

Implementierung einer kontinuierlichen
Prozessführung zur
Produktivitätssteigerung bei der
Kultivierung tierischer Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation
von

Jana Schellenberg, M. Sc.

2023

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

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Janina Bahnemann
Institut für Physik
Universität Augsburg

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 14.12.2022

Kurzfassung

Durch technologische Innovationen in der Prozessüberwachung und die Entwicklung von Single-Use Ausrüstung rücken kontinuierliche Kultivierungsprozesse zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) zunehmend in den Fokus der biopharmazeutischen Industrie. Daher existieren neben zahlreichen Design of Experiment (DoE) Ansätzen zur Produktivitätssteigerung im etablierten Fed Batch Betrieb vermehrt auch Transferprotokolle in Perfusionsprozesse, bei denen vielfach höhere Umsätze durch Hochzelldichte-Kultivierungen erreicht werden. Hierbei werden derzeit die Kapazitätsgrenzen der verwendeten membranbasierten Zellretentionssysteme im Hinblick auf die Trenneffizienz und die Produktausbeute erreicht, sodass der Bedarf nach neuen Methoden zur Zellabtrennung steigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze zur Produktivitätssteigerung einer CHO-Zelllinie untersucht. Eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität um 8 % in einem etablierten Fed Batch Prozess wurde durch eine pH-Wert Erhöhung innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Zusätzlich besteht ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der induzierten Produktivität und einer Zunahme des Zelldurchmessers. Die maximale Lebendzellzahl konnte außerdem durch eine semi-kontinuierliche Fütterungsstrategie um 3,1 Mio. Zellen/mL gesteigert werden.

Im zweiten Ansatz wurde ein kontinuierlicher quasi-Steady State im Chemostaten bei 8 Mio. Zellen/mL mit einer mAK-Ausbeute von 0,2 g/L*Tag erreicht. Zusätzlich konnte eine reversible glucoseinduzierte Wachstumsinhibierung der Zellen bei > 8 g/L (+1 Tag) mit erhöhter spezifischer Produktivität detektiert werden. Für eine Steigerung der kontinuierlichen mAK-Ausbeute durch erhöhte Zelldichten wurde ein Perfusionsprozess mittels einer 3D-gedruckten Zellseparationsspirale im Hinblick auf die Trenneffizienz und die Stabilität der Zellretention evaluiert. Neben einer Designoptimierung wurde die Prozessstabilität durch die Implementierung einer automatischen Spülung und einer Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung gesteigert. Die Langzeitstabilität des verwendeten Druckmaterials sowie die Scherstressbildung wurden in einem Perfusionsprozess > 500 h evaluiert.

Schlagwörter: kontinuierliche Kultivierung, CHO-Zellen, monoklonaler Antikörper, Prozessoptimierung, Perfusion, mikrofluidische Zellretention, 3D-Druck

Abstract

Innovative technologies for process monitoring and the development of single-use equipment enable a shift to continuous cultivation strategies in the biopharmaceutical industry for the commercial production of monoclonal antibodies (mAb). In addition to Design of Experiment (DoE) approaches to enhance product yields in established Fed Batch processes, an increasing number of transfer protocols for perfusion processes and high cell density cultivations have been published. Due to challenges regarding the product recovery and cell retention efficiency with the widely used membrane-based cell retention systems in high cell density processes, the demand for alternative devices rises.

This doctoral thesis includes several approaches to enhance productivity and mAb yield using a CHO-cell line and different process strategies. An increase of cell specific productivity of up to 8 % was achieved by a heightened pH-value during the exponential growth phase of an established Fed Batch process. Additionally, a non-linear relation between enhanced cell specific productivity and cell enlargement was detected. Furthermore, the peak viable cell concentration was increased by 3.1 mio cells/mL using a semi-continuous feeding strategy.

A Chemostat cultivation with a continuous quasi-steady state of 8 mio cells/mL and a mAb yield of 0.2 g/L*day was achieved in a second approach to increase productivity. Additionally, a reversible glucose induced growth inhibition was detected at > 8 g/L (+1 day) in relation to enhanced cell-specific productivity. For an increase of the continuous mAb yield with higher cell densities, a 3D-printed cell separation spiral was evaluated as a cell retention device in a perfusion process regarding the retention efficiency and the impact on process stability. In addition to an optimization of the channel design, the process stability was increased by the implementation of an automatic flush and a flow rate monitor with web-based remote control. The long-term stability of the printing material as well as the development of mechanical shear stress inside the separation spiral was evaluated in a > 500 h perfusion process.

Key words: continuous cultivation, CHO-cells, monoclonal antibodies, process optimization, perfusion, microfluidic cell retention, 3D-print

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Kurzfassung | I |
| Abstract | II |
| Inhaltsverzeichnis | III |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Zielsetzung | 3 |
| 3. Theoretischer Hintergrund | 4 |
| 3.1. CHO-Zellen in der biopharmazeutischen Industrie..... | 4 |
| 3.1.1. Substrate und Metabolismus..... | 5 |
| 3.2. Reaktorbetriebsweisen in der Bioprozesstechnik..... | 7 |
| 3.2.1. Diskontinuierliche Prozessführung..... | 7 |
| 3.2.2. Kontinuierliche Prozessführung..... | 10 |
| 3.2.3. Zellrückhaltesysteme..... | 13 |
| 3.2.4. Verwendete Reaktorsysteme..... | 16 |
| 3.3. In-silico Prozessoptimierung..... | 19 |
| 3.3.1. Bioprozessmodellierung..... | 19 |
| 3.3.2. Simulation optimierter Prozessbedingungen..... | 20 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 21 |
| 4.1. Fed Batch Prozess Plattform..... | 21 |
| 4.1.1. Produktivitätssteigerung durch pH-Shifts..... | 22 |
| 4.1.2. Übertragung des Standard Fed Batch Prozesses in das Ambr® 250..... | 24 |
| 4.2. Etablierung eines Chemostat Prozesses..... | 26 |
| 4.2.1. Semi-kontinuierlicher Substrat-Feed als Übergang zur kontinuierlichen Prozessführung..... | 27 |
| 4.2.2. Übertragung in einen kontinuierlichen Prozess mit Zellverlust..... | 29 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.3. | Evaluierung der in-silico Optimierung..... | 34 |
| 4.2.4. | Glucose-Überfütterung als potenzieller Wachstumsinhibitor | 39 |
| 4.2.5. | Umsatzsteigerung durch erhöhte Lebendzelldichte..... | 46 |
| 4.3. | Etablierung eines mikrofluidischen 3D-gedruckten Zellrückhaltesystems für Perfusionsprozesse | 50 |
| 4.3.1. | Optimierung des Spiralseparator-Designs und der Perfusionsflussraten | 50 |
| 4.3.2. | Implementierung einer automatischen Spülung..... | 57 |
| 4.3.3. | Implementierung einer Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung zur Steigerung der Prozesstabilität..... | 64 |
| 5. | Zusammenfassung und Ausblick..... | 73 |
| 6. | Anhang..... | I |
| 6.1. | Material und Methoden..... | I |
| 6.1.1. | Labormaterialien..... | I |
| 6.1.2. | Geräte..... | II |
| 6.1.3. | Kultivierungsmedien..... | III |
| 6.1.4. | Auftauen und Passagieren der Zellen | V |
| 6.1.5. | Kultivierungsbedingungen und Prozess der Vorkultur | VI |
| 6.1.6. | Kriterien für einen erfolgreichen Prozessverlauf | IX |
| 6.1.7. | Berechnete Prozessantworten | X |
| 6.1.8. | Verwendetes Zellrückhaltesystem | X |
| 6.2. | Zusätzliche experimentelle Daten..... | XVI |
| 6.2.1. | Kultivierungsdaten..... | XVI |
| 6.2.2. | Prozess-Rezepte für den 2 L Reaktor und das Ambr® 250 | XXII |
| 6.2.3. | Bioprozessmodell und Simulationen | XXIII |
| 6.2.4. | Python Skript für die automatische Spülung..... | XXV |
| 6.2.5. | Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung..... | XXV |

| | |
|--------------------------------------|---------------|
| Abbildungsverzeichnis | XXVIII |
| Tabellenverzeichnis | XXXI |
| Literaturverzeichnis | XXXIII |
| Danksagung | XLI |
| Unterstützende Arbeiten | XLIII |
| Publikationsliste | XLIV |
| Curriculum Vitae | XLVI |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| CHO | Chinese Hamster Ovary (chinesischer Hamster Eierstock) |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| FB | Fed Batch |
| FMA | Feedmedium A |
| FMB | Feedmedium B |
| CSPR | zellspezifische Perfusionsrate |
| D | Verdünnungsrate |
| DO | Dissolved Oxygen (Gelöstsauerstoff) |
| DoE | Design of Experiments (statistische Versuchsplanung) |
| IgG ₁ | Immunglobulin-G ₁ |
| IVCC | Integral der Lebendzellzahl |
| kFB | kontinuierlicher Fed Batch |
| kFM | kontinuierliches Feedmedium |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| max. | maximal |
| Mio. | Millionen |
| mind. | mindestens |
| MTX | Methotrexat |
| PM | Produktionsmedium |
| rpm | Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| Q _P | zellspezifische Produktivität |
| SF | Shake Flask (Schüttelkolben) |
| SMD | Seed Culture Medium (Vorkulturmedium) |
| STD | Standard Prozess |
| VCC | Viable Cell Concentration (Lebendzellzahl) |
| vvd | Vessel Volumes per day (Gefäßvolumen pro Tag) |
| ZR | Zellrückhaltung |
| μ | Zellwachstumsrate |
| μPCCC | micro periodic counter current chromatography (periodische Gegenstromchromatografie) |

1. Einleitung

„Nichts geschieht auf einen Schlag; und es ist einer meiner größten und bewährtesten Grundsätze, daß die Natur niemals Sprünge macht. Das nannte ich das Gesetz der Kontinuität.“

Die Kontinuität beschäftigte nicht nur den weltberühmten Philosophen, Wissenschaftler und Namensgeber der Universität Hannover, Gottfried Wilhelm Leibniz, sondern wird auch heute noch als erstrebenswert erachtet. Der Mensch ist ein Gewohnheitstier und benötigt Fixpunkte und Sicherheit im Leben, um sein volles Potential zu entfalten. Dass Kontinuität die Basis der Produktivität bildet, wurde besonders während der Corona-Pandemie im Alltag vieler Arbeitnehmer deutlich. Fehlende Routinen und unberechenbare Umgebungsbedingungen beeinträchtigen dabei nicht nur die spezifische Produktivität eines Menschen, sondern auch die Qualität der geleisteten Arbeit.

Nicht anders ist es in der industriellen Herstellung von diagnostischen und therapeutischen Biopharmaka. Vergleichbar zur Produktion von Wirkstoffen in der Natur, führt fehlende Kontinuität zu unvorhersehbarer Chargenvarianz in der Produktqualität und -quantität, welche für die Anwendung beim Patienten schwerwiegende Folgen haben kann. Die aktuelle Covid-19 Pandemie hat dabei nicht nur die Signifikanz der menschlichen Produktivität aufgezeigt, sondern auch einen erhöhten Bedarf in der Herstellung von Impfstoffen und monoklonalen Antikörpern. Letztere werden heutzutage hauptsächlich in komplexen Kultivierungsprozessen mit Säugerzellen als Produktionsorganismen hergestellt. Für eine Umsatzsteigerung existieren hierbei zwei Ansätze: die Produktausbeute wird entweder durch die Steigerung der spezifischen Produktivität bei gleicher Anzahl an Produzenten erhöht oder durch die Steigerung der Anzahl produzierender Zellen. Während der Fokus in den letzten Jahrzehnten auf der Produktivitätsoptimierung von etablierten Herstellungsprozessen lag, verlagert sich das Interesse der biopharmazeutischen Industrie zunehmend auf die Etablierung kontinuierlicher Prozesse und Hochzelldichte-Kultivierungen. Für diese Betriebsweise wird die Kontinuität auf die Kultivierungsparameter im Reaktor ausgeweitet und die Produktqualität und -quantität durch gleichbleibende Umgebungsbedingungen sichergestellt. Dafür ist nicht nur die kontinuierliche Ressourcenzufuhr und Prozessüberwachung von

Bedeutung, sondern auch eine Intensivierung der Zelldichte durch Zellrückhaltung im Reaktor. Diese Arbeit beschäftigt sich folglich mit der Produktivitätssteigerung einer Antikörper produzierenden Säugerzelllinie durch Kontinuität und dessen Disruption sowie der Evaluierung einer alternativen Methode zur Zellretention.

2. Zielsetzung

Ziel der vorgelegten Dissertation ist die Steigerung der zellspezifischen Produktivität der verwendeten CHO-Zelllinie sowie eine Umsatzsteigerung durch einen Transfer in kontinuierliche Kultivierungsprozesse. Verschiedene Optimierungsstrategien im etablierten Fed Batch Prozess erweitern das Prozessverständnis hinsichtlich der Abhängigkeit der Produktion und Proliferation von dem pH-Wert der Kultivierung und der Nährstoffzufuhr. Durch die Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses ohne Zellrückhaltung, in dem anhand der Substratkonzentration die Zelldichte im Reaktor gesteuert wird, soll der Titer des monoklonalen Antikörpers gesteigert werden. Dazu wird ein vereinfachtes Bioprozessmodell zur in-silico Prozessoptimierung evaluiert. Zusätzlich dient der Chemostat einer Vertiefung der metabolischen Charakterisierung der CHO-Zelllinie im Hinblick auf Glucose-limitierungen und Wachstumsinhibierungen sowie Verknüpfungen der Stoffwechselwege mit Lactat, Glutamin, und Glutamat. Die Etablierung des Steady State soll im Anschluss an diese Arbeit mehrere dynamische DoE Untersuchungen innerhalb einer kontinuierlichen Kultivierung ermöglichen.

Neben der Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses ohne Zellrückhaltung soll die Anwendbarkeit einer mikrofluidischen Zellseparationsspirale als Zellretentionssystem für einen Perfusionsprozess untersucht werden. Die 3D-gedruckte Single-Use Spirale wird hinsichtlich der Retentionseffizienz bei verschiedenen Zelldichten, der Scherkräfteinwirkung auf die Zellen sowie der Langzeitstabilität des Materials getestet. Zusätzlich soll die Beeinträchtigung der Prozessstabilität durch Funktionsstörungen minimiert und die sterile Austauschbarkeit der Spirale bestätigt werden. Für die Prozessüberwachung werden eine Durchflussmesszelle zur at-line Detektion der Zellzahl im Reaktor und eine gravimetrische Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung vergleichend beurteilt. Neben der Evaluierung der mikrofluidischen Separationsspirale als alternatives Zellretentionssystem soll eine stabile Prozessoperation im Steady State als weitere Basis für dynamische DoE-Ansätze zur Produktivitätssteigerung dienen. Im Gegensatz zum Chemostaten ermöglicht die Zellretention hierbei eine Umsatzsteigerung durch erhöhte Zelldichten im Vergleich zum etablierten Fed Batch Prozess.

3. Theoretischer Hintergrund

Im folgenden Kapitel werden grundlegende theoretische Hintergründe erläutert, die zu einem besseren Verständnis dieser Arbeit beitragen. Zunächst wird die verwendete Zelllinie CHO DG44 inklusive Charakteristika und besonderer Aspekte des Metabolismus vorgestellt. Darauf aufbauend werden die Eigenschaften verschiedener Prozessstrategien sowie die in dieser Arbeit verwendeten Reaktorsysteme beschrieben. Abschließend wird ein Einblick in die Beschreibung der Kinetik und die Verwendung von Bioprozessmodellen als Ansatz zur in-silico Prozessoptimierung vermittelt.

3.1. CHO-Zellen in der biopharmazeutischen Industrie

Seit der Entdeckung der Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen von T. Puck im Jahre 1957^[1] wurden zahlreiche genetische Varianten für die industrielle Produktion rekombinanter Biopharmazeutika etabliert. Die meistgenutzte Zelllinie CHO DG44 mit mutationsbedingter Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Defizienz vereinfacht hierbei die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen^[2] und wird auch in dieser Arbeit verwendet.

Aufgrund der erhöhten Signifikanz von post-translationen Modifikationen für die Pharmakodynamik rekombinant hergestellter Proteine kommen meist ausschließlich Säugerzellen als Produktionsorganismen für Wirkstoffe in der Humanmedizin infrage. Die vergleichsweise simple Kultivierung der Suspensionszellen in serumfreiem Medium sowie die genetische Stabilität und die konstante Expressionsrate sind vor allem für die kontinuierliche Prozessführung Grundvoraussetzungen. Durch optimierte Prozessstrategien und stabiles Zellwachstum können hierbei Hochzelldichten bis zu mehreren 100 Mio. Zellen/mL erreicht werden.^[3-5]

Bestehende Herausforderungen in der Kultivierung tierischer Zellen sind negative Einflüsse durch mechanische Scherkräfte sowie die Einhaltung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung und einer homogenen Durchmischung. Während eine Sauerstofflimitierung sich negativ auf das Zellwachstum und die Viabilität auswirkt, führt eine zu hohe Begasung zu mechanischem Stress durch vermehrte Blasenbildung. Daher beinhalten die meisten Prozessstrategien eine umfangreiche

Überwachung sowie optimierte Prozessregelungsparameter, um optimale Kultivierungsbedingungen zu schaffen und für die Dauer der Kultivierung beizubehalten. Eine vorausgehende Versuchsplanung sowie Design of Experiments (DoE) Versuche kreieren hierfür einen Design Space mit optimalen Wachstums- und Produktionsbedingungen.

3.1.1. Substrate und Metabolismus

Wie viele Mikroorganismen verwenden Säugerzellen Glucose als Kohlenstoffquelle, um Energie für das Zellwachstum, die den Grundstoffwechsel und die Proteinproduktion zu generieren. Zwischen zelleigenen und durch protein-engineering eingefügten Proteinen wird hierbei nicht differenziert.

Ein Teil der Glucosemoleküle wird über Pyruvat zu Lactat konvertiert und sekretiert. Dies führt in hohen Konzentrationen zu einer Absenkung des pH-Wertes der Kultivierung und kann bei unzureichender Pufferwirkung des Mediums zellschädigend wirken.^[6] Die Lactatproduktion aus Glucose generiert zudem lediglich 4 ATP Moleküle pro Glucosemolekül und findet bevorzugt bei hohen Wachstumsraten und übermäßiger Verfügbarkeit von Glucose statt. Während bei einer vollständigen Oxidation zu Wasser und CO₂ mit ca. 30-32 Molekülen ATP pro Molekül Glucose wesentlich mehr Energie geschaffen wird, dient die Umwandlung zu Lactat der Regenerierung von NAD⁺ aus NADH. Diese als „Warburg Effekt“ bekannte Konversion erhöht die Verfügbarkeit von NAD⁺ für die Glykolyse und ist abhängig vom Glucoseverbrauch der Zellen.^[7] Zu Beginn der stationären Wachstumsphase der Zellen und bei verringerten Glucosekonzentrationen im Medium wird oftmals ein Umschalten zu Lactatkonsum beobachtet.^[8, 9] Die Lactatmoleküle werden hierbei zur Energiegewinnung über Pyruvat in den Citrat-Zyklus eingespeist.

Zusätzlich zu einer Kohlenstoffquelle wird für den Anabolismus von Nukleosiden und somit für die Zellproliferation und Proteinproduktion eine Stickstoffquelle benötigt. Dieser Bedarf wird bei Säugerzellkulturen durch die Zugabe von Aminosäuren gedeckt. Neben Glutamin als Hauptsubstrat können hier auch Serin, Prolin und Asparagin zu erhöhtem Zellwachstum beitragen.^[10] Während Glutamin weitgehend als essenziell anerkannt wird, deuten Studien auf eine erhöhte Signifikanz von Glutamat für den Zellstoffwechsel hin, sodass beide Aminosäuren als gleichwertig angesehen werden können.^[11] Ersichtlich wird dies, sobald eine Glutamin Depletion

vorliegt und die Zellen vermehrt Glutamat mithilfe von Ammoniak zu Glutamin konvertieren. Zudem lässt sich ebenfalls eine Verbindung zum Lactatstoffwechsel erkennen. Zusätzlich zu der vernachlässigbaren Lactatproduktion durch die anaerobe Glutaminolyse,^[12, 13] besteht eine Abhängigkeit von der Glutaminkonzentration. Nach der Depletion dieser Aminosäure wird bei ausreichender Verfügbarkeit von Glucose und Glutamat von einer Lactatproduktion zum Lactatkonsum gewechselt. Dieser Zustand wird beibehalten, bis die Glucosezugabe den Bedarf stark übersteigt oder die Glutaminkonzentration erneut einen Schwellenwert überschreitet.^[14, 15]

Der Zellmetabolismus wird dabei stark durch das Wohlbefinden der Zellen beeinflusst, welches hauptsächlich anhand der Zellviabilität bestimmt wird. Dazu wird das Verhältnis der totalen Zellzahl zur Lebendzellzahl gebildet und prozentual angegeben. Eine weitere Methode zur Detektion von Zellstress ist die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität im Kulturüberstand.^[16] Dieses zelleigene Enzym befindet sich bei viablen Zellen im Zytoplasma und wird nur bei Beschädigung der Zellmembran in das Kulturmedium freigesetzt. Daher deutet eine erhöhte LDH-Aktivität im Überstand auf eine verstärkte Scherstressbildung durch mechanische Einflüsse hin.

Neben zelleigenen Proteinen produziert die verwendete CHO DG44 Zelllinie zusätzlich einen monoklonalen Antikörper (mAK). Dieses rekombinante Protein ist ein Immunglobulin der Klasse G₁ (IgG₁) welches in das Kultivierungsmedium sekretiert und im Überstand quantitativ bestimmt wird. Der entsprechende Antikörpers ist in der Literatur bereits umfassend beschrieben.^[17] Die zellspezifische Produktivität (Q_P) dieses Proteins stellt einen Kernpunkt der Prozessoptimierung dar und wird anhand der zeitlichen Änderung der Produktkonzentration (P) in Abhängigkeit der Lebendzellzahl (VCC) berechnet.^[18]

$$Q_{Pi} = \frac{(P_i - P_{i-1})}{(t_i - t_{i-1}) \times \left(\frac{VCC_i + VCC_{i-1}}{2}\right)} \quad (1)$$

Durch die Verwendung des arithmetischen Mittels der Lebendzellzahlen in Formel (1) wird ein lineares Wachstum der Zellen zwischen den gewählten Zeitpunkten angenommen. Für kontinuierliche Prozessstrategien wird die

zusätzliche Verdünnung mittels Verdünnungsrate (D) einbezogen, sodass die Berechnung sich wie folgt darstellt:

$$Q_{Pi} = \frac{(P_i - P_{i-1})}{(t_i - t_{i-1}) \times \left(\frac{VCC_i + VCC_{i-1}}{2}\right)} + \frac{D(P_{i-1})}{VCC_{i-1}} \quad (2)$$

3.2. Reaktorbetriebsweisen in der Bioprozesstechnik

Aufgrund ihrer im Idealfall gleichmäßigen Durchmischung der Zellsuspension bei zuverlässiger Temperaturregelung und Begasung, werden Rührkesselreaktoren häufig für Tierzellkultivierungen favorisiert. Neben dem Reaktortyp muss jedoch auch eine Prozessführungsstrategie abhängig der Zelllinie und der Prozessanforderungen gewählt werden. Hierbei wird zwischen diskontinuierlicher, halb-kontinuierlicher und kontinuierlicher Betriebsweise differenziert.

3.2.1. Diskontinuierliche Prozessführung

Die **diskontinuierliche** Betriebsweise (**Batch**) besitzt von den hier vorgestellten Strategien die kürzeste Prozessdauer. Zu Beginn wird ein Produktionsmedium vorgelegt und die Zellzahl steigt, bis die Substrate depletiert oder inhibitorische Nebenprodukte akkumuliert sind. Der Batch Betrieb bietet eine hohe Flexibilität kombiniert mit geringen Anschaffungskosten und ist somit vor allem für Screening Prozesse oder Proof of Concept Versuche geeignet. Zudem wird diese Strategie für die Vorkultur verwendet, bei der wiederholt Zellen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase entnommen und in frisches Medium passagiert werden. Das typische Wachstumsverhalten in einem diskontinuierlichen idealen Rührkessel ist in Abbildung 1 dargestellt.

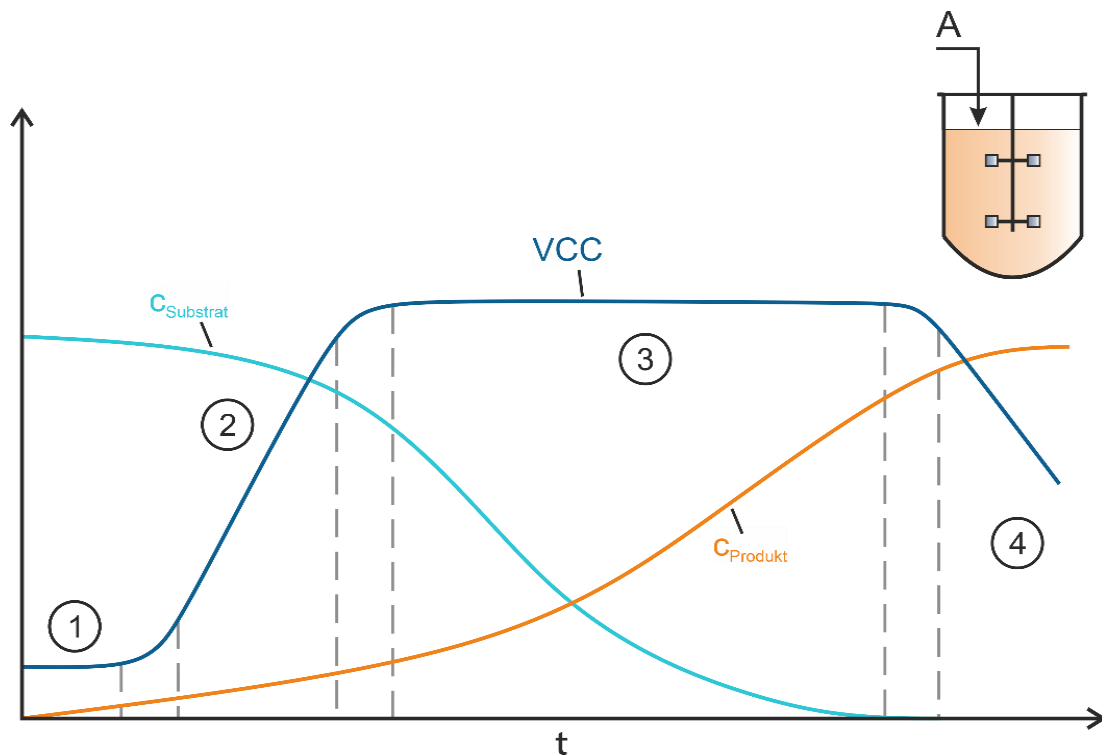


Abbildung 1: Die vier Phasen des Zellwachstums (VCC) im Batch Betrieb (Übergänge gestrichelt) mit zusätzlicher Substrat- (c_{Glucose}) und Produktkonzentration (c_{Produkt}).

Das Zellwachstum ist in vier Hauptphasen unterteilt und beginnt mit einer Anpassung der Zellen an die Umgebungsbedingungen (1). Nach dieser kurzen lag-Phase beginnt das exponentielle Wachstum (2). Durch die Verstoffwechslung der vorhandenen Substrate und eventuelle Anreicherung an inhibitorischen Nebenprodukten stellt sich ein Gleichgewicht der Wachstums- und Sterberate ein, sodass die stationäre Phase erreicht wird (3). Abschließend überwiegen die Limitierung und Inhibierung der Zellen, sodass der Prozess in der Absterbephase (4) beendet wird. Die Produktbildung findet hierbei abhängig von der verwendeten Zelllinie wachstumsgekoppelt oder nicht-wachstumsgekoppelt statt und erreicht kurz vor Beginn der Absterbephase ihr Maximum. In der Literatur werden für CHO-Zellen Produktausbeuten von bis zu 0,9 g/L mAK bei 8,5 Mio. Zellen/mL beschrieben.^[19, 20]

Durch erhöhte Anforderung der Vor- und Nachbereitung und den damit verbundenen Totzeiten und laufenden Kosten für Reinigung und qualifiziertes Personal eignet sich diese Betriebsweise nicht für industrielle Produktionsprozesse. Daher wird hier meist eine andere Prozessstrategie bevorzugt, die im Folgenden vorgestellt wird.

Beim **Zufütterungssatzbetrieb** oder auch **Fed Batch** wird eine Substratlimitierung durch die Zufuhr definierter Feed-Lösungen umgangen und die Wachstumsphase der Zellen verlängert. Durch die Zufütterung können die maximale Lebendzellzahl und der kumulativ erreichte Produkttiter gesteigert werden. Aufgrund des deutlich erhöhten Umsatzes im Vergleich zum Batch Betrieb bei geringfügig intensiviertem Aufwand durch die verlängerte Prozessdauer und die Herstellung der Feed-Lösung wird diese Betriebsweise für die Kultivierung tierischer Zellen bevorzugt. Ein typischer Verlauf des in dieser Arbeit verwendeten 2-Phasen Fed Batch Prozesses ist in Abbildung 2 dargestellt.

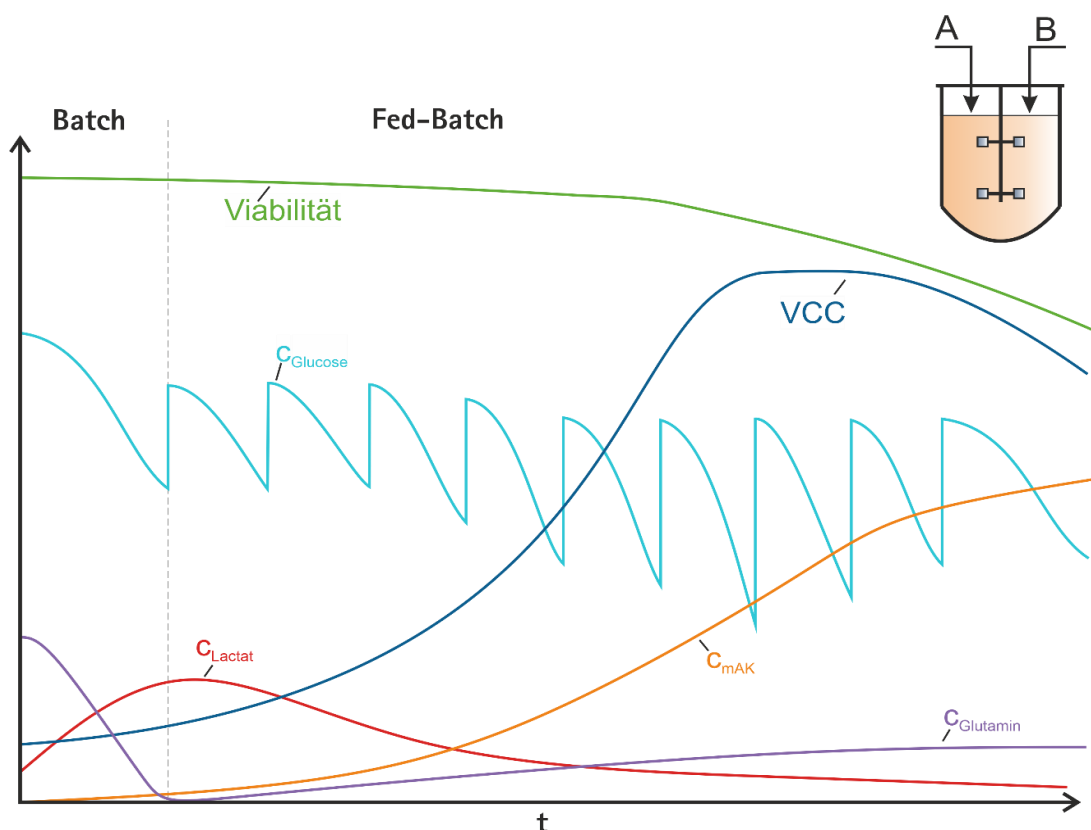


Abbildung 2: Skizzierter Verlauf der Fed Batch Prozess Plattform (geändert aus [14]). A beschreibt hierbei das vorgelegte Basalmedium und B die Zufütterung.

Der Prozess beginnt zunächst mit einer Batch Phase. Anschließend startet die tägliche Zufütterung mithilfe einer oder mehrerer Feed-Lösungen. In dieser Arbeit besteht die Zufütterung aus zwei Komponenten: Feedmedium A (FMA) und Feedmedium B (FMB). FMA enthält Glucose sowie einen Großteil der für das Zellwachstum und die rekombinante Produktion benötigten Aminosäuren. Das stark basische FMB hingegen enthält hauptsächlich die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in hohen

Konzentrationen.^[14] Bei Bedarf wird eine reine Glucose-Lösung als dritte Komponente zugefüttert, um eine Glucoselimitierung zu unterbinden. Die maximale Lebendzellzahl (VCC) wird nach 7-9 Tagen erreicht, woraufhin die stationäre Wachstumsphase eintritt. Der Prozess wird an Tag 12 bei ca. 3 g/L mAK-Titer beendet, um eine qualitative und quantitative Beeinträchtigung des Produktes durch die sinkende Zellviabilität und die damit einhergehende Sekretion zelleigener Proteasen zu vermeiden. Literaturangaben bestätigen mAK-Ausbeuten von 1-13 g/L im Fed Batch Betrieb bei bis zu 26 Mio. Zellen/mL.^[21, 22]

3.2.2. Kontinuierliche Prozessführung

Mit der Entwicklung neuer Technologien in der online-Überwachung und zusätzlicher Möglichkeiten der Prozessregelung, gewinnt der **kontinuierliche Betrieb** zunehmend an Bedeutung für die biopharmazeutische Industrie. Diese Prozessführung beinhaltet einen kontinuierlichen Zustrom von Substrat-Lösungen sowie einen gleichwertigen Abfluss von Kulturmedium. Hier lässt sich zusätzlich zwischen zwei Zielsetzungen unterscheiden: Steady State Kultivierungen mit Zellverlust und intensiviert Hochzelldichte-Prozesse mithilfe von Zellrückhaltesystemen.

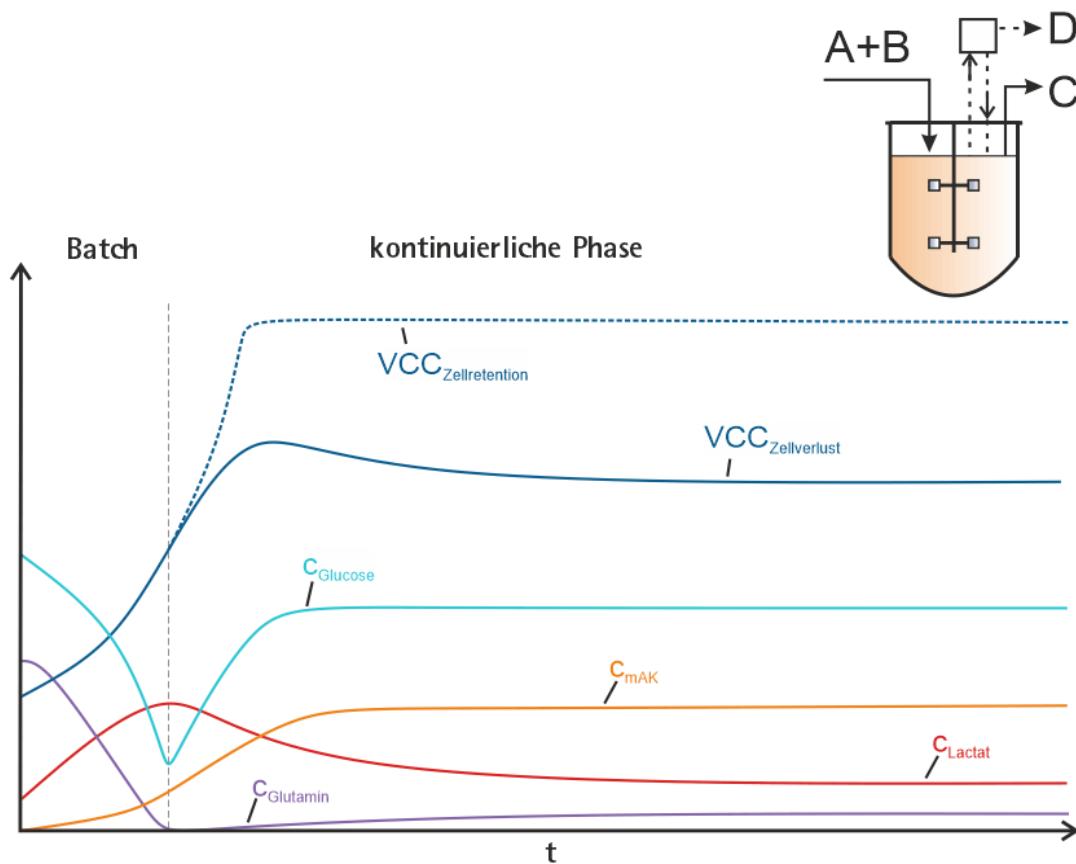


Abbildung 3: Skizze eines kontinuierlich betriebenen idealen Rührkesselreaktors mit Steady State durch Zellrückhaltung und Zellbleed (blau gestrichelt) oder Zellverlust (blau). A und B beschreiben hierbei Basal- und Feedmedien. D beschreibt zellfreies Medium nach Zellretention und C einen zellhaltigen Bleed.

Bei einer kontinuierlichen Kultivierung mit Zellverlust ist die eingesetzte Verdünnungsrate für das Zellwachstum und die angestrebte Lebendzellzahl im Steady State entscheidend. Die Wachstumsrate wird typischerweise über die zugeführte Substratkonzentration (Chemostat) oder die Kulturtrübung (Turbidostat) anhand einer Anpassung der Verdünnungsrate geregelt. Auch eine Regelung über eine konstante pH-Wert Messung (Auxostat) ist möglich, wird jedoch selten angewandt.

Geringe Verdünnungsraten resultieren in minimiertem Zellverlust und vermeintlich höherer Biomasseausbeute, sind jedoch mit dem Risiko einer Substratlimitierung oder Inhibitorakkumulation verbunden. Demgegenüber stehend sollte die Verdünnungsrate die maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) der verwendeten Zelllinie nicht überschreiten, um ein Auswaschen der Zellen zu verhindern. Eine optimale

Verdünnungsrate (D_{opt}) lässt sich anhand von historischen Daten und dem Prinzip der Monod-Kinetik mithilfe von Formel (3) berechnen. Dazu wird zusätzlich die eingehende Substratkonzentration (S_{ein}) und eine Affinitätskonstante (K_S) eingeführt, bei der das Zellwachstum halbmaximal ist.^[23]

$$D_{opt} = \mu_{max} * \left(1 - \sqrt{\frac{S_{ein}}{K_S + S_{ein}}} \right) \quad (3)$$

Der Produkttiter wird durch die Einstellung einer optimalen Verdünnungsrate erhöht, die einer prozessindividuellen Wachstumsrate mit maximaler Produktbildung entspricht. Somit ist die kontinuierliche Prozessführung optimal für hohe Umsätze bei gleichbleibender Qualität geeignet. Aufgrund der Komplexität von tierischen Zellen legt ein Großteil der Forschung den Fokus zunächst weiterhin auf die Erweiterung des metabolischen Verständnisses von CHO-Zellen. Hierbei beeinträchtigt bereits eine geringfügige Änderung der Umgebungsbedingungen die Stabilität eines stationären Zustandes durch die Aktivierung einer Kaskade von internen Zellantworten. Daher werden Steady State Betriebsweisen in der Industrie derzeit bevorzugt bei chemischen Prozessen mit schneller Gleichgewichtseinstellung durchgeführt.

