

Entwicklung eines QbD-Konzepts für einen biopharmazeutischen Antikörper-Herstellungsprozess

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Ole Jacob Wohlenberg, geb. Böhl, M. Sc.

2023

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

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. habil. Thomas Becker

Tag der Promotion: 21.06.2023

„Hakuna Matata“

- The Lion King

Kurzfassung

Monoklonale Antikörper gewinnen aufgrund ihrer vielseitigen Anwendungsbereiche immer weiter an Relevanz. Sie werden sowohl in der Diagnostik als auch in therapeutischen Maßnahmen eingesetzt und machen bereits den Großteil der biotechnologisch produzierten Biopharmaka aus. Um die Herstellungsprozesse neuer Antikörper systematisch hinsichtlich der Prozess- und Produktqualität zu verbessern, soll der *Quality by Design* Ansatz in die biopharmazeutische Forschung und Industrie integriert werden. Dabei mangelt es jedoch weiterhin an Modellprozessen für die praktische Implementierung über eine ganzheitliche Prozesskette. In der vorliegenden Dissertation wurde der *Upstream*-Prozess in einzelne Prozessschritte eingeteilt und anhand der *Quality by Design* Prinzipien charakterisiert. Dafür wurden zunächst kritische Prozessparameter und Qualitätsattribute der einzelnen Prozessschritte identifiziert. Anschließend wurden die Parametereffekte- und Interaktionen mithilfe von statistischen Versuchsplänen analysiert und ein robuster *Design Space* etabliert.

Im ersten Teil wurde die Vorkultur als kritischer Teil des Herstellungsprozesses eingestuft. Dabei wurden die Einflüsse der Parameter auf Qualitätsattribute der Vorkultur und des nachfolgenden Prozesses analysiert. Als Schlüsselparameter wurden die Passagendauer und die viable Zelldichte der Passagen identifiziert.

Während der *Quality by Design* Integration in den Produktionsprozess wurden zunächst prozessbezogene Qualitätsattribute untersucht, wobei der pH-Wert des Kulturmediums und die initiale Zelldichte als kritische Parameter festgestellt wurden. Die Bioaktivität des produzierten Antikörpers zeigte innerhalb des charakterisierten Bereiches jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Im dritten Teil wurde die Zellabtrennung als Bindeglied zum *Downstream*-Prozess analysiert. Die Viabilität wurde als Schlüsselparameter mit großem Einfluss auf prozessbezogene Verunreinigungen identifiziert. Die etablierten Design Spaces definierten hohes Zellwachstum und Zellerhaltung bei optimaler Antikörperproduktion als Ziel der Prozessführung und -Kontrolle.

Schlagwörter: Monoklonaler Antikörper, CHO-Zellen, Tierzellkultivierung, Quality by Design, Design of Experiments, Design Space

Abstract

Monoclonal antibodies are becoming increasingly relevant due to their versatile areas of application. They are used in diagnostics as well as in therapeutic measures and already account for the majority of biotechnologically produced therapeutics. In order to systematically improve the manufacturing processes of new therapeutic antibodies in terms of process and product quality, the Quality by Design approach is to be integrated into biopharmaceutical research and industry. However, there is still a lack of model processes for practical implementation across a holistic process chain. In this dissertation, the manufacturing process of a monoclonal antibody was characterized. The focus was on the application of quality by design principles in different sub-steps of the upstream process.

In the first part, the inoculum expansion was studied and classified as a critical part of the production process. The influences of the parameters on quality attributes of the preculture and the subsequent production process were analyzed. Passage duration and viable cell density of passages were identified as key parameters.

The second part describes the Quality by Design integration into the production process. Process-related quality attributes were first investigated, with the pH of the culture medium and the initial cell density found to be critical parameters. In contrast, the bioactivity of the produced antibody showed no significant changes within the characterized range.

In the third part, cell separation was analyzed as a link to the downstream process. The viability was identified as a key parameter with major influence on process-related impurities. The established design spaces defined high cell growth and cell maintenance with optimal antibody production as the goal of process analysis and control.

Keywords : Monoclonal antibody, CHO-cells, mammalian cell culture, Quality by Design, Design of Experiments, Design Space

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretische Grundlagen	3
3.1 Antikörper	3
3.1.1 Anwendung monoklonaler Antikörper	5
3.2 Produktion monoklonaler Antikörper	7
3.2.1 Upstream-Prozess	9
3.2.2 Downstream-Prozess	12
3.3 Qualitätskontrolle	13
3.3.1 Bioaktivitätsassay	14
3.4 Quality by Design	16
3.4.1 Design of Experiments	19
4 Experimenteller Teil	24
4.1 Implementierung von QbD Strategien in die Vorkultur eines mAb- Herstellungsprozesses	25
4.2 Optimierung eines mAb-Produktionsprozesses im Hinblick auf Robustheit und Produktqualität mithilfe von Quality by Design Prinzipien	39
4.3 Anwendung von QbD Strategien zur Untersuchung des Einflusses der Zellviabilität und -Dichte auf die Zellabtrennung eines monoklonalen Antikörpers	53

5	Zusammenfassung und Ausblick	65
6	Literaturverzeichnis	69
	Anhang	82
	Unterstützende Angaben	82
	Supporting Information - Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process	82
	Supporting information – Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles	84
	Supporting information – Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal	85
	Betreute Abschlussarbeiten	87
	Danksagung	88
	Curriculum Vitae	90
	Publikationsliste	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1	Struktureller Aufbau eines IgG-Antikörpers mit schematischer Glykosylierung	4
Abbildung 3.2	Schematischer Ablauf eines mAb-Herstellungsprozesses, aufgeteilt in den <i>Upstream</i> - und <i>Downstream</i> -Prozess	8
Abbildung 3.3	Schematischer Verlauf der Viabilität (rot), Substratkonzentration (gelb), VCD (braun) und Produktkonzentration (blau) in einem Fed-Batch Prozess. Wachstumsphasen sind unterteilt in lag-Phase (1), exponentielles Wachstum (2), stationäre Phase (3) und Absterbephase (4)	10
Abbildung 3.4	Schematische Durchführung des Bioaktivitätsassays mit Positivkontrolle (1), Negativkontrolle (2) und bindungsbasiertem Assay (3)	15
Abbildung 3.5	Theoretischer Ablauf der Quality by Design Strategie (A), Visuelle Darstellung des Design Space mit dazugehörigen Bereichen (B)	18
Abbildung 3.6	Schematische Darstellung des COST Ansatzes	19
Abbildung 3.7	Varianten des <i>Central Composite Designs</i>	21
Abbildung 3.8	Design of Experiments Versuchsplan mit dreidimensionalem CCF Design und zugehörigem theoretischen Effektplot mit Faktoreffekten/-Interaktionen und quadratischen Effekten	22
Abbildung 4.1	<i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript „ <i>Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process</i> “	25
Abbildung 4.2	<i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript „ <i>Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using Quality by Design principles</i> “	39
Abbildung 4.3	<i>Graphical abstract</i> zu dem Manuskript „ <i>Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies</i> “	53

Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustausch-Chromatographie (<i>engl. anion exchange chromatography</i>)
CCC	<i>Central Composite Circumscribed</i>
CCD	<i>Central Composite Design</i>
CCF	<i>Central Composite Face centered</i>
CCI	<i>Central Composite Inscribed</i>
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region (<i>engl. complementary determining region</i>)
CEX	Kationenaustausch-Chromatographie (<i>engl. cation exchange chromatography</i>)
CH2	Zweite konstante Region der schweren Kette
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIEF	Kapillare isoelektrische Fokussierung (<i>engl. capillary isoelectric focussing</i>)
COST	<i>Changing One Single variable at a Time</i>
COVID-19	Coronaviruskrankheit-2019 (<i>engl. coronavirus disease 2019</i>)
CPPs	Kritische Prozessparameter (<i>engl. critical process parameters</i>)
CPT	Camptothecin
CQAs	Kritische Qualitätsattribute (<i>engl. critical quality attributes</i>)
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. desoxiribonucleic acid</i>)
DoE	<i>Design of Experiments</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>

EVD	Ebolafieber (<i>engl. ebola virus disease</i>)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FMEA	<i>Failure Mode and Effect Analysis</i>
HAMA	Humaner anti-Maus Antikörper (<i>engl. human anti-mouse antibody</i>)
HC	Schwere Kette (<i>engl. heavy chain</i>)
HCPs	Wirtszellproteine (<i>engl. host cell proteins</i>)
ICH	<i>International Conference of Harmonisation</i>
L929-Zellen	Adhärente Mausfibroblasten
LC	Leichte Kette (<i>engl. light chain</i>)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>engl. monoclonal antibody</i>)
MTX	Methotrexat
MVDA	Multivariate Datenanalyse (<i>engl. multivariate data analysis</i>)
QbD	Quality by Design
QTPP	Prozess/Produktqualitätsprofil (<i>engl. quality target product profil</i>)
RPN	Risikoprioritätsnummer (<i>engl. risk priority number</i>)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR-1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
VCD	Viable Zelldichte (<i>engl. viable cell density</i>)

1 Einleitung

„Begin with the end in mind“

Eine der sieben Gewohnheiten hocheffektiver Menschen, erdacht von Stephen R. Covey, beschreibt nicht nur einen Grundsatz für erfolgreiche persönliche und berufliche Entwicklung eines einzelnen Menschen¹, sie definiert auch auf prägnante Weise den grundlegenden Gedanken des *Quality by Design* (QbD) Prinzips. Dieses wird seit einigen Jahren in vielen Bereichen der biopharmazeutischen Forschung und Produktion eingesetzt^{2,3}. In diesem Zusammenhang wächst vor allem die Bedeutung der monoklonalen Antikörper (mAb, *engl. monoclonal antibodies*) als vielseitige Diagnostika und Therapeutika stetig⁴. Aktuelle Berechnungen schätzen die jährlichen Gesamtmarkteinahmen auf über 300 Milliarden US\$ bis zum Jahr 2025^{5,6}. Aufgrund weitreichender Fortschritte steigen die Möglichkeiten der medizinischen Anwendung von mAbs rasch an. Anwendungsbereiche umfassen die Behandlung von Krebserkrankungen sowie von neuartigen Infektionskrankheiten wie dem Ebolafieber (EVD, *engl. ebola virus disease*) oder der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19, *engl. coronavirus disease 2019*)⁷⁻¹⁰.

Um die beschleunigte Zulassung und Bereitstellung neuer therapeutischer Antikörper zu ermöglichen, sind schnelle Strategien zur Produkt- und Prozessentwicklungen notwendig, die innerhalb der kontrollierten Produktionskette höchste Qualitätsstandards gewährleisten. Zur Umsetzung dieser steigenden Anforderungen wurde der QbD Ansatz implementiert, welcher darauf ausgelegt ist, Prozesse systematisch zugunsten der Prozess- und Produktqualität, regulatorischen Konformität und Einsparungen der Produktionskosten zu optimieren¹¹. Der Fokus liegt dabei auf der Planung und Entwicklung eines Prozesses im Hinblick auf die Einhaltung spezifischer Qualitätsattribute der entsprechenden Prozessschritte und des Produktes. Dadurch wird die Qualität nicht erst am Ende eines Prozesses getestet, sondern kann systematisch in den Prozess und das Produkt integriert werden¹². Es wird ein tiefgehendes Verständnis zwischen dem Prozess und Produkt geschaffen, welches optimierte Strategien zur Prozessüberwachung und Kontrolle ermöglicht. Trotz der weitreichenden Möglichkeiten von QbD im biopharmazeutischen Umfeld sind Anwendungsbeispiele der Integration in die gesamte Prozesskette der Antikörperproduktion bisher sehr limitiert¹³.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Herstellungsprozesses eines monoklonalen Antikörpers. Dabei liegt der Fokus auf der Implementierung des *Quality by Design* Grundsatzes in den *Upstream*-Prozess. Dieser lässt sich in die folgenden Teilschritte unterteilen: Die Vorkultur, den Produktionsprozess und die abschließende Zellabtrennung.

Dabei sollen die Prozessschritte zunächst isoliert betrachtet werden, wobei wichtige Qualitätsattribute auch über die Grenzen der einzelnen Schritte hinweg zu analysieren sind. Dadurch soll ein ganzheitliches Prozessverständnis für die Interaktion von Parametern mit der Prozess- und Produktqualität hergestellt werden. Das Ziel ist somit die Etablierung eines *Design Space* für die einzelnen Prozessschritte, als robusten Arbeitsbereich mit definierten Zielgrößen.

Dafür sollen im Rahmen einer Risikoanalyse zunächst kritische Prozessparameter (CPPs, *engl. critical process parameters*) identifiziert werden. Für die einzelnen Prozessschritte werden darüber hinaus intermediäre und produktbezogene Qualitätsattribute (CQAs, *engl. critical quality attributes*) definiert. Der Einfluss der CPPs auf die entsprechenden CQAs soll mithilfe des *Design of Experiments* (DoE) Ansatzes untersucht werden. Mittels multivariater Datenanalyse (MVDA, *engl. multivariate data analysis*) soll anschließend ein Regressionsmodell entwickelt werden, welches die experimentellen Daten beschreibt. Durch die systematische Variation mehrerer Faktoren im experimentellen Design lassen sich dabei sowohl die Parametereffekte als auch Interaktionen zwischen den Faktoren identifizieren.

Zur Beurteilung der Prozessqualität sollen verschiedene prozessbezogene Qualitätsattribute untersucht werden. Diese umfassen auf zellulärer Ebene die Wachstumsrate, die Viabilität und die Zelldichte. Für den Produktionsprozess und die Zellabtrennung sollen zusätzlich der Antikörpertiter und Verunreinigungen wie Wirtszellproteine (HCPs, *engl. host cell proteins*) und verbliebene Desoxyribonukleinsäuren (DNA, *engl. desoxyribonucleic acid*) analysiert werden. Die Produktqualität soll darüber hinaus anhand eines zellbasierten Bioaktivitätsassays über die Antigen-Inaktivierung durch den produzierten Antikörper bewertet werden.

3 Theoretische Grundlagen

Zur Beschreibung der Produktqualität muss der hergestellte Antikörper im Hinblick auf die Funktion, den Aufbau und mögliche Anwendungsbereiche charakterisiert werden. Um produktionsbezogene Qualitätsattribute untersuchen zu können muss der Herstellungsprozess genau beschrieben und gezielte Experimente systematisch geplant werden. Zusätzlich sind zur Interpretation der Ergebnisse methodische Kenntnisse über die einzelnen Schritte des *Quality by Design* Konzepts notwendig.

3.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind Glykoproteine aus der Klasse der Globuline und wichtige Vermittler der erworbenen Immunantwort. Sie werden als Reaktion von Plasmazellen auf bestimmte Fremdstoffe oder Krankheitserreger gebildet. Dabei bindet der Antikörper spezifisch an das jeweilige Antigen auf der Oberfläche des Fremdkörpers und löst damit die Immunreaktion aus¹⁴. Es wird zwischen zwei Arten, den polyklonalen- und monoklonalen Antikörpern unterschieden. Natürliche polyklonale Antikörper werden bei der Reaktion des Immunsystems von unterschiedlichen B-Lymphozyten gebildet und binden mehrere Epitope eines Antigens. Pharmazeutisch verwendete mAbs hingegen werden von einem einzelnen immortalisierten B-Zellklon hergestellt und sind damit gegen ein einzelnes Epitop gerichtet. Damit bieten mAbs den Vorteil, bestimmte Zielmoleküle noch spezifischer binden zu können, wodurch eine Vielzahl diagnostischer und therapeutischer Anwendungen ermöglicht wird¹⁵.

Im Folgenden wird hauptsächlich die Klasse Immunglobulin G (IgG) beschrieben, welche als ca. 150 kDa große Monomere überwiegend im Serum vorliegen und eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Viren und Bakterien spielen^{16,17}. Der strukturelle Aufbau eines IgG-Antikörpers ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

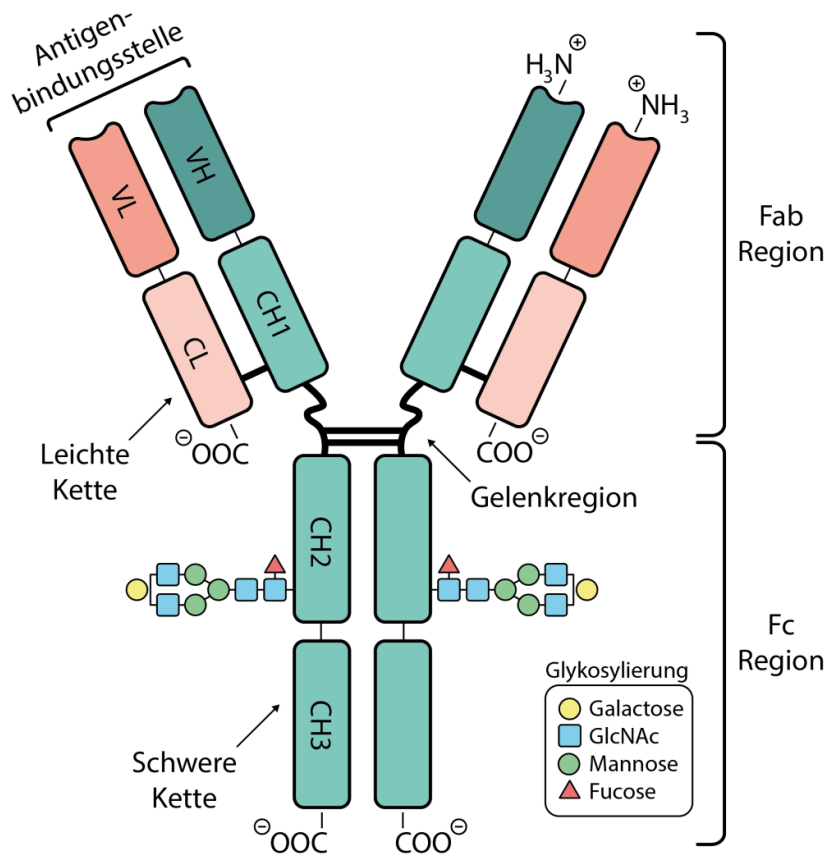


Abbildung 3.1 Struktureller Aufbau eines IgG-Antikörpers mit schematischer Glykosylierung

Die hohe Heterogenität von Antikörpern lässt sich durch ihre strukturelle Zusammensetzung erklären. In der Regel setzen sich Antikörper aus zwei schweren Ketten (HC, *engl. heavy chains*) und zwei leichten Ketten (LC, *engl. light chains*) zusammen, welche über kovalente Disulfidbrücken zu einer Y-Form verbunden sind. Die HC und die LC sind jeweils in variable und konstante Domänen unterteilt, wobei die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette gemeinsam die Antigenbindungsstelle darstellen. Dieses sogenannte Paratop ist für den jeweiligen Antikörper spezifisch, während die konstanten Regionen bei allen Antikörpern einer Klasse gleich aufgebaut sind und der Signalweiterleitung dienen. Man unterscheidet zwischen fünf verschiedenen Klassen von Antikörpern, deren konstante Region jeweils für die Interaktion mit bestimmten Rezeptoren und Proteinen des eigenen Komplementsystems spezialisiert ist, um gezielte Immunreaktionen auslösen zu können^{18–20}.

Zusätzlich zu dem beschriebenen Aufbau weisen die beiden schweren Ketten zwei besondere Attribute auf. Gemeinsam bilden sie eine flexible, zwölf Aminosäuren lange Gelenkregion, welche die Drehbarkeit und Flexibilität des Antikörpers erhöht^{20,21}. Außerdem bindet die zweite konstante Region (CH2) in Säugerzellen post-translational eine Oligosaccharid-Gruppe, die je nach addierten Zuckerresten verschiedene Glykoformen aufweisen kann. Dabei ist das Glykosylierungsmuster abhängig von dem antikörperproduzierenden Zelltypen sowie von möglichen Variationen im Produktionsprozess²². Eine der typischen Variationen bei IgGs sind die Glykoformen G0F, G1F und G2F, welche die Galactosylierungsanzahl der Zuckerkette beschreiben²³. Diese Glykosylierungen beeinflussen die Zytotoxizität des Antikörpers und tragen maßgeblich zur bioaktiven Funktionalität bei. Darüber hinaus wirken sich verschiedene Glykoformen auf die Stabilität, Löslichkeit und Konformation des Antikörpers aus^{22,24}.

3.1.1 Anwendung monoklonaler Antikörper

Der Aufbau der mAbs und die damit verbundene Spezifität für verschiedenste *targets* ermöglichen vielseitige Anwendungsbereiche. Diese umfassen sowohl experimentelle und diagnostische Verfahren, als auch therapeutische Maßnahmen^{5,25-28}. In der Labordiagnostik wird die Antikörper-Antigen-Bindung mit detektierbaren Liganden genutzt, wodurch spezifische Antigene nachgewiesen und quantifiziert werden können. Dafür werden radioaktive Isotope, Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme, welche bestimmte Farbreaktionen katalysieren, verwendet²⁹. Diese Methoden finden unter anderem bei *Western Blots*, *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) und Antikörper *Microarrays* Anwendung³⁰⁻³⁴.

Anfänglich wurden Antikörper hauptsächlich über die gezielte Immunisierung von Mäusen hergestellt. Der Einsatz im humantherapeutischen Bereich war aufgrund unerwünschter Immunreaktionen gegen die verwendeten murinen Antikörper zunächst jedoch nicht erfolgreich^{27,35}. Diese murinen Antikörper werden im menschlichen Organismus durch den humanen anti-Maus Antikörper (HAMA, *engl. human anti-mouse antibody*) selbst als Antigen erkannt, aktivieren damit das Immunsystem und sind somit für die Therapie ungeeignet. HAMA bindet dabei hauptsächlich an die konstante Region des murinen Antikörpers³⁶.

Zur standardisierten Herstellung von mAbs wurde die Hybridomtechnologie entwickelt, bei der entartete Lymphozyten mit antikörperbildenden Lymphozyten hybridisiert werden. Die entstandene Fusionszelle wird als Hybridomazelle bezeichnet und kombiniert die dauerhafte Teilungsfähigkeit mit hoher Antikörperproduktion, wodurch Antikörper in Laborkulturen produziert werden können^{37,38}. 1984 wurden chimäre Antikörper entwickelt, welche die humanen konstanten Regionen mit variablen Regionen der Maus kombinieren³⁹. Dadurch wird eine verbesserte Interaktion mit den humanen Zellen des Komplementsystems ermöglicht und die problematische Immunogenität verringert. Für einen zuverlässigen Einsatz im therapeutischen Bereich reichte diese Anpassung jedoch nicht aus, da mit der variablen Region noch 30 % murine Sequenz vorliegen, welche weiterhin unerwünschte Immuneffekte hervorrufen kann. Um auch diese zu überwinden wurden in den darauffolgenden Jahren humanisierte Antikörper entwickelt, welche nur die komplementaritätsbestimmende Region (CDR, *engl. complementary determining region*) der variablen Domäne aus der Maus enthalten⁴⁰. Jedoch kann auch die Humanisierung die Möglichkeit einer Immunreaktion nicht ausschließen, da der Erfolg und Grad der Humanisierung von den einzelnen Antikörpern abhängt. Außerdem sind die CDRs humanisierter Antikörper, welche den größten Teil der Antigen-Interaktion vermitteln, weiterhin nicht menschlichen Ursprungs⁴¹.

In der heutigen therapeutischen Anwendung werden daher vorwiegend vollständig humane Antikörper eingesetzt, da sie von den körpereigenen Antikörpern nicht unterscheidbar sind und damit das geringste Risiko der Immunogenität aufweisen⁴². Allerdings erfordert der Einsatz von humanen Antikörpern neue Verfahren, da die herkömmliche Immunisierungs- und Hybridomtechnologie nicht immer auf menschliche Spender übertragen werden konnte. Bei *in vitro* Selektionsverfahren wie dem *Antikörper-Phagen-Display* besteht im Gegensatz dazu keine Abhängigkeit von der *in vivo* Immunreaktion des Spenderorganismus⁴³⁻⁴⁵. Dieser Ansatz erlaubt die Identifikation von Antikörpern gegen fast jede Art von Antigenen und ein breites Spektrum an Epitopen. Dabei werden Antikörperfragmente oder gesamte Proteine auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert, um anschließend einen korrespondierenden Bindepartner zu identifizieren. Aus den so isolierten Phagen können daraufhin die zugehörigen Antikörpergene isoliert und sequenziert werden⁴³⁻⁴⁵.

Adalimumab wurde als erster humaner Antikörper aus *Antikörper-Phagen-Display* hergestellt und durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Dieser bindet und inaktiviert den 17 kDa großen Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), welcher in erhöhten Konzentrationen eine Vielzahl von immunvermittelten Erkrankungen wie Morbus Crohn und rheumatoide Arthritis auslöst⁴⁶⁻⁴⁸.

Es besteht demnach ein enger Zusammenhang zwischen dem Aufbau und der Funktion der eingesetzten Antikörper, vor allem im Hinblick auf die Verträglichkeit sowie die Wirksamkeit in der therapeutischen Anwendung.

3.2 Produktion monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper werden heutzutage meist ausschließlich in rekombinanten Säugerzellen produziert. Diese sind in der Lage die produzierten Antikörper post-translational zu modifizieren. Somit addierte humanähnliche Glykosylierungen optimieren die Pharmakodynamik und ermöglichen den erfolgreichen Einsatz in der Humanmedizin⁴⁹. Zu den dabei meistverwendeten Zelllinien gehören die *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen mit mutationsbedingter Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Defizienz, welche die Selektion von transfizierten Zellen vereinfacht. Bei der Verwendung von Expressionsvektoren, welche das DHFR-Gen und das zu exprimierende Gen enthalten, wird die Selektion mit dem zytotoxischen Medikament Methotrexat (MTX), einem kompetitiven Inhibitor von DHFR, ermöglicht. CHO Zellen wurden 1957 aus den Ovarienzellen eines chinesischen Zwerghamsters isoliert und können als Suspensionszellen in serumfreiem Medium mit hohen Zelldichten von bis zu mehreren 100 mio Zellen/mL kultiviert werden⁵⁰⁻⁵³. Zusätzlich weisen CHO Zellen eine hohe genetische Stabilität und stabile Expressionsraten für heterologe Konstrukte auf und sekretieren die produzierten mAbs in das Kulturmedium, wodurch die Produktaufarbeitung vereinfacht wird. Damit eignen sich diese Zellen optimal zur schnellen Generierung hoher Antikörpertiter^{54,55}.

Als energetische Kohlenstoffquelle für Zellwachstum/-Teilung und Erhaltung der Zellen, sowie die Produktion rekombinanter Proteine verstoffwechseln CHO Zellen Glukose. Diese wird darüber hinaus zu einem Teil über Pyruvat zu Lactat konvertiert, welches in das Kulturmedium sekretiert wird. Die Umwandlung zu Lactat dient im Gegensatz zur vollständigen Oxidation von Glukose zu Wasser und CO₂ weniger der Bildung von ATP, sondern hauptsächlich der Regenerierung von NAD⁺ aus NADH⁵⁶. Eine Anreicherung von Lactat im Medium führt zu einer Absenkung des pH-Wertes und kann bei hohen Konzentrationen zellschädigend wirken. Bei verringerter Verfügbarkeit von Glukose sind CHO Zellen in der Lage ihren Stoffwechsel auf Lactatverbrauch umzuschalten, wobei Lactat über Pyruvat in den Citrat-Zyklus eingebracht wird⁵⁷. Als Stickstoffquelle werden während der Kultivierung meist Aminosäuren wie Glutamin verwendet, welches zusätzlich einen Einfluss auf den Lactatstoffwechsel der Zellen hat. So wird nach dem Verbrauch von Glutamin und ausreichender Glucose- und Glutamatverfügbarkeit ebenfalls auf Lactatverbrauch umgeschaltet, bis die Glucosezugabe den Bedarf stark übersteigt oder die Glutaminkonzentration wieder ausreichend ansteigt.⁵⁸⁻⁶⁰

Der Herstellungsprozess von mAbs lässt sich in den *Upstream*- und den *Downstream*-Prozess unterteilen. Dabei beschreibt der *Upstream*-Prozess die Kultivierung der Zellen, während der *Downstream*-Prozess die Aufreinigung des produzierten Antikörpers umfasst⁶¹. Der Ablauf des Herstellungsprozesses ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

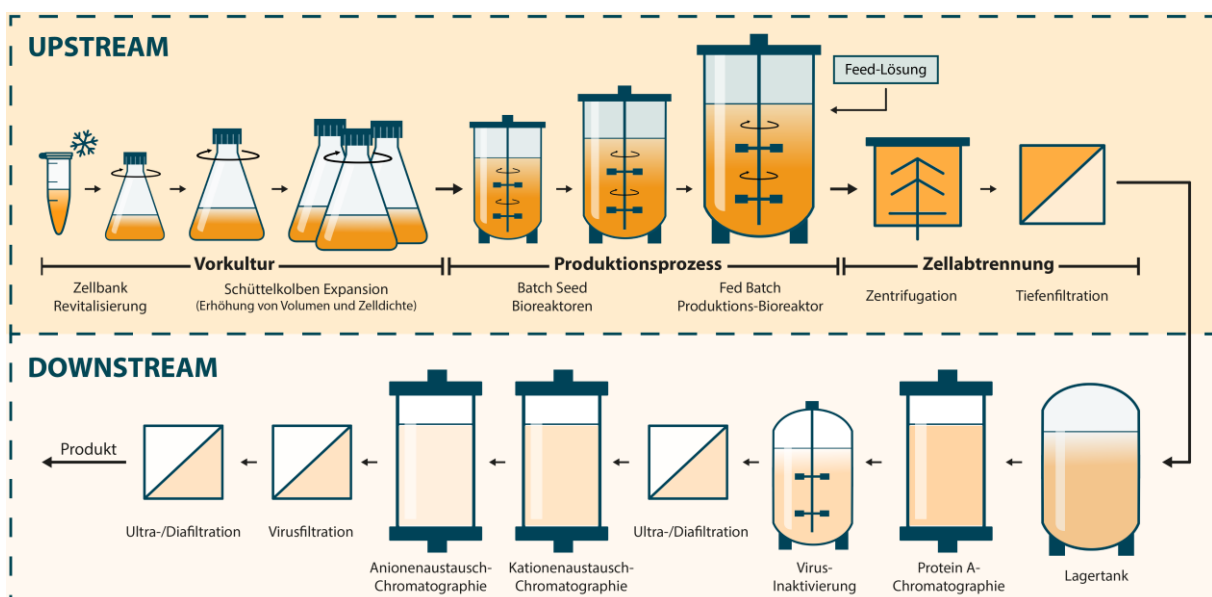


Abbildung 3.2 Schematischer Ablauf eines mAb-Herstellungsprozesses, aufgeteilt in den Upstream- und Downstream-Prozess

3.2.1 *Upstream*-Prozess

Der *Upstream*-Prozess der mAb Produktion lässt sich wiederum in drei wesentliche Schritte unterteilen: Die Vorkultur, den Produktionsprozess und die Zellabtrennung. Zunächst werden Zellen aus kryokonservierten Zellbanken revitalisiert und in der Vorkultur expandiert. Im industriellen Maßstab werden die Zellen dafür über mehrere Passagen kultiviert und in aufsteigend größere Kultivierungssysteme überführt um eine ausreichende Gesamtzellzahl für die Inokulation des Produktionsbioreaktors zu generieren^{62,63}. Zusätzlich wird dem Medium in den ersten Passagen meist MTX zugegeben, welches in geringen Konzentrationen als Selektionsmarker der transfizierten Gene wirkt und hochexprimierende Zellen isoliert^{64,65}. Für die Etablierung von Prozessen und die Untersuchungen im Laborumfeld wird die Vorkultur meist in Schüttelkolben durchgeführt, da hier nur ein geringes Inokulationsvolumen nötig ist.

Für den Produktionsprozess werden überwiegend Rührkesselreaktoren verwendet, da diese eine gleichmäßige Durchmischung sowie zuverlässige Regelung von Temperatur und Begasung ermöglichen. Durch die Begasung mit Sauerstoff (O₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) können Parameter wie die Gelöstsauerstoffkonzentration und der pH-Wert des Mediums geregelt werden^{55,62,66}. Während industrielle Produktionsprozesse traditionell in großen Edelstahlreaktoren mit Arbeitsvolumen von mehreren tausend Litern durchgeführt werden, finden in der Prozessentwicklung und -Optimierung im Laborumfeld meist Schüttelkolben und kleinere *single-use* Bioreaktoren Anwendung⁶⁷. Diese vereinfachen die Prozessvorbereitung und führen somit zu Zeit- und Kosteneinsparungen. Außerdem erlauben sie die Durchführung mehrerer zeitgleicher Kultivierungen und ermöglichen somit komplexere Untersuchungen der Prozessparametereinflüsse. So können im Ambr®15 Mikrobioreaktorsystem beispielsweise 24 Kultivierungsvessel mit einem Arbeitsvolumen von nur 13 mL parallel betrieben und separat kontrolliert werden. Dabei werden die Gelöstsauerstoffkonzentration und der pH-Wert photometrisch über Sensorspots am Boden der Reaktorgefäße gemessen. Über eine Software werden sowohl die Temperatur als auch die Begasung geregelt, sowie die Probennahme und Zugabe der Feed-Lösungen automatisiert^{68,69}.

