Pipettenspitzen und einen für Flüssigkeiten.
 - Befestigte, nicht transportierbare Reservoirre zur Vorlage von Flüssigkeiten.
 - Für die Definition der Transferstation des Inkubators wird in der Software Lirix (*lirix²* und *lirix³*) ein *Stacker* verwendet.

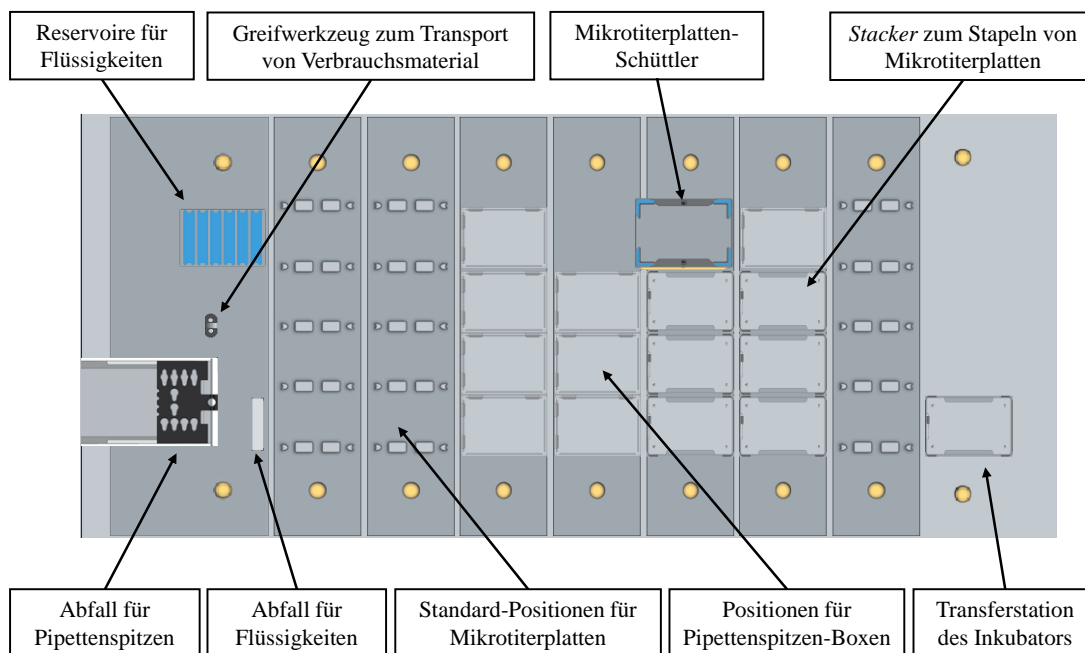


Abbildung 56: Oberflächenkonfiguration der X150 Workstation. Darstellung über die Software *lirix³*. Die Transferstation des Inkubators wird in der Software als Mikrotiterplatten-*Stacker* definiert. Diese verwendete Konfiguration stellt nur eine Möglichkeit zur Gestaltung des Decks dar.

- Flüssigkeitsstand-Detektion (*Liquid Level Detection, LLD*). Jeder Kanal ist mit einem Drucksensor ausgestattet, der eine unabhängige LLD ermöglicht.
- Steuerung der Workstation über das *lirix*-Softwarepaket (*lirix²* und *lirix³*). Diese zeichnet sich durch eine grafische Benutzeroberfläche und die Möglichkeit zur Verwaltung von Zugangsberechtigungen (21 CFR part 11 konform) aus.

Auf Grund der Modularität der Einzelkomponenten der X150 Workstation kann eine Vielzahl möglicher Konfigurationen gewählt werden. Ein Umbau ist jederzeit möglich und kann somit an die jeweilige Anforderung angepasst werden.

7.1.1.1.2. Schüttelinkubator STX44-IC SA (Liconic AG, Mauren, Liechtenstein)

Zur geschüttelten Inkubation der Zellkulturen wird der Inkubator STX44-IC SA der Firma Liconic AG (Mauren, Liechtenstein) verwendet. Dieser ermöglicht eine Temperatur-Regelung in dem Bereich von 33 °C bis 50 °C sowie eine Regelung der relativen Luftfeuchte bis 95 %. Dieser Inkubator stellt zum Zeitpunkt der Bestellung (Februar 2009) das einzige automatisierte System mit einer Exzentrizität des Schüttlers von 3 mm dar, welche für die geschüttelte Inkubation von 6 *well* und 24 *deepwell* Platten erforderlich ist (vgl. Kap. 5.2.1.2). Der Inkubator wird mit folgender Ausstattung verwendet:

- Shaking Option für 3 mm Exzentrizität mit einer maximalen Frequenz von 400 rpm.
- Option zur geregelten Begasung mit:
 - Kohlenstoffdioxid (0 % bis 10 %)
 - Stickstoff (75 % bis 100 %)
- Barcode-Leser in dem Inkubator zur Inventarisierung von Verbrauchsmaterial.
- Dampfinjektion zum beschleunigten Erreichen einer hohen Luftfeuchte.
- Liconel-Beschichtung (Legierung aus Kupfer und Edelstahl) zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen im Inkubator-Innenraum.
- Universal Communication Interface zur Kommunikation über eine serielle Schnittstelle, *Universal Serial Bus* (USB) oder Ethernet. Die Ansteuerung im PoC-System erfolgt über USB, in dem Produktivsystem über einen 9-poligen seriellen Port.
- Transfer-Station mit einer Länge von 1000 mm, ausgestattet mit einem Sensor zur Detektion einer Mikrotiterplatte (*plate presence sensor*) sowie der Möglichkeit, einen Zwischenstopp zu definieren (*step slide station*).
- 2 Typen von Kassetten für flache und hohe Mikrotiterplatten. Tabelle 21 zeigt eine Übersicht der verwendeten Kassetten. Die maximale Kapazität zur parallelen Kultivierung beträgt 34 flache oder 16 hohe Mikrotierplatten.
- Möglichkeit zur direkten Ansteuerung über ein Terminal (STX Panel).

Tabelle 21: Verwendete Kassetten zur geschüttelten Inkubation von Mikrotiterplatten. Der Abstand (*pitch*) zwischen den einzelnen Ebenen (*levels*) bestimmt die maximale Lagerkapazität. In dem Inkubator werden stets 2 Kassetten gleichen Typs verwendet.

Bezeichnung	Anzahl <i>level</i> ; <i>pitch</i>	Verwendeter Plattentyp	Max. Kapazität
Custom Size Shaker Cassette	17 <i>level</i> , <i>pitch</i> 30 mm	Flache Mikrotiterplatten (6 <i>well</i> , 12 <i>well</i> , 24 <i>well</i> , 48 <i>well</i>)	34 Mikrotiterplatten
Custom Size Shaker Cassette	8 <i>level</i> , <i>pitch</i> 59 mm	Hohe Mikrotiterplatten (24 <i>well</i>) und Reservoirs	16 Mikrotiterplatten

7.1.1.2. Analytik-Modul

Bei dem räumlich von der Zellkultureinheit getrennten Analytikmodul handelt es sich um eine Gruppierung von Einzelgeräten. Die Verbindung der einzelnen Geräte erfolgt durch einen manuellen Transfer und die Ansteuerung durch die jeweilige Gerätesoftware.

7.1.1.2.1. Pipettierstation Biomek[®] NXP (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)

Zur Vorbereitung der Assays wird der Biomek[®] NXP Pipettierroboter der Firma Beckman Coulter mit einem 96-Multikanalkopf verwendet. Neben der gleichzeitigen Aufnahme von 96 Pipettenspitzen ist es möglich, nur eine Spalte mit 8 Pipettenspitzen aufzunehmen bei Pipettierolumina von 1 μL bis 225 μL . Auf diese Weise können Verdünnungsreihen vereinfacht erstellt werden sowie Assays durch simultane Zugabe von Reagenz in alle *wells* einer Mikrotiterplatte gleichzeitig gestartet werden. Mit diesem Gerät ist es nicht möglich, einzelne Pipettenspitzen sowie Muster aufzunehmen, so dass dieses System nur für die Verwendung von 96 *well* und 384 *well* Mikrotiterplatten ausgelegt ist. Ein integrierter Greifarm ermöglicht den Transport von Verbrauchsmaterialien in SBS-Format innerhalb des Arbeitsbereiches (Abbildung 57).

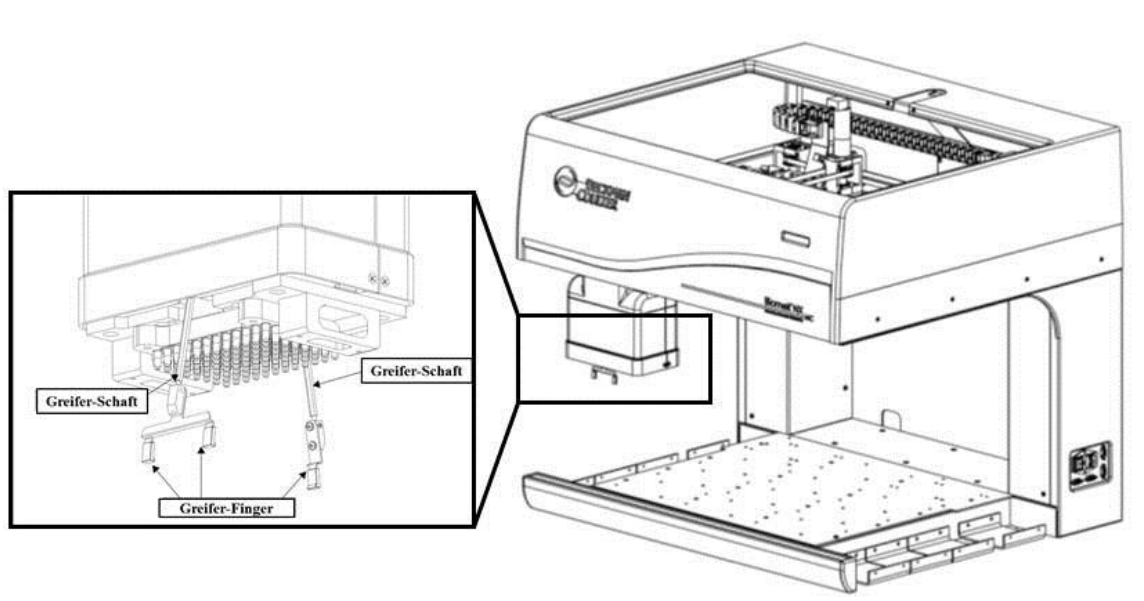


Abbildung 57: Schematische Darstellung des Pipettierroboters Biomek[®] NXP des Analytikmoduls, ausgestattet mit einem 96-Multikanal-Kopf und einem internen Greifarm [138].

Der Arbeitsbereich des Biomek[®] NXP bietet Platz für 15 Mikrotiterplatten oder Pipettenspitzen-Boxen. Eine Erhöhung der Lagerkapazität auf diesem System kann durch das Stapeln dieser Materialien erreicht werden. Für die Aufnahme der Pipettenspitzen erfordert dieses System den Anschluss an eine Druckluft-Leitung oder einen Kompressor. Die Steuerung sowie die Erstellung von Ablaufprotokollen erfolgen über die Biomek Software, diese ist 21 CFR Part 11 konform. Die von Beckman Coulter angegebene Pipettiergenauigkeit dieses Systems ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Von Beckman Coulter angegebene Werte zur Präzision (Wiederholgenauigkeit, ermittelt durch mehrmalige Wiederholung des Pipettierschritts unter Verwendung gleicher Parameter) und der Genauigkeit (Grad der Übereinstimmung zwischen Soll- und Ist-Wert) der Biomek[®] NXP Pipettierstation bei geringen Volumina, ausgestattet mit einem 96-Multikanalkopf.

Volumen [μL]	Präzision [% CV]	Genauigkeit [\pm %]
1	5	3
5	5	3

7.1.1.2.2. Fluoreszenzmikroskop IMT-2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)

Im Rahmen der Diplomarbeit von Pawel Linke [88] wird das inverse Fluoreszenz-Mikroskop IMT-2 der Firma Olympus modifiziert und für die Integration in ein automatisiertes System vorbereitet. Das Mikroskop ist ausgestattet mit einer Quecksilberdampfampe (USHIO, Tokio, Japan), einem Breitpassfilter X-115-2 (Omega, Brattleboro, USA), Objektiven (4fach, 10fach, 40fach), sowie einer MicroPublisher 5.0 RTV CCD-Kamera (QImaging, Minneapolis, USA) an dem ersten Strahlengang (80 %). In der Firmen-internen Werkstatt wird ein Tubus angefertigt, der auf den zweiten Strahlengang (20 %) montiert wird und als Aufnahme für die Watec WAT902DM25 Autofokuskamera (Watec, Middletown, USA) dient. Das analoge Ausgangssignal der Fokuskamera wird zur Autofokussierung in den PCI-Kartencontroller Oasis-4i (Objective Imaging, Cambridge UK) geleitet, welcher gleichzeitig den vollautomatischen Mikroskoptisch H107MT2 (Prior, Rockland, USA) sowie einen Motor am Fokusrad des Mikroskops steuert. Das Oasis-AF Modul ermöglicht eine Bildanalyse des monochromen Signals für die Hardwareautofokussierung in Echtzeit. Die Bildanalyse erfolgt unmittelbar im Controller und erfordert keine Computer-basierte Aufnahme und Auswertung der Fokusebenen. Die Steuerung des Gesamtsystems sowie die automatisierte Bildauswertung erfolgt über die Software Image-Pro plus Version 7.0.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA). Die Messdaten werden im Microsoft Excel-Format exportiert.

In dem PoC-System wird dieses System für die Bestimmung der Lebendzellichte und der Viabilität von Zellkulturen verwendet. Das Mikroskop wird manuell beladen und gestartet. Im Rahmen der Weiterentwicklung des PoC-Systems sowie dem Aufbau des Produktivsystems

wird das von Linke entwickelte Mikroskop in den vollständig automatisierten Prozess integriert.

7.1.1.2.3. Mikrotiterplattenleser Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

Der Mikrotiterplattenleser Sunrise™ der Firma Tecan wird zum Auslesen sämtlicher Absorptions-basierter Metabolitassays (vgl. Kap. 7.2.2.) in 96 *well* Mikrotiterplatten verwendet. Der Filterschlitten wird mit vier Interferenzfiltern für die Wellenlängen 340, 405, 492 und 550 nm mit einer Bandbreite von jeweils 10 nm bestückt. Das optische 12-Kanal-Modul ermöglicht kurze Analysezeiten der 96 *well* Mikrotiterplatten von 6 Sekunden für eine Wellenlänge und 8 Sekunden für zwei Wellenlängen. In Tabelle 23 sind die vom Hersteller angegebenen Spezifikationen zu den Parametern Genauigkeit, Linearität, Präzision und Auflösung zusammengefasst. Die Schütteloption des Gerätes ermöglicht eine Durchmischung auf der Mikrotiterplatte. Die Steuerung des Gerätes erfolgt über die Software Magellan (mit integrierter Auswertesoftware) oder XFluor (Steuersoftware ohne Auswerteooption). Ein Export der Messdaten ist in verschiedenen Formaten wie .csv, .txt oder .xls möglich. Eine Weiterverarbeitung der Messdaten erfolgt in Microsoft Excel.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Herstellerangaben zu den Parametern Genauigkeit, Linearität, Präzision und Auflösung des Sunrise™ Mikrotiterplattenlesers [139].

Parameter	Bereich	Wert
Genauigkeit	0,0-2,0 OD/492 nm	besser als $\pm (1,0 \% + 0,010 \text{ OD})$
	2,0-2,0 OD/492 nm	besser als $\pm (1,0 \% + 0,010 \text{ OD})$
Linearität	340-399 nm	für 0,0 bis 2,0 OD besser als $\pm 2 \%$
	400-750 nm	für 0,0 bis 2,0 OD besser als $\pm 1 \%$ für 2,0 bis 3,0 OD besser als $\pm 1.5 \%$
Präzision	0,0-2,0 OD/492 nm	besser als $\pm (0,5 \% + 0,005 \text{ OD})$
	2,0-2,0 OD/492 nm	besser als $\pm (1,0 \% + 0,005 \text{ OD})$
Auflösung	keine Angabe	0,001 OD

7.1.1.2.4. Mikrotiterplatten-Waschgerät Columbus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

Für die Waschschrte während der Durchführung des ELISA (vgl. Kap. 7.2.2.2.) wird das Columbus Mikrotiterplatten-Waschgerät der Firma Tecan verwendet. Dieses verfügt über 16 Kanäle zum gleichzeitigen Waschen von zwei Spalten einer 96 *well* Mikrotiterplatte. Die für den ELISA verwendeten Waschprogramme werden über ein im Gerät integriertes Tastenfeld erstellt [140].

7.1.1.2.5. Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten Alps300 (ABgene® Thermo Scientific, Epsom, United Kingdom)

Das Einschweißen von Mikrotiterplatten erfolgt mit Hilfe des Alps300™ der Firma ABgene® Thermo Scientific. Dieser schweißt über Hitze (*heat sealer*) eine Folie (AB-3738, ABgene®) auf eine Mikrotiterplatte. Bei Verwendung dieser Folie und Polystyrol-Mikrotierplatten wird eine Temperatur von 160 °C bei einer Dauer von drei Sekunden gewählt. Es werden Mikrotiterplatten bei der Durchführung des ELISA eingeschweißt sowie zum Versiegeln der Platten beim Einfrieren von Proben oder bei der Durchführung des Assays zur Zelldichtebestimmung.

7.1.2. Produktivsystem

Das Produktivsystem wird auf Basis der Erkenntnisse des PoC-Systems zusammengestellt. Dazu werden neue Instrumente bestellt sowie bereits genutzte in das Gesamtsystem integriert. Das finale, vollständig automatisierte System setzt sich aus den im folgenden Kapitel beschriebenen Einzelkomponenten zusammen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Komponenten des Produktivsystems. Es ist ein vollständig automatisierter Ablauf möglich, die Ansteuerung aller Komponenten erfolgt über die Software VWorks Automation Control von Agilent Technologies mit Ausnahme des Cellavista® Analysesystems.

Komponente	Hersteller	Beschreibung
Direct Drive Robot	Agilent Technologies	Zentraler Transport-Roboter für Verbrauchsmaterial in SBS-Format.
Bravo	Agilent Technologies	Pipettierer mit 96-Multikanalkopf. Möglichkeit zum Pipettieren von Mikrotiterplatten mit 6-384 wells.
STX44-IC SA	Liconic	Automatisierter Schüttel-Inkubator.
Cytomat® 2C	Thermo Fisher Scientific	Automatisierter, statischer Inkubator mit Kühl-Option.
Sunrise™	Tecan	Filter-basierter Mikrotiterplatten-Leser (Absorption).
Infinite® M200 PRO	Tecan	Monochromator-basierter Mikrotiterplatten-Leser (Absorption und Fluoreszenz) mit Begasungsoption.
Cellavista® Analysesystem	Roche Diagnostics GmbH	Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop.
Elx405™	BioTek	Mikrotiterplatten-Waschgerät, 96 Kanäle.
PlateLoc	Agilent Technologies	Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten.
VSpin	Agilent Technologies	Automatisierte Zentrifuge für zwei Mikrotiterplatten.
MiniHub	Agilent Technologies	Automatisiertes Karussell zur Lagerung von Pipettenspitzen-Boxen und Mikrotiterplatten mit mittlerer Kapazität.
Edelstahl-Stacker	Agilent Technologies	Stapelsystem für Verbrauchsmaterial in SBS-Format.
Cytomat® 800	Thermo Fisher Scientific	Automatisiertes Karussell zur Lagerung von Pipettenspitzen-Boxen und Mikrotiterplatten mit hoher Kapazität.

Die Ansteuerung aller in Tabelle 24 aufgelisteten Komponenten erfolgt über die Steuersoftware VWorks Automation Control von Agilent Technologies. Notwendige Treiber werden von Agilent bezogen, mit Ausnahme des Treibers für das Cellavista[®] Analysesystem. Die Einbindung dieser Komponente ist in Kapitel 5.1.2.3. beschrieben. In dem Produktivsystem wird ebenfalls das IMT-2 Fluoreszenzmikroskop eingesetzt bevor das Cellavista[®] Analysesystem integriert wird. In dem finalen System kommt nur noch das Cellavista[®] Analysesystem zum Einsatz.

Nicht im Produktivsystem genutzte Komponenten des PoC-Systems stehen als Einzelgeräte zur Verfügung und können für die Neuentwicklung und Optimierung neuer analytischer Methoden verwendet werden. Auf diese Weise ist eine Weiterentwicklung ohne Eingriff in das Produktivsystem möglich.

7.1.2.1. Plattentransportroboter Direct Drive Robot (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Die zentrale Komponente des Produktivsystems stellt der Plattentransportroboter Direct Drive Robot (DDR) der Firma Agilent dar. Dieser ist für die automatisierte Verbindung der Einzelgeräte zuständig und gewährleistet durch die Direktantriebs-Technologie eine hohe Präzision, Dynamik und Schnelligkeit. Weitere Funktionen dieses Roboters sind:

- Transport sämtlicher Verbrauchsmaterialien in SBS-Format bis zu einem Gewicht von 500 g. Der DDR kann sowohl an der langen (*portrait*) als auch an der kurzen (*landscape*) Seite des Verbrauchsmaterials greifen mit einer Dauer von weniger als 4 Sekunden für einen Transportvorgang (*pick-and-place*).
- Erleichtertes Definieren neuer Greif-Positionen per Knopfdruck.
- Unbegrenzte Rotation von 360° zur schnelleren und effizienteren Erreichbarkeit von Komponenten.
- Die Transportgeschwindigkeit wird an das jeweilige Verbrauchsmaterial angepasst.

Die Reichweite dieses Systems wird von Agilent wie folgt angegeben (Abbildung 58):

- Radial: Mitte der Drehachse bis zur Mitte der Mikrotierplatte: 625 mm.
- Vertikal: 33 bis 520 mm, Netto: 490 mm.
- Sperrzone mit einem Radius von 291 mm um die Drehachse. Innerhalb dieses Bereichs können keine Geräte beladen werden.