Zellrückhaltesysteme bieten eine Möglichkeit der kontinuierlichen Prozessführung ohne Zellverlust. Diese Hochzelldichte-Kultivierungen resultieren in Produktausbeuten von $> 5 \text{ g/L} \cdot \text{d}$ und der Generierung von nahezu zellfreiem kontinuierlich abgeführtem Überstand für die anschließende Produktaufreinigung.^[24] Bei der Implementierung einer Zellrückhaltung wird zusätzlich zur Verdünnungsrate ein weiterer Parameter für einen erfolgreichen Prozessverlauf berücksichtigt. Die zellspezifische Perfusionsrate (CSPR) gibt das Verhältnis des Mediendurchflusses (F) zur Lebendzellzahl (VCC) im betrachteten Reaktorvolumen (V_R) an und wird für eine optimale Proliferation und Produktivität überwacht und geregelt (Formel (4)).^[25]

$$CSPR = \frac{F}{VCC * V_R} \quad (4)$$

Die optimale CSPR ist abhängig von der verwendeten Zelllinie und der

Medienzusammensetzung. Eine Minimierung des Ressourcenverbrauchs durch die Anwendung der geringsten nötigen CSPR für einen stabilen Prozessverlauf mit der angestrebten Lebendzellzahl liegt hierbei im Fokus der Industrie. Konstantinov *et al.* beschreibt die push-to-low Strategie, bei der die CSPR im Steady State schrittweise reduziert wird, bis eine Beeinträchtigung der Lebendzellzahl oder Viabilität erkennbar ist. Die resultierende $CSPR_{min}$ beschreibt die optimale Performance des verwendeten Mediums. Eine Reduzierung der CSPR lässt sich dabei durch geringere Flussraten oder höhere VCC Setpoints erreichen. Aufgrund möglicher Sauerstofflimitierungen und der steigenden Viskosität bei Hochzelldichtekultivierungen wird eine Reduzierung der Flussrate bei gleichbleibender Lebendzellzahl empfohlen. Dazu muss ein zusätzlicher Zellbleed implementiert werden, um die Zellzahl konstant zu halten. Die Reduzierung der Flussrate ist jedoch nur sinnvoll, solange keine Inhibition des Zellwachstums durch toxische Nebenprodukte oder Metabolite stattfindet.^[26]

3.2.3. Zellrückhaltesysteme

Für einen intensivierten kontinuierlichen Prozess werden Zellrückhaltesysteme benötigt, um den Zellverlust zu minimieren und Hochzelldichten zu erreichen. Die verfügbaren Systeme werden anhand ihrer Eigenschaften, und der Zelleigenschaften kategorisiert, durch die eine Separation möglich wird. Dabei stehen vor allem die Zellgröße und die Zelldichte für die Kultivierung von Suspensionszellen im Fokus.^[27] Statische und dynamische membranbasierte Methoden sowie Tangentialflussfiltration (TFF) bilden mit 70-80 % den heutigen Hauptanteil der in der Literatur beschriebenen Systeme und werden auch in der biopharmazeutischen Industrie favorisiert.^[28] Membranfreie Methoden basieren hingegen entweder auf der Zentrifugalkraft (Hydrozyklon, Tellerzentrifugen) oder der Gravitation (Settler). Zusätzlich werden vermehrt neue Systeme entwickelt, bei denen die Zellen durch mikrofluidische Strömungseffekte separiert werden.^[29]

Bei der Verwendung von membranbasierten Systemen werden Zellen anhand ihrer Größe durch einen Differenzdruck über die Membran zurückgehalten, während kleinere Moleküle wie monoklonale Antikörper (mAK) durch die Poren gelangen und somit abgetrennt werden. Durch den direkten Kontakt der Oberfläche mit den Zellen sind diese Systeme sehr anfällig für Verblockungen und sogenanntes Fouling der

Poren, was besonders bei Langzeitversuchen mit hohen Zelldichten eine Herausforderung darstellt. Statische Methoden sind hierbei stärker betroffen als dynamische oder Tangentialflussfiltrationen, die einen aktiven Fluss der Suspensionskultur generieren, der die Poren teilweise freispülen kann. Besonders die Alternierende Tangentialflussfiltration (ATF) gewinnt zunehmend an Aufmerksamkeit, da neben der verringerten Verblockung zusätzlich der Scherstress auf die Zellen durch Diaphragma-Pumpen minimiert wird.^[30, 31] Auch die Austauschbarkeit der Zellretentionssysteme bei Funktionalitätseinschränkung und das damit verbundene Kontaminationsrisiko stellen eine Herausforderung dar, welche die zunehmende Entwicklung von Single-Use Systemen fördert. ATF und TFF bieten hierbei eine Modularität und Skalierbarkeit in Kombination mit einer reduzierten Verblockungsrate und gehören daher zu den meistverwendeten Systemen.^[28, 32] Im Zuge der aufkommenden Popularität der Hochzelldichte-Kultivierungen werden jedoch die Kapazitätsgrenzen dieser Systeme sichtbar. Die erhöhte Viskosität der Suspensionskultur führt zu steigender Produktretention, welche zwar durch Erhöhung der Porengröße umgangen werden kann, im Gegenzug für ein zellfreies Permeat jedoch zusätzliche Filtrationsschritte erfordert.^[33-35]

Porenverblockungen und Produktretention sind für membranfreie Systeme keine Herausforderungen. Akustische Settler waren zeitweise die meistverwendete Alternative zu membranbasierten Methoden, da sie durch zusätzliche akustische Schwingungen die langen Sedimentationszeiten herkömmlicher Settler außerhalb der kontrollierten Umgebungsbedingungen des Reaktors umgehen.^[27, 28, 36] Durch ihre mangelnde Skalierbarkeit und fehlende Übertragung in den Single-Use Bereich bedienen akustische Settler allerdings nicht mehr die aktuellen Anforderungen an die industrielle Produktion rekombinanter Proteine.^[37, 38] Zellretention durch diskontinuierliche oder kontinuierliche Zentrifugation der Zellen ist oft einfach in der Anwendung, birgt jedoch erhöhte Kontaminationsrisiken sowie vermehrtes Zellsterben und Aggregatbildung durch die hohe Krafteinwirkung auf die Zellen.^[39, 40] Während Wirbelschichtzentrifugen bereits eine zellschonenden Alternative zur Zellabtrennung nach der Zellernte darstellen,^[41, 42] gibt es derzeit keinen kontinuierlichen Ansatz während des Kultivierungsprozesses. Auch Hydrozyklone separieren die Zellen selektiv durch die Einwirkung der Zentrifugalkraft und sind als Single-Use Anwendung verfügbar sowie größtenteils skalierbar. Hierbei bestehen

jedoch erneut Herausforderungen in der Hochzelldichte, welche eine unvollständige Abtrennung und somit einen konstanten Zellverlust herbeiführt.^[43]

Durch jüngste Innovationen in der additiven Fertigung werden zunehmend mikrofluidische chipbasierte Methoden entwickelt, um Zellen zu fokussieren, zu sortieren und zu separieren. Zu den meistverwendeten Systemen gehören hierbei Trägheitsabscheider mit geraden oder gebogenen Mikrokanälen.^[44] Für die kontinuierliche Zellrückhaltung von tierischen Zellen wurden in der Literatur bereits mehrfach mikrofluidische Separationsspiralen untersucht.^[45–48] Die Systeme unterscheiden sich dabei im Aufbau nur geringfügig. Während die parallel betriebenen Spiralen bei Kwon *et al.*^[47] einen hohen Durchsatz mit bis zu 26,5 Mio. Zellen/mL erlauben, wurden Langzeitversuche lediglich mit > 5 Mio. Zellen/mL durchgeführt. Die Ursache liegt hierbei im Funktionsprinzip der Auftrennung. Bei einem laminaren Fluss innerhalb der rechteckigen Mikrokanäle werden die Zellen von drei verschiedenen Kräften beeinflusst und größenabhängig aufgeteilt. Die Zellen fokussieren sich hierbei am Ort des Kräftegleichgewichts, an dem der Auftrieb durch den Schergradienten (shear-gradient-induced lift) und die Kanalwand (wall-induced lift) gleichermaßen induziert wird.^[44, 49, 50] Aufgrund der spiralförmigen Anordnung der Kanäle tritt zusätzlich eine dritte Zugkraft (Dean drag force) auf, welche die Anordnung der Zellen im Equilibrium beschleunigt. Diese destabilisiert bestimmte Punkte des zuvor beschriebenen Kräftegleichgewichts, sodass die Zellen sich schließlich größenabhängig an der inneren Kanalwand der Spirale fokussieren (Abbildung 4).^[45–48]

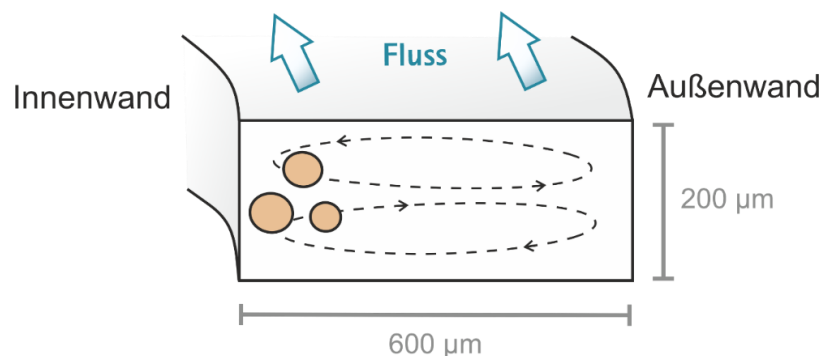


Abbildung 4: Positionierung der Zellen im gebogenen mikrofluidischen Kanal einer Separationsspirale (geändert aus [33]).

Erhöhte Zellkonzentrationen führen hierbei zu Zell-Zell-Interaktionen und einem gegenseitigem Abstoßen der Zellen. Dadurch wird die Fokussierung verschlechtert und die Trenneffizienz mit zunehmender Kultivierungsdauer reduziert. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von Enders *et al.* bei der Untersuchung von Zellkonzentrationen im Bereich von 5-20 Mio. Zellen/mL gezeigt.^[45]

Durch die niedrigen Kosten und die Flexibilität in der additiven Fertigung bezüglich des Designs und der Materialverfügbarkeit besitzen mikrofluidische Spiralseparatoren viel Potential für den Einsatz als kontinuierliche Zellrückhaltesysteme im Labormaßstab. Die multiplen Anschlussmöglichkeiten von verschiedenen Schlauchdurchmessern und Materialien sind vor allem für die Skalierbarkeit von Interesse. Zudem ermöglicht der parallele Betrieb multipler Spiralen eine Auftrennung und Verdünnung der Suspensionskultur, sodass die Herausforderungen der Hochzelldichte möglicherweise bewältigt werden können.

3.2.4. Verwendete Reaktorsysteme

Für die industrielle Herstellung monoklonaler Antikörper existieren Bioreaktorsysteme in verschiedenen Maßstäben von wenigen Millilitern im Prozess-Screening bis mehreren tausend Litern im Produktionsmaßstab. Neben der Reaktorgröße spielt das Material und die Wiederverwendbarkeit der Reaktorgefäße eine große Rolle. Single-Use Reaktoren aus Einwegmaterialien vereinfachen die Einhaltung der GMP (Good Manufacturing Practice) Richtlinien durch das verminderte Risiko von Kreuzkontaminationen und die Vereinfachung der komplexen Qualifizierungs- und Validierungsverfahren. Der reduzierte Reinigungs- und Sterilisationsaufwand führt zu erheblichen Kosteneinsparungen bei industriellen Produktionsprozessen. Dementgegen stehen Mehrwegreaktoren aus Glas oder Edelstahl, die eine erhöhte Vor- und Nachbereitung benötigen, bei großen Volumina jedoch deutlich robuster gegenüber dem steigenden Innendruck im Reaktor sind. Während Einwegreaktoren mit einem maximalen Volumen von 2000 L produziert werden, besitzen pharmazeutische Unternehmen wie Lonza oder Genentech Edelstahl Systeme bis zu 25 m³.^[51] In dieser Arbeit wurden neben 500 mL Single-Use Schüttelkolben drei verschiedene Reaktorsysteme verwendet: Der 2L Mehrwegreaktor Biostat ®BDCU und die Single-Use Systeme Ambr®250 und

Ambr®15 (Abbildung 5). Die Reaktoren werden im Folgenden in absteigender Größe vorgestellt.

Der größte in dieser Arbeit verwendete Benchtop Bioreaktor ist der 2L Biostat® BDCU mit Glasgefäß und abnehmbarer Heizmanschette. Durch Anschlüsse im Deckel können verschiedene Sensoren und Zugangsventile eingebracht und verwendet werden (Abbildung 5, A).

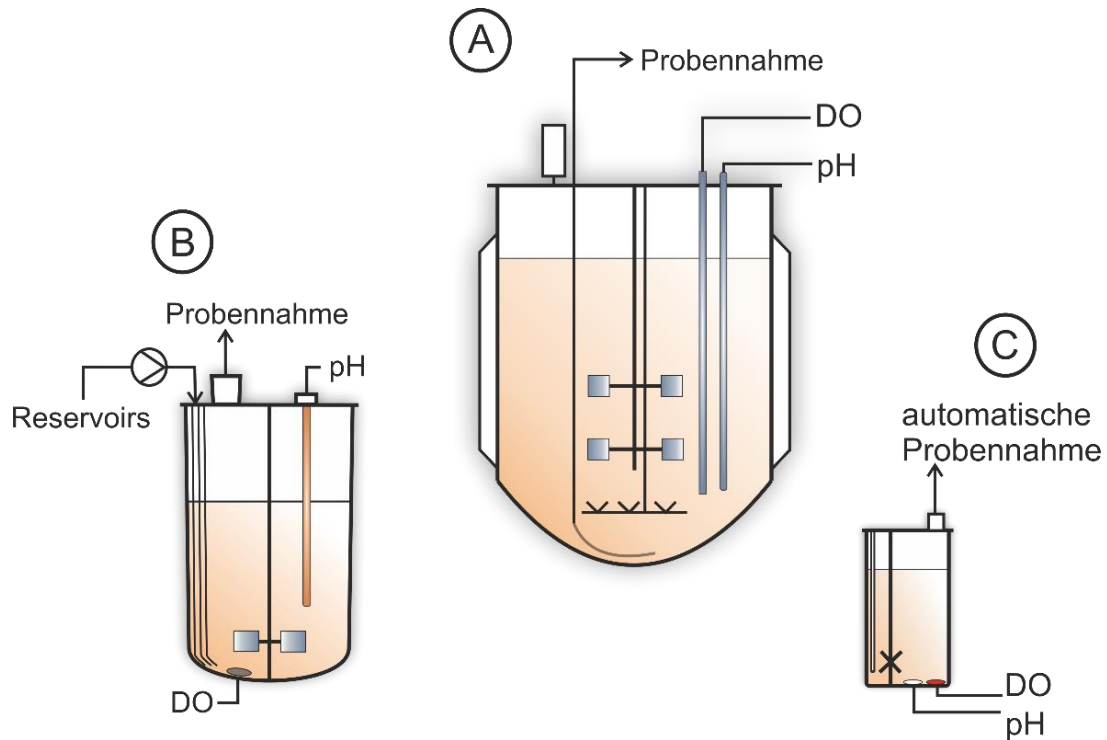


Abbildung 5: Skizze der verwendeten Bioreaktorsysteme: (A) Biostat® BDCU 2L, (B) Ambr® 250, (C) Ambr® 15.

Durch die hohe Anzahl an potenziellen Zugängen, eignet sich dieses System vor allem für Bypass Versuche und die Testung neu entwickelter Sensorik. Die bereits etablierte online Analytik ermöglicht hierbei die Überwachung von pH-Wert und Gelöstsauerstoff (DO) mittels Elektroden sowie der Temperatur und des Abgases. Für die homogene Durchmischung und Begasung der Kultur werden zwei 3-Blatt-Segmentrührer und ein Ringsparger verwendet. Im Gegensatz zu den Single-Use Systemen muss der Glasreaktor vorher manuell heißdampfsterilisiert werden. Die verwendete Prozessstrategie wird anschließend über ein Steuerungsrezept in BioPAT® MFCS programmiert und durchgeführt.

Das modulare Ambr® 250 System umfasst ein Modul mit zwei Single-Use Bioreaktoren, angeschlossen an eine Steuereinheit und einen Computer. In Abbildung 5, B ist beispielhaft ein 250 mL Reaktorgefäß ohne die implementierten Pumpreservoirs dargestellt. Dieser Reaktor umfasst weniger Zugänge als der 2L Reaktor, da die Zugabe von Medien und Korrekturmitteln hauptsächlich über die fünf Pumpreservoirs erfolgt. Im Deckel des Gefäßes existieren zwei Zugänge über Luer-Lock-Verbindungen, welche für die Inokulation und Zellernte sowie Bypässe oder zusätzliche Medien und Korrekturmittel genutzt werden können. Zudem wurde die Septumkappe, die den Hauptzugang des Reaktors luftdicht verschließt in dieser Arbeit durch einen 4-way Additionsport ersetzt, welcher vier weitere Zugänge schafft. Die implementierte online Sensorik umfasst eine pH-Elektrode, einen photometrischen Sensor Spot für Gelöstsauerstoff (DO) sowie eine Abgasanalytik und einen Schaumsensor. Da die Abluft im Gegensatz zu Mehrwegreaktoren nicht gekühlt wird, führt eine Verblockung der Abluftfilter durch Schaum oder Luftfeuchtigkeit zur einer Steigerung des Innendrucks im Reaktor. Daher besitzt das System zusätzlich zum photometrischen Schaumsensor ebenfalls einen integrierten Drucksensor. Die Begasung der Kultur erfolgt über ein Spargerrohr und die Durchmischung wird über zwei Schrägblattrührer und vier Schikanen gewährleistet. Gesteuert werden die Reaktoren durch eine Software auf dem integrierten Computer der Steuereinheit, welches vom Benutzer programmiert wird und während der Kultivierung angepasst werden kann.

Als letztes und kleinstes System soll das automatisierte Mikrobioreaktorsystem Ambr® 15 vorgestellt werden. Im Gegensatz zu den üblicherweise runden Reaktorgefäßen, besitzen die Gefäße des Ambr® 15 eine quaderförmige Geometrie, welche anschließend beim Scale-Up berücksichtigt werden muss (Abbildung 5, C). Zusätzlich wird jegliche Interaktion mit den Reaktorgefäßen während der Kultivierung vom Benutzer programmiert und automatisiert durch einen Roboter durchgeführt. Die Überwachung und Steuerung funktioniert äquivalent zum größeren Ambr® 250 System durch die implementierte Software. In den Kultivierungsstationen des Systems können hierbei zusammen bis zu 24 Gefäße gleichzeitig betrieben werden.

Im Gegensatz zum Ambr® 250 wird neben dem Gelöstsauerstoff auch der pH-Wert optisch mittels Sensor Spot am Gefäßboden bestimmt und überwacht. Die pH-Wert und DO-Regelung durch Begasung kann dabei für jedes Reaktorgefäß einzeln programmiert und über ein kleines Spargerrohr durchgeführt werden. Durchmischt wird die Kultur anhand eines 2-Blatt Segmentrührers. Eine geometrisch bedingte Herausforderung ist die potenzielle Verblockung der kleinen Begasungskanäle durch Schaum, Präzipitat oder Zelldebris. Daher wird die Zugabe von Antischaummittel prophylaktisch auf Intervalle von 12-24 h erhöht.

3.3. In-silico Prozessoptimierung

Prozessoptimierungen in der biopharmazeutischen Industrie basieren weitestgehend auf Design of Experiment (DoE) und "wet lab" Ansätzen und sind daher zeit-, kosten- und arbeitsintensiv. Durch die Verwendung von theoretischen, wissensbasierten Modellen und die Anpassung an kontinuierliche Betriebsweisen kann die resultierende Simulation eines optimierten Prozesses wiederholte Experimentreihen ersetzen. In dieser Arbeit wird geprüft, ob die Beschreibung der verwendeten Kultivierungsprozesse anhand einer vereinfachten Kinetik möglich ist und die in-silico produzierten Vorhersagen in der Realität verifiziert werden können.

3.3.1. Bioprozessmodellierung

Das Ziel einer Bioprozessmodellierung ist die Beschreibung von Kultivierungsdaten, um die Effekte auf ausgewählte Qualitätsattribute wie VCC, Produktivität oder Produktqualität evaluieren zu können.^[52, 53] Vor allem bei industriellen Produktionsprozessen kann die Integration historischer Daten in mathematische Modelle und die Vorhersage möglicher Prozessantworten die Identifikation potenzieller Targets für DoE-Experimente erleichtern.^[54] Für Monod-ähnliche kinetische Modelle wurde bereits eine gute Anpassung an existierende experimentelle Datensätze verschiedener Prozessstrategien mit Säugerzellen gezeigt^[55-57] und eine Steigerung des mAK Produkttiters um 30 % durch Optimierung der Fütterungsprofile erreicht.^[58]

Die hier verwendeten linearen Gleichungssysteme und Parametergrenzen sind im Anhang (6.2.3) zu finden. Dabei werden folgende vereinfachte Annahmen in einem ideal durchmischten Reaktor getroffen: Das Zellwachstum ist abhängig von der Glucose-, Glutamin- und Lactatkonzentration im Reaktor. Eine Lactatproduktion

findet in Gegenwart von Glutamin statt und wechselt auf einen Lactatkonsum sofern Glutamin depletiert ist. Zusätzlich wird Glutamat bei einer Glutaminlimitierung zu Glutamin konvertiert und in das Kulturmedium sekretiert. Die rekombinante Produktbildung des mAK wird hierbei als wachstumsgekoppelt angenommen. Für die Chemostat Kultivierung wird ein Zellverlust von 100 % implementiert, ein Perfusionsprozess besitzt hingegen eine Verlustrate von ca. 30 % der Zellen im Durchfluss.^[59]

3.3.2. Simulation optimierter Prozessbedingungen

Anhand von Bioprozessmodellen mit hoher Parametergüte und folglich guter Anpassung können optimierte Prozessstrategien durch Optimierungsalgorithmen simuliert werden. Somit bieten sie eine Alternative zu kosten- und arbeitsintensiven Screening Experimenten.^[60] Vor allem für Quality by Design (QbD) Ansätze stellt die in-silico Optimierung eine gute Alternative zu wiederholten „wet-lab“ Experimenten dar, um einen Design Space zu finden und die Endproduktqualität in den Produktionsprozess zu integrieren.^[61] Die Prozessoptimierung ist hierbei nicht auf den Produkttiter oder die maximale Lebendzellzahl beschränkt, jedoch lediglich innerhalb des Kalibrationsbereiches gültig. Auch die Glykosylierungsmuster und Faltung von rekombinanten Proteinen wie mAK, sowie die biopharmakologische Wirkung in klinischen Studien können durch mathematische Abstrahierung der komplexen intrazellulären Vorgänge simuliert werden.^[61-63] Besonders im Bereich der therapeutischen Anwendungen für seltene Erkrankungen haben in-silico Methoden die Charakterisierung von Wirkmechanismen und die Erkennung von Nebenwirkungen revolutioniert. Robuste Modelle benötigen jedoch erheblich mehr Rechenkapazität und Datenvielfalt als vereinfachte Modelle, sodass die Verwendung von Digital Twins in den letzten Jahren für die industrielle Produktion von Biopharmazeutika in den Fokus gerückt ist. Hierbei wird die Prozesseffizienz durch die Integration und Kommunikation zwischen physischen und virtuellen Systemen mittels Echtzeitüberwachung gesteigert.^[64] Dies erleichtert die Charakterisierung und Regelung von kritischen Prozessparametern wie Medienzusammensetzung oder Temperatur und die Identifikation von Targets für anschließende DoE-Experimente.^[65]

4. Ergebnisse und Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Kultivierung einer mAK produzierenden CHO DG44 Zelllinie in verschiedenen Bioreaktorsystemen und der Produktivitätssteigerung durch den Transfer in verschiedene kontinuierliche und semi-kontinuierliche Betriebsweisen. Dabei werden die Kultivierungsprozesse in Fed Batch, Chemostat und Perfusionsbetrieb differenziert. Trotz der unterschiedlichen Betriebsweisen in der Hauptkultur beginnt jeder Prozess mit einer dreitägigen Batch Phase. Für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Prozesse bleiben die standardisierten Prozessbedingungen sowie die Passagendauer und Produktivitätsinduktion in der Vorkultur erhalten (Anhang 6.1.5).

Wie im Anhang beschrieben, wird eine diskontinuierliche Hauptkultur mit 0,3 Mio. Zellen/mL inokuliert und einmal täglich beprobt, während ein kontinuierlicher Prozess mit einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen/mL beginnt und je nach Bedarf zwei- bis dreimal täglich beprobt wird. Diese offline Proben werden hinsichtlich der Zellzahl, Viabilität und Produktkonzentration sowie der Glucose-, Lactat-, Glutamin- und Glutamatkonzentration analysiert.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungsprozesse anhand des Zellwachstums, dem Produkttiter sowie der Änderungen des Metabolismus in Relation zur zellspezifischen Produktivität und der Zellgröße dargestellt und diskutiert.

4.1. Fed Batch Prozess Plattform

Für die Produktion monoklonaler Antikörper werden CHO-Zellen und andere Säugerkzellen derzeit hauptsächlich im diskontinuierlichen Fed Batch Betrieb kultiviert. Obwohl diese Betriebsweise seit Jahrzehnten in der biopharmazeutischen Industrie etabliert ist, sind die optimalen Prozessbedingungen nicht für alle CHO-Zelllinien gleich. Bei der Verwendung einer neuen Zelllinie wird durch DoE-Experimente zunächst ein Design Space festgelegt, in dem die Produktquantität und -qualität nicht signifikant beeinträchtigt wird. Diese Grenzen sind aufgrund der komplexen Validierungs- und Qualifizierungsverfahren von industriellen Produktionsprozessen weit um das Optimum gefasst, sodass eine minimale Varianz bestehen darf. Im Folgenden soll eine Produktivitätssteigerung eines Fed Batch

Prozesses innerhalb der etablierten Prozessgrenzen sowie eine Untersuchung der Skalierbarkeit erreicht werden.

4.1.1. Produktivitätssteigerung durch pH-Shifts

Die verwendete CHO DG44 Zelllinie weist eine Sensitivität gegenüber bestimmter Faktoren auf, deren Auftreten mit der Steigerung der zellspezifischen Produktivität einhergeht.^[14, 15, 66] Der pH-Wert der Suspensionskultur ist hierbei durch online Sensorik besonders einfach zu detektieren und kann zudem durch die bestehende Regelung schnell und zuverlässig korrigiert und verändert werden. Veröffentlichungen belegen zudem einen sichtbaren Effekt einer pH-Wert Änderung auf den Zellmetabolismus.^[15, 66, 67] Da eine Kultivierung aus verschiedenen Zellwachstumsphasen mit unterschiedlichen metabolischen Charakteristika besteht, ergibt sich die Hypothese eines definierten Zeitpunktes der Änderung mit maximalem Einfluss auf die Produktivität. Aufgrund der Annahme einer wachstumsgekoppelten Produktbildung wird zunächst der Effekt eines pH-Shifts in der exponentiellen Wachstumsphase an Tag 5 (pH_5) sowie zu Beginn der lag-Phase (pH_0) untersucht.

Die pH-Shifts beinhalten eine Setpoint Änderung vom optimalen pH-Wert (7,1) zur oberen Grenze des etablierten Design Space (7,3) und wurden mithilfe des automatisierten Ambr® 15 Systems in Zweifachbestimmung durchgeführt. Als Referenz wurden die Daten von vier parallel unter Standardbedingungen betriebenen Ambr® 15 Reaktoren durch Mittelwertbildung zusammengefasst. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse für das Zellwachstum und die Produktivität sowie die Zellgröße und die Glucosekonzentration zusammengefasst.

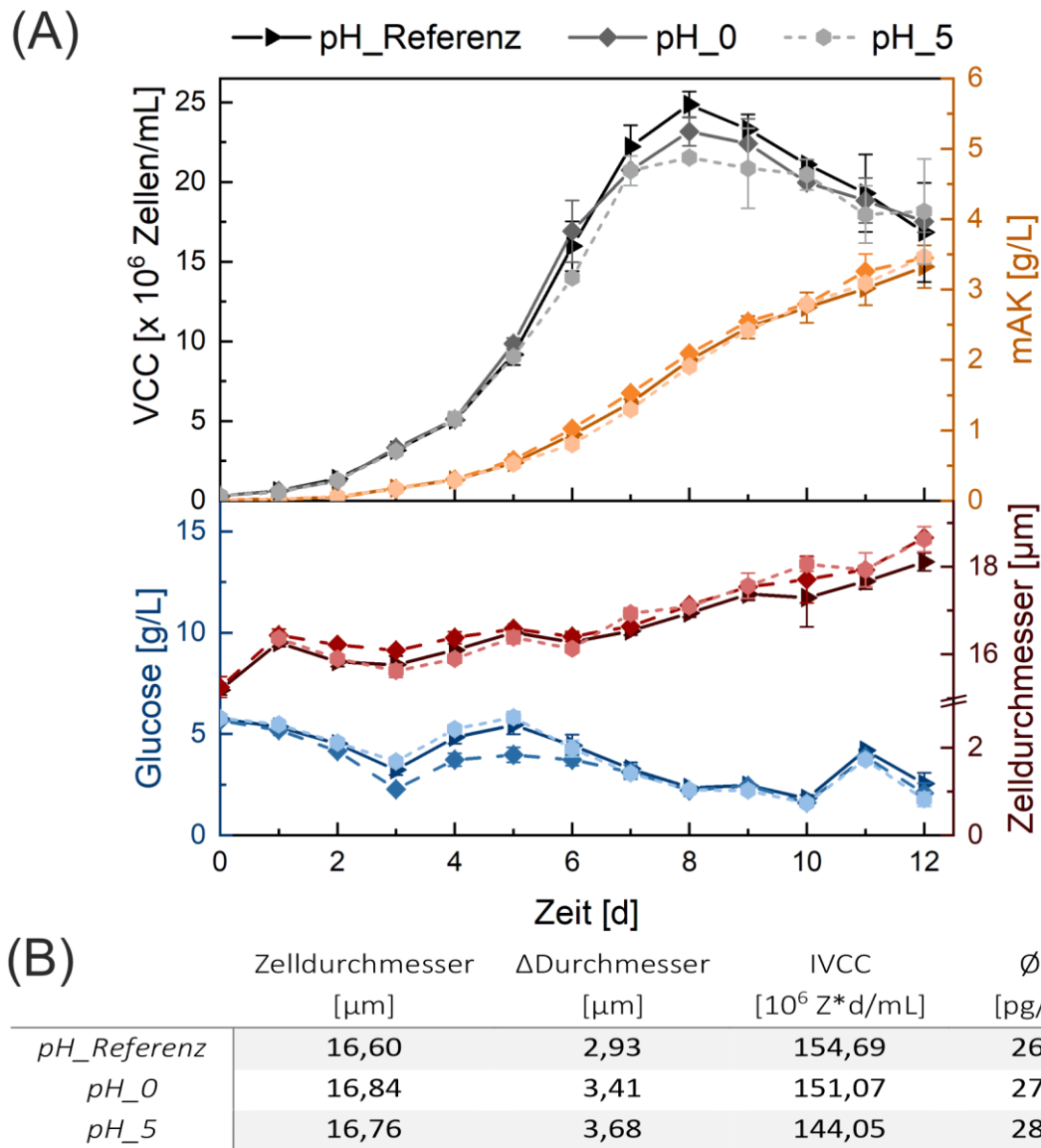


Abbildung 6: Fed Batch Kultivierung mit pH-Änderung nach 0 und 5 Tagen und Standard als Referenz im Ambr® 15 Mikrobioreaktorsystem. Offline Messwerte in (A) sowie berechnete Parameter in (B) (geändert aus Schellenberg *et al.* 2022)^[68]

Beide Ansätze der pH-Shifts zeigen ein verringertes Zellwachstums im Vergleich zur Referenz. Dieser Effekt tritt bei einem Shift nach 5 Tagen (*pH_5*) mit einer maximalen VCC von 21,54 Mio. Zellen/mL stärker auf als bei einem Shift von Beginn an (*pH_0*) mit 23,17 Mio. Zellen/mL (Referenz: 24,86 Mio. Zellen/mL). Auch die erhöhte zellspezifische Produktivität ist in *pH_5* mit einem Anstieg von bis zu 8 % deutlicher erkennbar als bei *pH_0* (3,5 %). Zudem tritt erst ab dem Zeitpunkt der pH-Änderung an Tag 5 eine sichtbare Abweichung der Lebendzellzahl von der Referenz und ein leichter Anstieg der Zellgröße auf, wodurch der pH-Shift als Ursache für eine

metabolische Umstellung angenommen wird. Zusätzlich wird eine Relation zwischen der Vergrößerung der Zellen und einer gesteigerten Produktivität beobachtet. Die Glucosekonzentration liegt mit 2-6 g/L während des gesamten Prozesses im optimalen Konzentrationsbereich und gewährleistet somit eine ausreichende Substratversorgung.

Die Änderung des pH-Wertes in der exponentiellen Phase beeinflusst den Metabolismus der Zellen und die daraus resultierende Wachstumsrate und spezifische Produktion stärker als ein höherer pH-Wert von Beginn an. Anhand dieser Beobachtung lässt sich die Hypothese bestätigen, dass eine plötzliche Änderung der Kultivierungsbedingungen und die daraus resultierende temporäre Anpassung der Zellen zu einer Produktivitätssteigerung beitragen kann. Literaturangaben beschreiben einen vergleichbaren Effekt bei der Produktion von anti-CD52 monoklonalen Antikörpern in CHO-Zellen.^[69]

4.1.2. Übertragung des Standard Fed Batch Prozesses in das Ambr® 250

Das für die pH-Shifts verwendete Mikrobioreaktorsystem Ambr® 15 vereinfacht Screening Experimente durch die Möglichkeit 24 parallel durchführbarer Kultivierungen in minimalem Volumen, bringt jedoch durch die abweichende eckige Geometrie der einzelnen Reaktorgefäße einige Herausforderungen im Scale-Up mit sich. Zusätzlich beeinträchtigt der erschwerte Zugang zu den einzelnen Reaktorgefäßen während der Kultivierung die flexible Implementation und Evaluierung von Zellretentionssystemen und externer Sensorik. Zur Verifizierung der Skalierbarkeit wurde der Standard Fed Batch Prozess in ein weiteres Bioreaktorsystem (Ambr® 250) mit geringem Arbeitsvolumen und der zusätzlichen Möglichkeit, Bypässe und at-line Sensoren anzuschließen, übertragen. Dazu wurden zwei Kultivierungen unter Standardbedingungen durchgeführt und die Ergebnisse in Abbildung 7 aufgetragen.

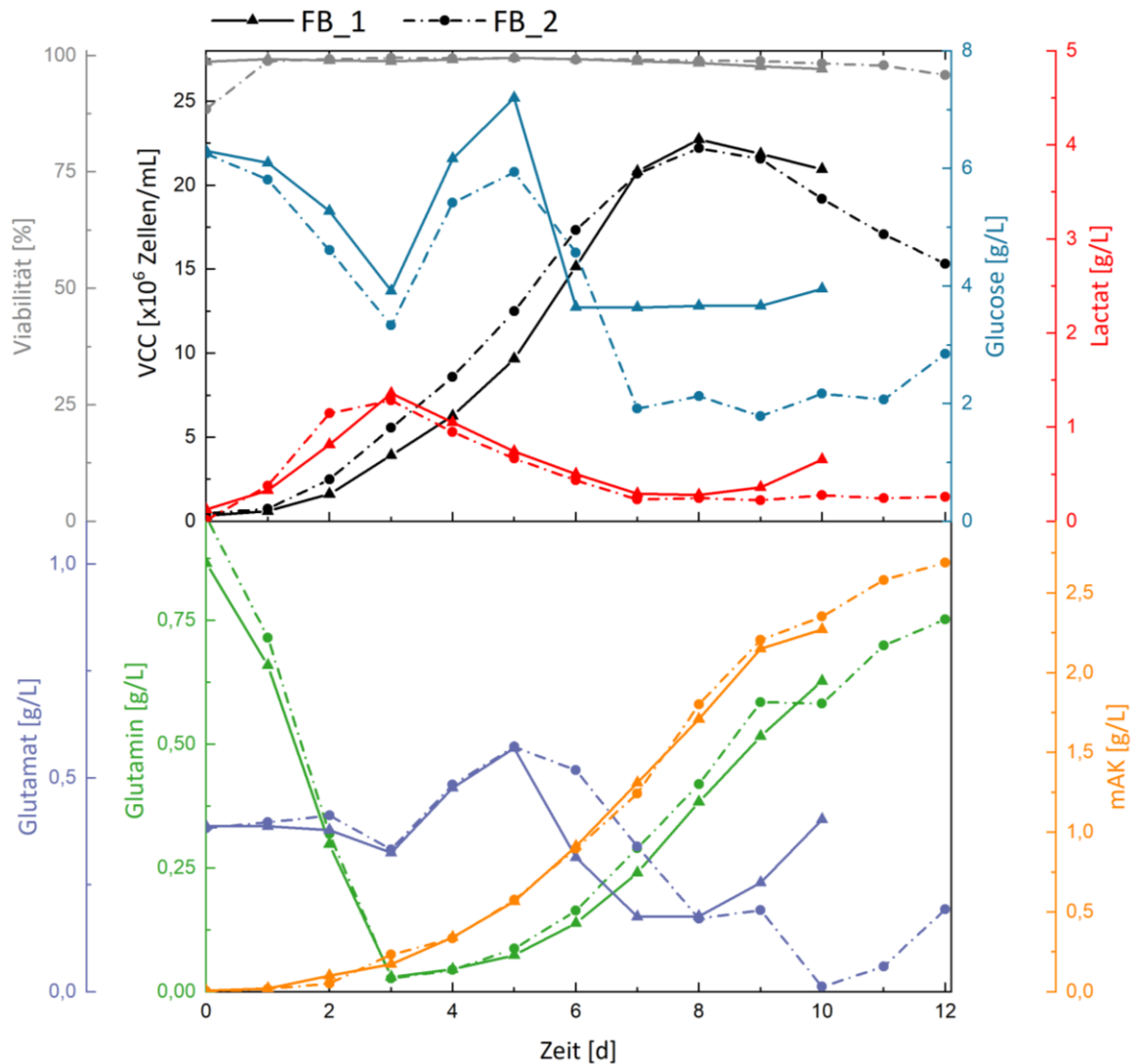


Abbildung 7: Fed Batch Standard Kultivierungen im Ambr® 250. Vergleich der offline Messwerte von zwei Kultivierungen mit identischen Prozessbedingungen.

Neben der gleichbleibend hohen Viabilität verläuft auch die Lebendzellzahl (VCC) bei beiden Kultivierungen ähnlich mit einem Maximum an Tag 8 zwischen 22,2 Mio. und 22,8 Mio. Zellen/mL. Der Verlauf der Wachstumskurven unterscheidet sich bis zum Erreichen des Maximums hierbei leicht in der Steigung: Während die exponentielle Phase in FB_2 früher erreicht wird, kann in FB_1 ab Tag 5 ein stärkerer Anstieg beobachtet werden. Die gemessenen Metabolitenkonzentrationen sind mit einem Lactatmaximum an Tag 3 bei ca. 1 g/L und einem sichtbaren Wechsel von Lactatproduktion zu Lactatkonsum vergleichbar. Der leichte Anstieg in FB_1 an Tag 10 kann hierbei durch eine Messungenauigkeit verursacht worden sein. Für die Evaluierung der Abweichungen zwischen den Kultivierungen in der Glucose-

konzentration, muss zusätzlich das Zellwachstum berücksichtigt werden. Da die exponentielle Phase in FB_1 später erreicht wird und somit weniger Zellen vorliegen, akkumuliert sich bis Tag 6 zunächst mehr Glucose im Medium als in FB_2. Somit besteht zwischen den Kultivierungen eine Konzentrationsdifferenz von ca. 2 g/L während der stationären Wachstumsphase, welche sich jedoch nicht auf die Lebendzellzahl oder den Produkttiter auswirkt. Letzterer steigt bei FB_1 auf 2,3 g/L (Prozessende an Tag 10) und bei FB_2 auf 2,8 g/L mAK (Prozessende an Tag 12) an. Der vergleichbare Verlauf deutet darauf hin, dass in FB_1 ebenfalls ein kumulativer Titer von ca. 3 g/L bei einer Prozessdauer von 12 Tagen erreicht worden wäre.

In den Konzentrationsprofilen der Aminosäuren beider Kultivierungen ist zunächst eine Depletion von Glutamin während der Batch Phase erkennbar. Anschließend wird Glutamat zu Glutamin umgewandelt, sodass sich dieses bei Überschreitung des zellinternen Bedarfs erneut im Medium akkumuliert. Vergleichbar zur Lactatkonzentration, ist ein Anstieg in FB_1 im Glutamatprofil an Tag 10 erkennbar. Hierbei ist nicht ersichtlich, ob ein metabolischer Schalter durch die vorliegenden Substratkonzentrationen im Medium oder ein Messfehler in der Glutamat-Analytik vorliegt.

Aufgrund der minimalen Abweichungen der Kultivierungen untereinander und der Einhaltung der Prozesskriterien wird die Übertragung des Fed Batch Prozesses in das Ambr® 250 System als erfolgreich bewertet. Die gezeigten Kultivierungen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit durch Mittelwertbildung zusammengefasst und als Referenz oder auch Standard (STD) Kultivierung betrachtet.

4.2. Etablierung eines Chemostat Prozesses

Der Chemostat zeichnet sich durch eine Regelung der Zelldichte anhand der Verdünnungsrate und der sich einstellenden Substratkonzentration aus und beinhaltet keine Zellrückhaltung. Da durch den unvermeidbaren Zellverlust keine Umsatzsteigerung durch Hochzelldichten erreicht werden kann, ist diese Betriebsweise für industrielle Produktionsverfahren ungeeignet. Die konstanten Zelldichten und Umgebungsbedingungen im stationären Zustand, dem „Steady State“, sind jedoch ideal für die Untersuchung der Zelllinien hinsichtlich ihrer metabolischen Eigenschaften. Eine Beeinflussung des Zellwachstums durch die Änderung einzelner

Kultivierungsparameter ist direkt anhand der Lebendzellzahl detektierbar. Führt die Änderung zu einer Wachstumsinhibierung, sinkt die Zellwachstumsrate unter die Verdünnungsrate und die Zellen werden aus dem Reaktor gewaschen. Liegt hingegen eine Wachstumsinduktion vor, steigt die Zellzahl im Reaktor.

Zur Etablierung eines kontinuierlichen Chemostat Prozesses ohne Zellrückhaltung wird für ein besseres Prozessverständnis zunächst ein semi-kontinuierliches Fütterungsprofil im Vergleich zum täglichen Bolus-Feed evaluiert. Hierbei werden Limitierungen durch die Bolus-Zufütterung sowie eine temporäre Irritation der Zellen durch plötzliche Veränderungen der Substratverfügbarkeit und Medienkomposition im Reaktor untersucht.

4.2.1. Semi-kontinuierlicher Substrat-Feed als Übergang zur kontinuierlichen Prozessführung

In Kapitel 4.1.1 konnte gezeigt werden, dass pH-Shifts während eines Fed Batch Prozesses zu einer verringerten Wachstumsrate und einer Produktivitätssteigerung führen. Da der mAK-Endtiter jedoch lediglich um 0,1 g/L ansteigt, gleicht die induzierte Produktivität nicht die reduzierte Zelldichte aus. Daher soll eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität ohne Wachstumsinhibierung der Zellen durch eine kontinuierliche Prozessführung erreicht werden. Um zunächst die Hypothese zu überprüfen, dass plötzliche Veränderungen eine temporäre Anpassung der Zellen erfordern, wurde der tägliche Bolus-Feed durch ein semi-kontinuierliches Fütterungsprofil im Ambr® 250 ersetzt. Für den Transfer wurde der tägliche prozentuale Bolus des Standardprozesses jeweils auf 24 h aufgeteilt (Anhang 6.1.5, Tabelle 14). Die Semi-Kontinuität ist hierbei durch eine tägliche minimale Anpassung der Feedflussraten gegeben. Durch die reduzierte Fluktuation in den Umgebungsbedingungen wird eine Steigerung der maximalen Lebendzellzahl bis hin zur Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase durch Zellstressminimierung erwartet. Das Zellwachstum, die Produktkonzentration sowie das Glucoseprofil sind in Abbildung 8 dargestellt.

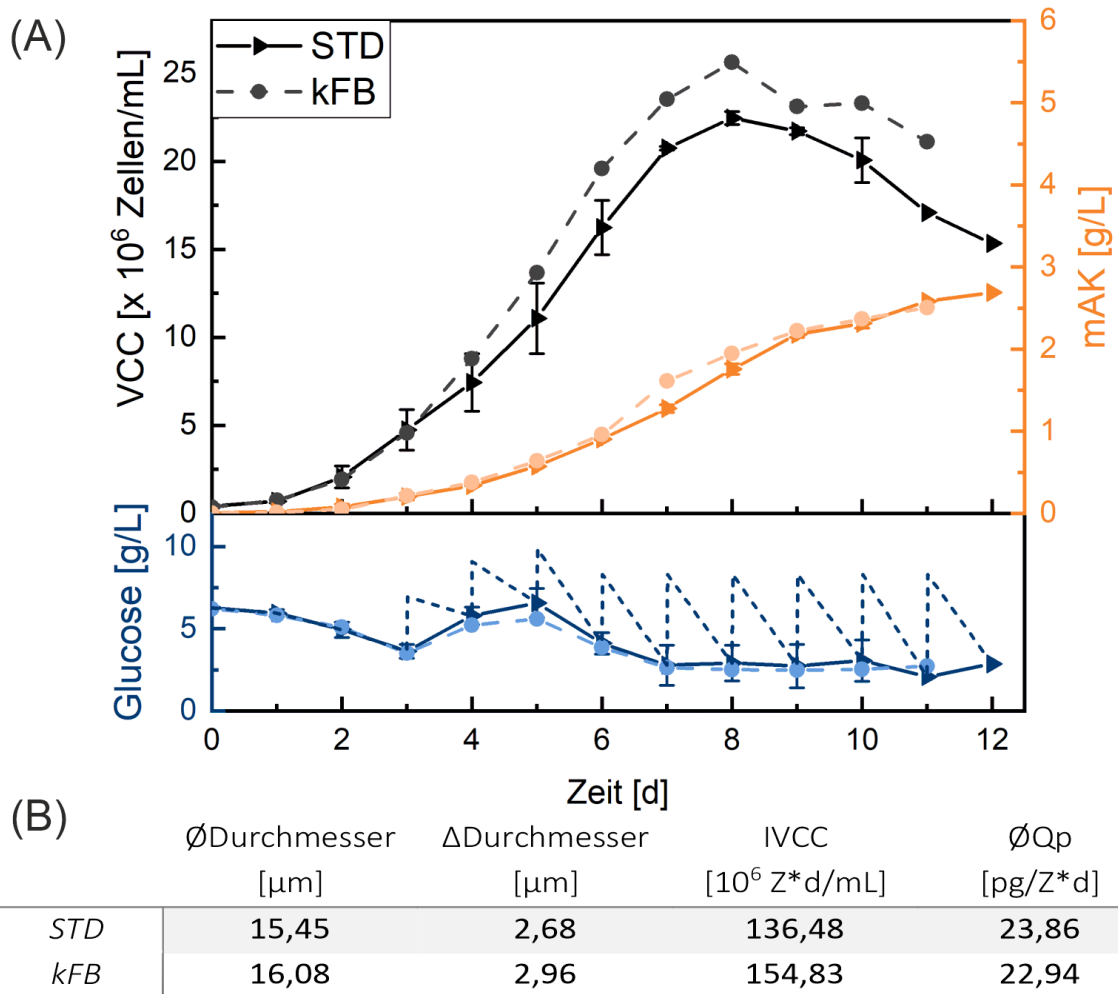


Abbildung 8: Semi-kontinuierlicher Feed (kFB) mit Standard Fed Batch (STD) als Referenz im Ambr® 250. Offline Messwerte in (A) sowie die durchschnittliche Zellgröße, maximale Größendifferenz, IVCC und zellspezifische Produktivität Q_p bis Tag 11 in (B).