Zur Intensivierung des Produktionsprozesses und der Optimierung des mAb Titers werden die Bioreaktoren heutzutage meist im Zufütterungssatzbetrieb (*engl. Fed Batch*) betrieben^{55,70,71}. Der schematische Verlauf eines *Fed-Batch* Prozesses im Bezug auf die viable Zelldichte (VCD, *engl. viable cell density*) und Viabilität der Zellen, sowie die Konzentration an Substrat und Produkt ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

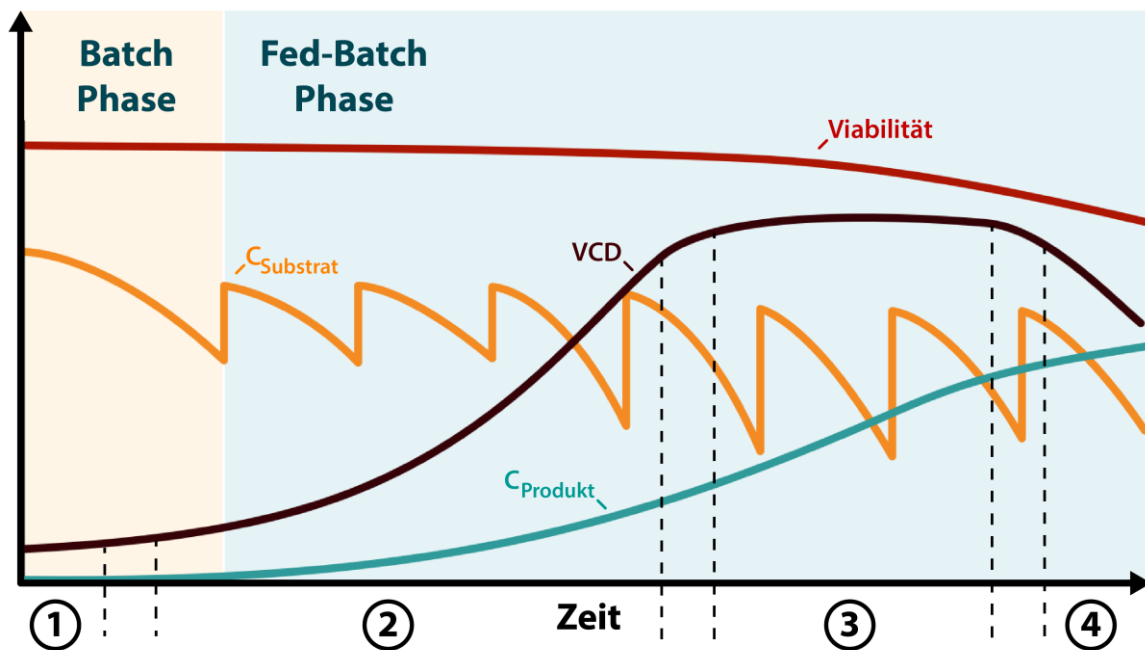


Abbildung 3.3 Schematischer Verlauf der Viabilität (rot), Substratkonzentration (gelb), VCD (braun) und Produktkonzentration (blau) in einem *Fed-Batch* Prozess. Wachstumsphasen sind unterteilt in lag-Phase (1), exponentielles Wachstum (2), stationäre Phase (3) und Absterbephase (4)

Im Bezug auf das Zellwachstum lässt sich ein *Fed-Batch* Prozess in vier Hauptphasen einteilen. Zu Beginn des Produktionsprozesses akklimatisieren sich die Zellen an die Umgebungsbedingungen und zeigen dabei nur geringes Wachstum (Abbildung 3.3, 1). Im Anschluss an diese kurze lag-Phase beginnt das exponentielle Zellwachstum (Abbildung 3.3, 2). Im Verlauf des Prozesses werden Substrate verbraucht, während inhibitorische Stoffe im Medium akkumulieren. Aufgrund dieser Effekte stellt sich zunächst ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Zellsterben ein, die stationäre Phase (Abbildung 3.3, 3), bevor die Limitierungen überwiegen und der Prozess in der Absterbephase beendet wird (Abbildung 3.3, 4).

Das Produkt wird abhängig von der eingesetzten Zelllinie wachstumsgekoppelt oder nicht-wachstumsgekoppelt gebildet. Beim Einsatz von CHO Zellen lässt sich dabei meist eine maximale Produktbildung zum Beginn der stationären Phase feststellen^{49,55}.

Hinsichtlich der Prozessführung beginnt die Kultivierung mit einer Phase des Batchbetriebs von mehreren Tagen, woraufhin die Fütterung mit *Feed*-Lösungen beginnt. Diese enthalten wichtige Kohlenstoffquellen wie Glukose, sowie essentielle Aminosäuren für das Wachstum der Zellen und die Produktion des mAbs. Zusätzlich können basische *Feed*-Lösungen gleichzeitig für die Erhöhung des pH-Wertes der Kultivierung eingesetzt werden⁷². Durch die Zugabe der *Feed*-Lösungen wird einer Substratlimitierung entgegengewirkt, sodass die exponentielle Wachstumsphase der Zellen verlängert werden kann. Damit werden die maximale Zellzahl und der resultierende Antikörpertiter gesteigert, während Totzeiten des Reaktors durch die verlängerte Betriebsdauer verringert werden^{73,74}.

Während des Produktionsprozesses werden mehrere Kenngrößen aufgezeichnet und berechnet, welche Aufschluss über die Güte des Prozesses und das Wohlbefinden der Zellen geben. Dazu gehören neben physikalischen Parametern wie dem pH-Wert, der Gelöstsauerstoffkonzentration und der Kultivierungstemperatur unter anderem auch die Wachstumsrate und die Viabilität der Zellen, sowie der Produkttiter. Die mAbs werden von den CHO-Zellen sekretiert und können daher während der Kultivierung direkt im Überstand gemessen werden⁷⁵⁻⁷⁷. Je mehr dieser Kenngrößen kontinuierlich im laufenden Prozess überwacht werden können, desto besser kann die Prozessführung zugunsten optimaler Bedingungen für das Zellwachstum und die Antikörperproduktion geregelt werden. Für diese Art der dynamischen Prozessanpassung muss jedoch zusätzlich ein weitreichendes Verständnis über die Zusammenhänge der Parameter und der Prozessqualität vorhanden sein.

Im Anschluss an den Produktionsprozess folgt der letzte *Upstream*-Schritt. Während der Zellernte erfolgt die Abtrennung der Zellen und kleinerer Zelltrümmer von dem Kulturüberstand. Dafür wird häufig die Zentrifugation verwendet, da diese eine einfache und kosteneffiziente Methode zur Zellabtrennung darstellt⁷⁸. Die Zentrifugation basiert auf der Sedimentation der Zellen durch Fliehkräfte und anschließende Entnahme des mAb-haltigen Überstandes. Dabei beeinflussen Faktoren wie die Dauer und die

Zentrifugalbeschleunigung die Effizienz der Abtrennung. Eine weitere Methode stellt die Filtration dar, wobei die Zellsuspension meist auf eine Cellulose-Filtermembran gegeben wird. Als Filterhilfsmittel wird dabei häufig Kieselgur verwendet, was durch eine Oberflächenvergrößerung die Kapazität und Trennleistung des Filters verbessert. Der erhaltene Kulturüberstand wird im *Downstream*-Prozess verarbeitet, um die monoklonalen Antikörper weiter aufzureinigen^{79,80}.

3.2.2 *Downstream*-Prozess

Über die letzten Jahrzehnte wurde der *Upstream*-Prozess hinsichtlich der Produktivität und damit maximaler Antikörpertiter optimiert. In heutzutage etablierten industriellen *Fed-batch* Prozessen können Titer von über 10 g/L erreicht werden. Zusätzlich wurden auch das Volumen und die Zahl der parallel betriebenen Produktionsreaktoren deutlich erhöht^{81,82}. Häufig wird jedoch der somit erreichte Kapazitätsanstieg des *Upstream*-Prozesses durch die traditionellen *Downstream*-Methoden ausgebremst^{61,83}.

Aufgrund des somit entstehenden Engpasses wird der zellfreie Kulturüberstand meist in Lagertanks aufgefangen und von dort schrittweise weiterverarbeitet. Als erster Aufreinigungsschritt folgt der sogenannte Antikörper-*capture* mittels Protein A-Chromatographie. Dafür werden chromatographische Säulen mit immobilisiertem Protein A verwendet, welches die hoch konservierte Fc-Region des Antikörpers bindet⁸⁴. Dieser Schritt stellt die Aufkonzentrierung dar, indem der gebundene Antikörper durch einen Elutionspuffer mit niedrigem pH-Wert wieder gelöst wird. Die Betriebsweise dieser Chromatographie wird daher auch als *bind and elute* bezeichnet und kann bereits Produktreinheiten von über 95 % erreichen. Somit stellt die Protein A-Chromatographie, trotz des kostenintensiven Säulenmaterials und technischer Einschränkungen im Bezug auf Durchflussraten und die Abmessungen der verwendeten Säulen, als meist genutzter Capture-Schritt einen wichtigen Teil des *Downstream*-Prozesses dar⁸⁵.

Nach Vorgaben der FDA muss die Aufreinigung neben den chromatographischen Methoden zwei Schritte der Virusreduktion umfassen, um den sicheren Einsatz im klinischen Umfeld zu gewährleisten. Nach der Protein A-Chromatographie folgt daher eine Virusinaktivierung bei einem pH-Wert $\leq 3,8$. Die Inkubation in saurem Milieu zeigte

erfolgreiche Inaktivierung von Retroviren für eine Vielzahl von biotechnologischen Prozessen. Dabei werden schwache Säuren wie 0,5 molare Phosphorsäure zur Einstellung des pH-Wertes eingesetzt. Starke Säuren wie Salzsäure werden hingegen vermieden um Denaturierung und Aggregation der Antikörper in der lokalen Region der Zugabe zu verhindern^{82,86}. Anschließend folgt ein Pufferwechsel mittels Ultra-/Diafiltration zur Vorbereitung auf die nachgeschalteten *Polishing*-Schritte. Diese umfassen häufig eine Kationenaustausch-Chromatographie (CEX, *engl. cation exchange chromatography*), welche verbliebene Wirtszellproteine sowie ausgewaschenes Protein A abtrennt. In der Anionenaustausch-Chromatographie (AEX, *engl. anion exchange chromatography*) hingegen werden negativ geladene Verunreinigungen wie DNA-Moleküle entfernt. Nach den Chromatographie-Schritten und einer weiteren Virusfiltration werden die aufgereinigten Antikörper mittels Ultra-/Diafiltration in den Formulierungspuffer überführt und für die jeweilige Verwendung abgefüllt^{61,82,85}.

3.3 Qualitätskontrolle

Die Qualität des Herstellungsprozesses und des produzierten Antikörpers ist ein wichtiger Faktor für die Verwendung im klinischen Umfeld. Dabei kann zwischen prozessbezogener und produktbezogener Qualität unterschieden werden^{87,88}. Während des *Upstream*-Prozesses geben die Viabilität, die Wachstumsrate und die Zelldichte Aufschluss über das Wohlbefinden und die Leistungsfähigkeit der Zellen⁸⁹. Im Anschluss an die Zellabtrennung werden weitere prozessbezogene Zielgrößen untersucht. Dazu gehören sowohl der Produkttiter als auch das Verhältnis von produzierten Antikörpern zu Verunreinigungen wie HCPs und DNA⁹⁰⁻⁹². Diese Verunreinigungen haben einen starken Einfluss auf die folgenden *Downstream*-Schritte und müssen minimiert werden, um den gesamten Prozess produktiv und kosteneffizient zu halten⁶¹. Während der Prozessentwicklung ist besonders die Korrelation der Zielgrößen, also die Verbindung von Zelldichte und Viabilität zu den beschriebenen Verunreinigungen für die Prozessführung- und Kontrolle von großer Wichtigkeit. Dabei ist diese Wechselbeziehung über die einzelnen Schritte des *Upstream*-Prozesses hinaus zu betrachten^{89,90}.

Im Anschluss wird die produktbezogene Qualität untersucht um die Verträglichkeit und Funktionalität des produzierten Antikörpers sicherzustellen. Dazu werden unter anderem Attribute wie die Ladungsvarianten und das Glykosylierungsmuster der Antikörper gezählt^{19,93-95}. Die Untersuchung der Ladungsvarianten wird in der Industrie als Standardanalyse zum Vergleich der Antikörperheterogenität zwischen verschiedenen Produktionschargen verwendet. Die Oberflächenladung kann durch eine Vielzahl von Modifikationen wie zum Beispiel Oxidation, Deamidierung oder Lysinabspaltung am C-terminalen Ende beeinflusst werden. Zur Analyse der Ladungsvarianten werden meist Kationenaustausch-Chromatographie oder kapillare isoelektrische Fokussierung (CIEF, *engl. capillary isoelectric focussing*) angewendet⁹⁶⁻⁹⁸. Die Glykosylierungsmuster der produzierten Antikörper sind eine wichtige Zielgröße im Hinblick auf die Stabilität, Pharmakodynamik und negative Immunreaktionen, weshalb die Verteilung und Heterogenität der Glykoformen ebenfalls in festgelegten Grenzen liegen muss^{22,24,99}. Meist werden flüssigchromatographische Verfahren mit nachgeschalteter Massenspektrometrie (LC-MS, *engl. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) eingesetzt um die Verteilung der Glykoformen nachzuweisen^{93,100}.

3.3.1 Bioaktivitätsassay

Zur Verwendung monoklonaler Antikörper im medizinischen Bereich muss neben der geringen Heterogenität auch die biologische Aktivität nach der Produktion und der Aufreinigung erhalten bleiben¹⁰¹. Die Bioaktivität beschreibt die Wirksamkeit des Antikörpers, ein spezifisches Antigen zu binden und stellt damit ein weiteres produktbezogenes Qualitätsattribut dar, welches mittels Bioaktivitätsassays nachgewiesen werden kann¹⁰². Im Gegensatz zu den Analysen der Ladungsvarianten und Glykosylierungen muss der Assay spezifisch auf die Funktion des jeweiligen Antikörpers angepasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein mAb produziert und analysiert, welcher als Antigen den Tumornekrosefaktor TNF- α bindet. Bei bestimmten Entzündungskrankheiten wirkt TNF- α als Initiator des programmierten Zelltodes, der Apoptose, indem er den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR-1) bindet und die molekulare Apoptosekaskade auslöst^{46,103,104}.

Damit kann auch bei Zelllinien, die sensitiv auf TNF- α reagieren, gezielt Apoptose induziert werden. Der darauf basierende Bioaktivitätsassay ist in Abbildung 3.4 methodisch dargestellt.

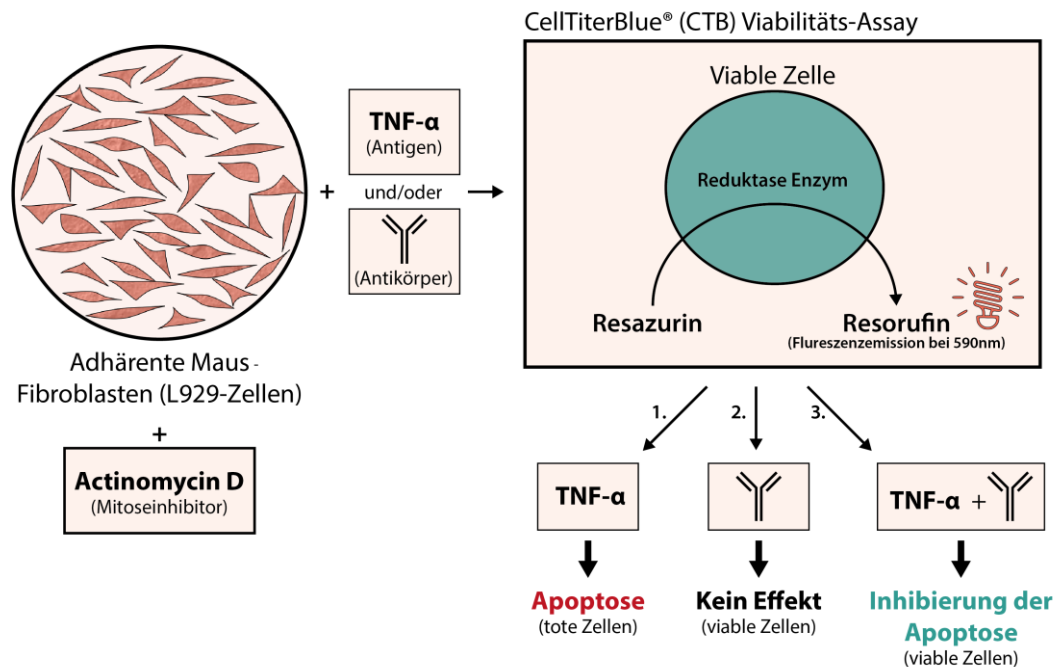


Abbildung 3.4 Schematische Durchführung des Bioaktivitätsassays mit Positivkontrolle (1), Negativkontrolle (2) und bindungsbasiertem Assay (3), (verändert nach¹⁰⁵)

Als analytisches System werden adhärenente Mausfibroblasten (L929-Zellen) in 96-well Platten kultiviert und mit Actinomycin D behandelt. Durch die Zugabe des Mitoseinhibitors Actinomycin D wird die Zellteilung blockiert, sodass die Zellzahl konstant gehalten werden kann. Anschließend werden dem Medium parallel TNF- α und der neutralisierende Antikörper hinzugefügt. Als Positivkontrolle wird reines TNF- α verwendet, während die Zugabe des reinen Antikörpers die Negativkontrolle darstellt^{105,106}. Nach der Behandlung wird die Viabilität der L929-Zellen mittels CellTiterBlue® Assay analysiert. Dieser basiert darauf, dass viable Zellen Resazurin zu Resorufin reduzieren, welches über die Fluoreszenzemission bei 590 nm quantitativ nachgewiesen wird¹⁰⁷.

In der Positivkontrolle zeigen die Zellen durch die apoptoseinduzierende Wirkung von TNF- α eine verringerte Viabilität (Abbildung 3.4, 1). Bei der Zugabe des Antikörpers in der Negativkontrolle tritt kein Effekt ein und die Zellen verbleiben viabel (Abbildung 3.3, 2). Bei der parallelen Zugabe bindet der Antikörper den freien TNF- α , wodurch das Auslösen der Signalkaskade zur Apoptose in den L929-Zellen unterbunden wird (Abbildung 3.4, 3). Dabei bindet die Fab-Region des bioaktiven Antikörpers spezifisch an TNF- α und verhindert damit die Aktivierung von TNFR-1⁴⁶. Somit lässt sich die Viabilität der Zellen mit der Bioaktivität des eingesetzten Antikörpers korrelieren und durch den Vergleich mit unbehandelten Referenzkulturen quantifizieren¹⁰⁶.

3.4 Quality by Design

Anhand der beschriebenen Qualitätsattribute lassen sich der Prozess und das Produkt evaluieren. Der traditionelle Ansatz zur Qualitätskontrolle in der chemischen und biopharmazeutischen Industrie ist jedoch sehr unflexibel und bietet nur limitierte Möglichkeiten zur qualitätsbezogenen Prozessregulierung. Die Produktqualität wird dabei erst am Ende der Prozesskette kontrolliert und es besteht meist kein strukturierter Zusammenhang zwischen Prozess, Produkt und klinischer Anwendung. Heutzutage ergibt sich aus den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von monoklonalen Antikörpern jedoch die Notwendigkeit für schnellere Produkt- und Prozessentwicklung, sowie flexibel kontrollierbare Produktionsketten. Dabei liegt der Fokus auf der überwachten und geregelten Prozessführung zur Sicherstellung der hohen Qualitätsstandards und schneller regulatorischer Zulassung. Dafür ist allerdings ein weitreichendes Prozessverständnis im Bezug auf die Interaktion von Einflussfaktoren auf die prozess-/produktbezogener Qualitätsattribute notwendig^{2,108}.

Um diese Anforderungen umzusetzen, wurde das QbD Prinzip als risikobasierter Ansatz für pharmazeutische Entwicklung und Herstellung entwickelt. Dieser wurde 2004 im Rahmen der *Current Good Manufacturing Practice for the 21st century* Initiative eingeführt¹⁰⁹. Darauf basierend veröffentlichte die FDA ein Leitprotokoll für Qualität in der pharmazeutischen Industrie, welches aus dem Protokoll *PAT – A framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance*, sowie den Richtlinien der International Conference of Harmonisation (ICH) *Q8 Pharmaceutical Development*, *Q9 Quality Risk Management* und *Q10 Pharmaceutical Quality Systems* aufgebaut ist¹¹⁰⁻¹¹³.

Die Zielsetzung von QbD ist dabei die systematische Verbesserung von Prozessen hinsichtlich der Produktqualität, Kosteneffizienz und schnelleren Entwicklung unter Einhaltung der gegebenen Vorschriften. Die Qualität wird während der Prozessentwicklung integriert, anstatt sie im Anschluss an den Prozess zu analysieren^{108,114}. Dieser Ansatz setzt somit voraus, dass aus einem optimierten und geregelten Prozess ein Produkt mit hoher Qualität resultiert. Damit können Hersteller den regulatorischen Aufwand für postkommerzielle Prozessänderungen reduzieren, was eine höhere Flexibilität in der biopharmazeutischen Produktion und Qualitätskontrolle ermöglicht¹⁰⁹.

Bei einem graduellen QbD Ansatz wird der Herstellungsprozess in einzelne Prozessschritte mit intermediären Qualitätsmerkmalen unterteilt. Daraufhin können die erhaltenen Ergebnisse und das Prozessverständnis zusammengefügt werden, um den Prozess holistisch zu beschreiben⁹⁰. Dementsprechend müssen zunächst die kritischen Prozessparameter, intermediäre Qualitätsattribute des Prozesses, sowie die kritischen Qualitätsattribute des produzierten Antikörpers definiert werden. Durch die strukturelle Verknüpfung der CPPs mit den CQAs kann somit ein *Design Space* für den untersuchten Prozess etabliert werden^{115,116}. Der Arbeitsablauf zur Implementierung des QbD Ansatzes in einen biopharmazeutischen Herstellungsprozess sowie die graphische Interpretation des *Design Space* sind in Abbildung 3.5 zusammengefasst.

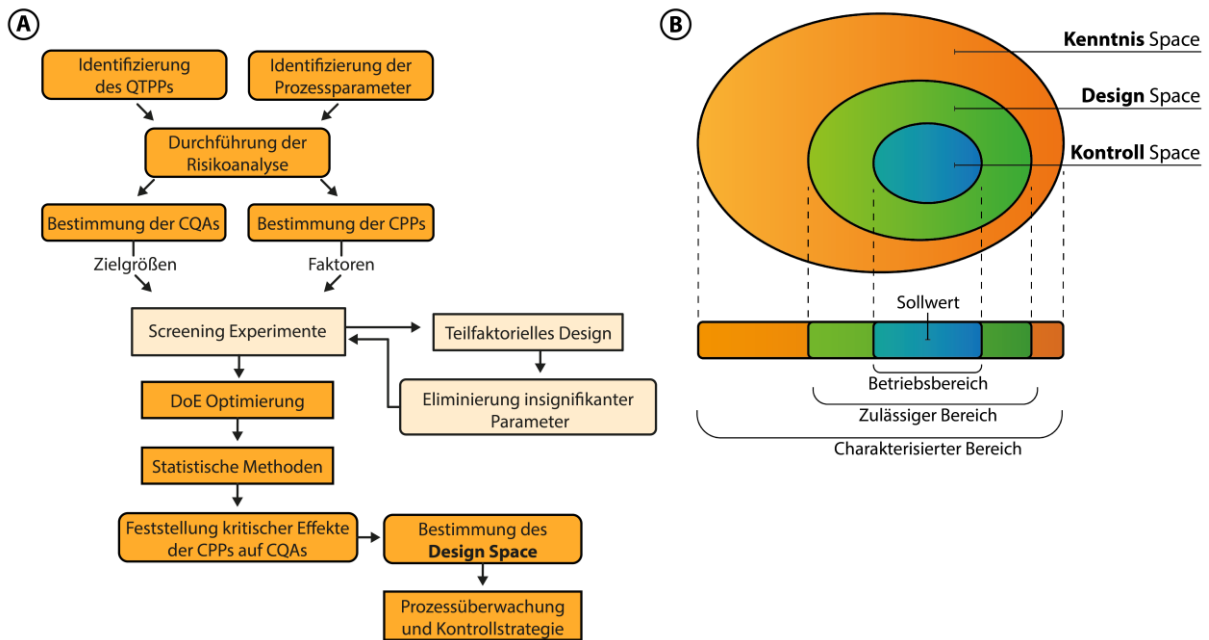


Abbildung 3.5 Theoretischer Ablauf der *Quality by Design* Strategie (A, verändert nach ³⁾), Visuelle Darstellung des *Design Space* mit dazugehörigen Bereichen (B, verändert nach^{67,117)})

Der QbD Ansatz beginnt mit der Festlegung des gewünschten Qualitätsprofils des jeweiligen Prozessschrittes und des Produktes (QTPP, engl. *quality target product profil*) sowie der Identifizierung der variablen Prozessparameter¹¹⁷. Als graphisches Hilfsmittel wird dafür häufig das sogenannte Ishikawa-Diagramm verwendet. Dieses visualisiert und kategorisiert Prozessparameter und ermöglicht die Identifikation von Problemursachen¹¹⁸.

Daraus werden mithilfe einer Risikoanalyse sowohl die CQAs als auch die CPPs bestimmt¹¹⁹. Als Methode zur Risikoanalyse der Prozessparameter kommt meist die *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA) zum Einsatz. Dabei werden die potentiellen Risiken jedes Prozessparameters in drei Bereiche unterteilt: Die Wahrscheinlichkeit (P, engl. *probability*), der Schweregrad (S, engl. *severity*) und die Detektierbarkeit (D, engl. *detectability*). Diese werden jeweils auf einer Skala von 1 – 5 bewertet. Dabei beschreibt „P“ die Wahrscheinlichkeit, dass ein möglicher Fehler auftritt, „S“ bewertet die potentielle Auswirkung eines solchen Fehlers auf den Gesamtprozess und das Produkt, und „D“ beschreibt die Möglichkeit diesen Fehler zu detektieren und zu beheben.

Im Anschluss an die Bewertung der einzelnen Bereiche werden die Werte multipliziert und ergeben die Risikoprioritätsnummer (RPN, *engl. risk priority number*)¹²⁰. Dabei werden Parameter mit hoher RPN als kritischer eingestuft. Damit festgestellte CPPs werden für die weitere Untersuchung als Faktoren und die festgelegten CQAs als Zielgrößen der Experimente bezeichnet.

3.4.1 Design of Experiments

Sollten die Risikoanalyse die Anzahl an CPPs nicht weit genug eingrenzen, oder die bestehende Prozesskenntnis zur vollständigen Bewertung nicht ausreichen, können Screening Experimente verwendet werden, um insignifikante Parameter auszuschließen¹¹⁷. Die definierten CPPs werden zur weiteren Charakterisierung ihres Einflusses auf den Prozess und die Produktqualität in einem DoE untersucht. Im Gegensatz zu Versuchsstrukturen wie dem sogenannten *changing one single variable at a time* (COST) Ansatz, erlaubt DoE die strukturelle Verknüpfung mehrerer Faktoren und deren Einfluss auf bestimmte Zielgrößen. Dabei werden mehrere Variablen gleichzeitig verändert, womit der Prozessraum auf das globale Optimum hin untersucht werden kann¹²¹. Der schematische Aufbau und die Limitierung des COST Ansatzes sowie der theoretische Vergleich zu der DoE Strategie sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

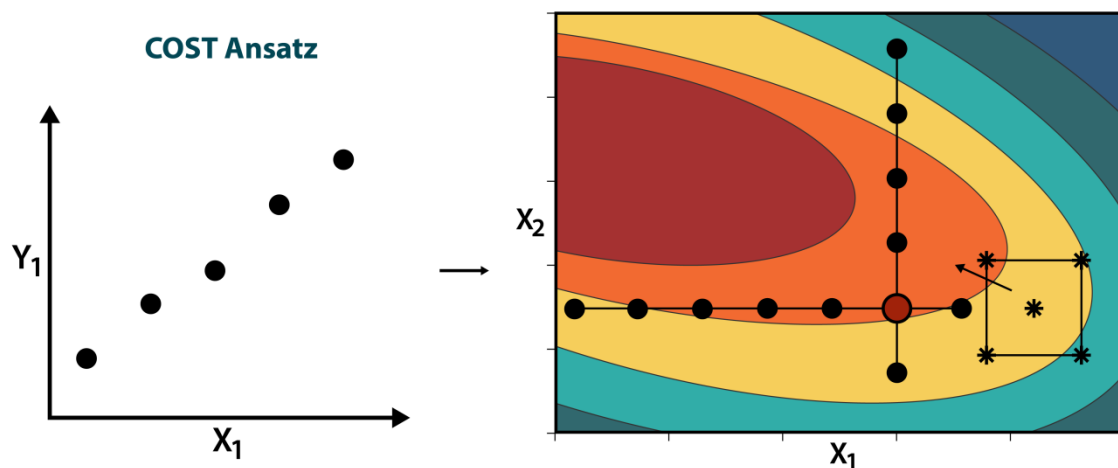


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung des COST Ansatzes (verändert nach ¹²¹)

Der COST Ansatz, bei dem jeweils nur ein Faktor verändert und dessen Einfluss auf die Zielgröße untersucht wird, ist meist ineffektiv und gibt nicht notwendigerweise Aufschluss über das reale Optimum. Dies führt vor allem bei Interaktionen von Faktoren zu Fehlinterpretationen, da es scheint als wäre ein Optimum erreicht sobald sich das Ergebnis nicht weiter verbessert¹²¹. Dieses Problem kann durch den DoE Ansatz gelöst werden, wobei in einer strukturellen Reihe von Experimenten alle relevanten Faktoren gleichzeitig verändert werden. Dabei formen vollfaktorielle Designs die Basis für alle klassischen experimentellen Designansätze in Screening-, Optimierungs- und Robustheitsversuchen. Zunächst werden für jeden Faktor eine niedrige Stufe (-1) und eine hohe Stufe (+1) definiert, welche orthogonal angeordnet werden um den experimentellen Raum aufzuspannen. Durch den gleichmäßig rechteckigen Aufbau werden weniger Versuchsläufe pro untersuchten Faktor benötigt und es können zusätzlich Faktorinteraktionen untersucht werden. Die Interpolation ermöglicht dabei die Identifizierung einer Richtung für das reale Optimum (Abbildung 3.6, rechts)^{121,122}.

Das eingesetzte Design variiert dabei je nach Anzahl der untersuchten Faktoren und der Komplexität der zugrundeliegenden Fragestellung¹²³. Für die Validierung und Feststellung der Reproduzierbarkeit werden in der Mitte des Versuchsraums Experimente in Replikaten ausgeführt. Über diese Zentralpunkte lässt sich eine Aussage über die allgemeine Varianz der Zielgrößen und die Reproduzierbarkeit des gesamten Prozesses treffen. Natürliche Erweiterungen des vollfaktoriellen Designs werden als *Central Composite Designs* (CCD) bezeichnet. Dabei wird der Versuchsplan um die beschriebenen Replikate und zusätzliche Sternpunkte erweitert, welche gleichmäßig um den Mittelpunkt verteilt sind und sich nur in einem Faktor von den Zentralpunkten unterscheiden. Der Abstand der Sternpunkte zum Mittelpunkt des faktoriellen Raums wird dabei als α bezeichnet. Damit wird der Suchraum präzisiert, weshalb CCDs häufig in der Optimierung von Prozessen Anwendung finden. Es wird generell zwischen drei Varianten von CCDs unterschieden, welche sich in dem relativen Abstand der Sternpunkte zu den Eckpunkten des vollfaktoriellen Designs unterscheiden^{121,124}. Die Varianten sind in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt und werden im Folgenden genauer beschrieben.