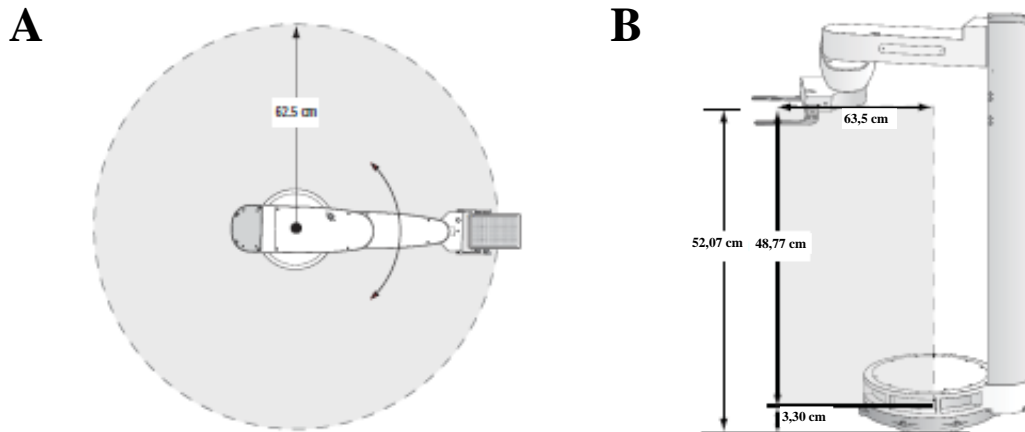


Abbildung 58: Darstellung der radialen (A) und vertikalen (B) Reichweite des Direct Drive Robots. Innerhalb der Sperrzone mit einem Radius von 291 mm um die Drehachse ist kein Transport möglich [141].

7.1.2.2. Pipettierstation Bravo (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Bei der Bravo Pipettier-Plattform handelt es sich um einen kompakten Pipettierer mit 9 Positionen, dessen offenes Design einen Zugriff von allen Seiten und damit eine vereinfachte Integration ermöglicht. Neben der Flexibilität bei der Belegung der einzelnen Positionen (Abfall, Mikrotiterplatten-Schüttler, Heiz- oder Kühlelemente usw.) ist ein Austausch des Pipettierkopfs ohne Probleme möglich. In der vorliegenden Arbeit wird das Instrument mit folgender Ausstattung verwendet:

- 96 Channel LT-Disposable Tip Head zur Aufnahme von 250 μL Einweg-Spitzen (*disposable tips*) mit einem zertifizierten Pipettiervolumen ($< 5\%$ CV) von 2 bis 200 μL . Geringere oder höhere Volumina können bei höheren CV-Werten pipettiert werden. Tabelle 25 zeigt eine Übersicht der von Agilent angegebenen Pipettiergenauigkeit.
- Mikrotiterplatten-Schüttler Variomag Teleshake (Inheco, Martinsried, Deutschland) mit einer Exzentrizität von 1 mm und einer Schüttelfrequenz von 100 bis 2000 rpm.
- Abfall für Pipettenspitzen auf Position 4 und 6. Genutzt wird ausschließlich Position 4 (Abbildung 59).

Tabelle 25: Von Agilent angegebene Werte zur Präzision (Wiederholgenauigkeit, ermittelt durch mehrmalige Wiederholung des Pipettierschritts unter Verwendung gleicher Parameter), Genauigkeit (Grad der Übereinstimmung zwischen Soll- und Ist-Wert) und Messwert-Ausreißer der Bravo Pipettierstation bei geringen Volumina, ausgestattet mit einem 96 Channel LT-Disposable Tip Head und 250 µL Pipettenspitzen.

Volumen [µL]	Präzision [% CV]	Genauigkeit [± %]	Ausreißer (5 %)	Ausreißer (10 %)
2	2	3,3	6	0
5	1	0,3	0	0
10	1	4,2	0	0

Eine Besonderheit dieses Gerätes liegt in der Flexibilität bei der Aufnahme von Pipettenspitzen. Neben einer Aufnahme von 96 Pipettenspitzen können Einzelspitzen sowie beliebige Anordnungen (z.B. 2x2, 4x8 usw.) aufgenommen werden. Diese Funktion ermöglicht die Verwendung dieses 96 Kanal-Pipettierers sowohl für die Pipettierschritte in Kultivierungsplatten (6 *well* oder 24 *deepwell* Mikrotiterplatten) als auch für die Pipettierschritte in 96 *well* oder 384 *well* Mikrotiterplatten bei der Analytik.

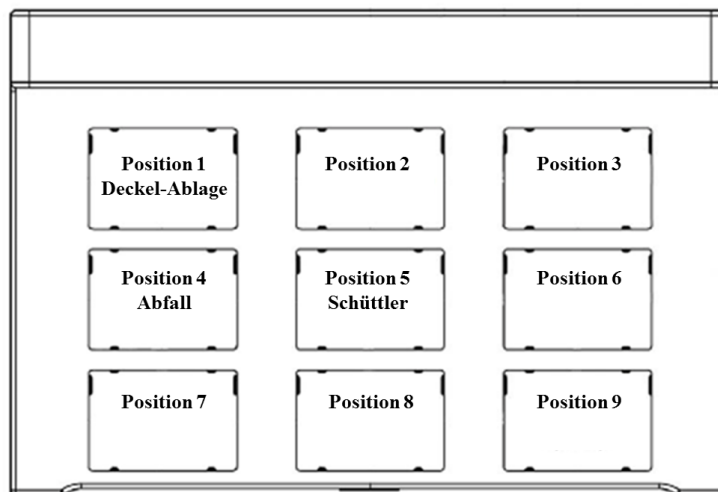


Abbildung 59: Layout des Bravo-Arbeitsbereiches. Auf Position 1 wird in der Software VWorks eine Deckel-Ablage (*lid hotel*) definiert, diese kann ausschließlich für die Ablage eines Mikrotiterplatten-Deckels verwendet werden. Auf Position 5 wird ein Mikrotiterplatten-Schüttler montiert, an Position 4 ist das Deck ausgefräst und dient als Abfall für Pipettenspitzen. Die restlichen Positionen können zur Ablage von Mikrotiterplatten, Reservoiren und Pipettenspitzen-Boxen genutzt werden.

7.1.2.3. Schüttelinkubator STX44-IC SA (Liconic AG, Mauren, Liechtenstein)

Der in dem PoC-System verwendete Schüttel-Inkubator wird in das Produktivsystem integriert und zur geschüttelten Inkubation der Zellkulturen eingesetzt. Eine Beschreibung dieser Komponente ist in Kapitel 7.1.1.1.2. gegeben.

7.1.2.4. Inkubator Cytomat[®] 2C (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland)

Zur statischen, Temperatur-kontrollierten Inkubation oder Lagerung wird der Cytomat[®] 2C von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dieser wird zur gekühlten Lagerung von Reagenzien- und Pufferlösungen verwendet sowie zum Testen der statischen Kultivierung (vgl. Kap. 5.2.3.2.). Der Inkubator ist mit folgenden Funktionen ausgestattet:

- Regelbarer Temperaturbereich von 4 bis 50 °C.
- Geregelte Begasung mit Kohlenstoffdioxid (0 bis 20 %).
- Feuchteregelung bis maximal 95 % relative Feuchte.
- Transfer-Station mit einer Länge von 1000 mm, ausgestattet mit einem *plate presence sensor*.
- Verwendete Kassetten sind geeignet für hohe Mikrotiterplatten (jeweils 10 Ebenen mit einem Abstand von 53 mm zwischen den Ebenen). Der Inkubator bietet Platz für zwei Kassetten.

7.1.2.5. Mikrotiterplatten-Waschgerät Elx405[™] (BioTek GmbH Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland)

In dem Produktivsystem wird das Elx405 Mikrotiterplatten-Waschgerät der Firma Biotek mit folgenden Funktionen integriert:

- 96-Kanal-Dual-Action[™]-Waschkamm zur Erhöhung des Durchsatzes und der Präzision durch getrennte Steuerung des Aspirier- und Dispensiervorgangs.
- Ultraschallreinigung durch Ultrasonic Advantage[™]-Technologie.

Dieses Gerät wird zum Waschen der Glasbodenplatten verwendet, die bei der Färbung der Organellen zum Einsatz kommen (vgl. Kap. 7.2.1.3.). Dazu entwickelte Musmann ein Waschprotokoll unter Nutzung von deionisiertem Wasser, 3 % Mucosol-Lösung, 0,1 % Triton X-100 und 80 % Ethanol zur effizienten Entfernung sämtlicher Assay-Bestandteile und ermöglichte die Wiederverwendung kostenintensiver Glasbodenplatten [119].

7.1.2.6. Folien-Schweißgerät für Mikrotiterplatten PlateLoc (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Der PlateLoc von Agilent stellt einen kompakten *Heat Sealer* mit geringem Platzbedarf dar. Dieser zeichnet sich durch einen hohen regelbaren Temperaturbereich von 30 bis 200 °C bei einer Präzision von ± 2 °C aus. Mikrotiterplatten in dem Produktivsystem werden mit einer durchstechbaren (*piercable*) Aluminiumfolie von Agilent Technologies (Produkt-Nummer:

06644-001) versiegelt. Mikrotiterplatten werden bei 170 °C und einer Dauer von fünf Sekunden verschweißt.

7.1.2.7. Zentrifuge VSpin (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Zur Zentrifugation von Mikrotiterplatten wird die automatisierbare Zentrifuge VSpin von Agilent integriert. Für die Beladung dieser wird keine spezielle Instrumentierung benötigt, diese erfolgt direkt durch den DDR. Weitere Funktionen der Zentrifuge sind:

- Gleichzeitige Zentrifugation von zwei Mikrotiterplatten mit einer maximalen Höhe von 48,3 mm.
- Maximale Geschwindigkeit / Zentrifugalkraft: 3000 rpm / 1000 g.
- Maximale Beladung von 250 g pro Zentrifugenteller.
- Beschleunigung / Bremsen innerhalb von 7,5 Sekunden von 0 bis 3000 rpm.

Die VSpin Zentrifuge wird zur Abtrennung von Zellbestandteilen verwendet, dazu werden die Mikrotiterplatten für 8 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird anschließend mit der Bravo-Pipettierstation automatisch abgenommen.

7.1.2.8. Mikrotiterplattenleser Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

Der Sunrise™ Mikrotiterplattenleser des PoC-Systems wird zum Auslesen der Mikrotiterplatten bei der Durchführung der Metabolit-Assays im vollständig automatisierten Prozess verwendet. Eine Beschreibung des verwendeten Systems ist in Kapitel 7.1.1.2.3. gegeben. Die Ansteuerung dieses Systems erfolgt über die Steuersoftware VWorks. Das Ausgabeformat der Messdaten ist eine .txt-Datei, die in Microsoft Excel prozessiert und ausgewertet wird. Dieses System wird im Laufe der Entwicklung von dem Infinite® M200 PRO abgelöst.

7.1.2.9. Mikrotiterplattenleser Infinite® M200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

Der Infinite® M200 PRO Plattenleser von Tecan ist mit der Quad4-Monochromator™-Technologie (jeweils zwei für die Anregung und Emission) ausgestattet und wird zur Absorptions- und Fluoreszenz-Messung eingesetzt. Der Plattenleser wird für die Durchführung der Metabolitassays sowie für die Entwicklung neuer Assays genutzt und weist folgende Funktionen auf:

- Nutzung einer Xenon Blitzlampe.
- Absorptionsmessung von 230 bis 1000 nm.
- Messung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 230 bis 850 nm und einer Emission von 280 bis 850 nm.
- Möglichkeit zum Auslesen von 6 bis 384 *well* Mikrotiterplatten.
- Möglichkeit zur Temperaturkontrolle von 5°C über Raumtemperatur bis 42 °C.
- Lineare und orbitale Schüttelfunktion.
- Gas Control Module (GCM)TM zur Regelung der Kohlenstoffdioxidkonzentration (0 bis 10 %) im Geräte-Innenraum.

Die Steuerung des Gerätes erfolgt über die Tecan-Software iconcontrol Version 1.8 oder über die VWorks Steuersoftware. Die Weiterverarbeitung der Messdaten erfolgt in Microsoft Excel.

7.1.2.10. Fluoreszenzmikroskop IMT-2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)

Das von Linke automatisierte inverse Fluoreszenzmikroskop IMT-2 wird vor der Integration des Cellavista[®] Analysesystems in dem Produktivsystem genutzt. Auf Grund der ressourcenintensiven Bildverarbeitung wird das automatisierte Mikroskopsystem über einen separaten Computer gesteuert. Die Einbindung in das Gesamtsystem erfolgt über das Ausführen von Batch-Dateien in der Steuersoftware VWorks über eine Ethernetverbindung von Mikroskop- und Anlagensteuerrechner.

7.1.2.11. Fluoreszenzmikroskop Cellavista[®] Analysesystem (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

Das automatisierte Fluoreszenzmikroskop Cellavista[®] Analysesystem der Roche Diagnostics GmbH wird im Laufe der Entwicklung integriert und ersetzt das automatisierte Fluoreszenzmikroskop IMT-2. In dieser Arbeit wurde die Vollausrüstung dieses Systems verwendet. Dieses ist ausgestattet mit fünf Objektiven (2x, 4x, 10x, 20x, 40x), sechs Fluoreszenzfilter-Sätzen (Tabelle 26) und einem Laser-basierten Autofokus zur Hellfeld- und Fluoreszenzanalyse. Die Bilder werden von dem Boden der 6-384 *well* Mikrotiterplatten erfasst und anschließend anhand von Operator-Dateien und Bildanalyse-Algorithmen in der Cellavista[®] Analysesystem Software analysiert. Die Roche Diagnostics GmbH gibt eine Analysezeit von etwa 3,5 Minuten bei Erfassung der vollen Fläche einer 96 *well* Platte mit einem 4x Objektiv und Nutzung eines Filters an. Ein Einbau dieses Systems in vollautomatische Prozesse ist möglich [142].

Tabelle 26: Zur Verfügung stehende Filtersets des Cellavista® Analysesystems in der verwendeten Vollausrüstung. [143].

Filterset	Anregungfilter [nm]	Dichroitische Filter [nm]	Emissionsfilter [nm]
UV	395	410	450 (Bandbreite 50)
Blue	470	510	500 (Breitband)
Cyan	505	530	560 (Bandbreite 50)
Green	530	555	565 (Breitband)
Amber	590	610	610 (Breitband)
Red	620	640	665 (Breitband)

7.1.2.12. Lagersystem MiniHub (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Zur Lagerung von Verbrauchsmaterial in SBS-Format wird das automatisierbare, rotierende Karussell MiniHub von Agilent mit einer mittleren Lagerkapazität eingesetzt. Die Variabilität bei dem Einstellen der Abstände zwischen den einzelnen Ebenen ermöglicht die Lagerung von bis zu 24 Pipettenspitzen-Boxen oder hohen Mikrotiterplatten (*pitch* 75,3 mm) bzw. 64 flache Mikrotiterplatten (*pitch* 25,1 mm). In dem Produktivsystem wird der MiniHub für die Lagerung von 24 Pipettenspitzen-Boxen konfiguriert. Auf das gelagerte Verbrauchsmaterial kann sowohl im *portrait*- als auch im *landscape*-Modus zugegriffen werden. Die Zeit zur Bereitstellung des Verbrauchsmaterials durch Drehung des Karussells liegt bei < 5 Sekunden.

7.1.2.13. Edelstahl-Stapel-Systeme (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

Neben dem MiniHub werden Edelstahl-Stapel-Systeme (*Stacker*) von Agilent zur Vorlage von Verbrauchsmaterialien in SBS-Format verwendet. In dem Produktivsystem werden maximal vier *Stacker* parallel verwendet, drei dieser bieten Platz für jeweils 16 flache Mikrotiterplatten, einer weist einen höheren Abstand zur Lagerung von 7 Pipettenspitzen-Boxen oder hohen Mikrotierplatten auf.

7.1.2.14. Cytomat® 800 Hotel (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland)

Zur Erhöhung der Lagerkapazität für Verbrauchsmaterialien wird das Cytomat® 800 Hotel von Thermo Fisher Scientific integriert. Es wird die Variante des Untertisch-Hotels gewählt mit einer senkrechten Ausgabe der Verbrauchsmaterialien. Das Cytomat® 800 Hotel verfügt über die Möglichkeit zur Verwendung von 9 *Stackern*, welche in unterschiedlicher Konfiguration verwendet werden können. Die Integration dieses System erfolgt zum Ende der Arbeit.

7.1.2.15. Sonstige Systeme

Neben den integrierten Komponenten werden Einzelgeräte eingesetzt, die nicht für den Routinebetrieb erforderlich sind bzw. eine Integration dieser nicht lohnend ist. Dabei handelt

es sich um ein System zur *online*-Bestimmung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration, welches auf Grund negativer Tests nicht integriert wird. Außerdem wird das System zur Bestimmung der Oberflächenspannung und des statischen Kontaktwinkels nur für einzelne Messungen eingesetzt.

7.1.2.15.1. *Sensor Dish[®] Reader* (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland)

Der Sensor Dish[®] Reader der Firma PreSens Precision Sensing GmbH wird nicht integriert. Es werden spezielle 6 *well* Platten verwendet, die an dem transparenten Boden der *wells* einen Sensor Spot zur Messung des pH-Wertes aufweisen (Hydro Dish[®]). PreSens gibt eine Genauigkeit von $\pm 0,05$ Einheiten bei der Messung des pH-Wertes an. Die Platten werden steril und vorkalibriert geliefert, für jede Charge wird eine neue Kalibrationsdatei zur Verfügung gestellt.

7.1.2.15.2. *Easy Drop Standard-System (DSA 15)* (Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Deutschland)

Mit Hilfe des Easy Drop Standard-Systems werden die Messungen der Oberflächenspannung des verwendeten Zellkulturmediums und die statischen Kontaktwinkel bei Benetzung verschiedener Mikrotiterplatten mit dem Medium durchgeführt.

7.1.2.15.2.1. *Kontaktwinkel-Messungen*

Die Kontaktwinkelmessung ist eine weit verbreitete physikalisch-chemische Methode zur Charakterisierung von Oberflächen sowie zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen einer Oberfläche und einem Fluid, insbesondere dem Benetzungsverhalten. Abbildung 60 zeigt die nach Young auftretenden Grenzflächenspannungen an einem Punkt der 3-Phasen-Kontaktlinie.

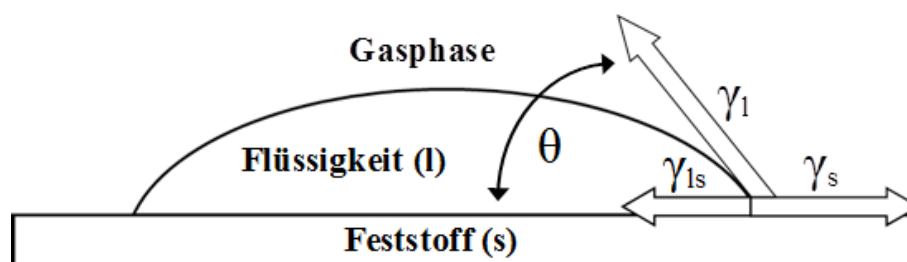


Abbildung 60: Auftretende Oberflächenspannungen und Kontaktwinkelbildung eines Flüssigkeitstropfens auf einer Feststoffoberfläche mit γ_l , γ_s als Oberflächenspannungskomponenten der flüssigen (l) und festen (s) Phase sowie γ_{ls} als Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen.

Basierend auf der Young'schen Gleichung kann über die Messung des Kontaktwinkels die Oberflächenenergie bestimmt werden [144]. In der vorliegenden Arbeit werden die Kontaktwinkelmessungen jedoch nur zur Charakterisierung des Benetzungsverhaltens von Mikrotiterplatten durchgeführt um Wechselwirkungen des verwendeten Zellkulturmediums

mit dem Plastik-Material beschreiben zu können. Die Messung des Kontaktwinkels erfolgt nach der „*sessile drop*“ Methode, d.h. der Flüssigkeitstropfen wird auf eine Oberfläche aufgetragen. Es wird der statische Kontaktwinkel gemessen.

Dazu wird ein Tropfen Zellkulturmedium auf den Boden der Mikrotiterplatten verschiedener Materialien und Beschichtungen aufgetragen. Die Auswertung erfolgt mit dem EasyDrop Standard System (DSA 15) der Firma Krüss GmbH, Hamburg. Dazu wird unmittelbar nach Auftragen des Tropfens ein Bild mit Hilfe einer CCD (*Charged-Coupled Device*) -Kamera erzeugt und dem internen Auswerteverfahren zugeführt. Bei dem gewählten Tangenten-Verfahren 1 wird die Steigung im 3-Phasen-Kontaktpunkt durch die Ableitung der allgemeinen Kegelschnittgleichung, welche an das Tropfenprofil angepasst wird, ermittelt. Beispiele für einen großen und kleinen Kontaktwinkel zeigt Abbildung 61.

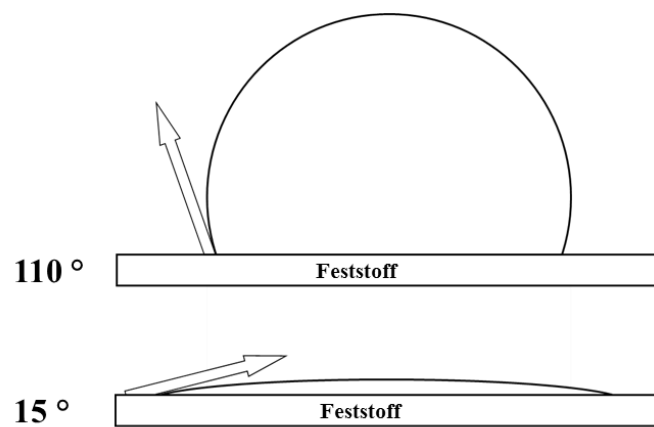


Abbildung 61: Statische Kontaktwinkel resultierend aus schlechter Benetzung (110°) und guter Benetzung (15°).