Das Ersetzen der täglichen Bolus-Feeds durch einen semi-kontinuierlichen Zufluss führt zu einem verbessertem Zellwachstum und einer höheren maximalen Lebendzellzahl (VCC) von 25,6 Mio. Zellen/mL an Tag 8 (Standard: 22,5 Mio. Zellen/mL, Anhang 6.2.1, Tabelle 15). Trotz höherer Zelldichten und vergleichbarer Glucosekonzentrationen in den offline Proben ist der kumulative mAK-Titer fast identisch zum Standardprozess ($\sim 2,5$ g/L an Tag 11). Für die weitere Berechnung der in Abbildung 8 (B) gezeigten Größen wurde die kürzere Prozessdauer von kFB berücksichtigt und ein Zeitraum von 11 statt 12 Tagen betrachtet. Hierbei zeigt sich eine Steigerung der IVCC um 13 % mit einer reduzierten zellspezifischen Produktivität (-4 %) bei der Anwendung eines semi-kontinuierlichen Feeds.

Um einen erweiterten Einblick in die Substratversorgung zu bekommen, wurde die im Bolus enthaltene Glucosekonzentration im Standard auf den täglichen offline Glucosemesswert addiert. Hierbei wird das tatsächliche Glucoseprofil ersichtlich (Abbildung 8 (A), blau gestrichelt), welches sich stark vom semi-kontinuierlichen Profil unterscheidet. Während der Setpoint von 5 g/L Glucose im semi-kontinuierlichen Ansatz auch mit einer zusätzlichen Glucose-Lösung ab Tag 6 nicht mehr erreicht werden kann, oszillieren die Glucosekonzentrationen im Standard stets um den Setpoint und erreichen dabei kurzzeitig bis zu 9 g/L Glucose. Die Zellen werden somit mit höheren Substratkonzentrationen versorgt und produzieren während der täglichen temporären Anpassung vermehrt mAK. Der semi-kontinuierlich Ansatz ohne die täglichen Schwankungen erreicht somit eine Steigerung der maximalen VCC, verringert jedoch gleichzeitig die Glucoseaufnahmerate sowie die mAK-Produktionsrate.

Durch die pH-Shifts aus Kapitel 4.1.1 und die hier angewandte semi-kontinuierliche Substratzufuhr konnte eine Korrelation von Zellwachstum und Produktivität zu plötzlichen Veränderungen der Kultivierungsbedingungen bestätigt werden. Die temporäre Irritation der Zellen führt zu verringertem Zellwachstum bei gleichzeitiger Produktivitätssteigerung. Um eine mögliche Nährstofflimitierung im semi-kontinuierlichen Ansatz auszuschließen, kann zusätzlich eine kontinuierliche Glucoseregulation etabliert werden, um das Erreichen des Setpoints von 5 g/L zu gewährleisten.

Da im semi-kontinuierlichen Ansatz keine Verlängerung der Zellwachstumsphase auftritt, wird im nächsten Schritt ein zellhaltiger Bleed etabliert, um die Akkumulation von toxischen Nebenprodukten zu verhindern und einen Steady State ohne Absterbephase zu erreichen.

4.2.2. Übertragung in einen kontinuierlichen Prozess mit Zellverlust

Ein erfolgreicher Transfer der verwendeten Zelllinie in eine Semi-Perfusion mit Zellrückhaltung durch tägliche Zentrifugation wurde bereits durch Literaturangaben bestätigt.^[40] Für die Etablierung eines kontinuierlichen Chemostat Prozesses ohne Zellrückhaltung wird eine vergleichbare Medienzusammensetzung aus Produktionsmedium (PM), Feedmedium A (FMA) und Feedmedium B (FMB) als kontinuierliches Feedmedium (kFM) verwendet. Dabei erfüllt jedes Medium

bestimmte Voraussetzungen für die Nährstoffversorgung der Zellen: Das Basalmedium (PM) sorgt während der Batch Phase für eine ausreichende Verfügbarkeit von Glucose und Glutamin für das Zellwachstum und besitzt eine definierte Pufferwirkung. Die kontinuierlichen Feedmedien enthalten durch die zugesetzten Feed-Lösungen A und B verschiedene Aminosäuren und hohe Glucosekonzentrationen für die Erhaltung der Proliferation und die mAK Produktion während der kontinuierlichen Phase.^[14]

Aufbauend auf den Ergebnissen der Semi-Perfusion von Janoschek *et al.*^[40] wird nach einer dreitägigen Batch Phase eine Verdünnungsrate von $1 \text{ vvd} = 0,042 \text{ /h}$ mit kFM1 (Anhang 6.1.3, Tabelle 10) angestrebt, welche die veröffentlichte Perfusionsrate von 1 vvd repliziert. Im Verlauf der Kultivierung soll die Verdünnungsrate anhand des vorliegenden Zellwachstums angepasst werden, um einen Steady State einzustellen. Die Ergebnisse für das Zellwachstum und die Metabolitenkonzentrationen des 2L Chemostat Prozesses sind in Abbildung 9 dargestellt.

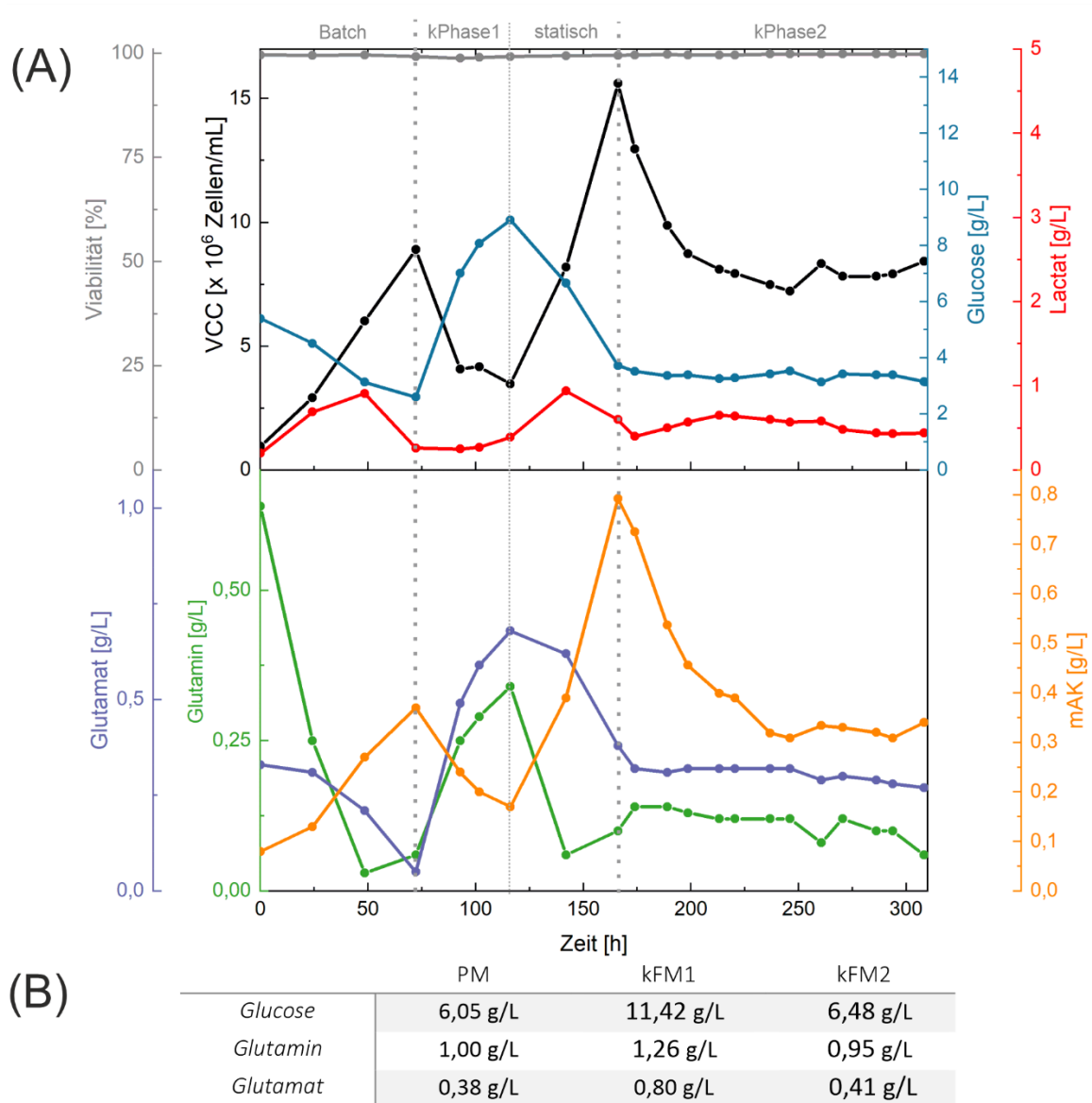


Abbildung 9: Chemostat Kultivierung C_1 im Biostat® BDCU 2L. Offline Messwerte, und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B).

Abbildung 9 zeigt ein deutliches Auswaschen der Zellen von ca. 9 Mio. Zellen/mL auf 3,5 Mio. Zellen/mL bei einer Verdünnungsrate von 0,042 /h zu Beginn der kontinuierlichen Phase ab Tag 3. Zeitgleich steigt die Glucosekonzentration im Reaktor über 8 g/L. Um eine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch eine Glucoseinhibierung sowie weitere Zellverluste zu vermeiden, wird die Flussrate zunächst verringert und nach weiteren 24 h gestoppt. Der Prozess befindet sich somit erneut in einer statischen Phase.

Neben der Glucosekonzentration ist während der kontinuierlichen Phase ein starker Anstieg der Glutamat- und Glutaminkonzentrationen erkennbar. Letztere resultiert in Kombination mit der hohen Glucoseverfügbarkeit zu Beginn der statischen Phase in einer erneuten Lactatproduktion mit einem Maximum von 0,94 g/L bei 142 h. Durch die schnelle Depletion von Glutamin auf unter 0,1 g/L und den hohen Glucoseverbrauch der Zellen, kann anschließend ein erneutes metabolisches Umschalten von Lactatproduktion zu Lactatkonsum beobachtet werden. Im Gegensatz zum Konzentrationsanstieg der Substrate wurde der produzierte monoklonale Antikörper im Verlauf der kontinuierlichen Phase von 0,37 g/L auf 0,17 g/L verdünnt. Durch die schnelle Erholung der Zellen in der statischen Phase steigt die mAK-Konzentration nachfolgend wachstumsgekoppelt mit der VCC stark an.

Die zweite kontinuierliche Phase startet bei 166 h mit einer VCC von 15 Mio. Zellen/mL, 3,5 g/L Glucose, 0,79 g/L mAK und einer neuen Feedmedienzusammensetzung. Das Medium kFM2 besitzt einen höheren Anteil an Basalmedium (PM) für eine verringerte Glucosekonzentration im Vergleich zur ersten kontinuierlichen Phase (kFM1). Dies verringert die Wahrscheinlichkeit einer Überfütterung der Zellen bei der angestrebten Flussrate von 0,042/h. In Abbildung 9 (A) ist im Verlauf der zweiten kontinuierlichen Phase (ab 166 h) zu erkennen, dass die zugeführten Substratkonzentrationen sowie die Lactatkonzentration nur geringfügig schwanken. Anders verhält es sich bei der Lebendzellzahl: in den ersten 24 h ist bereits ein deutlicher Zellverlust zu erkennen. Eine Rekalibration der eingestellten Pumpraten ergab eine Differenz zwischen realer und angestrebter Flussrate durch die Verformung der Pumpschläuche während der Sterilisation (Anhang 6.2.1, Tabelle 16). Dadurch lag die reale Verdünnungsrate über der angestrebten und die Zellen wurden ausgewaschen. Nach einer Korrektur der Pumpraten wird die Verdünnungsrate anschließend im Zeitraum von 190 h bis 270 h in Abhängigkeit der VCC schrittweise an eine konstante Zelldichte bei 0,029 /h angenähert. Ein vollständiger Austausch des Reaktorvolumens erfolgt hierbei nach ca. 36 h, sodass der Prozess nach einem erfolgreichen 38-stündigen quasi-Steady State Zustand mit 0,3 g/L mAK und 8 Mio. Zellen/mL beendet wurde.

Die resultierenden Metabolitenkonzentrationen sowie die Lebendzellzahl und Viabilität sind in Tabelle 1 im Vergleich zum Fed Batch Prozess^[14, 15]

zusammengefasst. Zusätzlich sind anhand der offline Messungen berechnete Charakteristika wie die spezifische Produktivität (Q_P) und die Perfusionsrate (CSPR) zur Evaluierung der Nährstoffversorgung dargestellt. Die täglich abgetrennte Produktkonzentration (mAK-Umsatz) im Zellbleed wird im Chemostaten zusätzlich durch die Multiplikation der mAK-Konzentration im Reaktor mit der Verdünnungsrate berechnet.

Tabelle 1: Vergleich der Chemostat Kultivierung C_1 mit dem etablierten 12-tägigen Fed Batch Standard Prozess im Biostat® BDCU 2L.

| | quasi-Steady State | Fed Batch Standard |
|------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| VCC | 8 Mio. Zellen/mL | bis 24,4 Mio. Zellen/mL |
| Viabilität | 99,8 % | 97-100 % |
| Glucose | 3,4 g/L | Setpoint: 5 g/L |
| Lactat | 0,5 g/L | max. 1,2 g/L |
| Glutamin | 0,1 g/L | 0-0,8 g/L |
| Glutamat | 0,3 g/L | 0-0,4 g/L |
| mAK-Umsatz | 0,2 g/L*Tag | Bis 2,8 g/L in 12 Tagen ¹ |
| Zell Durchmesser | 17,3 μ m | 14-16 μ m |
| Q_P | 29,0 pg/Zelle*Tag | 26,4 pg/Zelle*Tag |
| CSPR | 85,6 pL/Zelle*Tag | 1,7-8,7 pL/Zelle*Tag |

Während im etablierten Fed Batch Prozess² bis zu 3,6 g Produkt mit einer maximalen Lebendzellzahl von 24,4 Mio. Zellen/mL erreicht werden, gelingt ein vergleichbarer Umsatz mit 8 Mio. Zellen/mL, einer Verdünnungsrate von 0,029 /h und einer Dauer von 12 Tagen im quasi-Steady State. Diese Berechnung inkludiert die vollständige Ernte der verbleibenden Produktkonzentration im Reaktor zum Prozessende. Trotz der geringeren Glucosekonzentration von 3,4 g/L wird eine gesteigerte zellspezifische Produktivität zusammen mit einer geringfügigen Zellvergrößerung beobachtet. Zusätzlich befinden sich die Glutamin-, Glutamat- und Lactatkonzentration im optimalen Bereich des Standardprozesses.

Allerdings besteht im Chemostat Prozess eine 27-fach höhere Nährstoffzufuhr rate (CSPR) als im Fed Batch. Da die Viabilität über die gesamte Prozessdauer über 98,8 %

¹ Kumulativer Endtiter aus historischen Daten (Anhang 6.2.1, Tabelle 17)¹⁵

² Bei einem Arbeitsvolumen von 1,3 L im Biostat® BDCU 2L Reaktor

und im quasi-Steady State bei 99,8 % liegt, kann hierbei keine Beeinträchtigung der Zellen durch Inhibierung beobachtet werden. Die hohe Differenz zum Fed Batch Prozess kann durch die geringere Substratkonzentration in kFM2 verursacht werden, sodass eine Aussage über die Performance des Mediums anhand der CSPR nur bedingt möglich ist. Während in der Literatur für die Medienkomposition von kFM1 eine Substratlimitierung mit Beeinträchtigung der Zellviabilität bei einer CSPR unter 50 pL/Zelle*Tag beobachtet wird,^[40] existieren zu kFM2 keine vergleichbaren Angaben.

Wird die optimale Verdünnungsrate (D_{opt}) zusätzlich anhand historischer Daten des Fed Batch Prozesses (Anhang 6.2.1, Tabelle 17) und Formel (3) berechnet, ergeben sich optimale Verdünnungsraten von 0,012/h für kFM1 und 0,017 /h für kFM2.

$$\text{kFM1: } D_{opt} = 0,05 /h * \left(1 - \sqrt{\frac{11,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{8,1 \frac{\text{g}}{\text{L}} + 11,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}}} \right) = 0,012 /h \quad (5)$$

$$\text{kFM2: } D_{opt} = 0,05 /h * \left(1 - \sqrt{\frac{6,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{8,1 \frac{\text{g}}{\text{L}} + 6,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}}} \right) = 0,017/h \quad (6)$$

Die theoretische Berechnung der Verdünnungsrate im Steady State liegt für beide Medienzusammensetzungen deutlich unter der in C_1 experimentell bestimmten Verdünnungsrate. Für eine Optimierung der Verdünnungsrate in Abhängigkeit der Medienkomposition ist diese Methode daher ungeeignet. Da die mAK-Ausbeute von 0,2 g/L*Tag ab Tag 12 im quasi-Steady State vergleichbar zum 12-tägigen Fed Batch ist, wird für eine Umsatzsteigerung eine Verlängerung der Prozesszeit benötigt. Obwohl bei einer vergleichbaren Prozessdauer keine Umsatzsteigerung erreicht werden konnte, zeigt die Chemostat Kultivierung C_1, dass die verwendete Zelllinie über einen Zeitraum von mind. 300 h kultiviert werden kann.

4.2.3. Evaluierung der in-silico Optimierung

Für eine Produktivitätssteigerung im Chemostat Prozess ohne Zellrückhaltung wird eine Verdünnungsrate mit optimalem Zellwachstum und Produktivität benötigt. Da die Berechnung der theoretischen Verdünnungsrate D_{opt} als ungeeignet bewertet

wurde, soll die Verdünnungsrate anhand eines vereinfachten Bioprozessmodells optimiert werden. Dies ermöglicht im Gegensatz zu Formel (3) eine Berechnung des Zellwachstums durch die Berücksichtigung zusätzlicher Substrate wie Glutamin oder Lactat. Die verwendeten linearen Gleichungssysteme für die Modellierung sind im Anhang 6.2.3 dargestellt. Basierend auf der korrekten Simulation der Chemostat Kultivierung C_1 wird eine in-silico Optimierung der Verdünnungsrate und der Medienzusammensetzung für die Umsatzsteigerung des Chemostat Prozesses durchgeführt. Hierbei soll in der kontinuierlichen Phase eine Lebendzellzahl von 15-20 Mio. Zellen/mL bei ausreichender Substratversorgung ohne Inhibierung erreicht werden. Da die Lactatakkumulation in der Zellkultur eine signifikante Inhibierungsquelle darstellt, wird die Glutaminkonzentration im Reaktor unter Berücksichtigung des metabolischen Schalters (Kapitel 3.1.1) minimiert und die Glucosekonzentration bei 2-5 g/L gehalten. Innerhalb dieses Bereiches wird eine optimale Versorgung der Zellen mit Glucose angenommen. Um eine ausreichende Glutaminversorgung für die Zellproliferation während der kontinuierlichen Phase sicherzustellen, wird die Glutamatkonzentration im Feedmedium erhöht, sodass die Konversion der Aminosäuren genutzt werden kann. Für eine bessere Vergleichbarkeit zum Fed Batch Prozess wird eine Prozessdauer von bis zu 14 Tagen angestrebt, in denen der Steady State möglichst schnell erreicht werden soll. Da die Zielsetzung dieses Ansatzes eine Produktivitätssteigerung durch erhöhte Zelldichten ist, wird auf eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität zunächst verzichtet. Die Ergebnisse der Simulation der Verdünnungsraten sind in Abbildung 10 zusammengefasst:

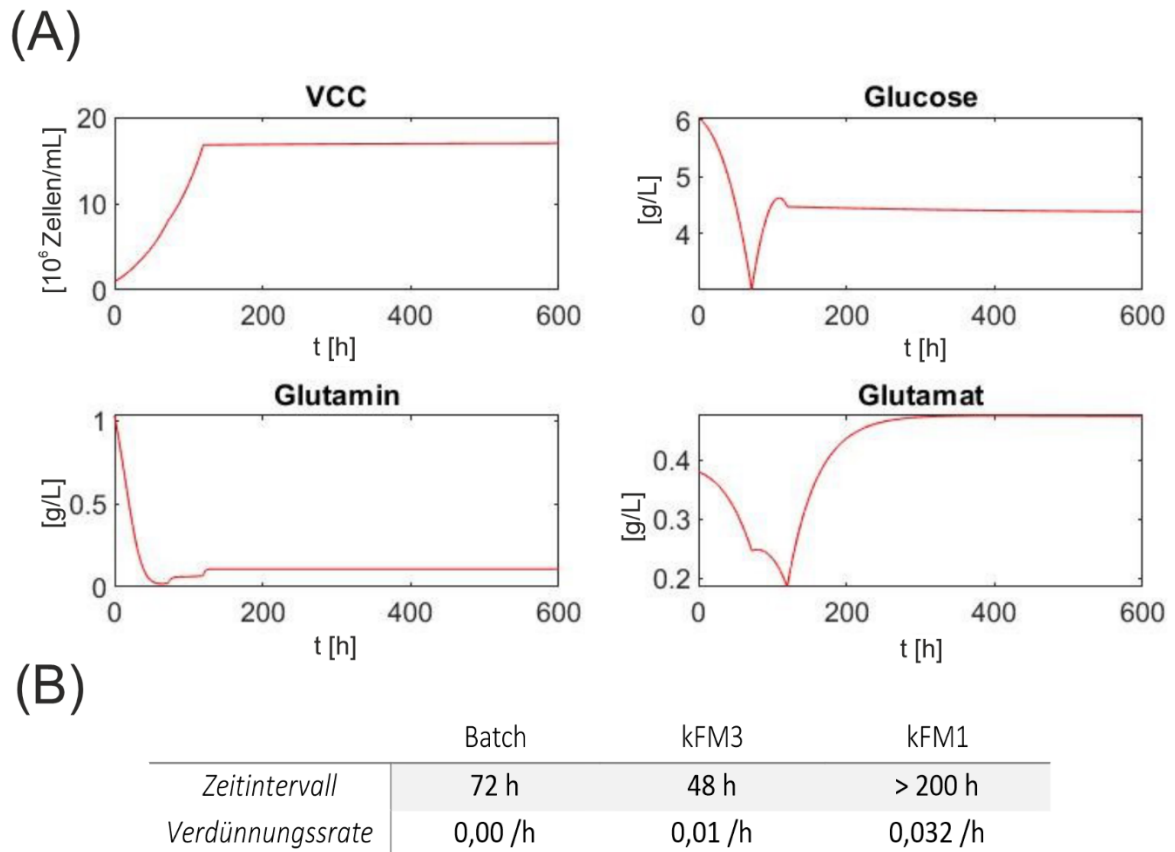


Abbildung 10: In-silico optimierter Chemostat Prozess anhand des vereinfachten Bioprozessmodells. Zelldichte und Metaboliten Konzentrationen in (A) sowie Dauer der Prozessphasen mit den zusammenhängenden Verdünnungsraten in (B).

Die Simulation zeigt einen Steady State bei 17 Mio. Zellen/mL, einer Glucosekonzentration von 4,5 g/L und Glutaminkonzentrationen unter 0,1 g/L. Für eine Konversion zu Glutamin liegt Glutamat in Konzentrationen von ca. 0,5 g/L vor. Der Prozess ist in drei Phasen unterteilt und in Abbildung 10 (B) dargestellt. Auf die anfängliche 72 h Batch Phase mit PM folgt eine kontinuierliche Phase mit hochkonzentriertem Feedmedium (kFM3) und einer Verdünnungsrate von 0,01/h. Nach 48 h wird die Verdünnungsrate auf 0,032/h mit dem geringer konzentrierten Medium kFM1 erhöht und für mindestens 200 h gehalten. Zu Beginn der dritten Phase wird der Prozess in einen Steady State überführt, welcher mehrere Tage andauert. Das „wet-lab“ Experiment zur Validierung der in-silico Optimierung wird ebenfalls im 2L Reaktor durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

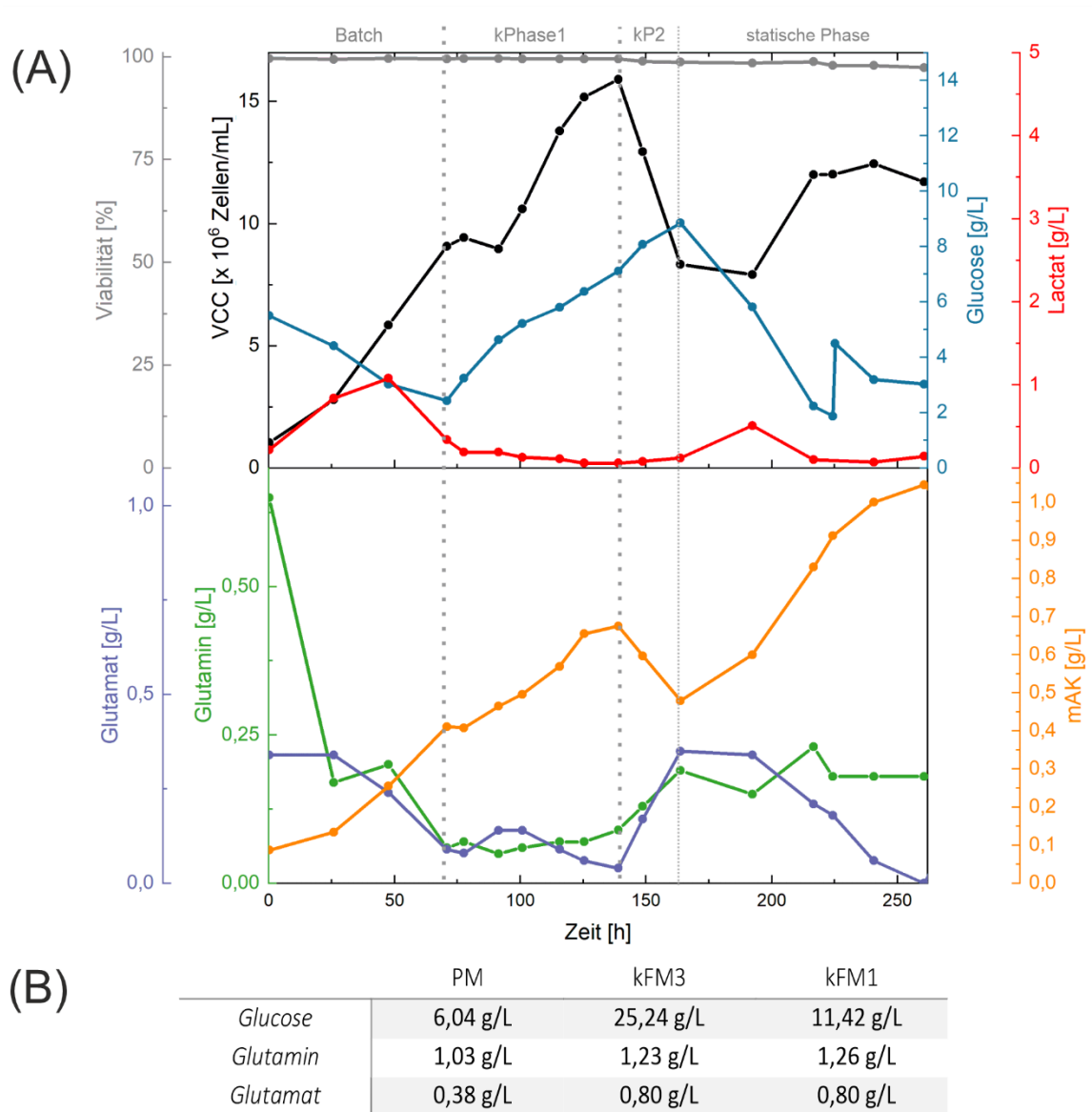


Abbildung 11: Chemostat Kultivierung C_2 im Biostat® BDCU 2L. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B).

Obwohl das Modell die erste Chemostat Kultivierung C_1 sehr gut beschreibt, weicht die Validierungskultivierung C_2 deutlich von der Prognose ab. Vergleichbar zur Simulation ist ein Anstieg der VCC während der Batch Phase auf ca. 9 Mio. Zellen/mL zu beobachten. Ab 72 h beginnt die erste kontinuierliche Phase mit einer temporären Irritation der Zellen durch die plötzliche Änderung der Medienkomposition und einem leichten Abfall der VCC. Aufgrund des temporär verringerten Zellwachstums wird die Verdünnungsrate von 0,01/h auf 68 h statt der simulierten 48 h ausgedehnt, um die angestrebte Lebendzellzahl von 15-20 Mio. Zellen/mL zu erreichen. Zu diesem

Zeitpunkt entsprechen auch die Glutamin- und Glutamatkonzentrationen der Prozesssimulation. Im Kontrast dazu steigt die Glucosekonzentration von 2,4 g/L zum Ende der ersten kontinuierlichen Phase auf ca. 7,1 g/L statt 4,5 g/L an, sodass die Möglichkeit einer Inhibierung des Zellwachstums sowie einer erneuten Lactatproduktion besteht.

Die zweite kontinuierliche Phase beginnt mit 15,9 Mio. Zellen/mL statt 17 Mio. Zellen/mL und einer mAK-Konzentration von 0,7 g/L. Der Feedmedienwechsel zu kFM1 und die erhöhte Verdünnungsrate von 0,032/h führen aufgrund einer Abnahme der Wachstumsrate zu einer Auswaschung der Zellen. Zudem akkumuliert sich die Glucose im Reaktor weiterhin auf bis zu 8,6 g/L und die Glutaminkonzentration auf bis zu 0,2 g/L, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Wachstumsinhibierung mit Wechsel zur Lactatproduktion zunehmend steigt. Aufgrund dieses Risikos und der Auswaschung von Zellen und Produkt, wird die zweite kontinuierliche Phase nach 24 h gestoppt und der Prozess in eine statische Phase überführt.

Im Gegensatz zur anfänglichen Batch Phase, werden die Volumenverluste durch Probennahmen während dieser diskontinuierlichen Phase durch eine Bolus Fütterung mit kFM1 bei 217 h ausgeglichen. Um eine Glucoselimitierung der Zellen bei Konzentrationen unter 2 g/L zu verhindern, wird zusätzlich bei 224 h eine hochkonzentrierte Glucose-Lösung zugefügt. Trotz einer ausreichenden Glucoseverfügbarkeit von 2-4,5 g/L und einem anfänglichen Anstieg der VCC, stellt sich ca. 53 h nach Phasenbeginn ein stationäres Wachstum ein, sodass der Prozess nach insgesamt 261 h mit einer VCC von ca. 12 Mio. Zellen/mL und 1 g/L mAK beendet wird. Die Endviabilität beträgt hierbei 97,4 %. Zum Prozessende ist die Glutamatkonzentration depletiert, während die Glutaminkonzentration trotz ausbleibender Zufuhr während der statischen Phase konstant bei 0,2 g/L liegt. Diese Beobachtung bestätigt erneut die von Newsholme *et al.*^[11] beschriebene Konversion von Glutamat zu Glutamin. Auch die Relation zum Lactatstoffwechsel ist zu Beginn der statischen Phase erneut zu erkennen: Aufgrund der erhöhten Glucosekonzentration und der Verfügbarkeit von Glutamin findet ein temporärer Wechsel von Lactatkonsum zu Lactatproduktion statt, welcher mit Beginn des stationären Zellwachstums und sinkender Glucosekonzentration wieder umgekehrt wird.

Die Kultivierung C_2 aus Abbildung 11 zeigt eine starke Abhängigkeit der Zellproliferation von der Glucosekonzentration sowie eine Beeinträchtigung durch Glucoseinhibierung und Änderungen der Medienkomposition. Zur Erweiterung des Bioprozessmodells um eine Wachstumsinhibierung bei hohen Glucosekonzentrationen, wird die Konzentration der Wachstumsinhibierung im nächsten Schritt experimentell ermittelt.

4.2.4. Glucose-Überfütterung als potenzieller Wachstumsinhibitor

Glucose bietet für viele Organismen die Hauptkohlenstoffquelle und ist daher ein beliebtes Substrat in der Bioprozesstechnik. Obwohl viele Zelllinien auch alternative Kohlehydrate wie Lactat oder Galactose verstoffwechseln können, wird Glucose von den Zellen meist aufgrund des hohen Energiegewinns im oxidativen Stoffwechsel bevorzugt. Während eine Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Viabilität durch eine Glucoselimitierung bekannt ist, werden die Effekte erhöhter Glucosekonzentrationen seltener untersucht. Für die industrielle Produktion liegt die Entwicklung eines ressourcenschonenden Prozesses im Fokus, sodass eine übermäßige Zugabe an Substrat mit erhöhten Kosten verbunden ist und daher vermieden wird.

Die Chemostat Kultivierung C_2 zeigt eine erhöhte Glucoseakkumulation während der ersten kontinuierlichen Phase, wodurch ein erhöhtes Risiko der Glucoseinhibierung angenommen wurde. Zur Ermittlung der Konzentrationsgrenze, ab der eine Wachstumsinhibierung durch Glucose beobachtet wird, werden diese Prozessbedingungen daher im kleineren Maßstab des Ambr® 250 reproduziert. Statt einer Überführung in die nächste kontinuierliche Phase wird die Verdünnungsrate von 0,01/h mit 25 g/L Glucose im Feed beibehalten, bis ein Abfall der VCC aufgrund der steigenden Glucosekonzentration erkennbar ist. Für die Untersuchung der Reversibilität der Wachstumsinhibierung wird die Glucosekonzentration im Feed bei gleichbleibender Verdünnungsrate auf 11 g/L reduziert bis ein erneuter Anstieg der VCC sichtbar wird. Das Feedmedium besteht hierbei aus kFM1 und einer reinen Glucose-Lösung, die entsprechend der Glucose-Feedkonzentration kontinuierlich zugeführt wird. Dabei wird die Verdünnungsrate während der gesamten Kultivierung konstant gehalten. Die Ergebnisse der Lebendzellzahl und der Zellproduktivität sowie der entsprechenden Glucosekonzentration sind in Abbildung 12 dargestellt.

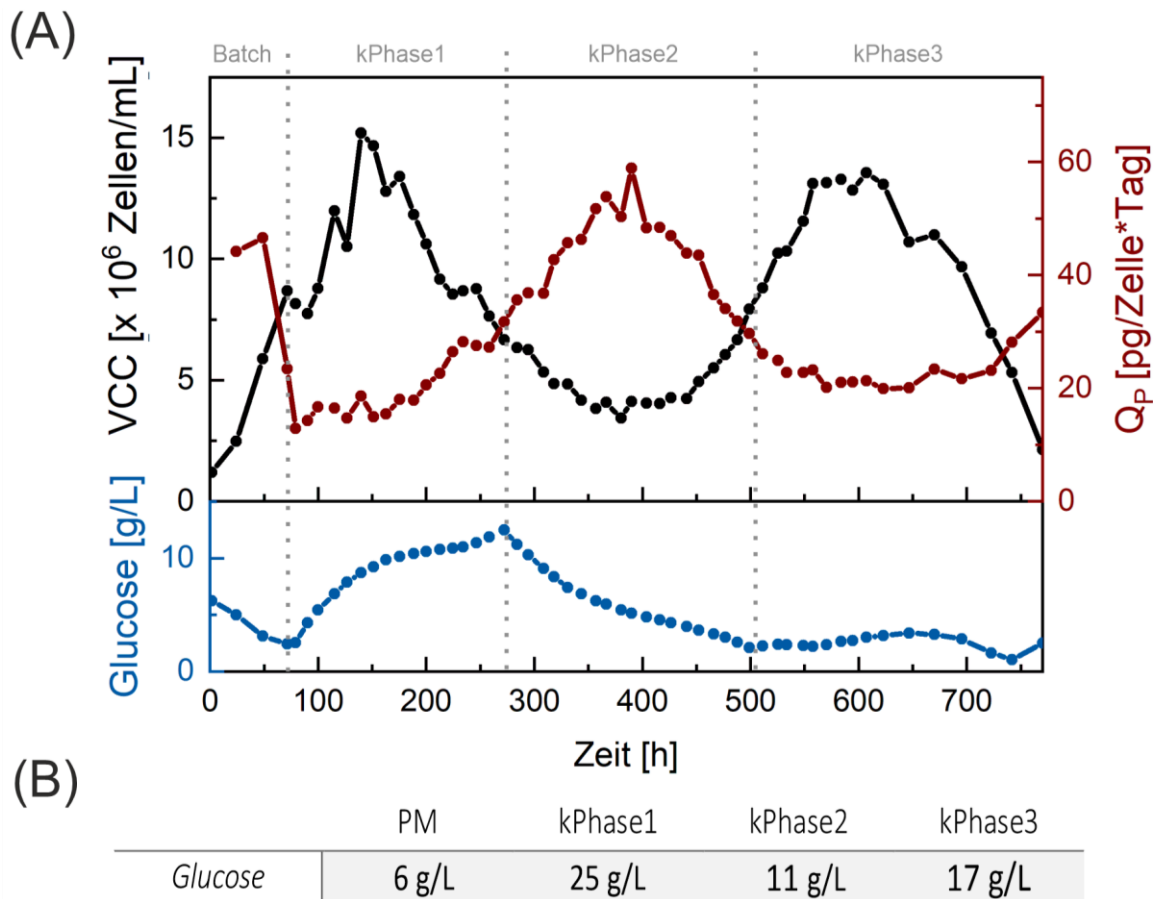


Abbildung 12: Chemostat Kultivierung C_3 im Ambr® 250. Offline Messwerte und Medienwechsel in (A) sowie die Glucosekonzentrationen der verwendeten Medien in (B).

Der anfängliche Anstieg der VCC auf 9 Mio. Zellen/mL innerhalb der Batch Phase ist vergleichbar zu C_1 und C_2 und korreliert mit einer Glucoseabnahme auf 2,5 g/L. In der anschließenden kontinuierlichen Phase mit einer Verdünnungsrate von 0,01/h und einer Glucose Feed Konzentration von 25 g/L (Abbildung 12 (B)) werden die Zellen aufgrund der plötzlichen Umgebungsänderung und der resultierenden Irritation kurzzeitig ausgewaschen. Nach 28 h gehen die Zellen erneut in exponentielles Wachstum ($\mu > D$) über, sodass die maximale Lebendzellzahl von 15,2 Mio. Zellen/mL bei 152 h erreicht wird. Aufgrund der hohen Glucosekonzentration im Feedmedium steigt die Konzentration im Reaktor trotz erhöhtem Bedarf stetig an. Abbildung 12 (A) zeigt zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von 8,7 g/L Glucose. Während die Glucosekonzentration anschließend weiter zunimmt, sinkt die Wachstumsrate unter 0,01/h und die Zellen werden ausgewaschen.

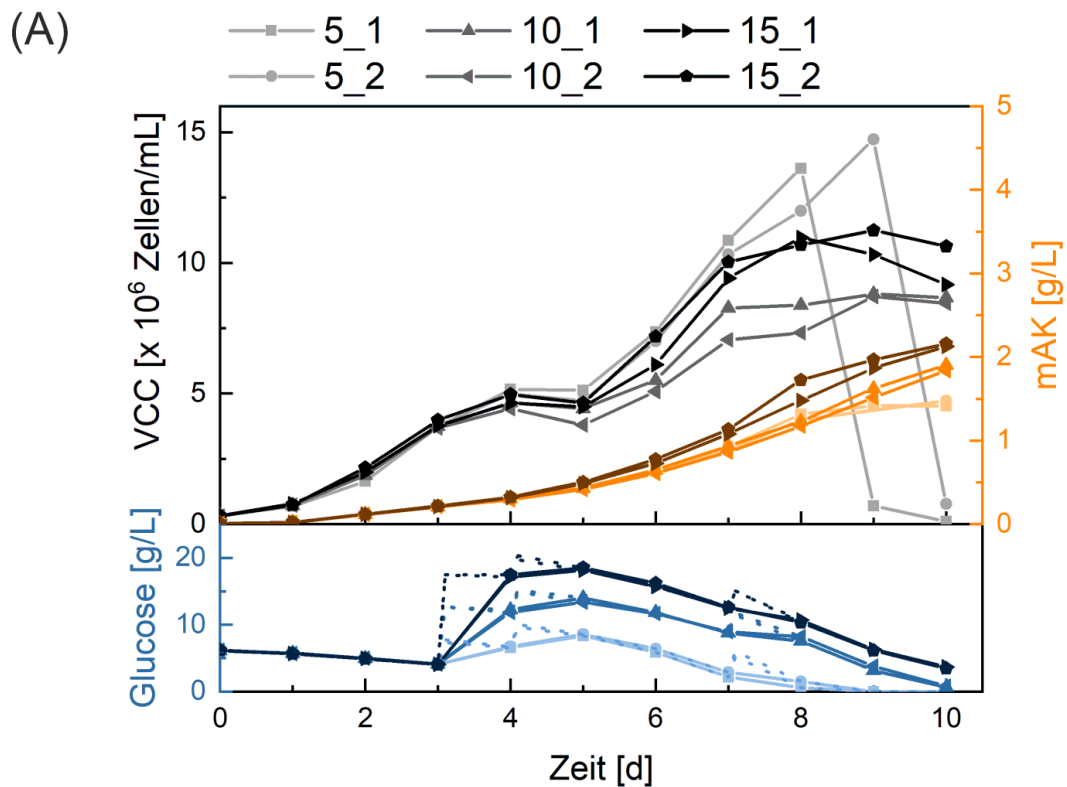
Für die Bestätigung der Annahme einer Wachstumsinhibierung durch erhöhte Glucosekonzentrationen muss diese nachweisbar reversibel sein. Daher wird die Glucosekonzentration im Feedmedium ab 272 h bei gleichbleibender Verdünnungsrate auf 11 g/L reduziert (Abbildung 12 (B), kPhase2). Eine Erholung des Zellwachstums mit anschließender exponentieller Phase ist ab 367 h bei einer Glucosekonzentration im Reaktor von ca. 6 g/L erkennbar. Da die Verdopplungszeit von Säugerzellen bei ca. 24 h liegt, wird diese Zeitspanne als Anpassungsdauer mit in die Bestimmung der Konzentrationsgrenze für eine Glucoseinhibierung einbezogen. Demnach ergibt sich in Abbildung 12 (A) ein Bereich von 127-344 h in denen eine Wachstumsinhibierung durch Glucose vorliegt. Die Konzentrationsgrenze liegt somit bei 8 g/L (+ 1 Tag), da die Glucoseinhibierung eintritt, sobald die Glucosekonzentration im Reaktor für mindestens 24 h über 8 g/L liegt.

Im weiteren Prozessverlauf wird die Glucosekonzentration im Feed bei 501 h ein weiteres Mal angepasst, um eine Glucoselimitierung unter 2 g/L auszuschließen und einen Steady State zu erreichen (kPhase3). Dieser wird bezüglich der Lebendzellzahl ab 558 h mit 13,3 Mio. Zellen/mL ($\pm 0,2$ Mio. Zellen/mL) bei einer Glucosekonzentration von 2,2-3,2 g/L für 65 h gehalten, bevor das Zellwachstum erneut abnimmt. Der Prozess wurde nach insgesamt 770 h aufgrund von übermäßiger Lactatproduktion bei einer Zellviabilität von 68,7 % beendet (Anhang 6.2.1, Tabelle 18). Neben einer ausreichenden Verfügbarkeit von Glucose, liegt die Glutaminkonzentration im Bereich der stationären VCC konstant bei ca. 0,13 g/L, sodass keine Lactatproduktion zu erwarten gewesen wäre. Während die Zellzahl, die Glutamin- und die mAK-Konzentration ab 558 h einen stationären Zustand erreichen, sinkt die Glutamatkonzentration weiterhin stetig von 0,34 g/L auf 0,13 g/L. Da die Stoffwechselreaktionen von Glutamin und Glutamat eng verbunden sind wird hier neben Glutamin ebenfalls eine Konzentrationsgrenze für Glutamat angenommen, bei der eine Umstellung zur Lactatproduktion erfolgt. Somit wird der Lactatkonsum nach einer Depletion von Glutamin ausgelöst und kann nur bei ausreichender Verfügbarkeit von Glutamat erhalten werden. Sinkt diese unterhalb eines Schwellenwertes im Bereich von 0,1-0,3 g/L produzieren die Zellen erneut Lactat. Zusätzlich liegt die Nährstoffzufuhr bei 21,4 pL/Zelle*Tag und somit deutlich unter der kritischen CSPR einer Semi-Perfusion mit kFM1.^[40] Da in kPhase3 zum Zeitpunkt des stationären Zustands der VCC ein Medium mit höherer Glucosekonzentration

verwendet wurde, ist ein Vergleich zu kFM1 nur bedingt möglich. Es besteht jedoch weiterhin die Annahme, dass für eine bessere Performance des verwendeten Mediums die erhöhte Zugabe weiterer Substrate wie Glutamat nötig ist.