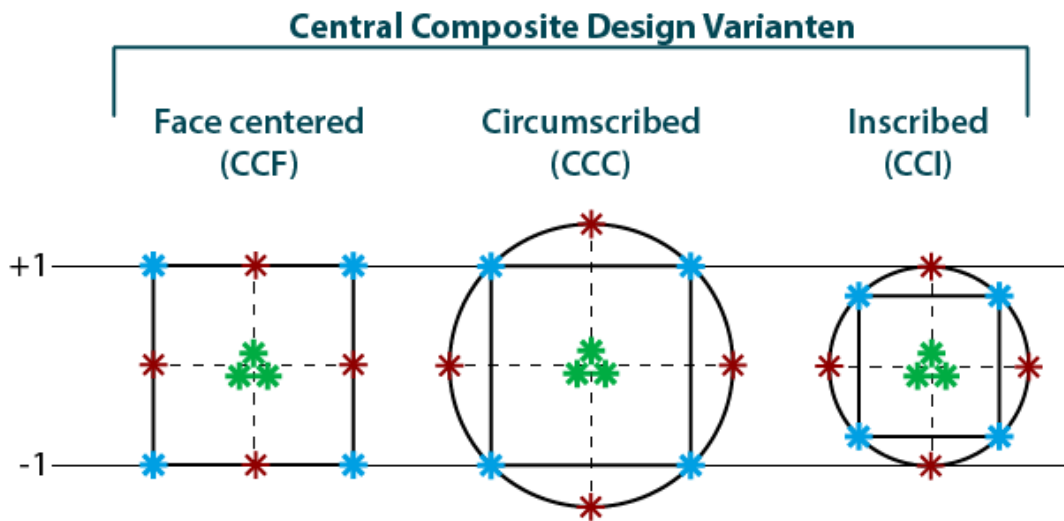


Abbildung 3.7 Varianten des *Central Composite Designs*, (verändert nach ¹²⁴)

In *Central Composite Face centered* (CCF) Designs liegen die Sternpunkte auf den Flächen des faktoriellen Raums, womit $\alpha = \pm 1$ ist. Die Faktoren werden weiterhin auf drei Stufen variiert, der Suchraum wird somit genauer abgebildet. Dadurch kann zusätzlich ein quadratisches Modell vollständig bestimmt werden.

Central Composite Circumscribed (CCC) Designs beschreiben die klassische Form der CCDs. Die Sternpunkte sind dabei um einen bestimmten Abstand von dem Mittelpunkt entfernt und definieren neue Extreme für die niedrigen und hohen Stufen. Damit werden fünf Stufen für jeden Faktor benötigt. Der Abstand hängt von dem untersuchten Prozess und den Eigenschaften der zu analysierenden Faktoren ab. Diese Designs haben eine zirkuläre oder sphärische Symmetrie und erweitern den Suchraum außerhalb der faktoriellen Eckpunkte.

Central Composite Inscribed (CCI) Designs werden verwendet, wenn die Limits, welche für die Faktoren definiert wurden, faktische Limits der Prozessparameter darstellen. In diesem Fall werden die Faktorwerte als Sternpunkte verwendet und ein neues faktorielles Design innerhalb dieser Grenzen gebildet, sodass ebenfalls fünf Stufen für jeden Faktor benötigt werden. Das CCI Design beschreibt damit ein verkleinertes CCC Design bei dem die Faktorwerte durch α dividiert wurden^{122,124}.

Zur Durchführung der Experimente wird die Reihenfolge der generierten Versuchsläufe zufällig verteilt, um den möglichen Einfluss exogener Faktoren auf den gesamten Suchraum zu verteilen. Die generierten Daten werden mittels MVDA ausgewertet, wobei ein mathematisches Regressionsmodell die experimentellen Daten abbildet¹¹⁷. Das Modell wird anhand verschiedener Modellparameter auf statistische Signifikanz, Zuverlässigkeit zukünftiger Vorhersagen, potentielle Modellfehler und Reproduzierbarkeit überprüft. Dabei werden Faktoren, welche Null in dem zugehörigen Konfidenzintervall einschließen als insignifikant bewertet und stufenweise aus dem Modell ausgeschlossen. Das erstellte Modell beschreibt die relevanten Faktoreffekte und -Interaktionen und damit die Einflüsse der einzelnen Faktoren auf die jeweiligen Zielgrößen^{121,123,125}. Ein schematischer Effektplot eines dreidimensionalen CCF Designs ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

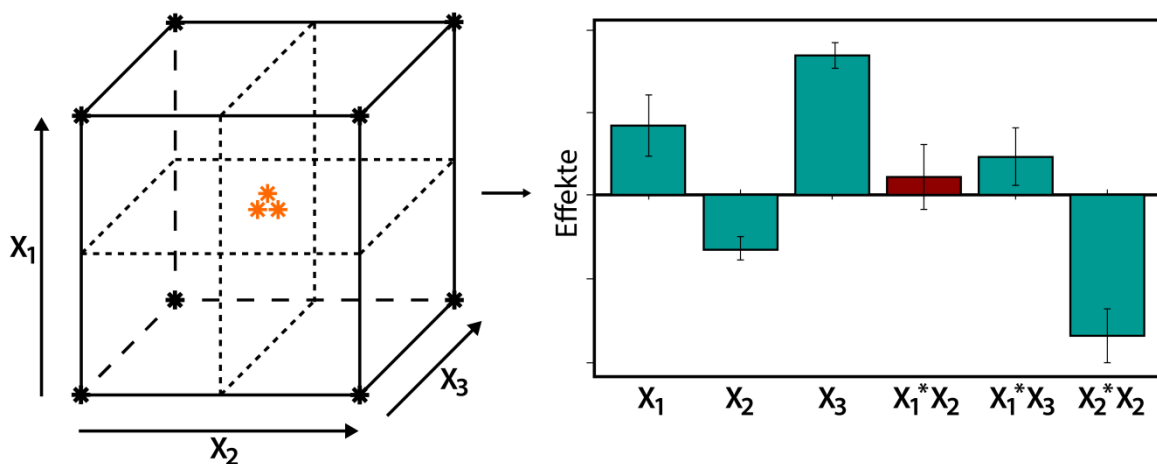


Abbildung 3.8 Design of Experiments Versuchsplan mit dreidimensionalem CCF Design und zugehörigem theoretischen Effektplot mit Faktoreffekten/-Interaktionen und quadratischen Effekten

Die Faktoreffekte weisen, abhängig von ihrem positiven oder negativen Einfluss auf die untersuchte Zielgröße, entsprechende Koeffizienten auf. Zusätzlich können Interaktionseffekte zweier Faktoren ($X_1 * X_3$) sowie quadratische Effekte ($X_2 * X_2$) eines einzelnen Faktors identifiziert werden. Darüber hinaus wird in dem dargestellten Beispiel die Interaktion der Faktoren X_1 und X_2 ($X_1 * X_2$, rot) aufgrund unzureichender Signifikanz von der Modellberechnung ausgeschlossen.

Zur Interpolation und Visualisierung der Effekte mehrerer Faktoren auf eine Zielgröße können zusätzlich Konturdiagramme erstellt werden¹²¹. Anhand der somit gewonnenen Informationen können optimale Prozessbedingungen definiert und ganzheitlich der *Design Space* für den untersuchten Prozessschritt etabliert werden. Die Monte-Carlo-Simulation bietet eine einfache Möglichkeit zur Untersuchung der Einflüsse zufälliger Variationen der Eingangsfaktoren. Dabei wird zunächst ein mathematisches Prozessmodell erstellt in dem die Faktorgrößen durch Zufallszahlen aus geeigneten Verteilungsfunktionen ersetzt werden. Dadurch werden die Zielgrößen in Verteilungen umgeformt deren Eigenschaften durch das Modell und die Verteilung der zufälligen Variablen bestimmt wird. Durch die Kombination dieser Modellverteilung und der gesetzten Grenzen der betrachteten Qualitätsattribute lässt sich der *Design Space* berechnen. Dieser repräsentiert dabei eine multidimensionale Verbindung und Interaktion von Prozessparametern, welche die Einhaltung der definierten Qualitätsattribute sicherstellen^{3,117}. Innerhalb des *Design Space* liegt der für die Betriebsführung und Prozesskontrolle angewendete Betriebsbereich mit optimalen Sollwerten der einzelnen CPPs¹¹⁶. Das flexible Arbeiten innerhalb des definierten *Design Space* wird im industriellen Umfeld nicht als Prozessveränderung angesehen und benötigt daher keine erneute Zulassung. Dies ermöglicht die Einsparung von Zeit und Kosten sowie der Aufrechterhaltung eines stetigen Arbeitsflusses¹²⁶.

4 Experimenteller Teil

Die Integration des *Quality by Design* Prinzips erfolgte graduell in den verschiedenen *Upstream*-Schritten der Herstellung eines monoklonalen Antikörpers. Die Ergebnisse wurden separat in *peer-reviewed* Fachzeitschriften veröffentlicht.

Für die strukturierte Untersuchung des gesamten *Upstream*-Prozesses wurde dieser in drei Teilschritte unterteilt: Die Vorkultur, den Produktionsprozess und die Zellabtrennung. Diese Prozessschritte wurden der Reihenfolge nach analysiert, wobei Erkenntnisse der vorherigen Experimente in die Risikoanalyse und Versuchsplanung der folgenden Studien einbezogen wurden. Mittels DoE wurden die kritischen Parameter untersucht und deren Effekt auf die spezifischen Zielgrößen für den jeweiligen Prozessschritt analysiert. Dabei erlaubte die Einteilung in einzelne Prozessschritte eine tiefere Analyse und genauere Definition der jeweiligen *Design Spaces*. Die Verknüpfung der Ergebnisse und der Bezug auf die Qualitätsattribute der vorherigen und nachfolgenden Prozessschritte ermöglichte darüber hinaus eine holistische Prozesscharakterisierung.

In den folgenden Abschnitten wird in Kapitel 4.1 die Implementierung von QbD in die Vorkultur dargestellt, in Kapitel 4.2 die Analyse des Produktionsprozesses beschrieben und letztlich in Kapitel 4.3 die Untersuchung der Zellabtrennung erläutert.

4.1 Implementierung von QbD Strategien in die Vorkultur eines mAb-Herstellungsprozesses

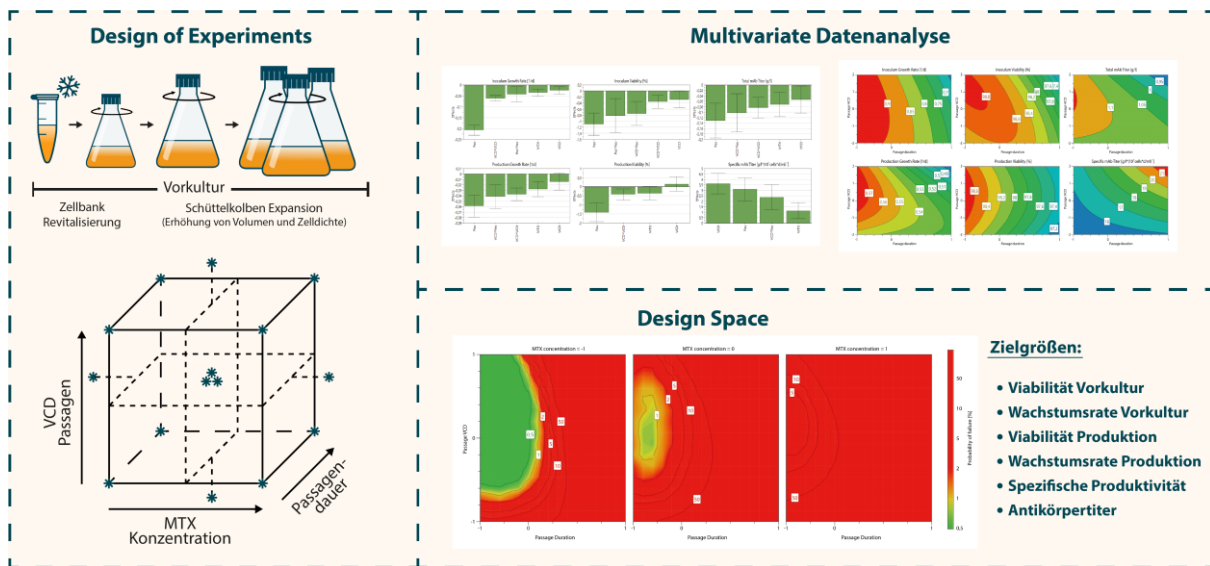


Abbildung 4.1 Graphical abstract zu dem Manuskript „Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process“

Das QbD Konzept wird seit einigen Jahren vielseitig in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Es ermöglicht die strukturierte Etablierung, Analyse und Optimierung der Prozess- und Produktqualität. Dabei sind Untersuchungen der frühen Prozessschritte bisher sehr limitiert eingeschlossen. Die Vorkultur wird häufig nicht so überwacht und geregelt wie der Produktionsprozess in größeren Bioreaktoren, weshalb kritische Einflüsse der Vorkulturparameter auf den weiteren Prozess nicht vollständig verstanden sind und oft unterschätzt werden. Die Richtlinien der FDA sehen die Anwendung von QbD jedoch für die gesamte Produktionskette eines biopharmazeutischen Produktes vor^{111,114}.

Daher beschreibt der folgende Artikel die Verbindung von Prozessparametern der Vorkultur mit der Qualität des Produktionsprozesses. Zunächst wurden die Prozessparameter in einem Ishikawa-Diagramm zusammengetragen und mittels FMEA bewertet. Dabei wurden die viable Zelldichte zu Beginn der einzelnen Passagen, die Passagedauer und die MTX Konzentration zu Beginn der Vorkultur als CPPs identifiziert. Zur Untersuchung der Parametereffekte wurde ein DoE entwickelt und die Vorkultur in 125 mL Schüttelkolben durchgeführt.

Dabei wurde die viable Zelldichte zwischen $0.1 - 0.3 \times 10^6$ Zellen/mL, die Passagendauer zwischen 2 - 5 Tagen und die MTX Konzentration zwischen 0 - 30 nM variiert. Das resultierende teilfaktorielle CCC Design umfasste 15 Versuche mit drei Mittelpunktreplikaten. Die Qualität der Vorkultur wurde anhand der Wachstumsrate und Endviabilität der letzten Passage bewertet. Diese Inokulationsparameter beeinflussen den nachfolgenden Produktionsprozess, in dem zusätzlich die Wachstumsrate, die Endviabilität sowie der mAb Gesamttiter und die spezifische Produktivität als Zielgrößen betrachtet wurden. Zunächst wurden die erstellten Modelle validiert und anschließend die Faktoreffekte und Interaktionen ausgewertet. Dabei wurden zur Interpretation der Ergebnisse verschiedene Plots erstellt und schließlich ein *Design Space* für den untersuchten Prozessschritt definiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Passagendauer den Schlüsselparameter der Vorkultur darstellt und sie in Interaktion mit der viablen Zelldichte der Passagen einen kritischen Einfluss auf die Qualität des untersuchten Prozesses zeigt. Eine reduzierte MTX Konzentration und verringerte Passagendauer verbesserte außerdem die Viabilität und Wachstumsrate der Vorkultur und des Produktionsprozesses. Zusätzlich wurde eine antiproportionale Wirkung auf die spezifische Produktivität festgestellt. Dies bedeutet, dass die Zellen unter suboptimalen Wachstumsbedingungen mehr Antikörper produzieren. Dieser Effekt konnte jedoch die erhöhten Wachstumsraten und Zelldichten der anderen Versuchsläufe nicht kompensieren. Der definierte *Design Space* zeigte den akzeptablen Arbeitsbereich der untersuchten Parameter mit optimalen Sollwerten im mittleren Bereich der viablen Zelldichte und am unteren Minimum der Passagendauer. Basierend auf den Ergebnissen wurde die Vorkultur als kritischer Prozessschritt der mAb Herstellung eingestuft und sollte daher in der Etablierung neuer Prozesse analysiert und anschließend durch geeignete PAT Maßnahmen überwacht und gesteuert werden.

Im folgenden Artikel „*Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.

RESEARCH ARTICLE

Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process

Ole Jacob Böhl¹ | Jana Schellenberg¹ | Janina Bahnemann¹ | Bernd Hitzmann² | Thomas Scheper¹ | Dörte Solle¹

¹ Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Hannover, Germany

² Universität Hohenheim, Fachgebiet für Prozessanalytik und Getreidewissenschaft, Stuttgart, Germany

Correspondence

Dr. Dörte Solle, Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany. Email: solle@iftc.uni-hannover.de

This article is dedicated to Prof. Thomas Bley on the occasion of his 70th birthday.

Funding information

Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant/Award Numbers: 031B0475I, 031B0744

Abstract

The quality by design approach was introduced to the biopharmaceutical industry over 15 years ago. This principle is widely implemented in the characterization of monoclonal antibody production processes. Anyway, the early process phase, namely the inoculum expansion, was not yet investigated and characterized for most processes. In order to increase the understanding of early process parameter interactions and their influence on the later production process, a risk assessment followed by a design of experiments approach was conducted. The DoE included the critical parameters methotrexate (MTX) concentration, initial passage viable cell density and passage duration. Multivariate data analysis led to mathematical regression models and the establishment of a designated design space for the studied parameters. It was found that the passage duration as well as the initial viable cell density for each passage during the inoculum expansion have severe effects on the growth rate and viability of the early process phase. Furthermore, the variations during the inoculum expansion directly influenced the production process responses. This carry-over of factor effects highlights the crucial impact of early process failures and the importance of process analysis and control during the first part of mAb production processes.

KEYWORDS

CHO, inoculum expansion, mAb, PAT, QbD

Abbreviations: CHO, Chinese hamster ovary cells; FMA, feed medium A; FMB, feed medium B; FMEA, failure mode and effect analysis; mAb, monoclonal Antibody; MLR, multiple linear regression; MTX, methotrexate; MVDA, multivariate data analysis; PM, production medium; QbD, quality by design; RPN, risk priority number; SM, stock medium; VCD, viable cell density

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by Wiley-VCH GmbH

1 | INTRODUCTION

The Quality by Design (QbD) principle is a risk-based approach to pharmaceutical development and manufacturing [1]. It emerged in 2004 with the *Current Good Manufacturing Practice for the 21st century* initiative [2]. Based on this, the United States Food and Drug Administration (FDA) launched a guidance protocol for the biopharmaceutical industry. This guidance consists of the report

PRACTICAL APPLICATION

The inoculum expansion was assessed as a critical part of the mAb production process by examination of critical process parameters in a design of experiments approach. Our research resulted in the definition of a designated design space and new feedback strategies for a robust process control. This highlights the importance of early process understanding and investigation, while marking the first step towards a full process characterization regarding quality by design principles. Implementing the conducted concept in the process development was thereby shown to be crucial for the studied process as well as similar cell culture processes.

PAT – A framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance [3] and the International Conference of Harmonisation (ICH) guidelines *Q8 Pharmaceutical Development*, *Q9 Quality Risk Management* and *Q10 Pharmaceutical Quality Systems* [4–6].

Before introducing this guidance the pharmaceutical industry used a traditional approach for process development and regulation: A rigid manufacturing process with batch to batch quality controls and no methodical connection between process, product and clinical application. The QbD paradigm, imposed by the ICH guidelines, was defined as “a systematic approach to development that begins in predefined objectives and emphasises product and process understanding and process control based on sound science and quality risk management” [4]. The objective of this approach is to “build quality into the product” rather than “testing quality into the product” [7, 8]. Thereby manufacturers can reduce the post-commercial filings for process changes, leading to greater flexibility in biopharmaceutical production and quality control. A general roadmap for successful implementation of the QbD philosophy is shown in Figure 1.

The streamlined operation starts with the product and process definition, identification of process parameters and a general risk assessment, often using the Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) [9, 10]. Subsequent process characterizations are typically performed in qualified scaled-down models, using a Design of Experiments approach to set up conclusive experiments [11, 12]. An analysis of the compiled results leads to the definition of a designated Design Space [13]. The FDA defines Design Space as “the multidimensional combination and interaction of

input variables that have demonstrated to provide assurance of quality” [4].

Thereby, design space can be described as the acceptable range of process parameters, which is located in a broad characterisation range and inherits the operating range with optimal set points. Working within the defined design space is therefore not considered to be a process change and hence needs no further validation, resulting in cost savings and the maintenance of a steady workflow.

This work will focus on the QbD implementation of a monoclonal Antibody (mAb) production process using a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell cultivation process [14, 15]. Concrete QbD case studies, like the CMC Biotech Working Group for mAb production processes and the following downstream part are published [16]. Yet, reports on the QbD implementation on early process steps, namely the inoculum expansion, are still limited. It consists of multiple cell passages, which involve the transfer of a defined cell number into fresh culture medium. By passaging with specific intervals the inoculum is expanded, while maintaining the cells in a healthy and actively growing state [17]. Thereby the predefined cell concentration for inoculation of the production process is achieved. This early phase of said processes is still not as frequently monitored and regulated as the production part in larger bioreactors and often falsely treated as a “black box” with no crucial impact on the following process. The critical impact of early phase parameters was not yet investigated thoroughly and is therefore not fully understood. As envisioned by the ICH guidelines, the QbD philosophy should be applied throughout the entire lifecycle of a biopharmaceutical product [4, 18]. This work will therefore create a linkage between process parameters of the inoculum expansion and process performance of the production process. A schematic overview of the process is shown in Figure 2.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell line and material

For this study a DG44 CHO suspension cell line producing an IgG1 monoclonal Antibody (mAb) was used (Sartorius Stedim Cellca GmbH). Cells were cultivated in shake flasks (Corning, USA) in a Heracell 240 CO₂ Incubator (Thermo Scientific, USA) using a MaxQ CO₂ Plus shaker platform (Thermo Scientific, USA). The cultivation was performed in proprietary and chemically defined cell culture media, all part of the Sartorius Stedim Cellca medium platform. The inoculum expansion was performed using stock medium (SM), whereas the production process used production medium (PM). Additionally, two feeds were used during the production process. Macro nutrients (e.g.

FIGURE 1 Schematic strategy for implementation of QbD and determination of a process design space in a biopharmaceutical production process. CPP, critical process parameter; CQA, critical quality attribute; DoE, design of experiments; QTPP, quality target product profile

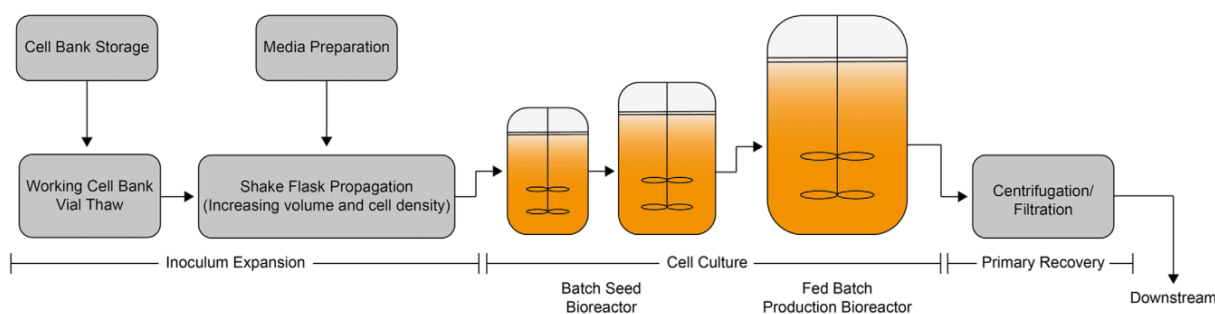
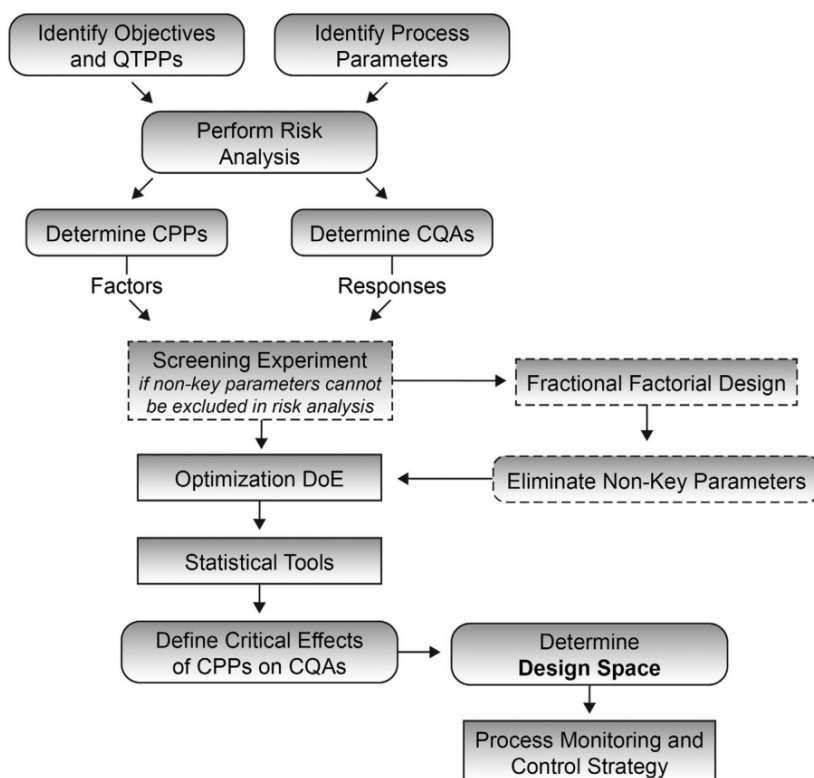


FIGURE 2 Schematic representation of the process workflow of monoclonal antibody cell cultivation in larger scale

glucose) were added using feed medium A (FMA), while micro nutrients (e.g. amino acids) were supplemented using feed medium B (FMB) (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Germany).

For the first passage of inoculum expansion a cryo vial, containing 1 mL CHO suspension (30×10^6 cells/mL), was thawed and transferred to a 15 mL Falcon tube (Sarstedt, Germany) with 10 mL stock medium. The suspension was centrifuged at $190 \times g$ for 3 min using a Microstar17 centrifuge (VWR International, USA). After removal of the supernatant, the pellet was resuspended in 10 mL pre-warmed (36.8°C) stock medium and transferred to a 500 mL shake flask with 140 mL pre-warmed stock medium. The inoculum expansion was conducted over

16 days at 36.8°C and 7.5% CO_2 with a shaking rate of 120 rpm. Cells were passaged by centrifugation of the needed amount of cell suspension, removal of the supernatant and resuspension in fresh stock medium to the initial passage viable cell density (VCD). During the first three passages, the required amount of methotrexate (MTX) was added to the stock medium. From the second passage, 125 mL shake flasks with a working volume of 25 mL were used for the experiments.

The production process was performed in 125 mL shake flasks with 25 mL pre-warmed production medium. All production cultivations were inoculated to an initial viable cell density of 0.3×10^6 cells/mL and run over 8 days with daily feeds (1% feed medium A, 0.1% feed medium B) from

day 3. Due to the cultivation in shake flasks the pH and the dissolved oxygen were not controlled, yet the process was previously analyzed and shown to be reproducible and comparable to bioreactor cultivations of different scales. To improve the comparability all experiments were simultaneously conducted in the same incubator with identical process conditions.

2.2 | Analytics

Samples were taken daily during the inoculum expansion as well as during the production process. Viable cell densities and viabilities were measured using a Cedex HiRes (Roche Innovatis, Swiss) with a 1:2 dilution in 10 % phosphate-buffered saline (PBS). Growth rates of the production process were calculated by linear regression of the natural logarithm of viable cell densities against culture duration. The inoculum growth rate relates to the respective last passage of every inoculum expansion (N-1-step), in order to ensure optimal comparability of the examined factor effects. Viabilities were calculated as average over the culture duration for the inoculum expansion as well as the production process. The mAb titer was analyzed during the production process by using the Cedex Bio (Roche, Swiss). Therefore, cell separation was performed by centrifugation for 5 min at 190 x g. Specific antibody titers were calculated by dividing the final antibody titer by the integral viable cell concentration over the entire production process duration.

2.3 | Failure mode and effect analysis (FMEA)

The risk assessment was performed using the FMEA approach [9]. The FMEA divides the potential risk into three main factors. The Probability (P) evaluates the likelihood of a possible failure mode. Failure impact on the system and the product are assessed by the Severity (S). In addition, the Detection (D) assesses the possibility to detect and correct a failure mode. These factors were rated on a scale between 1 and 5 individually for each process parameter. Multiplication of these ratings resulted in the Risk Priority Number (RPN) for each respective parameter.

2.4 | Design of experiments (DoE)

The design and analysis was performed using the DoE software MODDE 12 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Germany). The three parameters with the highest RPN during the risk assessment were used as factors

(F_1 = MTX concentration, F_2 = passage duration, F_3 = initial passage viable cell density) for a central composite design with three centre-point runs. The resulting design is illustrated in the supplements. Hereinafter, the factor settings are described as 0 for centre-point level and $-1/1$ for the low and high levels of the full factorial cube, respectively. The additional levels for the star of the central composite design are described as -2 and 2 .

The initial viable cell density of each passage was varied equally between 0.1 and 0.3×10^6 cells/mL with a step size of 0.05×10^6 cells/mL, while the MTX concentration was varied between 0 and 30 nM with a step size of 7.5 nM. The passage duration was varied without any additional level between 2 , $3/4$ and 5 days with a constant total inoculum expansion time of 16 days. A passage duration lower than -1 level was not possible, because shorter passages than 2 days did not result in the minimum viable cell number needed for sufficient inoculum expansion. Also the total duration of all experiments was preserved at 16 days. According to the process development, this is the time needed to expand the inoculum to the minimum viable cell number for inoculation of larger production bioreactors. Therefore, a plane star was applied in this design, which resulted in a total of 15 runs.

All 15 runs were cultivated simultaneously in the same incubator. To improve the comparability of the runs, one vial thaw and centre-point passage one was used to inoculate the following 15 experiments under described levels. The factor changes were implemented on every seed step from the second passage onwards. Also, all runs respective last passage was run over 3 days, to compare the final growth rate and enable production process inoculation on the same day. Passage duration centre-point runs were passaged every $3-4$ days, resulting in a total of five inoculum expansion steps. The -1 level runs were passaged every 2 days, the 1 level runs every 5 days, resulting in a total of 7 and 4 passages respectively (see Figure 4). An overview of the experimental set up and the explained numerical coding of the parameter levels are depicted in the supplements. Six different responses were analysed: Inoculum viability, inoculums growth rate, production viability, production growth rate, total mAb titer and specific mAb titer. The responses were predicted by using the following model:

$$R_i = p_0 + p_1F_1 + p_2F_2 + p_3F_3 + p_4F_1^2 + p_5F_2^2 + p_6F_3^2 + p_7F_1F_2 + p_8F_1F_3 + p_9F_2F_3$$

Here, R_i is one of the six responses, p_0 is the intercept, p_j are the coefficients of the factors F_1 , F_2 and F_3 . Factors whose coefficient has the value zero in its confidential

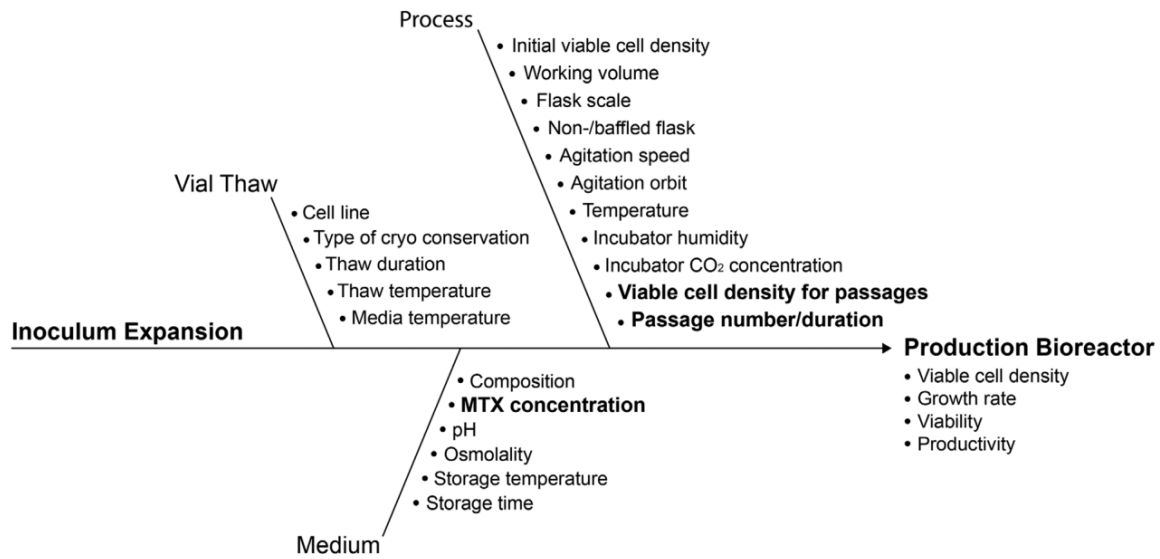


FIGURE 3 Ishikawa diagram for the inoculum expansion. Bold parameters were determined as critical and therefore examined during this study

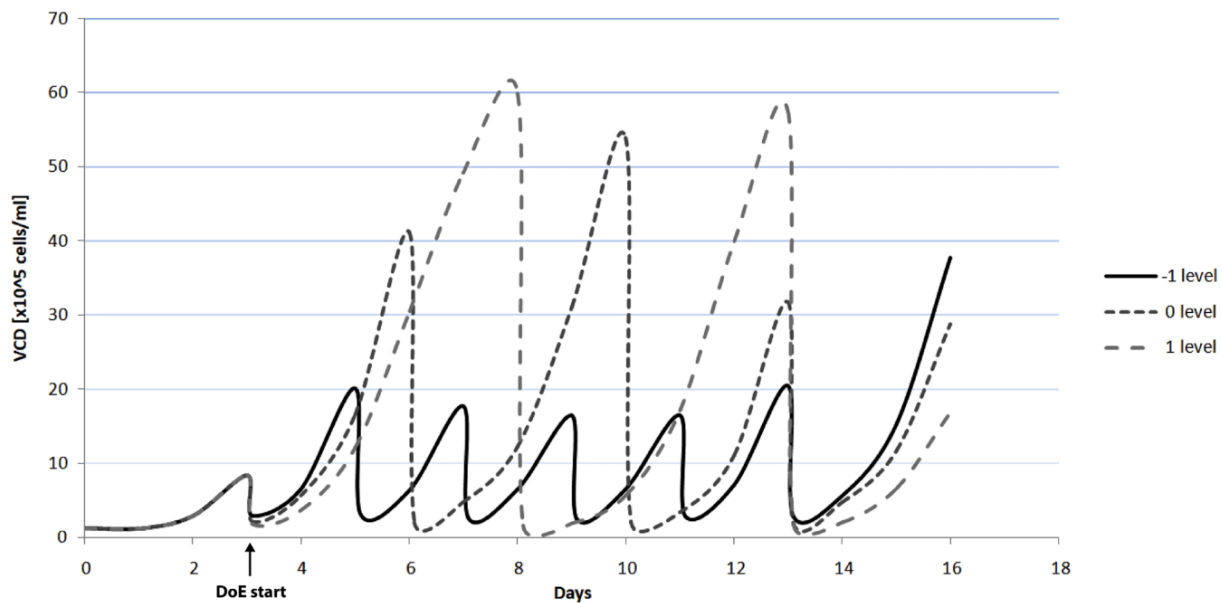


FIGURE 4 Viable cell densities during the inoculum expansion for experiments with -1/0/1 levels for the passage duration. Cells were split to 0.2×10^6 cells/mL for each passage

interval are regarded to have no significant influence on the response and are therefore removed from the model.