7.1.2.15.2.2. Messung der Oberflächenspannung

Die Vergrößerung der Oberfläche von Flüssigkeiten erfordert das Verrichten von Arbeit und wird in Bezug zur vergrößerten Fläche als Oberflächenspannung bezeichnet. Da Flüssigkeiten in gasförmiger Umgebung die kleinstmögliche Oberfläche einnehmen, bilden sie die Form einer Kugel. Auf einen hängenden Tropfen wirkt zum einen die Gravitationskraft, welche den Tropfen in eine längere Form bringt, und zum anderen wird der Tropfen durch die Oberflächenspannung in einer möglichst kleinen Form gehalten. Es bildet sich ein axialsymmetrischer Tropfen in charakteristischer Form.

Zur Messung der Oberflächenspannung von Zellkulturmedien wird die Methodik der Tropfenkonturanalyse mit dem EasyDrop Standard-System (Krüss, Hamburg) durchgeführt. Dazu wird die optische Messmethodik des „hängenden Tropfen“ gewählt, welche sich sowohl für hohe als auch niedrige Oberflächenspannungen eignet und unabhängig von der Viskosität ist. An einer Kapillare wird ein hängender Tropfen erzeugt und die Tropfenkontur mit der CCD-Kamera des EasyDrop Systems aufgenommen. Auf Basis der Young-Laplace-Gleichung kann das Kräftegleichgewicht zwischen Gravitationskraft und

Oberflächenspannung mathematisch beschrieben werden. Die Auswertung der Tropfenkontur erfolgt automatisch mit der Auswertesoftware Drop Shape Analysis von Krüss. Auf Grund der Temperaturabhängigkeit der Oberflächenspannung, erfolgen alle Messungen bei Raumtemperatur (20 °C).

7.2. Entwicklung einer miniaturisierten und automatisierbaren Analytik

Eine Kultivierung in Mikrotiterplatten stellt auf Grund des geringen Kulturvolumens eine besondere Herausforderung an die prozessbegleitende Analytik dar. Neben einer Miniaturisierung dieser (Anpassung an geringes Kulturvolumen) ist eine Automatisierung (Anpassung an den erhöhten Durchsatz) notwendig. Folgende Anforderungen müssen bei einer Entwicklung erfüllt werden:

- Kurze Analysezeiten, hoher Parallelisierungsgrad
- Robuste Methoden zur Gewährleistung hoher Reproduzierbarkeit
- Integrationsfähigkeit in das automatisierte System

Die Entwicklung der im Rahmen dieser Arbeit genutzten analytischen Methoden erfolgt schwerpunktmäßig im Rahmen der Diplom- bzw. Masterarbeiten von Richard Wetzel, Pawel Linke, Carsten Musmann und Swetlana Spielmann. Das Ziel ist der Aufbau einer Analytik zur prozessbegleitenden Routineanwendung sowie der Beweis der Machbarkeit (*Proof of Concept*) für spezielle analytische Nachweisverfahren. Neben der eigenen Entwicklung wird im Rahmen dieser Arbeit ein Netzwerk zu Hochdurchsatz-Systemen der Firmen-internen Analytikabteilung etabliert.

Die Entwicklung und Anpassung der Assays erfolgt über einen Zeitraum von zwei Jahren, so dass eine stetige Weiterentwicklung und Anpassung an neue Hardware notwendig ist. Während des Aufbaus des *Proof of Concept* Systems (vgl. Kap. 5.1.1.) erfolgt die analytische Entwicklung an einem modifizierten Fluoreszenzmikroskop (IMT-2, Olympus) und einem Absorptions-Plattenleser (Sunrise, Tecan). In dem Produktivsystem (vgl. Kap. 5.1.2.) hingegen kommen das Cellavista[®] Analysesystem der Roche Diagnostics GmbH sowie der Fluoreszenz-Absorptions-Plattenleser Infinite[®] M200 PRO der Firma Tecan zum Einsatz.

In diesem Kapitel sollen sowohl die in dieser Arbeit verwendeten sowie die zur Verfügung stehenden analytischen Methoden dargestellt werden. Ein Einsatz dieser Methoden ist sowohl im vollständig automatisierten als auch teilautomatisierten Betrieb (Trennung von Zellkultur und Analytik) möglich. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die im Routinebetrieb verwendeten und die zur Verfügung stehenden vollständig automatisierten Methoden, für welche die Machbarkeit bewiesen ist.

Tabelle 27: Übersicht der miniaturisierten und automatisierten analytischen Methoden. Alle dargestellten Methoden sind sowohl für den Hochdurchsatz im vollständig automatisierten Umfeld als auch zur Durchführung in teilautomatisierten Systemen geeignet. F: Fluoreszenzmikroskopie; A: Absorptionsbasiert; PoC: *Proof of Concept* bewiesen; HK: Hexokinase; G6PDH: Glukose-6-phosphatdehydrogenase; LOD: Laktatoxidase; POD: Peroxidase; GLS: Glutaminase; GLD: Glutamatoxidase; LAC: Laktat; GLDH: Glutamatdehydrogenase; ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; fAK: Fang-Antikörper; dAK: Detektions-Antikörper; TIA: Turbidimetrischer Immunoassay.

System	Bezeichnung/Analyt	Nachweisprinzip	Hersteller	Status	Ex/Em
F	Lebend- und Gesamtzell-dichte	Resazurin C ₁₂ + SYTOX [®] Green	Molecular Probes L34951	Routine	R: 488/575 S: 504/523
A	Glukose	HK + G6PDH Messung NADPH	Roche Diagnostics 04657527	Routine	340
A	Laktat	LOD + POD Messung 4-AAP	Roche Diagnostics 05401666	Routine	550
F	Zellkern	Hoechst 3342	Enzo Life Science ENZ-52401	PoC	350/460
F	Golgi-Apparat	Golgi-ID [™] Green *	Enzo Life Science ENZ-51028-K100	PoC	500/550
F	Endoplasmatisches Retikulum	ER-ID [™] Red *	Enzo Life Science ENZ-51026-K500	PoC	590/670
F	Endoplasmatisches Retikulum	ER-Tracker [™] Green Glibenclamid BODIPY [®] FL	Molecular Probes E34251	PoC	504/511
F	Lysosomen	Lyso-ID [®] Green *	Enzo Life Science ENZ-51034-K500	PoC	485/560
F	Apoptose	Annexin-V-Alexa 568	Roche Diagnostics 03703126001	PoC	488-590/600
F	Proteinbiosynthese	L-Azidohomoalanin + Alexa Fluor 488	Molecular Probes C10102	PoC	495/519
A	Glutamin	GLS + GLD + POD Messung 4-AAP	Randox GM1373	PoC	550
A	Glutamat	GLD + POD Messung 4-AAP	Randox GM1372	PoC	550
A	Ammonium	GLDH Messung NADPH	Randox AM 1015	PoC	340
A	Laktat-dehydrogenase	LAC Messung NADH	Randox LD2812	PoC	340
A	Antikörper	One Step ELISA Messung über ABTS	Jackson Immuno Research (fAK,dAK), Roche (ABTS), MicroCoat (Streptavidin-Beschichtung)	PoC	405
A	Antikörper	Turbidimetrischer Immunoassay (TIA)	Roche Diagnostics 03507378	PoC	340

* keine Herstellerangabe bezüglich der Reagenzien bzw. des Färbesystems

In Tabelle 28 sind die außerhalb des automatisierten Zellkultursystems genutzte Analysensysteme zur Polymerasekettenreaktion und Firmen-interne Kooperationen zur Antikörper- und Glykanquantifizierung dargestellt.

Tabelle 28: Schnittstellen zu nicht integrierten Analysesystemen. Neben Kooperationen mit der Analytik-Abteilung wird ein LightCycler® Instrument zur Integration in das automatisierte Zellkultursystem vorbereitet [134]. RT-qPCR: Real-Time-quantitative-Polymerasenkettenreaktion; ESI-MS: Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie.

System	Bezeichnung/Analyt	Nachweisprinzip	Status	Art der Entwicklung
Interferometrie	Antikörper	Octet-System	Routine	Kooperation mit Analytik-Abteilung
Massen-spektrometrie	Glykosylierungs-muster	ESI-MS von aufgearbeiteten Glykopeptiden	Routine	Kooperation mit Analytik-Abteilung
Polymerase-ketteneraktion	Gen-Expressionslevel	RT-qPCR LightCycler®	PoC	Eigene Entwicklung, PCR-Labor

Eine Einteilung der analytischen Methoden nach ihrer Verfügbarkeit in dem jeweiligen automatisierten System der vorliegenden Arbeit ist in Tabelle 29 gegeben. Im Laufe des Aufbaus von *Proof of Concept* und Produktivsystem erfolgt eine stetige Weiter- und Neuentwicklung von Tests zur Charakterisierung der Zellkulturen.

Tabelle 29: Einteilung der entwickelten miniaturisierten Tests nach ihrer Verfügbarkeit in den automatisierten Zellkultursystemen. ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, TIA: Turbidimetrischer Immunoassay.

Bezeichnung/Analyt	System	Verfügbarkeit
Lebend- und Gesamtzelldichte	Fluoreszenzmikroskopie	PoC-System; Produktivsystem
Glukose, Laktat	Absorption	PoC-System; Produktivsystem
Glutamin, Glutamat, Ammonium, Laktatdehydrogenase	Absorption	PoC-System; Produktivsystem
Antikörper (ELISA)	Absorption	PoC-System; Produktivsystem
Zellkern, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen	Fluoreszenzmikroskopie	Produktivsystem
Apoptose	Fluoreszenzmikroskopie	Produktivsystem
Proteinbiosynthese	Fluoreszenzmikroskopie	Produktivsystem
Antikörper (TIA)	Absorption	Produktivsystem
Antikörper	Interferometrie	Produktivsystem
Glykosylierungsmuster	Massenspektrometrie	Produktivsystem
Gen-Expressionslevel	Polymeraseketteneraktion	Produktivsystem

Mit Ausnahme der Detektion von Organellen (Verwendung von Glasbodenplatten; Porvair Sciences Ltd, Surrey United Kingdom) werden alle automatisierten Assays in Polystyrol-Mikrotiterplatten (NUNC Thermo Scientific, Langenselbold) durchgeführt. Materialien für die externe Analytik sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Sämtliche Reagenzien und Pufferlösungen werden bei +4 °C gelagert. DMSO-haltige Reagenzien werden vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

7.2.1. Fluoreszenzmikroskopie-basierte Methoden

Fluoreszenzmikroskopie-basierte Nachweismethoden werden zur Markierung von Zellen oder Zellbestandteilen eingesetzt, wie der Markierung lebender und toter Zellen oder der Markierung von Organellen. Ebenso können morphologische Veränderungen von Zellen detektiert werden, die beispielsweise im Verlauf der Apoptose auftreten. Diese Methoden basieren auf dem Nachweis markierter Zellen und unterscheiden sich daher von den Absorptions-basierten Methoden, welche für den Nachweis von Analyten aus der direkten Umgebung der Zelle genutzt werden (vgl. Kap. 7.2.2.).

7.2.1.1. Bestimmung von Lebend- und Gesamtzellichte

Im Rahmen der Masterarbeit von Pawel Linke wird ein Assay zur automatisierten Zellzählung und Viabilitätsbestimmung auf Basis des IMT-2 Fluoreszenzmikroskops entwickelt und vergleichbare Ergebnisse zu denen des Cedex Analysesystems erzielt [88]. Die Arbeit umfasst den Umbau eines inversen Mikroskops IMT-2 (Olympus, Hamburg, Deutschland) (vgl. Kap. 7.1.1.2.2.) und die Anpassung eines kommerziellen Tests an das Mikrotiterplattenformat. Die Software Image-Pro Plus V. 7.0.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, USA) ermöglicht dabei die Automatisierung der Bildaufnahme und der anschließenden Bildverarbeitung.

7.2.1.1.1. Assayentwicklung zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellichte

Die Entwicklung des Assays erfolgt an dem automatisierten Fluoreszenzmikroskop IMT-2, die Pipettierprotokolle werden an dem Bravo-Pipettierer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) entwickelt. Neben denen von Linke getesteten Färbemethoden wird in der vorliegenden Arbeit eine weitere mit dem Cellavista[®] Analysesystem getestet. Diese nutzt die Reagenzien Hoechst 33342 und Propidiumiodid und ermöglicht auf Grund des geringen Preises eine weitere Kostenreduktion bei der Verwendung des Assays im Hochdurchsatz. Tabelle 30 zeigt eine Übersicht zu den getesteten Reagenzien.

Tabelle 30: Übersicht und Bewertung getesteter Färbemethoden zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellichte.

Testbezeichnung	Hersteller	Funktionsprinzip	Bemerkung
LIVE/DEAD [®] Viability/Cytotoxicity Kit	Molecular Probes L3224	Calcein-AM: lebende Zellen Ethidium Homodimer-1 (Ethd-1): tote Zellen	Calcein bleicht schnell aus, ungeeignet für Standzeiten > 30 Minuten
LIVE/DEAD [®] Reduced Biohazard Cell Viability Kit	Molecular Probes L7013	SYTO 10 Green: lebende Zellen Ethidium Homodimer-1 (Ethd-1): tote Zellen	Hoher Preis
LIVE/DEAD [®] Cell Vitality Assay Kit	Molecular Probes L34951	C ₁₂ -Resazurin/Resorufin: lebende Zellen SYTOX [®] : tote Zellen	Hohe Stabilität, geringer Preis
Hoechst 33342; Propidiumiodid	Molecular Probes H3570; P3566	Hoechst 33342: lebende Zellen Propidiumiodid: tote Zellen	Geringer Preis, aber starke Apoptoseinduktion durch Hoechst 33342

Der Farbstoff Hoechst 33342 führt ab einer Konzentration von 0,95 µg/mL zur Apoptose-Induktion. Eine Verwendung geringerer Konzentrationen ist auf Grund einer zu geringen Signalintensität nicht möglich. Abbildung 62 zeigt Durchlichtaufnahmen mit dem Cellavista[®] Analysesystem bei steigender Konzentration des Farbstoffs Hoechst 33342. Je höher die Konzentration des Farbstoffs, desto stärker ist die Bildung von *apoptotic bodies*. Propidiumiodid wird in einer Konzentration von 60 mg/mL getestet und zeigt auch bei steigender Konzentration bis 200 mg/mL keine negativen Effekte. Diese Färbemethode wird nicht weiter verwendet.

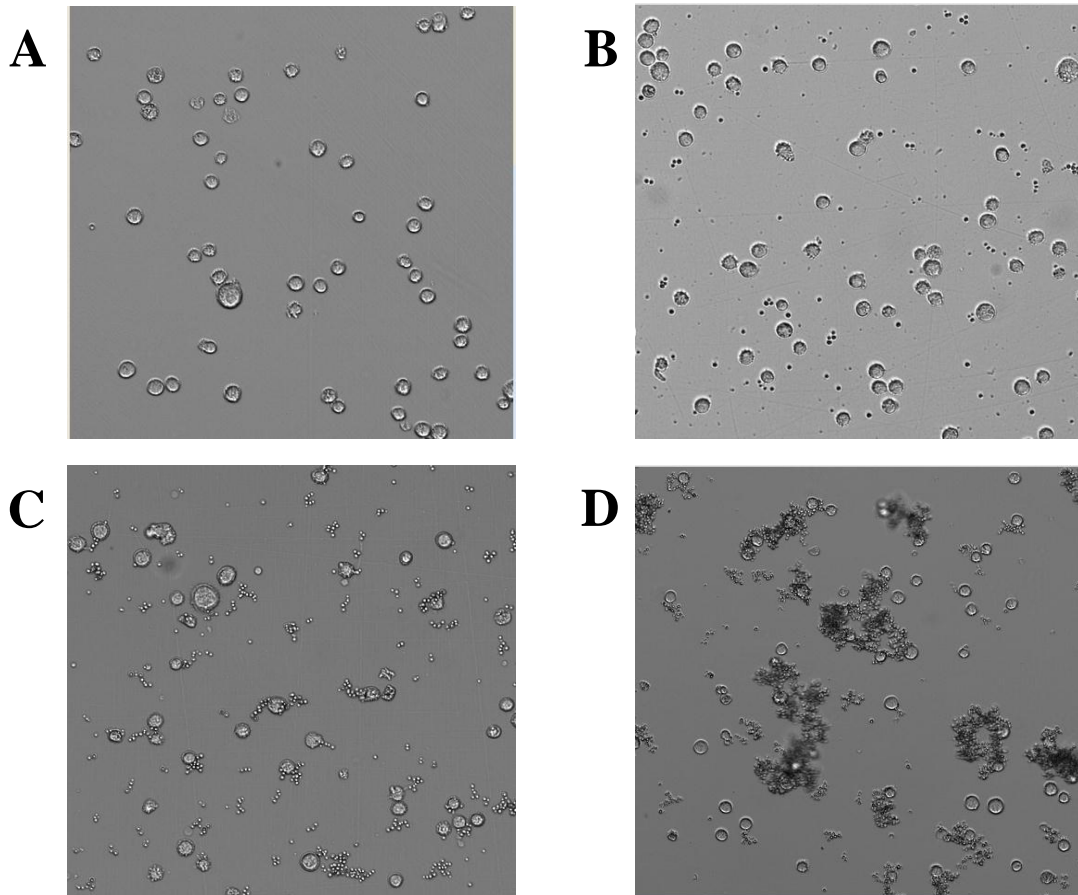


Abbildung 62: Durchlichtaufnahmen mit dem Cellavista[®] Analysesystem von Zellkulturen, die mit verschiedenen Konzentrationen des Farbstoffs Hoechst 33342 behandelt wurden (A) 0,19 µg/mL; (B) 0,95 µg/mL; (C) 2,38 µg/mL und (D) 4,76 µg/mL.

In der vorliegenden Arbeit wird auf Grund des geringen Preises und der hohen Stabilität der Färbung ausschließlich die SYTOX[®] und C₁₂-Resazurin Fluoreszenzfärbung verwendet. Tabelle 31 zeigt die einzusetzenden Reagenzien- und Pufferkonzentrationen pro *well*. Die als optimal ermittelte Inkubationszeit beträgt 20 Minuten.

Tabelle 31: Zusammensetzung des verwendeten Routine-Assays zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzelldichte.

Bestandteil	Konzentration der Stocklösung	Volumen pro well
HEPES	1 M	80 μ L
Reagenzienmix		
SYTOX [®]	3,3 μ M SYTOX [®]	2 μ L
C ₁₂ -Resazurin	50 μ M C ₁₂ -Resazurin	

Der Reagenzienmix aus SYTOX[®] und C₁₂-Resazurin wird in einer 96 well Mikrotiterplatte mit schwarzen wells (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vorgelegt, der Deckel wird mit Hilfe einer Folie abgedunkelt. Die Stabilität des Reagenzienmix kann für eine Dauer von 14 Tagen bei einer Lagerung von 4 °C gezeigt werden [119]. Die Vorlage von HEPES erfolgt in einem 4-Kammer-Reservoir (Porvair Sciences Ltd, Surrey UK).

7.2.1.1.2. Entwicklung eines Pipettierprotokolls zur automatisierten Durchführung

Im Rahmen der Assayentwicklung wird folgendes Protokoll (Abbildung 63) für die Bestimmung der Lebend- und Gesamtzelldichte von Zellkulturen im automatisierten Betrieb entwickelt [88]. Ausgegangen wird von der Vorlage einer zellhaltigen Probe in einer 96 well Mikrotiterplatte mit Rundboden (BD FalconTM):

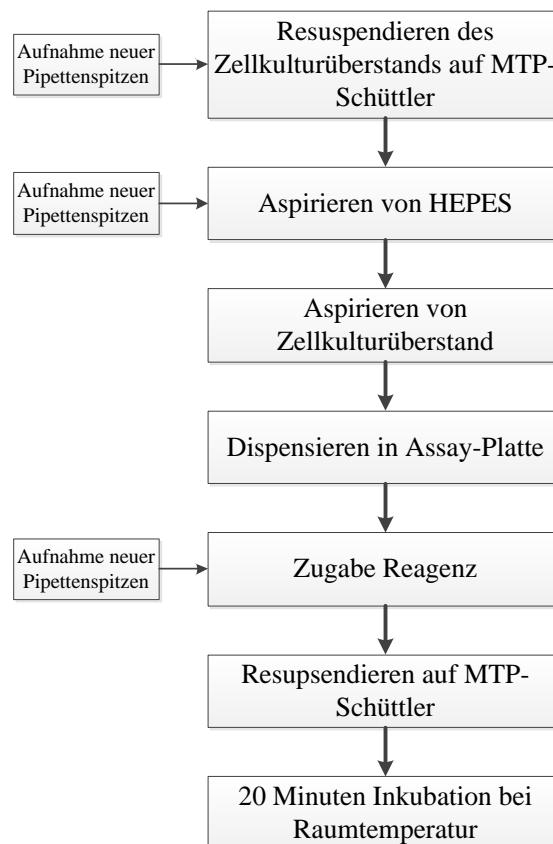


Abbildung 63: Schematische Darstellung des entwickelten Protokolls zur automatisierten Bestimmung der Lebend- und Gesamtzelldichte in Mikrotiterplatten mit dem automatisierten IMT-2-Mikroskop [88].

Nach mehrmaligem Resuspendieren des Zellkulturüberstandes in einer 96 *well* Platte Mikrotiterplatte bei simultanem Schütteln auf einem Variomag Teleshake (Inheco, Martinsried, Deutschland) werden 80 μL 1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) aspiriert. Im Anschluss wird die zellhaltige Suspension in die gleichen Pipettenspitzen aufgezogen, die HEPES-Pufferlösung gewährleistet bei dem folgenden Dispensierschritt die vollständige Abgabe der zellhaltigen Suspension in die Assayplatte. Die Zugabe der Reagenzienmischung erfolgt mit neuen Pipettenspitzen mit anschließendem Resuspendieren bei simultanem Schütteln der Platte. Nach der Sedimentation der Zellen können diese mit dem automatisierten Fluoreszenzmikroskop detektiert und gezählt werden.