Für die Betrachtung der mAK-Produktivitätssteigerung ist in Abbildung 12 (A) zusätzlich die zellspezifische Produktivität Q_p anhand Formel (2) dargestellt. Mit Ausnahme der Batch Phase, in der eine Produktivität von bis zu 47 pg/Zelle*d bei exponentiellem Zellwachstum erreicht wird, wird ein reziproker Verlauf der Produktivität zur Lebendzellzahl mit ca. 14-59 pg/Zelle*Tag ersichtlich. Während die Zellen aufgrund der Wachstumsinhibierung ausgewaschen werden, bleibt die mAK-Konzentration im Reaktor dadurch zunächst konstant und sinkt anschließend innerhalb von ca. 150 h um lediglich 0,2 g/L (Anhang 6.2.1, Tabelle 18). Da die maximale Produktivität zum Zeitpunkt der Wachstumsinhibierung durch Glucose auftritt, wird ein reversibles Umschalten zwischen Proliferation und erhöhter Produktivität und vermutet. Die Reversibilität ist dabei anhand der sinkenden zellspezifischen Produktivität bei erneutem exponentiellem Wachstum der Zellen gegeben. Zusätzlich zur wachstumsgekoppelten Produktbildung zum Prozessbeginn zeigt die Chemostat Kultivierung C_3 eine nicht-wachstumsgekoppelte Produktbildung zum Zeitpunkt der Produktivitätssteigerung.

Zur Verifizierung der hybriden Produktbildung mit einer Produktivitätssteigerung durch glucoseinduzierte Wachstumsinhibierung wird ein weiteres Experiment in 150 mL Schüttelkolben durchgeführt. Nach einer 3-tägigen Batch Phase werden die Zellen in doppeltem Ansatz auf einen Glucose Setpoint von 5 g/L (5_1 und 5_2) 10 g/L (10_1 und 10_2) und 15 g/L (15_1 und 15_2) eingestellt und weitere 7 Tage kultiviert. Die Zufütterung erfolgte an Tag 3, 4 und 7 mit FMA, FMB und Glucose-Lösung. Die Ergebnisse für die Lebendzellzahl, die Produktkonzentration und die Glucosekonzentration sind in Abbildung 13 dargestellt.



(B)

| | \emptyset Durchmesser [μm] | Δ Durchmesser [μm] | IVCC [$10^6 \text{ Z} \cdot \text{d} / \text{mL}$] | $\emptyset Q_P$ [$\text{pg} / \text{Z} \cdot \text{d}$] |
|-------|--|---|---|--|
| SF_5 | 15,36 | 2,25 | 54,45 | 28,88 |
| SF_10 | 16,39 | 3,18 | 48,84 | 38,82 |
| SF_15 | 16,35 | 2,70 | 59,17 | 37,85 |

Abbildung 13: Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung in 150 mL Schüttelkolben mit unterschiedlichen Glucose Setpoints (5, 10, 15 g/L). Offline Messwerte in (A) sowie die durchschnittliche Zellgröße, maximale Größendifferenz, IVCC und zellspezifische Produktivität Q_P in (B).

Nach der anfänglichen Batch Phase, beginnt die Einstellung der Glucose Setpoints bei ca. 3,8 Mio. Zellen/mL und 4 g/L Glucose. Durch das glucosehaltige Feedmedium A (FMA) liegt die Glucosekonzentration der Referenzkolben (5_1 und 5_2) direkt nach der Zufütterung bei jeweils 7,4 g/L und 7,8 g/L und damit über dem Setpoint von 5 g/L. Daher wurden die Glucosekonzentrationen in den anderen Kolben ebenfalls um die Differenz von 2,4-2,8 g/L zum angestrebten Setpoint erhöht (Abbildung 13 (A), gestrichelt). Ab Tag 5 wird der Feed für 2 Tage ausgesetzt, da die Glucosekonzentration bereits in den Referenzkolben an Tag 4 nach der Zugabe von FMA und FMB bei ca. 10 g/L liegt und eine Wachstumsinhibierung bewirkt. Die Abnahme der

Wachstumsrate ist anhand der stagnierenden VCC an Tag 5 in allen Schüttelkolben erkennbar. Der letzte Feed findet an Tag 7 während der zweiten exponentiellen Wachstumsphase statt und erreicht die jeweiligen Glucose Setpoints von 5, 10 und 15 g/L. Anschließend wird die Glucose in den Referenzkolben innerhalb von 1-1,5 Tagen depletiert, was in einer starken Abnahme der Zellviabilität und der Lebendzellzahl resultiert.

Eine Abweichung des Zellwachstums von den Referenzkolben ist bei erhöhten Glucosekonzentrationen bereits einen Tag nach dem ersten Feed erkennbar und verstärkt sich mit steigender Prozessdauer. Hierbei besteht jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen der verfügbaren Glucosekonzentration und der Intensität der Wachstumsinhibierung. Während die Referenz maximale Lebendzellzahlen von 13,6 Mio. Zellen/mL (5_1) und 14,7 Mio. Zellen/mL (5_2) erreicht, stellt sich das stationäre Wachstum in den Kolben mit erhöhtem Glucose Setpoint bei deutlich geringeren Lebendzellzahlen ein. In 15_1 und 15_2 wird jeweils eine maximale Lebendzellzahl von 11 Mio. Zellen/mL und 11,2 Mio. Zellen/mL erreicht. Für den Glucose Setpoint von 10 g/L ergeben sich mit 8,8 Mio. Zellen/mL (10_1) und 8,7 Mio. Zellen/mL (10_2) die geringsten maximalen VCC. Somit besteht die stärkste Wachstumsinhibierung bei Glucosekonzentrationen von 8-15 g/L und stimmt mit der ermittelten Konzentrationsgrenze von > 8 g/L (+1 Tag) überein.

Die Kultivierungen 10_1 und 10_2 besitzen im Mittelwert trotz des geringsten Zellwachstums die höchste durchschnittliche zellspezifische Produktivität (Q_P) von 38,82 pg/Zelle*Tag (Abbildung 13 (B)). Aufgrund höherer Lebendzellzahlen bei leicht geringerer Produktivität (37,85 pg/Zelle*Tag) werden die höchsten Titer von 2,1-2,2 g/L jedoch in 15_1 und 15_2 erreicht. Die Referenzkultivierung zeigt die geringste zellspezifische Produktivität von 28,88 pg/Zelle*Tag, sodass zusätzlich zur Wachstumsinhibierung eine Produktivitätssteigerung durch hohe Glucosekonzentrationen verifiziert werden konnte. Auch hier besteht ein nicht-linearer Zusammenhang, da die höchste Glucosekonzentration nicht die stärkste Produktivitätssteigerung induziert. Der größte Effekt wird zusammen mit der stärksten Wachstumsinhibierung bei Glucosekonzentrationen im Bereich von 8-15 g/L beobachtet.

Für die Betrachtung der Effizienz der Glucosenutzung wird zusätzlich der Ausbeutekoeffizient von Lactat aus Glucose ($Y_{\text{Lac/Glc}}$) mithilfe von Formel (11) (Anhang 6.1.7) in Abbildung 14 berechnet.

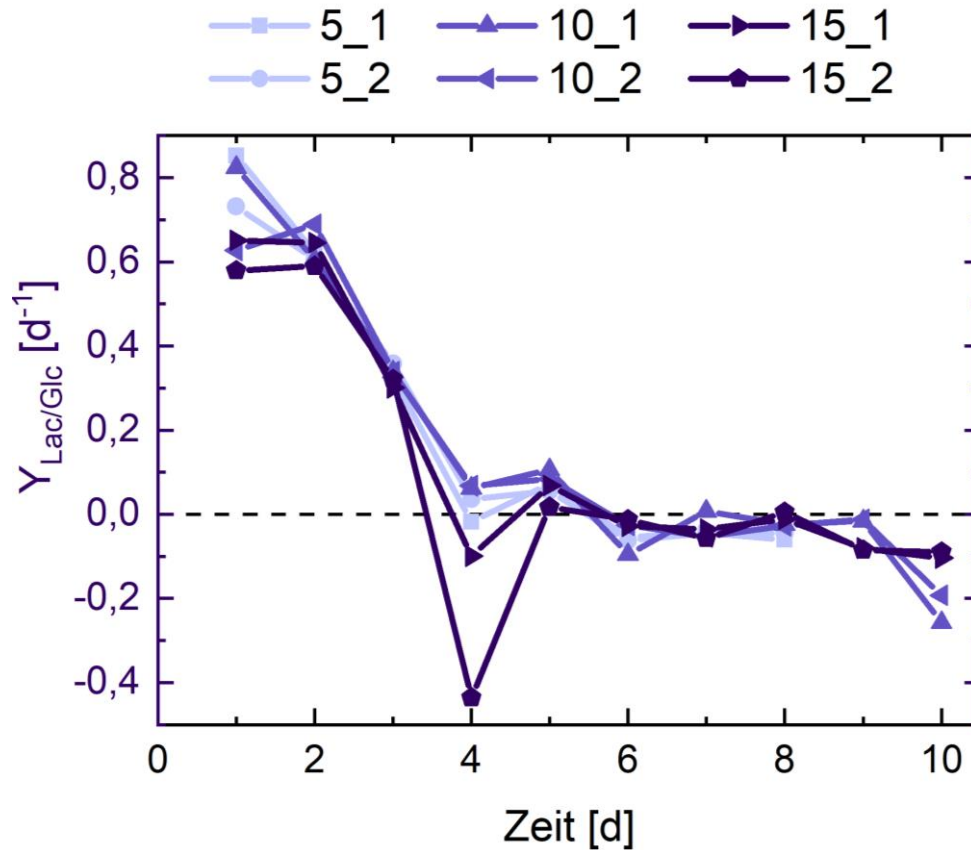


Abbildung 14: Lactatausbeutekoeffizienten aus Glucose der Schüttelkolben Kultivierungen mit unterschiedlichen Glucose Setpoints (SF_5, SF_10, SF_15) aus Abbildung 13.

Da die Lactatproduktion aus Glucose einen sehr geringen Energieumsatz besitzt, und die Akkumulation dieses unerwünschten Nebenproduktes wachstumsinhibierend wirkt, zeigen hohe $Y_{\text{Lac/Glc}}$ Werte eine geringe metabolische Effizienz an. Für alle Kultivierungsansätze wird ab Tag 6 ein vorwiegender Lactatkonsum beobachtet, welcher sich in den negativen Werten für $Y_{\text{Lac/Glc}}$ widerspiegelt und mit einer erhöhten Effizienz verbunden ist. Eine temporäre Irritation der Zellen durch die erhöhte Glucoseverfügbarkeit ist in 15_1 und 15_2 an Tag 4 durch stark negative Koeffizienten erkennbar. Diese zeigen jedoch keinen erhöhten Lactatverbrauch, sondern ein durch einen minimalen Glucoseverbrauch von 0,12-0,28 g/L von Tag 3 auf Tag 4 bei einem geringen Lactatverbrauch verursachtes Artefakt (Anhang 6.2.1, Tabelle 19). Der leicht

erhöhte Lactatkonsum in 10_1 und 10_2 an Tag 10 wird hingegen auf die geringe Glucoseverfügbarkeit (0,64-0,77 g/L) im Medium zurückgeführt, sodass eine vermehrte Nutzung von Lactat zum Erhalt des Zellstoffwechsels angenommen wird.

Der Verlauf des Lactatausbeutekoeffizienten ist für alle Kultivierungen vergleichbar und mit Ausnahme einer Anpassungsdauer von max. 48 h nach Erhöhung der Glucoseverfügbarkeit sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kultivierungen erkennbar. Somit führt eine erhöhte Glucoseverfügbarkeit bis zu 20 g/L weder zu einem erhöhten Lactatverbrauch noch zu einer erhöhten Lactatproduktion, sodass die Effizienz der Glucose Nutzung für alle Kultivierung gleichwertig ist. Ob die Glucose hauptsächlich für den Zellerhalt, die mAK-Produktion oder die Proliferation verwendet wird ist hierbei nicht ersichtlich.

Da das Zellverhalten sich in Abhängigkeit der verschiedenen Glucosekonzentrationen unterscheidet, die Nutzungseffizienz der Glucose jedoch unverändert bleibt, wird die Hypothese eines metabolischen Schalters zwischen Produktion und Proliferation bestätigt. Zusätzlich konnte die hybride Produktbildung mit wachstumsgekoppelter Phase zu Beginn und nicht-wachstumsgekoppelten Phasen bei einer Wachstumsinhibierung durch erhöhte Glucosekonzentrationen verifiziert werden.

4.2.5. Umsatzsteigerung durch erhöhte Lebendzellichte

Die nicht-linearen Zusammenhänge zwischen der Wachstumsinhibierung und der Glucosekonzentration sowie die beobachtete Konzentrationsgrenze von Glutamat für die Zellerhaltung und den Lactatstoffwechsel können mithilfe des vereinfachten Bioprozessmodells nicht simuliert werden. Für eine Umsatzsteigerung wird daher eine Erhöhung der Zelldichte im Steady State durch verringerte Verdünnungsraten und eine gesteigerte Substratkonzentration im Feedmedium angestrebt. Dazu wurden die erreichten VCC der stationären Zustände aus C_1 und C_3 und die maximalen VCC in Abhängigkeit der angewandten Verdünnungsrate (Fed Batch: Feedflussrate) aufgetragen (Anhang 6.2.1, Abbildung 28). Die für eine Zelldichte von 15-20 Mio. Zellen/mL benötigte Verdünnungsrate wurde anschließend anhand einer logarithmischen Trendlinie berechnet und soll nun experimentell verifiziert werden.

Die eingesetzte Glucosekonzentration im kontinuierlichen Feedmedium (kFM4) wurde anhand des Glucoseverbrauchs der vorangegangenen Chemostat Kultivierungen auf 27 g/L geschätzt und wird mit einer konstanten Verdünnungsrate von 0,007/h über die gesamte Prozessdauer zugegeben. Aufgrund der in C_3 beobachteten Signifikanz einer ausreichenden Glutamatversorgung wird die Glucosekonzentration nicht durch die Zugabe einer Glucose-Lösung erreicht, sondern durch eine erhöhte Zugabe der Feedmedien A und B (Anhang 6.1.3, Tabelle 10). Der Anteil der hochkonzentrierten Medien wird hierbei jeweils mehr als verdreifacht, um Substratlimitierungen zu vermeiden. Zusätzlich beinhaltet das neue kontinuierliche Feedmedium kFM4 im Gegensatz zu den vorherigen Medienkompositionen kein Glutamin, um einer Umstellung auf Lactatproduktion durch Überschreitung der Glutaminkonzentrationsgrenze im Prozessverlauf vorzubeugen. Während die Kultivierung C_1 nach einem vollständigen Austausch des Reaktorvolumens im stationären Zustand (38 h) beendet wurde, wird in der Literatur eine Zeitspanne von über einem 4,6-fachen der Verweilzeit im Reaktor zum Erreichen eines stabilen Steady States beschrieben.^[70] Die Berechnung der Verweilzeit (τ) anhand des Reaktorvolumens (V_R) und der Flussrate (\dot{V}) ist in Formel (11) und die resultierende Dauer des Steady State in Formel (12) dargestellt.

$$\tau = \frac{V_R}{\dot{V}} = \frac{230 \text{ mL}}{36 \text{ mL/d}} = 6,3\bar{8} \text{ d} \quad (7)$$

$$4,6 \times \tau = 29,3\bar{8} \text{ d} \quad (8)$$

Anhand dieser Ergebnisse wird die kontinuierliche Phase für 30 Tage im Anschluss an die 3-tägige Batch Phase durchgeführt und eine oszillierende Annäherung der VCC und Metabolitenkonzentrationen an den stationären Zustand erwartet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

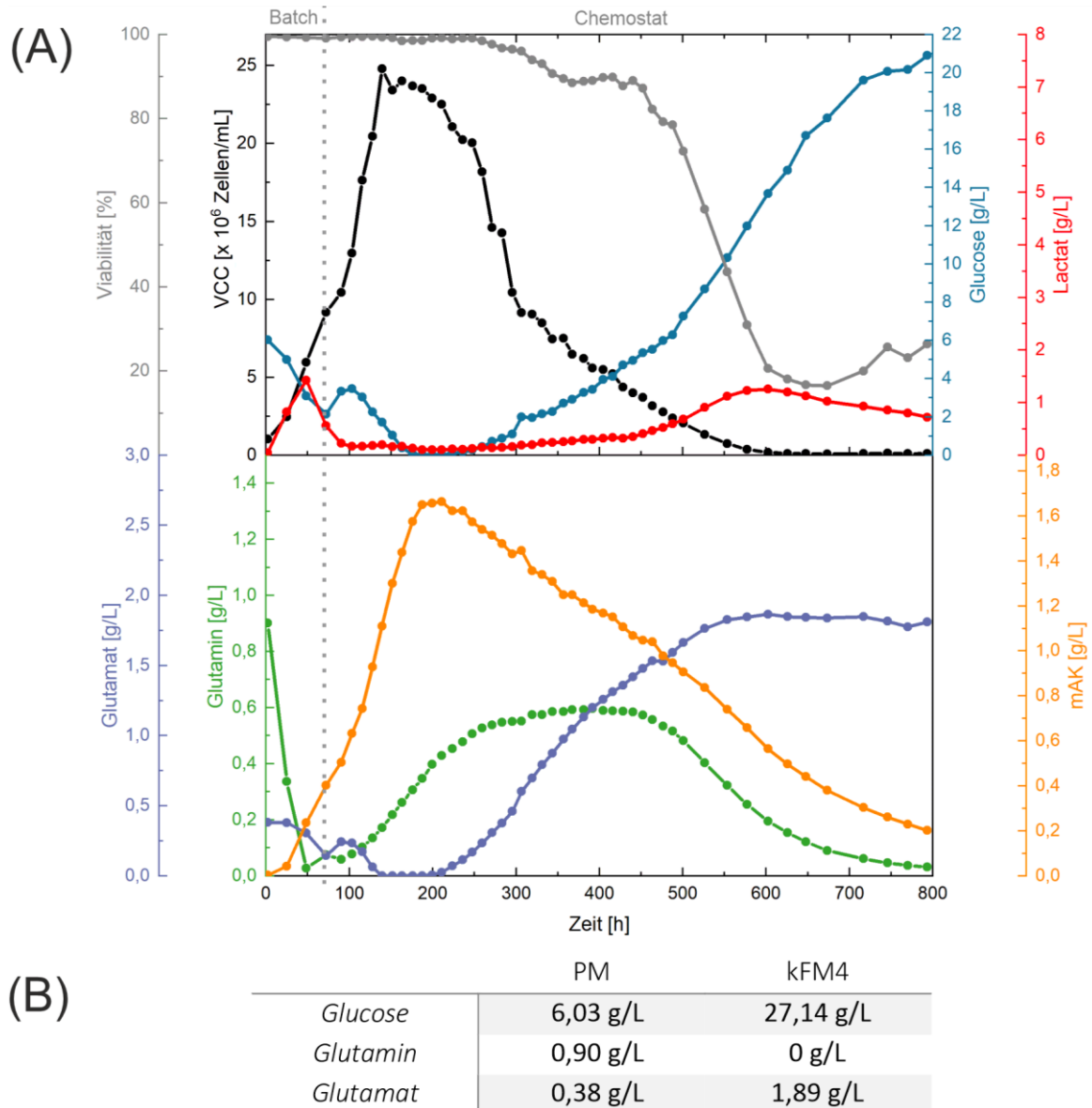


Abbildung 15: Chemostat Kultivierung C_4 im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B).

Auch dieser Versuchsansatz beginnt mit einem typischen Anstieg der VCC auf 9 Mio. Zellen/mL in der Batch Phase. Ebenfalls vergleichbar, befindet sich ein Lactatmaximum bei ca. 48 h und die Glucosekonzentration nach 72 h bei 2,1 g/L. Durch die geringe Verdünnungsrate von 0,007 /h wird jedoch kein Auswaschen der Zellen zu Beginn der kontinuierlichen Phase beobachtet. Stattdessen steigt die Lebendzellzahl innerhalb von 90 h auf 24 Mio. Zellen/mL an, und bewirkt durch den erhöhten Glucosebedarf für ca. 48 h eine Glucosedepletion. Diese Limitierung führt zu einer starken Abnahme des Zellwachstums und der Viabilität mit einem stetigen

Auswaschen der Zellen bis zum Prozessende. Der erneute Anstieg der Glucosekonzentration resultiert nicht in einer Erholung der Zellen, sondern in einer erhöhten Lactatproduktion und zusätzlichem Zellsterben. Der Prozess wird nach 793 h bei 0,1 Mio. Zellen/mL, einer Zellviabilität von 26 % und einer Glucosekonzentration von 20,9 g/L beendet.

Zu Beginn des Prozesses ist die wachstumsgekoppelte mAK-Produktion ersichtlich. Der maximale Titer wird mit 1,7 g/L kurz nach Erreichen der maximalen VCC bei 210 h gemessen. Anschließend sinkt die Produktivität stark und das Produkt wird zusammen mit den Zellen aus dem Reaktor gewaschen. Das in kFM4 enthaltene Glutamat wird zu Glutamin konvertiert, wodurch die Glutaminkonzentration im Reaktor auch ohne Zugabe ansteigt. Ab ca. 250 h wird zunehmend weniger Glutamat verbraucht und die Konzentration steigt an, wobei die Glutaminkonzentration stagniert. Es stellt sich ein kurzzeitiges Gleichgewicht zwischen Glutaminverbrauch und Verfügbarkeit durch Konversion ein. Ab 500 h ist die Zellviabilität so gering, dass keine Konversion mehr stattfindet und das Glutamin ausgewaschen wird. Die Glutamatkonzentration steigt hierbei vergleichbar zur Glucose an und erreicht ab ca. 550 h die Eingangskonzentration von 1,85 g/L.

Im Gegensatz zur Wachstumsinhibierung durch Glucose ist die hier beobachtete Limitierung irreversibel und führt nach mindestens 24 h zum Zelltod. Eine Erholung durch erneute Glucosezugabe konnte nicht beobachtet werden und führt stattdessen zu vermehrter Lactatproduktion mit stark sinkender Zellviabilität. Für einen Steady State wird eine zweite kontinuierliche Phase mit erhöhter Verdünnungsrate benötigt, welche eine ausreichende Glucosezugabe und einen erhöhten Zellbleed bewirkt. Zudem wird die Notwendigkeit von Glucose für das Zellwachstum und den Zellerhalt deutlich.

Das Prozessverständnis hinsichtlich der metabolischen Herausforderungen der verwendeten CHO DG44 Zelllinie wurde durch die Etablierung des kontinuierlichen Ansatzes eines Chemostat Prozesses erfolgreich erweitert. Neben der reversiblen Wachstumsinhibierung durch hohe Glucosekonzentrationen und der irreversiblen Glucoselimitierung wurde ein temporärer Stillstand des Zellwachstums bei plötzlichen Änderungen der Medienkomposition beobachtet. Zusätzlich konnte eine hybride Produktbildung mit einem metabolischen Schalter zwischen Proliferation

und mAK-Produktion bei kurzzeitigen Irritationen oder Wachstumsinhibierungen der Zellen durch Glucose bestätigt werden. Diese Ergebnisse bilden die Basis für weitere Effizienzsteigerungen und ermöglichen eine Einteilung in Wachstums- und Produktionsphasen. Da der in der Chemostat Kultivierung C_1 erreichte quasi-Steady State mit einer VCC von 8 Mio. Zellen/mL und 0,3 g/L mAK eine vergleichbare Effizienz zum etablierten Fed Batch Prozess besitzt, soll ein Zellrückhaltesystem zur Steigerung der Lebendzellichte etabliert werden.

4.3. Etablierung eines mikrofluidischen 3D-gedruckten Zellrückhaltesystems für Perfusionsprozesse

Während Chemostaten in der Zellkultur hauptsächlich für geringe Zelldichten angewendet werden und oftmals der Vertiefung des Prozessverständnisses dienen, generieren Perfusionsprozesse und Hochzelldichte-Kultivierungen deutlich mehr Umsatz. Für intensiverte Prozesse im kontinuierlichen Betrieb liegt neben der Verdünnungsrate besonders die Retentionseffizienz der verwendeten Zellrückhaltesysteme im Fokus. Während die Zellen im Reaktor verbleiben, wird das Produkt zusammen mit altem Kulturmedium entfernt.

Die in dieser Arbeit verwendete mikrofluidische Separationsspirale bietet durch die additive Fertigung aus einem thermostabilen Material eine hohe Flexibilität im Design mit geringen Produktions- und Sterilisierungskosten und eignet sich daher gut für die Etablierung eines Perfusionsprozesses. Bei membranfreien, mikrofluidischen Trägheitsabscheidern wie der Spirale wird die Effizienz hierbei von der Zelldichte, dem Zelldurchmesser und der Flussrate durch die Spirale beeinflusst. Aufbauend auf den Ergebnissen von Enders *et al.*^[45] wird die Separationsspirale at-line am Ambr® 250 bezüglich ihrer Zellretentionseffizienz, Scherstressbildung und der Anwendbarkeit für verschiedene Zelldichten im Langzeitbetrieb getestet.

4.3.1. Optimierung des Spiralseparator-Designs und der Perfusionsflussraten

Enders *et al.* beschreibt eine erfolgreiche Auftrennung von bis zu 20 Mio. Zellen/mL mit einer Kanalaufteilung von 50:50 und integrierten Pulsationspuffersystemen zur Minimierung turbulenter Strömung durch die Pumpimpulse von Peristaltik-Pumpen.^[45] Basierend auf diesen Ergebnissen wird ein Steady State bei 13-

17 Mio. Zellen/mL in 230 mL Arbeitsvolumen angestrebt, um die Separationskapazität nicht zu überschreiten. Der Prozess besteht aus einer 72 h Batch Phase und einer kontinuierlichen Phase mit Zellrückhaltung (ca. 216 h) mit optionalem Zellbleed. Aufgrund der glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung durch das hochkonzentrierte Feedmedium der ersten kontinuierlichen Phase in C_2 (Kapitel 4.2.3) wird auf einen Feedmedienwechsel innerhalb der Kultivierung verzichtet. Stattdessen wird die Feedrate von kFM1 an den Glucosebedarf der Zellen angepasst und die Bleedrate entsprechend angeglichen. Gestartet wird mit einer Verdünnungsrate von $D=0,01/h$, sodass 2,4 mL/h anhand der Separationsspirale aus dem Reaktor entnommen werden. Da für eine erfolgreiche Auftrennung deutlich höhere Flussraten durch die Spirale benötigt werden, wird diese zunächst mit 1 mL/min (60 mL/h) und einer Rückführung von 0,96 mL/min (57,6 mL/h) betrieben, um eine Abnahme von 2,4 mL/h zu erreichen. Zusätzlich wird eine Durchflussmesszelle zur online Überwachung der Zelldichte über einen Bypass angeschlossen, um starke Zellverluste in Echtzeit zu detektieren. Die Ergebnisse der Lebendzellzahl und Viabilität sowie der Glucose- und mAK-Konzentrationen sind in Abbildung 16 dargestellt.

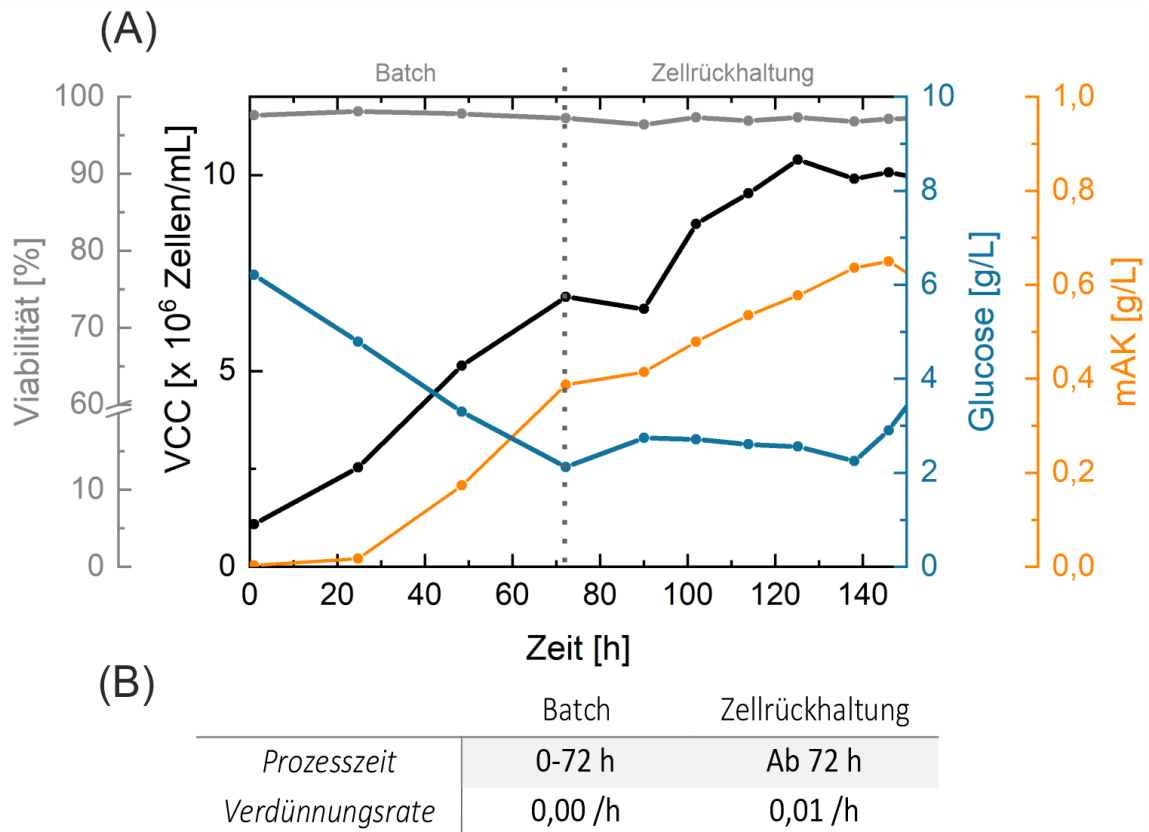


Abbildung 16: Perfusionskultivierung P_1 mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B).

Nach der Batch Phase werden statt der typischen VCC von 9 Mio. Zellen/mL nur ca. 7 Mio. Zellen/mL mit einer Viabilität von 97,2 % erreicht. Da die zusätzlich angeschlossene Durchflussmesszelle zur Überwachung der Zelldichte mit vergleichsweise hohen Flussraten von 5 mL/min (300 mL/h) im Bypass betrieben wird, liegt eine mögliche Ursache in den erhöhten Pump-Scherkräften. Diese Annahme wird durch das zeitliche Auftreten der Wachstumsinhibierung bestärkt, da der Bypass des Zellseparationssystems erst nach der Batch Phase angeschlossen wird. Steinwedel *et al.* beschreibt eine vergleichbare Abnahme der Zellwachstumsrate in Schüttelkolben.^[71]

Anschließend beginnt die kontinuierliche Phase mit Zellrückhaltung zunächst mit einer leichten Abnahme der VCC, welche durch eine geringe Zellretentionseffizienz oder eine temporäre Irritation verursacht werden kann. Zusätzlich tritt durch das Totvolumen im Bypass von ca. 5 mL ein Verdünnungseffekt durch das Verbleiben der Zellen in der Separationsspirale und die Zugabe von frischem Medium auf. Nach

ca. 30 h ist jedoch ein erneuter Anstieg der VCC erkennbar, sodass bei 125 h eine maximale Lebendzellzahl von 10,4 Mio. Zellen/mL erreicht wird. Wiederkehrende Kanalverblockungen in der Spirale verursachen vermehrt Zellverluste, sodass die Kultivierung nach 145 h bei einer Viabilität von 97,1 % beendet wird.

Im Verlauf der kontinuierlichen Phase liegt die Glucosekonzentration im Reaktor zwischen 2-4 g/L, sodass sowohl eine Limitierung als auch eine Inhibierung durch Glucose ausgeschlossen werden können. Der mAK-Titer steigt mit zunehmender Zelldichte lediglich auf bis zu 0,65 g/L bei 10,1 Mio. Zellen/mL an und zeigt keine erhöhte zellspezifische Produktivität. Der unerwartet geringe Anstieg der Lebendzellzahl wird in dieser Kultivierung demnach weder durch Nährstoffmangel noch durch ein Umschalten zu erhöhter Produktbildung verursacht.

Um eine Verblockungen der Separationsspirale durch Zellaggregate und Partikel zu minimieren, werden verschiedene Kanalauftrennungen getestet. Als kurative Maßnahme bei irreversibler Beeinträchtigung der Zellauftrennung wird außerdem ein steriler Austausch des Separationssystems untersucht. Für die frühzeitige Erkennung von Zellverlusten wird die Durchflussmesszelle erneut zur Prozessüberwachung eingesetzt. Zudem wird die Zugabe von Medium für einen kontinuierlichen Ausgleich des Probennahmenvolumens im Vergleich zur Bleedrate um 0,15-0,25 mL/h erhöht. Die Ergebnisse für die Lebendzellzahl und Zellviabilität sowie die Metabolitenkonzentrationen sind in Abbildung 17 dargestellt.

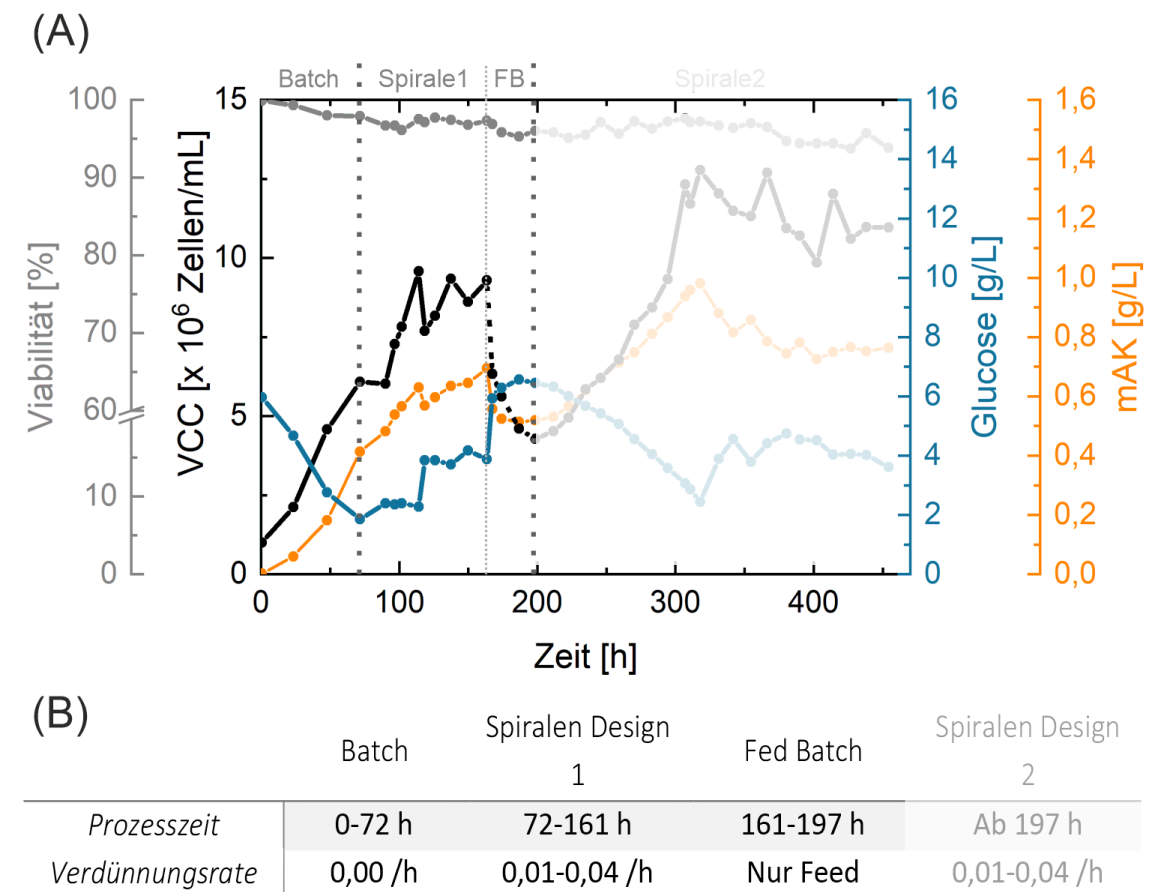


Abbildung 17.1: Perfusionskultivierung P_2 mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250. Offline Messwerte und Austausch der Spirale in (A) sowie die Kultivierungsphasen und Verdünnungsraten in (B).

Auch diese Kultivierung zeigt aufgrund des zusätzlichen Bypasses der Durchflussmesszelle bereits in der Batch Phase ein vermindertes Zellwachstum auf nur 6 Mio. Zellen/mL mit einer Zellviabilität von 96,7 %. Nach 72 h beginnt die erste Perfuionsphase mit Zellrückhaltung erneut mit einer leichten Abnahme der VCC durch das Totvolumen des Separationssystems und die Adaption der Zellen. Anschließend steigt die Lebendzellzahl auf bis zu 9,6 Mio. Zellen/mL an. Um einen sterilen Austausch des Separationssystems zu verifizieren, wird die Spirale jeweils bei 93 h und 101 h kontaminationsfrei ausgewechselt. Vergleichbar zu P_1 treten bei diesen höheren Zelldichten vermehrt Kanalverblockungen auf, die in Zell- und Volumenverlusten resultieren, sodass besonders ohne Betreuung über Nacht keine Prozessstabilität vorliegt. Dies ist nicht nur anhand der VCC-Schwankungen zu erkennen, sondern auch in der plötzlich steigenden Glucosekonzentrationen bei

119 h und 150 h, welche durch einen Volumenausgleich durch das Feedmedium mit erhöhtem Glucoseeintrag verursacht werden. Eine detaillierte Beschreibung der Volumenschwankungen ist im Anhang (6.2.1, Tabelle 21) dargestellt. Während eine Verblockung des Spiralausgangs bei einer Bleedflussrate von 2,4 mL/h nur geringfügige Volumenänderungen bewirkt, sind die Auswirkungen einer Rückführungsverblockung mit 60 mL/h umso schwerwiegender. Eine solche Verblockung mit starkem Zellverlust tritt bei 161 h auf. Die Anhaftung von Zellaggregaten mit Plastikpartikeln im Kanal der Rückführung (Anhang 6.1.8, Abbildung 26 (C)) erhöht den Bleed für mehrere Stunden auf ca. 60 mL/h, sodass sich das Reaktorvolumen von 230 mL auf 100 mL verringert. Vergleichbare Partikel wurden bereits bei der Biokompatibilitätstestung des Materials mit einer Fibroblasten Zelllinie (L929) aus Mäusen detektiert und beeinträchtigen die Zellviabilität nicht.^[72]

Für die Testung eines neuen Spiralen Designs mit veränderter Aufteilung zugunsten der Rückführung (Verhältnis 70:30) wird der Prozess zunächst für 35 h in eine Fed Batch Phase ohne Volumenabnahme überführt (Abbildung 17.1 (A), FB). Um eine Inhibierung der Zellen durch Glucose beim Auffüllen des Reaktors zu vermeiden, wird die Feedflussrate hierbei nach 5 h von 8 mL/h auf 3 mL/h herabgesetzt. Der erkennbare Abfall der VCC in Abbildung 17.1 (A) zwischen 161 h und 197 h zeigt somit keinen Zellverlust, sondern eine starke Verdünnung der Zelldichte durch die kFM1 Zugabe.

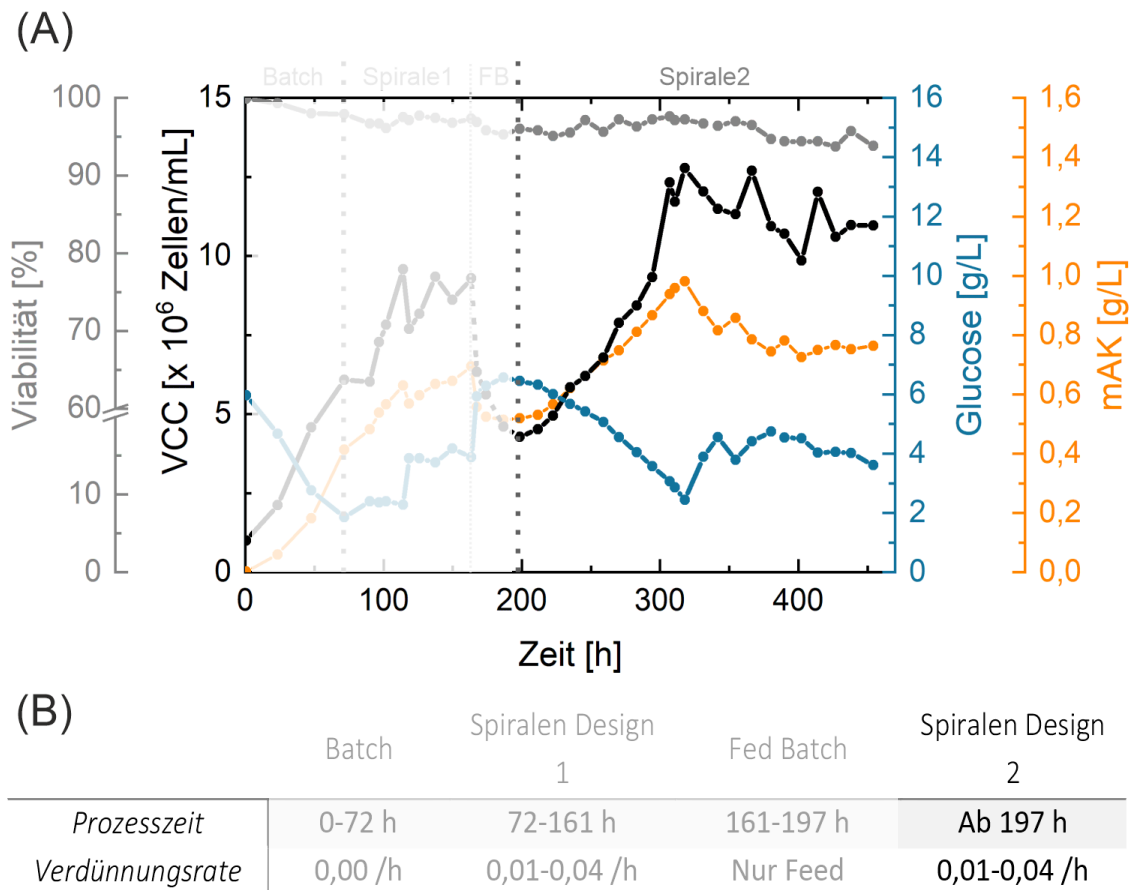


Abbildung 17.2: Perfusionskultivierung P_2 mit optimierter Zellseparationsspirale im Ambr® 250. Offline Messwerte, und Austausch der Spirale in (A) sowie die Kultivierungsphasen und Verdünnungsraten in (B).