2.5 | Multivariate data analysis (MVDA)

Multiple linear regression (MLR) was used to fit the mathematical model. Various model statistics were investigated

in order to evaluate the conducted model. The R-squared (R^2) term is the fraction of the variation of the response explained by the model. The adjusted R-squared (R^2_{adj}) term is adjusted for the degrees of freedom of the model.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

$$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p}$$

Here, y_i , \hat{y}_i , and \bar{y} are the measured data, the prediction of calibration data and the mean of the measured data, respectively; n is the number of measurement points and p the number of parameters. Statistical accuracy of future predictions of the model is estimated by the Q-squared (Q^2) term. If the y data are not used for calibration, then the Q^2 is calculated as follows.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

The model p -value represents the significance of the fitted model. It tests the null hypothesis, that the coefficient is equal to zero, for each term. Here, the p -value belongs to an f -test, which compares an intercept-only model (just a constant $y = \text{const}$) with the model under consideration (R_i). The tested null hypothesis is that a fit of the intercept-only model and the model R_i are equal. The reproducibility r compares the replicate variability to the overall variability of the experimental data.

$$r = 1 - MS_{pe}/MS_{tot}$$

Here, MS_{pe} is the mean square of the pure error and MS_{tot} the total mean square of y . A reproducibility value of 1 signifies perfect reproducibility.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

In order to investigate possible influences of the inoculum expansion on the production process, critical process parameters must be identified and assessed based on a design of experiment to establish a design space for this early process step. During this evaluation the effects of the inoculum expansion on the production process must be considered as target values for a high quality process.

3.1 | Risk assessment

All possible process parameters were listed in an Ishikawa diagram (Figure 3), which depicts potential root causes for specific failure events during the studied process. The parameters were categorized in different parts of the inoculum expansion, namely the vial thaw, the medium and the process.

Historical data as well as profound process understanding were used to rank process parameters according to

their potential risks for the process robustness and productivity. Hence, a Failure Mode and Effect Analysis approach was used. The probability, severity and detectability of each parameter were rated individually and multiplied, resulting in the respective risk priority number.

Some specific parameters, like general media composition and cell line, were not taken into account during the risk assessment because they were profoundly analysed and optimized during process and media development. Others like the temperature and incubator CO_2 concentration were ruled out during risk assessment due to the optimized control of the used incubator. This results in low failure probability and high detectability of possible failure modes like loss of CO_2 pressure. Since the process was shown to be replicable in scaled down bioreactors, parameters like the flask scale were also known to be non-critical for the process [19]. The threshold RPN to consider a parameter to be critical for the system- and product robustness was determined to be 15, representing a moderate to significant risk of at least two of the FMEA factors. Critical process parameters identified in this way are shown in bold in Figure 3 and are represented in Table 1. The complete FMEA table is summarized in the supplements.

The methotrexate concentration has a significant influence on the antibody production and severe toxic effects on the CHO cells (Severity = 5) [20]. A failure in adjusting the MTX concentration within the stock medium is furthermore not easily detectable during the later process steps (Detection = 4). Therefore, the MTX concentration was considered a critical parameter and used as factor F_1 in the DoE, despite the low failure probability (Probability = 1) due to standard operation procedure and good laboratory manufacturing practise.

For the passage duration (F_2), the balance between too short passages, leading to an insufficient viable cell density for the expansion of the seed steps, and too long passages, leading to consumed nutrients, can be a critical aspect (Severity = 3). Also this parameter can be of special interest because other failures in the system, e.g. the preparation of the production bioreactor, can lead to a delay in the process and longer passage duration. Likewise, the tight schedule in production and a failure in seed culture could lead to shortened time available for the new inoculum expansion (Probability = 3). In reality, the layout of the inoculum expansion can also be dependent on other factors like working hours and days in the industry. Therefore, the understanding of the impact of the passage duration in combination with the other critical process parameters is needed to define a robust design space for the inoculum expansion.

Failures in the initial passage viable cell density (initial passage VCD) would be detected quickly; however, a

TABLE 1 Failure mode and effect analysis (FMEA) results for the examined parameters

	Probability	Severity	Detection	RPN
MTX concentration	1	5	4	20
Passage duration	3	3	2	18
Initial passage VCD	2	2	4	16

Probability, severity and detection were individually rated between 1 and 5. In words, 1 represents no potential risk, 3 moderate/controllable risk and 5 significant risk

readjustment is virtually impossible without time consuming preparation of new shake flasks and medium (Detection = 4). The readjustment of the passage viable cell density is also logistically impossible in a scaled-up approach with seed bioreactors due to the preparation of the needed reactor. The probability of a failure was considered to be low yet possible, due to rare inaccuracies during the passages (Probability = 2). It was also considered to show a direct non-severe impact on the nutrient consumption and thereby the growth rate and viability (Severity = 2). Therefore, the initial passage VCD is used as factor F_3 .

3.2 | DoE concept and implementation

The ICH Guidelines determined the implementation of a Design of Experiments approach to investigate the single and combined influence of critical process parameters. Accordingly, the MTX concentration (F_1), the passage duration (F_2) and the initial passage viable cell density (F_3) were combined in a central composite DoE.

The initial passage VCD as well as the MTX concentration were varied on a five level scale (-2,-1,0,1,2), while the passage duration could only be varied on three levels (-1,0,1). As explained in the Material and Methods, a passage duration lower than 2 days (-1 level) did not result in the minimum viable cell number needed for sufficient inoculum expansion. Longer passages than 5 days (1 level) did not fit in the experimental design and total inoculum expansion duration of 16 days. Furthermore, previous experiments show that inoculum expansion passages of more than 5 days result in severe negative effects due to consumed nutrients. The centre-point experiment on level 0 was conducted with four passages of 3 days and one passage of 4 days to fulfil the total duration of 16 days. The respective last passage of every experiment was cultivated 3 days before inoculation of the production processes. Figure 4 visualizes the passage duration principle by plotting the viable cell densities of three different runs (-1, 0, 1).

During the inoculum expansion the growth rates and cell viabilities of each experiment were monitored as responses for the early process steps. The growth rate was calculated for the respective last passage of the inoculum

expansion. These responses provide specific information on the inoculum expansion culture. The growth rate determines when the minimum viable cell number for inoculation of the next passage or the production bioreactor will be reached. An inoculum expansion with a high proliferation rate also shortened the lag phase of the production process. Therefore, improvements in the inoculum growth rate could lead to reduced process time and production costs. A maximized viability during the inoculum expansion is crucial for the maintenance of the culture and the successful inoculation of the production bioreactor.

In order to investigate the influence of the determined inoculum expansion process parameters on the later process steps, all inoculum cultures were used to inoculate scaled-down production processes. These were simultaneously cultivated at standard conditions and sampled daily. The growth rates, average viabilities and the antibody titer were monitored as responses for the later state of the process. To obtain an optimal production process all of these responses should be maximized. A high growth rate leads to an early reach of an acceptable VCD for sufficient antibody production rates. An optimal viability ensures the maintenance of the culture during the entire production process. Moreover, the high viability is important to minimize the amount of cell debris, DNA and HCPs that are released to the medium and have to be removed expensively during the downstream part. To provide a profitable process the final product titer obviously has to be maximized. Additionally to the antibody titer, the specific titer was investigated as a response. It elucidates the cell specific productivity for the studied culture conditions. Thereby, it is possible to establish a specific production control between optimized growth and productivity. Typically, quality attributes in the biopharmaceutical industry include the quality of the product, such as the bioactivity or the glycosylation of the antibody. Yet, we concluded that the quality attributes for the inoculum expansion in our experimental set up have to be the condition of the final inoculum. That includes the growth rate, viability and also the productivity of the following production process. These were rated as sufficient responses for a meaningful conclusion regarding the inoculum expansion performance and its direct influence on the production.

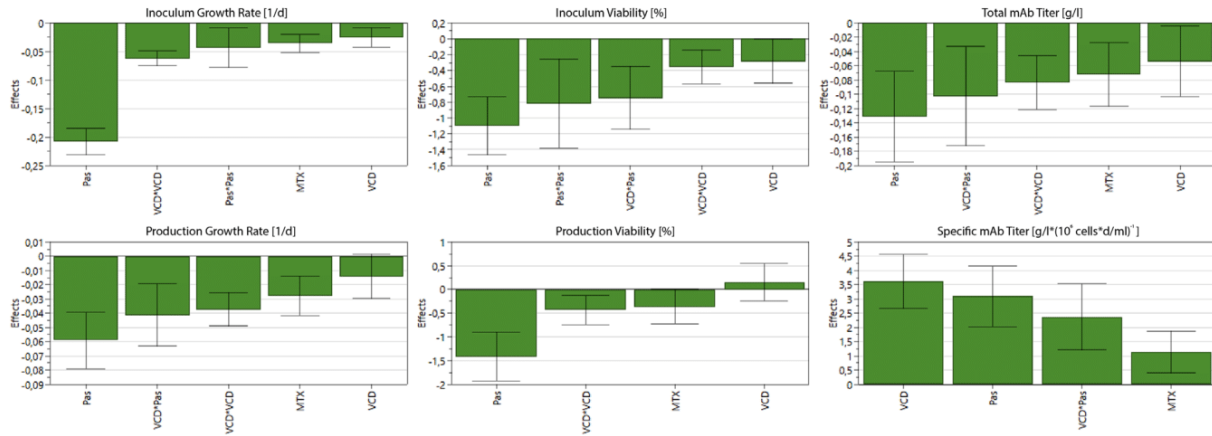


FIGURE 5 Factor (parameter) and its interaction effect plots for the inoculum expansion and production process responses. Not shown parameters as well as parameters whose confidential interval includes zero were determined to have no significant effect on the respective response (Pas, passage duration, MTX, TX concentration, VCD, initial passage viable cell density)

3.3 | Multivariate data analysis

Multiple linear regression (MLR) was used to analyse the factors and evaluate the responses (inoculums viability, inoculums growth rate, production viability, production growth rate, total mAb titer and specific mAb titer) by fitting mathematical models. The regression models were used to determine effects of the studied factors (process parameters) and their interactions. Factors, which include zero in its confidential interval, are insignificant and hence eliminated from the corresponding model. The resulting main effects are plotted in Figure 5. Most of the parameters and parameter interactions show negative coefficients for the prediction of the growth rates and viabilities of the inoculum expansion and the production process as well as the total mAb titer. The passage duration shows the most considerable influence, both as a linear effect (Pas) for all responses as well as a non-linear effect (Pas*Pas) for the inoculum responses. Furthermore, it shows strong effects in the interaction with the initial passage viable cell density (VCD*Pas). Its negative coefficient on the growth rate and viability can be explained by the consumption of important nutrients as well as the aggregation and stress of cells at higher cell densities during the inoculum expansion. The fact that those effects are still detectable in the production process, supports the hypothesis that parameter effects from the early process steps indeed carry over to the production process. This certainly shows the severe influence of the inoculum expansion on later process steps. A slightly lower but still significant negative coefficient on all responses was observed for the initial passage viable cell density (VCD), which can also be explained by its strong connection to the nutrient consumption and cell interaction from the beginning of every passage. The MTX con-

centration (MTX) only showed negative linear effects on the production process responses, which again underlines the importance of early process monitoring and control strategies.

Negative coefficients regarding the total mAb titer can be explained by the connection between viable cell density and total product concentration. Evidently, a higher cell count during the cultivation leads to an increased titer. Therefore, the explained negative effects on the growth rate influence the total mAb titer, which is why the specific mAb titer was calculated and used as an additional response. In contrast to the discussed responses, the studied parameters show consistently positive effects on the cell specific mAb titer. This could signify that cells, growing under suboptimal cultivation conditions in regard to growth and viability, show an increased specific antibody production. Again, the passage duration (Pas) and its interaction with the initial passage viable cell density (VCD*Pas) show the most significant effects, supporting the concept of counteraction between optimal growth and specific productivity. Also, the MTX concentration (MTX) shows a comparatively high effect on the specific mAb titer, indicating the importance of balance between selection pressure and ideal cultivation conditions.

To investigate the meaningfulness of the regression models, various model statistics were analysed. The full model statistics table is shown in the supplements. All models show a good fit to the experimental data with R^2 and R^2_{adj} values mostly over 0.9. The Q^2 term, representing the predictive power of the model and its ability to generalize to unseen data, is also sufficient for all responses with the lowest value for the production viability at 0.62. Model significance, represented by the p-value, shows a great meaningfulness for all responses with values close

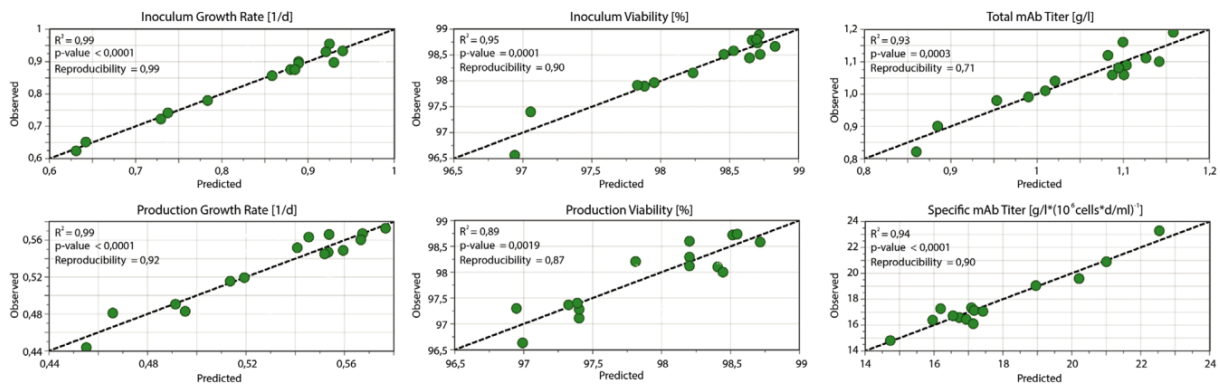


FIGURE 6 Observed versus predicted plots for the inoculum expansion and production process responses

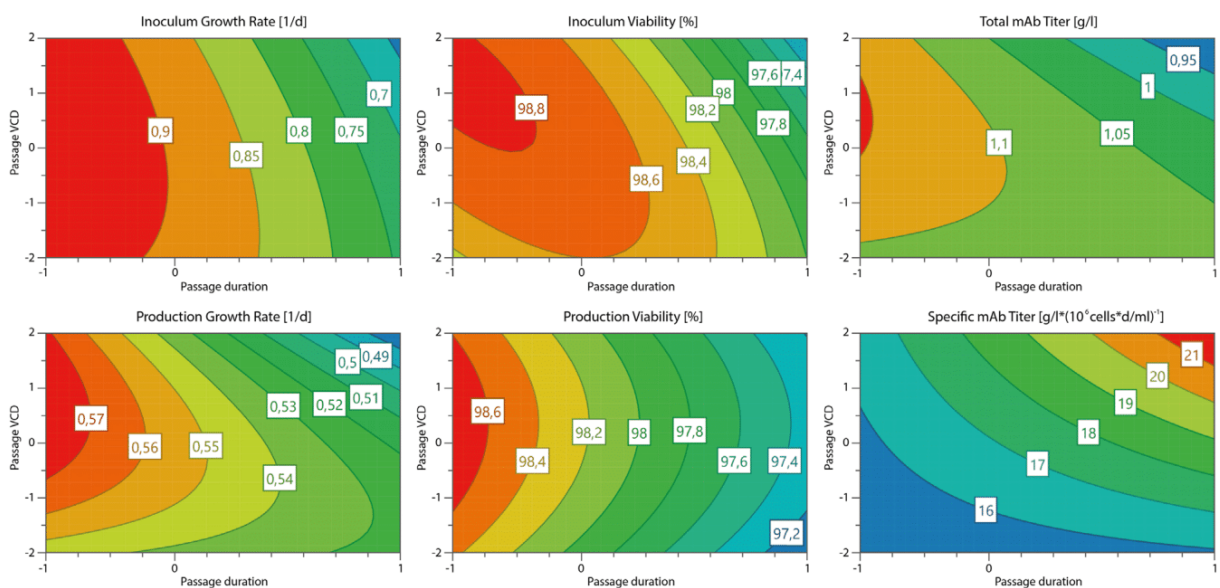


FIGURE 7 Response contour plots showing results for inoculum expansion and production process responses

to zero. Also the reproducibility of the model is ensured for all responses with reproducibility values all over 0.7. In summary, the model statistics elucidate well fitted regression models for all selected responses. Also, the predictive power as well as the reproducibility is sufficient for the analysis of parameter effects. Since the model shall be used for future predictions and the establishment of a design space, the predictive power is particularly important. Thus, the observed response values were plotted against the predicted response values, to enable further insights on the model and possible outliers. The resulting observed vs predicted plots for all responses are shown in Figure 6.

For the evaluated responses the plots show an overall strong predictive power. Furthermore, this plot allows an explanation for the comparatively low model statistic values of the production viability. It can show possible indi-

vidual outliers as well as the biggest overall spread of data points. These were further investigated by analysis of the response residuals and the normal probability of distribution, which implied no significant outliers. In summary, the models were verified by analysis of the model statistics and the observed vs. predicted plot. Overall well fitted models with strong predictive power and a great reproducibility were determined.

The observed interaction effects of the passage duration and the initial passage VCD were further investigated by analysis of the response contour plots shown in Figure 7. These provide a two-dimensional illustration of the combined parameters and their impact on the respective response. All represented growth rates and viabilities as well as the total mAb titer show similar contour plots. The estimated optimum for these responses is close to the

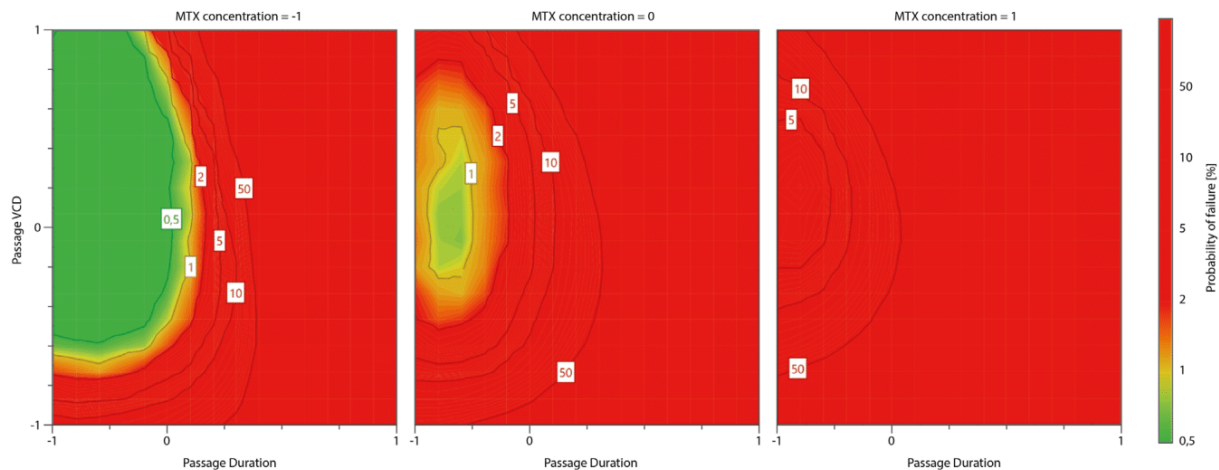


FIGURE 8 Determined design space for the inoculum expansion and production process viability/growth rate and the antibody titer with colour coded probability of failure

-1 level for the passage duration and slightly higher than the 0 level for the initial passage VCD. Passage durations lower than -1 level were practically not possible because passages shorter than 2 days did not result in the minimum viable cell number needed for sufficient inoculum expansion. That is why the passage duration levels could not be shifted further towards the estimated optimum. A passage duration longer than the 0 level resulted in worsened response values for all said responses.

Furthermore, the non-linearity as well as the interaction of the parameter effects, which were observed in the effect plot, is detailed in the contour plots. This can be seen particularly in the inoculum viability contour plot with an anticipated optimum at -1 level for the passage duration and 1 level for the passage VCD. The presence of a predictable optimum underlines the effect interaction of factors. Shown similarities between the inoculum expansion and the production process responses also underline the hypothesis that the early process steps have a considerable influence on the production process. These investigations highlight the importance of a sound monitoring and control strategy for the shown parameters.

The total mAb titer was shown to be the most robust response in relation to the passage duration and the initial passage VCD. Again, the optimum was anticipated below -1 level for the passage duration. Besides that, the contour plot shows a substantial robust working area with no considerable loss in antibody titer. That is likely due to the cell line and process development, which was focused on the optimization of the produced antibody titer.

In contrast, the specific antibody titer shows an estimated optimum at the upper end of the examined space. Increasing passage duration as well as increasing initial passage viable cell density equally improved the specific

productivity of the cells. Anyway, the increased productivity could still not compensate the negative effects on the growth rate and therefore the total cell number and final product titer. Taking only the studied factor effects into account, it was shown to be yet more worthwhile to improve the growth and viability of the cells in order to increase the total mAb titer.

Therefore, the respective growth rate and viability responses as well as the total mAb titer response were used for further investigation. On that basis a design space for the studied process was calculated. Monte Carlo simulations were used to compile the needed probability statistics. The resulting design space is shown in Figure 8. It visualizes the region in the experimental design where all response specifications are fulfilled with given probabilities. These specifications were experimentally accounted and adjusted with profound process knowledge which was expanded during this study.

A robust design space, marked in green, was determined around the -1 level for the passage duration and 0 level for the initial passage viable cell density. Increasing MTX concentration shows a negative effect on said design space. The set standard operation for the passage duration is located at the boundary of the acceptable probability values. Consequently, it would be beneficial for the process safety to either decrease the MTX concentration to broaden the design space or to shorten the passage duration to shift the process further towards the design space midpoint. Mathematical optimization of the three parameters resulted in the following optimal set points. The passage duration and the MTX concentration should therefore be decreased to 2 days and 7.5 nM, while the initial passage viable cell density should be slightly increased to 0.225×10^6 cells/mL.

4 | CONCLUDING REMARKS

The quality by design principle determined by the FDA was applied to the early process steps of a CHO cell cultivation. Inoculum expansion process parameters were compiled and potential risks were assessed by failure mode and effect analysis. The impact of selected parameters and their interactions were investigated using a design of experiments approach in scaled down shake flasks. Multivariate data analysis was used to analyse the experimental data and calculate regression models fitting to the measured responses. Analysis of the effect- and response contour plots identified the passage duration as a key process parameter and its interaction effects with the initial passage viable cell density as a crucial part of the studied process. It also showed that the parameters in the inoculum expansion have a critical impact on later production process performance.

A reduced MTX concentration and passage duration improved the overall viability and growth rate of the inoculum expansion and the production process. Additionally, an opposite effect of the studied process parameters on the specific productivity was observed, which still could not compensate the discussed negative coefficients in terms of total mAb production. Further analysis of the responses resulted in the definition of a design space for the studied parameters. It showed the acceptable working range for the process, which could be expanded with decreased MTX concentration. Furthermore, it was shown to be robust for a mean initial passage viable cell density, while the optimum for the passage duration was found at the experimentally possible minimum. Based on these results, the early process steps were assessed as a critical part of the process and should consequently be investigated and analysed for newly developed processes and subsequently monitored and controlled using appropriate PAT possibilities.

Leading forward, the findings of this study will be connected to parameter effects of the production process to further increase the understanding of the process. In the course of those future studies, experiments will be carried out using the Ambr® microbioreactor platforms by Sartorius Stedim. In order to achieve further insights, product quality attributes, namely the bioactivity, glycosylation and charge variants of the produced mAb will be taken into account. Thereby, this study is considered to be the first step towards a full process characterization regarding QbD principles, highlighting the importance of early process understanding and investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

We confirm that all corresponding authors agree with the submission and publication of this paper and that there is no conflict of interest concerning financial and personal relationships. The manuscript does not contain neither experiments using animals nor human studies. Furthermore, we confirm that the article has not been published previously by any of the authors and is not under consideration for publication elsewhere at the time of submission.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

REFERENCES

- Rathore, A. S., Winkle, H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 9.
- US Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century—A risk-based approach. 2004. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/Manufacturing/QuestionsandAnswers/CurrentGoodManufacturingPracticescGMPforDrugs/UCM176374.pdf>.
- Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. PAT Guidance for Industry – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance. 2004.
- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical development Q8(R2). 2009. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q8R1/Step4/Q8R2Guideline.pdf>.
- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Quality risk management (Q9). 2005. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9Guideline.pdf>.
- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical quality system (Q10). 2008. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10Guideline.pdf>.
- Snee, R. D. Quality by design: Building quality into products and processes. in: Zhang, L. (Ed.), *Nonclinical Statistics for Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Springer International Publishing 2016, pp. 461–499. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23558-5_18.
- Abu-Absi, S. F. et al. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 106, 894–905.
- Mollah, A. H. Application of Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) for Process Risk Assessment. *Bioprocess Int.* 2005, 5.
- Zhang, L., Mao, S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian J. Pharm. Sci.* 2017, 12, 1–8.
- Rathore, A. S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* 2009, 27, 546–553.

12. Li, F. et al. A Systematic Approach for Scale-Down Model Development and Characterization of Commercial Cell Culture Processes. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 696–703.
13. Nagashima, H., Watari, A., Shinoda, Y., Okamoto, H., Takuma, S. Application of a Quality by Design Approach to the Cell Culture Process of Monoclonal Antibody Production, Resulting in the Establishment of a Design Space. *J. Pharm. Sci.* 2013, 102, 4274–4283.
14. Metze, S., Ruhl, S., Greller, G., Grimm, C., Scholz, J. Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2020, 43, 193–205.
15. Claßen, J. et al. A novel LED-based 2D-fluorescence spectroscopy system for in-line bioprocess monitoring of Chinese hamster ovary cell cultivations—Part II. *Eng. Life Sci.* 2019, 19, 341–351.
16. CMC Biotech Working Group. A–Mab: A Case Study in Bioprocess Development; Version 2.1. ISPE, International Society for Pharmaceutical Engineering.
17. Kloth, C., Maclsaac, G., Ghebremariam, H., Arunakumari, A. Inoculum Expansion Methods, Recombinant Mammalian Cell Lines. in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2010.
18. Yu, L. X. et al. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J.* 2014, 16, 771–783.
19. Janoschek, S., Schulze, M., Zijlstra, G., Greller, G., Matuszczyk, J. 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.* 2019, 35, e2757.
20. Bellingham, D. L., Sar, M., Cidlowski, J. A. Methotrexate-induced overexpression of functional glucocorticoid receptors in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1992, 83, 153–171.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Böhl OJ, Schellenberg J, Bahnemann J, Hitzmann B, Scheper T, Solle D. Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process. *Eng Life Sci.* 2021;21:196–207.
<https://doi.org/10.1002/elsc.202000056>

4.2 Optimierung eines mAb-Produktionsprozesses im Hinblick auf Robustheit und Produktqualität mithilfe von Quality by Design Prinzipien

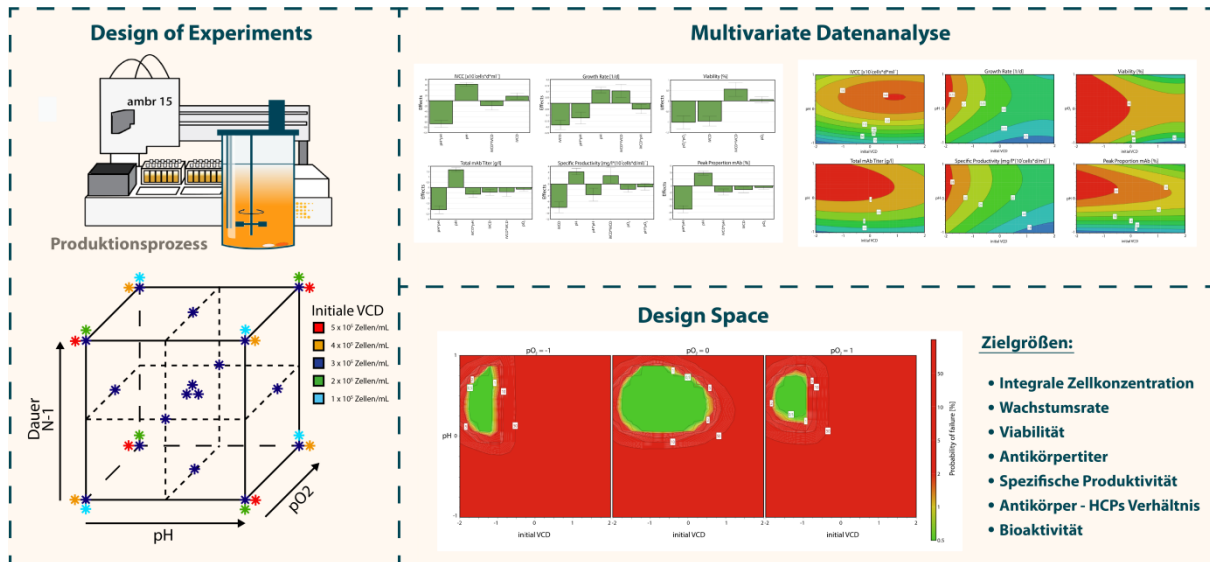


Abbildung 4.2 Graphical abstract zu dem Manuskript „Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using Quality by Design principles“

Im Anschluss an die Vorkulturuntersuchungen wurde der QbD Ansatz zur Analyse und Optimierung des Produktionsschrittes eingesetzt. Dabei wurde der Fokus zunächst auf intermediäre Qualitätsattribute, wie Zellwachstum und Viabilität, gelegt bevor im weiteren Verlauf die Produktivität und Produktqualität betrachtet wurden. Damit schließt sich diese Studie direkt an die Untersuchung der Vorkultur an und bildet so den zweiten Teil der *Upstream*-Prozesscharakterisierung.