Das detaillierte Protokoll mit Einzelheiten zu Pipettier-, Schüttler-Parametern sowie den verwendeten Flüssigkeitsklassen unterliegt der Geheimhaltung und darf in dieser Arbeit nicht dargestellt werden.

Das einzusetzende Probevolumen ist abhängig von der Gesamtzellichte der Suspension und wird wie folgt gewählt:

- Bis zu einer Gesamtzellichte von 70×10^5 Zellen/mL: 10 μL .
- Bis zu einer Gesamtzellichte von 250×10^5 Zellen/mL: 2,5 μL .

Bei einer Gesamtzellichte $> 250 \times 10^5$ Zellen/mL wird die Probe mit 1 M HEPES-Lösung verdünnt um die Bildung eines geschlossenen Monolayers der Zellen auf dem Boden der Mikrotiterplatten zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen wäre keine Auswertung der Bilder möglich. In Tabelle 32 sind die zentralen Parameter des automatisierten Assays zur Zellichte- und Viabilitätsbestimmung zusammengefasst.

Tabelle 32: Zusammenfassung zentraler Parameter zur Durchführung des Assays zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzellichte mit dem automatisierten IMT-2-Mikroskop.

Parameter	Beschreibung
Probevolumen	<ul style="list-style-type: none"> • 10 μL: bis 70×10^5 Zellen/mL. • 2,5 μL: bis 250×10^5 Zellen/mL.
Reagenzien	<ul style="list-style-type: none"> • 2 μL einer Stocklösung aus 50 μM C₁₂-Resazurin und 3,3 μM SYTOX[®]. • 80 μL einer 1 M HEPES-Lösung. • Stabilität von 14 Tagen bei Lagerung zwischen 4-8 °C.
Vorlage Reagenz	<ul style="list-style-type: none"> • schwarze Mikrotiterplatte mit V-Boden, abgedunkelter Deckel.
Mikrotiterplattenmaterial der Assay-Platte	<ul style="list-style-type: none"> • Glasboden-Platten (Porvair Sciences Ltd, Surrey UK) verbessern zwar den Kontrast, sind aber nicht erforderlich. Kontrast in Polystyrol-Plastikplatten (NUNC Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) ist ausreichend.
Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Autofluoreszenz bei Verwendung von 1xPBS; unscharfe Bilder, kein reproduzierbarer Autofokus. Daher sollte HEPES verwendet werden.
Inkubation	<ul style="list-style-type: none"> • 20 Minuten bei Raumtemperatur.

7.2.1.1.3. Bildaufnahme und -verarbeitung am IMT-2-Fluoreszenzmikroskop

Standardmäßig werden 9 Bilder von jedem *well* aufgenommen und anschließend ausgewertet. Für diese Bedingungen wird ein Variationskoeffizient von 8 % ermittelt. Bei der Aufnahme von 4 Bildern wird ein Variationskoeffizient von 41 % ermittelt und bei 6 Bildern beträgt dieser 15 % [88].

Zur Auswertung der fluoreszierenden Objekte mit der Software Image Pro Plus wird ein Makro entwickelt, welches aus folgenden Teilen besteht [88]:

- Definieren des Autocollectors (z.B. Anzahl, Durchmesser, Clustergröße der Objekte).
- Homogenisierung des Hintergrundes durch Bildbearbeitungsfilter.
- Aufteilen des Bildes in die Farbkanäle Blau, Grün und Rot.
- Reduzieren von Farbüberlagerungen durch Subtraktion der Farb-Kanäle.
- Intensitätsverstärkung durch zweifache Addition des jeweiligen Farb-Kanals.
- Definition des auszuwertenden Bereichs mit einer Größe von 0,4187 mm².
- Festlegung der Größe und Signalintensität zu zählender Objekte.
- Trennung von Zellaggregaten anhand von Intensitätsverläufen im Histogramm (die Intensität zwischen zwei Zellen ist schwächer).

Die gesamte Prozedur wird separat für den roten und den grünen Kanal nacheinander durchgeführt und die ermittelten Zahlenwerte in den Autocollector übertragen. Die Ausgabe der Daten erfolgt als Microsoft Excel-Datei.

7.2.1.1.4. Anpassung des Zelldichteassays an das Cellavista[®] Analysesystem

Der Einsatz des Cellavista[®] Analysesystems zur Erhöhung des Durchsatzes erfordert eine Anpassung des in Kapitel 7.2.1.1.1. beschriebenen Assays zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzelldichte, der auf Basis des IMT-2-Mikroskops entwickelt wurde. Das entwickelte Pipettierprotokoll für den Bravo (vgl. Kap. 7.2.1.1.2.) wird vollständig übernommen. Neben der Anpassung der Reagenzkonzentrationen an die neue Hardware werden die Bildanalyseparameter zur Auswertung der aufgenommenen Bilder optimiert [119]. Die gewählten Parameter zur Aufnahme der Bilder mit dem Cellavista[®] Analysesystem sind in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Parameter zur Aufnahme der Bilder mit dem Cellavista[®] Analysesystem für den Assay zur Lebend- und Gesamtzell-dichtebestimmung.

	Parameter	Einstellung
	Objektiv	10x
	Anzahl Bilder pro well	9
C ₁₂ -Resazurin	Anregung	505 nm
	Emission	565 nm
SYTOX [®]	Anregung	470 nm
	Emission	500 nm

Die zentralen Parameter des angepassten Assays sind in Tabelle 34 dargestellt. Anpassungen sowie Änderungen, die aus der Verwendung eines neuen Mikroskop- und Bildauswertesystems resultieren, sind hervorgehoben.

Tabelle 34: Zusammenfassung zentraler Parameter zur Durchführung des Assays zur Bestimmung der Lebend- und Gesamtzell-dichte mit dem Cellavista[®] Analysesystem. Die vorgenommenen Anpassungen sowie Änderungen, die aus der Verwendung eines neuen Mikroskop- und Bildauswertesystems resultieren, sind hervorgehoben.

Parameter	Beschreibung
Probevolumen	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µL: bis 50 x10⁵ Zellen/mL. • 2,5 µL: bis 300 x10⁵ Zellen/mL.
Reagenzien	<ul style="list-style-type: none"> • 3 µL einer Stocklösung aus 50 µM C₁₂-Resazurin und 1,75 µM SYTOX[®]. • 80 µL einer 1 M HEPES-Lösung. • Stabilität von 14 Tagen bei Lagerung zwischen 4-8 °C.
Vorlage Reagenz	<ul style="list-style-type: none"> • Abgedunkelte Mikrotiterplatte mit V-Boden, abgedunkelter Deckel.
Mikrotiterplattenmaterial der Assay-Platte	<ul style="list-style-type: none"> • Glasboden-Platten (Porvair Sciences Ltd, Surrey UK) verbessern zwar den Kontrast, sind aber nicht erforderlich. Kontrast in Polystyrol-Plastikplatten (NUNC Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland) ist ausreichend.
Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Autofluoreszenz bei Verwendung von 1xPBS; unscharfe Bilder, kein reproduzierbarer Autofokus. Daher sollte HEPES verwendet werden.
Inkubation	<ul style="list-style-type: none"> • 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Auf Grund einer schwächeren Signalintensität bei der Verwendung des Cellavista[®] Analysesystems gegenüber dem IMT-2 Mikroskop wird die Inkubationsdauer auf 30 Minuten erhöht.

7.2.1.2. Proteinbiosynthese

Ein weiterer an das automatisierte Zellkultursystem angepasster Assay dient dem nicht-radioaktiven Nachweis neu synthetisierter Proteine und liefert damit Informationen zur biosynthetischen Aktivität der Zellen. Durch die Inkubation der Zellkultur mit dem Aminosäureanalogon L-Azidohomoalanin (AHA) in Methionin-freiem Medium wird dieses in neu synthetisierte Proteine integriert. An das azide Ende des AHA bindet das alkine Ende

des eingesetzten Fluorochroms Alexa Fluor 488, welches grün fluoresziert. Zusätzlich werden in diesem Test alle Zellen mit Ethd-1 rot markiert, so dass für biosynthetisch aktive Zellen eine Gelb-Färbung resultiert [88].

7.2.1.3. Färbung und Detektion von Organellen

Im Rahmen seiner Diplomarbeit zeigt Carsten Musmann die Machbarkeit der Färbung und Detektion des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates, der Lysomen sowie des Zellkerns tierischer Zellkulturen [119]. Dazu passt er kommerziell erhältliche Testkits an das Mikrotiterplattenformat und die automatisierte Durchführung im automatisierten Zellkultursystem und die Analyse mit dem Cellavista[®] Analysesystem an. Eine Übersicht zu den entwickelten Assays ist in Tabelle 35 gegeben. Die Aufnahme der 49 (7x7) Bilder pro *well* erfolgt standardmäßig mit einem 40x Objektiv, welches die Verwendung von Glasbodenplatten erfordert. Das eingesetzte Probevolumen wird analog der Richtwerte der automatisierten Zellzählung (vergleiche Tabelle 34) gewählt. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Alle Reagenzien und Puffer werden dunkel bei +4 - 8 °C gelagert.

Tabelle 35: Übersicht zu den an das automatisierte Zellkultursystem angepassten Assays zur Färbung und Detektion von Organellen. Ex: Extinktion; Em:Emission.

Assay	Reagenzvolumen pro <i>well</i>	Zusammensetzung Reagenz	Puffervolumen pro <i>well</i>	(Ex/Em)
ER Tracker Green	1 µL	0,01 mM Stocklösung	100 µL (1 M HEPES)	505/550
ER ID Red	7 µL	Reagenzmix: 1 mL 1X Assay Puffer + 1 µL ER ID Red Reagenz*	80 µL (1X Assay Puffer)	620/665
Golgi ID Green	4 µL	Reagenzmix: 990 µL 1X Assay Puffer + 10µL 100X Golgi ID Green (50 pM)	80 µL (1X Assay Puffer)	470/500
ER ID Red + Golgi ID Green	7 µL 4 µL	ER-Reagenzmix + Golgi-Reagenzmix	80 µL (Gemisch aus 1X Assay Puffer ER ID Red und 1X Golgi-Puffer zu gleichen Teilen)	620/665 470/500
Lyso ID Green**	2 µL	Lyso ID Reagenz*	80 µL 1X Assay Puffer	470/500
Zellkern-Färbung	14 µL	Reagenzmix: 999 µL 10 mM HEPES + 1 µL Hoechst 33342*	80 µL (10 mM HEPES)	395/450

* keine Herstellerangabe zur Konzentration

** Testkit enthält außerdem eine Positivkontrolle (Chloroquin). Die zu färbende Probe muss mit 300 µM Chloroquin für 8 Stunden inkubiert werden.

Die kombinierte und simultane Durchführung des ER ID Red und des Golgi ID Green ermöglicht eine Einsparung an Material und führt zu einer zeitlichen Verkürzung des Assays um Faktor 2. Eine weitere Einsparung von Material kann durch das Spülen der Mikrotiterplatten mit Glasboden erreicht werden [119]. Hierzu wird ein Protokoll zum Entfernen sämtlicher Assay-Bestandteile entwickelt (vgl. Kap. 7.1.2.5.).

7.2.1.4. Färbung und Detektion apoptotischer Zellen

Ein weiterer Assay, den Carsten Musmann an das automatisierte Format des automatisierten Zellkultursystems und des Cellavista[®] Analysesystems angepasst hat, dient der Färbung und Detektion apoptotischer Zellen. Dazu verwendet er den Farbstoff Annexin-V-Alexa 568 zur Färbung apoptotischer und SYTOX[®] zur Färbung toter Zellen. Tabelle 36 gibt eine Übersicht zu den optimierten Parametern zur automatisierten Durchführung im automatisierten Zellkultursystem [119]. Auf Grund der Stabilität der Farbstoffe Annexin-V-Alexa568 und SYTOX[®] ist es möglich, die Mikrotiterplatte zur 30 minütigen Inkubation verschweißt (PlateLoc, Agilent Technologies) bei Raumtemperatur zu lagern.

Tabelle 36: Optimierte Parameter zur Durchführung der automatisierten Färbung und Detektion apoptotischer Zellen im automatisierten Zellkultursystem [119].

Parameter	Beschreibung
Annexin-V-Alexa568*	0,5 $\mu\text{L}/\text{well}$ Extinktion/Emission: 590/610nm
SYTOX [®]	Volumen: 1 μL (5 mM Stock) Extinktion/Emission: 470/500nm
Puffervolumen	100 μL Assay Puffer (10 mM HEPES; 140 nM NaCl; 5 mM CaCl ₂)
Objektiv	10x
Anzahl Bilder pro well	21
Mikrotiterplatte	96 well Polystyrol-Platte mit Flachboden (NUNC)

7.2.2. Absorptions-basierte Methoden

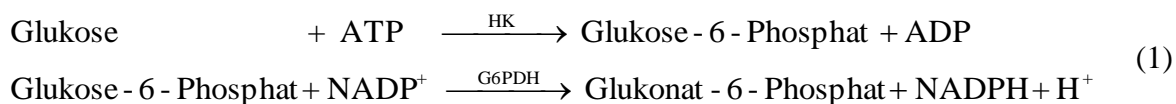
In dem Bereich Absorptions-basierter Methoden werden Assays zur Metabolitquantifizierung entwickelt. Dazu werden kommerzielle Testkits an das Mikrotiterplattenformat und die automatisierte Zellkulturplattform angepasst. Routinemäßig werden die Assays für die Quantifizierung von Glukose und Laktat eingesetzt, weitere Assays zum Nachweis von Glutamin, Glutamat, Ammonium, Laktatdehydrogenase (LDH) sowie ein Ein-Schritt-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zur Bestimmung der Antikörperkonzentration werden getestet [140]. Außerdem wird ein weiterer Test zur Antikörperquantifizierung über einen immunologischen Trübungstest entwickelt [119]. In dem folgenden Kapitel soll ein Überblick zu den verfügbaren Nachweismethoden gegeben sowie die Messprinzipien erläutert werden.

7.2.2.1. Enzymatische Metabolitquantifizierung

Enzymatische, kolorimetrische Methoden stellen robuste und reproduzierbare Techniken zur Quantifizierung dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Testkits der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland) sowie von Randox Life Sciences (Crumlin, United Kingdom) verwendet und an das automatisierbare Mikrotiterplattenformat angepasst. Zunächst werden die Reaktionsprinzipien der Assays dargestellt, die Durchführung ist in Tabelle 37 zusammengefasst.

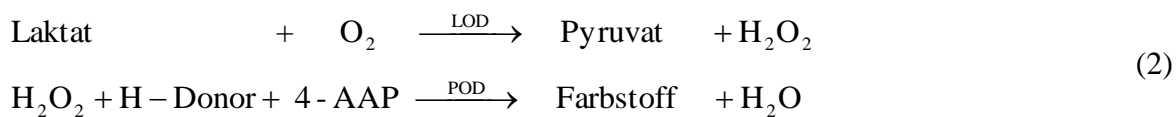
7.2.2.1.1. Glukose

Zum Nachweis der Glukose in den Zellkulturüberständen wird ein Testkit der Firma Roche Diagnostics GmbH (Bestellnummer: 04657527) verwendet. Das Testprinzip beruht auf einer Hexokinase (HK) -katalysierten Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat unter ATP-Verbrauch. Durch die anschließende Oxidation, katalysiert durch Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH), zu Glukonat-6-phosphat wird NADPH freigesetzt, welches bei 340 nm detektiert wird (Gleichung 1).



7.2.2.1.2. Laktat

Bei dem verwendeten Test zum Laktatnachweis (Roche Diagnostics GmbH, Bestellnummer 05401666) wird Laktat durch Laktatoxidase (LOD) zu Pyruvat oxidiert. Das entstandene H_2O_2 reagiert mit Peroxidase (POD) und 4-Aminoantipyrin (4-AAP), dabei dient das eingesetzte Toluol als Wasserstoffdonor und bedingt eine violette Farbentwicklung, die bei 550 nm gemessen wird (Gleichung 2).



7.2.2.1.3. Glutamin

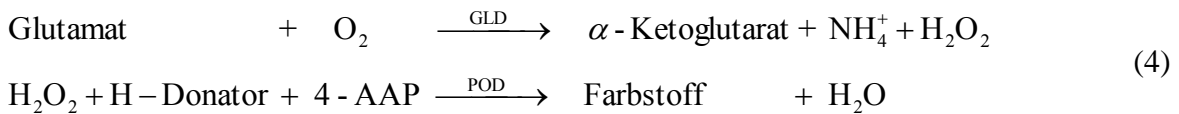
Die Bestimmung von Glutamin in Zellkulturüberständen erfolgt schrittweise mit einem Testkit von Randox Life Sciences (GM1373). Nach der Deaminierung von Glutamin zu Glutamat unter Freiwerden von Ammonium, katalysiert durch Glutaminase (GLS) (Gleichung 3), erfolgt die Umsetzung des gebildeten Glutamats zu α -Ketoglutarat unter Bildung des rot-violetten Quinonimin, welches bei 550 nm gemessen wird (vgl. Glutmat-Assay, Gleichung 4).

Bei der Verwendung Glutamat-haltiger Medien in der Zellkultur ist es erforderlich, vor Beginn des Assays das vorhandene Glutamat abzubauen um Störeffekte zu vermeiden.



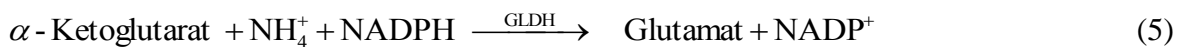
7.2.2.1.4. Glutamat

Bei dem Nachweis von Glutamat mit dem Testkit GM1372 von Randox Life Sciences wird vorhandenes Glutamat durch Glutamatoxidase (GLD) zu α -Ketoglutarat und H_2O_2 umgesetzt. Anschließend erfolgt die Bildung des rot-violetten Quinonimins, welches bei 550 nm gemessen wird (Gleichung 4).



7.2.2.1.5. Ammonium

Bei der Verwendung des Ammonium-Testkits AM 1015 von Randox Life Sciences oxidiert die Glutamatdehydrogenase (GLDH) NADPH und setzt α -Ketoglutarat und Ammonium zu Glutamat um. Die Abnahme der NADPH-Konzentration ist proportional zum vorhandenen Ammonium und wird bei 340 nm gemessen (Gleichung 5).



7.2.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für den Nachweis von Antikörpern wird ein Ein-Schritt-ELISA der Forschungsabteilung der Roche Diagnostics GmbH an das 96 well Mikrotiterplattenformat angepasst. In Abbildung 64 ist der schematische Aufbau dieses Assays dargestellt.

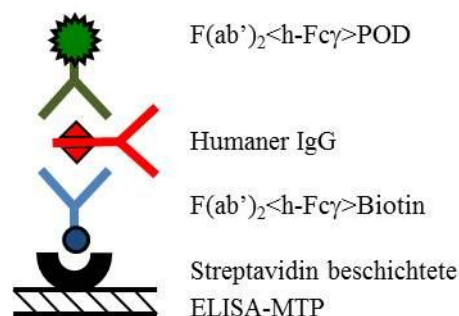


Abbildung 64: Schematische Darstellung des Ein-Schritt-ELISA.

Dieser Sandwich-ELISA wird mit zwei $\text{Fc}\gamma$ -spezifischen Nachweis-Antikörpern (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) durchgeführt. Der biotinylierte Fänger-Antikörper

(fAK) sowie der POD-funktionalisierte Detektions-Antikörper (dAK) werden auf einer Streptavidin-beschichteten Platte mit dem Antikörper-haltigen Zellkulturüberstand eingeschweißt (Alps300™, ABgene®, Langenselbold, Deutschland) und auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Variomag Teleshake, Inheco, Martinsried, Deutschland) inkubiert. Nach Bindung des Antikörper-Komplexes an die Mikrotiterplatte erfolgt nach einem Waschschrift die Zugabe des Nachweissubstrates 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfon-säure) (ABTS, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland). Nach enzymatischer Umsetzung durch POD kann das grüne Reaktionsprodukt bei 405 nm gemessen werden. Abbildung 65 zeigt das Ablaufschema des Assays.

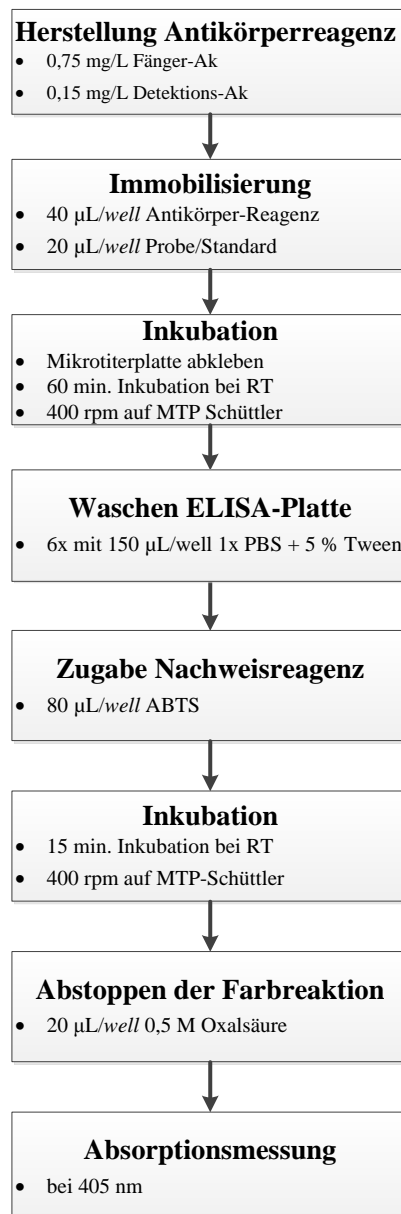


Abbildung 65: Ablaufschema des ELISA zur Bestimmung der Antikörperkonzentration. MTP: Mikrotiterplatte; min.: Minuten; RT: Raumtemperatur.