Die zweite Perfuionsphase mit optimierter Separationsspirale zugunsten der Rückführung (Spiralen Design 2, Anhang 6.1.8) beginnt bei 197 h mit 4,3 Mio. Zellen/mL, einer Viabilität von 96 % und einer Glucosekonzentration von 6,4 g/L. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der mAK-Titer bereits 0,5 g/L. Obwohl ab 307 h Volumenschwankungen zwischen 195-240 mL auftreten, wird eine VCC über 12 Mio. Zellen/mL mit 97,6 % Zellviabilität erreicht. Ab 318 h wird anschließend der gesteigerte Glucosebedarf durch eine Erhöhung der Verdünnungsrate auf 0,032/h (7,3 mL/h) gedeckt. Im Folgenden ist in Abbildung 17.2 (A) trotz ausreichender Substratversorgung mit einer CSPR von 79,7 pL/Zelle*Tag weder eine Zunahme der VCC über 10-12 Mio. Zellen/mL noch eine Steigerung des mAK-Titers ersichtlich. Dies ist vor allem auf die erschwerte Prozesskontrolle durch wiederholte Verblockungen der Separationsspirale und die resultierenden starken Volumenschwankungen und

Umgebungsänderungen im Reaktor zurückzuführen. Auch die erhöhte Lactatkonzentration (Anhang 6.2.1, Tabelle 21) zeigt eine Ineffizienz des Zellmetabolismus hinsichtlich der Energiegewinnung für Proliferation und Proteinproduktion auf. Zusätzlich sinkt die Zellviabilität innerhalb des angestrebten Steady States stetig bis auf < 94 %, sodass der Prozess nach insgesamt 454 h bei 11 Mio. Zellen/mL und 0,76 g/L mAK beendet wird.

In diesem Versuch konnte ein steriler Austausch des Separationssystems gezeigt werden. Zudem führt die optimierte Kanalaufteilung zugunsten der Rückführung zu einer verringerten Verblockungsrate und verhindert folglich drastische Volumenverluste. Die verbleibenden Verblockungen entstehen vermehrt bei fehlender Betreuung über Nacht und schließen eine stabile Prozessführung aufgrund von starken Umgebungsänderungen aus. Da die manuelle Spülung des Separationssystems mit einer temporären Erhöhung der Flussraten durch die Spirale zeitlich begrenzt ist und Zellverluste beinhaltet, wird im nächsten Ansatz eine automatisierte Spülung mit verdünntem Produktionsmedium integriert.

4.3.2. Implementierung einer automatischen Spülung

Funktionsstörungen durch Kanalverblockungen innerhalb der Separationsspirale sind die Hauptursache für die instabile Prozessführung in P_1 und P_2. Während eine manuelle Beseitigung effektiv ist, setzt sie eine Detektion der Funktionsstörung voraus und kann somit nur tagsüber und in Anwesenheit der Anwender durchgeführt werden. Eine automatische Spülung mit webbasierter Steuerung ist zeitunabhängig und zusätzlich prophylaktisch anwendbar, um Verblockungen nicht nur zu beseitigen, sondern auch zu verhindern. Dazu wird eine stündliche Spülung mit verdünntem Produktionsmedium (PM) für 60 sek mit 4 mL/min implementiert (Anhang 6.2.4).

Die vorangegangenen Perfusionskultivierungen mit einer Prozessüberwachung in einem zusätzlichen Bypass zeigen eine verringerte Zellwachstumsrate sowie eine geringere Zellviabilität, welche die Bildung von Zellaggregaten zusätzlich begünstigen kann. Daher wird im nächsten Ansatz auf einen weiteren Bypass neben der Zellrückhaltung verzichtet. Zusätzlich wird der Scherstress durch das Separationssystem anhand einer photometrischen Messung des im Überstand vorhandenen Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) untersucht. Das Verhältnis der LDH-Aktivität

im Überstand zur Lebendzellzahl ist zusammen mit der Viabilität, der Glucosekonzentration und dem mAK-Titer in Abbildung 18 dargestellt.

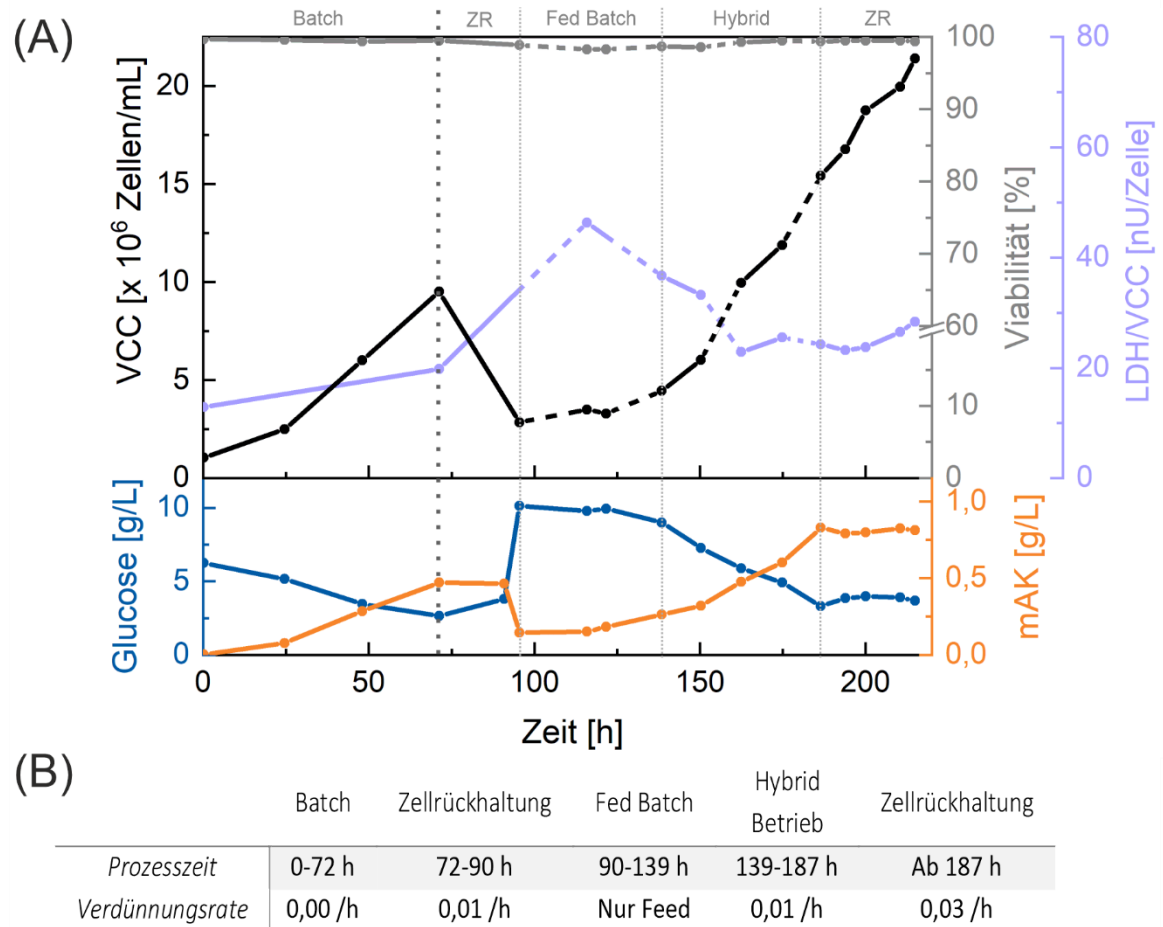


Abbildung 18: Perfusionskultivierung P_3 mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B).

Bereits zu Beginn der Kultivierung ist ohne zusätzlichen Bypass ein vergleichbares Zellwachstum zu den Chemostat Versuchen in Kapitel 4.2 auf bis zu 9,5 Mio. Zellen/mL zum Ende der Batch Phase erkennbar. Die durch hohe Zelldichten zunehmende Zellaggregation verblockt die bei 72 h eingesetzte Separationsspirale trotz automatischer Spülung über Nacht und verringert das Reaktorvolumen auf 25 mL. Für einen Volumenausgleich wurde der Prozess daher ab 90 h in eine Fed Batch Phase überführt. Durch die starke Verdünnung mit kFM1 auf 100 mL Reaktorvolumen sinkt die Lebendzellzahl bei 95 h auf 2,8 Mio. Zellen/mL mit einer

Viabilität von 98,9%. Zusätzlich werden die Zellen durch die erhöhte Glucosekonzentration von 10 g/L temporär im Zellwachstum inhibiert.

Eine zweite kontinuierliche Phase beginnt ab 139 h bei 230 mL Suspensionsvolumen mit der anfänglichen Verdünnungsrate von 0,01/h. Um weitere Volumenverluste über Nacht zu vermeiden, wird für 48 h ein Hybridbetrieb mit abwechselnder Zellrückhaltung und nächtlicher Batch Phase getestet. Zusätzlich wird die automatische Spülung während der Separationsintervalle auf 6 mL/h erhöht. Die gestrichelten Linien der VCC in Abbildung 18 zeigen ein leicht erhöhtes exponentielles Zellwachstum während der diskontinuierlichen Phasen im Vergleich zur Zellretention und somit einen geringen Zellverlust trotz ausreichender Funktionsstabilität der Spirale. Aufgrund des erhöhten Glucosebedarfs wird die Verdünnungsrate anschließend ab 186 h auf 0,032/h erhöht und der Prozess bei 15,4 Mio. Zellen/mL erneut in eine konstante Zellrückhaltung (ZR) überführt.

Während die Glucosekonzentration und der mAK-Titer bei jeweils 4 g/L und 0,8 g/L für 24 h einen quasi-Steady State annehmen, steigt die VCC weiterhin exponentiell bis auf 21,4 Mio. Zellen/mL an. Eine Reduzierung der Flussraten innerhalb der Separationsspirale bewirkt keine steuerbare Änderung der Zellverlustrate durch eine verringerte Retentionseffizienz, sodass für einen Steady State ein zusätzlicher Zellbleed benötigt wird. Daher wird der Prozess nach 215 h beendet.

Da die Zellviabilität unabhängig der zwei verschiedenen Betriebsarten in der Hybrid Phase konstant hoch ist, wird ein negativer Effekt des Separationssystems ausgeschlossen. Eine Betrachtung des Verhältnisses der LDH-Aktivität zur Lebendzellzahl zeigt ebenfalls keine signifikante Erhöhung des Scherstress innerhalb der zweiten kontinuierlichen Phase. Da weiterhin manuelle Spülintervalle mit bis zu 8 mL/min bei Lebendzellzahlen ab ca. 6 Mio. Zellen/mL zur vollständigen Beseitigung von Kanalverblockungen benötigt werden, wird die automatische Spülung im nächsten Ansatz auf 10 mL/min für 60 sek erhöht. In dem Bestreben, den Scherstress auf die Zellen weiter zu reduzieren und Kanalverblockungen mit Volumenverlusten über Nacht zu vermeiden wird ein optimierter Hybrid Betrieb mit abwechselnder Zellrückhaltung und kontinuierlichem Zellbleed getestet. Die resultierende Lebendzellzahl und Viabilität sowie die zellspezifische LDH-Aktivität

sind zusammen mit der Glucosekonzentration und dem mAK-Titer in Abbildung 19 dargestellt.

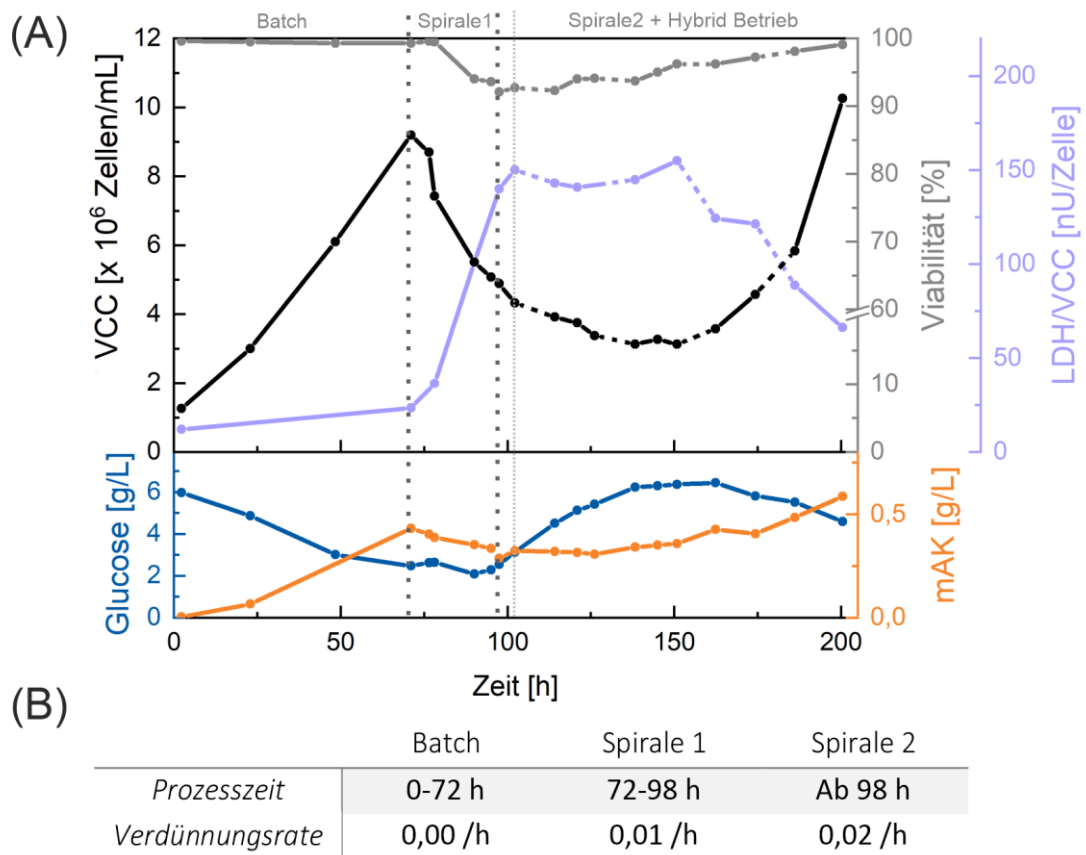


Abbildung 19: Perfusionskultivierung P_4 mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250. Offline Messwerte und Austausch der Spirale in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B).

Ohne zusätzlichen Bypass wird auch in dieser Kultivierung zum Ende der Batch Phase eine typische Lebendzellzahl von 9,2 Mio. Zellen/mL erreicht. Die erste Perfusionsphase beginnt ab 72 h mit dem Einsatz des Separationssystems bei einer Zellviabilität von 99,3 %, 23 nU/Zelle LDH-Aktivität und 2,5 g/L Glucose. Innerhalb von 24 h sinkt die VCC trotz einer Steigerung der Substratzufuhr ($D=0,017/h$) auf 5 Mio. Zellen/mL mit einer reduzierten Viabilität von 93,6 %. Das erhöhte Zellsterben ist ebenfalls in dem Anstieg der LDH-Aktivität und der Lactatkonzentration (Anhang 6.2.1, Tabelle 22) erkennbar, sodass das Separationssystem als mögliche Ursache bei 98 h ausgetauscht wird.

Im Anschluss erreicht die neue Separationsspirale durch die Abtrennung toter Zellen und Zelldebris eine Erholung der Zellviabilität innerhalb von 48 h von 92,1 % auf 95 % und ermöglicht einen erneuten Anstieg der Zellzahl. Durch die erhöhte Aggregationsrate toter Zellen wird die automatische Spülung in dieser Erholungsphase der Zellen zusätzlich auf 90 sek pro Stunde erhöht. Anhand der gestrichelten Linien der VCC in Abbildung 19 (A) innerhalb der kontinuierlichen Zellbleed Phasen im Hybrid Betrieb lässt sich außerdem ab 151 h ein Anstieg der Zellviabilität und der Lebendzellzahl erkennen. Auch die LDH-Aktivität wird bei exponentiellem Anstieg der VCC von ca. 150 nU/Zelle auf 66,3 nU/Zelle reduziert. Der Prozess wird nach 201 h bei 10,3 Mio. Zellen/mL und einer Viabilität von 99,1 % aufgrund einer Kontamination beendet.

Statt einer konstanten Verdünnungsrate wurde die Glucosekonzentration während der kontinuierlichen Phase durch eine Anpassung der kFM1 Zufuhr bei 2,5–6,4 g/L gehalten. Dadurch konnte eine optimale Erholung der Zellen bis hin zu erneutem exponentiellem Wachstum erfolgen. In der kontinuierlichen Phase ist außerdem eine nahezu konstante mAK-Konzentration zu erkennen. Da diesem Zeitpunkt eine geringe Zellviabilität beobachtet werden kann, wird eine zusätzliche Freisetzung des mAK durch vermehrte Zellyse vermutet. Daher ist die gemessene Produktkonzentration im Kulturmedium für die Kalkulation der zellspezifischen Produktivität nicht mehr zulässig. Erst bei Erholung der Zellen ist ein erneuter Anstieg der mAK-Konzentration zusammen mit der Zellzahl erkennbar, der auf eine wachstumsgekoppelte Produktionsphase hinweist.

Da ein Austausch des Separationssystems in einer deutlichen Verbesserung der Umgebungsbedingungen resultiert wird eine inkorrekte Aufreinigung der 3D-gedruckten Spirale als Ursache angenommen. Bei der additiven Fertigung mit HT90 Material (Anhang 6.1.8) wird ein Wachs als Stützmaterial in die mikrofluidischen Kanäle eingebracht und bei der Aufreinigung gründlich entfernt. Ist diese unvollständig, gelangen Wachsreste in die Suspensionskultur und entfalten dort ihre zytotoxischen Eigenschaften. Zusätzlich wurde die Messfunktion der pH-Sonde beeinträchtigt, sodass der pH-Wert der Kultivierung ab 72 h zunächst stark schwankt und anschließend auf 7,7 ansteigt (Anhang 6.2.1, Abbildung 29). Die Abweichungen zum tatsächlichen pH-Wert wurden mithilfe einer offline Messung detektiert und

manuell korrigiert. Im Folgenden wurde das Aufreinigungsprotokoll um eine verlängerte Spülung vor der Sterilisierung der Spirale mit Ethanol (70 %) und ddH₂O für 12-24 h erweitert. Zusätzlich konnte eine Reduzierung der Kanalverblockungen während der Kultivierung mit einer stündlichen automatischen Spülung von 10 mL/min für 90 sek bestätigt werden.

Für eine gesteigerte Prozessstabilität bei der Langzeitanwendung der Separationsspirale in kontinuierlichen Perfusionskultivierungen ist eine Echtzeitüberwachung der Funktionalität unabdingbar. Die frühzeitige Detektion von Funktionsstörungen ermöglicht hierbei eine schnelle Korrektur und die konstante Einhaltung der Prozessbedingungen. Eine Möglichkeit zur Überwachung der Prozessstabilität im Steady State bietet die online Messung der Lebendzellzahl. Diese wird meist invasiv in direktem Kontakt zu den Zellen im Reaktor oder in einem Bypass durchgeführt. Sowohl der Aufenthalt der Zellen außerhalb der optimalen Bedingungen des Reaktors als auch die mechanischen Einflüsse der verwendeten Peristaltik-Pumpen begünstigen jedoch Zellstress. Da die Zellseparationsspirale bereits durch einen Bypass mit einem Totvolumen von < 5% des Reaktorvolumens angeschlossen wird, erhöht ein weiterer Bypass das Risiko der Scherstressbildung. Für die Evaluierung eines zweiten Bypasses zur invasiven Prozessüberwachung wurden der Zeitraum vor Einsatz der Zellseparationsspirale mit und ohne Durchflussmesszelle betrachtet. Das Zellwachstum, die Zellviabilität und die Zellaggregationsrate innerhalb der Batch Phase der vier Kultivierungen ist in Abbildung 20 vergleichend dargestellt.

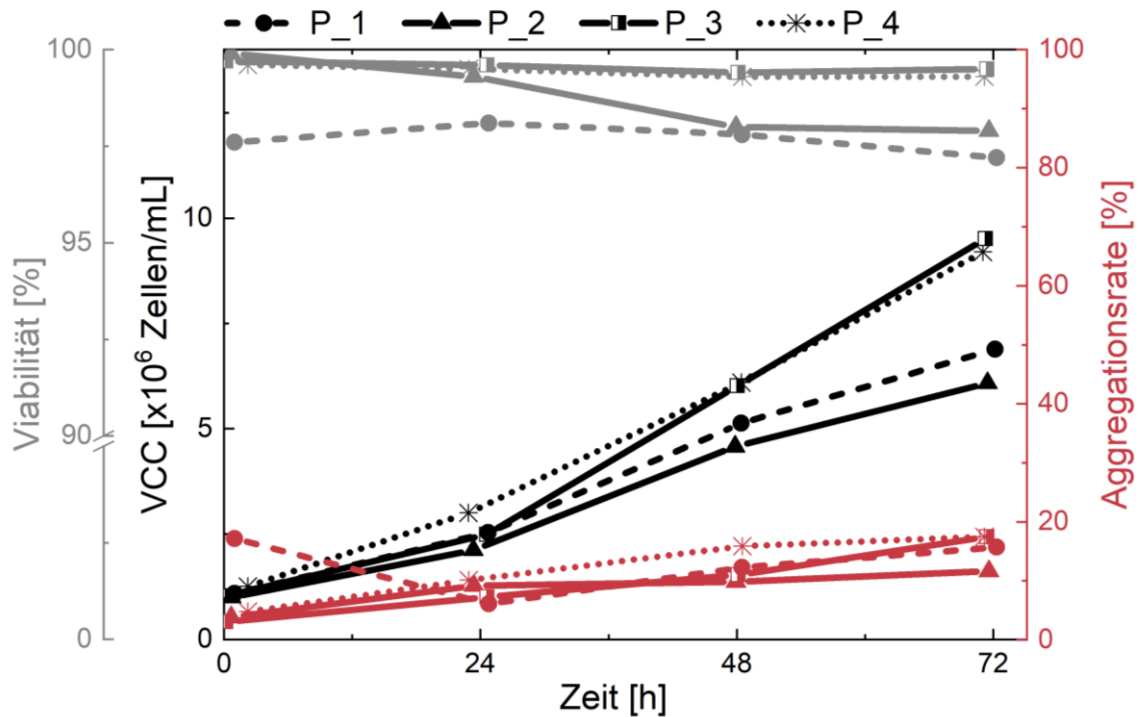


Abbildung 20: Evaluierung eines zusätzlichen Bypasses zur invasiven Prozessüberwachung im Ambr® 250 anhand verschiedener Zelleigenschaften.

P_1 und P_2 weisen spätestens nach 48 h eine verringerte Zellviabilität und ein reduziertes Zellwachstum auf. Während P_3 und P_4 ohne zusätzlichen Bypass nach 72 h über 9 Mio. Zellen/mL erreichen, sind es bei den Kultivierungen mit Durchflussmesszelle nur 6-7 Mio. Zellen/mL. Trotz der geringeren Viabilität von 97 % in P_1 und P_2 sind keine negativen Auswirkungen auf die Aggregationsrate erkennbar. Eine gesteigerte Verblockungsrate bei der Anwendung der Durchflussmesszelle mit der Separationsspirale ist somit unwahrscheinlich.

Die Wachstumsinhibierung des zusätzlichen Bypasses verzögert das Erreichen hoher Lebendzellzahlen und verlängert die Prozessdauer um mehrere Tage. Zusätzlich führt die verringerte Zellviabilität zu einer vermehrten Sekretion von zelleigenen Proteasen, wodurch die Qualität des mAK im abgetrennten Kulturmedium der Perfusionskultivierungen beeinträchtigt wird. Als Ursache wird eine gesteigerte Scherstressbildung durch hohe Bypassflussraten von 5 mL/min und die Peristaltik-Pumpe angenommen, welche für die korrekte Funktion der Durchflussmesszelle benötigt werden. Eine invasive Prozessüberwachung durch einen zusätzlichen

Bypass ist daher für kontinuierliche Prozesse mit der Zellseparationsspirale als Zellrückhaltesystem ungeeignet.

4.3.3. Implementierung einer Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung zur Steigerung der Prozesstabilität

Für den kontinuierlichen Betrieb des mikrofluidischen Zellrückhaltesystems wird eine Prozessüberwachung benötigt, die auch über Nacht eine schnelle Detektion von Funktionsstörungen ermöglicht. Da invasive Biosensoren oft zu groß für das Ambr® 250 System sind und der mechanische Stress eines zusätzlichen Bypasses zu einer Wachstumsinhibierung führt, soll der Abfluss aus dem System überwacht werden. Die gravimetrische Bestimmung der Bleedflussrate aus der Spirale erlaubt direkte Rückschlüsse auf mögliche Kanalverblockungen. Daher wird die Gewichtszunahme des abgetrennten Kulturmediums einer weiteren Perfusionskultivierung in Echtzeit überwacht und daraus die Bleedflussrate berechnet. Für eine benutzergerechte Anwendung werden die Ergebnisse des Waagensignals und der Flussratenberechnung grafisch in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (Anhang 6.2.5, Abbildung 31). Zusätzlich wird ein mobiler Alarm ausgelöst, sobald die berechneten Flussraten von einem manuell festgelegten Bereich abweichen und eine Funktionsstörung der Spirale anzeigen. Anschließend kann das Separationssystem über eine webbasierte Steuerung und das in Kapitel 4.3.2 implementierte Skript manuell gespült werden. Eine automatische stündliche Spülung erfolgt unabhängig von der Flussratenüberwachung.

Für eine verbesserte Zellretentionseffizienz beginnt die Zellrückhaltung in dieser Kultivierung zusätzlich mit einer Verdünnungsrate von 0,01/h mit kFM1 und einer erhöhten internen Flussrate von 3 mL/min durch die Spirale. Ziel ist es, anhand der webbasierten Flussratenüberwachung eine stabile Prozessoperation im Steady State mit Zellbleed zu erreichen. Die Ergebnisse der Lebendzellzahl und Viabilität sowie die LDH-Aktivität sind gemeinsam mit der Glucosekonzentration und dem Produkttiter in Abbildung 21 zusammengefasst.

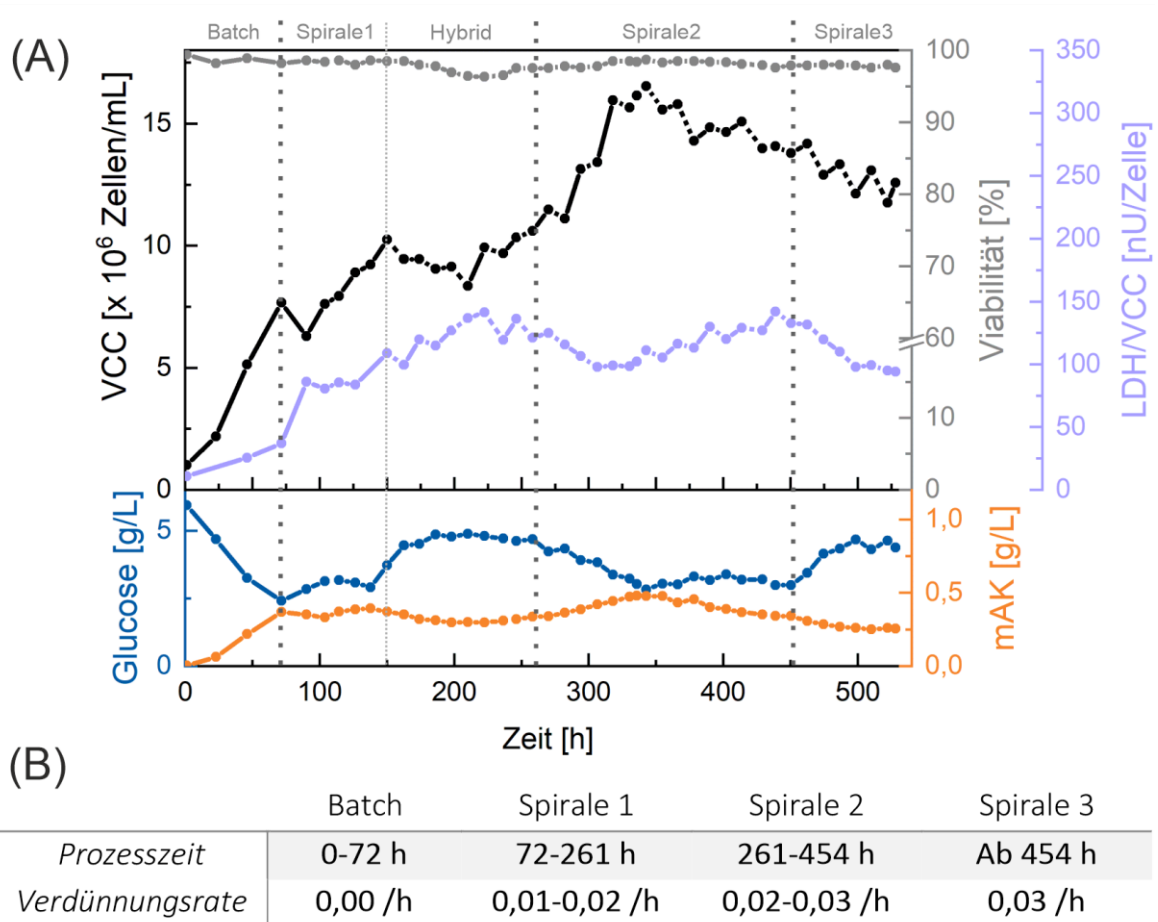


Abbildung 21: Perfusionskultivierung P_5 mit Zellseparationsspirale, automatischer Spülung und Flussratenüberwachung im Ambr® 250. Offline Messwerte, Austausch der Spirale und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B).

Der Einsatz der Separationsspirale beginnt im Anschluss an die Batch Phase bei 8 Mio. Zellen/mL und 98,2 % Viabilität. Statt einer erwarteten leichten Abnahme der Lebendzellzahl durch das Totvolumen des Separationssystems und die Adaption der Zellen, führt die interne Flussrate von 3 mL/min durch die Spirale zu einer erhöhten Abnahme der VCC mit einer deutlichen Zunahme der LDH-Aktivität. Da die erhöhte LDH-Aktivität im Kulturmedium auf Scherstress hinweist, wird die Flussrate durch die Spirale nach 20 h auf 2 mL/min reduziert. Um den Scherstress weiter zu reduzieren und die Prozessstabilität über Nacht zu erhöhen, wird der Prozess ab 152 h in einen Hybrid Betrieb mit abwechselnder kontinuierlicher Phase mit und ohne Zellrückhaltung überführt. Hierbei ist eine leichte Abnahme der LDH-Aktivität in den Phasen ohne Zellrückhaltung erkennbar. Trotz der implementierten Echtzeitüberwachung führen geringe Abweichungen der Bleedflussraten durch

vereinzelte Verblockungen bereits zu Volumenschwankungen von 220-240 mL im Reaktor.

Aufgrund des geringen Zellwachstums und der stetig sinkenden Viabilität auf 97,5 % wird das Separationssystem bei 261 h ausgetauscht. Da die Lebendzellzahl mit der neuen Separationsspirale erneut exponentiell steigt, wird eine Wachstumsinhibierung durch Extractables und Leachables bei langfristiger Anwendung der alten Spirale vermutet. Literaturangaben bestätigen die bedingte Biokompatibilität des verwendeten thermostabilen Druckmaterials bei Langzeitnutzung.^[72] Für die Bestätigung der Hypothese einer verminderten Langzeitbiokompatibilität wird das Separationssystem erneut bei verringertem Zellwachstum (454 h) und reduzierter Viabilität ausgetauscht. Auch hier ist ein exponentieller Anstieg der VCC in den Phasen mit Zellrückhaltung als Folge der neuen Separationsspirale erkennbar. Zusätzlich bestätigt die steigende LDH-Aktivität bei langer Nutzungsdauer einer Spirale eine Beeinträchtigung der Zellen und zeigt durch ein erneutes Absinken eine Erholung der Zellen infolge eines Austausches.

Da die Glucosekonzentration im Reaktor bei Verdünnungsraten bis zu 0,032/h dem Bedarf der Zellen entspricht, ist eine Nährstofflimitierung oder Überfütterung auszuschließen. Zusätzlich liegt die Nährstoffzufuhr mit 59,1 pL/Zelle*Tag über der kritischen CSPR von 50 pL/Zelle*Tag^[40] für das verwendete Medium kFM1. Zudem spiegelt die mAK-Konzentration den Verlauf der Lebendzellzahl wider und zeigt eine wachstumsgekoppelte Produktion ohne metabolisches Umschalten zwischen Proliferation und Produktivität. Der Prozess wird bei einer VCC von 12,6 Mio. Zellen/mL mit 97,5 % Viabilität und einem mAK Titer von 0,3 g/L beendet.

Für einen detaillierten Einblick in die Zellretentionseffizienz, die Produktretention und die Funktion der Separationsspirale, wird die abgetrennte Fraktion zusätzlich erfasst und analysiert. Die Aggregationsrate und die durchschnittliche Zellgröße sowie die mAK-Konzentration im Reaktor und in der zellarmen Bleedfraktion sind in Abbildung 22 dargestellt.

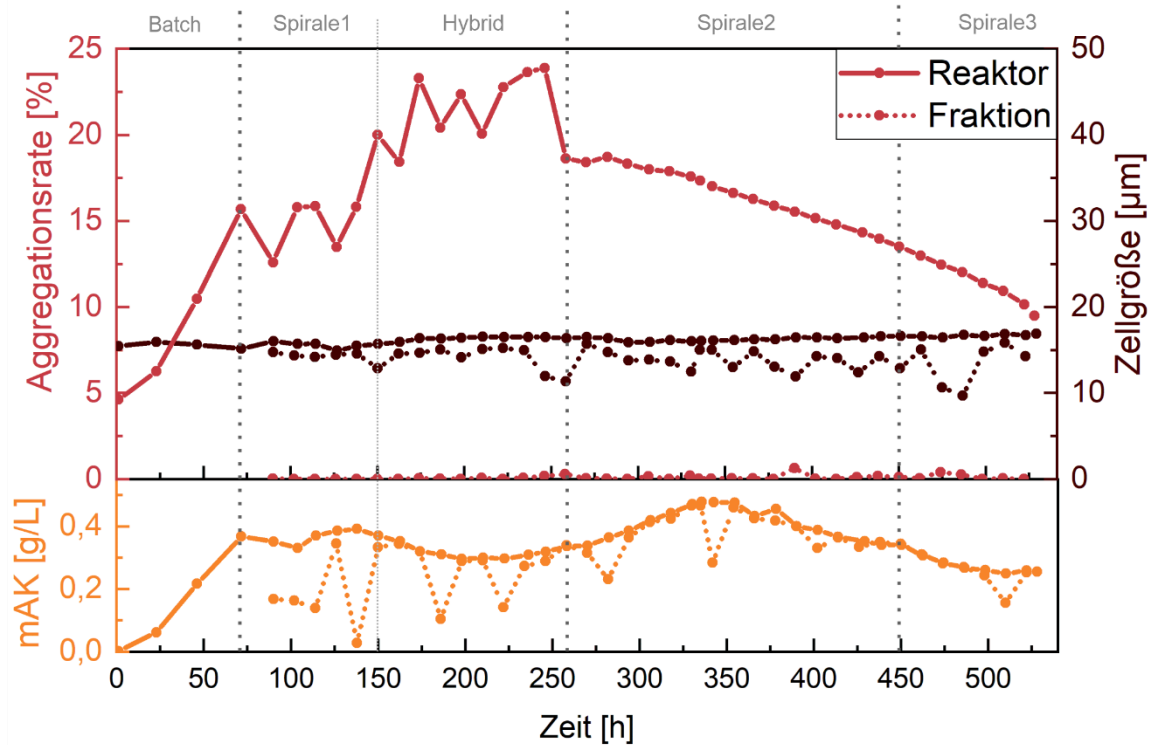


Abbildung 22: Produktretention und Zellseparation der Perfusionskultivierung P_5 im Ambr® 250. Offline Messwerte der abgetrennten Fraktion und im Reaktor sowie Austausch der Spirale und Kultivierungsphasen.

Die Zellaggregationsrate im Reaktor steigt mit der ersten Separationsspirale auf bis zu 24 % an und wird durch einen Austausch bei 261 h schlagartig um 5 % reduziert. Anschließend sinkt die Aggregationsrate unabhängig weiterer Prozesseingriffe bis zum Ende der Kultivierung auf 10 %. In der abgetrennten Fraktion sind hingegen keine Zellaggregate erkennbar, sodass die Rate konstant bei < 1% liegt. Unklar ist, ob die erhöhte Zellaggregationsrate im Reaktor zu Beginn durch eine starke Akkumulation von Extractables und Leachables verursacht wurde oder eine Folge der abnehmenden Zellviabilität darstellt. Da die Aggregationsrate aber im späteren Verlauf der Kultivierung nicht mehr steigt, wird die abnehmende Zellviabilität als Auslöser der Aggregation angenommen. Zusätzlich werden durch die Separationsspirale hauptsächlich einzelne kleinere Zellen und Zelltrümmer und keine Aggregate abgetrennt, was durch den Vergleich der durchschnittlichen Zellgröße bestätigt wird. Die fraktionierten Zellen sind hier im Durchschnitt > 2 µm kleiner als im Reaktor, wobei Schwankungen innerhalb der Messungen durch Spülvorgänge mit verdünntem Medium verursacht werden.

Eine kontinuierliche Produktabtrennung setzt zudem voraus, dass die abgetrennte Produktkonzentration vergleichbar zu dem erreichten mAK-Titer im Reaktor ist. Diese Grundvoraussetzung wird in Abbildung 22 durch vergleichbare Konzentrationen im Reaktor und in der zellarmen Fraktion bestätigt. Verdünnungen durch eine Spülung der Spiralkanäle kurz vor der Probennahme sind hierbei besonders im Zeitintervall von 100- 350 h erkennbar.

Neben der Produktausbeute, der Zellgröße und der Aggregationsrate ist für die Beurteilung der Retentionseffizienz die Lebendzellzahl und die Viabilität in der abgetrennten Fraktion essenziell. Abbildung 23 stellt neben diesen Größen zusätzlich die Zellretention in Prozent dar.

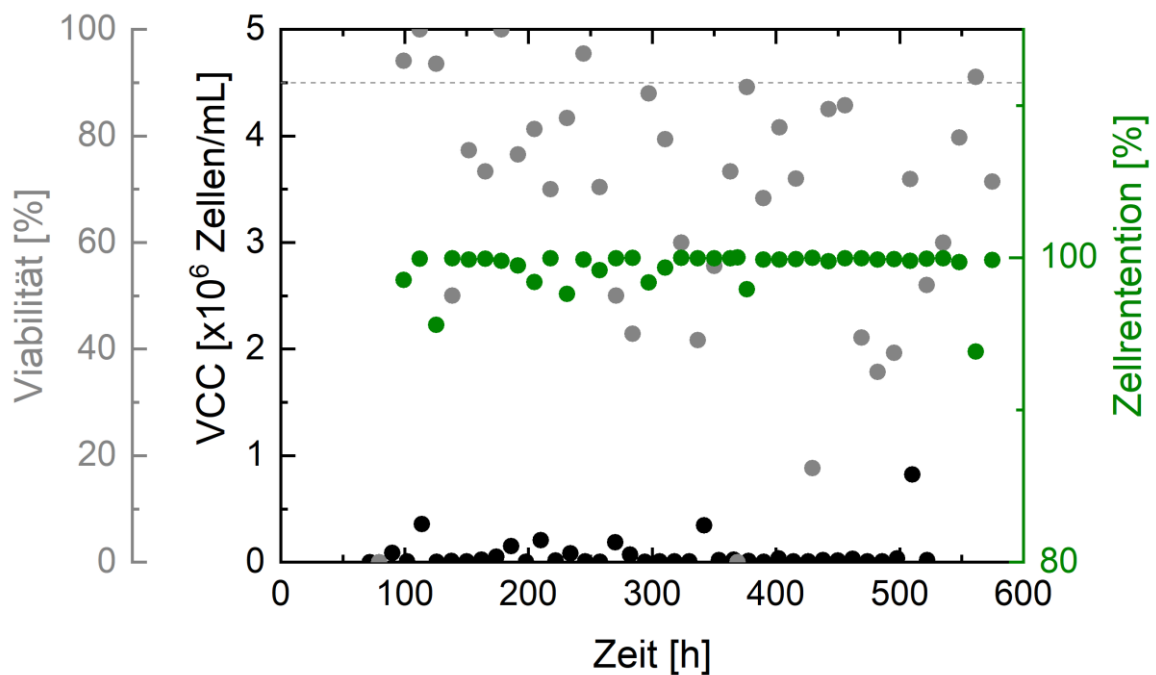


Abbildung 23: Zellretention, VCC und Viabilität der abgetrennten Fraktion der Perfusionskultivierung P_5 im Ambr® 250.

Vergleichbar zu Abbildung 22 lassen sich bedingt durch die Spülvorgänge in der abgetrennten Fraktion teilweise viable Zellen nachweisen. Dabei werden sedimentierte Zellen zusammen mit Zellresten aus den Kanälen und den Reservoirs der Pulsationspuffer in die zellarme Fraktion gespült. Die VCC liegt hier jedoch mit maximal 0,8 Mio. Zellen/mL weit unter der Zellzahl im Reaktor. Der Einfluss der Spülung vor einer Probennahme ist ebenfalls in der stark schwankenden Viabilität

zwischen 40-100 % erkennbar. Ein Großteil der Proben aus der zellarmen Fraktion zeigt jedoch eine Zellviabilität deutlich unter 90 % (Abbildung 23, grau gestrichelt) und somit weit unter der Zellviabilität im Reaktor. Die deutlich höheren Zelldichten im Reaktor im Vergleich zur Fraktion zeigen, dass die Zellretention weiterhin fast ausschließlich bei 100 % liegt. Somit wird die korrekte Funktionsweise und die hohe Zellretentionseffizienz des Separationssystems bestätigt.

Die Etablierung der 3D-gedruckten Separationsspirale als Zellrückhaltesystem wurde durch die Implementierung einer automatischen Spülung und einer gravimetrischen Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung ermöglicht. Hierbei werden tote und kleine Zellen sowie Zelldebris zuverlässig abgetrennt, sodass die Viabilität im Reaktor bei > 97 % gehalten wird. Inhibierende Nebenprodukte wie Lactat werden kontinuierlich abgeführt, sodass keine Beeinträchtigung der Zellen durch Akkumulation stattfindet. Zusätzlich konnte in P_3 eine Erholung der Zellen durch gezielte Abtrennung eingebrachter zytotoxischer Wachsreste innerhalb von 48 h gezeigt werden. Durch die hohe Zellretention wird dabei selbst bei hohen Verdünnungsraten von 0,033 /h ein exponentielles Zellwachstum bis über 20 Mio. Zellen/mL ermöglicht. Zusätzlich konnte die Prozessstabilität in P_5 für Zelldichten bis 17 Mio. Zellen/mL erfolgreich durch die automatische Spülung und eine Flussratenüberwachung sowie die Überführung in einen Hybrid Prozess mit und ohne Zellrückhaltung gesteigert werden. Die Implementierung des Zellbleeds ermöglicht somit eine stabile Prozessoperation bei der angestrebten Zelldichte. Bei der Auswahl eines langezeitstabilen biokompatiblen Druckmaterials bietet die Zellseparationsspirale eine flexible Alternative zu den kommerziell erhältlichen Produkten.

Neben der Implementierung der kontinuierlichen Kultivierungsprozesse zur Vertiefung des Prozessverständnisses und der Zellcharakterisierung, liegt der Fokus dieser Arbeit auf einer Produktivitätssteigerung. Ausgehend vom etablierten Fed Batch Prozess als Referenz (FB_Ref) werden ausgesuchte Kultivierung hinsichtlich einer Steigerung der mAK-Produktivität oder des Umsatzes evaluiert. Dazu wird die Lebendzellzahl, die durchschnittliche zellspezifische Produktivität (avg Q_p), der mAK-Titer und die Zellviabilität der pH-optimierten Fed Batch Kultivierung und der kontinuierlichen Prozesse mit der Referenz verglichen. Während die Lebendzellzahl

und der mAK-Titer sich für die diskontinuierlichen Kultivierungen auf die maximale VCC und den kumulativen Endtiter beziehen, wird für die Chemostat und Perfusionsprozesse nur die Phase der stabilen Prozessoperation betrachtet. Tabelle 2 zeigt zwei Fed Batch Kultivierungen und je zwei kontinuierliche Kultivierungen mit und ohne Zellrückhaltung, in denen ein quasi-Steady State erreicht werden konnte.