Die Prozessparameter wurden erneut mittels Ishikawa-Diagramm gesammelt und anhand einer FMEA nach dem potentiellen Risiko für die Prozess- und Produktqualität bewertet. Dabei wurden gewonnene Erkenntnisse des vorherigen Artikels mit in die Risikoanalyse einbezogen⁸⁹. So wurde der Einfluss der initialen Zelldichte der Kultivierung aufgrund der Ergebnisse der Vorkultur als kritisch bewertet. Auch die Dauer der Vorkulturpassagen zeigte große Effekte in der vorausgehenden Studie, weshalb die Dauer der N-1 Passage ebenfalls als kritischer Faktor für den Produktionsprozess festgelegt wurde. Darüber hinaus wurden der pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration des Kulturmediums als CPPs identifiziert.

In dem entwickelten DoE wurde der pH-Wert zwischen 6.9 - 7.3, die Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen 40% - 60% und die N-1 Dauer zwischen 2 - 4 Tagen variiert. Diese Faktoren wurden in einem CCF Design vollfaktoriell mit drei Mittelpunktreplicaten beschrieben. Zusätzlich wurde die initiale Zelldichte auf fünf Stufen zwischen $1 - 5 \times 10^6$ Zellen/mL variiert und teilfaktoriell auf den Eckpunkten des Würfels in das experimentelle Design integriert. Zur Optimierung der Durchführbarkeit und der Vergleichbarkeit der 33 experimentellen Läufe wurden die Kultivierungen als *scale-down* Modell in dem Ambr®15 Mikrobioreaktorsystem durchgeführt. Dies ermöglicht eine schnellere Versuchsdurchführung und zusätzlich optimale Kontrolle der zu untersuchenden Prozessparameter.

Als Zielgrößen wurden die Wachstumsrate und die integrale Zellkonzentration als Maß für das Zellwachstum und den Zellerhalt berechnet. Diese erlauben mögliche Rückschlüsse auf eine verzögerte Prozessdauer und damit verbundene Produktionskosten. Zur weiteren Analyse des Zellzustandes wurde die Endviabilität betrachtet, da eine hohe Viabilität während des Prozesses geringe Mengen an Zelltrümmern, DNA und HCPs sicherstellt. Diese Verunreinigungen sind zu minimieren, da durch erhöhte Konzentrationen der anschließende *Downstream*-Prozess aufwendiger und kostenintensiver gestaltet werden muss. Als intermediäre Qualitätsattribute der Antikörperproduktion wurden der Gesamttiter, die spezifische Produktivität, sowie das Verhältnis von produziertem mAb zu HCPs untersucht.

Mittels MVDA wurden die Faktoreffekte und -Interaktionen festgestellt und der entsprechende *Design Space* für den Produktionsprozess definiert. Im Anschluss wurden zur Validierung der Ergebnisse drei Versuchspunkte mit Standard-, verbesserten und verschlechterten Bedingungen definiert, welche für eine erneute Kultivierung im Ambr®15 System genutzt wurden. Die produzierten Antikörper aus den Validierungskultivierungen wurden zusätzlich auf ihre Bioaktivität untersucht, welche ein direktes Produktqualitätsattribut darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die initiale Zelldichte und der pH-Wert des Mediums Schlüsselparameter für die Qualität des Produktionsprozesses darstellen. Dabei bestätigten die Effekte der initialen Zelldichte die Erkenntnisse aus den Vorkulturexperimenten im Hinblick auf den Substratverbrauch und damit die

Prozesskontrolle. So muss bei Abweichungen der initialen Zelldichte die Feeding-Strategie auf den veränderten Substratverbrauch angepasst werden um eine Substratlimitierung oder Überfütterung der Zellen zu verhindern. Der pH-Wert zeigte einen nicht-linearen Einfluss, mit kritischen Effekten im niedrigen Bereich, sowohl für das Zellwachstum als auch die Produktbildung. Zusätzlich konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Endviabilität und dem Anteil an HCPs in dem Zellkulturüberstand festgestellt werden.

Die Berechnung des *Design Space* ergab ein Optimum für den pH-Wert von 7.2, während die initiale Zelldichte auf 0.2×10^6 Zellen/mL verringert werden sollte. Die Gelöstsauerstoffkonzentration sollte entsprechend dem Standardprotokoll auf 60 % geregelt werden. Veränderungen der N-1 Dauer zeigten nur geringfügige Einflüsse auf den Produktionsprozess, weshalb eine Verzögerung der Inokulation von weniger als zwei Tagen durch optimale Prozesskontrolle ausgeglichen werden kann. Die Validierungskultivierungen bestätigten die Ergebnisse der DoE Versuche, wobei die Untersuchung der Bioaktivität innerhalb der analysierten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede in der Produktqualität aufzeigte. Daraus wurde geschlossen, dass die Priorität in der Prozessführung auf optimalen Zellerhalt und hohe mAb Produktion gelegt werden sollte.

Im folgenden Artikel „*Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using Quality by Design principles*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.

RESEARCH ARTICLE

Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles

Ole Jacob Wohlenberg | Carlotta Kortmann | Katharina V. Meyer |
Jana Schellenberg | Katharina Dahlmann | Janina Bahnemann |
Thomas Scheper | Dörte Solle

Institut für Technische Chemie, Leibniz
Universität Hannover, Hannover,
Germany

Correspondence

Dörte Solle, Institut für Technische
Chemie, Leibniz Universität Hannover,
Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany.
Email: solle@iftc.uni-hannover.de

Abstract

Quality by Design principles are well described and widely used in biopharmaceutical industry. The characterization of a monoclonal antibody (mAb) production process is crucial for novel process development and control. Yet, the application throughout the entire upstream process was rarely demonstrated. Following previously published research, this study marks the second step toward a complete process characterization and is focused on the effect of critical process parameters on the antibody production efficiency and quality of the process. In order to conduct the complex Design of Experiments approach with optimal control and comparability, the ambr®15 micro bioreactor platform was used. Investigated parameters included the pH and dissolved oxygen set points, the initial viable cell density (iVCD) as well as the N-1 duration. Various quality attributes (e.g., growth rate, viability, mAb titer, and peak proportion) were monitored and analyzed using multivariate data analysis to evaluate the parameter effects. The pH set point and the initial VCD were identified as key process parameters with strong influence on the cell growth as well as the mAb production and its proportion to the total protein concentration. For optimization and improvement in robustness of these quality attributes the pH must be increased to 7.2, while the iVCD must be lowered to 0.2×10^6 cells/mL. Based on the defined design space, additional experiments verified the results and confirmed the intact bioactivity of the antibody. Thereby, process control strategies could be tuned toward high cell maintenance and mAb production, which enable optimal downstream processing.

Abbreviations: CQAs, critical quality attributes; DoE, design of experiments; EDV, ebola virus disease; mAb, monoclonal antibody; PAT, process analytical technology; QbD, quality by design.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by Wiley-VCH GmbH

KEYWORDS

ambr®, chinese hamster ovary, monoclonal antibody, process analytical technology, quality by design

1 | INTRODUCTION

The importance of monoclonal antibodies in the biopharmaceutical industry is continuously growing, with past market data indicating an increasing trend for 2022 and overall mAb sales reaching 130–200 billion US\$. [1] Current use cases and studies also underline the treatment possibilities of mAbs for novel diseases such as the Ebola Virus Disease (EVD) or the Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2 (SARS-CoV-2). [2–4] Rapid product and process development with a controlled production chain ensuring highest quality standards are necessary to enable fast approval and distribution of new therapeutic antibodies.

Therefore, the FDA launched a guidance protocol introducing the Quality by Design (QbD) approach, a risk-based workflow to biopharmaceutical product development and manufacturing. [5] Said protocol was based on the *Current Good Manufacturing Practice for the 21st century* initiative and consist of a framework for Process Analytical Technology (PAT) and multiple guidelines from the International Conference of Harmonisation (ICH). [6–10]

Until then, the development and manufacturing were limited by inflexible batch to batch quality controls as well as an unstructured relation between the process and the product application. The QbD approach aims to systematically improve a process toward product quality, regulatory compliance, cost reduction and fast track development. [11] In a split up approach individual process steps are investigated separately with specific intermediate quality outputs, before the gained results and process knowledge can be combined in a holistic way for the entire mAb production process. Therefore, the key objective of QbD with said method is to identify the intermediate critical quality attributes for the process, which can influence the products critical quality attributes (CQAs) as well as critical process parameters (CPPs) in order to establish a designated design space for the studied process. [12, 13]

The targeted roadmap for QbD implementation in the process development begins with a risk assessment, mostly using screening experiments and the Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) approach. [14] Parameters considered as critical for the process stability or product quality are further investigated in a Design of Experiments (DoE). This enables a structured connection between process in- and outputs to identify optimal process conditions for the predetermined targets, conclusively resulting in the design space. [15, 16]

A design space represents the multidimensional connection and interaction of process factors that assure a robust process operation and observance of CQAs. [7] Thereby, working within the factorial boundaries of the design space is not considered to be a change or risk for the conducted process, enabling a more flexible, cost saving, and steady workflow. The relationship of the design space with the characterized knowledge space and the control space with their associated factor ranges is depicted in Figure 1.

In this work, the main focus will be set on important intermediate process quality attributes like cell growth and viability as well as the mAb production efficiency and quality. In order to ensure sufficient product quality, the mAb proportion to total protein concentration and the bioactivity will be examined as indicators for the target product profile. Thereby, an optimization of the established process regarding the product yield with sufficient bioactivity can be achieved within the described QbD guidelines. Combination of these intermediate quality attributes will lead to the establishment of a designated design space for the production process.

Based on previous inoculum expansion studies, this marks the second step toward a complete process characterization. [18] While some case studies for QbD in mAb productions were conducted, the full process implementation is important for every novel biopharmaceutical product as well as a basis to gain general process knowledge and confidence in the presented QbD tools. [19] One major challenge toward this goal is the long process duration for Chinese Hamster Ovary (CHO) cell cultivations and the amount of experiments needed for a sufficient DoE and the subsequent modeling. In order to overcome this, while maintaining optimal process control and comparability, the experiments were conducted using the ambr®15 micro bioreactor system. [20, 21] These small-scale bioreactors are commonly used a scale-down model for fed batch processes and enable the parallel control of up to 24 cultivations. Thereby, a more rapid application of QbD strategies for the production process is possible.

2 | MATERIAL AND METHODS

The presented QbD principles will be implemented in the production step of an IgG1 monoclonal antibody (mAb) production process using a DG44 CHO cell line (Sartorius Stedim Cellca GmbH).

2.1 | Cell line and material

The inoculum expansion was performed as described by Boehl et al. [18] For the production process the cells were cultivated in the Ambr®15 system (Sartorius, Germany). The cultivation was conducted in proprietary and chemically defined cell culture media, all part of the Sartorius Stedim Cellca medium platform. Production medium (PM) and two additional feed media (feed medium A; feed medium B) for macro nutrients (e.g., glucose) and micro nutrients (e.g., amino acids) respectively, were used for the production process. [18, 21]

The cultivation was conducted over 11 days with daily feeds (1 % feed medium A, 0.1 % feed medium B) from day 3 and additional glucose feeds to a culture glucose concentration of 5 g/L from day 5. Feeding volume for needed concentrations was calculated by the ambr®15 software.

2.2 | Analytics

Samples were taken daily by the Ambr®15 liquid handler during the production process. Viable cell densities and viabilities were measured using a Cedex HiRes (Roche Innovatis, Switzerland) with a 1:2 dilution in 10% phosphate-buffered saline (PBS). Growth rates were calculated by linear regression of the natural logarithm of viable cell densities against culture duration. The pH and pO₂ were measured by the Ambr®15 system. Offset calibrations for the PH were performed using a FiveEasy Plus pH meter FP20-Micro (Mettler Toledo, USA) every two days.

The mAb titer and important substrates (e.g., glucose; amino acids) were analyzed during the production process using the Cedex Bio (Roche, Switzerland). Therefore, cell separation was performed by centrifugation for 5 min at 190 × g using a Microstar17 centrifuge (VWR International, USA). Specific productivities were calculated by dividing the final antibody titer by the integral viable cell concentration over the entire production process duration. The total protein concentration of the supernatant was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Meyer et al. and used for calculation of the mAb peak proportions. [22]

Antibody bioactivity was determined by an adherent mouse fibroblast (L929) cell based assay using the tumor necrosis factor alpha (TNF-α) under the presence of actinomycin D. [23] Therefore, L929 cell viability was analyzed using the cell titer-blue assay (Promega, USA) after 24 h of antigen/antibody treatment. The produced antibody was diluted and used in low and high concentrations of 2.5 and 50 ng/mL respectively. The antigen TNF-α was used in a

PRACTICAL APPLICATION

The ambr®15 micro bioreactor platform was used to study the production process of a monoclonal antibody within a complex Design of Experiments approach. Our controlled investigation of critical process parameters resulted in the establishment of a designated design space and process control strategies for robust process optimization. The gained process understanding and novel feedback strategies are crucial for the optimization of the studied process as well as for new process development. Thereby, this study highlights the importance of Quality by Design and the practical implementation using micro bioreactors.

fixed concentration, determined to result in around 30% cell viability.

2.3 | Failure mode and effect analysis (FMEA)

The risk assessment was conducted using the FMEA approach as described by Boehl et al., with five levels for the classification of the probability, severity and detectability of each process parameter. [18] Multiplication of these rated factors resulted in the respective risk priority number. The Probability (P) evaluates the likelihood of general parameter failure. Failure impact on the system and the

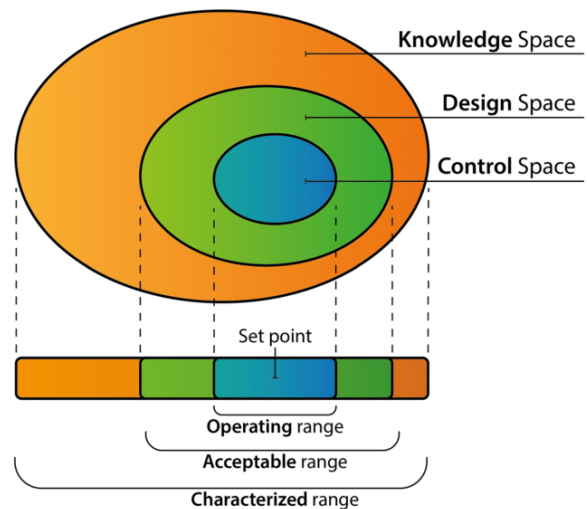


FIGURE 1 Schematic representation of the design space and associated ranges. Adjusted from Rathore et al. [17]

product are assessed by the Severity (S). In addition, the Detection (D) assesses the possibility of detection and fast correction a given failure mode.

2.4 | Design of Experiments (DoE)

The design and analysis was performed using the DoE software MODDE 12 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Germany). The four parameters with the highest RPN during the risk assessment were used as factors ($F_1 = \text{pH}$, $F_2 = \text{initial viable cell density}$, $F_3 = \text{N-1 duration}$, $F_4 = \text{pO}_2$) for a custom central composite face centered design with three center point runs. The resulting design is illustrated in Figure 3 (see chapter 'DoE structure and implementation'). Hereinafter, the different factor settings are described as 0 for center point level and $-1/1$ for the low and high levels of the full factorial cube respectively. The additional levels for the 5 level factor (initial VCD) are described as -2 and 2 .

The pH was varied equally between 6.9 and 7.3 by control of the CO₂ gas flow and additional bolus feeds of sodium carbonate (Na₂CO₃) as base. For the initial viable cell density 5 levels from 0.1 to 0.5×10^6 [6] cells/mL with an equidistant step size of 0.1×10^6 [6] cells/mL were examined. The N-1 duration was varied equally between 2 and 4 days by shifting of the passage times of the N-2 and N-3 passage to allow simultaneous inoculation of the production process. The pO₂ was controlled over the oxygen gas flow and varied equally between 40% and 80%. The applied design resulted in a total of 33 runs. The experiments were conducted in two Ambr15 cultivations with 18 vessels each. Three center point runs were implemented in both cultivations, resulting in a total of 36 conducted runs. An overview of the experimental set up and the explained numerical coding of the parameter levels are depicted in the supplements.

Six different responses were analyzed: growth rate for the growth phase during the production process, integral viable cell concentration, end viability, total mAb titer, mAb productivity, and the mAb peak proportion. The responses were predicted by using a multilinear model with squares and interactions for all factors.

Multiple linear regression (MLR) was used to fit the mathematical models as described by Boehl et al. [18] Model statistics such as the R-squared, adjusted R-squared, Q-squared, model validity, and the reproducibility were analyzed for the evaluation of the conducted model. Factors whose coefficient has the value zero in its confidential interval are regarded to have no significant influence on the response and are therefore removed from the model.

The design space was calculated using Monte Carlo simulations to compile the needed probability statistics.

Parameter limits are summarized in the supplements and were set on the basis of historical data and process knowledge.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Main objective of this study was the investigation of parameter effects and the establishment of a designated design space for the mAb production process of a CHO cell cultivation. Therefore, process parameters were identified and assessed by their theoretical risks. Identified critical process parameters were evaluated based on a design of experiment approach with a focus on cell growth, mAb production and the mAb proportion to process related impurities as intermediate critical quality attributes.

3.1 | Risk assessment

An Ishikawa diagram (Figure 2) was used to list possible process parameters, categorized in different parts of the process, namely the medium, feeding, process and the cell separation. These parameters can influence the process and can therefore be potential root causes for specific failure events. In order to rank the process parameters according to said risks, a Failure Mode and Effect Analysis approach was conducted.

Parameters that were highly optimized during the process development, like the media composition of the production medium and the feeding, were not taken into account because these parameters are fixed for the production process and not part of the process control. Previous scale down experiments showed high process reproducibility in various reactor systems and scales, which is why the reactor scale and working volume were also considered noncritical parameters. Parameters, like the temperature or feeding amounts/timing, are highly controlled in the ambr®15 system. This results in a low failure probability and a quick detection of potential failure modes like temperature drops. In order to determine CPPs the RPN threshold was set to be over 20, which represents moderate to significant risk (3–5) of at least two factors with the third factor having any considerable risk (>1) during the FMEA. The results of the FMEA for the identified CPPs are listed in Table 1 and shown bold in Figure 2.

The pH value of the production medium was used as factor F_1 in the DoE due to its severe effect on the cell growth as well as the antibody production and stability (Severity = 5). As a result of the high level of monitoring and control, the probability of larger pH failures can be considered fairly small (Probability = 2). Yet, control systems

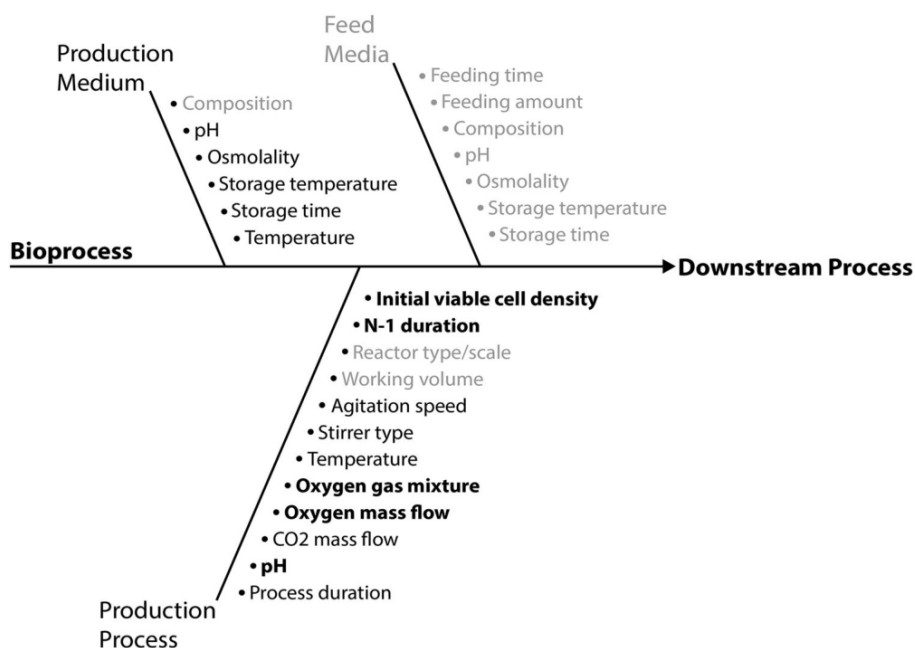


FIGURE 2 Ishikawa diagram for the mAb production process. Bold parameters were determined as critical and therefore examined during this study. Grey parameters were excluded from the risk assessment

TABLE 1 Failure mode and effect analysis (FMAE) results for the examined parameters. Probability, severity and detection were individually rated between 1 and 5. 1 represents no potential risk, 3 moderate/controllable risk and 5 significant risk

Process parameter	Probability	Severity	Detection	RPN
pH	2	5	3	30
Initial VCD	2	3	4	24
Dissolved oxygen	3	4	2	24
N-1 duration	2	3	4	24
Process duration	2	5	2	20
Media storage temperature	1	4	3	12
CO ₂ mass flow	2	3	2	12
Temperature	1	5	2	10
Media storage time	1	4	2	8
Agitation speed	1	4	2	8
Stirrer type	1	3	1	3

like base additions work with a time delay and can add to additional cell stress (Detection = 3).

Significance of the initial VCD (F_2) can be explained by moderate risk of all three FMEA factors. A moderate impact on the growth rate was shown in previous preculture experiments (Severity = 3). This effect was correlated to higher nutrient consumption rates and thus a nutrient deficiency during first days of the cultivation. The possi-

bility for failures in the iVCD was considered to be low yet possible, due to potential inaccuracies during the inoculation and rare variations in the preculture cell density (Probability = 2). Deviations of the initial VCD can be detected quickly; however, readjustments can potentially lead to a critical process delay. In biopharmaceutical production scale the readjustment to the VCD set-point can furthermore be virtually impossible, due to the preparation and availability of bioreactors (Detection = 4).

In contrast, failures in the dissolved oxygen (F_3) can be detected and corrected quite quickly (Detection = 2). However, oxygen plays an important role in the cell metabolism and was therefore considered critical for cell growth and production (Severity = 4), while historical data showed a moderate probability of slight failure modes (Probability = 3).

The passage duration was previously determined as a critical process parameter during the inoculum expansion study and showed negative effects on the cell growth and viability with longer durations. [18] During said study, the N-1 passage was set to be 3 days for all experiments to enable simultaneous inoculation of the production process with constant volumes. In order to study the link between critical process parameters of the inoculum expansion and the production process, the N-1 duration was used as another factor F_4 for the DoE. Even though the probability of longer N-1 durations can be consider fairly small (Probability = 2), a process delay can have a critical impact on the cell conditions, growth and viability (Severity = 3).

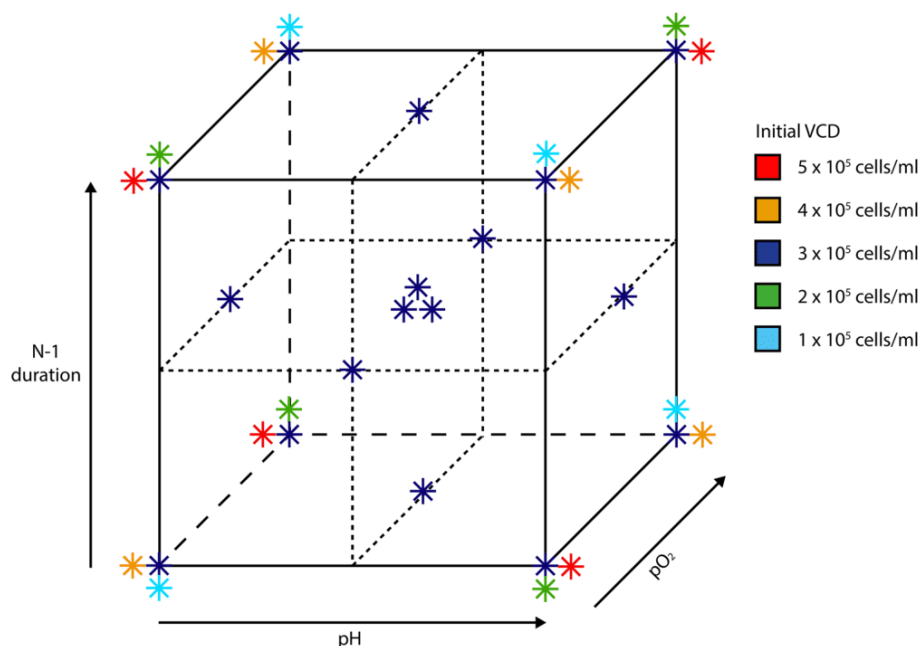


FIGURE 3 Schematic representation of the conducted design of experiments for the N-1 duration, pH, dissolved oxygen (pO_2) and the initial VCD. The corner point stars of the cube represent $-1/1$ levels of the studied parameters. The three stars in the middle of the cube represent the replicated center point runs (0 level). The color of the stars represent the 5 levels of the initial VCD ($-2/-1/0/1/2$ level)

Moreover, the detection must be assessed as critical (Detection = 4), due to the time delay for the process and inability to solve certain failure modes, without preparing another bioreactor.

3.2 | DoE structure and implementation

In order to investigate the influence and interaction of the determined critical process parameters, based on the ICH Guidelines, a Design of Experiments was set up. Since four parameters, namely the pH (F_1); initial VCD (F_2); Dissolved oxygen (F_3) and N-1 duration (F_4), exceeded the critical RPN threshold, a custom extended central composite design was constructed. Therefore, the factors F_1 , F_3 and F_4 were combined in a face centered design and each varied on a three level scale ($-1, 0, 1$). The initial VCD (F_2) was varied on a five level scale ($-2, -1, 0, 1, 2$) in order to expand the experimental range and integrated in the design as a fractional factorial factor. The resulting design, depicted in Figure 3, shows a regular geometry and high coverage for all four critical process parameters.

The design added up to 33 experimental runs. In order to extract in-depth information about the varied process parameters a selection of critical responses for the studied process was determined. During the production process the growth rates and integral viable cell concentration of each run were monitored as responses for cell growth and

maintenance. The proliferation rate is a critical attribute correlated to the cell condition and can provide early information about possible delays in the culture duration. Furthermore, general improvements in cell growth could lead to reduced process time and production costs. The same argumentation applies for a high integral viable cell concentration, since it indicates optimal cell growth and maintenance conditions.

Additionally, the end viabilities were determined to further investigate the cellular conditions. High cell viabilities throughout the process also insures minimal amounts of cell debris, nucleic acids and host cell proteins, which have to be removed expensively during the downstream process. In order to investigate quality attributes for the mAb production, the total mAb titers were determined at the end of the cultivations, which has to be maximized for a profitable process. The specific productivity was determined to elucidate the cell specific productivity for all studied conditions, since earlier experiments showed a contrary trend between optimal growth and high specific productivity. Furthermore, the mAb peak proportion was analyzed as a quality attribute for all runs. The proportion of produced antibody to host cell proteins and other impurities directly impacts the following downstream and possible yields.

The summary of all experimental runs with associated responses is depicted in the supplements. By combination of said responses, the optimal process conditions for max-

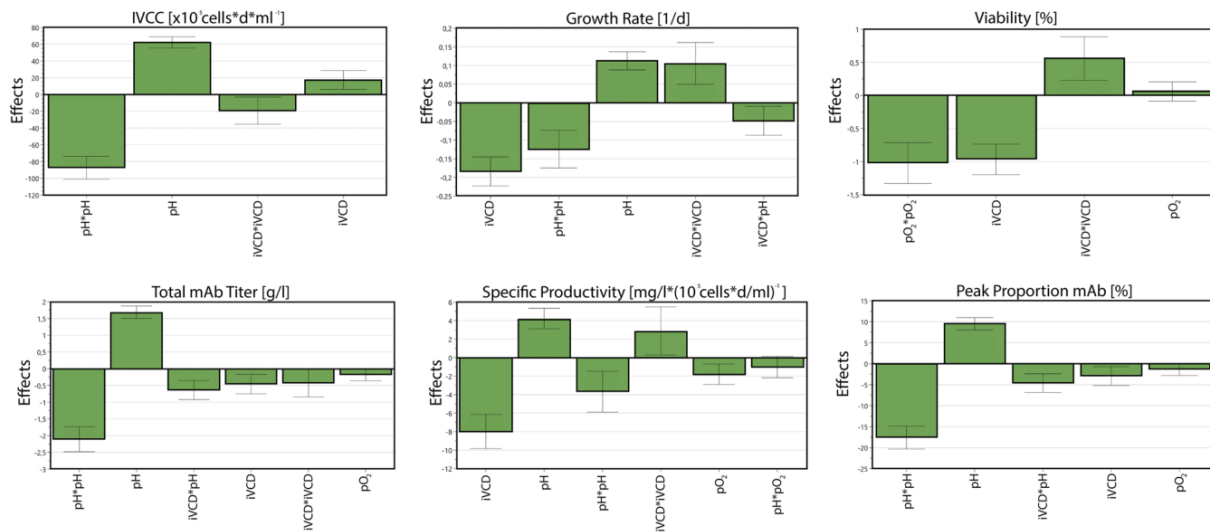


FIGURE 4 Factor effect plots for the studied responses. Factor squares and interactions are combined with a star. Only significant factors and interactions are considered and displayed in descending order for each response

imized growth and cell maintenance as well as optimal mAb production could be determined.

3.3 | Multivariate data analysis

In order to evaluate the experimental data, a statistical model was calculated using MLR. Interpretation of the model led to specific conclusion for factor effects and interactions for the studied parameters. In this process, factors and factor combinations that include zero in their confidential intervals were considered as not significant and hence removed from the respective model. Figure 4 shows the plotted main effects for the examined responses.

Overall, the factors with the highest impact on most of the selected responses were the culture pH set point and the initial VCD, both as linear effects (pH; iVCD), non-linear effects (pH*pH; iVCD*iVCD) as well as interaction (iVCD*pH).

The initial VCD showed considerable influence on the growth rate, viability, and the specific productivity with negative coefficients, meaning a lower iVCD resulted in improved responses. Its quadratic effect with positive coefficients for most responses besides the peak proportion showed the nonlinearity of the correlation. Those effects can be explained by faster nutrient consumption and limitation with higher initial VCDs.

The pH showed reversed coefficients for most responses, resulting in a nonlinear correlation. With higher pH values increasing growth rates, integral viable cell concentrations, mAb titers, and purities were observed. Furthermore, small but significant interaction of iVCD and pH with neg-

ative coefficients could be found. This shows that a lower VCD in combination with a higher pH set point results in improved quality attributes.

In contrast to the other responses, the viability is mainly influenced by dissolved oxygen and the initial VCD. While the dissolved oxygen has significant effects only as quadratic factor with negative coefficients, the initial VCD showed a correlation comparable to the other responses. Those influences on the end viability highlight the importance of the initial VCD, since it impacted the response throughout the whole process.

Accuracy of the regression models was verified by analyzing the corresponding model statistics. The R-squared (R^2) term is the fraction of the variation of the response explained by the model, while the adjusted R-squared (R^2_{adj}) term is adjusted for the degrees of freedom of the model. Values over 0.5 for these terms show high model significance. Statistical model accuracy of future predictions is estimated by the Q-squared (Q^2) term. Values for Q^2 should exceed 0.1 for a significant model and 0.5 for good model. The model validity checks for diverse model problems. A value less than 0.25 indicates statistically significant model problems, such as presence of outliers, incorrect model terms or transformation problems. The reproducibility compares the variation of the center point replicates to the overall variability, with a value over 0.5 insuring high model reproducibility. Table 2 summarizes the model statistics for the analyzed parameters.