7.2.2.3. Turbidimetrischer Immunoassay

Bei der Turbidimetrie wird die Abschwächung des Lichtes gemessen, welches durch eine Partikel-haltige Suspension gestrahlt wird. Diese Abschwächung resultiert aus der Absorption, Reflektion und Streuung [145]. Der verwendete Test der Roche Diagnostics GmbH beinhaltet einen Latexpartikel gebundenen anti-IgG-Antikörper, der an die Fc-Domäne des nachzuweisenden Antikörpers bindet (Fc_γ-spezifisch). Das in dem Reagenz enthaltene Polyethylenglykol (PEG) beschleunigt die Bildung von Antikörper-Komplexen und erhöht die Sensitivität des Tests. Die gebildeten Komplexe werden nach der Agglutination turbidimetrisch bei 340 nm gemessen. Durch die Verwendung dieses Tests kann die Gesamtdauer des Nachweises gegenüber einem ELISA deutlich gesenkt werden [119].

7.2.3. Übersicht zur Durchführung der entwickelten Assays

Mit der Entwicklung und der Verfügbarkeit der in diesem Kapitel beschriebenen Assays steht für die Kultivierungen in dem automatisierten Zellkultursystem eine große Auswahl prozessbegleitender analytischer Methoden zur Verfügung. Diese sind in den vollständig automatisierten Prozess integriert und können in Abhängigkeit der gewünschten Analytik selektiv ausgewählt werden. Eine Zusammenfassung relevanter Parameter der Absorptions-basierten analytischen Methoden ist in Tabelle 37 dargestellt. Die Lagerung sämtlicher verwendeter Reagenzien während eines Experimentes erfolgt dunkel bei +4 °C.

Tabelle 37: Absorptions-basierte Assays, die mit dem automatisierten Zellkultursystem voll automatisch durchgeführt werden können. Oxals., Oxalsäure; R1, Reagenz 1; R2, Reagenz 2. Die Inkubation erfolgt auf einem Mikrotiterplattenschüttler.

Metabolit; Assay	Probevolumen [μL]	Verdünnung	Messbereich [mg/L]	Reagenzien [μL]	Wellenlänge [nm]	Inkubation [min]
Glukose	22 μL	1:20	200-14.000	R1: 150	340	5
		1:40	400-28.000	R2: 30		
Laktat	22 μL	1:20	100-3.000	R1: 125	550	5
		1:40	200-6.000	R2: 25		
Glutamin	10 μL	1:5	20-1.500	R1: 80 R2: 40	550	15
Glutamat	10 μL	1:5	20-1.500	R1: 140 R2: 50	550	5
Ammonium	22 μL	1:20	10-250	R1: 40	340	10
		1:40	20-500	R2: 20		
LDH	4 μL	1:5	10-3.500 U/L	R1: 180	340	15
				R2: 72		Kinetik
ELISA	20 μL	1:10.000	0,25-2 AU	Ak: 40	405	60
		1:40.000	0,25-10 AU	ABTS: 80 Oxals.: 20		15
TIA	20 μL	1:5	150-2500	R1: 125 μL R2: 40 μL	340	5
		1:10	300-5000			
		1:20	600-10.000			

Die Vergleichbarkeit von kommerziellen und eigens hergestellten Standardlösungen für Glukose und Laktat zur Kalibration der Assays kann bestätigt werden [140]. Daher wird für die im Routinebetrieb des automatisierten Zellkultursystems durchgeführten Assays für Glukose und Laktat eine eigene Standard-Lösung hergestellt. Die Zusammensetzung dieser sowie der kommerziellen Lösungen für die Nachweise von Glutamin, Glutamat, Ammonium und LDH sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Die Verwendung des jeweiligen Standards richtet sich nach Art der gewünschten Analytik. Wird beispielsweise nur die Konzentration von Glukose und Laktat benötigt, wird ein eigens hergestellter Standard verwendet, während bei Messung von Glukose, Laktat, Glutamat und Ammonium ein Multicalibrator der Firma Randox zum Einsatz kommt. Auf Grund der Instabilität von Glutamin [146] muss für den Nachweis dieses Analyten ein gesonderter Standard verwendet werden.

Tabelle 38: Verwendete Standard-Lösungen zur internen Kalibration der Absorptions-basierten Assays.

Assay	Bezeichnung/Hersteller	Zusammensetzung
Glukose; Laktat	Eigene Einwaage in 1x PBS	Glukose: 700 mg/L Laktat: 150 mg/L
Glukose, Laktat, Glutamat, Ammonium	Multicalibrator (cal M) Randox MC 1382	Glukose: 2590 mg/L Laktat: 395 mg/L Glutamat: 296 mg/L Ammonium: 4,5 mg/L
Glutamin	Glutamine Calibrator (GLN CAL 1) Randox GM1375	Glutamin: 313 mg/L
Turbidimetrie (IgG)	Interner IgG Standard des jeweiligen Produktes	Keine Angabe

7.2.4. Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen der Diplomarbeit von Swetlana Spielmann [128] wird eine Methode zur Reverse Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) für den Hochdurchsatz entwickelt um die Genexpression von Zellkulturen zu charakterisieren. Die Arbeit umfasst die Identifizierung und Etablierung eines Referenzgens zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse sowie die Erarbeitung der Grundlagen zur Implementierung dieser Technik in dem automatisierten Zellkultursystem. Die Funktionalität und damit die Grundlage zur Integration wird anhand eines Experiments der vorliegenden Arbeit bewiesen (vgl. Kap. 5.3.2.).

7.2.4.1. Isolierung von Ribonukleinsäure zur Implementierung in das automatisierte Zellkultursystem

Die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) stellt einen zentralen Schritt bei der Charakterisierung von Genexpressionsprofilen dar. Neben der automatisierten Isolierung mit dem MagNAPure LC 2.0 System der Roche Diagnostics GmbH wird das RealTime ready

Cell Lysis Kit der Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland) zur Vereinfachung der Durchführung getestet. Sämtliche Schritte zur Isolierung der RNA können in dem automatisierten Zellkultursystem durchgeführt werden:

Vorbereitung:

1. Herstellung einer 1:3 Verdünnung von Zellsuspension mit bekannter Zellkonzentration und kaltem (4°C) 1x PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei pH-Wert 7,2.
2. Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 x g.
3. Entfernen des Zellkulturüberstands und Einfrieren des Zellpellets bei -80°C.

Lagerung der Proben auf Trockeneis vor **Lyse der Zellen:**

4. Herstellung des Lysis-Puffers aus 39,5 µL RealTime ready Lysis Buffer und 0,5 µL Protector RNase Inhibitor unmittelbar vor Lyse.
5. Zugabe des benötigten Lysis-Puffer Volumens, um eine Zellkonzentration von 10^5 Zellen/40 µL Lysis-Puffer zu erreichen.
6. Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Eine anschließende Lagerung ist möglich für maximal zwei Tage bei +2 °C bis +8 °C oder mehrere Monate bei -15 °C bis -18 °C.
7. Beginn der *complementary* DNA-Synthese (vgl. Kap. 7.2.4.2.) unmittelbar nach der Präparation bzw. dem Auftauen der Proben.

7.2.4.2. Synthese von complementary DNA

Der Einsatz von RNA in der PCR erfordert die Umschreibung der RNA in *complementary* DNA (cDNA). Dazu wird das Transkriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Roche Diagnostics GmbH zusammen mit Random-Hexamer-Primern eingesetzt. Tabelle 39 fasst das Pipettierschema des Master Mix zur cDNA Synthese mit anschließender Zugabe von Zelllysat zusammen.

Tabelle 39: Pipettierschema des Master Mix für die cDNA Synthese mit der anschließenden Zugabe von Zelllysats [128].

Komponente	Volumen [μL]
Wasser, PCR grade	8,5
Random Hexamer Primer 600 μ M	2,0
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ μ L	0,5
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc.	4
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	2
Thermolabile DNase	0,5
Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/ μ L	0,5
Master Mix	18
Zelllysats	2
Endvolumen	20

Anschließend erfolgt die Inkubation der Ansätze in einem Thermo Cycler (MJ Research PTC-200 Thermo Cycler) nach dem in Tabelle 40 dargestellten Schema. Nach erfolgter Inkubation wird die cDNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und ohne vorherige Reinigung der RT-qPCR zugeführt.

Tabelle 40: Inkubationsschema zur cDNA Synthese [128]

Temperatur [$^{\circ}$C]	Inkubation [min]
29	10
55	25
85	5

7.2.4.3. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Zur Messung der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) in 96 well Mikrotiterplatten (LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96, Roche Diagnostics GmbH) wird ein LightCycler[®] 480 Instrument (Roche Diagnostics GmbH) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der LightCycler[®] Software release 1.5.0 (Roche Diagnostics GmbH). Zur Detektion der Amplifikate werden *hydrolysis probes* eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (Universal Probe Library, Roche Diagnostics GmbH) gekoppelt sind. In Tabelle 41 ist das Pipettierschema zur Vorbereitung des LightCycler[®] 480 Probes Master Mix und der Zugabe von cDNA dargestellt.

Tabelle 41: Herstellungsschema für den LightCycler® 480 Probes Master Mix mit einem Gesamtvolumen von 15 µL. Die anschließende Zugabe von 5 µL verdünnter cDNA-Lösung ergibt ein Gesamtvolumen von 20 µL pro well in der Mikrotiterplatte. [128].

Komponente	Volumen [µL]
LightCycler® 480 Probes Master, 2 x conc.	10
Primermix (forward + reverse each 20 µM)	0,4
Hydrolysis probe 10 µM	0,4
Wasser, PCR grade	4,2
MasterMix	15
Zugabe von cDNA, 1:10 mit Wasser, PCR grade, verdünnt	5
Gesamtvolumen pro well in der Mikrotiterplatte	20

Das verwendete Programm des LightCycler® 480 Instruments setzt sich aus drei Teilprogrammen zusammen und ist in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Teilprogramme des verwendeten Standard-Programms zur Amplifikation [128].

	Teilprogramm	Anzahl Zyklen	Analyse Modus
(1)	Pre-Incubation	1	None
(2)	Amplification	45	Quantification
(3)	Cooling	1	None

Die Details zu den einzelnen Teilprogrammen sind in Tabelle 43a-c zusammengefasst.

Tabelle 43a: Zusammenfassung der Parameter für das Teilprogramm Pre-Incubation [128].

Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisitions [per °C]	Sec Target [°C]	Step Size	Step Delay
95	None	00:10:00	4,40	-	95	0	0

Tabelle 44b: Zusammenfassung der Parameter für das Teilprogramm Amplification [128].

Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisitions [per °C]	Sec Target [°C]	Step Size	Step Delay
95	None	00:00:10	4,40	-	0	0	0
55	None	00:00:20	2,20	-	0	0	0
72	Single	00:00:10	4,40	-	0	0	0

Tabelle 45c: Zusammenfassung der Parameter für das Teilprogramm Cooling [128].

Target [°C]	Acquisition Mode	Hold [hh:mm:ss]	Ramp Rate [°C/s]	Acquisitions [per °C]	Sec Target [°C]	Step Size	Step Delay
40	None	00:00:10	2,20	-	0	0	0

7.2.5. Netzwerk zu anderen Hochdurchsatz-Systemen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein Netzwerk zu Hochdurchsatz-Systemen der Analytik-Abteilung der Roche Diagnostics GmbH etabliert. Als Übergabeformat wird eine 96 well Mikrotiterplatte definiert. Die Probenvorbereitung wird zum Teil mit dem automatisierten Zellkultursystem durchgeführt. Durch Nutzung dieses Netzwerkes stehen analytische Methoden zur Bestimmung der Antikörperkonzentration sowie des Antikörper-Glykosylierungsmusters zur Verfügung. In dem folgenden Kapitel sollen diese im Routinebetrieb genutzten Methoden erläutert werden.

7.2.5.1. Konzentrationsbestimmung von Antikörpern durch Interferometrie

Das Octet-System der Firma FortéBio (Menlo Park, USA) stellt ein Hochdurchsatz-System zur Messung biomolekularer Interaktionen durch Nutzung der Interferometrie (Überlagerung von Wellen) dar. Bei dieser optischen Messtechnik wird das Interferenzmuster von weißem Licht analysiert, welches von zwei Oberflächen reflektiert wird (interne Referenzschicht und Schicht aus immobilisierten Proteinen auf dem Biosensor). Es werden ProteinA-beschichtete Biosensoren verwendet, die in eine Antikörper-haltige Probe eingetaucht werden. Auf Grund der Bindung von Antikörpern an die Biosensoren wird das Interferenzmuster messbar verändert und verursacht einen Wellenlängen-*Shift*. Dieser stellt ein direktes Maß für die Änderung der Dicke der biologischen Schicht und somit für die Antikörperkonzentration dar (Abbildung 66).

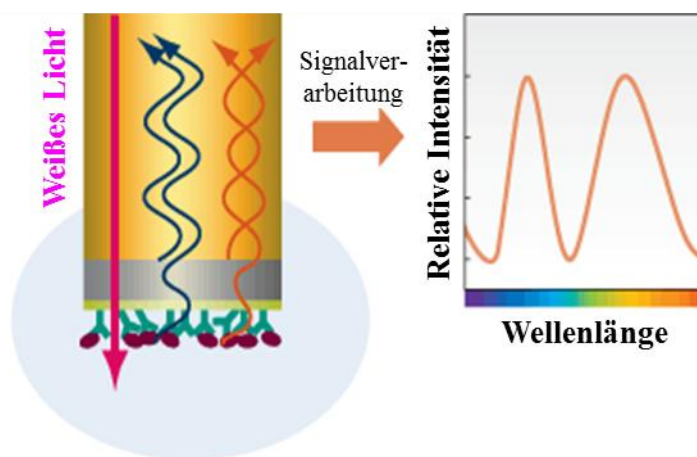


Abbildung 66: Messprinzip des Octet-Systems (FortéBio, Menlo Park, USA). Einfallendes weißes Licht wird von einer internen Referenzschicht sowie einer Schicht aus ProteinA-beschichteten Biosensoren reflektiert. Bei der Bindung von Antikörpern an die Biosensoren wird ein messbarer Wellenlängen-*Shift* verursacht, der proportional zu der Antikörperkonzentration in der gemessenen Probe ist.

Die Schnittstelle zu diesem Analysesystem wird wie folgt definiert:

- Probenvorbereitung mit dem automatisierten Zellkultursystem.
- Transfer einer versiegelten Platte zur Analytik-Abteilung.
- Übermittlung der Messdaten in einem Microsoft Excel-Datenblatt von der Analytik-Abteilung.

Die Probenvorbereitung sieht eine Zentrifugation zur Abtrennung von Zellbestandteilen (10 Minuten bei 210 x g) sowie eine Verdünnung der Probe entsprechend des nachweisbaren Bereichs von 1 bis 1000 mg/L vor. Entsprechend dieses Bereichs wird die Probe in der Messplatte (Greiner Bio-One) mit einem Puffer (0,1% BSA in 1x PBS) mit einem Gesamtvolumen von 200 µL/*well* verdünnt und anschließend versiegelt (Laborbedarf von Lueder GmbH, Crailsheim, Deutschland). Nach erfolgter Messung in der Analytikabteilung werden die Daten in einer Excel-Datei transferiert.

7.2.5.2. Detektion und Quantifizierung von Glykanstrukturen

Die automatisierte Detektion und Quantifizierung von Glykanstrukturen erfolgt in der Analytikabteilung durch Nutzung von chromatographischen und massenspektrometrischen Techniken. Der gesamte Ablauf erfolgt auf der Basis von 96 *well* Mikrotiterplatten und kann in vier Abschnitte unterteilt werden (Abbildung 67).

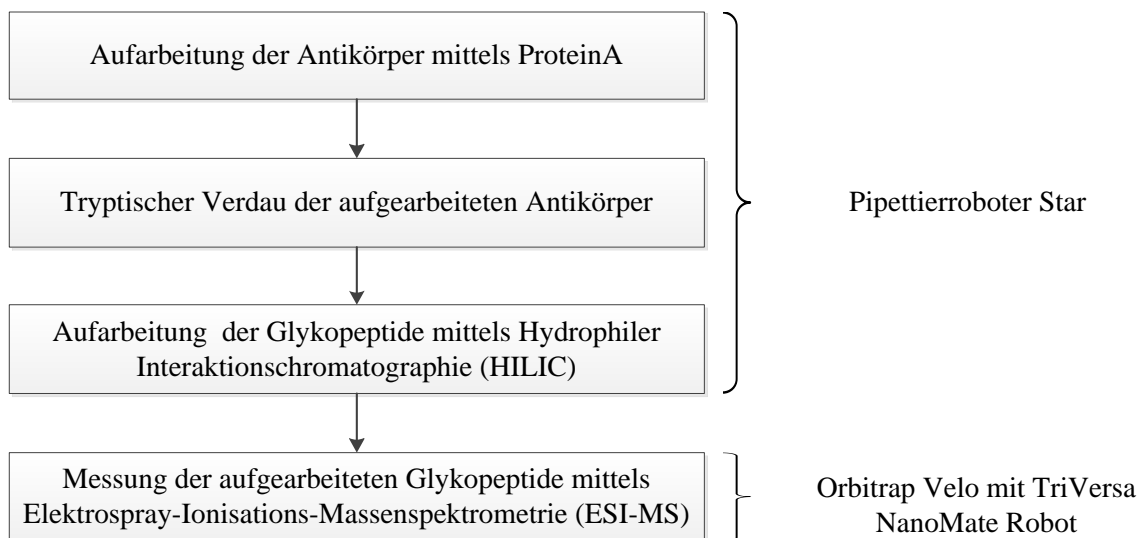


Abbildung 67: Ablauf der Detektion und Quantifizierung von Glykanstrukturen der aufgearbeiteten Glykopeptide mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie. Die vorbereitenden Schritte erfolgen auf dem Pipettierroboter Star (Hamilton), die Messung erfolgt mit dem Massenspektrometer Orbitrap Velo (Thermo Scientific), ausgestattet mit dem Injektor TriVersa NanoMate Robot (Advion).

Die Schnittstelle zu diesem Analysesystem wird wie folgt definiert:

- Proben werden mit dem automatisierten Zellkultursystem auf 96 well Rundbodenplatten (BD Falcon™) vorgelegt. Es wird eine Mindestmenge von 10 µg Antikörper benötigt.
- Verschweißen der Mikrotiterplatte mit einem *Heat Sealer*.
- Transfer der versiegelten Mikrotiterplatte zur Analytik-Abteilung.
- Übermittlung der Messdaten in einem Microsoft Excel-Datenblatt von der Analytikabteilung.

7.3. Verwendete Software

Tabelle 46: Übersicht verwendeter Software.

Hersteller/Name der Software	Funktion
Agilent VWorks Automation Control V. 11.1.0.1104	Steuerung/ <i>Scheduling</i> des Produktivsystems
Xiril Lirix 2 und 3	Steuerung der X150 Workstation
Beckman Coulter Biomek® Software V.3.3	Steuerung der Biomek® NXP Pipettierstation
Tecan Magellan V.6.0	Steuerung des Sunrise™ und Auswertung der Messergebnisse
Tecan iconcontrol V. 1.8	Steuerung des Infinite® M200 PRO
Roche Cellavista® Instrumentation Control and Evaluation Application V.1.1.0.3	Steuerung des Cellavista® Analysesystems und Auswertung der Messergebnisse
Tecan XFluor4	Steuerung des Sunrise™ Mikrotiterplattenlesers; Erstellung von <i>Parameter-Files</i> zur Integration in die VWorks Automation Control
Media Cybernetics, Inc. Image-Pro Plus V.7.0.1	Bildverarbeitungssoftware für das Fluoreszenzmikroskop IMT-2
Presens SDR_v37	Steuerung des Sensor Dish Readers

7.4. Verwendete Materialien

Tabelle 47: Übersicht verwendeter Materialien.