Tabelle 2: Evaluation der Produktivitätssteigerung durch die Implementierung einer kontinuierlichen Prozessführung. Vergleich wichtiger Kenngrößen zwischen Fed Batch (FB), Chemostat und Perfusionskultivierungen.

| | FB_Ref ³ | FB_pH | Chemostat C_1 | Chemostat C_3 | Perfusion P_2 | Perfusion P_5 |
|--|---------------------|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| VCC [Zellen/mL] | 24 Mio. | 23 Mio. | 8 Mio. | 13 Mio. | 10-12 Mio. | 12-14 Mio. |
| avg Q_p [pg/Zelle*Tag] | 24 | 28 | 29 | 21 | ~66 | ~16 |
| mAK [g/L] | 2,9 | 3,5 | 0,2/Tag | 0,24/Tag | ~0,6/Tag | ~0,23/Tag |
| Viabilität [%] | > 97 | > 96 | 98,7 | 98,5 | ~95,2 | ~97,9 |

Da die Steigerung der Zelldichte unter anderem mit Herausforderungen in der Sauerstoffversorgung und der Temperaturregelung im Reaktor einhergeht, liegt der Fokus der Produktivitätssteigerung auf der Erhöhung der Q_p oder einer Umsatzsteigerung durch konstante Produktbildung. Dementsprechend erreicht der Referenz Fed Batch Prozess (FB_Ref) mit einer maximalen VCC von 24 Mio. Zellen/mL im Vergleich die höchste Zelldichte. Durch eine pH-Erhöhung in der exponentiellen Wachstumsphase konnte die Produktivität in FB_pH (Abbildung 6, pH_5) um 4 pg/Zelle*Tag gesteigert werden. Aufgrund der nur leicht verringerten Lebendzellzahl wird so eine Steigerung des mAK-Endtiters um 0,6 g/L erreicht.

Obwohl die Lebendzellzahlen der kontinuierlichen Kultivierungen innerhalb der stabilen Prozessoperation weit unter der maximalen VCC der Fed Batch Kultivierungen liegen, ist der mAK-Umsatz nach wenigen Tagen vergleichbar. Die Chemostat Kultivierung C_1 besitzt die geringste Zelldichte bei 8 Mio. Zellen/mL,

³ Referenz aus allen verwendeten Bioreaktormaßstäben (Anhang 6.2.1, Tabelle 23)

erreicht jedoch aufgrund einer Produktivitätssteigerung um 5 pg/Zelle*Tag im Vergleich zur Referenz nach 12 Tagen im quasi-Steady State einen vergleichbaren kumulativen mAK-Titer von 2,8 g/L. Für diese Berechnung wurde die vollständige Ernte des verbleibenden Produktes im Reaktor zum Prozessende mit einbezogen. Somit führt die in C_1 beobachtete Produktivitätssteigerung bereits bei einer geringfügigen Verlängerung der Prozessdauer im Vergleich zur Referenz zu einer Steigerung der erzielten Umsatzes. Durch Zelldichten von 13 Mio. Zellen/mL in C_3 kann ein Titer von 3 g/L trotz verringerter zellspezifischer Produktivität bereits nach 8 Tagen im stationären Zustand und vollständiger Ernte zum Prozessende erreicht werden. Ein Steady State mit einer Verdünnungsrate von 0,01 /h erzielt dementsprechend eine Umsatzsteigerung bei gleichbleibender Prozessdauer im Vergleich zur Referenz statt einer Steigerung der zellspezifischen Produktivität.

Vergleichbare Zelldichten zu C_3 werden auch in den Perfusionskultivierungen P_2 (10-12 Mio. Zellen/mL) und P_5 (12-14 Mio. Zellen/mL) erreicht. Während die stationären Zustände der Chemostat Kultivierungen vorwiegend konstant bleiben, bestehen innerhalb der Perfusionskultivierungen Schwankungen aufgrund von Funktionsbeeinträchtigungen des Zellrückhaltungssystems. P_2 erreicht mit einer Steigerung von ca. 42 pg/Zelle*Tag die höchste zellspezifische Produktivität mit einem Umsatz von ungefähr 0,6 g/L*Tag mAK. Ein Produkttiter von 3 g/L kann hier mit einem stabilen Steady State und einer vollständigen Ernte zum Prozessende demnach bereits nach 4 Tagen erreicht werden. Die Kultivierung P_5 erreicht aufgrund einer deutlich reduzierten zellspezifischen Produktivität im Vergleich zur Referenz (-6 pg/Zelle*Tag) trotz vergleichbarer Zelldichten zu C_3 und P_2 nur einen mAK-Umsatz von 0,23 g/L*Tag. Da ein Produkttiter von 3 g/L hier erst nach 12 Tagen im Steady State und einer vollständigen Ernte zum Prozessende erreicht werden kann, ist in dieser Kultivierung keine Form der Produktivitätssteigerung erkennbar.

Da nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität des mAK vom Wohlbefinden der Zellen abhängig ist, wird zusätzlich die Zellviabilität betrachtet. Eine reduzierte Viabilität im Vergleich zur Referenz kann hierbei eine Beeinträchtigung der Produktqualität durch sekretierte zelleigene Proteasen oder unvollständige Faltung und post-translationale Modifikation verursachen. Während beide Chemostat Kultivierungen eine höhere Zellviabilität im Vergleich zur Referenz aufweisen, zeigt

P_2 mit der höchsten Produktivitätssteigerung die geringste Viabilität von 95,2 %. Da der stationären Zustand aufgrund vermehrter Verblockung der Separationsspirale instabil ist, wird eine wiederholte Anpassung der Zellen an die plötzlichen Änderung vermutet. Diese verursacht neben der Produktivitätssteigerung vergleichbar zu FB_pH eine zusätzliche Reduzierung der Zellviabilität. Die Perfusionskultivierung P_5 mit automatischer Spülung und implementierter Flussratenüberwachung zeigt eine verbesserte Prozessstabilität und eine vergleichbare Zellviabilität zur Referenz. Da keine der hier gezeigten Kultivierungen eine Zellviabilität unter 90 % aufweist und die untere Grenze des Design Space der Referenz bei 75 % liegt (Anhang 6.1.6), kann eine starke Beeinträchtigung der Produktqualität ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kontinuierliche und semi-kontinuierliche Prozessstrategien untersucht, um die Ausbeute eines monoklonalen Antikörpers (mAK) mit der verwendeten CHO DG44-Zelllinie zu steigern. Für die Zellrückhaltung wurde eine 3D-gedruckte, mikrofluidische Zellseparationsspirale eingesetzt. Die metabolische Zellcharakterisierung wurde anhand des etablierten Fed Batch Prozesses durch pH-Wert Änderungen, einer semi-kontinuierliche Zufütterung und Untersuchungen des Glucose Bedarfs erweitert.

Für die Implementierung einer kontinuierlichen Prozessführung zur Produktivitätssteigerung bei der Kultivierung tierischer Zellen wurde zunächst die Steigerung der zellspezifischen Produktivität im Fed Batch untersucht und etabliert. Hierbei konnte eine temporäre Wachstumsinhibierung der Zellen mit erhöhter Produktivität bei plötzlichen Änderungen der Umgebungsbedingungen detektiert werden. Die pH-Wert Erhöhung innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase an Tag 5 erreicht eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität um bis zu 8 %. Zusätzlich besteht ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der erhöhten Produktivität und einer Vergrößerung des durchschnittlichen Zelldurchmessers. Da der kumulative mAK-Titer lediglich um 0,1 g/L auf 3,5 g/L ansteigt, gleicht die induzierte Produktivität jedoch nicht die verringerte Zelldichte aus. Für eine Steigerung der mAK-Ausbeute wird daher eine pH-Wert Erhöhung kurz vor Erreichen der maximalen Lebendzellzahl zum Ende des exponentiellen Wachstums empfohlen.

Aufgrund der geometrischen Abweichungen der Ambr® 15 Bioreaktorgefäße wurde der Fed Batch Prozess für weitere Screening Ansätze im Labormaßstab in das Ambr® 250 transferiert. Mithilfe dieser Referenzkultivierungen wurde der Einfluss einer semi-kontinuierlichen Zufütterung als Übergang zum kontinuierlichen Betrieb untersucht. Vergleichbar zur plötzlichen pH-Wert Änderung führt der tägliche Bolus Feed der Fed Batch Referenz zu einer temporären Anpassung der Zellen mit erhöhter Produktivität. Die semi-kontinuierliche Fütterungsstrategie hingegen erreicht eine Steigerung der maximalen Lebendzellzahl von 3,1 Mio. Zellen/mL bei gleichem kumulativen mAK-Titer (2,5 g/L an Tag 11). Die temporäre Umstellung von Proliferation zu Produktion bei plötzlichen Änderungen der Umgebungsbedingungen wird somit bestätigt.

Für einen Transfer in den kontinuierlichen Betrieb wurden zwei verschiedene Prozessstrategien mit anfänglicher Batch Phase untersucht. In einer Chemostat Kultivierung ohne Zellrückhaltung bestimmt die Substratverfügbarkeit durch definierte Verdünnungsraten (D) die Zellwachstumsrate und Zelldichte im Reaktor. Im Steady State gleicht die Wachstumsrate dem Zellverlust, sodass die Zelldichte und die Substratkonzentrationen konstant bleiben. Änderung des Zellmetabolismus durch Prozesseingriffe wie pH-Änderungen haben in diesem Steady State einen sichtbaren Einfluss auf die Zelldichte im Reaktor. Ein quasi-Steady State wurde erfolgreich im Biostat® 2L für 38 h mit $D=0,029/h$ bei 8 Mio. Zellen/mL und einem mAK-Titer von $0,2 \text{ g/L*Tag}$ erzielt. Dieser Zustand bietet nach > 12 Tagen eine höhere Produktausbeute im Vergleich zum Fed Batch Prozess. Mithilfe eines vereinfachten Bioprozessmodells und historischen Fed Batch Daten wurden optimierte Verdünnungsraten und Medienkompositionen für einen Steady State bei einer erhöhten Zelldichte von 17 Mio. Zellen/mL gefunden. Die Evaluierung der optimalen in-silico Bedingungen zeigt eine Inhibierung bei hohen Glucosekonzentrationen, die vom vereinfachten Modell zusammen mit der Berücksichtigung des verminderten Zellwachstums nicht beschrieben werden konnte.

Die Grenzen dieser Wachstumsinhibierung wurden in einem kontinuierlichen Ansatz im Ambr®250 mittels drei verschiedener Feedmedienkompositionen untersucht. Ein reduziertes Zellwachstum mit erhöhter Produktivität durch hohe Glucosekonzentrationen tritt bei $> 8 \text{ g/L}$ (+1 Tag) auf und ist reversibel. Dementgegen steht die irreversible Glucoselimitierung, die in Schüttelkolben nach mind. 24 h zu einer Abnahme der Viabilität und zum Zelltod führte. Diese Beobachtung wurde durch eine 33 Tage Chemostat Kultivierung bestätigt, bei der die exponentielle Zunahme der Lebendzellzahl in einer Depletion von Glucose und einem anschließendem Zellsterben ohne erneutes Wachstum resultiert. Eine korrekte Simulation des kontinuierlichen Prozesses ohne Zellrückhaltung benötigt die Abbildung des vollständigen und bisher noch nicht umfassend bekannten, hochkomplexen Zellmetabolismus im Modell. Dennoch wurde die Kultivierbarkeit der verwendeten Zelllinie in kontinuierlichen Chemostat Prozessen $> 300 \text{ h}$ bestätigt und bei gleicher Prozessdauer ein gleichwertiger kumulativer Titer zum etablierten Fed Batch Prozess erreicht. Ein kurzzeitiger stabiler Zustand bei 13 Mio. Zellen/mL mit einem mAK Titer von $0,24 \text{ g/L*Tag}$ einer weiteren Chemostat Kultivierung lässt zudem vermuten, dass

eine Umsatzsteigerung durch erhöhte Zelldichten grundsätzlich möglich ist. Für eine Bestätigung dieser Annahme sollte der quasi-Steady State erneut repliziert und für eine Dauer von mind. einer Reaktorverweilzeit (τ) für einen vollständigen Volumenaustausch gehalten werden. Da das Zellwachstum im Chemostaten durch die Substratkonzentration beeinflusst wird, kann eine Prozessautomatisierung im weiteren Verlauf durch eine Echtzeitüberwachung der Substratkonzentration mit zusätzlicher Regelung ermöglicht werden.

Als zweiter Ansatz wurde ein Perfusionsprozess mit mikrofluidischer Zellrückhaltung untersucht. Das 3D-gedruckte System besteht hierbei aus einer Zellseparationsspirale mit gebogenen mikrofluidischen Kanälen und zwei Pufferkammern zur Reduzierung der turbulenten Strömung, die durch den Pulsationsfluss von Peristaltik-Pumpen verursacht wird. Während Enders *et al.* bereits eine Kapazitätsgrenze von bis zu 20 Mio. Zellen/mL aufzeigt,^[45] wurde die Separationsspirale in dieser Arbeit erstmalig at-line an einen Produktionsprozess im Ambr® 250 angeschlossen. Für die Untersuchung der Langzeitstabilität der kontinuierlichen Zellrückhaltung wurde die Funktionsbeeinträchtigungen durch Kanalverblockungen analysiert und minimiert. Dazu wurde das Design der Kanalauftrennung von einem Verhältnis von 50:50 auf 70:30 zugunsten der Rückführung in den Reaktor erweitert. Diese Anpassung verringert Volumenverluste durch Verblockung der Rückführung deutlich und erhöht somit die Prozessstabilität. Eine weitere Reduzierung der Kanalverblockungsrate wurde durch die Implementierung einer automatischen Spülung mit webbasierter Steuerung erreicht. Die stündliche Spülung wurde hierbei hinsichtlich der benötigten Dauer (90 s) und der Flussrate durch die Spirale (10 mL/min) optimiert.

Für die Prozessüberwachung und schnelle Detektion von Funktionsstörungen der Separationsspirale wurden ein online Trübungssensor als Durchflussmesszelle und eine gravimetrische Flussratenüberwachung evaluiert. Die Durchflussmesszelle bildet die im Reaktor befindliche Lebendzellzahl korrekt ab, beeinträchtigt durch die hohen Bypass Flussraten von 5 mL/min und die zusätzliche Peristaltik-Pumpe jedoch erheblich die Viabilität und das Wachstum der Zellen. Im Gegensatz zur invasiven Durchflussmesszelle, greift die webbasierte gravimetrische Flussratenüberwachung nicht in den Prozess ein und hat somit keinen Einfluss auf die Kultivierung. Hierbei wird die Gewichtszunahme der durch die Zellrückhaltung abgetrennten Fraktion

verwendet, um die zellarmen Bleedflussraten zu kalkulieren. Zusätzlich wurde ein mobiles Alarmsystem implementiert, welches den Anwender bei Abweichungen außerhalb des manuell festgelegten Bereiches benachrichtigt. Durch die ebenfalls webbasierte Steuerung der automatischen Spülung können mögliche Verblockungen anschließend manuell beseitigt werden.

Zusätzlich zur Optimierung der Funktionsstabilität des Zellseparationssystems, wurde die Langzeitkompatibilität des Materials und die Beeinträchtigung der Zellen durch Scherstress in einem Perfusionsprozess mit einer Dauer von über 500 h untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Reduzierung der Viabilität und des Zellwachstums nach ca. 190 h (< 8 Tage) beobachtet werden. Eine Steigerung der Wachstumsrate und Reduzierung der sekretierten Lactat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität nach Austausch der Separationsspirale bestätigt die mit der Anwendungsdauer abnehmenden Biokompatibilität des Druckmaterials. Eine Bestimmung möglicher Extractables und Leachables wurde hierbei nicht durchgeführt. Zusätzlich zum Material besitzt die Flussrate durch die Spirale sowie die Betriebsweise einen starken Einfluss auf die Bildung von Scherstress. Die LDH-Aktivität als Scherstressindikator wurde durch einen Hybrid Prozess aus täglicher Zellrückhaltung und Zellbleed über Nacht sowie eine Flussrate von 2 mL/min durch die Spirale minimiert. Zur Beurteilung der Zellretentionseffizienz des Separationssystems wurde die abgetrennte zellarme Fraktion hinsichtlich verschiedener Zellcharakteristika sowie der Produktkonzentration analysiert. Während hauptsächlich kleine und tote Zellen, sowie Zelldebris entfernt werden, verbleiben Aggregate und größere Zellen im Reaktor. Trotz der Detektion geringer Zellzahlen in der Fraktion, beträgt die Retentionseffizienz bei 2 mL/min Durchfluss durch die Spirale weiterhin ca. 100 %. Durch den Zusammenhang zwischen Zellgröße und Produktivität kann die Spirale somit eine high-producer Kultivierung durch die Rückhaltung von Zellen mit intensivierter mAK-Produktivität ermöglichen.

Im Gegensatz zur Auftrennung der Zellen spiegelt die mAK-Konzentration in der abgetrennten Fraktion den mAK-Titer im Reaktor korrekt wider. Die mikrofluidische Zellrückhaltung ermöglicht somit eine Produktausbeute ohne Verluste durch Adsorption des Antikörpers an das Druckmaterial. Bei der Anwendung in einem rekombinanten Produktionsprozess wird für die Erhaltung der Produktqualität in der

abgetrennten Fraktion zusätzlich eine kontinuierliche Aufreinigung zur Abtrennung sekretierter Proteasen benötigt. Mikrofluidische Ansätze wie die periodische Gegenstromchromatografie (μ PCCC) besitzen kompatible Verdünnungsraten zu dem in dieser Arbeit evaluierten Prozess.^[73]

Aufgrund der abnehmenden Biokompatibilität des Druckmaterials und einer Trennkapazität von unter 20 Mio. Zellen/mL ist die Zellseparationsspirale in der hier verwendeten Konfiguration zur Produktivitätssteigerung in kontinuierlichen Langzeitprozessen ungeeignet. Für die Etablierung des Zellrückhaltesystems steht eine Optimierung des Druckmaterials sowie eine Steigerung der Kapazität aus. Diese könnte durch Parallelschaltung mehrerer Spiralen in Kombination mit einer Verdünnung der Zelldichte ermöglicht werden. Außerdem ist die Generierung zellfreier Fraktionen durch die Spirale nach einer vorgeschalteten groben Zellrückhaltung (Hydrozyklon o.ä.) möglich. Für eine ressourcenschonende Anwendung kann zusätzlich der Mediumverbrauch durch eine Minimierung der Perfusionsrate reduziert werden. Eine weitere alternative Anwendungsmöglichkeit bietet die Zellseparation nach Induktion mit einer zytotoxischen Substanz oder nach einer Transfektion. Zudem ermöglicht die Spirale eine Größenauftrennung der Zellen und eignet sich daher für Folgeuntersuchungen nach einer induzierten Änderung des Zelldurchmessers.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die metabolische Charakterisierung der verwendeten CHO DG44 Zelllinie um eine Produktivitätssteigerung durch eine pH-Wert Erhöhung und Bolus-Zufütterung sowie eine Wachstumsinhibierung durch hohe Glucosekonzentrationen erweitert wurde. Bei der Etablierung eines kontinuierlichen Prozesses ohne Zellrückhaltung wurde eine gleichwertige mAK-Ausbeute zum etablierten Fed Batch bei geringerer Zelldichte und ein Einblick in eine mögliche Umsatzsteigerung durch verringerte Verdünnungsraten erreicht. Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit einer mikrofluidischen Zellseparationsspirale als Zellrückhaltesystem für einen mehrtägigen Produktionsprozess mit mittleren Zelldichten bestätigt.

6. Anhang

6.1. Material und Methoden

6.1.1. Labormaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Produkt | Hersteller |
|--|---|---------------------------------------|
| 3D Druckmaterial | VisiJet® M2S-HT90 | 3D Systems, USA |
| 3D Stützmaterial | VisiJet® M2 Sup | 3D Systems, USA |
| Bottle Top Sterilfilter | 1L Filter System 0,1 µm | Corning, USA |
| | 1L Filter System 0,22 µm | Corning, USA |
| Konische Zentrifugenröhrchen (Falcon Tubes) | Centrifuge Tubes (diverse) | Corning, USA |
| Klarlack | Detax | DETAX GmbH, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Pipettenspitzen (diverse) | Brand, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | SafeSeal Reaktionsgefäße (diverse) | Sarstedt, Deutschland |
| Schlauchverbindungsstücke | Rotilabo® Schlauchverbindungsstücke (diverse) | Carl Roth GmbH, Deutschland |
| | 4-way addition port | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| Schottflaschen | DURAN® Laborflaschen (diverse) | DWK Life Sciences, Deutschland |
| Schüttelkolben | Corning® Erlenmeyer Schüttelkolben (diverse) | Corning, USA |
| Serologische Pipette | Costar® Stripette® (diverse) | Corning, USA |
| Sekundenkleber | UHU Sekundenkleber | Bolton Adhesives, Niederlande |
| Reaktorschläuche | Silikonschläuche (diverse) | VWR International, USA |
| | C-Flex® (diverse) | Saint-Gobain, Frankreich |
| | PharMed® BPT | Saint-Gobain, Frankreich |
| | Tygon® (diverse) | VWR International, USA |
| Spritzen | BD Plastikpak™ | BD Biosciences, USA |
| | Injekt® -F 1 mL | B. Braun Melsungen AG, Deutschland, |

| | | |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Spritzenfilter | Millex® GV 4mm 0,22 µm | Merck KGaA, Deutschland |
| Sterilfilter | Minisart® PES 0,22 µm | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| | Midisart® 2000 0,2 µm PTFE | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| Steriles Zellsieb | Zellsieb 70 µm | Falcon by Corning, USA |

6.1.2. Geräte

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte

| Bezeichnung | Produkt | Hersteller |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 3D Drucker | ProJet® MJP 2500 Plus | 3D Systems, USA |
| | EasyClean System | 3D Systems, USA |
| 3D Druck Software | SolidWorks 2020 | Dassault Systems GmbH, Deutschland |
| Analysenwaage | Extend ED124S | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| Analytik der Metabolite | Cedex Bio Analyzer | Roche CustomBiotech, Deutschland |
| Autoklav | VX-150 | Systec GmbH, Deutschland |
| Durchflussmesszelle | Einweg Bioflowcell | Lytegate, Deutschland |
| Hochlastwaage | Cubis® II | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| Inkubator | Heracell™ 240 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Paraffinölbad | | CarlRoth, Deutschland |
| pH-Meter | FiveEasy Plus FP20-Micro-Kit | Mettler Toledo, USA |
| pH-Sonde | OxyFerm FDA VP 225 | Hamilton Robotics, USA |
| Pipette | accu-jet® pro | Brand, Deutschland |
| | Transferpipette® | Brand, Deutschland |
| | Eppendorf Research® | Eppendorf, Deutschland |
| Peristaltik-Pumpe | Ismatec® Reglo ICC | Cole Palmer, USA |
| pO₂-Sonde | EasyFerm Plus PHI VP 225 Pt100 | Hamilton Robotics, USA |
| Reaktoren | Biostat ®BDCU | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| | Ambr ®250 | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |
| | Ambr ®15 | Sartorius Stedim Biotech, Deutschland |

| | | |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Sicherheitswerkbank | MSC-Advantage™ | Thermo Fisher Scientific, USA |
| | Safe 2020 | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Ultraschallbad (Paraffinöl) | | Elma Schmidbauer GmbH, Deutschland |
| Ultraschallbad (Wasser) | Sonorex Super RK510H | Bandelin GmbH, Deutschland |
| Vakuumpumpe | LABOPORT® Mini | KNF Neuberger GmbH, Deutschland |
| Vortex | Genie 2 | Bender & Hobein GmbH, Deutschland |
| Wasserbad | Wasserbad WNB Basic | Memmert GmbH + Co. KG, Deutschland |
| Zellzähler | CEDEX HiRes | Roche Innovatis AG, Schweiz |
| Zentrifuge | Micro Star 17 | VWR International, USA |
| | Centrifuge 5702 | Eppendorf, Deutschland |
| | Centrifuge Hareus Pico 21 | Thermo Fisher Scientific, USA |

6.1.3. Kultivierungsmedien

Tabelle 5: Zusammensetzung von 1 L Seed Culture Medium (SMD)

| Bestandteil | Menge | Hersteller | Bemerkungen |
|-----------------------------------|--------------|-------------------------|--------------------|
| ddH₂O | 970 mL | | |
| CHOKO Stock Culture Medium | 20,040 g | Sigma Aldrich, USA | 60 min rühren |
| NaOH Pellets | 0,880 g | Merck KGaA, Deutschland | 30 min rühren |
| NaHCO₃ | 1,80 g | Sigma Aldrich, USA | 15 min rühren |
| ddH₂O | Ad 1000 mL | | |
| L-Glutamin [200nM] | 30 mL | Lonza, Schweiz | |
| MTX [500 µM] | 0,03 mL | Sigma Aldrich, USA | Nur bis Passage 3 |
| Sartopore 2 0,1 µm | | Sartorius, Deutschland | |

Der pH-Wert wird nach Natriumcarbonat-Zugabe auf 6,9-7,3 eingestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung von 1 L Produktionsmedium (PM)

| Bestandteil | Menge | Hersteller | Bemerkungen |
|-------------------------------|------------|----------------------------|---|
| ddH ₂ O | 970 mL | | |
| CHOKO Production Medium | 22,310 g | Sigma Aldrich, USA | 60 min rühren |
| 5M NaOH | 6,200 mL | Merck KGaA, Deutschland | Schrittweise zugeben, 30 min rühren |
| NaHCO ₃ | 1,80 g | Sigma Aldrich, USA | 15 min rühren |
| ddH ₂ O | Ad 1000 mL | | |
| L-Glutamin [200nM] | 30 mL | Lonza, Schweiz | |
| Sartopore 2 0,1 µm | | Sartorius, Deutschland | |

Der pH-Wert wird nach Natriumcarbonat-Zugabe auf 6,9-7,3 eingestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung von 1 L Feedmedium A (FMA)

| Bestandteil | Menge | Hersteller | Bemerkungen |
|--------------------|------------|----------------------------|---------------|
| ddH ₂ O | 850 mL | | |
| CHOKO FMA | 154,120 g | Sigma Aldrich, USA | 60 min rühren |
| NaOH Pellets | 3,148 mL | Merck KGaA, Deutschland | 30 min rühren |
| ddH ₂ O | Ad 1000 mL | | |
| Sartopore 2 0,1 µm | | Sartorius, Deutschland | |

Der pH-Wert wird auf 6,5-6,8 eingestellt.

Tabelle 8: Zusammensetzung von 1 L Feedmedium B (FMB)

| Bestandteil | Menge | Hersteller | Bemerkungen |
|--------------------|------------|----------------------------|---------------|
| ddH ₂ O | 850 mL | | |
| CHOKO FMB | 94,600 g | Sigma Aldrich, USA | 60 min rühren |
| 5M NaOH | 32,100 mL | Merck KGaA, Deutschland | 30 min rühren |
| ddH ₂ O | Ad 1000 mL | | |

Der pH-Wert wird auf 11,0-11,4 eingestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung von 1 L Glucose-Feed

| Bestandteil | Menge | Hersteller | Bemerkungen |
|--------------------|--------|---------------------------|---------------|
| ddH ₂ O | 772 mL | | |
| D-Glucose | 400 g | Sigma Aldrich, USA | 60 min rühren |
| Sartopore 2 0,1 µm | | Sartorius, Deutschland | |

Tabelle 10: Zusammensetzung von jeweils 1 L kontinuierlichem Feedmedium (kFM1,2,3,4)

| Bestandteil | Menge | | | | Bemerkungen |
|---------------------------|--------|--------|--------|----------|------------------------|
| | kFM1 | kFM2 | kFM3 | kFM4 | |
| CHOKO PM | 912 mL | 991 mL | 912 mL | 697,5 mL | kFM4: PM ohne Glutamin |
| CHOKO FMA | 80 mL | 8 mL | 80 mL | 275 mL | |
| CHOKO FMB | 8 mL | 0,8 mL | 8 mL | 27,5 mL | |
| Glucose 400g/L | -- | -- | 30 mL | -- | |
| Sartopore 2 0,1 µm | | | | | |

Aufgrund des erhöhten Kontaminationsrisikos durch die Druckunterschiede im Separationssystem zwischen der Zellauftrennung (2-3 mL/min) und der Spülung (10-12 mL/min) werden die verwendeten Medien der Kultivierung P_5 in 4.3.3 mit Pen/Strep versetzt.

Tabelle 11: Weitere verwendete Chemikalien

| Chemikalie | |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Antifoam C Emulsion | Sigma-Aldrich, USA |
| Cedex-Detergent (3% Mucosol) | VWR International, USA |
| Ethanol | Merck KGaA Deutschland |
| PBS | Sigma-Aldrich, USA |
| Pen/Strep (100x) | Sigma Aldrich, USA |
| Spülmittel (Fairy Ultra Plus) | Procter and Gamble, USA |
| Trypanblau | VWR International, USA |

6.1.4. Auftauen und Passagieren der Zellen

Auftauen der Zellen:

Ein Cryovial mit der Zelllinie CHO DG44 (bereitgestellt durch Sartorius) wird bei 37 °C aufgetaut und der Inhalt anschließend steril in ein mit 10 mL SMD gefülltes 15 mL-Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wird für 5 min bei 0,3 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen kann ein 500 mL Schüttelkolben mit 150 mL vorgewärmtem SMD steril präpariert werden. Der Überstand der Zellsuspension wird verworfen und das Zellpellet vorsichtig in vorgewärmtem SMD

aus dem Schüttelkolben resuspendiert. Abschließend wird die Lebendzellzahl und die Viabilität bestimmt.

Passagieren der Zellen:

Abhängig von der Passage wird nach 3-4 Tagen die Lebendzellzahl und Viabilität bestimmt und anhand dessen das benötigte Volumen für die nächste Passage bestimmt:

Beispielrechnung:

Lebendzellzahl der vorherigen Passage: $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL

Finales Volumen der neuen Passage: 150 mL

Benötigte Initial-Zellkonzentration der neuen Passage: $0,2 \times 10^6$ Zellen/mL

$$\frac{150 \text{ mL} * 0,2 \times 10^6 \text{ Zellen/mL}}{1,5 \times 10^6 \text{ Zellen/mL}} = 20 \text{ mL Inokulationssuspension}$$

Das berechnete Volumen wird aus dem vorher vorbereiteten 500 mL Schüttelkolben mit 150 mL vorgewärmtem Medium entnommen. Und durch Zellsuspension ersetzt. Abschließend wird die Lebendzellzahl und Viabilität der neuen Passage bestimmt.

6.1.5. Kultivierungsbedingungen und Prozess der Vorkultur

Tabelle 12: Zusammenfassung der Kultivierungsbedingungen der Vorkultur

| | |
|------------------------------|----------------|
| Schüttelrate | 120 rpm |
| Orbitaler Durchmesser | 50 mm |
| Temperatur | 36,8 °C |
| CO₂ | 7,5 % |
| Luftfeuchtigkeit | 80 % |

Zu Beginn jeder Kultivierung wird eine Vorkultur aus der kryokonservierten CHO DG44 Zelllinie mit fünf aufeinanderfolgenden Passagen bei 36,8 °C, 7,5 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit für 3-4 Tage bei 120 rpm im Inkubator in Vorkulturmedium kultiviert. Zur Expressionssteigerung enthält das Medium in den ersten drei Passagen zusätzlich Methotrexat (MTX).^[74, 75] Die letzte Passage dient als Inokulum für die Hauptkultur.

Tabelle 13: Fließschema der Prozessschritte vom Auftauen über die Vorkultur in Schüttelkolben zur Hauptkultur.

| Gefäß | Cryo Vial ↓ SF 0,5 L | SF 0,5 L | SF 0,5 L | SF 0,5 L | SF 0,5 L | Ambr® 15 bis STR® 50 |
|---|-------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|---|
| Schritt | Auftauen n-5 | n-4 | n-3 | n-2 | n-1 | Hauptkultur N |
| Medium | SMD mit MTX | SMD mit MTX | SMD mit MTX | SMD ohne MTX | SMD ohne MTX | PM |
| Initial VCD [10⁶ Zellen/mL] | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| Passage | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Dauer | 3 | 3 - 4 | 3 - 4 | 3 - 4 | 3 | 12 |
| Prozesstag | 0 | 3 | 6 - 7 | 9 - 11 | 12 - 15 | 15 - 18 |

Eine Hauptkultur im Fed Batch Prozess wird mit 0,3 Mio. Zellen/mL inokuliert und bei 36,8 °C, pH=7,1 und einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 60 % für drei Tage in der Batch Phase und anschließend für weitere neun Tage in der Fed Batch Phase durchgeführt. Der pH-Wert wird ebenso wie der Gelöstsauerstoff online überwacht und über die Begasung mit CO₂ geregelt. Zusätzlich zur täglichen Zugabe des basischen Feedmedium B kann bei Bedarf eine 1 M Na₂CO₃-Lösung als Base eingesetzt werden. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wird über eine Begasungskaskade mit Luft und Sauerstoff sowie steigender Rührgeschwindigkeit geregelt. Für die Bestimmung des Zellwachstums und des aktuellen Zustandes im Reaktor, werden täglich offline Proben entnommen. Hierbei werden die Zellzahl, Viabilität und Produktkonzentration sowie die Glucose-, Lactat-, Glutamin- und Glutamat-Konzentration untersucht.

Ein kontinuierlicher Prozess unterscheidet sich in den Kultivierungsparametern kaum von dem etablierten Fed Batch Prozess. Zunächst wird für eine höhere Zelldichte zu Beginn der kontinuierlichen Phase mit 1 Mio. 10⁶ Zellen/mL in das Basalmedium inokuliert und ebenfalls eine dreitägige Batch Phase durchgeführt. Dies

dient zum Ausgleich des angenommenen Zellverlustes und einer weiteren lag-Phase des Zellwachstums aufgrund der Anpassung an den kontinuierlichen Durchfluss. In der anschließenden kontinuierlichen Phase wird ein zuvor hergestelltes Gemisch aus Basal- und Feedmedien mit definierten Substratkonzentrationen (Anhang 6.1.3, Tabelle 10) in einer definierten Flussrate hinzugegeben. Um das Reaktorvolumen konstant zu halten, wird zudem Kulturmedium mit (Chemostat) oder ohne Zellen (Perfusion) abgeführt. Neben der online Analytik wird die offline Probennahme aufgrund möglicher Fluktuationen im Prozess und der Notwendigkeit manueller Korrektur auf zwei bis dreimal täglich erhöht.

Probennahme, Vermessung und Lagerung

Die Probennahme ist mindestens einmal am Tag durchzuführen und erfolgt über das Probennahme-Ventil. Da die integrierte Bakterienfalle eine sensible Sterilgrenze ist, wird der Vorgang sorgfältig, aber zügig durchgeführt.

Es werden eine sterile 5-30 mL Luer-Lock Spritze, ein 2 mL Reaktionsgefäß oder 15 mL Zentrifugenröhrchen und eine Sprühflasche mit 70 % Isopropanol benötigt. Im Folgenden ist eine schrittweise Anleitung beschrieben:

- I. Handschuhe, Spritzenverpackung, Probennahme-Ventil und Tischoberfläche mit Isopropanol einsprühen. Spritze am Stempel entpacken und bereithalten.
- II. Deckel von der Bakterienfalle abschrauben und beide Komponenten großzügig einsprühen (im Deckel sollte ein wenig Isopropanol stehen). Anschließend die Spritze auf die Bakterienfalle drehen, Schlauchklemme lösen und mind. 1 mL Vorlauf ziehen. Schlauchklemme schließen, Spritze abschrauben und den Vorlauf verwerfen.
- III. Bakterienfalle und Luer-Lock Anschluss der Spritze großzügig mit Isopropanol einsprühen und Überschuss vorsichtig abklopfen. Spritze erneut zügig anschließen, Schlauchklemme öffnen, 1-2 mL Probe ziehen, Schlauchklemme schließen, Spritze abschrauben und den Deckel auf die erneut eingesprühte Bakterienfalle schrauben.
- IV. Probe aus der Spritze in das Reaktionsgefäß geben und umgehend am pH-Meter vermessen. In der Ambr®250 Software wird die Probe unter „Sample“ eingetragen und der Zeitpunkt dokumentiert.

Nach erfolgreicher pH Messung und ggf. Rekalibrierung wird die Probe am Cedex HiRes (unverdünnt 300 µl) vermessen und anschließend bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 150-170 µl am Cedex Bio Analyzer photometrisch auf Glucose, Glutamin, Glutamat, Lactat, IgG und ggf. LDH-Aktivität untersucht. Der restliche Überstand wird bei -20 °C gelagert.

Fütterungsprofile

Tabelle 14: Vergleich der Fütterungsprofile in 4.2.1

| | Standard Feed | | Semi-kontinuierlicher Feed | |
|--------|---------------|---------|----------------------------|------------|
| | FMA [%] | FMB [%] | FMA [mL/h] | FMB [mL/h] |
| Tag 3 | 3,98 | 0,40 | 0,319 | 0,032 |
| Tag 4 | 3,81 | 0,38 | 0,310 | 0,031 |
| Tag 5 | 3,66 | 0,37 | 0,306 | 0,031 |
| Tag 6 | 3,52 | 0,35 | 0,301 | 0,030 |
| Tag 7 | 3,36 | 0,34 | 0,296 | 0,030 |
| Tag 8 | 3,22 | 0,32 | 0,291 | 0,029 |
| Tag 9 | 3,08 | 0,31 | 0,290 | 0,029 |
| Tag 10 | 2,96 | 0,30 | 0,283 | 0,028 |
| Tag 11 | 2,85 | 0,29 | 0,277 | 0,028 |

6.1.6. Kriterien für einen erfolgreichen Prozessverlauf

- Kultivierungsdauer **12** Tage
- maximale VCD **170 - 260** x 10⁵ Zellen/mL
- Tag der maximalen VCD **7 - 9**
- End-VCD **110 - 160** x 10⁵ Zellen/mL
- End-Viabilität **75 - 99** %
- Tag 3 Verdopplungszeit **15,5 - 18 h**
- Tag 5 Verdopplungszeit **20 - 22,5 h**
- Tag 6 Verdopplungszeit **23 - 25 h**
- Tag 12 Produkttiter **3 - 5 g/L**

6.1.7. Berechnete Prozessantworten

Lactat Ausbeute Koeffizient

Der Lactatausbeutekoeffizient aus Glucose ($Y_{Lac/Glc}$) beschreibt die Effizienz des Glucosemetabolismus (Formel (9)). Die Berechnung des Koeffizienten basiert auf der Glucoseaufnahme (Formel (10)) und der spezifischen Lactatproduktion (Formel (11)), unter Verwendung der Metabolitenkonzentrationen und dem geometrischen Mittel der VCC.^[33]

$$q_{Glc} = \frac{c_{Glc,i-1} - c_{Glc,i}}{(t_i - t_{i-1}) \bar{X}} \quad (9)$$

$$q_{Lac} = \frac{c_{Lac,i} - c_{Lac,i-1}}{(t_i - t_{i-1}) \bar{X}} \quad (10)$$

$$Y_{\frac{Lac}{Glc}} = \frac{q_{Lac}}{q_{Glc}} \quad (11)$$

Zusätzlich zur spezifischen Produktivität der Zellen wird das Integral der Lebendzellzahl (IVCC) mittels Formel (3) berechnet.^[76] Diese quantifiziert die effektive Arbeitszeit der Zellen innerhalb eines definierten Intervalls und kann in Verbindung mit dem mAK-Titer ebenfalls für die Kalkulation der Produktivität verwendet werden.

$$IVCC_n = \int_{t=0}^t VCC(t) dt \approx \sum_{i=1}^n \left(\frac{VCC_i + VCC_{i-1}}{2} \right) \times (t_i - t_{i-1}) \quad (12)$$

6.1.8. Verwendetes Zellrückhaltesystem

Vorbereitung der Separationsspirale

Die additive gefertigte mikrofluidische Separationsspirale wurde in SolidWorks 2020 designt und mit dem Multijet 3D Drucker ProJet® MJP 2500 Plus gedruckt. Durch die hohe xyz Auflösung von 800 x 900 x 790 DPI, betragen die Schichten lediglich 32 µm. Aufgrund der thermostabilen Eigenschaften wurde das autoklavierbare VisiJet(R)M2S-HT90 als Druckmaterial und das VisiJet(R)M2 Sup als Stützmaterial ausgewählt. Nach dem Druck wurden die Teile zum Ablösen von der Druckerplatte

für 10 min bei – 18 °C inkubiert, bevor sie für 45 min in eine Heißdampf-Unit des EasyClean Systems transferiert wurden. Verbleibende Wachsreste aus dem Supportmaterial wurden anschließend in einem 65 °C heißen Paraffinölbad innerhalb von 30 min und durch zusätzliches Spülen mit Paraffinöl entfernt. Abschließend werden die Teile zunächst in ein Ultraschall Ölbad und anschließend für 30 min in ein Ultraschall Wasserbad mit 1 % Spülmittel gelegt. Das gründliche Spülen mit dem 65 °C heißen Spülwasser entfernt letzte Ölreste.

Nach der vollständigen Aufreinigung wurden die Einzelteile des Separationssystems mit Sekundenkleber zusammengefügt und für eine bessere Durchsicht unter dem Mikroskop mit Klarlack lackiert. Vor der Anwendung in einem Kultivierungsprozess wurden alle HPLC-, Silikon- und Tygon-Pumpschläuche durch verschiedene Gewindeadapter an der Spirale befestigt und das System für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Aufgrund von Wachs- Öl- oder Spülmittelresten in einer Kultivierung in Kapitel 4.3.2 (P_4) wurde das System fortan nach dem Zusammenbau erst für 1 h mit 70 % Ethanol und anschließend für 12 h mit ddH₂O gespült.

Einsatz des Zellrückhaltesystems in einem Kultivierungsprozess

Für die Anwendung im Ambr® 250 Bioreaktorsystem wird die Silikonkappe eines Bioreaktorgefäßes durch den 4-way addition port aus Edelstahl mit erhöhter O-Ring Stärke ersetzt. Von den vier Zugängen werden zwei für den Anschluss der Separationsspirale und eine für einen Zellbleed verwendet. Der letzte Zugang wird einem schweißbaren Schlauch (CFlex®) versehen und dient als Backup bei Funktionsstörungen der anderen Zugänge.

Das Separationssystem wird über verschiedene Schlauchverbindungsstücke vor der Sterilisation im Autoklaven direkt an den 4-way Adapter und ein 3-Wege Ventil zur Probennahme angeschlossen, wobei alle Gewinde leicht gelockert und das Ventil geöffnet werden. Nach 30 min bei 121 °C werden alle Gewinde handfest angezogen und das Ventil geschlossen, sodass das Zellrückhaltesystem ein geschlossenes System darstellt. Nach der Inokulation des Bioreaktors durch ein Zellsieb (70 µm), wird der 4-way Port unter der Sicherheitswerkbank eingesetzt und die Reaktoröffnung zusätzlich mit Parafilm luftdicht verschlossen. Anschließend kann der Bioreaktor

inklusive Zellrückhaltesystem mit Probennahme Ventil aus der Sicherheitswerkbank entnommen und in das Ambr® System eingesetzt werden.

Für einen sterilen Austausch der Separationsspirale, wird eine aufgereinigte und gespülte Spirale mit HPLC-Schlauchverbindungsstücken in einer Edelstahlbox autoklaviert. Anschließend kann die neue Spirale unter einer Sicherheitswerkbank durch die Verbindung der Schlauchadapter an die Schläuche des Bypasses eingesetzt werden.

Für die Berechnung der Zellretentionseffizienz wird eine zusätzliche Probe der abgetrennten Fraktion benötigt. Die Retention wird wie folgt berechnet:

$$\text{Zellretention [\%]} = 1 - \left(\frac{VCC_{\text{Fraktion}}}{VCC_{\text{Reaktor}}} \right) \times 100 \quad (13)$$

Beschreibung der verschiedenen Spiraldesigns

Das Original Design der Spirale von Enders *et al.* ist in Abbildung 24 dargestellt.