Analysis of the shown model statistics confirmed the significance, validity, and high reproducibility of all used regression models. The viability model showed the lowest values for R^2 , R^2_{adj} , Q^2 and the reproducibility,

TABLE 2 Summarized model statistics for the studied responses. R^2 representing the model significance, Q^2 representing the predictive power of the model, model validity representing possible model problems and the reproducibility representing the center point variation compared to the overall variability

	R^2	R^2 adj.	Q^2	Model validity	Reproducibility
Growth rate	0.88	0.86	0.83	0.92	0.82
IVCC	0.96	0.95	0.93	0.63	0.97
Viability	0.81	0.79	0.73	0.97	0.65
Total mAb Titer	0.96	0.95	0.93	0.88	0.95
Specific productivity	0.87	0.84	0.79	0.95	0.76
Peak proportion	0.94	0.93	0.90	0.67	0.96

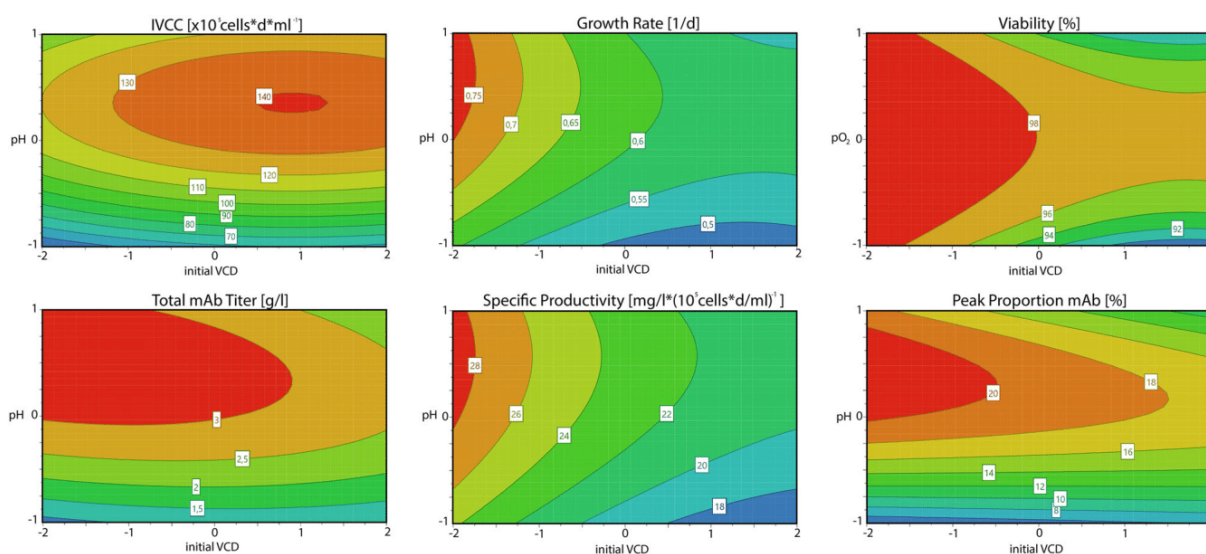


FIGURE 5 Response contour plots representing the interaction effects of different factors on the studied process responses

which are yet high enough for solid model interpretation. The overall variability in the measured viabilities compared to the center point runs was rather low, explaining the reproducibility value of 0.65 and influencing the overall model significance. Yet, the high model validity value for the viability of 0.97 insured that no model problems or outliers were present. All other models showed overall high values of over 0.8 for R^2 and R^2 adjusted, validating the models significance. Furthermore, the predictive power for future experiments was confirmed by the high Q^2 values of mostly over 0.8. Same applies for the model validity and reproducibility with values over 0.6 and 0.75, respectively.

After validation of the computed regression models, the findings were extended by investigation of the resulting response counter plots, depicted in Figure 5. A response contour plot provides a two-dimensional interpretation of the predictors and their respective response values. Using the contour plots it was possible to further investigate factor effects and interactions as well as determine desirable operating conditions.

The IVCC as well as the total mAb titer contour plot confirms the observed pH effect, with an optimum between 0 and 1 conditions. As expected, a higher initial viable cell density led to an increased IVCC with an optimum around 1 condition. However, this effect was counteracted by the improved growth rate for low initial VCDs. The contour plot for the growth rate and the specific productivity responses shows an optimum for a minimal initial VCD and an increased pH set point. Furthermore, it depicts the nonlinear effect of the pH and the lower robustness against variations in the initial VCD.

For the viability response the initial VCD and the dissolved oxygen were used for the response contour plot. Again, lower initial VCD were shown to be beneficial for high culture viabilities throughout the entire process, while the dissolved oxygen showed an optimum around 0 condition, especially for higher initial VCDs. The peak proportion contour plot shows similar effects for the pH as described for the other responses. Yet, the initial VCD effect shows similarities to the viability plot, implying correlations between those responses. This can be explained

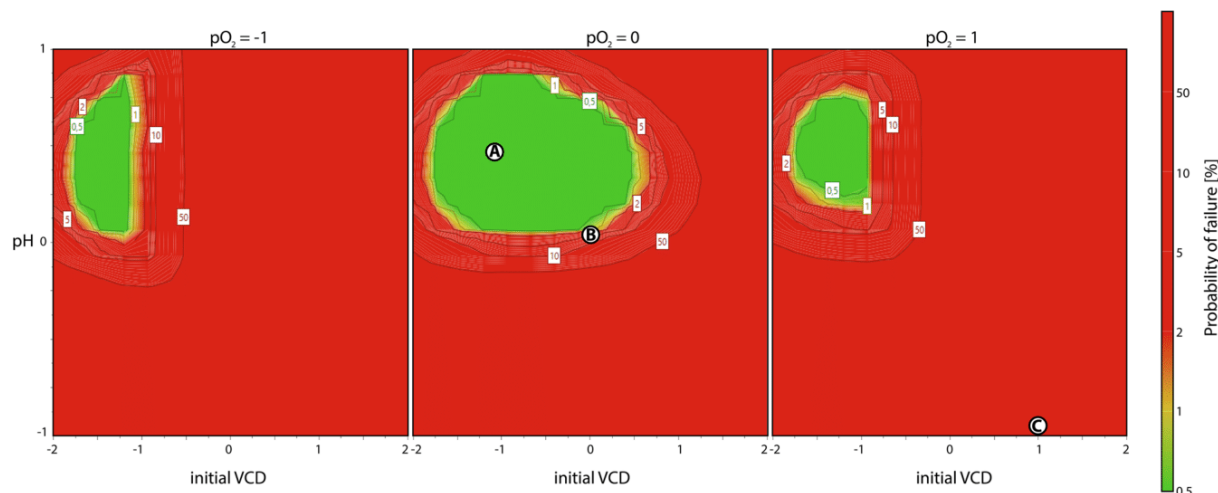


FIGURE 6 Determined design spaces for the mAb production process with color coded probability of failure for the assessed response specifications. Parameter conditions for the verification runs are marked as A (optimum), B (standard), and C (impaired)

by host cell proteins and other impurities that are released to the cultivation broth during cell death.

In order to combine the analyzed responses and visualize the experimental design region in which all response specifications are fulfilled with given probabilities, a design space was calculated. Specifications for each response were accounted during the process development and adjusted with the risk assessment as well as the process knowledge acquired during this study. The resulting design space for the factors initial VCD, pH, and dissolved oxygen is shown in Figure 6. The green area marks a robust design space with a low probability for possible process failures.

The design space was determined around -1 level for the initial VCD and between 0 and 1 level for the pH set point. Increase as well as decrease in the dissolved oxygen decreased the design space in its size, shifting it toward a lower initial VCD. Therefore, a process with insufficient pO_2 control should be inoculated with a lower viable cell density, while the pH effect was shown to be more robust above the center point. Using the design space new optimal set points for the pH with 7.2 and the initial VCD with 0.2×10^6 cells/mL could be specified. Thereby, robust cell growth and viability as well as optimal mAb production with minimal impurities can be targeted for the studied process.

The established optimum A ($pO_2 = 60\%$; $pH = 7.2$; $iVCD = 0.2 \times 10^6$ [6]), the standard run B ($pO_2 = 60\%$; $pH = 7.1$; $iVCD = 0.3 \times 10^6$) as well as a run with impaired conditions C ($pO_2 = 80\%$; $pH = 6.9$; $iVCD = 0.4 \times 10^6$ [6]) were repeated in three-fold determination, which confirmed the findings for all assessed responses. Corresponding growth curves are depicted in Figure 7, while the measured responses are summarized in the supple-

ments. While the standard run showed a slightly higher mAb titer and IVCC, its productivity was lower compared to the optimized run. The impaired conditions caused lower cell growth and viabilities, ultimately resulting in a poor mAb titer with larger proportions of host cell proteins. These verifications of the conducted DoE underline the importance of the established process control space. The correlation of end viability and the peak proportion of the product is especially important for the following downstream process.

Likewise, the bioactivity of the produced antibody is an important critical quality attribute. In order to investigate this, the mAb samples produced in the verification runs (A, B and C) were used for a cell based bioactivity assay. This assay is based on the antibody property to bind and inactivate the cytotoxic antigen TNF- α . By that, the viability of the used L929 cells represents the bioactivity of the antibodies for given concentrations. Results of the assay are shown in Figure 7, in which the dashed TNF- α line represents cell viability without added antibody.

The applied concentrations were chosen from a previously conducted calibration curve with standard mAb. As expected, the low concentration only showed a small increase in cell viability compared to the pure TNF- α experiment. The high concentration prevented the apoptotic effect and thereby the decrease in cell viability by binding the applied antigen. Only insignificant differences between the separate runs were observed, with the optimized run showing the highest bioactivity.

These results indicate that the investigated cultivation conditions during the production process have no significant impact on the bioactivity of the produced antibody. By that, the focus must be set on the intermediate quality attributes like high mAb production with special attention

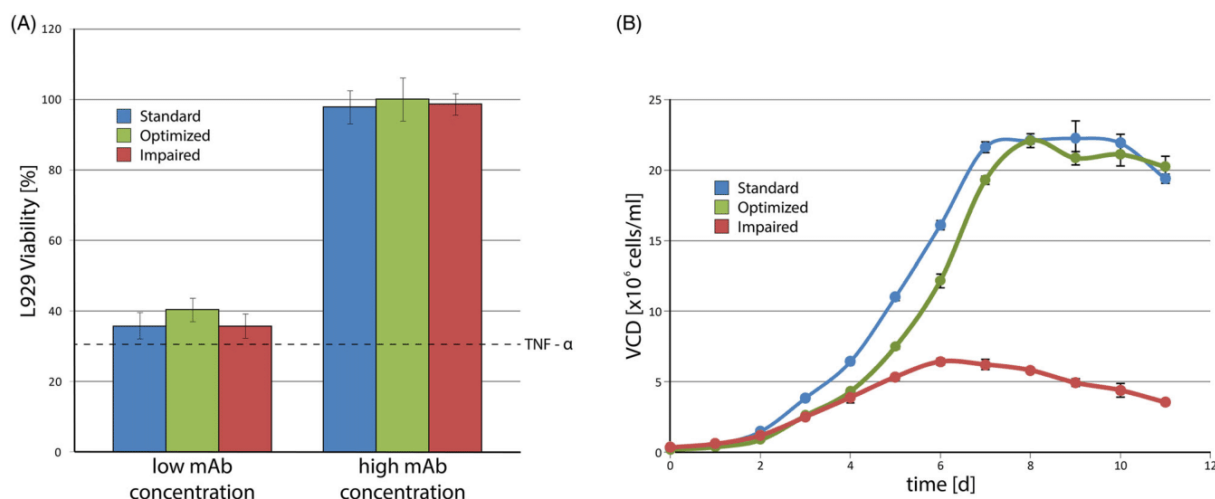


FIGURE 7 (A) Bioactivity assay for mAb samples of the standard (blue), optimized (green) and impaired (red) runs in two different concentrations (2.5 ng/mL and 50 ng/mL). Cell viability without added antibody is marked by the dashed TNF- α line. (B) Growth curves of the standard (blue), optimized (green), and impaired (red) runs

to the cell maintenance, in order to ensure low amounts of impurities. This target can be reached by precise process analytics and control based on the established design space.

4 | CONCLUDING REMARKS

The fundamental concepts of QbD were tested and implemented in the established mAb production process of a CHO cell cultivation. Thereby, this work builds upon previous findings in the inoculum expansion and marks the second step toward a holistic process characterization. Process parameters were compiled and sorted in an Ishikawa-diagram. Using the FMAE tool, the general risk potential for each parameter was assessed and ranked based upon their probability, severity and detectability. In order to investigate the effect and interaction of the intermediate critical process parameters a complex design of experiments approach was conducted. The experiments were performed using the ambr®15 micro bioreactor platform, aiming for optimal process parameter control and high comparability of the acquired cultivation data. Multivariate data analysis was used to fit a mathematical model and calculate parameter effects and interactions for each respective response. Culture pH and iVCD were determined as nonlinear key process parameters with interaction effects. The observed effects of the initial VCD confirmed the findings for the initial passage VCD during the inoculum expansion studies and its importance on the nutrient consumption and thereby the process control.

All responses and parameter effects were used to establish a design space in which sufficient cell growth as well

as antibody production is ensured. In conclusion, the pH should be controlled around 7.2, while the initial VCD should be lowered to 0.2×10^6 [6] cells/mL. The dissolved oxygen should be controlled around the 60% set point. Changes in the N-1 duration showed only small effects on the process, meaning that a delay in inoculation for less than 2 days can be balanced out with optimal control of the other process parameters. Furthermore, no significant differences in the product quality, namely the bioactivity, were observed for changing cultivation conditions, meaning the priority in quality control for the studied process should be set on high cell maintenance as well as optimal mAb production.

This case study for the implementation of QbD strategies in the mAb production illustrates the suitability of the ambr®15 micro bioreactor system for complex DoE approaches with sufficient process control and high reproducibility. Furthermore, this study highlights the importance of the established Design Space for robust process optimization during the process development. In order to apply the general QbD principles on the entire process, further studies will be focused on the cell removal and the downstream part. Therefore, the correlation of viability and product proportion to total protein as well as other quality attributes will be investigated using different cell removal methods.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of the research by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (031B0744).

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

We confirm that all corresponding authors agree with the submission and publication of this paper and that there is no conflict of interest concerning financial and personal relationships. The manuscript does not contain neither experiments using animals nor human studies. Furthermore, we confirm that the article has not been published previously by any of the authors and is not under consideration for publication elsewhere at the time of submission.

REFERENCES

- Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol.* 2019;37:9–16.
- Levine MM. Monoclonal antibody therapy for Ebola Virus Disease. *N Engl J Med.* 2019;381:2365–2366.
- Jahanshahlu L, Rezaei N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 2020;129:110337.
- Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2020;11:2251.
- Rathore AS, Winkle H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol.* 2009;27:9.
- US Food and Drug Administration. Guidance for industry PAT - A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. 2004;19. <http://www.fda.gov/regulatory-information/Search-fda-guidance-documents/pat-framework-innovative-pharmaceutical-development-manufacturing-and-quality-assurance>
- The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q8R1/Step4/8R2Guideline.pdf>
- The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Quality risk management (Q9). 2005. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9Guideline.pdf>
- The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical quality systems (Q10). 2008. <http://www.ich.org/fileadmin/PublicWebSite/ICHProducts/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10Guideline.pdf>
- US Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century; a risk-based approach. 2004.
- Snee RD. Quality by design: building quality into products and processes. *Nonclinical Statistics for Pharmaceutical and Biotechnology Industries.* Springer International Publishing; 2016:461–499. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23558-5_18
- Nagashima H, Watari A, Shinoda Y, Okamoto H, Takuma S. Application of a quality by design approach to the cell culture process of monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a design space. *J Pharm Sci.* 2013;102:4274–4283.
- Horst JP, Turimella SL, Metsers F, Zwieters A. Implementation of Quality by Design (QbD) principles in regulatory dossiers of medicinal products in the European Union (EU) between 2014 and 2019. *Ther Innov Regul Sci.* 55:583–590.
- Mollah AH. Application of failure mode and effect analysis (FMEA) for process risk assessment. *BioProcess International.* 2005;5:12–20.
- Zhang L, Mao S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian J Pharm Sci.* 2017;12:1–8.
- Harms J, Wang X, Kim T, Yang X, Rathore AS. Defining process design space for biotech products: case study of *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Prog.* 2008;24:655–662.
- Rathore AS. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* 2009;27:546–553.
- Böhl OJ, Schellenberg J, Bahnemann J, Hitzmann B, Scheper T, Solle D. Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process. *Eng Life Sci.* 2021;21:196–207.
- CMC Biotech Working Group. A-Mab: A case study in bioprocess development; Version 2.1.
- Ngibuini M. Section 1: upstream technologies. *BioProcess International.* 2014;12:3–6.
- Janoschek S, Schulze M, Zijlstra G, Greller G, Matuszczyk J. 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.* 2019;35:e2757.
- Meyer KV, Siller IG, Schellenberg J, et al. Monitoring cell productivity for the production of recombinant proteins by flow cytometry: an effective application using the cold capture assay. *Eng Life Sci.* 2021;21:288–293.
- Carrillo-Conde BR, Brewer E, Lowman A, Peppas NA. Complexation hydrogels as oral delivery vehicles of therapeutic antibodies: an in vitro and ex vivo evaluation of antibody stability and bioactivity. *Ind Eng Chem Res.* 2015;54:10197–10205.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Wohlenberg, O. J., Kortmann, C., Meyer, K. V., Schellenberg, J., 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>

4.3 Anwendung von QbD Strategien zur Untersuchung des Einflusses der Zellviabilität und -Dichte auf die Zellabtrennung eines monoklonalen Antikörpers

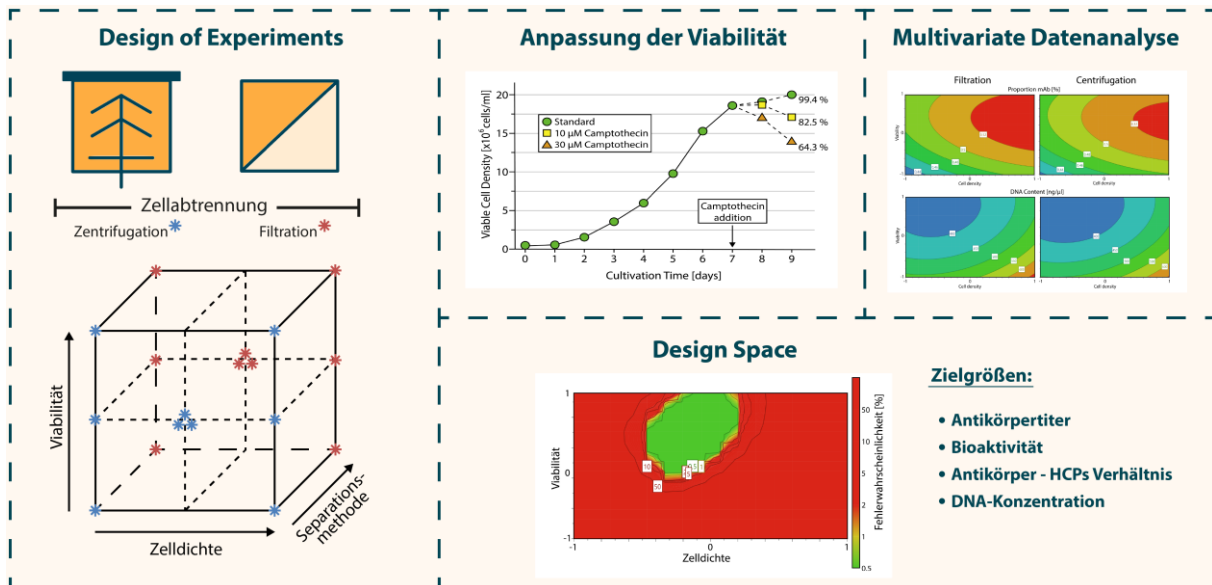


Abbildung 4.3 Graphical abstract zu dem Manuskript „Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies“

Zur ganzheitlichen Implementierung des QbD Prinzips in den *Upstream*-Prozess der mAb Herstellung wurde schließlich die Zellabtrennung untersucht. Diese beschreibt den finalen Schritt des *Upstream*-Prozesses und den Übergang in den darauffolgenden *Downstream*-Prozess. Trotz des vielseitigen Einsatzes von QbD Methoden in der biopharmazeutischen Industrie, ist der graduelle Ansatz der umfassenden Prozesscharakterisierung nur selten angewendet. Diese Vorgehensweise in der QbD Implementierung erlaubt die strukturierte Verbindung von intermediären Qualitätsattributen mit folgenden Prozessschritten, wodurch eine holistische Analyse der Prozessrisiken und der Robustheit ermöglicht wird.

Anhand der Ergebnisse der Produktionsprozessuntersuchungen wurden die kritischen Parameter sowie die Zielgrößen für die Zellabtrennung definiert⁹⁰. Es wurde festgestellt, dass in dem untersuchten Kenntnisraum Antikörper mit gleichbleibender Bioaktivität produziert wurden. Daher wurden die Quantität sowie die Reinheit des Produktes als wichtigste Qualitätskriterien für den folgenden *Downstream*-Prozess festgelegt.

Als CPPs wurden die Viabilität und die Zelldichte definiert, da diese während des Produktionsprozesses wichtige Informationen über den Zellerhalt und mögliche Verzögerungen in der Prozessdauer geben. Eine verringerte Viabilität der Zellen wies darüber hinaus starke Zusammenhänge mit erhöhten Mengen an prozessbedingten Verunreinigungen im Zellkulturüberstand auf. Außerdem ist bekannt, dass hohe Zelldichten sich auf die Effektivität und Effizienz der Zellabtrennung auswirken können⁷⁸. Diese Faktoren wurden in einem vollfaktoriellen DoE zusammengefasst, welcher durch den qualitativen Faktor der Zellabtrennungsmethode erweitert wurde. Damit wurden Filtration und Zentrifugation als primärer Abtrennungsschritt in Verbindung mit der Viabilität und der Zelldichte verglichen. Zur gezielten Einstellung der Viabilität wurde eine Behandlungsmethode mit dem zelltoxischen Topoisomeraseinhibitor Camptothecin (CPT) entwickelt. Mittels MVDA wurden die Ergebnisse der Experimente ausgewertet und ein *Design Space* für die primäre Zellabtrennung definiert.

Es wurde gezeigt, dass die Viabilität zum Ende des Prozesses durch die Zugabe von CPT gezielt auf genaue Werte zwischen 60 % - 90 % variiert werden konnte. Der erwartete Einfluss der Viabilität auf die Menge an Oligonukleotiden und HCPs wurde bestätigt, womit sie einen Schlüsselfaktor für den anschließenden *Downstream*-Prozess darstellt. Die Untersuchung der Bioaktivität hingegen ergab keine signifikanten Veränderungen, weshalb diese als Qualitätsattribut bei der Berechnung des *Design Space* nicht weiter berücksichtigt wurde. Diese Ergebnisse zeigten damit jedoch erneut, dass die Veränderungen der untersuchten Parameter im *Upstream*-Prozess keinen Einfluss auf die Funktionalität des mAb haben. Auch die Zellabtrennungsmethode zeigte keinen kritischen Einfluss auf die analysierten Zielgrößen. Zusammengefasst sollte die Viabilität zum Ende des Prozesses nicht unter 85 % sinken und die Zelldichte zur Abtrennung auf bei 15×10^6 Zellen/mL eingestellt werden. Damit unterstreicht diese Studie die Wichtigkeit der Zellerhaltung über die gesamte Prozessdauer und die Notwendigkeit der Prozesskontrolle für eine hohe Reinheit des Zellkulturüberstandes zur Sicherstellung eines zeit- und kosteneffizienten *Downstream*-Prozesses.

Im folgenden Artikel „*Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies*“ werden die Ergebnisse detailliert beschrieben und diskutiert.

RESEARCH ARTICLE

Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies

Ole Jacob Wohlenberg | Carlotta Kortmann | Katharina V. Meyer  | Thomas Scheper | Dörte Solle

Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Hannover, Germany

Correspondence

Dörte Solle, Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie, Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany.
Email: solle@iftc.uni-hannover.de

Funding information

Federal Ministry of Education and Research, Germany, Grant/Award Number: 031B0744

Abstract

Quality by Design (QbD) is one of the most important tools for the implementation of Process Analytical Technology (PAT) in biopharmaceutical production. For optimal characterization of a monoclonal antibody (mAb) upstream process a stepwise approach was implemented. The upstream was divided into three process stages, namely inoculum expansion, production, and primary recovery, which were investigated individually. This approach enables analysis of process parameters and associated intermediate quality attributes as well as systematic knowledge transfer to subsequent process steps. Following previous research, this study focuses on the primary recovery of the mAb and thereby marks the final step toward a holistic characterization of the upstream process. Based on gained knowledge during the production process evaluation, the cell viability and density were determined as critical parameters for the primary recovery. Directed cell viability adjustment was achieved using cytotoxic camptothecin in a novel protocol. Additionally, the cell separation method was added to the Design of Experiments (DoE) as a qualitative factor and varied between filtration and centrifugation. To assess the quality attributes after cell separation, the bioactivity of the mAb was analyzed using a cell-based assay and the purity of the supernatant was evaluated by measurement of process related impurities (host cell protein proportion, residual DNA). Multivariate data analysis of the compiled data confirmed the hypothesis that the upstream process has no significant influence on the bioactivity of the mAb. Therefore, process control must be tuned towards high mAb titers and purity after the primary recovery, enabling optimal

Abbreviations: CHO, Chinese Hamster Ovary; CQA, Critical Quality Attribute; CPP, Critical Process Parameter; CPT, Camptothecin; DoE, Design of Experiments; HCP, Host Cell Protein; L929 cell, Adherent mouse fibroblast L929 cell; mAb, monoclonal Antibody; MLR, Multiple Linear Regression; MVDA, Multivariate Data Analysis; PAT, Process Analytical Technology; PM, Production Medium; QbD, Quality by Design; SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2; TCD, Total Cell Density; TNF-alpha, Tumor Necrosis Factor alpha.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by Wiley-VCH GmbH

downstream processing of the product. To minimize amounts of host cell proteins and residual DNA the cell viability should be maintained above 85% and the cell density should be controlled around 15×10^6 cells/ml during the cell removal. Thereby, this study shows the importance of QbD for the characterization of the primary recovery of mAbs and highlights the useful implementation of the stepwise approach over subsequent process stages.

KEYWORDS

CHO, DoE, mAb, PAT, QbD

1 | INTRODUCTION

The monoclonal antibody market is growing rapidly, with expected total market revenues reaching a valuation of 300 billion US\$ by 2025 [1, 2]. Due to major advancements in the biopharmaceutical industry, the number of medical applications is quickly increasing, including treatments for cancer as well as novel diseases such as the Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2 (SARS-CoV-2) [3–6]. The traditional approach for product and process development consists of a rigid manufacturing process with predefined set points and batch-to-batch quality controls, resulting in a lack of methodical connection between the process, product, and application. In order to enable fast approval and release to market of novel therapeutic antibodies fulfilling high-quality standards the development and production process has to be performed in a structured and controlled environment [7].

Following this agenda, the FDA introduced a guideline to biopharmaceutical development and manufacturing with the *Current Good Manufacturing Practice for the 21st century* initiative in 2004. This protocol includes the framework for Process Analytical Technology (PAT) and guidelines from the International Conference of Harmonisation, which introduced the concept of Quality by Design (QbD) as a risk-based approach to the development of new therapeutics [8–12]. This approach defined the main objective of research as a way to construct and methodically build quality into the process and product during the development phase instead of testing it into the product during production. Thereby biopharmaceutical manufacturers are able to tune their processes toward product quality in a compliant environment, resulting in improved flexibility, cost reduction, and faster adjustments in production as well as the development [13, 14].

Quality by Design is structured as a multi-step process, starting with the identification of process parameters and a risk assessment, followed by a Design of Experiments (DoE) approach to examine critical process parameters

(CPPs) regarding critical quality attributes (CQAs) [15, 16]. CPPs are evaluated process inputs like the initial viable cell density or the culture pH, while CQAs include process and product outputs like the growth rate of the cells or the bioactivity of the produced antibody. The systematic set up of the DoE enables the investigation of factor effects and interactions, which can be statistically solidified using multivariate data analysis (MVDA). Based on the data and the mathematical model a designated design space can be calculated, representing a multi-dimensional region of process parameters in which the process can be conducted within predefined quality attributes [9, 17]. Thereby, working within the set design space is not considered to be a change or risk to the process or product quality.

In order to assess the complete upstream process of a mAb production using Chinese Hamster Ovary (CHO) cells the process was split up into steps, which were investigated individually. Thereby, this work was based on the previous findings regarding the inoculum expansion and production process and marks the final step of the complete case study process characterization [18, 19]. Even though the presented QbD strategies are widely used in the biopharmaceutical industry, the split-up approach to process characterization was rarely implemented [20, 21]. This approach enhances the analysis by connecting intermediate quality attributes to following process steps, allowing for a holistic assessment of the process risks and robustness.

By that, gained knowledge about factor effects on intermediate CQAs can be used to define the setup of the following experiments. Earlier studies showed no significant impact of the production process on the investigated product quality elucidating the mAb quantity and purity as the main quality criteria for the production step [19]. Furthermore, they showed a strong influence of the culture pH, pO_2 , and the initial viable cell density on the viability in correlation with the proportion of produced mAb to process-related impurities [19]. Therefore, this work will focus on viability as an input factor for the first step of cell

removal. The directed adjustment of the cell viability for analysis in a DoE approach was established by the use of camptothecin (CPT), which has a planar pentacyclic ring structure and acts as a topoisomerase inhibitor, resulting in a cytotoxic effect on the CHO cells [22]. This enables the viability adjustment for the first time without altering the culture duration or variation of other process parameters. Critical quality attributes like the bioactivity of the produced antibody as well as the amount of residual DNA and host cell proteins (HCPs) in the supernatant were analyzed to establish a robust design space for the last step of the upstream process.

2 | MATERIAL AND METHODS

Presented QbD strategies will be implemented in the primary recovery of an IgG1 monoclonal antibody (mAb) production process using a DG44 CHO cell line (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Germany).

2.1 | Cell line and material

The first steps of the process, namely the vial thaw and inoculum expansion were performed as described by Boehl et al. [18]. The production process step was performed in the modular Ambr®250 system (Sartorius, Germany), using proprietary and chemically defined production medium (PM) and two additional feed media (feed medium A; feed medium B) for macro nutrients (e.g., glucose) and micro nutrients (e.g., amino acids) respectively (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Germany) [23]. One Ambr®250 vessel was used to cultivate the cells for the DoE, while the second vessel was used as an internal reference standard.

The cultivation was conducted over 9 days with daily feeds (1% feed medium A, 0.1% feed medium B) from day 3 and additional glucose feeds (400 g/L stock solution) to a culture glucose concentration of 5 g/L from day 5. At peak cell density from day 7 to 9 the cells were cultivated in 250 ml shake flasks (Corning, USA) in a Heracell 240 CO₂ incubator at 36.8°C and 7.5% CO₂ (Thermo Scientific, USA) using a MaxQ CO₂ Plus shaker platform (Thermo Scientific, USA).

2.2 | Directed cell viability adjustment

The viability adjustment was conducted in shake flasks to treat cells from a single process. Thereby, improving the comparability of the DoE runs, compared to using

PRACTICAL APPLICATION

Consistent adjustment of critical process parameters is the key for meaningful DoE analysis. Therefore, cytotoxic camptothecin was used in a novel approach to adjust the cell viability at peak cell densities. Thereby, the viability can be used as an input factor for the process characterization, enabling further analysis of the effects and interactions of cell viabilities without elongation of the process duration or variation of other process parameters. This highlights the importance of novel strategies to implement QbD principles on various process steps.

the two available Ambr®250 vessels for multiple cultivations. After transfer to the shake flasks, camptothecin was added to concentrations of 10 and 30 μM to adjust the targeted cell viabilities of ~60% and ~80%, respectively. The used concentrations were evaluated by a standard series of camptothecin at peak viable cell density (20×10^6 cells/ml). Viabilities for the multivariate data analysis were calculated by the combination of the relative decline in cell density to the reference cultivation and the measured viability for each cultivation run.

2.3 | Analytics

During the production process 1 ml samples were taken daily. Viable cell densities and viabilities were measured using a Cedex HiRes (Roche Innovatis, Switzerland). The pH (7.2) and pO₂ (60%) were measured and controlled by the Ambr®250 system. Offline pH measurements for off-set calibration (for ΔpH > 0.05) were performed using a FiveEasy Plus pH meter FP20-Micro (Mettler Toledo, USA) every 2 days.

Substrates (glucose, lactate, glutamine, glutamate), the produced mAb and total protein concentrations were analyzed during the production process and after the cell separation using the Cedex Bio (Roche, Switzerland). The DNA concentration in the supernatant was analyzed using the Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Antibody bioactivity was determined in triplicates by an adherent mouse fibroblast (L929) cell (CLS Cell Lines Service, Germany; catalog number 400260) based assay using the tumor necrosis factor alpha (TNF-α) under the presence of actinomycin D. L929 cell viability was analyzed using the cell titer-blue assay (Promega, USA) after 24 h of treatment

with the antigen and antibody. The produced antibody was diluted and used in low and high concentrations of 8 and 80 ng/ml, respectively. The antigen TNF- α was used in a fixed concentration, determined to result in around 20% L929 cell viability without addition of functional antibody.

2.4 | Cell separation

The cell separation at the end of the process was performed by centrifugation and filtration of 6 ml cell culture broth for each experimental run. Centrifugation was performed for 5 min at $300 \times g$ using a Centrifuge 5702 (Eppendorf, Germany), while filtration was performed using Sartoclear Dynamics Lab P15 syringes with $0.2 \mu\text{m}$ filters (Sartorius, Germany).

2.5 | Design of experiments (DoE)

The design and analysis was performed using the DoE software MODDE 12 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Sweden). Three critical parameters determined during risk assessment were used as factors (F_1 = viability, F_2 = cell density, F_3 = separation method) for full factorial designs with three center point runs. With the viability varied on three levels and the third factor as a qualitative factor, the design resulted in two full factorial approaches with two factors (F_1 and F_2) for each separation method with a total of 18 experiments. Hereinafter, the factor settings are described as 0 for center point level and $-1/1$ for the low and high levels of the full factorial squares, respectively. The qualitative factors for the separation method are abbreviated as C for centrifugation and F for filtration.