Beschreibung	System	Hersteller/Material	
Pipettenspitzen für <i>Liquid Handler</i>	X-150 (Xiril)	Rainin (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) sterile Spitzen 250 µL: RT-250S 1000 µL: RT-1000S	
	Biomek [®] NXP (Beckman Coulter)	Axygen Biosciences (Union City, USA) 20 mL: FX-20-R (301-26-101) 250 µL: FX-250-R (301-27-101) Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) Biomek[®] AP96 unsterile Spitzen 20 µL: AP96P20 (717254) 250 µL: AP96P250 (717251)	
	Bravo (Agilent Technologies)	250 µL Spitzen steril (19477-012) 250 µL Spitzen unsteril (19477-002)	
Mikrotiterplatten	Zellkultivierung		
	6 well	Corning Costar <i>not treated</i> (3736)	
		Corning Costar <i>TC treated</i> (3516)	
		Corning Costar <i>6well ultra low attachment</i> (3471)	
	24 well	Porvair 24 <i>deepwell</i> PP (360080)	
		Greiner bio-one, 24 well flach Cellstar, TC-Platte <i>sterile with lid</i> (662-160)	
	sonstige	Greiner bio-one, 12 well flach Cellstar, TC-Platte <i>sterile with lid</i> (665-180)	
		Corning Costar 48 well <i>clear TC-treated</i> (3548)	
	Probenahmeplatte		BD Falcon™ 96well U-Bottom <i>without lid</i> , Polystyrene, <i>nonsterile</i> (18266)
	Assays		
▪ Zelldichtebestimmung ▪ Konzentrationsbestimmung Glukose und Laktat ▪ Turbidimetrischer Immunoassay		Nunc 96F <i>untreated</i> (732-2717)	
	Organellendetektion	Greiner Bio-one Glasbodenplatte (655892)	
	Octet-Platte	Greiner bio-one PP <i>Microplate black</i> , 96 well, F <i>shape</i> (655209)	
ESI-MS Vorlage	BD Falcon™ 96well U-Bottom <i>without lid</i> , Polystyrene, <i>nonsterile</i> (18266)		
Lagerung	Einfrieren von Proben		
		Nunc 96 <i>deepwell</i> PP <i>plate natural</i> (260252)	
		BD Falcon™ 96well U-Bottom <i>without lid</i> , Polystyrene, <i>nonsterile</i> (18266)	
Reservoirs	Reagenzien-Vorlage für Zelldichtebestimmung	Eppendorf Microplate 96/V, <i>black well</i> , PCR <i>clean</i> (951040260)	
	Vorlage Zufütterlösung	Porvair 4-fach Reservoir (390107)	
sonstiges	Folie für Octet-Platten	Laborbedarf von Lueder GmbH, Crailsheim, Deutschland (F100)	
	Folie für PlateLoc	Agilent, Aluminium, <i>piercable</i> (06644-001)	
	Folie für Alps300	ABgene, Aluminium <i>piercable</i> (AB-3738)	

8. Literaturverzeichnis

- [1] Chen A, Chitta R, Chang D, Amanullah A. Twenty-four well plate miniature bioreactor system as a scale-down model for cell culture process development. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Jan 1;102(1):148-60.
- [2] Maggon, Krishan. New Drug Approvals FDA 2011: New drugs in the US market [Internet]. Version 405. Knol. 2012 Feb 2. Available from: <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/new-drug-approvals-fda-011/3fy5eowy8suq3/148>.
- [3] <http://www.antibodysociety.org>. letzter Zugriff am 16.11. 2011
- [4] Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010 Sep-Oct;2(5):466-79.
- [5] Lye GJ, Ayazi-Shamlou P, Baganz F, Dalby PA, Woodley JM. Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques. *Trends Biotechnol.* 2003 Jan;21(1):29-37.
- [6] Kempner, ME.; Felder, RA. A review of cell culture automation. *JALA* 2002, 7(2), 56–62.
- [7] Kelley B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs.* 2009 Sep-Oct;1(5):443-52.
- [8] Horvath B, Mun M, Laird MW. Characterization of a monoclonal antibody cell culture production process using a quality by design approach. *Mol Biotechnol.* 2010 Jul;45(3):203-6.
- [9] Terstegge S, Laufenberg I, Pochert J, Schenk S, Itskovitz-Eldor J, Endl E, Brüstle O. Automated maintenance of embryonic stem cell cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Jan 1;96(1):195-201.
- [10] Thomas RJ, Anderson D, Chandra A, Smith NM, Young LE, Williams D, Denning C. Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Apr 15;102(6):1636-44.
- [11] Thomas R, Ratcliffe E. Automated adherent human cell culture (mesenchymal stem cells). *Methods Mol Biol.* 2012;806:393-406.
- [12] Thomas RJ, Hope AD, Hourd P, Baradez M, Miljan EA, Sinden JD, Williams DJ. Automated, serum-free production of CTX0E03: a therapeutic clinical grade human neural stem cell line. *Biotechnol Lett.* 2009 Aug;31(8):1167-72.
- [13] Joannides A, Fiore-Hériché C, Westmore K, Caldwell M, Compston A, Allen N, Chandran S. Automated mechanical passaging: a novel and efficient method for human embryonic stem cell expansion. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):230-5.

- [14] Sherman SP, Alva JA, Thakore-Shah K, Pyle AD. Human pluripotent stem cells: the development of high-content screening strategies. *Methods Mol Biol.* 2011;767:283-95.
- [15] Jain S, Sondervan D, Rizzu P, Bochdanovits Z, Caminada D, Heutink P. The complete automation of cell culture: improvements for high-throughput and high-content screening. *J Biomol Screen.* 2011 Sep;16(8):932-9.
- [16] Hallborn J, Carlsson R. Automated screening procedure for high-throughput generation of antibody fragments. *Biotechniques.* 2002 Dec;Suppl:30-7.
- [17] Browne SM, Al-Rubeai M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* 2007 Sep;25(9):425-32. Epub 2007 Jul 30.
- [18] Clark I, Lim H, Hoehenstein K, Bright G. Accelerated High Secretion Cell Line Development. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, November 1, 2008.
- [19] Salmen A, Lindgren K, Bylund L, Gelius G, Fenge C, Skoging-Nyberg U. Efficient Development of Stable High-Titer Cell Lines for Biopharmaceutical Manufacturing. *BioProcess International* December 2009.
- [20] Betts, J.I. and F. Baganz, Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, 2006. 5(21).
- [21] Cohen S, Trinka RF. Fully automated screening systems. *Methods Mol. Biol.* 2002, 190:213-228.
- [22] Zimmermann HF. Dissertation Fakultät für Informatik und Elektrotechnik , Universität Rostock: Entwicklung der Hochdurchsatzfermentation : „Bestimmung der bioverfahrenstechnischen Anforderungen und Implementierung der Laborautomation“, 2005
- [23] Carson KL. Flexibility--the guiding principle for antibody manufacturing. *Nat Biotechnol.* 2005 Sep; 23(9):1054-8.
- [24] Takatsy G, Kiserl. A new method for the preparation of serial dilutions in a quick and accurate way. *Orvostud* 2, 393 (1950).
- [25] Sever JL. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *L Immunol.* 1962; 88:320-329.
- [26] Witlin B. Detection of antibodies my microtimator techniques. *Mycopathologia* Vol. 33, No. 3-4, 241-257.
- [27] Sullivan EJ, Rosenbaum MJ. Methods for preparing tissue culture in disposable microplates and their use in virology. *J. Epidemiol.* (1967) 85 (3): 425-437.
- [28] Hernandez-Baumgarten EM. Miniature Tissue Culture Technique with a Modified Plastic Microplate. *Appl Microbiol.* 1972 December; 24(6): 999–1000.

- [29] Ruitenbergh EJ et al.. Direct measurement of microplates and its application to enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1976 May;3(5):541-2.
- [30] <http://www.starlab.de>. Letzter Zugriff am 06.01.2012
- [31] Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol.* 2007 Sep;152(1):53-61.
- [32] Harris SR, Garlick RK, Miller JJ Jr, Harney HN, Monroe PJ. Complement C5a receptor assay for high throughput screening. *J Recept Res.* 1991;11(1-4):115-28.
- [33] Mayr LM, Bojanic D. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Oct;9(5):580-8. Epub 2009 Sep 21. Novel trends in high-throughput screening.
- [34] Astle TW. *Journal of the association of laboratory automation.* 2000, 5(6):30-31. Recollections of early microplate automation.
- [35] Funke M, Diederichs S, Kensy F, Müller C, Büchs J. The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Aug 15;103(6):1118-28.
- [36] Duetz WA. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends Microbiol.* 2007 Oct;15(10):469-75.
- [37] Kumar S et al. Minibioreactors. *Biotechnol Lett.* 2004 Jan;26(1):1-10.
- [38] Hermann R, Lehmann M, Büchs J. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Jan 20;81(2):178-86.
- [39] Hermann R, Walther N, Maier U, Büchs J. Optical method for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. *Biotechnol Bioeng.* 2001 Sep 5;74(5):355-63.
- [40] Weiss S, John GT, Klimant I, Heinzle E. Modeling of mixing in 96-well microplates observed with fluorescence indicators. *Biotechnol Prog.* 2002 Jul-Aug;18(4):821-30.
- [41] Büchs J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J.* 2001 Mar;7(2):91-98.
- [42] Jänicke G, Sauter C, Bux R, Haas J. Characterisation of shake flasks for cultivation of animal cell cultures. In: Smith R, editor. *Cell Technology for Cell Products, Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, June 5-8, 2005.* The Netherlands, Springer; 2007.
- [43] Thomas D, Ward T, Drake R, Hollway R, Savage D, Owen S: A Novel Automated Approach to Enabling High-Throughput Cell Line Development, Selection, and Other Cell Culture Tasks Performed in Erlenmeyer (Shake) Flasks. *J Assoc Lab Autom.* 2008; 13:145-151.
- [44] <http://www.FisherScientific.com>. Letzter Zugriff am 20.12.2011

- [45] <http://www.sartorius-stedim.com>. Letzter Zugriff am 10.01.2012
- [46] De Jesus M, Girard P, Bourgeois M, Baumgartner G, Jacko B, Amstutz H, Wurm FM. TubeSpin satellites: a fast track approach for process development with animal cells using shaking technology. 2004 *Biochem Eng J* 17:217–223.
- [47] Strnad J, Brinc M, Spudić V, Jelnikar N, Mirnik L, Carman B, Kravanja Z. Optimization of cultivation conditions in spin tubes for Chinese hamster ovary cells producing erythropoietin and the comparison of glycosylation patterns in different cultivation vessels. *Biotechnol Prog.* 2010 May-Jun;26(3):653-63.
- [48] Stettler M, Zhang X, Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs. *Biotechnol Prog.* 2007 Nov-Dec;23(6):1340-6.
- [49] Xie Q, Michel PO, Baldi L, Hacker DL, Zhang X, Wurm FM. TubeSpin bioreactor 50 for the high-density cultivation of Sf-9 insect cells in suspension. *Biotechnol Lett.* 2011 May;33(5):897-902.
- [50] Diao J, Young L, Zhou P, Shuler ML. An actively mixed mini-bioreactor for protein production from suspended animal cells. *Biotechnol Bioeng.* 2008 May 1;100(1):72-81.
- [51] Cheung L, Hu J, Luo S, Bevilacqua C, and Gawlitzek M. Developing an Automated High-Throughput System for Cell Culture Process Development. Presented at BioProcess International Conference, September 2008, Anaheim, CA.
- [52] Vallejos JR, Kostov Y, Ram A, French JA, Marten MR, Rao G. Optical analysis of liquid mixing in a minibioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Apr 5;93(5):906-11.
- [53] Tang YJ, Laidlaw D, Gani K, Keasling JD. Evaluation of the effects of various culture conditions on Cr(VI) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a novel high-throughput mini-bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2006 Sep 5;95(1):176-84.
- [54] Krommenhoek EE, van Leeuwen M, Gardeniers H, van Gulik WM, van den Berg A, Li X, Ottens M, van der Wielen LA, Heijnen JJ. Lab-scale fermentation tests of microchip with integrated electrochemical sensors for pH, temperature, dissolved oxygen and viable biomass concentration. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Mar 1;99(4):884-92.
- [55] <http://www.2mag.de>. Letzter Zugriff am 12.12.2011
- [56] Bareither R, Pollard D. A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnol Prog.* 2011 Jan-Feb;27(1):2-14.
- [57] <http://www.biospectra.ch>. Letzter Zugriff am 12.12.2011

- [58] Sellick, C.A., et al., Optimizing CHO Cell Culture Conditions. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 2009: p. 56-57.
- [59] http://www.ninolab.se/fileadmin/Ninolab/pdf/applikon/appk_leaflet_micro24.pdf. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [60] http://forschung.ti.bfh.ch/fileadmin/x_forschung/forschung.ti.bfh.ch/Drucktechnologie/flyer/flyerMiflyerMikrobio.pdf. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [61] Lewis G, Lugg R, Lee K, Wales R. Novel Automated Micro-Scale Bioreactor Technology: A Qualitative and Quantitative Mimic for Early Process Development. *Bioprocessing Journal*, 2010. 9(1): p. 22-25
- [62] <http://www.tapbiosystems.com/a/micro-bioreactor-gp.htm>. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [63] Amanullah A, Otero JM, Mikola M, Hsu A, Zhang J, Aunins J, Schreyer HB, Hope JA, Russo AP. Novel micro-bioreactor high throughput technology for cell culture process development: Reproducibility and scalability assessment of fed-batch CHO cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2010 May 1;106(1):57-67.
- [64] Legmann R, Schreyer HB, Combs RG, McCormick EL, Russo AP, Rodgers ST. A predictive high-throughput scale-down model of monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2009 Dec 15;104(6):1107-20.
- [65] <http://www.seahorsebio.com>. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [66] Harms, P. SimCell update from a user's perspective. Conference presentation at 2nd Annual European Cell Line Development and Engineering Conference, March 2007.
- [67] Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng*. 2005 Mar 5;89(5):512-23.
- [68] Puskeiler R, Kusterer A, John GT, Weuster-Botz D. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 2005 Dec;42(Pt 3):227-35.
- [69] Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2005 Nov;28(2):109-19.
- [70] Harms P, Kostov Y, French JA, Soliman M, Anjanappa M, Ram A, Rao G. Design and performance of a 24-station high throughput microbioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Jan 5;93(1):6-13.

- [71] Lamping, SR, Zhang H, Allen B, Ayazi Shamlou P. Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chemical Engineering*. 2003 *Science* (58): 747-58.
- [72] Aldridge S. Solutions for Automating a Cell Culture Process. *Gen. Eng. Biotechnol. News* 1 Mar 2008:26-27.
- [73] Gryseels T. Considering Cell Culture Automation in Upstream Bioprocess Development. *BioProcessInternational* Dec 2008:12-16.
- [74] Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochem Eng J*. 2001 Mar;7(2):163-170.
- [75] Akgün A, Maier B, Preis D, Roth B, Klingelhöfer R, Büchs J. A novel parallel shaken bioreactor system for continuous operation. *Biotechnol Prog*. 2004 Nov-Dec;20(6):1718-24.
- [76] Klinger C, Baumann S, Puskeiler R, Jockwer A. Development of a Partly Controllable System at Shake Flask Scale. Application Note PreSens Precision Sensing GmbH. Letzter Zugriff auf <http://www.presens.de/> am 19.11.2011.
- [77] Hegde S, Pant T, Pradhan K, Badiger M, Gadgil M. Controlled Release of Nutrients to Mammalian Cells Cultured in Shake Flasks. *Biotechnol. Prog.*, 2011, Vol. 00, No. 00 DOI 10.1002/btpr.729. Published online in Wiley Online Library (<http://www.wileyonlinelibrary.com>).
- [78] http://www.tapbiosystems.com/tap/cell_culture/Cello.htm. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [79] Samorski M, Müller-Newen G, Büchs J. Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: a novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnol Bioeng*. 2005 Oct 5;92(1):61-8.
- [80] Kensy F, Engelbrecht C, Büchs J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microb Cell Fact*. 2009 Dec 22;8:68.
- [81] <http://www.m2p-labs.com/measurement-devices/biolector>. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [82] Huber R, Ritter D, Hering T, Hillmer AK, Kensy F, Müller C, Wang L, Büchs J. Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microb Cell Fact*. 2009 Aug 1;8:42.
- [83] <http://www.pan-systech.de>. Letzter Zugriff am 19.11.2011
- [84] Chapman T. Lab automation and robotics: Automation on the move. *Nature* (6 February 2003) 421, 661-666
- [85] <http://www.liconic.li>, letzter Zugriff 06.01.2012

- [86] <http://www.thermo.com>, letzter Zugriff 06.01.2012
- [87] www.optics.pro.com, letzter Zugriff 06.01.2012
- [88] Linke, P., Assayentwicklung zur Konzentrationsbestimmung von Metaboliten tierischer Zellkulturen auf einer robotischen Plattform. 2010, Fachhochschule Münster.
- [89] Markert and Joeris: Development of an automated, multiwell plate based screening system for suspension cell culture. *BMC Proceedings* 2011 5(Suppl 8):O9.
- [90] Funke M, Buchenauer A, Mokwa W, Kluge S, Hein L, Müller C, Kensy F, Büchs J. Bioprocess control in microscale: scalable fermentations in disposable and user-friendly microfluidic systems. *Microb Cell Fact*. 2010 Nov 13;9:86.
- [91] Krause M, Ukkonen K, Haataja T, Ruottinen M, Glumoff T, Neubauer A, Neubauer P, Vasala A. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microb Cell Fact*. 2010 Feb 19;9:11.
- [92] Kocincová AS, Nagl S, Arain S, Krause C, Borisov SM, Arnold M, Wolfbeis OS. Multiplex bacterial growth monitoring in 24-well microplates using a dual optical sensor for dissolved oxygen and pH. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Jun 15;100(3):430-8.
- [93] Barrett TA, Wu A, Zhang H, Levy MS, Lye GJ. Microwell engineering characterization for mammalian cell culture process development. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Feb 1;105(2):260-75.
- [94] Girard P, Jordan M, Tsao M, Wurm FM. Small-scale bioreactor system for process development and optimization. *Biochem Eng J*. 2001 Mar;7(2):117-119.
- [95] McDaniel LE, Bailey EG, Zimmerli A. Effect Of Oxygen-Supply Rates On Growth Of Escherichia Coli. II. Comparison Of Results In Shake Flasks And 50-Liter Fermentor. *Appl Microbiol*. 1965 Jan;13:115-9.
- [96] Silk NJ, Denby S, Lewis G, Kuiper M, Hatton D, Field R, Baganz F, Lye GJ. Fed-batch operation of an industrial cell culture process in shaken microwells. *Biotechnol Lett*. 2010 Jan;32(1):73-8.
- [97] Duetz WA, Witholt B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. *Biochem Eng J*. 2001 Mar;7(2):113-115.
- [98] Duetz WA, Rüedi L, Hermann R, O'Connor K, Büchs J, Witholt B. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jun;66(6):2641-6.

- [99] Huber R, Roth S, Rahmen N, Büchs J. Utilizing high-throughput experimentation to enhance specific productivity of an E.coli T7 expression system by phosphate limitation. *BMC Biotechnol.* 2011 Mar 17;11:22.
- [100] Kensy F, Engelbrecht C, Büchs J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. *Microb Cell Fact.* 2009 Dec 22;8:68.
- [101] Kensy F, Zang E, Faulhammer C, Tan RK, Büchs J. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb Cell Fact.* 2009 Jun 4;8:31.
- [102] Lye GJ, Dalby PA, Woodley JM (2002) Better biocatalytic processes faster: New tools for the implementation of biocatalysis in organic synthesis. *Org Process Res Dev* 6: 434–440
- [103] Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C (2002) Highthroughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 99: 51–62
- [104] Deshpande RR, Wittmann C, Heinzle E. Microplates with integrated oxygen sensing for medium optimization in animal cell culture. *Cytotechnology.* 2004 Sep;46(1):1-8.
- [105] Suresh S, Srivastava VC, Mishra IM. Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29(4):255-78.
- [106] Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv.* 2009 Mar-Apr;27(2):153-76.
- [107] Gill NK, Appleton M, Baganz F, Lye GJ. Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Aug 15;100(6):1144-55.
- [108] Nicolaiewsky EMA, Fair JR. Liquid Flow over Textured Surfaces. 1. Contact Angles. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1999, 38, 284-291.
- [109] Vhquez G, Alvarez E, Navaza JM. Surface Tension of Alcohol + Water from 20 to 50 °C. *J. Chem. Eng. Data* 1995,40, 611-614.
- [110] Büchs J, Lotter S, Milbradt C. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J.* 2001 Mar;7(2):135-141.
- [111] Moeser K. Charakterisierung von Fermentationsprozessen auf einer robotischen Zellkulturplattform. Diplomarbeit 2011, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg.
- [112] Gu F, Liu CJ, Yuan XG, Yu GC. CFD Simulation of Liquid Film Flow on Inclined Plates. *Chem. Eng. Technol.* 2004, 27, No. 10.

- [113] Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E, Shamlou PA. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol Appl Biochem.* 2005 Feb;41(Pt 1):1-8.
- [114] <http://www.enzyscreen.com>, letzter Zugriff 12.12.2011
- [115] Zimmermann HF, John GT, Trauthwein H, Dingerdissen U, Huthmacher K. Rapid evaluation of oxygen and water permeation through microplate sealing tapes. *Biotechnol Prog.* 2003 May-Jun;19(3):1061-3.
- [116] www.bioventures.com, letzter Zugriff 14.12.2011
- [117] www.labcyte.com, letzter Zugriff 14.12.2011
- [118] www.usascientific.com, letzter Zugriff 14.12.2011
- [119] Musmann C. Entwicklung einer prozessbegleitenden Analytik mit Integration in eine industrielle, automatisierte Zellkulturplattform. Diplomarbeit, 2012, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- [120] Dezenogita VM, Kimura R, Miller WM. Effects of CO₂ and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production. *Cytotechnology.* 1998 Nov;28(1-3):213-27.
- [121] Zhu MM, Goyal A, Rank DL, Gupta SK, Vanden Boom T, Lee SS. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnol Prog.* 2005 Jan-Feb;21(1):70-7.
- [122] Panula-Perälä J, Siurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn MG, Neubauer P. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb Cell Fact.* 2008 Nov 18;7:31.
- [123] Jenkins N, Parekh RB, James DC. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol.* 1996 Aug;14(8):975-81.
- [124] Marino M, Corti A, Ippolito A, Cassani G, Fassina G. Effect of bench-scale culture conditions on murine IgG heterogeneity. *Biotechnol Bioeng.* 1997 Apr 5;54(1):17-25.
- [125] Castro PM, Hayter PM, Ison AP, Bull AT. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992 Oct;38(1):84-90.
- [126] Lee GM, Kim EJ, Kim NS, Yoon SK, Ahn YH, Song JY. Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *J Biotechnol.* 1999 Apr 15;69(2-3):85-93.