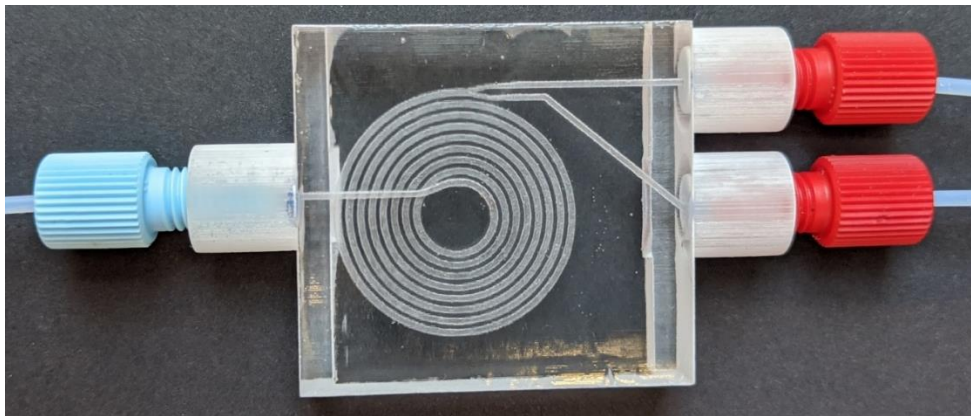


Abbildung 24: Additiv gefertigte Separationsspirale nach vollständiger Aufreinigung und Lackierung. Zugang aus dem Reaktor (blau), abgetrennte Fraktion (rot, oben) und Rückführung zum Reaktor (rot, unten).

Die in Kapitel 4.3 erläuterte Optimierung des Separationssystems zur Zellrückhaltung in Kooperation mit M. Sc. Michaela Dehne ist anhand der in dieser Arbeit verwendeten Designs in Abbildung 25 zusammengefasst.

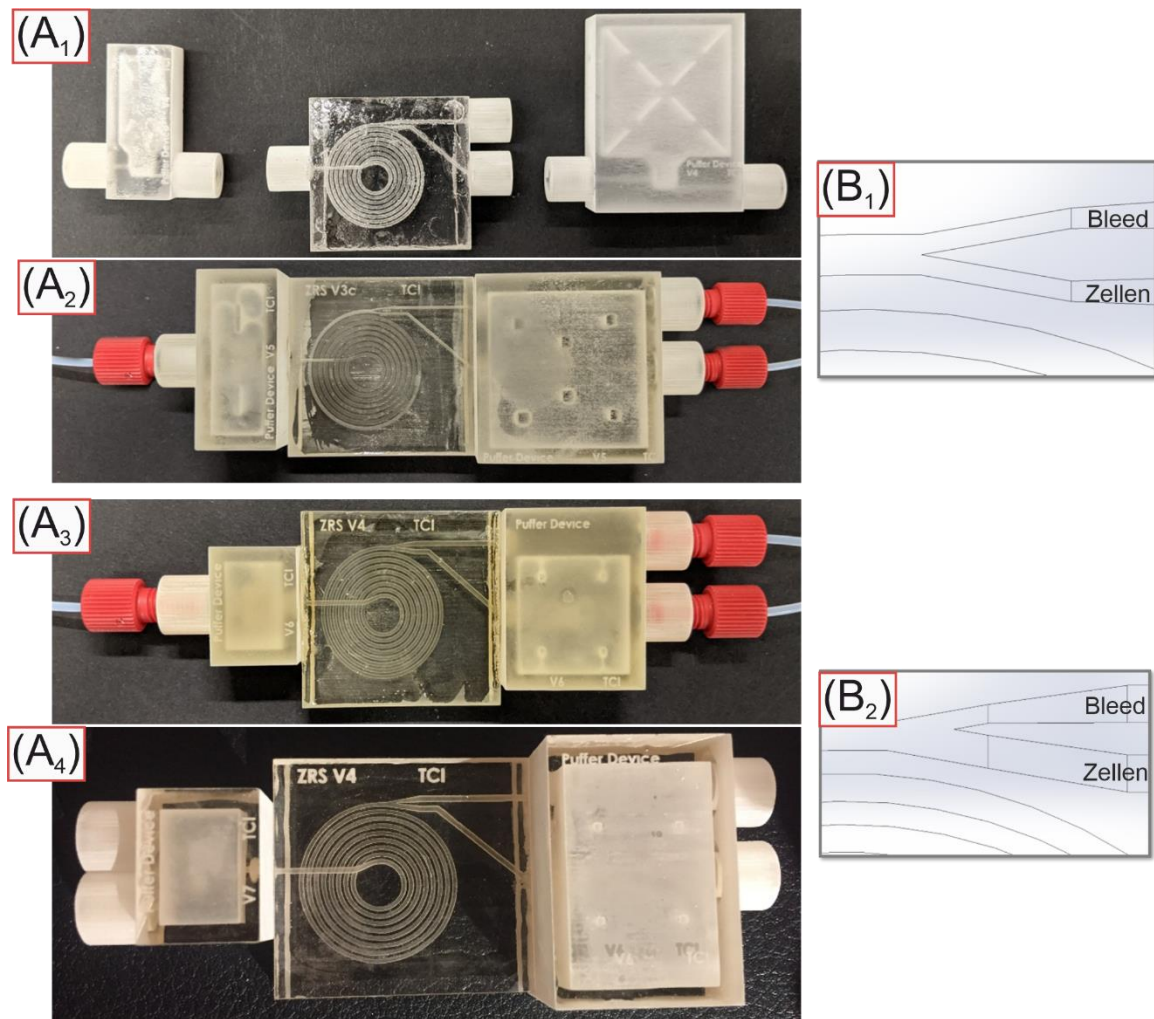


Abbildung 25: Separationssystem-Designs in chronologischer Reihenfolge. Einzelne Komponenten in (A₁) sowie integrierte Pulsationspuffer für P₁ und P₂ in (A₂) mit einer Kalanauftrennung von 50:50 (B₁). Komprimierte Puffereinheiten (A₃) und Implementation der automatischen Spülung und optimierte Puffereinheiten für P₃, P₄ und P₅ in (A₄) mit einer Kanalauftrennung von 70:30 zugunsten der Rückführung (Zellen, B₂).

Verblockung der mikrofluidischen Kanäle

Die Verblockung der Spiralkanäle einer 70:30 Auftrennung zugunsten der Zellrückführung ist in Abbildung 26 beispielhaft dargestellt.

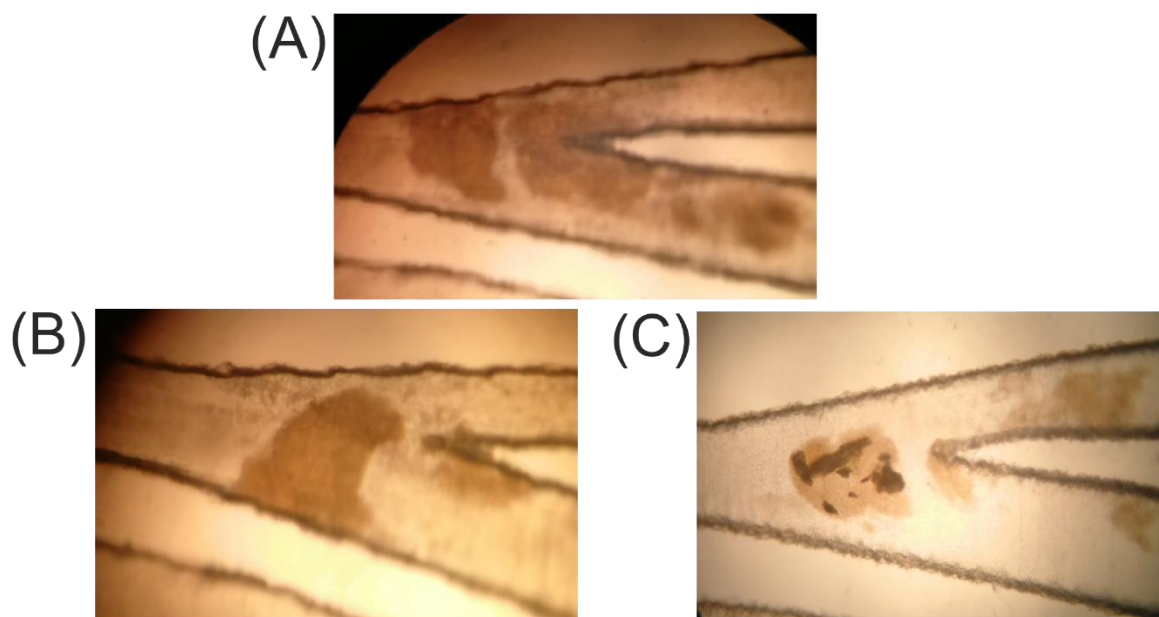


Abbildung 26: Mikroskopische Betrachtung einer Verblockung der Kanalaufteilung des 3D-gedruckten Spiralseparators durch Zellaggregate. Vollständige Verblockung in (A), Abschirmung der Rückführung in (B) und Zellaggregate mit Plastikpartikeln in (C).

Aufbau einer Perfusionskultivierung im Ambr® 250

Der Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung mit einem 3D-gedruckten Spiralseparationssystem als Zellrückhaltung und implementierter automatischer Spülung ist in Abbildung 27 dargestellt.

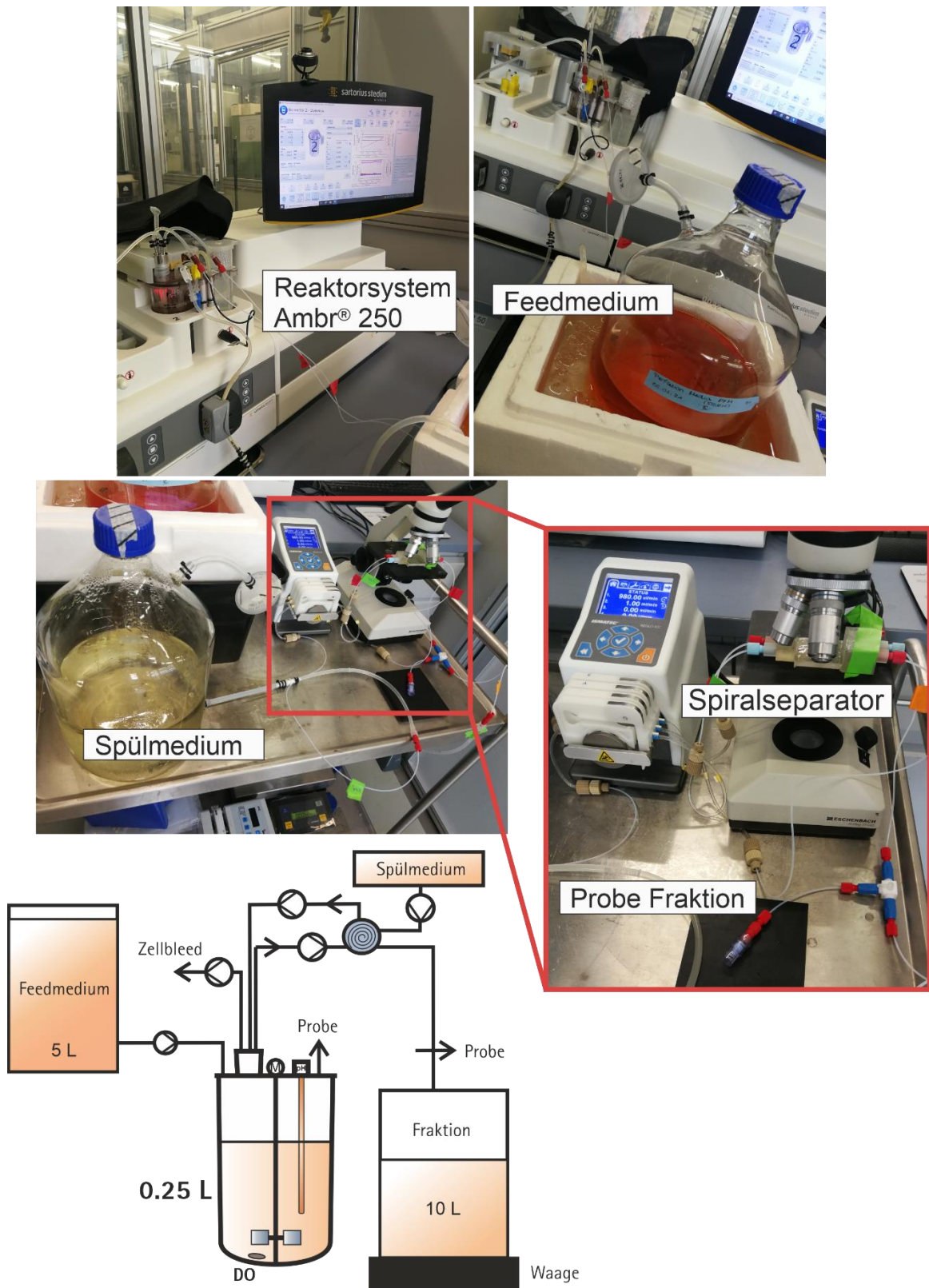


Abbildung 27: Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung im Ambr® 250 Reaktorsystem mit Separationsspiralseparator als Zellrückhaltung und automatischer Spülung.

6.2. Zusätzliche experimentelle Daten

6.2.1. Kultivierungsdaten

Tabelle 15: Kultivierungsdaten für einen Standard Fed Batch Prozess im Ambr® 250.

| FB_STD | VCC | Viabilität | Zellgröße | mAK | Glucose | Lactat | Glutamin | Glutamat |
|--------|-------------------------------|------------|-------------------|-------|---------|--------|----------|----------|
| | [$\times 10^6$ Zellen/mL] | [%] | [μm] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] |
| Tag 0 | 0,40 | 93,6 | 15,16 | 0,01 | 6,27 | 0,07 | 0,91 | 0,38 |
| Tag 1 | 0,68 | 99,0 | 15,30 | 0,02 | 5,95 | 0,36 | 0,69 | 0,39 |
| Tag 2 | 2,07 | 99,1 | 14,95 | 0,08 | 4,94 | 0,98 | 0,31 | 0,40 |
| Tag 3 | 4,74 | 99,2 | 14,58 | 0,20 | 3,63 | 1,32 | 0,03 | 0,33 |
| Tag 4 | 7,43 | 99,3 | 14,58 | 0,34 | 5,79 | 1,00 | 0,04 | 0,48 |
| Tag 5 | 11,09 | 99,5 | 14,95 | 0,57 | 6,57 | 0,70 | 0,08 | 0,57 |
| Tag 6 | 16,24 | 99,2 | 15,05 | 0,90 | 4,11 | 0,47 | 0,15 | 0,42 |
| Tag 7 | 20,75 | 99,0 | 15,25 | 1,28 | 2,78 | 0,26 | 0,26 | 0,26 |
| Tag 8 | 22,47 | 98,7 | 15,53 | 1,76 | 2,90 | 0,26 | 0,40 | 0,17 |
| Tag 9 | 21,72 | 98,3 | 16,06 | 2,18 | 2,73 | 0,29 | 0,55 | 0,22 |
| Tag 10 | 20,07 | 97,7 | 16,71 | 2,31 | 3,06 | 0,47 | 0,60 | 0,21 |
| Tag 11 | 16,21 | 96,9 | 17,26 | 2,64 | 2,46 | 0,25 | 0,73 | 0,13 |
| Tag 12 | 15,53 | 97,1 | 17,28 | 2,79 | 1,51 | 0,32 | 0,78 | 0,16 |

Tabelle 16: Ein Vergleich der angestrebten und realen Verdünnungsraten (D) mit den verwendeten Feedmedienkompositionen der Kultivierung C_1.

| T [h] | C_1 | | Feedmedium |
|-------|------------------------|------------------|------------|
| | Angestrebte D [1/h] | Reale D [1/h] | |
| 0 | 0 | 0 | kFM1 |
| 72 | 0,042 | 0,052 | |
| 94 | -- | 0,046 | |
| 118 | 0 | 0 | Kein Feed |
| 169 | 0,042 | 0,052 | kFM2 |
| 194 | 0,042 | 0,042 | |
| 246 | -- | 0,025 | |
| 262 | -- | 0,034 | |
| 271 | -- | 0,029 | |
| 318 | -- | 0 | |

Tabelle 17: Kultivierungsdaten für einen Standard Fed Batch Prozess im Biostat® BDCU 2L Reaktor als Referenz für die Beurteilung von C_1.

| FB Referenz | VCC | Viabilität | Zellgröße | mAK | Glucose | Lactat | Glutamin | Glutamat |
|-------------|------------------------------|------------|-----------|-------|---------|--------|----------|----------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [µm] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] |
| Tag 0 | 0,33 | 99,35 | 14,96 | 0,01 | 5,46 | 0,08 | 0,75 | 0,38 |
| Tag 1 | 0,62 | 99,23 | 15,43 | 0,05 | 5,18 | 0,27 | 0,25 | 0,30 |
| Tag 2 | 1,08 | 99,50 | 14,71 | 0,05 | 4,43 | 0,67 | 0,17 | 0,22 |
| Tag 3 | 4,67 | 99,53 | 14,41 | 0,18 | 3,36 | 1,18 | 0,02 | 0,27 |
| Tag 4 | 7,46 | 99,47 | 14,84 | 0,23 | 5,01 | 0,70 | 0,04 | 0,43 |
| Tag 5 | 12,00 | 99,10 | 15,26 | 0,44 | 8,09 | 0,34 | 0,04 | 0,36 |
| Tag 6 | 17,90 | 99,60 | 15,32 | 1,00 | 7,32 | 0,27 | 0,07 | 0,33 |
| Tag 7 | 21,63 | 99,53 | 15,56 | 1,35 | 5,02 | 0,35 | 0,11 | 0,12 |
| Tag 8 | 24,07 | 98,07 | 15,18 | 1,57 | 5,29 | 1,15 | 0,16 | 0,00 |
| Tag 9 | 24,36 | 99,10 | 14,10 | 1,71 | 1,38 | 0,35 | 0,18 | 0,00 |
| Tag 10 | 23,76 | 98,40 | 14,34 | 2,12 | 4,20 | 0,35 | 0,23 | 0,00 |
| Tag 11 | 21,99 | 98,50 | 14,65 | 2,51 | 4,79 | 0,28 | 0,17 | 0,00 |
| Tag 12 | 20,54 | 97,50 | 15,48 | 2,77 | 12,87 | 0,32 | 0,32 | 0,01 |

Tabelle 18: Kultivierungsdaten für einen Chemostat Prozess zur Untersuchung der Wachstumsinhibierung durch Glucose im Ambr® 250 (C_3).

| C_3 | VCC | Viabilität | mAK | Glucose | Lactat | Glutamin | Glutamat |
|-------|------------------------------|------------|-------|---------|--------|----------|----------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [g/L] |
| 1,5 | 1,195 | 99,7 | 0,003 | 6,247 | 0,034 | 0,863 | 0,381 |
| 24,3 | 2,473 | 99,1 | 0,08 | 4,997 | 0,748 | 0,250 | 0,371 |
| 48,9 | 5,875 | 99,4 | 0,279 | 3,122 | 1,078 | 0,027 | 0,262 |
| 71,5 | 8,674 | 99,4 | 0,44 | 2,421 | 0,297 | 0,082 | 0,111 |
| 79,0 | 8,147 | 99,1 | 0,407 | 2,527 | 0,227 | 0,062 | 0,108 |
| 90,4 | 7,745 | 98,8 | 0,448 | 4,310 | 0,227 | 0,053 | 0,158 |
| 99,7 | 8,784 | 98,7 | 0,494 | 5,429 | 0,144 | 0,055 | 0,157 |
| 115,3 | 11,9825 | 99,5 | 0,569 | 6,874 | 0,214 | 0,067 | 0,131 |
| 126,7 | 10,504 | 99,2 | 0,646 | 7,890 | 0,113 | 0,082 | 0,080 |
| 139,9 | 15,2 | 99,1 | 0,727 | 8,730 | 0,093 | 0,095 | 0,040 |
| 151,2 | 14,664 | 99 | 0,789 | 9,258 | 0,097 | 0,110 | 0,027 |
| 163,0 | 12,792 | 98,8 | 0,819 | 9,871 | 0,109 | 0,123 | 0,022 |
| 175,5 | 13,395 | 99,3 | 0,844 | 10,158 | 0,123 | 0,141 | 0,020 |
| 188,6 | 11,828 | 98,8 | 0,876 | 10,419 | 0,140 | 0,157 | 0,024 |
| 200,1 | 10,622 | 98,3 | 0,895 | 10,595 | 0,139 | 0,168 | 0,037 |
| 212,6 | 9,163 | 98,3 | 0,883 | 10,764 | 0,158 | 0,190 | 0,056 |
| 224,5 | 8,55 | 98,1 | 0,901 | 10,901 | 0,155 | 0,211 | 0,082 |
| 234,1 | 8,678 | 98,8 | 0,881 | 11,005 | 0,154 | 0,228 | 0,113 |
| 246,5 | 8,765 | 98,7 | 0,879 | 11,377 | 0,169 | 0,247 | 0,152 |
| 258,4 | 7,635 | 97,5 | 0,881 | 11,879 | 0,181 | 0,302 | 0,192 |

| | | | | | | | |
|-------|---------|------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 272,3 | 6,671 | 98 | 0,864 | 12,492 | 0,146 | 0,339 | 0,244 |
| 284,0 | 6,339 | 96,6 | 0,85 | 11,201 | 0,149 | 0,357 | 0,295 |
| 294,5 | 6,259 | 97,9 | 0,832 | 10,308 | 0,149 | 0,374 | 0,342 |
| 308,5 | 5,336 | 97,2 | 0,83 | 9,102 | 0,201 | 0,391 | 0,416 |
| 318,1 | 4,855 | 98 | 0,803 | 8,352 | 0,200 | 0,400 | 0,469 |
| 331,0 | 4,837 | 96,8 | 0,799 | 7,394 | 0,223 | 0,401 | 0,518 |
| 343,6 | 4,163 | 96,9 | 0,768 | 6,872 | 0,217 | 0,420 | 0,583 |
| 357,0 | 3,826 | 96,3 | 0,731 | 6,232 | 0,227 | 0,393 | 0,645 |
| 366,5 | 4,078 | 96,5 | 0,729 | 5,929 | 0,240 | 0,374 | 0,666 |
| 380,3 | 3,431 | 93,8 | 0,719 | 5,432 | 0,269 | 0,366 | 0,716 |
| 390,0 | 4,11 | 95,1 | 0,706 | 5,152 | 0,304 | 0,356 | 0,758 |
| 403,7 | 4,047 | 92,6 | 0,698 | 4,818 | 0,350 | 0,323 | 0,769 |
| 416,0 | 4,025 | 93,3 | 0,672 | 4,553 | 0,404 | 0,307 | 0,805 |
| 426,4 | 4,262 | 93,5 | 0,665 | 4,283 | 0,453 | 0,278 | 0,800 |
| 440,9 | 4,231 | 92,4 | 0,656 | 3,969 | 0,547 | 0,244 | 0,830 |
| 452,2 | 4,929 | 94,9 | 0,635 | 3,638 | 0,613 | 0,218 | 0,822 |
| 466,0 | 5,505 | 94,7 | 0,659 | 3,300 | 0,630 | 0,197 | 0,815 |
| 476,6 | 6,048 | 94,7 | 0,682 | 3,012 | 0,642 | 0,179 | 0,810 |
| 487,9 | 6,658 | 95 | 0,691 | 2,557 | 0,656 | 0,167 | 0,785 |
| 498,8 | 7,922 | 95,6 | 0,718 | 2,105 | 0,672 | 0,153 | 0,744 |
| 511,4 | 8,802 | 97,1 | 0,75 | 2,232 | 0,707 | 0,144 | 0,693 |
| 525,5 | 10,2345 | 97,4 | 0,805 | 2,374 | 0,704 | 0,136 | 0,615 |
| 533,6 | 10,328 | 97,3 | 0,826 | 2,358 | 0,669 | 0,130 | 0,551 |
| 549,0 | 11,557 | 98,3 | 0,84 | 2,283 | 0,566 | 0,129 | 0,422 |
| 557,7 | 13,115 | 98,3 | 0,921 | 2,195 | 0,514 | 0,122 | 0,343 |
| 570,5 | 13,137 | 98,3 | 0,935 | 2,351 | 0,293 | 0,126 | 0,240 |
| 583,9 | 13,278 | 98,7 | 0,975 | 2,634 | 0,214 | 0,127 | 0,174 |
| 594,5 | 12,84 | 98,6 | 0,989 | 2,734 | 0,280 | 0,127 | 0,150 |
| 607,1 | 13,548 | 98,8 | 0,973 | 3,003 | 0,224 | 0,128 | 0,136 |
| 623,0 | 13,082 | 98,7 | 0,958 | 3,163 | 0,278 | 0,129 | 0,127 |
| 646,8 | 10,7035 | 98,9 | 0,909 | 3,383 | 0,414 | 0,131 | 0,120 |
| 670,1 | 10,986 | 99 | 0,86 | 3,268 | 0,775 | 0,126 | 0,104 |
| 695,6 | 9,668 | 99,1 | 0,821 | 2,862 | 1,860 | 0,119 | 0,107 |
| 722,6 | 6,938 | 97,6 | 0,718 | 1,628 | 4,273 | 0,104 | 0,148 |
| 741,7 | 5,311 | 96,5 | 0,65 | 1,046 | 6,403 | 0,096 | 0,214 |
| 770,3 | 2,133 | 68,7 | 0,509 | 2,500 | 6,993 | 0,098 | 0,340 |

Tabelle 19: Kultivierungsdaten für die Schüttelkolben Kultivierung 15_1 zur Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung.

| SF_15_1 | VCC | Viabilität | Zellgröße | mAK | Glucose | Lactat |
|---------|---------------------------------|------------|-----------|-------|---------|--------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [µm] | [g/L] | [g/L] | [g/L] |
| Tag 0 | 0,33 | 98,60 | 14,86 | 0,01 | 6,14 | 0,12 |
| Tag 1 | 0,77 | 99,60 | 16,01 | 0,02 | 5,68 | 0,42 |
| Tag 2 | 1,99 | 99,70 | 15,34 | 0,12 | 4,97 | 0,88 |
| Tag 3 | 3,77 | 99,70 | 15,07 | 0,21 | 4,06 | 1,15 |
| | | | | | 17,45 | |
| Tag 4 | 4,64 | 99,70 | 15,25 | 0,32 | 17,17 | 1,13 |
| | | | | | 19,75 | |
| Tag 5 | 4,49 | 99,50 | 17,07 | 0,49 | 18,18 | 1,23 |
| Tag 6 | 6,11 | 99,00 | 17,59 | 0,73 | 15,73 | 1,16 |
| Tag 7 | 9,42 | 96,80 | 17,44 | 1,08 | 12,49 | 1,05 |
| | | | | | 15,15 | |
| Tag 8 | 10,97 | 92,90 | 17,45 | 1,48 | 10,70 | 0,99 |
| Tag 9 | 10,32 | 91,90 | 17,24 | 1,87 | 6,31 | 0,64 |
| Tag 10 | 9,18 | 91,00 | 16,53 | 2,13 | 3,68 | 0,37 |

Tabelle 20: Kultivierungsdaten für die Schüttelkolben Kultivierung 15_2 zur Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung.

| SF_15_1 | VCC | Viabilität | Zellgröße | mAK | Glucose | Lactat |
|---------|---------------------------------|------------|-----------|-------|---------|--------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [µm] | [g/L] | [g/L] | [g/L] |
| Tag 0 | 0,32 | 99,80 | 14,89 | 0,01 | 6,19 | 0,12 |
| Tag 1 | 0,74 | 99,50 | 15,89 | 0,02 | 5,67 | 0,42 |
| Tag 2 | 2,16 | 99,70 | 15,34 | 0,12 | 4,90 | 0,88 |
| Tag 3 | 3,98 | 99,90 | 15,12 | 0,22 | 4,04 | 1,15 |
| | | | | | 17,48 | |
| Tag 4 | 4,97 | 99,60 | 15,32 | 0,32 | 17,36 | 1,10 |
| | | | | | 20,33 | |
| Tag 5 | 4,64 | 99,50 | 17,23 | 0,50 | 18,55 | 1,13 |
| Tag 6 | 7,18 | 98,30 | 17,55 | 0,78 | 16,22 | 1,10 |
| Tag 7 | 10,04 | 98,90 | 17,37 | 1,13 | 12,62 | 0,90 |
| | | | | | 15,24 | |
| Tag 8 | 10,69 | 94,40 | 17,51 | 1,72 | 10,35 | 0,92 |
| Tag 9 | 11,25 | 92,10 | 17,04 | 1,97 | 6,13 | 0,56 |
| Tag 10 | 10,64 | 91,70 | 16,55 | 2,16 | 3,45 | 0,32 |

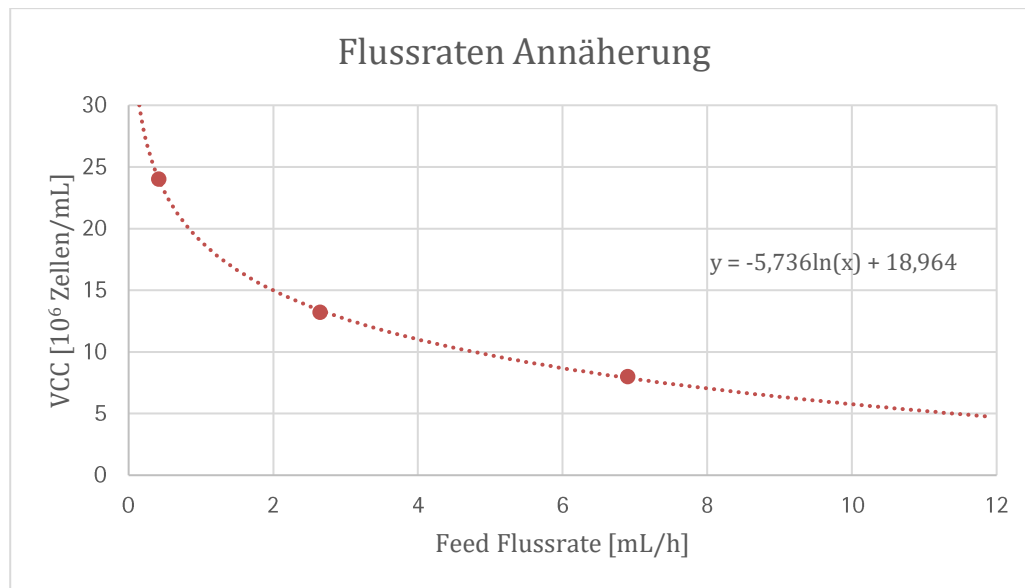


Abbildung 28: Grafische Auswertung der Flussrate für eine Steigerung der Zelldichte in C_4 aus der VCC des Standard Fed Batch und den kontinuierlichen Kultivierungen C_1 und C_3 und einer logarithmischen Annäherung.

Tabelle 21: Kultivierungsdaten für einen Perfusionsprozess mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250 (P_2).

| P_2 | VCC | Viabilität | mAK | Glucose | Lactat | Volumen |
|-------|-------------------------------|------------|-------|---------|--------|---------|
| | [$\times 10^6$ Zellen/mL] | [%] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | mL |
| 0,7 | 1 | 99,9 | 0,002 | 5,972 | 0,028 | 240 |
| 23,3 | 2,121 | 99,3 | 0,06 | 4,672 | 0,896 | 237 |
| 47,8 | 4,576 | 98 | 0,182 | 2,754 | 1,665 | 233 |
| 71,5 | 6,082 | 97,9 | 0,414 | 1,856 | 1,075 | 230 |
| 90,1 | 6,02 | 96,7 | 0,482 | 2,394 | 0,768 | 230 |
| 96,8 | 7,279 | 96,7 | 0,538 | 2,357 | 0,727 | 250 |
| 101,9 | 7,82 | 96,1 | 0,566 | 2,393 | 0,633 | 240 |
| 114,1 | 9,584 | 97,5 | 0,63 | 2,276 | 0,516 | 190 |
| 118,6 | 7,696 | 97,1 | 0,569 | 3,837 | 0,456 | 160 |
| 125,9 | 8,17 | 97,7 | 0,597 | 3,836 | 0,501 | 190 |
| 137,3 | 9,343 | 97,4 | 0,635 | 3,702 | 0,595 | 185 |
| 149,8 | 8,611 | 96,8 | 0,645 | 4,170 | 0,606 | 230 |
| 163,5 | 9,294 | 97,3 | 0,695 | 3,876 | 0,669 | 100 |
| 167,4 | 6,331 | 96,9 | 0,557 | 5,928 | 0,528 | 180 |
| 174,2 | 5,617 | 95,8 | 0,524 | 6,290 | 0,520 | NaN |
| 186,9 | 4,6 | 95,3 | 0,514 | 6,567 | 0,610 | NaN |
| 198,5 | 4,28 | 96 | 0,519 | 6,446 | 0,782 | NaN |
| 211,6 | 4,525 | 95,8 | 0,531 | 6,324 | 0,954 | 230 |
| 222,7 | 4,949 | 95,1 | 0,566 | 6,002 | 1,020 | 230 |
| 235,0 | 5,848 | 95,5 | 0,621 | 5,680 | 1,038 | 230 |
| 246,0 | 6,199 | 97,1 | 0,661 | 5,420 | 1,026 | 195 |
| 259,1 | 6,784 | 95,6 | 0,714 | 5,058 | 1,073 | 205 |
| 270,2 | 7,887 | 97,2 | 0,748 | 4,554 | 1,086 | 230 |

| | | | | | | |
|-------|--------|------|-------|-------|-------|-----|
| 283,1 | 8,428 | 96,3 | 0,811 | 4,039 | 1,100 | 240 |
| 294,4 | 9,329 | 97,2 | 0,866 | 3,573 | 1,049 | 230 |
| 307,1 | 12,323 | 97,6 | 0,938 | 3,067 | 0,958 | 180 |
| 310,8 | 11,721 | 97,1 | 0,958 | 2,855 | 0,936 | NaN |
| 317,8 | 12,774 | 97,2 | 0,981 | 2,439 | 0,908 | NaN |
| 331,3 | 12,034 | 96,7 | 0,881 | 3,886 | 0,781 | 220 |
| 341,8 | 11,494 | 96,4 | 0,815 | 4,557 | 0,798 | 220 |
| 354,5 | 11,317 | 97 | 0,858 | 3,786 | 0,907 | 180 |
| 366,4 | 12,691 | 96,5 | 0,785 | 4,417 | 0,905 | 185 |
| 380,2 | 10,938 | 94,7 | 0,744 | 4,744 | 0,988 | 215 |
| 390,0 | 10,698 | 94,4 | 0,781 | 4,535 | 1,146 | 235 |
| 402,4 | 9,858 | 94,4 | 0,725 | 4,517 | 1,216 | 270 |
| 414,2 | 12,02 | 94,4 | 0,75 | 4,026 | 1,263 | 220 |
| 426,9 | 10,602 | 93,7 | 0,766 | 4,062 | 1,276 | 270 |
| 438,2 | 10,971 | 95,7 | 0,752 | 4,018 | 1,339 | 245 |
| 454,2 | 10,966 | 93,8 | 0,764 | 3,610 | 1,603 | 270 |

Tabelle 22: Kultivierungsdaten für einen Perfusionsprozess mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250 (P_4).

| P_4 | VCC | Viabilität | mAK | Glucose | Lactat | LDH |
|-------|---------------------------------|------------|-------|---------|--------|--------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [g/L] | [g/L] | [g/L] | [U/mL] |
| 2,2 | 1,26 | 99,6 | 0,003 | 5,964 | 0,053 | 0,015 |
| 22,9 | 3,003 | 99,5 | 0,066 | 4,863 | 0,875 | NaN |
| 48,4 | 6,097 | 99,3 | NaN | 3,007 | 1,032 | NaN |
| 71,0 | 9,196 | 99,3 | 0,432 | 2,469 | 0,243 | 0,215 |
| 76,5 | 8,697 | 99,6 | 0,403 | 2,621 | 0,181 | NaN |
| 78,2 | 7,422 | 99,5 | 0,388 | 2,630 | 0,228 | 0,270 |
| 90,1 | 5,509 | 94 | 0,352 | 2,088 | 1,092 | 0,557 |
| 95,1 | 5,074 | 93,6 | 0,335 | 2,287 | 1,171 | NaN |
| 97,5 | 4,885 | 92,1 | 0,287 | 2,532 | 1,207 | 0,683 |
| 102,2 | 4,328 | 92,7 | 0,323 | 3,132 | 1,151 | 0,650 |
| 114,2 | 3,917 | 92,3 | 0,319 | 4,506 | 0,988 | 0,560 |
| 121,0 | 3,747 | 94 | 0,315 | 5,117 | 0,875 | 0,528 |
| 126,1 | 3,379 | 94,1 | 0,307 | 5,412 | 0,786 | NaN |
| 138,3 | 3,13 | 93,7 | 0,341 | 6,222 | 0,607 | 0,453 |
| 145,0 | 3,263 | 95 | 0,351 | 6,295 | 0,567 | NaN |
| 150,9 | 3,131 | 96,2 | 0,358 | 6,362 | 0,572 | 0,485 |
| 162,4 | 3,575 | 96,2 | 0,426 | 6,436 | 0,761 | 0,444 |
| 174,3 | 4,571 | 97,2 | 0,406 | 5,813 | 0,979 | 0,554 |
| 186,1 | 5,836 | 98,1 | 0,485 | 5,519 | 1,265 | 0,518 |
| 200,5 | 10,264 | 99,1 | 0,587 | 4,581 | 1,393 | 0,680 |

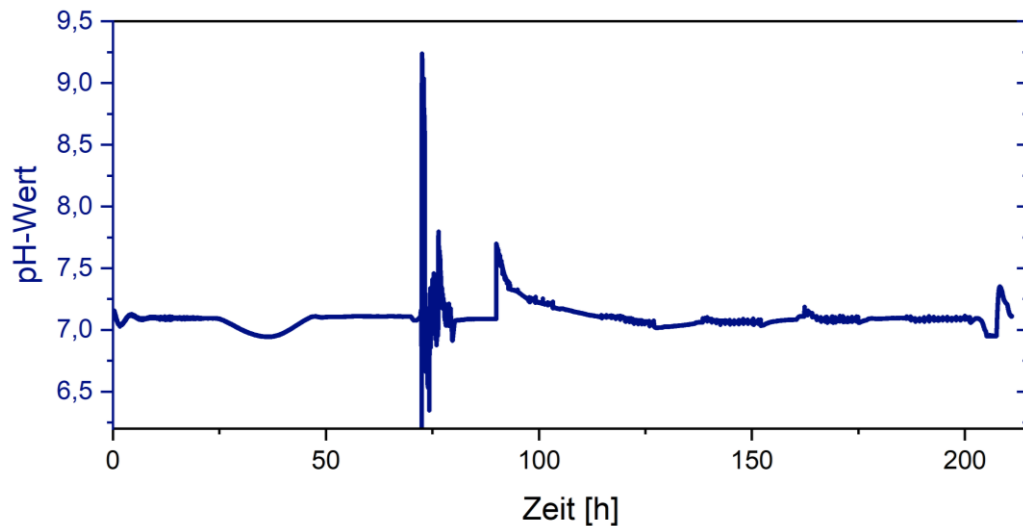


Abbildung 29: Kultivierungsverlauf des online pH-Wertes eines Perfusionsprozesses mit Separationsspirale und automatischer Spülung (P_4).

Tabelle 23: Fed Batch Refrenz (FB_Ref) durch Mittelwertbildung von Kultivierungsdaten der Standards aus allen Reaktormaßstäben: Ambr® 15, Ambr® 250, Biostat® BDCU 2L.

| FB_Ref | VCC | Viabilität | mAK |
|--------|---------------------------------|------------|-------|
| | [x10 ⁶ Zellen/mL] | [%] | [g/L] |
| 0 | 0,34 | 97,29 | 0,01 |
| 1 | 0,64 | 99,00 | 0,03 |
| 2 | 1,87 | 99,20 | 0,06 |
| 3 | 4,19 | 99,36 | 0,19 |
| 4 | 6,65 | 99,38 | 0,29 |
| 5 | 10,75 | 99,37 | 0,52 |
| 6 | 16,70 | 99,46 | 0,95 |
| 7 | 21,54 | 99,38 | 1,34 |
| 8 | 23,80 | 98,79 | 1,77 |
| 9 | 23,13 | 98,89 | 2,12 |
| 10 | 21,64 | 98,24 | 2,39 |
| 11 | 19,17 | 97,64 | 2,72 |
| 12 | 17,63 | 96,88 | 2,94 |

Alle weiteren Kultivierungsdaten befinden sich auf dem beigelegten Datenträger.

6.2.2. Prozess-Rezepte für den 2 L Reaktor und das Ambr® 250

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

6.2.3. Bioprozessmodell und Simulationen

Die in dieser Arbeit verwendeten mathematischen Bioprozessmodelle basieren auf der Monod-Kinetik und beschreiben die komplexen biotischen Vorgänge im Reaktor durch vereinfachte Annahmen der Wachstums- und Substratverbrauchskinetik. Der Reaktor wird dabei als ideal betrachtet.

Materialbilanzgleichung (abiotische Vorgänge) mit den Termen der erzwungenen Konvektion, der effektiven Diffusion und der Reaktion.

$$\frac{\delta c_i}{\delta t} = -\text{div}(\vec{u}c_i) + \text{div}(D_i \text{grad } c_i) + \sum_j v_{ij}r_j \quad (14)$$

Lineares Differentialgleichungssystem

Zellwachstumskinetik

$$\mu = \mu_{\text{Glc}} + \mu_{\text{Gln}} + \mu_{\text{Lac}} \quad (15)$$

mit

$$\mu_{\text{Glc}} = \frac{\mu_{\text{max Glc}} \times c_{\text{Glc}}}{K_{\text{M Glc}} + c_{\text{Glc}}} \quad (16)$$

$$\mu_{\text{Gln}} = \frac{\mu_{\text{max Gln}} \times c_{\text{Gln}}}{K_{\text{M Gln}} + c_{\text{Gln}}} \quad (17)$$

$$\mu_{\text{Lac}} = \frac{\mu_{\text{max Lac}} \times c_{\text{Lac}}}{K_{\text{M Lac}} + c_{\text{Lac}}} \times \frac{K_{\text{I Gln}}}{K_{\text{I Gln}} + c_{\text{Gln}}} \quad (18)$$

Hierbei folgt das Wachstum auf Glucose und Glutamin der Monod-Kinetik, ein Wachstum auf Lactat wird durch Glutamin inhibiert und erfolgt erst nach dessen Depletion.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \times X - DX \quad (19)$$

$$\frac{dc_{\text{Glc}}}{dt} = -\frac{\mu_{\text{Glc}}}{Y_{\text{X/Glc}}} \times X + D(c_{\text{Glc}}^0 - c_{\text{Glc}}) \quad (20)$$

$$\frac{dc_{\text{Lac}}}{dt} = \left(\frac{\mu_{\text{Glc}}}{Y_{\text{Lac/Glc}}} - \frac{\mu_{\text{Lac}}}{Y_{\text{X/Lac}}} \right) \times X + Dc_{\text{Lac}} \quad (21)$$

$$\frac{dc_{\text{Gln}}}{dt} = -\frac{\mu_{\text{Gln}}}{Y_{\text{X/Gln}}} \times X + \frac{c_{\text{Glu}}}{Y_{\text{Gln/Glu}}} \frac{K_{\text{I Gln}}}{K_{\text{I Gln}} + c_{\text{Gln}}} - D(c_{\text{Gln}}^0 - c_{\text{Gln}}) \quad (22)$$

$$\frac{dc_{\text{Glu}}}{dt} = -\frac{c_{\text{Glu}}}{Y_{\text{Gln/Glu}}} \frac{K_{\text{I Gln}}}{K_{\text{I Gln}} + c_{\text{Gln}}} + D(c_{\text{Glu}}^0 - c_{\text{Glu}}) \quad (23)$$

Während die verwendeten Gleichung für den Fed Batch Prozess und den kontinuierlichen Prozess größtenteils gleich sind, besteht ein wesentlicher Unterschied in der Berechnung der Volumenänderung.