The cell viability was varied equally between 60% and 99 % by addition of camptothecin. For the cell density, the cell broth was diluted with fresh PM before cell separation. Total cell densities were varied equally between 10 and 20×10^6 cells/ml. An overview of the experimental setup and the explained numerical coding of the parameter levels are depicted in the [supplements](#). Three responses were analyzed after the cell separation: mAb proportion to impurities, residual DNA in the supernatant and product bioactivity.

2.6 | Multivariate data analysis (MVDA)

The mathematical models were fitted using multiple linear regression (MLR) with squares and interactions in MODDE 12 (Umetrics, Sartorius Stedim Data Analytics, Sweden) as described by Boehl et al. [18]. Model statistics, namely the R-squared, adjusted R-squared, Q-squared,

model validity, and reproducibility were calculated to assess the conducted model. Factors with a coefficient of zero in its confidential interval are regarded to have no significant influence on the response and were therefore removed from the model. The design space was calculated using Monte Carlo simulations with parameter limits summarized in the [supplements](#).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

Key objective of this study was the investigation of parameter effects on the robustness and quality of the primary recovery for the mAb production process. Several process parameters were evaluated in regard to their importance for the process and theoretical risks for further downstream processing. Identified critical process parameters were evaluated based on a DoE approach with a focus on mAb quality and process related impurities after the cell separation. Thereby, a quality focused process evaluation was enabled, resulting in defined knowledge about the different parameter effects and interactions. This can be used to change and adjust the following downstream process for optimal product recovery.

3.1 | Risk assessment

The quality of the production process step was earlier evaluated by analysis of multiple intermediate CQAs [19]. During the production step, product of consistent quality was produced within the investigated knowledge space [19]. Thus, the product quantity and purity were established as the most important quality criteria for the subsequent downstream process. Cell viabilities, growth rates and integral viable cell concentrations were monitored as responses for cell growth and maintenance. These attributes provide critical information about a possible delay in the culture duration or low cell maintenance. Improvements in cell densities on the other hand can lead to reduced process time and production costs as well as higher mAb titers.

In order to further investigate the critical role of these intermediate attributes, the viability and the cell density were determined as critical process parameters for the following process step, namely the cell separation. In earlier studies, low viability representing suboptimal cellular condition could be correlated to higher amounts process related impurities, which have to be removed at high cost during further downstream process steps [19]. Higher cell densities were shown to impact the effectiveness and efficiency of the cell removal [24]. However, the peak cell density during the production process was determined

to have an overall higher impact on the antibody titer than productivity enhancing conditions [19]. Furthermore, high values for these parameters represent the previously established quality of the production process [18, 19].

Thereby, the viability and cell density can be used as linking parameters between mAb production and downstream processing. With the aim of a broad evaluation of the primary recovery, the separation method was also determined as a critical process parameter. The interaction between the separation method and other parameters could be especially interesting to dynamically adjust the cell removal for given process parameters. Filtration and centrifugation were compared as general standards in the biopharmaceutical industry. Internal parameters within the separation methods, such as time and speed of the centrifugation or filter size for the filtration were not investigated further, since these parameters are well optimized for the used separation protocols.

3.2 | DoE structure and implementation

In order to investigate the effects and interactions of the determined critical process parameters, based on the ICH Guidelines, a DoE was set up. The factors F_1 (viability) and F_2 (total cell density) were combined in a full factorial design, each varied on a three-level scale (-1, 0, 1). Since the factor F_3 (separation method) is a qualitative factor with two options (centrifugation or filtration) there is no center level definable. Therefore, a three-dimensional subspace was created in which the factors pattern a regular two-level factorial design. Replicated center points were located at the centers of the front and back surfaces of the cube. By that, the quantitative factors are varied in three levels, which is desirable for the following data analysis. To further increase the available data, additional 0 level experiments were added for the viability. These were added to increase the overall data sets and comparability for the viability factor, since the method of varying CHO cell viabilities using camptothecin was newly established for this process. The resulting design added up to 18 experiments and is depicted in Figure 1.

For further in-depth investigation of the varied process parameter effects and interactions various critical responses for the process step were determined. In order to evaluate the purity of the supernatant the residual DNA content as well as the proportion of produced antibody to process and product related impurities, like host cell proteins were analyzed. These attributes can have a severe effect on the time, yield and expenses of further downstream processing. Hence, limiting the amount of said impurities is one of the main quality aims for the upstream process and especially the primary recovery. Additionally,

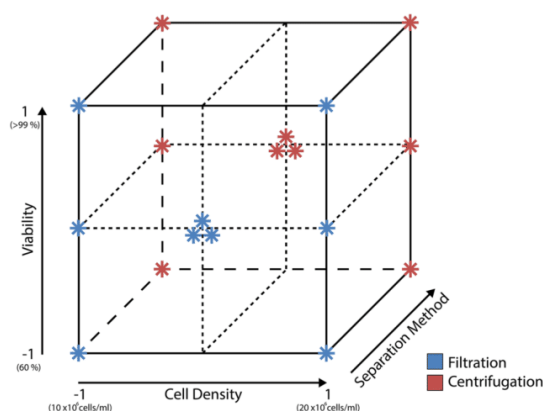


FIGURE 1 Schematic representation of the conducted design of experiments for the viability, cell density and separation method. The color of the stars represents the qualitative options for the separation method, centrifugation (red) and filtration (blue).

the bioactivity of the mAb was analyzed as its main CQA, which represents the maintenance of the mAb activity during the cell separation.

3.3 | Directed viability adjustment

The cell viability at the end of the culture duration was defined as one of the critical process parameters. For reliable and reproducible DoE analysis the parameters must be varied consistently on the described levels. So far, directed adjustment of cell viabilities without elongation of the culture duration was a great challenge. Longer cultivation times lead to large variances in the cell density and product titer, therefore distorting the comparability of the experimental set up. That is why camptothecin (CPT) was used in different concentrations to adjust the cell viability at the end of the exponential growth phase. The cytotoxic effect of CPT on the mAb producing CHO cells was analyzed for various concentrations, with 10 and 30 μM being used to lower the cell viability to $\sim 80\%$ and $\sim 60\%$ respectively over 48 h. The viable cell densities over the cultivation with addition of CPT at the beginning of the stationary phase are depicted in Figure 2.

While the cell density in the standard cultivation approached the stationary phase with around 20×10^6 cells/ml, the cultures treated with CPT showed a decline in viable cell densities. This resulted in relative end viabilities of 82.5% and 64.3 % for 10 and 30 μM CPT treatments, respectively. This confirmed the effectiveness of the newly established protocol and enabled further investigation of the viability as a factor within the DoE approach.

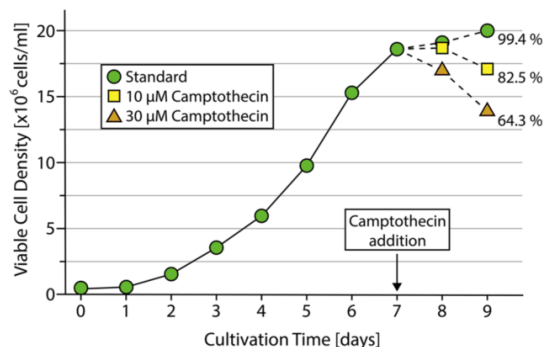


FIGURE 2 Course of cultivation with camptothecin addition on day 7. The percentage values represent the relative viability of the respective cultivation conditions.

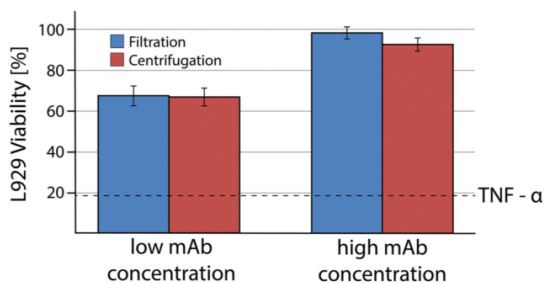


FIGURE 3 Mean results of bioactivity assay for all nine experimental runs of the filtration and centrifugation level with the dashed TNF- α line representing cell viabilities without addition of monoclonal antibody.

3.4 | Bioactivity assay

Product bioactivity is one of the most important critical quality attributes for the upstream process of monoclonal antibody production. All samples generated during the experimental phase of the DoE were investigated using a cell-based bioactivity assay, which is based on the mAb property to bind and inactivate the cytotoxic antigen TNF- α . Thereby, the viability of the used L929 assay cells represents the bioactivity of the mAb sample. High bioactivity indicates a well working and posttranslational functionalizing antibody production. Assay results are depicted in Figure 3, with the dashed TNF- α line representing cell viabilities without the addition of monoclonal antibody.

The shown results represent the mean bioactivities of all experimental runs (see above in Figure 1) for the filtration (blue) and the centrifugation (red) for the given mAb concentrations. Deviation between the investigated runs of each separation method as well as the overall difference between filtration and centrifugation was insignificant. The standard deviation of the center point runs was in the

same range as the overall deviation for all experiments, resulting in insufficient modeling for the bioactivity as a DoE response, which confirms the consistent bioactivity over the various experimental runs. That is why the bioactivity was excluded from further multivariate data analysis. These results elucidate the hypothesis that within the investigated knowledge space the upstream process has no significant effect on the antibody bioactivity for the described process. Therefore, a high mAb titer and low amounts of process-related impurities can be defined as the main goal for the upstream process, which were further investigated using statistical modeling.

3.5 | Multivariate data analysis

The experimental data was evaluated by calculation of a statistical model using multiple linear regression (MLR), leading to specific conclusions for factor effects and interactions for the studied parameters. Figure 4 presents the main effects plot for the mAb proportion and the residual DNA content.

The key factors total cell density and viability showed a high impact on the selected responses, both as linear effects (TCD; Via) and non-linear effects (TCD*TCD; Via*Via). Higher cell densities during the cell separation increase the proportion of antibody as well as the residual DNA content in the supernatant. Its strong quadratic effect shows a significant non-linearity in the correlation. The viability shows effects with positive coefficients on the proportional mAb content and effects with negative coefficients on the residual DNA. For both responses the quadratic effect highlights the non-linear effect of the viability. In contrast, the separation methods showed only marginal to non-significant effects and where therefore mainly excluded from the mathematical model. That means the different separation methods did not result in considerable changes in the investigated quality attributes and can be evaluated as equally effective for the first step of the primary recovery.

Accuracy of the regression models was verified by analyzing the corresponding model statistics as described by Wohlenberg et al. Thereby, the R-squared (R^2) term is the fraction of the variation of the response explained by the model, while the adjusted R-squared (R^2_{adj}) term is adjusted for the degrees of freedom of the analyzed model. Values over 0.5 for these terms ensure high model significance. Model accuracy of future predictions is statistically estimated by the Q-squared (Q^2) term. Values for Q^2 should exceed 0.1 for significant models and 0.5 for good models. The model validity checks for diverse model problems. A value less than 0.25 predicts statistically significant model problems, such as the presence of outliers,

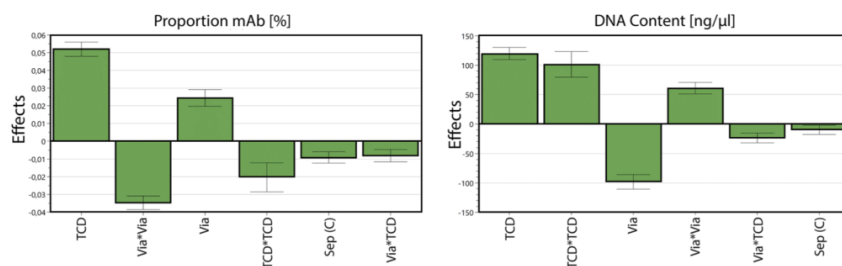


FIGURE 4 Factor effects (TCD = total cell density; Via = cell viability; Sep = separation method) for the studied responses. Factor squares and interactions are combined with a star. Only significant factors and interactions are considered and displayed in descending order for each response.

TABLE 1 Summarized model statistics for the studied responses. R^2 representing the model significance, Q^2 representing the predictive power of the model, model validity representing possible model problems and the reproducibility representing the center point variation compared to the overall variability

	R^2	R^2 adj.	Q^2	Model validity	Reproducibility
mAb proportion	0.997	0.996	0.990	0.708	0.997
DNA content	0.997	0.995	0.991	0.813	0.995

transformation problems in the calculation, or incorrect model terms. The reproducibility compares the variation of the center point replicates to the overall variability, with a value over 0.5 insuring high model reproducibility. The calculated model statistics for the proportional mAb as well as the DNA content are summarized in Table 1.

The calculated model statistics showed exceptional significance and prediction accuracy for the investigated responses with values mainly over 0.99. Model validity showed the lowest values with 0.708 and 0.813 for the mAb proportion and DNA content, respectively, which are still sufficient to rule out potential model problems. The models were also characterized as well reproducible with values close to 1, which can be explained by the small variance in the centre point runs for each cell separation method.

The approved regression models were further used for the construction and analysis of response culture plots, which provide a lucid two-dimensional evaluation of the factors and corresponding response values. Response plots for each response divided by the separation method are illustrated in Figure 5.

By analysis of the response contour plots the described factor effects and interactions were outlined more detailed. Comparison of the left and right plots confirms the marginal effect differences between the cell separation methods. For the mAb proportion the optimal area was only slightly enlarged using the filtration method. Overall, these differences can be rated as insignificant for the investigated responses, meaning the investigated cell separation methods have no critical effect on the primary recovery of the studied process.

The factor effects of the viability and the cell density were also confirmed with the response contour plots. As expected, lower viabilities resulted in higher residual DNA concentrations as well as higher amounts of host cell proteins in the supernatant, thus a lower proportional mAb content. Apoptotic cells release large amounts of cell specific impurities to the cell culture medium, which are difficult to remove during the first steps of primary recovery. Removal of said impurities during the downstream process can be time consuming and costly, underlining the critical effect of the cell viability for the entire process performance. Higher cell densities during the cell separation improved the mAb proportion, while increasing the undesirable DNA content. Thereby the cell density shows a discrepancy between optimal mAb proportion and residual DNA. Both factors also showed interaction and non-linearity effects. In order to further analyze the optimal factor set points and visualize the experimental design region in which all response specifications are fulfilled, a designated design space was calculated. Response specifications were accounted during the process development and adjusted during the risk assessment and data analysis. Figure 6 depicts the resulting design space, with green areas marking a robust design space with low probabilities for possible process failures.

The designated design space was established around 0 level for the cell density and between 0 and 1 level for the viability. Insignificant differences resulting from the separation methods were excluded during the design space determination. Summarized, the viability should be maintained above 85 % to avoid undesired amounts of HCPs and

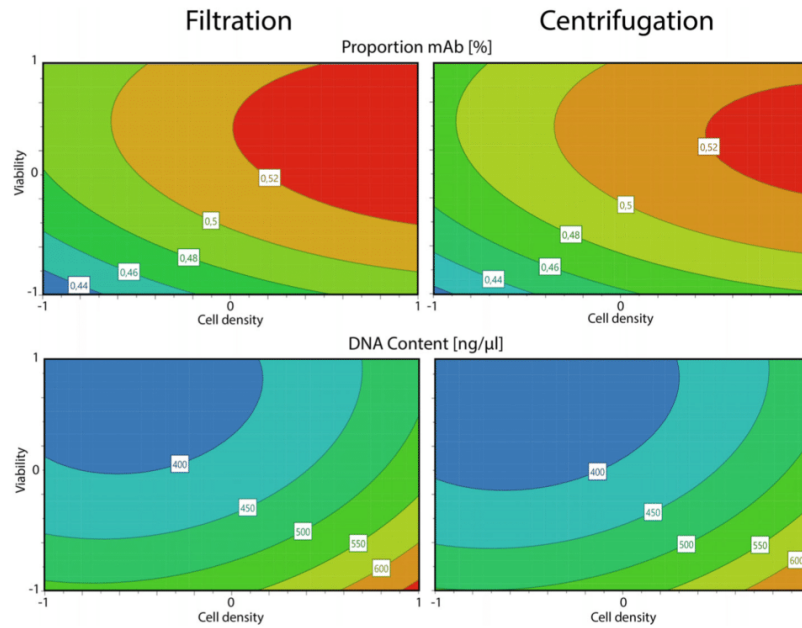


FIGURE 5 Response contour plots representing the interaction effects of factors viability and cell density on the studied process responses for the filtration (left) and the centrifugation (right).

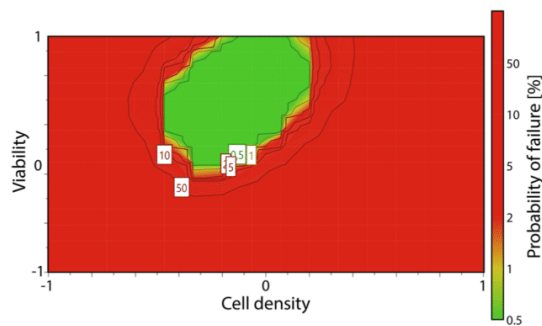


FIGURE 6 Determined design spaces for the mAb production process with color coded probability of failure for the assessed response specifications.

DNA impurities. In order to strike the balance between optimal proportions of the produced antibody to residual DNA the cell density during the cell removal should be controlled to be around 15×10^6 cells/ml for the primary recovery of the studied fed batch process.

4 | CONCLUDING REMARKS

Established Quality by Design principles were implemented in the first step of the primary recovery of a mAb production process. This study builds upon previous work

on the inoculum's expansion as well as the production step and marks the final step toward a complete upstream process characterization following the FDA guidelines. Critical process parameters were determined during the risk assessment and combined in a DoE approach. In order to adjust the cell viability during the process without elongation of the culture duration, a directed cell death protocol using cytotoxic camptothecin was established. Thereby, it was possible to controllably vary the viability between 60%–99%. The process was conducted using the ambr250 bioreactor platform, ensuring optimal process control for the desired scale. A mathematical model was calculated to fit the compiled response data using multivariate data analysis. By that, parameter significance was assessed and specific parameter effects and interactions were identified. Bioactivity of the produced antibody was confirmed to stay intact over the varied experimental runs, ruling out parameter effects on the mAb quality. The purity of the supernatant was assessed by measurement of HCPs and residual DNA amounts and used as critical quality attribute because of its crucial effect on the following downstream process. The comparison between centrifugation and filtration as separation methods did not result in significant changes in the amount of impurities in the supernatant. Cell viability and cell density during the separation were determined as non-linear key process parameters with interaction effects.

These responses were used to establish a design space for optimal mAb proportion and low amounts of residual DNA after the primary recovery. As expected, maintenance of high cell viabilities was determined to be crucial to reduce undesired impurities. The cell density showed a contrary effect on the amounts of HCPs and DNA, with higher cell densities increasing the DNA content while lowering the concentration of HCPs. Therefore, the design space was calculated to combine optimal mAb proportion while maintaining DNA amounts under the defined limit. In conclusion, the viability should be maintained above 85% and the cell density should be controlled around 15×10^6 cells/ml during the cell removal.

The described case study highlights the importance of cell maintenance during the entire upstream process. It confirms the previous findings that changes during the production part of the established mAb production process have no significant influence on the bioactivity of the antibody [19]. Thereby, process control and primary recovery should be tuned toward high purity of the supernatant, enabling time and cost efficient downstream processes.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the financial support of the research by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (031B0744).

CONFLICT OF INTEREST

We confirm that all corresponding authors agree with the submission and publication of this paper and that there is no conflict of interest concerning financial and personal relationships. The manuscript does not contain neither experiments using animals nor human studies. Furthermore, we confirm that the article has not been published previously by any of the authors and is not under consideration for publication elsewhere at the time of submission.

ORCID

Katharina V. Meyer  <https://orcid.org/0000-0003-1198-6664>

REFERENCES

1. El Abd Y, Tabll A, Smolic R, Smolic M. Mini-review: the market growth of diagnostic and therapeutic monoclonal antibodies – SARS CoV-2 as an example. *Hum Antibodies*. 2022;30:15-24.
2. Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol*. 2019;37:9-16.
3. Jin S, Sun Y, Liang X, et al. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7:39.
4. Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020;11:2251.
5. Jahanshahlu L, Rezaei N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110337.
6. Santos-Neto JF, Oliveira FO, Hodel KVS, et al. Technological advancements in monoclonal antibodies. *Sci World J*. 2021;2021:1-19.
7. Sneer RD. Quality by design: building quality into products and processes. In: Zhang L, ed. *Nonclinical Statistics for Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Springer International Publishing; 2016: 461-499. doi: 10.1007/978-3-319-23558-5_18
8. US Food and Drug Administration. Guidance for Industry PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, manufacturing, and Quality Assurance. 19 (2004).
9. The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical development Q8 (R2). 2009.
10. The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Quality risk management Q9. 2005.
11. The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline: Pharmaceutical quality systems Q10. 2008.
12. US Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century; a risk-based approach. 2004.
13. Rathore AS, Winkle H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*. 2009;27:9.
14. Rathore AS. QbD/PAT for bioprocessing: moving from theory to implementation. *Curr Opin Chem Eng*. 2014;6:1-8.
15. Rathore AS. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol*. 2009;27:546-553.
16. Aksu B, Sezer AD, Yegen G, Kuscu L. QbD implementation in biotechnological product development studies. In: Chen T & Chai SC, eds. *Special Topics in Drug Discovery*. InTech; 2016. doi: 10.5772/66296
17. Harms J, Wang X, Kim T, Yang X, Rathore AS. Defining process design space for biotech products: case study of *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Prog*. 2008;24:655-662.
18. Böhl OJ, Schellenberg J, Bahnemann J, et al. Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process. *Eng Life Sci*. 2021;21:196-207.
19. Wohlenberg OJ, Kortmann C, Meyer KV, et al. Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles. *Eng Life Sci*. 2022;22:484-494.
20. Nagashima H, Watari A, Shinoda Y, Okamoto H, Takuma S. Application of a quality by design approach to the cell culture process of monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a design space. *J Pharm Sci*. 2013;102:4274-4283.
21. Abu-Absi SF, Yang L, Thompson P, et al. Defining process design space for monoclonal antibody cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2010;106:894-905.
22. Bodley AL, Shapiro TA. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:3726-3730.
23. Janoschek S, Schulze M, Zijlstra G, Greller G, Matuszczyk J. 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*. 2019;35:e2757.

24. Popova D, Stonier A, Pain D, Titchener-Hooker NJ, Farid SS. Integrated economic and experimental framework for screening of primary recovery technologies for high cell density CHO cultures. *Biotechnol J*. 2016;11:899-909.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Wohlenberg OJ, Kortmann C, Meyer KV, Scheper T, Solle D. Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies. *Eng Life Sci*. 2022:e2200056. <https://doi.org/10.1002/elsc.202200056>

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde der Herstellungsprozess eines monoklonalen Antikörpers analysiert und optimiert. Das Ziel war es, den *Quality by Design* Ansatz in den *Upstream*-Prozess zu implementieren, welcher in die Vorkultur, den Produktionsprozess und die Zellabtrennung unterteilt wurde. Für jeden Prozessschritt wurde der Zusammenhang zwischen den Prozessparametern und der Prozess- bzw. Produktqualität untersucht. Der QbD Prozess folgte dabei dem mehrstufigen Ablauf aus Identifikation der kritischen Prozessparameter mittels Risikoanalyse und Festlegung der Zielgrößen als Qualitätsattribute des jeweiligen Prozessschrittes. Nach Erstellung und Durchführung eines *Design of Experiments* wurden die Daten mittels MVDA ausgewertet. Damit konnten Parametereffekte und -Interaktionen auf die bestimmten Qualitätsattribute analysiert und ganzheitlich ein *Design Space* zur robusten Durchführung des Prozessschrittes definiert werden.

Im ersten Kapitel des experimentellen Teils dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.1) wurde die Vorkultur des Prozesses untersucht. Nach der Bewertung der Passagendauer, viablen Zelldichte und MTX Konzentration als CPPs der Vorkultur, wurde ein DoE Versuchsplan mit einem teilfaktoriellen CCC Design erstellt. Als Zielgrößen wurden die Wachstumsraten und Endviabilitäten der Vorkultur und des anschließenden Produktionsprozesses sowie der Gesamtprodukttiters und die spezifische Produktivität der Zellen betrachtet. Die Analyse der Daten identifizierte die Dauer der Passagen als Schlüsselparameter und zeigte einen kritischen Einfluss der Vorkultur auf den nachfolgenden Prozessschritt. Mit verlängerter Passagendauer nahmen sowohl die Wachstumsraten als auch die Zellviabilitäten in der Vorkultur und dem nachfolgenden Produktionsprozess ab. Damit sank ebenfalls der Gesamttiters zum Abschluss des Produktionsschrittes. Eine entsprechende Überwachung und Kontrolle der Vorkulturdauer ist somit unerlässlich für ausreichendes Zellwachstum, optimale Zellerhaltung sowie hohe Antikörpertiter. Zusätzlich konnte ein entgegengesetzter Effekt von optimalen Wachstums- und Zellerhaltungsbedingungen und spezifischer Produktivität festgestellt werden. Die Zellen zeigten also unter suboptimalen Wachstumsbedingungen eine erhöhte spezifische Produktivität, welche jedoch nicht ausreichte die verringerte Zelldichte im Hinblick auf den Gesamttiters auszugleichen.

Entsprechend dem definierten *Design Space* sollte die Passagendauer und die MTX Konzentration für eine robuste Prozessführung reduziert werden, während die initiale Zelldichte der Passagen im Standardbereich kontrolliert werden kann. Die initiale Zelldichte muss dabei direkt zum Beginn jeder Passage bestimmt und gegebenenfalls angepasst werden. Anschließend wurden die Ergebnisse der Vorkultur weiter mit den Prozessparametern der folgenden Prozessschritte verbunden.

Die QbD Implementierung in den Produktionsprozess ist im zweiten Kapitel des experimentellen Teils (siehe 4.2) beschrieben. Der pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration des Mediums wurden mittels FMEA als kritische Inputs für den Produktionsprozess identifiziert. Zusätzlich zu den Parametern aus der Risikoanalyse wurden die Schlüsselparameter der Vorkulturversuche einbezogen, sodass die Dauer der N-1 Passage, sowie die initiale Zelldichte des Produktionsprozesses ebenfalls als CPPs festgelegt wurden. Das entworfene dreidimensionale CCF Design wurde teilfaktoriell um den Faktor der initialen Zelldichte erweitert, welcher auf fünf Stufen variiert und auf den Eckpunkten des faktoriellen Raums verteilt wurde. Optimale Vergleichbarkeit und Kontrolle der untersuchten Parameter wurde durch die Verwendung des Ambr®15 Mikrobioreaktorsystems sichergestellt.

Zur Analyse des Zellwachstums und dem Zellerhalt wurden die Wachstumsraten, integrale Zellkonzentrationen und Endviabilitäten der durchgeführten Versuchsläufe betrachtet. Im Bezug auf die Antikörperproduktion wurde der Gesamtiter, die spezifische Produktivität sowie das Verhältnis von produziertem mAb zu HCPs als Zielgrößen analysiert. Anhand der MVDA wurden der eingestellte pH-Wert sowie die initiale Zelldichte als Schlüsselparameter für den Produktionsprozess identifiziert. Der errechnete *Design Space* wurde anhand weiterer Versuchsläufe verifiziert, woraufhin die Bioaktivität der produzierten Antikörper untersucht wurde. Da alle untersuchten Proben eine intakte Bioaktivität aufwiesen, wurde der Effekt des *Upstream*-Prozesses auf die Funktionalität des mAbs als insignifikant eingestuft. Daher wurden hohe Zellerhaltung, optimale Antikörperproduktion sowie geringe Mengen an prozessbedingten Verunreinigungen als Ziel der Prozesskontrolle definiert.

Als Übergang zu dem nachfolgenden *Downstream*-Prozess wurde im dritten Teil dieser Arbeit (siehe 4.3) die Zellabtrennung analysiert. Basierend auf den Erkenntnissen der beschriebenen Versuche wurden die Viabilität und die Zelldichte als kritische Parameter definiert und in einem vollfaktoriellen Design untersucht. Zur gezielten Einstellung der Viabilität als variabler Faktor wurde die Behandlung der Zellen mit definierten Konzentrationen von CPT etabliert. Zusätzlich wurde die Methode der Zellabtrennung als qualitativer Faktor zwischen Zentrifugation und Filtration variiert. Die Untersuchung der Bioaktivität als direktes Qualitätsattribut des Produktes zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den verschiedenen Versuchen, weshalb sie als Zielgröße für die Berechnung der Regressionsmodelle ausgeschlossen wurde. Dieses Ergebnis bestätigte erneut, dass innerhalb der untersuchten Prozessgrenzen des *Upstream*-Prozesses durchgehend Antikörper mit unveränderter Funktionalität produziert wird.

Daher wurden das Verhältnis von produzierten mAbs zu HCPs sowie die Konzentration an verbliebene DNA als Maß für prozessbedingte Verunreinigungen definiert und als Zielgrößen untersucht. Die identifizierten Parametereffekte und der etablierte *Design Space* zeigte, dass die Viabilität über 85 % erhalten werden sollte, um eine ausreichende Reinheit des Kulturüberstandes für den folgenden *Downstream*-Prozesse sicherzustellen. Damit unterstreicht die Untersuchung der Zellabtrennung die Bedeutung optimaler Zellerhaltung während des *Upstream*-Prozesses.

Zusammengefasst wurde die Vorkultur, der Produktionsprozess und die Zellabtrennung eines MAb-Herstellungsprozesses anhand der QbD Methodik graduell untersucht. Dieser Ansatz ermöglichte die Analyse von Prozessparametern und den damit verbundenen Qualitätsattributen sowie eine stufenweise Verknüpfung der einzelnen Prozessschritte. Schlüsselparameter mit kritischem Einfluss auf intermediäre Qualitätsattribute wurden in nachfolgenden Prozessschritten als Eingangsfaktoren eingesetzt und Zielgrößen über die Grenzen der einzelnen Prozessschritte hinweg betrachtet. Die etablierten *Design Spaces* definieren Arbeitsbereiche in denen eine robuste Prozessführung im Bezug auf eine optimale Zellerhaltung sowie eine hohe Antikörperproduktion garantiert ist. Dabei ist zu beachten, dass die Ergebnisse sehr prozessspezifisch sind, sodass die etablierten Grenzen für die Prozessentwicklung neuer biopharmazeutischer Antikörper nicht direkt übernommen werden können.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen jedoch die methodische Implementierung und den Nutzen der Analysestrategien des QbD Ansatzes und liefern Daten sowie Prozessverständnis, welche in der Risikoanalyse und Versuchsplanung zukünftiger Prozesse genutzt werden können. Darüber hinaus ermöglichen die Erkenntnisse über Prozesszusammenhänge die Verbesserung der Überwachung und Regelung. Die Vorkultur sollte demnach deutlich detaillierter analysiert werden. Außerdem können die gesetzten Grenzen des Design Spaces genutzt werden um fehlerhafte Prozesse frühzeitig abubrechen, womit Zeit und Ressourcen eingespart werden können. Für den Produktionsprozess sollten neben der häufig eingesetzten Sensorik für pH- und Sauerstoffmessung auch die Viabilität und Zelldichte kontinuierlich im laufenden Prozess überwacht werden. Damit lässt sich das spezifische Feeding-Profil optimal an das Zellwachstum anpassen. Zusätzlich wird durch die *in-line* Überwachung eine gezielte Termination des Produktionsprozesses ermöglicht. Damit wird die Zellabtrennung durchgeführt bevor die Viabilität der Zellen in der letzten Phase des Prozesses zu weit absinkt und der *Downstream*-Prozess aufgrund der verstärkten Verunreinigungen aufwendig intensiviert werden muss.

Im Hinblick auf kontinuierliche Kultivierungsprozesse ermöglichen die gewonnenen Prozesskenntnisse darüber hinaus die dynamische Anpassung der Prozessbedingungen. Damit können Prozesse, nach dem Auftreten von Fehlern in der Betriebsweise, in den Standardzustand zurückgeführt werden. Innerhalb der Grenzen des entwickelten *Design Spaces* wird dabei weiterhin ausreichende Prozess- und Produktqualität garantiert.