- [127] Kim EJ, Kim NS, Lee GM. Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Nov-Dec;34(10):757-61.
- [128] Hodge G. Media Development for Mammalian Cell Culture. *BioPharm International* 2005 May 1, Volume 18, Issue 5.
- [129] Lindgren K, Salmén A, Lundgren M, Bylund L, Ebler A, Fäldt E, Sörvik L, Fenge C, Skoging-Nyberg U. Automation of cell line development. *Cytotechnology.* 2009 January; 59(1): 1–10.
- [130] Jun SC, Kim MS, Baik JY, Hwang SO, Lee GM. Selection strategies for the establishment of recombinant Chinese hamster ovary cell line with dihydrofolate reductase-mediated gene amplification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Nov;69(2):162-9.
- [131] Hegde S, Pant T, Pradhan K, Badiger M, Gadgil M. Controlled release of nutrients to mammalian cells cultured in shake flasks. *Biotechnol Prog.* 2012 Jan;28(1):188-95.
- [132] Wlaschin KF, Hu WS. Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2006;101:43-74.
- [133] Carroll S, Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Nov;4(11):1821-9.
- [134] Spielmann S. Etablierung einer für den Hochdurchsatz geeigneten RT-qPCR Methode zur Charakterisierung von CHO-Zellkulturen im industriellen Umfeld. Diplomarbeit, 2012, Technische Hochschule Mittelhessen.
- [135] Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Mar 20;81(6):631-9.
- [136] Barnes LM, Dickson AJ. Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression. *Curr Opin Biotechnol.* 2006 Aug;17(4):381-6.
- [137] <http://www.xiril.com>, letzter Zugriff am 01.12.2011
- [138] <http://www.beckmancoulter.de>, letzter Zugriff am 01.12.2011
- [139] <http://www.tecan.com>, letzter Zugriff am 01.12.2011
- [140] Wetzel R. Assayentwicklung zur Konzentrationsbestimmung von Metaboliten tierischer Zellkulturen auf einer robotischen Plattform. Diplomarbeit, 2010, Technische Universität Dresden.
- [141] <http://www.chem.agilent.com>, letzter Zugriff am 01.12.2011
- [142] <http://www.roche.com>, letzter Zugriff am 01.12.2011
- [143] Cellavista[®] Analyzer User Manual Version 2.0, 03.12.2009

- [144] Adamson, A. W. *Physical Chemistry of Interfaces*, 5th. Ed.; Wiley: New York, 1990.
- [145] Whicher JT, Price CP, Spencer K. Immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for proteins. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1983;18(3):213-60.
- [146] Tritsch GL, Moore GE. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Exp Cell Res.* 1962 Nov;28:360-4.

9. Abkürzungsverzeichnis

A: Absorption

ABTS: 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfon-säure)

ADP: Adenosindiphosphat

AHA: L-Azidohomoalanin

Ak: Antikörper

API: *active pharmaceutical ingredient*

ATP: Adenosintriphosphat

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CCD: *Charged-Coupled Device*

cDNA: *complementary* Desoxyribonukleinsäure

CFD: *Computational Fluid Dynamics*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

COM-Port: Serielle Schnittstelle

csv: *Comma-Separated Values-Datei*

CTR: Kohlenstoffdioxidtransferrate

CO₂: Kohlenstoffdioxid

dAK: Detektions-Antikörper

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DNase: Desoxyribonuklease

DO: Gelöstsauerstoff

DDR: *Direct Drive Robot*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Em: Emission

ER: endoplasmatisches Retikulum

ESI-MS: Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Ex: Extinktion

F: Fluoreszenz

fAK: Fang-Antikörper

FTT: FluidTrain[®] Technologie

GCM: *Gas Control Module*

GEP: *Good Engineering Practice*

GLS: Glutaminase

GLD: Glutamatoxidase

GLDH: Glutamatdehydrogenase

GMP: *Good Manufacturing Practice*

G6PDH: Glukose-6-phosphatdehydrogenase

HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HILIC: Hydrophile Interaktionschromatographie

HK: Hexokinase

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HTS: *High-Throughput Screening*

IA: Integrierte Analytik

IgG: Immunglobulin Typ G

k_{La} : volumetrischer Stoffübergangskoeffizient [h^{-1}]

LDH: Laktatdehydrogenase

LH: *Liquid Handling*

LLD: *Liquid Level Detection*

LOD: Laktatoxidase

M: Molarität [mol/L]

MB: Mikro Bioreaktor

MBA: Mikro-Bioreaktor-Array

MTP: Mikrotiterplatte

NADPH: reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NH₄: Ammonium-Ion

N₂: Stickstoff

OTR: Sauerstoffeintragsrate

O₂: Sauerstoff

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: Polymerasekettenreaktion

PEG: Polyethylenglykol

pH: pH-Wert

PoC: *Proof of Concept*

POD: Peroxidase

PTFE: Polytetrafluorethylen

P/V_L: volumetrischer Leistungseintrag [W/m³]

qRT-PCR: *Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion*

RAMOS: *Respiratory Activity Monitoring System*

RANS: Reynolds Averaged Navier Stokes

RNA: Ribonukleinsäure

RS232: *Recommended Standard 232* (serielle Schnittstelle)

RQ: Respirationskoeffizient

R² Bestimmtheitsmass

RT: Raumtemperatur

SBS: *Society of Biomolecular Screening*

TIA: Turbidimetrischer Immunoassay

TK: Transport des Kulturgefäßes

TubeSpin: TubeSpin[®] Bioreaktoren der Firma TPP (Techno Plastics Products AG, Trasadingen, Schweiz) oder der CultiFlask 50 mL disposable bioreactor (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen).

txt: Textdatei

uHTS: *ultra High-Throughput Screening*

USB: *Universal Serial Bus*

USP: *Upstream Processing*

xls: Dateiendung von Microsoft Excel-Dateien

4-AAP: 4-Aminoantipyrin

10. Anhang

Tabelle 48: Übersicht zur Vielfalt standardmäßig verfügbarer Mikrotiterplatten. Die Wahl einer Platte erfolgt nach dem Einsatzgebiet und den erforderlichen Spezifikationen. Neben den hier dargestellten Spezifikationen sind zahlreiche nicht standardmäßig eingesetzte Formate und Sonderanfertigungen verfügbar.

Eigenschaft	Spezifikation
Anzahl der <i>wells</i>	6-1536
Geometrie der Platte	flach (<i>shallowwell</i> plate) hoch (<i>deepwell</i> plate)
Material der Platte	Polystyrol Polypropylen
Farbe der Platte	klar trüb schwarz/weiß
Form der <i>wells</i>	rund quadratisch rechteckig
Boden der <i>wells</i>	rund flach (UV-transparent und -undurchlässig) V-förmig pyramidal
Beschichtung der <i>wells</i>	hydrophil hydrophob funktionalisiert (versch. Arten)
Sterilität	steril unsteril
sonstiges	mit/ohne Deckel mit/ohne Barcode

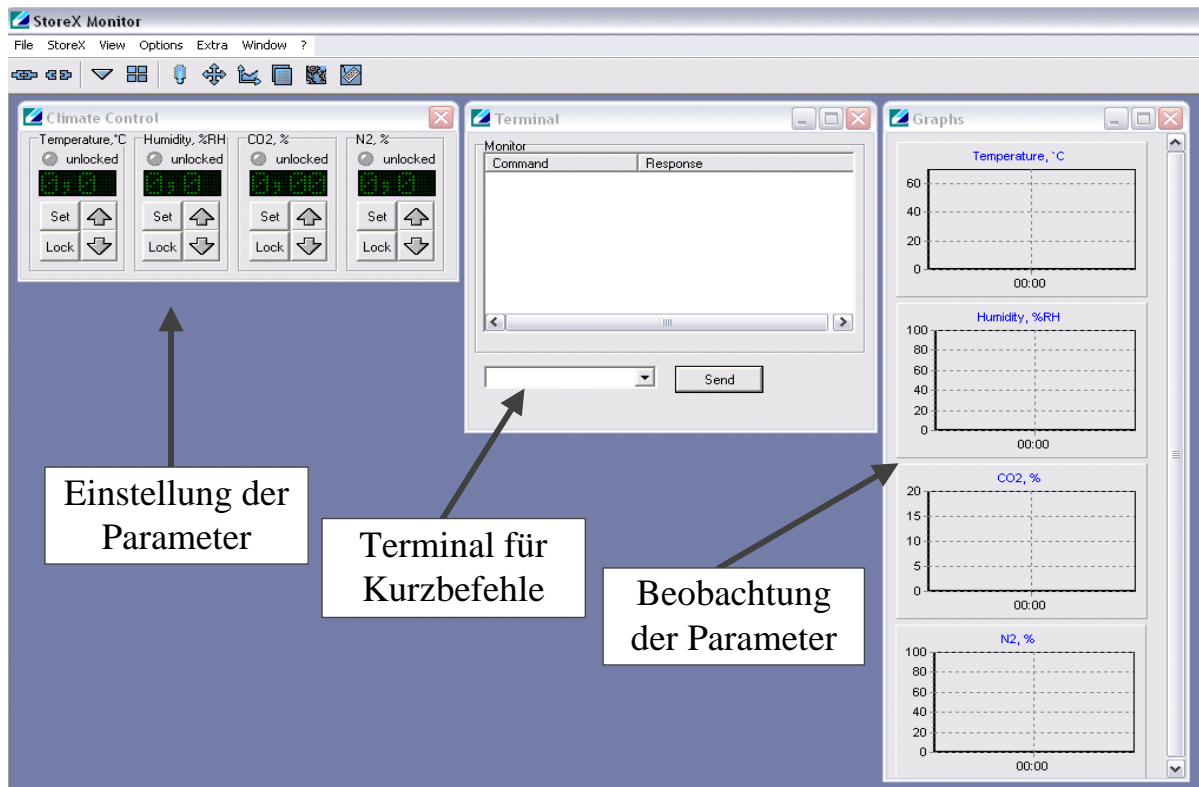


Abbildung 68: Terminal zur Ansteuerung des Inkubators STX-44 als Einzelgerät. Neben der Regelung und der Beobachtung der Parameter Temperatur, relative Luftfeuchte, CO₂ und N₂ können Kurzbefehle gesendet werden.

Tabelle 49: COM-Port-Einstellungen zur Ansteuerung des STX-44 über die Lirix-Steuersoftware.

Parameter	Wert
Bits pro Sekunde	9600
Datenbits	8
Parität	Keine (E)
Stopbits	1

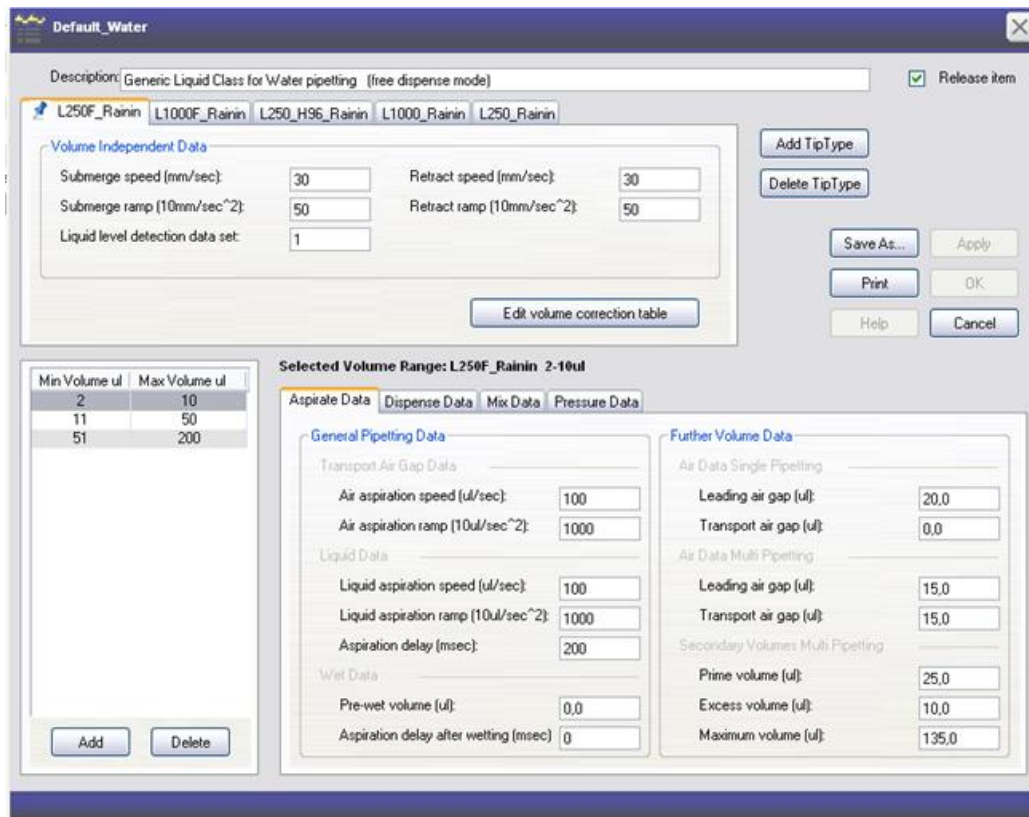


Abbildung 69: Parameter zur Optimierung einer Flüssigkeitsklasse zum Aspirieren am Beispiel von Wasser in der lixir³-Software.

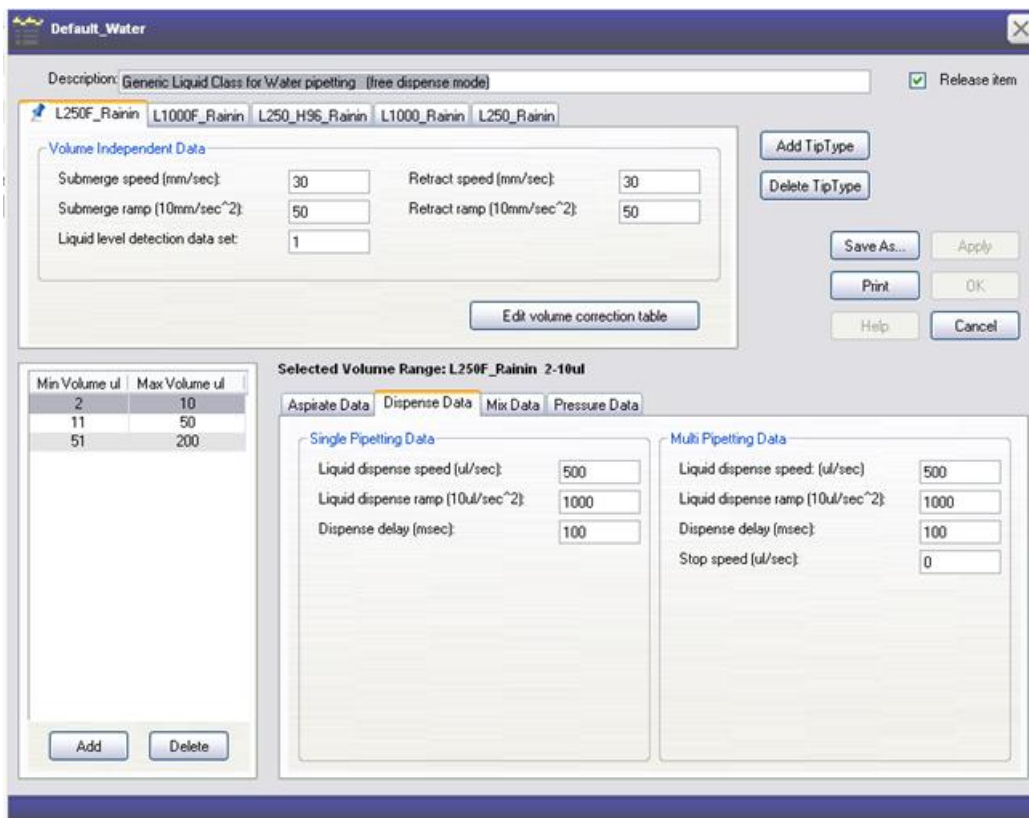


Abbildung 70: Parameter zur Optimierung einer Flüssigkeitsklasse zum Dispensieren am Beispiel von Wasser in der lixir³-Software.

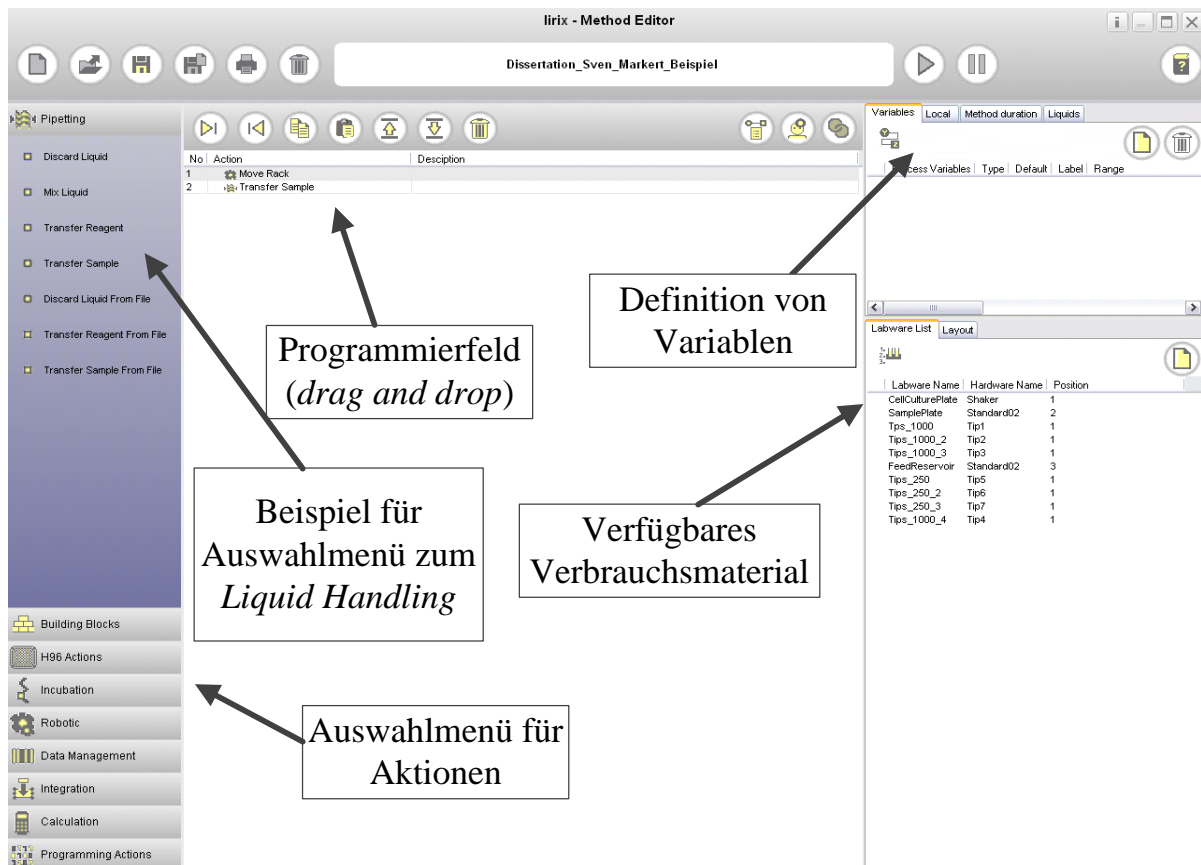


Abbildung 71: Methoden-Editor der Lirix-Software. Durch *drag and drop* können Aktionen aus den Auswahlmenüs (links) in das Programmierfeld (Mitte) gezogen werden. Nach dem Hinzufügen öffnet automatisch ein neues Fenster, in dem die Spezifikationen der jeweiligen Aktion definiert werden. Es können Variablen definiert werden (oben rechts) und es ist eine Übersicht zu verfügbaren Verbrauchsmaterialien gegeben (unten rechts.)

Nummer	Befehlszeile	Erklärung
1	rs.ComPort = Z	Wahl des COM-Ports
2	rs.ComPortSettings = „9600,E,8,1”	Definition der COM-Port Einstellungen
3	rs.SendCmd(“wr dm0 x”)	Kurzbefehl Definition Kassette
4	Start Timer	Start eines <i>Timers</i> (Dauer 1s)
5	Wait for End of Timer	Wartebefehl für <i>Timer</i>
6	rs.ComPort = Z	Wahl des COM-Ports
7	rs.ComPortSettings = „9600,E,8,1”	Definition der COM-Port Einstellungen
8	rs.SendCmd(“wr dm5 y”)	Kurzbefehl Definition Ebene
9	Start Timer	Start eines <i>Timers</i> (Dauer 1s)
10	Wait for End of Timer	Wartebefehl für <i>Timer</i>
11	rs.ComPort = Z	Wahl des COM-Ports
12	rs.ComPortSettings = „9600,E,8,1”	Definition der COM-Port Einstellungen
13	rs.SendCmd(“st 1905”)	Kurzbefehl Definition Ausschleusen
14	Start Timer	Start eines <i>Timers</i> (Dauer 1s)
15	Wait for End of Timer	Wartebefehl für <i>Timer</i>

Abbildung 72: Beispiel für eine Befehlszeile in der Lirix-Software zum automatischen Ausschleusen einer Mikrotiterplatte mit den dazugehörigen Erklärungen zu den einzelnen Kommandozeilen. Z = Nummer des COM-Ports; x = Nummer der Kassette mit einem Wert von 1 oder 2; y = Ebene der gewählten Kassette. Die Werte für y sind abhängig von der gewählten Kassetten-Konfiguration.

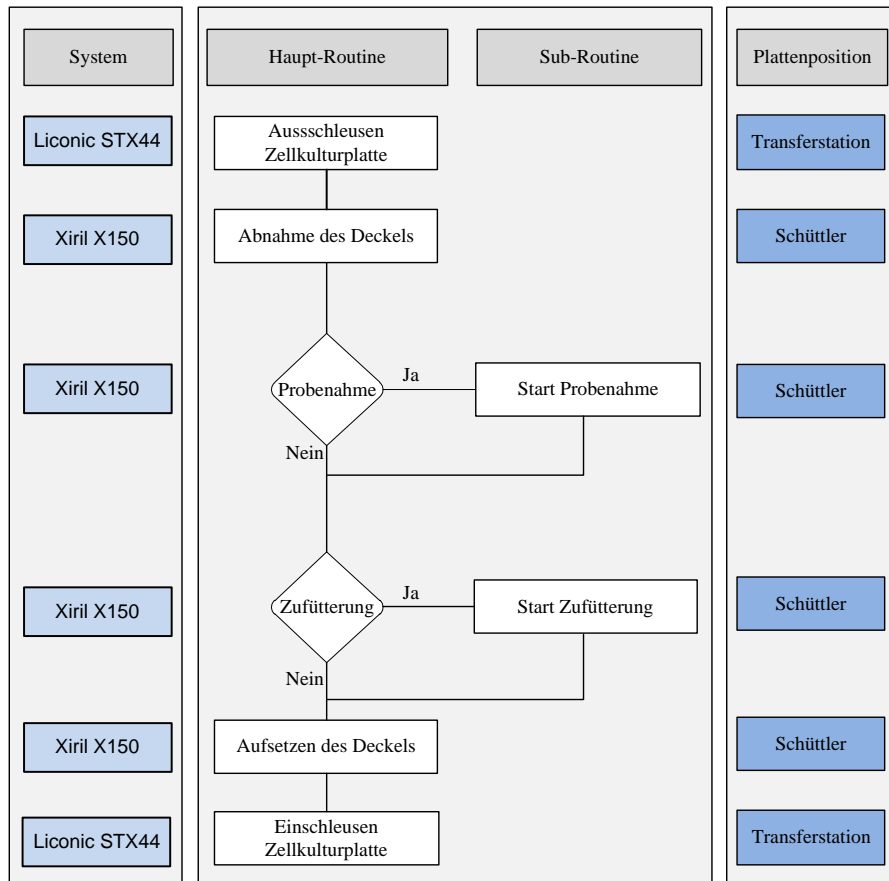


Abbildung 73: Ablauf der Prozessierung einer Zellkulturplatte in dem Zellkulturmodul des *Proof of Concept* Systems mit Darstellung der beteiligten Systeme und der Plattenposition während der Haupt- und Subroutinen der Methode zur Entnahme einer Probe und Zugabe einer Nährlösung. In der Hauptroutine werden zwei Entscheidungspunkte passiert.