Fed Batch: $\frac{dV}{dt} = F^{\text{in}} - F^{\text{out}}, \quad F^{\text{out}} = 0 \quad (24)$

Kontinuierlicher Prozess: $\frac{dV}{dt} = F^{\text{in}} - F^{\text{out}} \quad (25)$

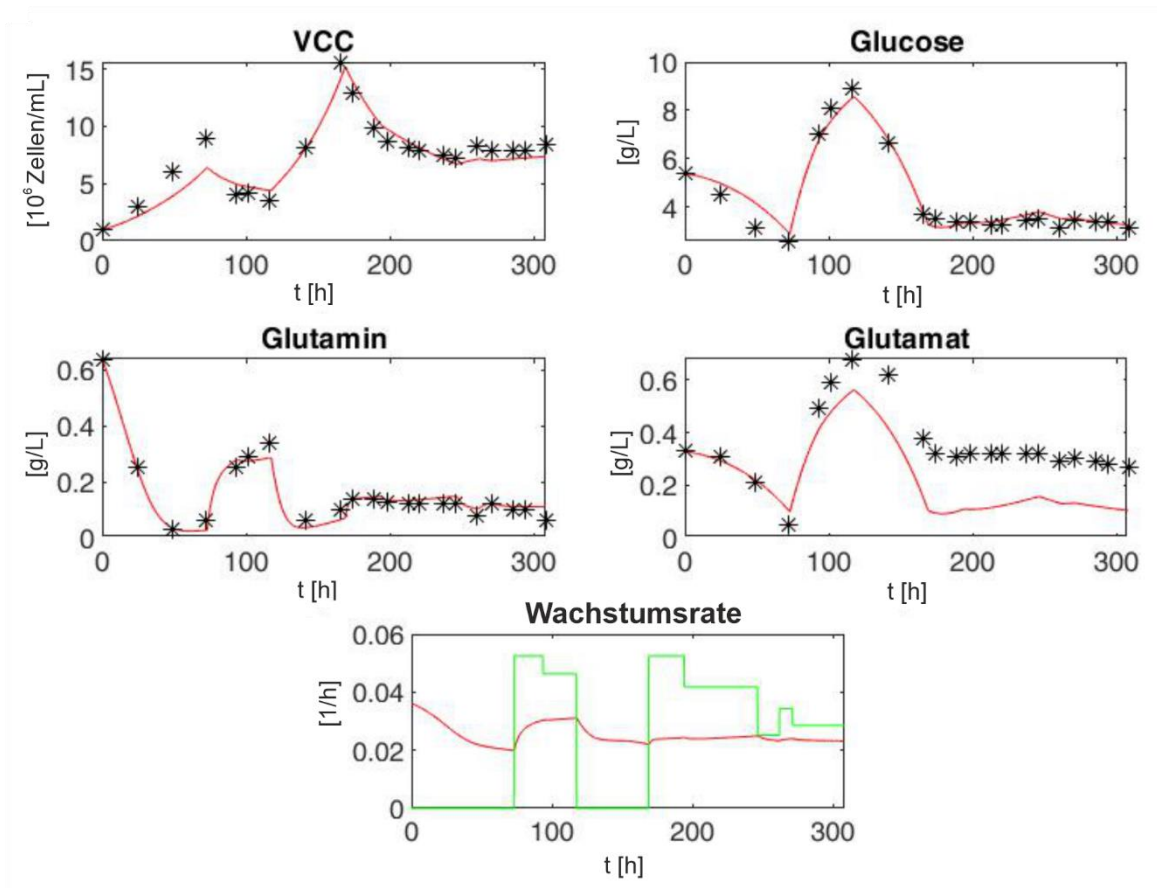


Abbildung 30: Modellfit für den kontinuierlichen Prozess C_1. Offline Messwerte (schwarz) für Lebendzellzahl (VCC), Glucose, Glutamin und Glutamat sowie Modellwerte (rot) mit der Wachstumsrate in rot und der Verdünnungsrate in grün.

Das verwendete Modell befindet sich zusammen mit den Parametergrenzen, den Anpassungen und weiteren Funktionen auf dem beigelegten Dateiträger.

6.2.4. Python Skript für die automatische Spülung

Das Skript für die automatische Spülung des Zellrückhaltesystems befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

6.2.5. Flussratenüberwachung mit webbasierter Steuerung

Die Software kommuniziert mit der verwendeten Waage über ein SBI Protokoll, um das gemessene Gewicht der zellarmen Fraktion in Echtzeit abzufragen und in eine Flussrate umzurechnen. Zusätzlich wird dem Anwender eine webbasierte Oberfläche

bereitgestellt die eine Einstellungen der erlaubten Flussraten sowie einen Überblick über die gemessenen und berechneten Werte ermöglicht.

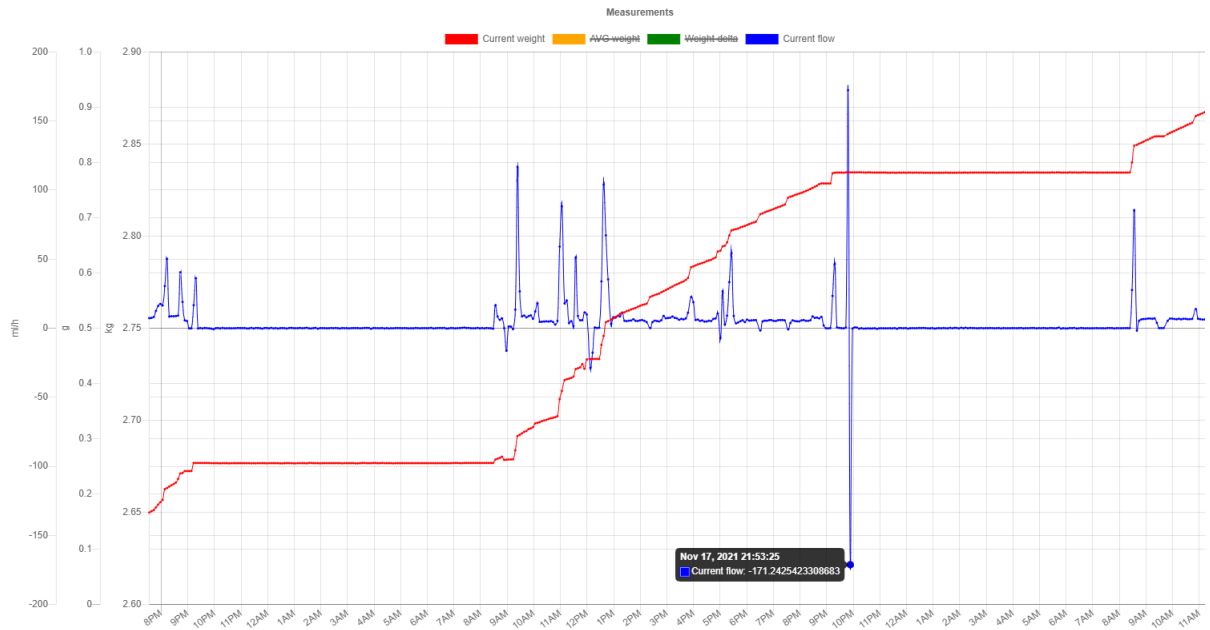


Abbildung 31: Webbasierte Benutzeroberfläche zur Darstellung der Bleedflussrate (current flow) und des Waagensignals (current weight).

Da der zellhaltige Bleed über Nacht in einem anderen Auffanggefäß als die abgetrennte Fraktion der Separationsspirale gesammelt wurde, sind die kontinuierlichen Phasen ohne Zellrückhaltung in Abbildung 31 als konstantes Waagensignal (rot) mit errechneten Flussraten von 0 mL/min (blau) erkennbar. Die Phasen der Zellrückhaltung zeichnen sich durch einen stufenweisen Anstieg des Waagensignals mit verschiedenen Bleedflussraten aus. Innerhalb der Zellrückhaltung wird der Anwender bei einer Abweichung der Flussraten außerhalb des festgelegten Bereiches über einen mobilen Alarm benachrichtigt. Dazu wurde ein Telegram-Bot eingebunden, der mehreren Anwendern über einen Gruppen-Chat Informationen und Interaktionen bereitstellen kann. Der Bot informiert die Anwender über den aktuellen Status, sowie über auftreten Alarme, welche zusätzlich manuell ein oder ausgeschaltet werden können. Die Integration mit dem Telegram Bot setzt einen existieren Bot und einen Telegram Profil voraus.

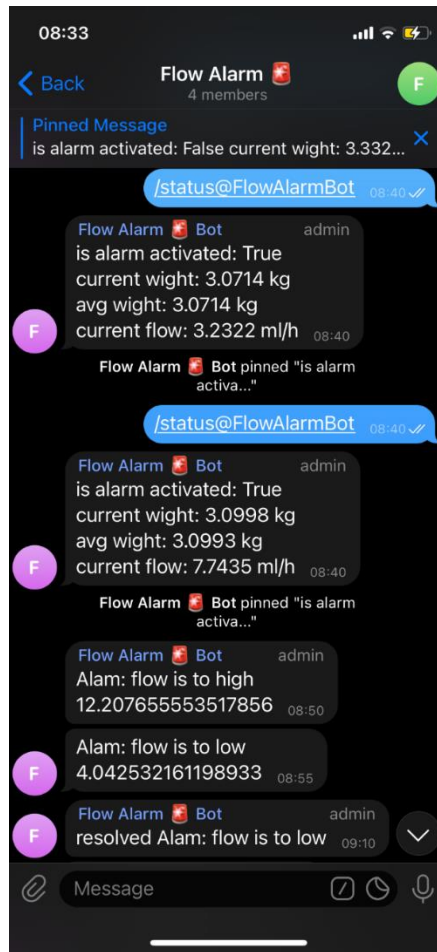


Abbildung 32: Funktionen des Telegram-Bots für das mobiles Alarmsystem und die webbasierte Statusabfrage in Echtzeit über ein Smartphone.

Die Programmierung wurde in Kooperation mit M. Sc. Ferdinand Lange durchgeführt. Der Quellcode, eine kurze Anleitung sowie weitere erklärende Abbildungen befinden sich auf dem beigelegten Datenträger und auf <https://doi.org/10.25835/hg4blboq>.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Die vier Phasen des Zellwachstums (VCC) im Batch Betrieb (Übergänge gestrichelt) mit zusätzlicher Substrat- (c_{Glucose}) und Produktkonzentration (c_{Produkt}). 8 | 8 |
| Abbildung 2: Skizzierter Verlauf der Fed Batch Prozess Plattform (geändert aus [26]). A beschreibt hierbei das vorgelegte Basalmedium und B die Zufütterung. 9 | 9 |
| Abbildung 3: Skizze eines kontinuierlich betriebenen idealen Rührkesselreaktors mit Steady State durch Zellrückhaltung und Zellbleed (blau gestrichelt) oder Zellverlust (blau). A und B beschreiben hierbei Basal und Feedmedien. D beschreibt zellfreies Medium nach Zellretention und C einen zellhaltigen Bleed. 11 | 11 |
| Abbildung 4: Positionierung der Zellen im gebogenen mikrofluidischen Kanal einer Separationsspirale (geändert aus [33]). 15 | 15 |
| Abbildung 5: Skizze der verwendeten Bioreaktorsysteme: (A) Biostat® BDCU 2L, (B) Ambr® 250, (C) Ambr® 15. 17 | 17 |
| Abbildung 6: Fed Batch Kultivierung mit pH-Änderung nach 0 und 5 Tagen und Standard als Referenz im Ambr® 15 Mikrobioreaktorsystem. Offline Messwerte in (A) sowie berechnete Parameter in (B) (geändert aus Schellenberg <i>et al.</i> 2022) ^[57] 23 | 23 |
| Abbildung 7: Fed Batch Standard Kultivierungen im Ambr® 250. Vergleich der offline Messwerte von zwei Kultivierungen mit identischen Prozessbedingungen. 25 | 25 |
| Abbildung 8: Semi-kontinuierlicher Feed (kFB) mit Standard Fed Batch (STD) als Referenz im Ambr® 250. Offline Messwerte in (A) sowie die durchschnittliche Zellgröße, maximale Größendifferenz, IVCC und zellspezifische Produktivität Q_P bis Tag 11 in (B). 28 | 28 |
| Abbildung 9: Chemostat Kultivierung C_1 im Biostat® BDCU 2L. Offline Messwerte, und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B). 31 | 31 |
| Abbildung 10: In-silico optimierter Chemostat Prozess anhand des vereinfachten Bioprozessmodells. Zelldichte und Metaboliten Konzentrationen in (A) sowie Dauer der Prozessphasen mit den zusammenhängenden Verdünnungsraten in (B). 36 | 36 |
| Abbildung 11: Chemostat Kultivierung C_2 im Biostat® BDCU 2L. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B). 37 | 37 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 12: Chemostat Kultivierung C_3 im Ambr® 250. Offline Messwerte und Medienwechsel in (A) sowie die Glucosekonzentrationen der verwendeten Medien in (B)..... | 40 |
| Abbildung 13: Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung in 150 mL Schüttelkolben mit unterschiedlichen Glucose Setpoints (5, 10, 15 g/L). Offline Messwerte in (A) sowie die durchschnittliche Zellgröße, maximale Größendifferenz, IVCC und zellspezifische Produktivität Q_P in (B)..... | 43 |
| Abbildung 14: Lactatausbeutekoeffizienten aus Glucose der Schüttelkolben Kultivierungen mit unterschiedlichen Glucose Setpoints (SF_5, SF_10, SF_15) aus Abbildung 13..... | 45 |
| Abbildung 15: Chemostat Kultivierung C_4 im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Substratkonzentrationen der verwendeten Medien in (B)..... | 48 |
| Abbildung 16: Perfusionskultivierung P_1 mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B)..... | 52 |
| Abbildung 17.1: Perfusionskultivierung P_2 mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250. Offline Messwerte und Austausch der Spirale in (A) sowie die Kultivierungsphasen und Verdünnungsraten in (B). | 54 |
| Abbildung 18: Perfusionskultivierung P_3 mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250. Offline Messwerte und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B)..... | 58 |
| Abbildung 19: Perfusionskultivierung P_4 mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250. Offline Messwerte und Austausch der Spirale in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B)..... | 60 |
| Abbildung 20: Evaluierung eines zusätzlichen Bypasses zur invasiven Prozessüberwachung im Ambr® 250 anhand verschiedener Zelleigenschaften. | 63 |
| Abbildung 21: Perfusionskultivierung P_5 mit Zellseparationsspirale, automatischer Spülung und Flussratenüberwachung im Ambr® 250. Offline Messwerte, Austausch der Spirale und Kultivierungsphasen in (A) sowie die Verdünnungsraten in (B). | 65 |
| Abbildung 22: Produktretention und Zellseparation der Perfusionskultivierung P_5 im Ambr® 250. Offline Messwerte der abgetrennten Fraktion und im Reaktor sowie Austausch der Spirale und Kultivierungsphasen. | 67 |

| | |
|--|-------|
| Abbildung 23: Zellretention, VCC und Viabilität der abgetrennten Fraktion der Perfusionskultivierung P_5 im Ambr® 250..... | 68 |
| Abbildung 24: Additiv gefertigte Separationsspirale nach vollständiger Aufreinigung und Lackierung. Zugang aus dem Reaktor (blau), abgetrennte Fraktion (rot, oben) und Rückführung zum Reaktor (rot, unten)..... | XII |
| Abbildung 25: Separationssystem Designs in chronologischer Reihenfolge. Einzelne Komponenten in (A ₁) sowie integrierte Pulsationspuffer für P_1 und P_2 in (A ₂) mit einer Kalanauftrennung von 50:50 (B ₁). Komprimierte Puffereinheiten (A ₃) und Implementation der automatischen Spülung und optimierte Puffereinheiten für P_3, P_4 und P_5 in (A ₄) mit einer Kalanauftrennung von 70:30 zugunsten der Rückführung (Zellen, B ₂)..... | XIII |
| Abbildung 26: Mikroskopische Betrachtung einer Verblockung der Kanalaufteilung des additiv gefertigten Spiralseparators durch Zellaggregate. Vollständige Verblockung in (A), Abschirmung der Rückführung in (B) und Zellaggregate mit Plastikpartikeln in (C)..... | XIV |
| Abbildung 27: Aufbau einer kontinuierlichen Kultivierung im Ambr® 250 Reaktorsystem mit Separationsspiralseparator als Zellrückhaltung und automatischer Spülung. | XV |
| Abbildung 28: Grafische Auswertung der Flussrate für eine Steigerung der Zelldichte in C_4 aus der VCC des Standard Fed Batch und den kontinuierlichen Kultivierungen C_1 und C_3 und einer logarithmischen Annäherung. | XX |
| Abbildung 29: Kultivierungsverlauf des online pH-Wertes eines Perfusionprozesses mit Separationsspirale und automatischer Spülung (P_4). | XXII |
| Abbildung 30: Modellfit für den kontinuierlichen Prozess C_1. Offline Messwerte (schwarz) für Lebendzellzahl (VCC), Glucose, Glutamin und Glutamat sowie Modellwerte (rot) mit der Wachstumsrate in rot und der Verdünnungsrate in grün. | XXV |
| Abbildung 31: Webbasierte Benutzeroberfläche zur Darstellung der Bleedflussrate (current flow) und des Waagensignals (current weight)..... | XXVI |
| Abbildung 32: Funktionen des Telegram-Bots für das mobiles Alarmsystem und die webbasierte Statusabfrage in Echtzeit über ein Smartphone..... | XXVII |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|------|
| Tabelle 1: Vergleich der Chemostat Kultivierung C_1 mit dem etablierten 12-tägigen Fed Batch Standard Prozess im Biostat® BDCU 2L | 33 |
| Tabelle 2: Evaluation der Produktivitätssteigerung durch die Implementierung einer kontinuierlichen Prozessführung. Vergleich wichtiger Kenngrößen zwischen Fed Batch (FB), Chemostat und Perfusionskultivierungen. | 70 |
| Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien | I |
| Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte | II |
| Tabelle 5: Zusammensetzung von 1 L Seed Culture Medium (SMD) | III |
| Tabelle 6: Zusammensetzung von 1 L Produktionsmedium (PM) | IV |
| Tabelle 7: Zusammensetzung von 1 L Feedmedium A (FMA) | IV |
| Tabelle 8: Zusammensetzung von 1 L Feedmedium B (FMB) | IV |
| Tabelle 9: Zusammensetzung von 1 L Glucose-Feed | IV |
| Tabelle 10: Zusammensetzung von jeweils 1 L kontinuierlichem Feedmedium (kFM1,2,3,4) | V |
| Tabelle 11: Weitere verwendete Chemikalien | V |
| Tabelle 12: Zusammenfassung der Kultivierungsbedingungen der Vorkultur | VI |
| Tabelle 13: Fließschema der Prozessschritte vom Auftauen über die Vorkultur in Schüttelkolben zur Hauptkultur | VII |
| Tabelle 14: Vergleich der Fütterungsprofile in 4,2,1 | IX |
| Tabelle 15: Kultivierungsdaten für einen Standard Fed Batch Prozess im Ambr® 250. | XVI |
| Tabelle 16: Ein Vergleich der angestrebten und realen Verdünnungsraten (D) mit den verwendeten Feedmedienkompositionen der Kultivierung C_1 | XVI |
| Tabelle 17: Kultivierungsdaten für einen Standard Fed Batch Prozess im Biostat® BDCU 2L Reaktor als Referenz für die Beurteilung von C_1. | XVII |
| Tabelle 18: Kultivierungsdaten für einen Chemostat Prozess zur Untersuchung der Wachstumsinhibierung durch Glucose im Ambr® 250 (C_3) | XVII |
| Tabelle 19: Kultivierungsdaten für die Schüttelkolben Kultivierung 15_1 zur Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung. | XIX |
| Tabelle 20: Kultivierungsdaten für die Schüttelkolben Kultivierung 15_2 zur Verifizierung einer glucoseinduzierten Wachstumsinhibierung. | XIX |

Tabelle 21: Kultivierungsdaten für einen Perfusionsprozess mit Zellseparationsspirale im Ambr® 250 (P_2).XX

Tabelle 22: Kultivierungsdaten für einen Perfusionsprozess mit Zellseparationsspirale und automatischer Spülung im Ambr® 250 (P_4).....XXI

Tabelle 23: Fed Batch Refrenz (FB_Ref) durch Mittelwertbildung von Kultivierungsdaten der Standards aus allen Reaktormaßstäben: Ambr® 15, Ambr® 250, Biostat® BDCU 2L.....XXII

Literaturverzeichnis

1. Tjio JH, Puck TT (1958) *GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS : II. CHROMOSOMAL CONSTITUTION OF CELLS IN TISSUE CULTURE*. The Journal of Experimental Medicine 108:259–268
2. Urlaub G, Käs E, Carothers AM et al. (1983) *Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells*. Cell 33:405–412.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90422-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90422-1)
3. Schwarz H, Mäkinen ME, Castan A et al. (2022) *Monitoring of amino acids and antibody N-glycosylation in high cell density perfusion culture based on Raman spectroscopy*. Biochemical Engineering Journal 182:108426.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108426>
4. Särnlund S, Jiang Y, Chotteau V (2021) *Process intensification to produce a difficult-to-express therapeutic enzyme by high cell density perfusion or enhanced fed-batch*. Biotechnol Bioeng 118:3533–3544.
<https://doi.org/10.1002/bit.27806>
5. Gagnon M, Nagre S, Wang W et al. (2018) *Shift to high-intensity, low-volume perfusion cell culture enabling a continuous, integrated bioprocess*. Biotechnol Prog 34:1472–1481. <https://doi.org/10.1002/btpr.2723>
6. Sellick CA, Croxford AS, Maqsood AR et al. (2011) *Metabolite profiling of recombinant CHO cells: designing tailored feeding regimes that enhance recombinant antibody production*. Biotechnol Bioeng 108:3025–3031.
<https://doi.org/10.1002/bit.23269>
7. Buchsteiner M, Quek L-E, Gray P et al. (2018) *Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect*. Biotechnol Bioeng 115:2315–2327. <https://doi.org/10.1002/bit.26724>
8. Martínez VS, Dietmair S, Quek L-E et al. (2013) *Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption*. Biotechnol Bioeng 110:660–666. <https://doi.org/10.1002/bit.24728>
9. Luo J, Vijayasankaran N, Autsen J et al. (2012) *Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process*. Biotechnol Bioeng 109:146–156. <https://doi.org/10.1002/bit.23291>
10. Carrillo-Cocom LM, Genel-Rey T, Araíz-Hernández D et al. (2015) *Amino acid consumption in naïve and recombinant CHO cell cultures: producers of a*

- monoclonal antibody*. Cytotechnology 67:809–820.
<https://doi.org/10.1007/s10616-014-9720-5>
11. Newsholme P, Procopio J, Lima MMR et al. (2003) *Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function*. Cell Biochem Funct 21:1–9.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1003>
 12. Yoo H, Antoniewicz MR, Stephanopoulos G et al. (2008) *Quantifying Reductive Carboxylation Flux of Glutamine to Lipid in a Brown Adipocyte Cell Line**. The Journal of Biological Chemistry 283:20621–20627.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M706494200>
 13. Harper HA, Löffler G, Petrides PE et al. (2013) *Physiologische Chemie: Eine Einführung in die medizinische Biochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*. Springer Berlin Heidelberg
 14. Jana Schellenberg (2018) *Prozess-Scale-up der Produktion eines monoklonalen Antikörpers mit tierischen Zellen*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover
 15. Nagraik T (2021) *Process transfer and optimization of Chinese hamster ovary cell cultivation for monoclonal antibody production*
 16. Legrand C, Bour JM, Jacob C et al. (1992) *Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker*. J Biotechnol 25:231–243. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90158-6)
 17. Gonzalez Salcedo A (2020) *Aspekte der Produktaufreinigung und -analytik in der Tierzellkultivierung*. Dissertation. Hannover : Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover
 18. Acosta ML, Sánchez A, García F et al. (2007) *Analysis of kinetic, stoichiometry and regulation of glucose and glutamine metabolism in hybridoma batch cultures using logistic equations*. Cytotechnology 54:189–200.
<https://doi.org/10.1007/s10616-007-9089-9>
 19. Reinhart D, Damjanovic L, Kaisermayer C et al. (2015) *Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production*. Appl Microbiol Biotechnol 99:4645–4657. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6514-4>
 20. Kunert R, Reinhart D (2016) *Advances in recombinant antibody manufacturing*. Appl Microbiol Biotechnol 100:3451–3461. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>

21. Dean J, Reddy P (2013) *Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production*. *Biotechnol Bioeng* 110:1735–1747.
<https://doi.org/10.1002/bit.24826>
22. Huang Y-M, Hu W, Rustandi E et al. (2010) *Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment*. *Biotechnol Prog* 26:1400–1410.
<https://doi.org/10.1002/btpr.436>
23. Chmiel H, Briechle S (eds) (2008) *Bioprozesstechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik, 2., neu bearb. Aufl., [Nachdr.]*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
24. Wong HE, Chen C, Le H et al. (2021) *From chemostats to high-density perfusion: the progression of continuous mammalian cell cultivation*. *J Chem Technol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6841>
25. Dowd JE, Jubb A, Kwok KE et al. (2003) *Optimization and control of perfusion cultures using a viable cell probe and cell specific perfusion rates*. *Cytotechnology* 42:35–45. <https://doi.org/10.1023/A:1026192228471>
26. Ozturk SS (1996) *Engineering challenges in high density cell culture systems*. *Cytotechnology* 22:3–16. <https://doi.org/10.1007/BF00353919>
27. Voisard D, Meuwly F, Ruffieux P-A et al. (2003) *Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells*. *Biotechnol Bioeng* 82:751–765. <https://doi.org/10.1002/bit.10629>
28. MacDonald MA, Nöbel M, Roche Recinos D et al. (2021) *Perfusion culture of Chinese Hamster Ovary cells for bioprocessing applications*. *Crit Rev Biotechnol*:1–17. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1998821>
29. Marques MP, Szita N (2017) *Bioprocess microfluidics: applying microfluidic devices for bioprocessing*. *Current Opinion in Chemical Engineering* 18:61–68.
<https://doi.org/10.1016/j.coche.2017.09.004>
30. Zhan C, Bidkhorji G, Schwarz H et al. (2020) *Low Shear Stress Increases Recombinant Protein Production and High Shear Stress Increases Apoptosis in Human Cells*. *iScience* 23:101653. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101653>
31. Wang S, Godfrey S, Ravikrishnan J et al. (2017) *Shear contributions to cell culture performance and product recovery in ATF and TFF perfusion systems*. *J Biotechnol* 246:52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.020>

32. Karst DJ, Serra E, Villiger TK et al. (2016) *Characterization and comparison of ATF and TFF in stirred bioreactors for continuous mammalian cell culture processes*. *Biochemical Engineering Journal* 110:17–26.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.003>
33. Clincke M-F, Mölleryd C, Zhang Y et al. (2011) *Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE Bioreactor™*. *BMC Proc* 5 Suppl 8:P105. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P105>
34. Pinto NDS, Napoli WN, Brower M (2020) *Impact of micro and macroporous TFF membranes on product sieving and chromatography loading for perfusion cell culture*. *Biotechnol Bioeng* 117:117–124. <https://doi.org/10.1002/bit.27192>
35. Clincke M-F, Mölleryd C, Zhang Y et al. (2013) *Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process*. *Biotechnol Prog* 29:754–767. <https://doi.org/10.1002/btpr.1704>
36. Shirgaonkar IZ, Lanthier S, Kamen A (2004) *Acoustic cell filter: a proven cell retention technology for perfusion of animal cell cultures*. *Biotechnol Adv* 22:433–444. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.03.003>
37. Ryll T, Dutina G, Reyes A et al. (2000) *Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: Characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality*. *Biotechnol Bioeng* 69:440–449. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20000820\)69:4<440:AID-BIT10>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000820)69:4<440:AID-BIT10>3.0.CO;2-0)
38. Gränicher G, Coronel J, Trampl F et al. (2020) *Performance of an acoustic settler versus a hollow fiber-based ATF technology for influenza virus production in perfusion*. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:4877–4888.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10596-x>
39. Johnson M, Lanthier S, Massie B et al. (1996) *Use of the Centritech Lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium*. *Biotechnol Prog* 12:855–864. <https://doi.org/10.1021/bp960072n>
40. Janoschek S, Schulze M, Zijlstra G et al. (2019) *A protocol to transfer a fed-batch platform process into semi-perfusion mode: The benefit of automated small-scale bioreactors compared to shake flasks as scale-down model*. *Biotechnol Prog* 35:e2757. <https://doi.org/10.1002/btpr.2757>

41. Saballus M, Nisser L, Kampmann M et al. (2021) *A novel clarification approach for intensified monoclonal antibody processes with 100 million cells/mL using a single-use fluidized bed centrifuge*. *Biochemical Engineering Journal* 167:107887. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107887>
42. Saballus M, Kampmann M (2022) *Fluidized bed centrifugation of precipitated and flocculated cell cultures: An intensified clarification approach for monoclonal antibodies*. *J Biotechnol* 352:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.004>
43. Bettinardi IW, Castan A, Medronho RA et al. (2020) *Hydrocyclones as cell retention device for CHO perfusion processes in single-use bioreactors*. *Biotechnol Bioeng* 117:1915–1928. <https://doi.org/10.1002/bit.27335>
44. Herrmann N, Neubauer P, Birkholz M (2019) *Spiral microfluidic devices for cell separation and sorting in bioprocesses*. *Biomicrofluidics* 13:61501. <https://doi.org/10.1063/1.5125264>
45. Enders A, Preuss J-A, Bahnemann J (2021) *3D Printed Microfluidic Spiral Separation Device for Continuous, Pulsation-Free and Controllable CHO Cell Retention*. *Micromachines (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/mi12091060>
46. Yin L, Au WY, Yu CC et al. (2021) *Miniature auto-perfusion bioreactor system with spiral microfluidic cell retention device*. *Biotechnol Bioeng* 118:1951–1961. <https://doi.org/10.1002/bit.27709>
47. Kwon T, Prentice H, Oliveira J de et al. (2017) *Microfluidic Cell Retention Device for Perfusion of Mammalian Suspension Culture*. *Sci Rep* 7:6703. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06949-8>
48. Warkiani ME, Tay AKP, Guan G et al. (2015) *Membrane-less microfiltration using inertial microfluidics*. *Sci Rep* 5:11018. <https://doi.org/10.1038/srep11018>
49. Gou Y, Jia Y, Wang P et al. (2018) *Progress of Inertial Microfluidics in Principle and Application*. *Sensors (Basel)* 18. <https://doi.org/10.3390/s18061762>
50. Zhang J, Yan S, Yuan D et al. (2016) *Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review*. *Lab Chip* 16:10–34. <https://doi.org/10.1039/c5lc01159k>
51. Sharma R, Harrison STL, Tai SL (2022) *Advances in Bioreactor Systems for the Production of Biologicals in Mammalian Cells*. *ChemBioEng Reviews* 9:42–62. <https://doi.org/10.1002/cben.202100022>

-
52. Sarantos Kyriakopoulos, Kok Siong Ang, Meiyappan Lakshmanan et al. (2018) *Kinetic Modeling of Mammalian Cell Culture Bioprocessing: The Quest to Advance Biomanufacturing*. Biotechnol J 13. <https://doi.org/10.1002/biot.201700229>
 53. Paul K, Rajamanickam V, Herwig C (2019) *Model-based optimization of temperature and pH shift to increase volumetric productivity of a Chinese hamster ovary fed-batch process*. Journal of Bioscience and Bioengineering 128:710–715. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.004>
 54. Bailey JE (1998) *Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities*. Biotechnol Prog 14:8–20. <https://doi.org/10.1021/bp9701269>
 55. Bree MA, Dhurjati P, Geoghegan RF et al. (1988) *Kinetic modelling of hybridoma cell growth and immunoglobulin production in a large-scale suspension culture*. Biotechnol Bioeng 32:1067–1072. <https://doi.org/10.1002/bit.260320814>
 56. Miller WM, Blanch HW, Wilke CR (2000) *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH*. Biotechnol Bioeng 67:853–871. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000320\)67:6<853:AID-BIT20>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<853:AID-BIT20>3.0.CO;2-4)
 57. Craven S, Shirsat N, Whelan J et al. (2013) *Process model comparison and transferability across bioreactor scales and modes of operation for a mammalian cell bioprocess*. Biotechnol Prog 29:186–196. <https://doi.org/10.1002/btpr.1664>
 58. Kiparissides A, Pistikopoulos EN, Mantalaris A (2015) *On the model-based optimization of secreting mammalian cell (GS-NS0) cultures*. Biotechnol Bioeng 112:536–548. <https://doi.org/10.1002/bit.25457>
 59. Marcel Demiral (2021) *Prozessoptimierung einer Perfusionskultur anhand von Bioprozessmodellen*. Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover
 60. Möller J, Kuchemüller KB, Steinmetz T et al. (2019) *Model-assisted Design of Experiments as a concept for knowledge-based bioprocess development*. Bioprocess Biosyst Eng 42:867–882. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02089-7>

61. Kotidis P, Jedrzejewski P, Sou SN et al. (2019) *Model-based optimization of antibody galactosylation in CHO cell culture*. *Biotechnol Bioeng* 116:1612–1626. <https://doi.org/10.1002/bit.26960>
62. Carlier A, Vasilevich A, Marechal M et al. (2018) *In silico clinical trials for pediatric orphan diseases*. *Sci Rep* 8:2465. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20737-y>
63. M. Manieri T, G. Magalhaes C, Y. Takata D et al. (2021) *In silico Techniques for Prospecting and Characterizing Monoclonal Antibodies*. In: Rezaei N (ed) *Monoclonal Antibodies*. IntechOpen, Erscheinungsort nicht ermittelbar
64. Park S-Y, Park C-H, Choi D-H et al. (2021) *Bioprocess digital twins of mammalian cell culture for advanced biomanufacturing*. *Current Opinion in Chemical Engineering* 33:100702. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100702>
65. Kuchemüller KB, Pörtner R, Möller J (2021) *Digital Twins and Their Role in Model-Assisted Design of Experiments*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 177:29–61. https://doi.org/10.1007/10_2020_136
66. Böhl OJ, Schellenberg J, Bahnemann J et al. (2021) *Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process*. *Eng Life Sci* 21:196–207. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000056>
67. Wohlenberg OJ, Kortmann C, Meyer KV et al. (2022) *Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles*. *Engineering in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100172>
68. Schellenberg J, Nagraik T, Wohlenberg OJ et al. (2022) *Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells*. *Engineering in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100062>
69. Zheng C, Zhuang C, Chen Y et al. (2018) *Improved process robustness, product quality and biological efficacy of an anti-CD52 monoclonal antibody upon pH shift in Chinese hamster ovary cell perfusion culture*. *Process Biochemistry* 65:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.013>
70. T. Scheper IP *Technische Chemie I: Übungsvorlesung*. Technische Chemie I
71. Steinwedel T (2022) *Entwicklung einer disposable-Durchflussmesszelle zur spektroskopischen Bioprozessüberwachung*. Dissertation. Hannover : Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover

72. Winkler S, Meyer KV, Heuer C et al. (2022) *In vitro biocompatibility evaluation of a heat-resistant 3D printing material for use in customized cell culture devices*. Engineering in Life Sciences. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100104>
73. Habib T, Brämer C, Heuer C et al. (2022) *3D-Printed microfluidic device for protein purification in batch chromatography*. Lab Chip 22:986–993. <https://doi.org/10.1039/d1lc01127h>
74. Ng SK (2012) *Generation of high-expressing cells by methotrexate amplification of destabilized dihydrofolate reductase selection marker*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 801:161–172
75. Hausmann R, Chudobová I, Spiegel H et al. (2018) *Proteomic analysis of CHO cell lines producing high and low quantities of a recombinant antibody before and after selection with methotrexate*. J Biotechnol 265:65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.008>
76. Adams D, Korke R, Hu W-S (2007) *Application of Stoichiometric and Kinetic Analyses to Characterize Cell Growth and Product Formation*. In: Pörtner R (ed) Animal cell biotechnology: Methods and protocols, 2nd ed., vol 24. Humana Press, Totowa, N.J., pp 269–284

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wurde nur durch die Unterstützung vieler hilfsbereiter Menschen ermöglicht, bei denen ich mich in diesem Rahmen nochmal bedanken möchte.

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion und mein Studium an seinem Institut durchführen zu dürfen. Danke, dass Du mich immer unterstützt und oft einen freundlichen Schubs in die richtige Richtung gegeben hast. Ohne Dein Zutun wären die letzten 8 Jahre sicherlich nicht so glatt gelaufen.

Bei Prof. Janina Bahnemann bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats aber auch für die vielen inspirierenden und aufbauenden Gespräche bezüglich der Zellseparation. Ob auf dem Flur beim Wasserholen oder online in einer Videokonferenz, Du hast immer ein paar warme Worte für uns.

Ebenso ist Prof. Sascha Beutel eine wichtige Säule im Konstrukt des TCI. Danke, dass Du für mich ein weiteres Korreferat übernimmst und uns Doktoranden immer den Rücken stärkst. Als Kellermeister durfte ich das ein oder andere Mal Deinen Einsatz für den Erhalt der sozialen Strukturen im Chaos der Arbeitswelt miterleben.

PD Dr. Ulrich Krings danke ich herzlich für den Prüfungsvorsitz, die beruhigende Atmosphäre in den Modulprüfungen und die humorvollen und alltagsnahen Vorlesungen zur Lebensmittelchemie.

Bei Dr. Dörte Solle möchte ich mich für die Betreuung meines Projektes bedanken. Auch wenn viele Ideen spontan entstanden sind, hattest Du immer ein offenes Ohr für neue Ansätze. Du forderst uns heraus, selbstbewusst für unsere Ideen einzustehen und nimmst uns an die Hand, wenn wir mal nicht weiterwissen. Auch Dir liegt neben der fachlichen Betreuung das Miteinander im Team am Herzen, sodass Du mit uns jedes Jahr ein neues spannendes Event ausprobierst, an das man sich gerne erinnert.

Da man gerade am Anfang der Promotion manchmal noch etwas hilflos durch die Labore schreitet, sind hilfsbereite Wissenschaftliche Mitarbeiter, eine blitzschnelle Werkstatt und ein freundliches Gesicht in der Verwaltung goldwert. Ein großes Dankeschön daher an Martina Weiss, Martin Pähler, Dr. Frank Stahl, Torsten Stempel, Friedbert Gellermann, Thorleif Hentrop, Dr. Ivo Havlik, Ferdinand Lange,

Ulrike Dreschel, Christiane Hellwig, Dr. Iliyana Pepelanova und alle weiteren helfenden Hände. Dr. Antonina Lavrentieva danke ich außerdem für die inspirierenden fachlichen und außerfachlichen Gespräche und das traditionelle Keksebacken im Advent.

Das TCI wäre ohne seine Doktorand*Innen nur halb so Spaßig und besonders als Kellermeister ist man ohne Hilfe aufgeschmissen. Vielen lieben Dank an alle, die mir in den letzten Jahren beim Kistenschleppen und Organisieren zur Hand gegangen sind. Das Motto „Viele Hände, schnelles Ende“ habt ihr euch wirklich zu Herzen genommen und ich bin froh, dass ich euch kennenlernen durfte!

Ein besonderer Dank gilt meinem vergangenen und jetzigen Büro: Johanna, Louis, Steffen, Nicolas sowie Flo, Daniel und Tammy, ihr habt das Laborchaos erträglich gemacht. Auf euch kann man immer zählen!

Ole, danke für die hervorragende Musik beim Laborputz und dass Du immer Entspannung in unser Upstream-Dreamteam bringst. Katha, Michi und Anton danke ich für die Geduld während der Langzeitkooperationen und die exzellenten problem-solving skills zu jeder Tageszeit. Taieb, Marline, Carlotta, Chris, Pia, Ina, Torsten, Lisa, Tessa, Kimia und Marc, euch will ich natürlich auch nicht vergessen. Danke, dass ihr das Leben außerhalb der Arbeit mit so viel Freude und Humor und auch ein paar Feierabendgetränken erfüllt habt.

Ein ganz großes Dankeschön gilt natürlich auch meiner Familie. Danke, dass ihr mir mein Studium ermöglich und zu jeder Zeit meinen Rücken gestärkt habt. Ohne eure liebevolle Unterstützung und euer offenes Ohr wäre ich nicht, wo und wer ich jetzt bin.

Last but not least möchte ich mich bei Tobi bedanken. Danke für deine bedingungslose Unterstützung bei den nicht enden wollenden Kultivierungen und den unerwarteten Nachtschichten. Du machst das Leben jeden Tag ein bisschen leichter und meine Welt ein bisschen bunter.

Unterstützende Arbeiten

Kooperation

Die untersuchte Zelllinie (CHO DG44) wurde im Rahmen einer Kooperation von Sartorius bereitgestellt. Zusätzlich waren an der Implementierung der 3D-gedruckten Separationsspirale und der Flussratenüberwachung neben dem Autor der vorgelegten Dissertation folgende Personen beteiligt:

M. Sc. Anton Enders und M. Sc. Michaela Dehne: Design, Aufarbeitung und Optimierung der Zellseparationssystems

M. Sc. Ferdinand Lange: Programmierung der webgesteuerten Flussratenüberwachung

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

Bachelorarbeit:

Marcel Demiral: *Prozessoptimierung einer Perfusionskultur anhand von Bioprozessmodellen*, März-Juni 2021, Teilergebnisse wurden für die Anpassung des Bioprozessmodells in Abschnitt 4.2 und Anhang 6.2.3 verwendet.

Publikationsliste

Veröffentlichungen (chronologisch)

Böhl, O.J.; **Schellenberg, J. (10 %)**; Bahnemann, J.; Hitzmann, B.; Scheper, T. et al.: *Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process*. Engineering in Life Sciences 21 (2020), Nr. 3-4, S. 196-207, DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.202000056>

Meyer, K.V.; Siller, I.G.; **Schellenberg, J. (10 %)**; Gonzalez Salcedo, A.; Solle, D. et al.: *Monitoring cell productivity for the production of recombinant proteins by flow cytometry: An effective application using the cold capture assay*. Engineering in Life Sciences 21 (2021), Nr. 5, S. 288-293, DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.202000049>

Schellenberg, J. (75 %); Nagraik, T.; Wohlenberg, O.J.; Ruhl, S.; Bahnemann, J.; Scheper, T.; Solle, D.; *Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells*, Engineering in Life Sciences 22, (2022), Nr. 5, S427-436, DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.202100062>

Wohlenberg, O. J., Kortmann, C., Meyer, K. V., **Schellenberg, J. (5 %)**, Dahlmann, K., Bahnemann, J., Scheper, T., Solle, D. *Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles*. Eng Life Sci. (2022); 1– 11, <https://doi.org/10.1002/elsc.202100172>

Schellenberg J. (50 %); Dehne M. et al.: *Establishment of a Perfusion Process with CHO cells using a 3D-printed Cell Separator Spiral and a semi-automatic flow control*, in Vorbereitung

Vorträge

Schellenberg, J.; Solle, D.; Scheper, T.; *How stress can induce productivity in mammalian cells*, 13. Interdisziplinäres Doktorandenseminar (1. Platz Vortragspreis), Arbeitskreis Prozessanalytik, Berlin, 2019

Schellenberg, J.; Solle, D.; Scheper, T.; *Auswirkungen einer CO₂-Limitierung auf die zellspezifische Produktivität in CHO-Zellen*, Karl-Schügerl-Preisverleihung, Hannover, 2019

Posterbeiträge

Schellenberg, J.; Nagraik, T.; Bahnemann, J.; Solle, D.; Scheper, T.; *Impact of stress on the productivity in mammalian cells*, 4. Niedersachsen-Israel Konferenz, Hannover, 2019

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Jana Schellenberg
Geburtsdatum/-ort: 08.07.1995, Langenhagen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 01/2019 Promotion, Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover
Inkl. Stipendium des Programms "New Concepts in
Chemical Engineering" (01/2019-01/2021)

10/2016-09/2018 Masterstudium, M. Sc. im Fach Life Science
Leibniz Universität Hannover

10/2013-11/2016 Bachelorstudium, B.Sc. im Fach Life Science
Leibniz Universität Hannover

2005-2013 Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Neustadt, Neustadt am Rübenberge

Berufliche Erfahrungen

Seit 01/2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Technische
Chemie, Leibniz Universität Hannover

10/2016-03/2018 Hilfwissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für
Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

02/2017-03/2017 Internationales Forschungspraktikum,
Technion, Haifa