Tabelle 50: Geforderte Spezifikationen für die Auswahl eines Plattentransportroboters und *Liquid Handlers* mit gemeinsamer Steuerungssoftware.

Komponente	Anforderung
Plattentransportroboter	<p>Erforderliche Funktionalität:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kreisförmiger oder elliptischer Arbeitsbereich. • Minimaler Bewegungskreis: 300° (Totbereich $\leq 60^\circ$). • Minimale vertikaler Arbeitsbereich (Min bis Max Position): 45 cm. • Minimaler horizontaler Greifbereich (Min bis Max Position): 20 cm (40 cm auf den gesamten Aktionskreis gerechnet). • Zulässiges Gewicht der Platten/Verbrauchsmaterial: ≥ 500 g. • Greifen von Material im SBS-Format sowohl in <i>portrait</i> als auch im <i>landscape</i> Format. • Möglichkeit zum Transport jedes Verbrauchsmaterials, das SBS Format hat. • Roboter muss auch Multiwellplatten mit einem 2,5 cm hohen Deckel transportieren, entdeckeln und wieder verschließen können. <p>Zusätzlich gewünschte Funktionalität in abnehmender Priorität:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Der Roboter soll auch bei Programmunterbrechung und/oder manueller Umpositionierung seine absolute Position kennen und die Routine fortsetzen können (<i>Encoder System</i>). • Möglichst einfache Definition (<i>teaching</i>) neuer Positionen ist erwünscht. • Zeitbedarf zwischen dem Anfahren von zwei Positionen ≤ 10 Sekunden. • Durchführung komplexer, frei programmierbarer Bewegungsmuster (z.B. Schüttelbewegung) durch den Roboter. • Seitliches Greifen der Platten/Verbrauchsmaterial bevorzugt. • Geringes Eigengewicht wünschenswert.
<i>Liquid Handler</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Geringe Aufstellfläche • Interner Greifer zum Transport von Material im SBS Format. • Möglichkeit zur Bearbeitung von Mikrotiterplatten mit 6-384 <i>wells</i> pro Platte mit geeignetem Pipettierkopf für hohen Durchsatz. • Mindestens neun Positionen auf der Arbeitsfläche. • Offener Aufbau zur Erleichterung der Integration. • Möglichkeit zur Integration eines Mikrotiterplatten-Schüttlers innerhalb des Arbeitsbereichs.
Software	<ul style="list-style-type: none"> • Die Steuerungssoftware muss einen dynamischen <i>Scheduler</i> beinhalten. Ein statischer <i>Scheduler</i> ist aufgrund der Komplexität der Anwendung nicht ausreichend, da die Fähigkeit zur selbstständigen Optimierung der Prozessabläufe zwingend erforderlich ist. • Vollständige Integration aller Funktionen des Roboters in der <i>scheduling</i>-Software. Die Programmierung des Roboters soll in dieser Software erfolgen. • Die Software muss über eine eigene Datenbank verfügen (Möglichkeit zur Plattenverfolgung, Prozesshistorie, Zwischenspeicherung und Zuordnung von Daten zu den Platten usw.). • Fähigkeit zur selbstständigen Optimierung der Transportprozesse (kürzester Weg, Kollisionsvermeidung). • Verfügbarkeit eines Modus zum manuellen Eingriff in laufende Prozesse zur Fehlerkorrektur. • Funktion zur Fehlerbehebung (<i>error recovery function</i>) und Vorhandensein einer Fehlerdatenbank.

Tabelle 51: Schnittstellen der Hardware-Komponenten zu dem Steuerrechner in dem Produktivsystem. Neben der seriellen RS-232-Schnittstelle und USB werden Ethernet-Verbindungen genutzt.

Komponente	Anschluss
Direct Drive Robot	Ethernet
Bravo	Ethernet
STX44-IC SA	RS-232
Cytomat [®] 2C	RS-232
Sunrise [™]	RS-232
Infinite [®] M200 PRO	USB
Cellavista [®] Analysesystem	Ethernet
Elx405 [™]	RS-232
PlateLoc	Ethernet
VSpin	Ethernet
MiniHub	Ethernet
Cytomat [®] 800	RS-232

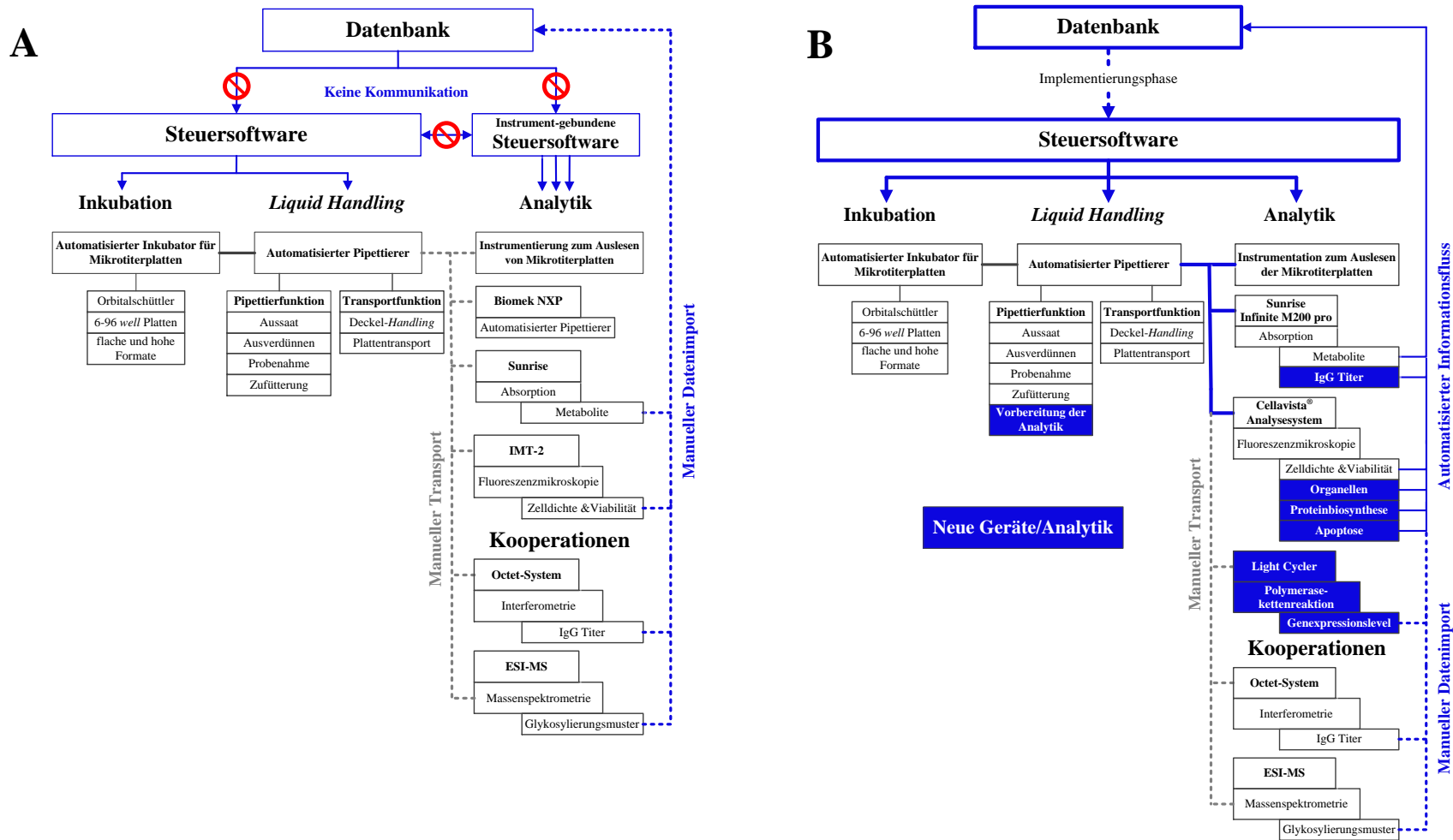


Abbildung 74: Direkter Vergleich von Aufbau und Funktionalität des Proof of Concept Systems (A) und des Produktivsystems (B). Neue funktionelle Einheiten (Geräte und analytische Methoden) sowie neu etablierte Kommunikationswege und Softwarelösungen sind in blau hervorgehoben. Während in dem Proof of Concept System mehrere Steuersoftwarepakete verwendet werden und die Kommunikation mit einer Datenbank nicht möglich ist, ermöglicht die Verwendung einer zentralen Steuersoftware im Produktivsystem die vollständige Automatisierung sowie die Anbindung einer Datenbank zur Implementierung von *feed back loops*. Innerhalb des Produktivsystems sind sämtliche Transportvorgänge automatisiert mit Ausnahme der Einbindung von Kooperationen mit der Analytikabteilung der Roche Diagnostics GmbH.

Tabelle 52: Tabellarischer Vergleich von *Proof of Concept* und Produktiv System.

Vergleichsparameter	<i>Proof of Concept</i>	Produktivsystem
Datenbank	Analysedaten werden manuell in eine Datenbank importiert	Analysedaten werden automatisch in eine Datenbank importiert, manueller Datenimport nur von Kooperationspartnern
Kommunikation (Datenbank – Steuersoftware)	Nicht möglich	Möglich, ein Regelkreis kann implementiert werden
Gefahr der Probenverwechslung	Hoch auf Grund der Teilautomatisierung und Verwendung mehrerer Softwarepakete	Ausgeschlossen, da geschlossenes, vollständig automatisiertes System. Volle Rückverfolgbarkeit der Proben ist gegeben.
Steuersoftware	Verwendung mehrerer Softwarepakete	Eine zentrale Steuersoftware für alle Komponenten
<i>Log file</i>	Für Teilprozesse	für Gesamtprozess
Fehlerkorrektur	Keine Fehlerbibliothek oder Fehlerkorrektur möglich	Fehlerbibliothek mit automatischer Fehlerkorrektur
<i>Scheduling</i>	Kein <i>Scheduling</i> , sequentielles Abarbeiten von Befehlen	Dynamischer <i>Scheduler</i> optimiert und beschleunigt Prozessabläufe
Flexibilität in Programmierung	Eingeschränkte, ausreichende Flexibilität	Volle Flexibilität durch Java-Programmiererelemente
Komplexität der Anlage	Gering	Hoch
Automatisierungsgrad	Gering, Teilautomatisierung	Hoch, vollständig automatisiertes Zellkultursystem
Kosten	Gering auf Grund der Anschaffung des absolut Notwendigsten	Mittel, da Geräte für den höheren Durchsatz einen höheren Preis aufweisen
Flexibilität, Modularität	Gering, Platz für Neugeräte ist begrenzt	Hoch auf Grund der Verwendung eines schnellen Plattentransportroboters. Ausreichend Platz für eine Erweiterung des Systems
Durchsatz	204 Parallelansätze*	384 Parallelansätze möglich*
Flexibilität zur Durchsatzerhöhung	Gering, System wird nur für den Beweis des <i>Proof of Concepts</i> verwendet.	Hoch, System wird für den hohen Durchsatz entwickelt. Alle Komponenten erlauben eine Erhöhung des Durchsatzes
Einsatz versch. MTP-Geometrien	Begrenzt möglich, limitierend ist die Verwendung eines Einzel-Kanal Liquid Handlers	Volle Flexibilität, Einsatz von 6 bis 384 well Mikrotiterplatten ist im System möglich
Plattentransport im System	Automatisiert im Zellkulturmodul, manueller Transport zum Analytik-Modul	Vollständig automatisiert

* Werte resultieren aus den im Rahmen dieser Arbeit zur Kultivierung tierischer Zellkulturen verwendeten Mikrotiterplatten und der zur Verfügung stehenden Kapazität des automatisierten Schüttel-Inkubators.

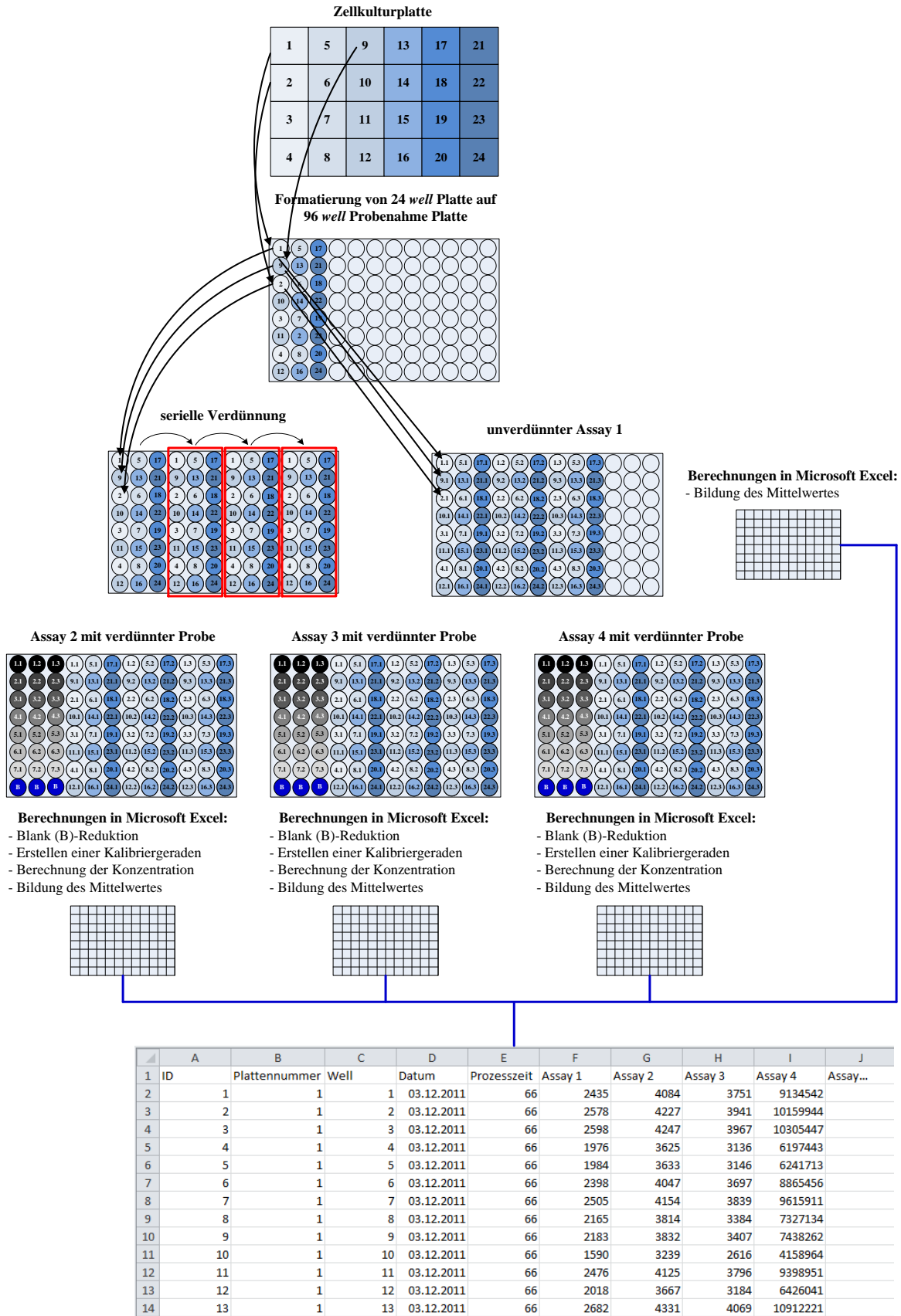


Abbildung 75: Proben- und Datenfluss in dem Produktivsystem bei der Kultivierung mit einer 24 deepwell Platte. Bei der Probenahme werden die Proben auf eine 96 well Platte umformatiert und anschließend verdünnt oder direkt für einen Assay verwendet. Die mit den Ausleseeinheiten generierter Rohdaten werden mit Hilfe von Micorsoft Excel prozessiert und in einer Datei gespeichert.

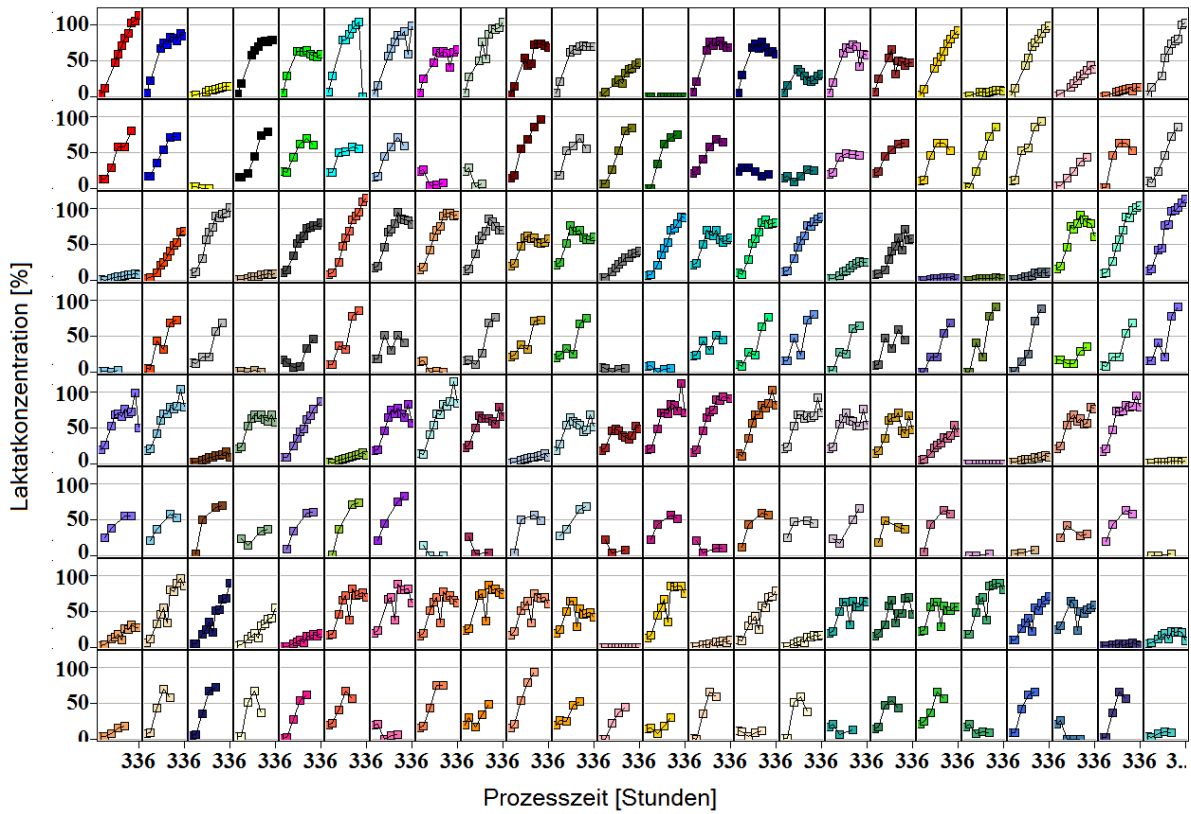


Abbildung 77: Verlauf der Laktatkonzentration der 96 Klone in Duplikaten aus dem automatisierten Fed-Batch Experiment. Duplikate sind jeweils in gleicher Farbe dargestellt.

11. Lebenslauf

17.07. 1982 Geboren in Hildesheim
07/1993 - 07/2002 Bischöfliches Gymnasium Josephinum in Hildesheim

Studium

Seit 10/2008 **Promotion Institut für Technische Chemie Hannover**
Bei der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Abteilung Pharmaceutical
Biotech Production & Development/Fermentation
*„Entwicklung eines automatisierten, Mikrotiterplatten basierten
Systems für die Suspensions-Zellkultur zur Effizienzsteigerung der
Prozessentwicklung im pharmazeutisch industriellen Umfeld“*

09/2008 **Abschluss des Studiums**
Erlangen des Grades „Diplom-Biotechnologe“ mit Auszeichnung

11/2007 - 09/2008 **Diplomarbeit**
Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Abteilung Pharmaceutical
Biotech Production & Development/Fermentation
„CHO-Kulturmedienentwicklung als Teil einer Plattform-Technologie“

5/2007 - 08/2007 **Praktikum**
Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Abteilung Pharmaceutical
Biotech Production & Development/Fermentation
*„Evaluierung des Kleinkultursystems TubeSpin zur Medienentwicklung
für tierische Zellkulturen“*

08/2006-09/2006 **Projektarbeit**
Universität Bielefeld, AG Zellkulturtechnik
*„Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie: Screening
verschiedener Entsalzungsmethoden“*

07/2005 **Vordiplom** und Beginn des Hauptstudiums

10/2003 - 07/2005 **Grundstudium** „Molekulare Biotechnologie“ an der Universität
Bielefeld