Zur weiteren Charakterisierung des *Upstream*-Prozesses und der Produktqualität können außerdem zusätzliche Qualitätsattribute wie die Verhältnisse der Glykoformen und Ladungsvarianten untersucht werden. UHPLC-MS Analysen ermöglichen hierbei die Untersuchung des Endproduktes sowie die kontinuierliche Inprozesskontrolle. Darüber hinaus können die dargestellten Ergebnisse mit Studien des *Downstream*-Prozesses verbunden werden, um eine ganzheitliche Charakterisierung des vollständigen mAb-Herstellungsprozesses zu erreichen. In der Analyse des *Downstream*-Prozesses sollten wiederum die beschriebenen QbD Prinzipien und die Einteilung in einzelne Prozessschritte angewendet werden, um eine schnelle und systematische Charakterisierung sicherzustellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Covey, S. R. *The Seven Habits of Highly Effective People: Restoring the Character Ethic.* (Simon and Schuster, 1992).
2. Rathore, A. S. & Winkle, H. Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **27**, 9 (2009).
3. Rathore, A. S. QbD/PAT for bioprocessing: moving from theory to implementation. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **6**, 1–8 (2014).
4. Santos-Neto, J. F. *et al.* Technological Advancements in Monoclonal Antibodies. *Sci. World J.* **2021**, 1–19 (2021).
5. El Abd, Y., Tabll, A., Smolic, R. & Smolic, M. Mini-review: The market growth of diagnostic and therapeutic monoclonal antibodies – SARS CoV-2 as an example. *Hum. Antibodies* **30**, 15–24 (2022).
6. Grilo, A. L. & Mantalaris, A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends Biotechnol.* **37**, 9–16 (2019).
7. Jin, S. *et al.* Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 39 (2022).
8. Zahavi, D. & Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* **9**, 34 (2020).
9. Levine, M. M. Monoclonal Antibody Therapy for Ebola Virus Disease. *N. Engl. J. Med.* **381**, 2365–2366 (2019).
10. Wang, C. *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* **11**, 2251 (2020).

11. Juran, J. M. Juran on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services. (The Free Press, 1992).
12. Aksu, B., Sezer, A. D., Yegen, G. & Kusçu, L. QbD Implementation in Biotechnological Product Development Studies. in *Special Topics in Drug Discovery* (eds. Chen, T. & Chai, S. C.) (InTech, 2016).
13. CMC Biotech Working Group. A-Mab: A case study in bioprocess development; Version 2.1. (2009)
14. Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. *Immunologie für Einsteiger*. (Springer Berlin Heidelberg, 2015).
15. Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. & Weis-Garcia, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILARJ*. **46**, 258–268 (2005).
16. Suerbaum, S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, (2016).
17. Davies, D. R. & Chacko, S. Antibody structure. **26**, 421–427 (1993).
18. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A. & Gilliland, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **8**, 55 (2019).
19. Wang, X., An, Z., Luo, W., Xia, N. & Zhao, Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell* **9**, 74–85 (2018).
20. Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169–217 (1994).
21. Adlersberg, J. B. The immunoglobulin hinge (Interdomain) region. *Ric. Clin Lab* **6**, (1976).

22. Hossler, P., Khattak, S. F. & Li, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* **19**, 936–949 (2009).
23. Hamm, M., Wang, Y. & Rustandi, R. Characterization of N-Linked Glycosylation in a Monoclonal Antibody Produced in NS0 Cells Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Pharmaceuticals* **6**, 393–406 (2013).
24. Mimura, Y. *et al.* Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell* **9**, 47–62 (2018).
25. Goldsmith, S.J. & Signore, A. An overview of the diagnostic and therapeutic use of monoclonal antibodies in medicine. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **54**, 574–81 (2010).
26. Edwards, P. A. W. Some properties and applications of monoclonal antibodies. *Biochem. J.* **200**, 1–10 (1981).
27. Berger, M., Shankar, V. & Vafai, A. Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *Am. J. Med. Sci.* **324**, 14–30 (2002).
28. Castelli, M. S., McGonigle, P. & Hornby, P. J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **7**, (2019).
29. Reinard, T. *Molekularbiologische Methoden*. Ulmer, (2010).
30. Mahmood, T. & Yang, P. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* **4**, 429–34 (2012).
31. Begum, H., Murugesan, P. & Tangutur, A. D. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques* **73**, 59–70 (2022).
32. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–74 (1971).
33. Borrebaeck, C. A. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunol Today* **21**, 379–82 (2000).

34. Walter, J.-G. Protein microarrays: Reduced autofluorescence and improved LOD. *Eng. Life Sci.* **10**, 103–08 (2010).
35. Winter, G. & Milstein, C. Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293–99 (1991).
36. Legouffe, E. Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clin Exp Immunol* **98**, 323–29 (1994).
37. Zhang, C. Hybridoma Technology for the Generation of Monoclonal Antibodies. in *Antibody Methods and Protocols* (eds. Proetzel, G. & Ebersbach, H.) 117–135 (Humana Press, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-931-0_7.
38. Listek, M., Hönow, A., Gossen, M. & Hanack, K. A novel selection strategy for antibody producing hybridoma cells based on a new transgenic fusion cell line. *Sci. Rep.* **10**, 1664 (2020).
39. Boulianne, G.L., Hozumi, N. & Shulman, M.J. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**, 643–46 (1984).
40. Tsurushita, N., Hinton, P. R. & Kumar, S. Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax. *Methods San Diego Calif* **36**, 69–83 (2005).
41. Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridg, R. B. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs* **2**, 256–265 (2010).
42. Weiner, L. M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* **29**, 1–9 (2006).
43. Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
44. Watkins, N. A. & Ouweland, W. H. Introduction to Antibody Engineering and Phage Display. *Vox Sang.* **78**, 72–79 (2000).

45. Frenzel, A., Schirrmann, T. & Hust, M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *mAbs* **8**, 1177–1194 (2016).
46. Rau, R. Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 70ii–7073 (2002).
47. Mease, P. J. Adalimumab in the treatment of arthritis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 133–148 (2007).
48. Singh, S. *et al.* Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr. Clin. Pharmacol.* **13**, 85–99 (2018).
49. Al-Rubeai, M. Animal Cell Culture. Cell Engineering vol. 9, Springer International Publishing, (2015).
50. Gagnon, M., Nagre, S., Wang, W. & Hiller, G. W. Shift to high-intensity, low-volume perfusion cell culture enabling a continuous, integrated bioprocess. *Biotechnol. Prog.* **34**, 1472–1481 (2018).
51. Särnlund, S., Jiang, Y. & Chotteau, V. Process intensification to produce a difficult-to-express therapeutic enzyme by high cell density perfusion or enhanced fed-batch. *Biotechnol. Bioeng.* **118**, 3533–3544 (2021).
52. Tjio, J. H. & Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* **108**, 259–268 (1958).
53. Trill, J. J., Shatzman, A. R. & Subinay, G. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 553–560 (1995).
54. Chusainow, J. *et al.* A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1182–1196 (2009).
55. Kunert, R. & Reinhart, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3451–3461 (2016).

56. Buchsteiner, M., Quek, L.-E., Gray, P. & Nielsen, L. K. Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 2315–2327 (2018).
57. Schellenberg, J. Implementierung einer kontinuierlichen Prozessführung zur Produktivitätssteigerung bei der Kultivierung tierischer Zellen. (2022).
58. Dean, J. & Reddy, P. Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1735–47 (2013).
59. Luo, J. *et al.* Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 146–56 (2012).
60. Ahn, W. S. & Antoniewicz, M. R. Towards dynamic metabolic flux analysis in CHO cell cultures. *Biotechnol. J.* **7**, 61–74 (2012).
61. Gronemeyer, P., Ditz, R. & Strube, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* **1**, 188–212 (2014).
62. Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. (Yijuan), Kiss, R. & Amanullah, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* **2**, 466–479 (2010).
63. Kloth, C., Maclsaac, G., Ghebremariam, H. & Arunakumari, A. Inoculum Expansion Methods, Recombinant Mammalian Cell Lines. in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* eib369 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
64. Bellingham, D. L., Sar, M. & Cidlowski, J. A. Methotrexate-induced overexpression of functional glucocorticoid receptors in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **83**, 153–171 (1992).
65. Hartley, J. L. Protein Expression in Mammalian Cells. MIMB vol. 801, Springer, Humana Press (2012).
66. Hu, W.-S. Cell culture bioprocess engineering, second edition. CRC Press(2020).

67. Li, F. *et al.* A Systematic Approach for Scale-Down Model Development and Characterization of Commercial Cell Culture Processes. *Biotechnol. Prog.* **22**, 696–703 (2006).
68. Nagraik, T. Process transfer and optimization of Chinese hamster ovary cell cultivation for monoclonal antibody production. (2021).
69. Janoschek, S., Schulze, M., Zijlstra, G., Greller, G. & Matuszczyk, J. 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 (2019).
70. Birch, J. R. & Racher, A. J. Antibody production. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 671–685 (2006).
71. Ben Yahia, B., Malphettes, L. & Heinzle, E. Predictive macroscopic modeling of cell growth, metabolism and monoclonal antibody production: Case study of a CHO fed-batch production. *Metab. Eng.* **66**, 204–216 (2021).
72. Schellenberg, J. *et al.* Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells. *Eng. Life Sci.* **22**, 427–436 (2022).
73. Kiss, B. *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins.* vol. 165 (Springer International Publishing, 2018).
74. Bibila, T. A. & Robinson, D. K. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol. Prog.* **11**, 1–13 (1995).
75. Claßen, J. *et al.* A novel LED-based 2D-fluorescence spectroscopy system for in-line bioprocess monitoring of Chinese hamster ovary cell cultivations—Part II. *Eng. Life Sci.* **19**, 341–351 (2019).

76. Graf, A. *et al.* A novel LED-based 2D-fluorescence spectroscopy system for in-line monitoring of Chinese hamster ovary cell cultivations – Part I. *Eng. Life Sci.* **19**, 352–362 (2019).
77. Meyer, K. V. *et al.* Monitoring cell productivity for the production of recombinant proteins by flow cytometry: An effective application using the cold capture assay. *Eng. Life Sci.* **21**, 288–293 (2021).
78. Popova, D., Stonier, A., Pain, D., Titchener-Hooker, N. J. & Farid, S. S. Integrated economic and experimental framework for screening of primary recovery technologies for high cell density CHO cultures. *Biotechnol. J.* **11**, 899–909 (2016).
79. Reif, O.-W. & Scheper, T. Aufreinigung. in *Angewandte Mikrobiologie* (ed. Antranikian, G.) 427–443 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
80. Gupta, A., Amara, J. P., Gousseinov, E. & Cacace, B. Chapter 6 - Recent advances in harvest clarification for antibodies and related products. in *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics* (ed. Matte, A.) 117–136 (Elsevier, 2020).
81. Tihanyi, B. & Nyitray, L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov. Today Technol.* **38**, 25–34 (2020).
82. Shukla, A. A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S. & Low, D. Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *J. Chromatogr. B* **848**, 28–39 (2007).
83. Capela, E. V. Monoclonal Antibodies - Addressing the Challenges on the Manufacturing Processing of an Advanced Class of Therapeutic Agents. in *Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives* (ed. Atta-ur-Rahman) vol. 4 142–203 (Bentham Science Publishers Ltd., 2017).

84. Kanje, S., Scheffel, J., Nilvebrant, J. & Hober, S. Chapter 2 - Engineering of Protein A for improved purification of antibodies and Fc-fused proteins. in *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics* (ed. Matte, A.) 35–54 (Elsevier, 2020).
85. Marichal-Gallardo, P. A. & Álvarez, M. M. State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: Process trends in design and validation. *Biotechnol. Prog.* **28**, 899–916 (2012).
86. Mazzer, A. R., Perraud, X., Halley, J., O'Hara, J. & Bracewell, D. G. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *J. Chromatogr. A* **1415**, 83–90 (2015).
87. Karst, D. J., Steinebach, F., Soos, M. & Morbidelli, M. Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process: Integrated Continuous Antibody Production Process. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 298–307 (2017).
88. Weinberg, W. C. *et al.* Development and regulation of monoclonal antibody products: Challenges and opportunities. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 569–584 (2005).
89. Böhl, O. J. *et al.* Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process. *Eng. Life Sci.* **21**, 196–207 (2021).
90. Wohlenberg, O. J. *et al.* Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles. *Eng. Life Sci.* **22**, 484–494 (2022).
91. Wohlenberg, O. J., Kortmann, C., Meyer, K. V., Scheper, T. & Solle, D. Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies. *Eng. Life Sci.* **n/a**, e202200056 (2022).

92. Wang, X., Hunter, A. K. & Mozier, N. M. Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 446–458 (2009).
93. Jakes, C. *et al.* Tracking the Behavior of Monoclonal Antibody Product Quality Attributes Using a Multi-Attribute Method Workflow. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**, 1998–2012 (2021).
94. Liu, Y. *et al.* A Fully Integrated Online Platform For Real Time Monitoring Of Multiple Product Quality Attributes In Biopharmaceutical Processes For Monoclonal Antibody Therapeutics. *J. Pharm. Sci.* **111**, 358–367 (2022).
95. Torkashvand, F., Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Main Quality Attributes of Monoclonal Antibodies and Effect of Cell Culture Components. *Iran. Biomed. J.* **21**, 131–141 (2017).
96. Singh, S. K., Narula, G. & Rathore, A. S. Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes?: General. *ELECTROPHORESIS* **37**, 2338–2346 (2016).
97. Xu, T., Han, L., George Thompson, A. M. & Sun, L. An improved capillary isoelectric focusing-mass spectrometry method for high-resolution characterization of monoclonal antibody charge variants. *Anal. Methods* **14**, 383–393 (2022).
98. Füssl, F. *et al.* Comprehensive characterisation of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis hyphenated on-line to native high resolution Orbitrap mass spectrometry. *mAbs* **11**, 116–128 (2019).
99. Reusch, D. & Tejada, M. L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* **25**, 1325–1334 (2015).
100. Robotham, A. C. & Kelly, J. F. Chapter 1 - LC-MS characterization of antibody-based therapeutics: recent highlights and future prospects. in *Approaches to the*

- Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics* (ed. Matte, A.) 1–33 (Elsevier, 2020).
101. Kozlowski, S. & Swann, P. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 707–722 (2006).
102. Gao, X. *et al.* An Approach to Bioactivity Assessment for Critical Quality Attribute Identification Based on Antibody-Antigen Complex Structure. *J. Pharm. Sci.* **110**, 1652–1660 (2021).
103. van Horssen, R., Ten Hagen, T. L. M. & Eggermont, A. M. M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist* **11**, 397–408 (2006).
104. Grütter, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 649–655 (2000).
105. Kortmann, C. Polishing-Schritte bei der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers und dessen Qualitätskontrollen. (2019).
106. Gonzalez Salcedo, A. Aspekte der Produktaufreinigung und -analytik in der Tierzellkultivierung. (2020).
107. Riss, T., O'Brien, M. & Moravec, R. Choosing the right cell-based assay for your research. *Cell Notes* **6**, 6 (2003).
108. Snee, R. D. Quality by Design: Building Quality into Products and Processes. in *Nonclinical Statistics for Pharmaceutical and Biotechnology Industries* (ed. Zhang, L.) 461–499 (Springer International Publishing, 2016).
109. US Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century; a risk-based approach. (2004).

110. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration
Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical
Development, manufacturing, and Quality Assurance. (2004)
111. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline:
Pharmaceutical development Q8(R2). (2009)
112. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline:
Quality risk management (Q9). (2005)
113. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline:
Pharmaceutical quality system (Q10). (2008)
114. Yu, L. X. *et al.* Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J.* **16**, 771–
783 (2014).
115. Nagashima, H., Watari, A., Shinoda, Y., Okamoto, H. & Takuma, S. Application of a
Quality by Design Approach to the Cell Culture Process of Monoclonal Antibody
Production, Resulting in the Establishment of a Design Space. *J. Pharm. Sci.* **102**,
4274–4283 (2013).
116. Abu-Absi, S. F. *et al.* Defining process design space for monoclonal antibody cell
culture. *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 894–905 (2010).
117. Rathore, A. S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for
biotechnology products. *Trends Biotechnol.* **27**, 546–553 (2009).
118. Coccia, M. The Fishbone diagram to identify, systematize and analyze the sources
of general purpose technologies. **4**, 291–303 (2017).

119. Rasmussen, A. S. B., Hammou, A., Poulsen, T. F., Laursen, M. C. & Hansen, S. F. Definition, categorization, and environmental risk assessment of biopharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* **789**, 147884 (2021).
120. Mollah, A. H. Application of Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) for Process Risk Assessment. 5 (2005).
121. Carlson, R. Design of Experiments, Principles and Applications, L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström and S. Wold, Umetrics AB, Umeå Learnways AB, Stockholm, 2000, ISBN 91-973730-0-1, xii + 329 pp. *J. Chemom.* **15**, 495–496 (2001).
122. Jankovic, A., Chaudhary, G. & Goia, F. Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems. *Energy Build.* **250**, 111298 (2021).
123. Barad, M. Design of Experiments (DOE)—A Valuable Multi-Purpose Methodology. *Appl. Math.* **5**, (2014).
124. Ait-Amir, B., Pougnet, P. & El Hami, A. Meta-Model Development. in *Embedded Mechatronic Systems 2* 151–179 (Elsevier, 2015).
125. Rencher, A. C. A Review Of “Methods of Multivariate Analysis, Second Edition”. *IIE Trans.* **37**, 1083–1085 (2005).
126. Nadpara, N. P., Thumar, R. V., Kalola, V. N. & Patel, P. B. Quality by design (QBD): A complete review. *Int J Pharm Sci Rev Res* **17**, 20–28 (2012).

Anhang

Unterstützende Angaben

Supporting information – Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process

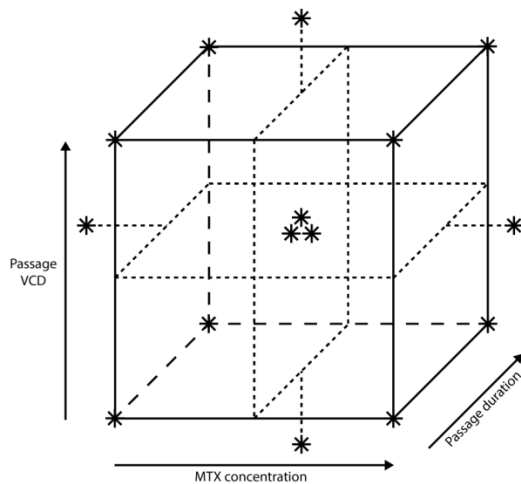


Figure S1. Schematic representation of the conducted central composite design for the Passage viable cell density, the MTX concentration and the passage duration. The eight corner points represent the -1/1 levels. The three stars in the middle of the cube represent the replicate centre-point runs (0 level). The outer stars represent the -2/2 levels for two of the three parameters.

Table S1. Risk assessment and FMEA results.

Process Parameter	Probability	Severity	Detection	RPN
MTX concentration	1	5	4	20
Passage duration	3	3	2	18
Passage VCD	2	2	4	16
pH	2	3	2	12
Thaw temperature	2	3	2	12
Thaw duration	2	2	3	12
Osmolality	1	3	3	9
Media storage temperature	1	4	2	8
Media storage time	1	4	2	8
Initial VCD	1	2	4	8
Type of cryo conservation	1	3	2	6
Media temperature	1	3	2	6
Cell line	1	5	1	5
Temperature	1	5	1	5
Incubator CO ₂	1	4	1	4
Agitation speed	1	4	1	4
Incubator humidity	1	3	1	3
Non-/baffled flasks	1	3	1	3
Working volume	1	2	1	2

Table S2. Numerical coding of varied process parameters.

	-2	-1	0	1	2
MTX concentration [nM]	0	7.5	15	22.5	30
Passage duration [d]	-	2	3,2	5	-
Passage VCD [x10⁶ cells/ml]	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3

Table S3. Experimental set up and responses for the DoE.

Experiment number	MTX Conc.	Passage Duration	Passage VCD	Inoculum Viability [%]	Inoculum GrowthRate [1/d]	Production Viability [%]	Production Growth Rate [1/d]	Total mAb Titer [g/l]	SpecificmAb Titer [g/l*(10 ⁶ cells*d/ml) ⁻¹]
1	-1	-1	-1	98.5	0.96	98.6	0.57	1.10	14.78
2	1	-1	-1	98.6	0.92	98.1	0.56	1.12	16.41
3	-1	1	-1	97.9	0.75	97.1	0.55	1.06	16.57
4	1	1	-1	98.0	0.79	97.3	0.51	1.04	17.32
5	-1	-1	1	98.7	0.86	98.7	0.56	1.11	17.26
6	1	-1	1	98.7	0.87	98.0	0.55	1.09	16.47
7	-1	1	1	97.4	0.69	97.3	0.49	0.98	20.87
8	1	1	1	96.6	0.68	96.6	0.44	0.82	23.30
9	-2	0	0	98.8	0.90	98.7	0.57	1.19	16.72
10	2	0	0	98.4	0.82	98.2	0.52	1.01	19.03
11	0	0	-2	98.2	0.79	97.4	0.48	0.99	20.21
12	0	0	2	97.9	0.72	97.4	0.48	0.90	19.58
13	0	0	0	98.9	0.89	98.3	0.55	1.16	17.12
14	0	0	0	98.5	0.88	98.2	0.57	1.06	16.11
15	0	0	0	98.8	0.87	98.6	0.55	1.08	17.08

Table S4. Model statistics for the inoculum expansion and production process responses

	R²	R²_{adj}	Q²	p-value	Reproducibility
Inoculum viability	0.95	0.91	0.79	0.0001	0.90
Inoculum growth rate	0.99	0.98	0.96	< 0.0001	0.99
Production viability	0.89	0.81	0.62	0.0019	0.87
Production growth rate	0.99	0.90	0.69	< 0.0001	0.92
Total mAb titer	0.93	0.88	0.70	0.0003	0.71
Specific mAb titer	0.94	0.914	0.827	< 0.0001	0.90

Supporting information – Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles

Table S1. Numerical coding of varied process parameters.

Process Parameter	-2	-1	0	1	2
pH	-	6.9	7.1	7.3	-
Initial VCD [x10 ⁵ cells/ml]	1	2	3	4	5
Dissolved oxygen [%]	-	40	60	80	-
N-1 duration [d]	-	2	3	4	-

Table S2. Experimental set up and responses for the DoE.

Experiment number	Initial VCD	pH	pO ₂	N-1 duration	Growth rate	IVCC	Viability	Total mAb titer	Specific mAb titer	Peak proportion
1	3	7.1	60	3	0.61	127.9	98.3	3.24	25.3	17.79
2	1	6.9	40	2	0.57	33.4	97.9	0.84	25.2	3.78
3	2	6.9	40	4	0.57	48.3	96.4	1.04	21.5	4.75
4	4	6.9	40	2	0.48	58.6	87.5	1.05	17.9	5.5
5	5	6.9	40	4	0.50	70.6	85.7	1.2	17.0	6.32
6	1	7.3	40	4	0.78	107.7	99.4	3.17	29.4	18.07
7	2	7.3	40	2	0.67	113.7	95.5	1.92	16.9	10.51
8	4	7.3	40	4	0.60	121.5	96.1	3.07	25.3	15.09
9	5	7.3	40	2	0.53	94.4	84.7	1.96	20.8	10.13
10	1	6.9	80	4	0.63	31.4	99	0.93	29.7	4.11
11	3	7.1	60	3	0.66	133.3	98.6	2.77	20.8	4.09
12	2	6.9	80	2	0.59	60.74	95.6	1.23	20.3	6.42
13	4	6.9	80	4	0.49	58.7	92.4	0.91	15.5	4.37
14	5	6.9	80	2	0.45	66.5	93.3	1.18	17.8	6.49
15	1	7.3	80	2	0.76	106.7	99.1	2.93	27.5	15.39
16	2	7.3	80	4	0.57	54.8	87.5	0.97	17.7	4.84
17	4	7.3	80	2	0.54	103.6	97.9	1.99	19.2	9.21
18	3	7.1	60	3	0.66	142.1	99.1	3.4	23.9	20.14
19	5	7.3	80	4	0.53	106.2	86.8	1.9	17.9	9.02
20	3	7.1	60	3	0.58	126.8	96.9	3.02	23.8	18.24
21	3	6.9	40	2	0.49	62.0	89.9	1.24	20.0	6.39
22	3	7.3	80	4	0.61	131.4	93.4	2.76	21.0	15.68
23	3	7.1	40	3	0.62	139.7	93	3.06	21.9	18.86
24	3	7.3	40	2	0.61	123.7	93.9	3.09	25.0	19.16
25	3	7.3	60	3	0.62	137.0	96.8	3.16	23.1	18.58
26	3	7.3	40	4	0.57	116.7	92.3	2.78	23.8	14.83
27	3	7.1	80	3	0.58	133.0	95.5	2.92	22.0	17.54
28	3	7.1	60	2	0.57	130.2	98.3	2.93	22.5	18.81
29	3	7.1	60	4	0.61	124.2	97.7	2.86	23.0	18.24
30	3	7.1	60	3	0.61	138.9	96.4	3.11	22.4	20.71
31	3	6.9	40	4	0.49	57.6	94.2	1.08	18.7	5.9
32	3	7.3	80	2	0.59	115.1	93.9	2.72	23.6	-
33	3	6.9	60	3	0.45	54.3	84	0.93	17.1	4.65
34	3	7.1	60	3	0.59	133.2	98.1	3.0	22.5	19.3
35	3	6.9	80	2	0.46	54.5	91.7	0.97	17.8	4.87
36	3	6.9	80	4	0.45	53.0	93.6	1.04	19.6	5.33

Table S3. Parameter limits for the design space calculation

	Growth rate	IVCC	Viability	Total mAb titer	Specific mAb titer	Peak proportion
Parameter limit	0.55	110	95	2.9	20	16
Target	1	160	100	3.5	30	25

Table S4. Responses for the verification runs

Experiment	Growth rate	IVCC	Viability	Total mAb titer	Specific mAb titer	Peak proportion
Standard 1	0.60	139.6	97.3	3.49	25.0	17.64
Standard 2	0.63	137.8	97.1	3.13	22.7	17.0
Standard 3	0.60	134.7	98.5	3.43	25.4	16.35
Optimized 1	0.66	115.6	95.4	3.0	26.0	15.93
Optimized 2	0.67	124.3	98.1	3.33	26.8	15.4
Optimized 3	0.65	124.7	97.8	3.16	25.3	15.85
Impaired 1	0.41	46.5	75.4	0.68	14.6	2.77
Impaired 2	0.39	38.1	77.9	0.64	16.8	2.96
Impaired 3	0.42	45.8	80.7	0.69	15.1	2.89

Supporting information – Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies

Table S1. Numerical coding of varied process parameters.

Process Parameter	-1	0	1
Viability [%]	64	82.5	99
VCD [$\times 10^6$ cells/ml]	10	15	20
Separation method	Filtration	-	Centrifugation

Table S2. Experimental set up and responses for the DoE.

Experiment number	Viability [%]	VCD [$\times 10^6$ cells/ml]	Separation method	mAb titer [g/L]	Total protein [g/L]	Proportion mAb [%]	Residual DNA [ng/ μ l]	Bioactivity low mAb conc. [%]	Bioactivity high mAb conc. [%]
1	99	10	Filtration	2.45	5.09	0.482	392.5	70.8	109.5
2	99	20	Filtration	2.42	4.65	0.521	497.5	75.1	89.6
3	82.5	10	Filtration	2.45	5.19	0.472	421.4	61.1	97.1
4	82.5	15	Filtration	2.73	5.36	0.510	429.6	60.5	97.5
5	82.5	15	Filtration	2.72	5.33	0.510	436.1	48.0	89.2
6	82.5	15	Filtration	2.74	5.33	0.514	433.7	69.2	97.8
7	82.5	20	Filtration	2.42	4.61	0.526	537.9	79.4	101.4
8	64	10	Filtration	1.97	5.15	0.384	587.8	61.4	96.6
9	64	20	Filtration	1.96	4.53	0.433	751.4	77.5	103.1
10	99	10	Centrifugation	2.43	5.19	0.467	380.4	65.7	104.8
11	99	20	Centrifugation	2.41	4.66	0.518	480.7	69.5	91.1
12	82.5	10	Centrifugation	2.45	5.27	0.465	420.5	72.1	90.4
13	82.5	15	Centrifugation	2.70	5.38	0.501	412.0	62.3	83.6
14	82.5	15	Centrifugation	2.70	5.39	0.500	429.5	48.7	91.1
15	82.5	15	Centrifugation	2.67	5.38	0.497	428.6	71.9	98.3
16	82.5	20	Centrifugation	2.40	4.64	0.518	536.5	82.1	85.3
17	64	10	Centrifugation	1.97	5.22	0.378	565.0	63.6	88.1
18	64	20	Centrifugation	1.98	4.44	0.445	745.1	63.9	98.0

Table S3. Parameter limits for the design space calculation

	Proportion mAb [%]	Residual DNA [ng/ μ l]
Parameter limit	0.5	420
Target	1	0

Table S4. Used Cedex Bio kits for the metabolite analysis

Metabolite	Cedex kit
Glucose	Glucose Cedex Bio
Lactate	Lactate Cedex Bio
Glutamine	Glutamine V2 Bio
Glutamate	Glutamate V2 Bio
Total protein	Total Protein Bio
Monoclonal antibody	IgG Bio

Table S5. Camptothecin standards

CPT concentration [μM] / incubation time [h]	Proportion of apoptotic cells [%]	Standard deviation [%]
5 μM / 24 h	3.4	0.68
5 μM / 48 h	13.3	2.31
10 μM / 24 h	7.5	1.58
10 μM / 48 h	20.9	2.38
20 μM / 24 h	11.8	2.13
20 μM / 48 h	27.6	3.04
30 μM / 24 h	15.7	1.97
30 μM / 48 h	38.2	2.93

Equation S1. MLR equation for MVDA

$$R_i = p_0 + p_1F_1 + p_2F_2 + p_3F_3 + p_4F_1^2 + p_5F_2^2 + p_6F_3^2 + p_7F_1F_2 + p_8F_1F_3 + p_9F_2F_3$$

Here, R_i is one of the four responses, p_0 is the intercept, p_j are the coefficients of the factors F_1 , F_2 and F_3 . Factors whose coefficient has the value zero in its confidential interval are regarded to have no significant influence on the response and are therefore removed from the model.

Betreute Abschlussarbeiten

Bachelorarbeiten

Jesslyn Gunawan, Testung der Bioaktivität eines monoklonalen Antikörpers für verschiedene Herstellungsbedingungen, (2021)

Masterarbeiten

Charlotte Hauschildt, Etablierung von LC-MS Analysen zur Qualitätskontrolle eines monoklonalen Antikörpers, (2023)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper aussprechen. Vielen Dank, dass ich die Möglichkeit bekommen habe an einem spannenden Thema zu arbeiten und im Institut für Technische Chemie zu promovieren. Darüber hinaus einen besonderen Dank, dass Du dieses Institut durch die vielseitige fachlichen Ausrichtung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Fokus auf sozialen Interaktionen zu einem ganz besonderen Ort gemacht hast.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Sascha Beutel für die freundliche Unterstützung bei vielen organisatorischen Fragen, deinen starken Einsatz für das Institut und die Übernahme des Korreferats. Herrn PD Dr. Ulrich Krings möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Dr. Dörte Solle möchte ich besonders für die Unterstützung während der Promotion und das Vertrauen für die Übernahme in weitere Projekte danken. Vielen Dank für deinen kreativen Input, die große Freiheit in der Bearbeitung meines Themas und die tollen Gruppenevents. Ein großer Dank geht außerdem an das gesamte Zellkultur-Team für die Zusammenarbeit und die Arbeitsaufteilung an den vielen Wochenenden. Allen voraus möchte ich Jana und Tamanna für die Einführung in das Reich der Zellkultur und die Organisation rund um Lab17 danken.

Ein großer Dank geht an Christiane Hellwig, Ulla Dreschel, Martina Weiß, Martin Pähler, Friedbert Gellermann, Thorsten Stempel, Thorleif Hentrop und Kai Patzer. Vielen Dank, dass ihr bei großen und kleinen Anliegen immer da seid und den Laden am laufen haltet.

Meinen Bachelor- und Masterstudentinnen möchte ich für die engagierte Arbeit und das nette Miteinander während eurer Zeit im TCI danken.

Bei meinem Büro163 möchte ich mich für die tolle Zeit und die fröhlichen Stunden und Unternehmungen während und nach der Arbeit bedanken. Insbesondere Carlotta, Katharina, Michaela, Lisa und Taieb danke ich für die gegenseitige Unterstützung, die Hilfe bei Korrekturen und fachlichen Fragen, den Kuchen, die Glühweifeierabende und die reichlichen witzigen Momente.

Dem gesamten TCI, Johanna, Jana, Luis, Jan, Marline, Ina, Pia, Tobi, Marc, Anton und allen anderen möchte ich für das soziale Miteinander und die unvergessliche Zeit an diesem Institut danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei dem VE-Brauteam und unseren Fans für die fleißige Arbeit im Braukeller und am Glas bedanken. Besonderer Dank geht dabei natürlich an Tobi und alle ehemaligen Braumeister, die das Wissen rund ums Bier seit Generationen erfolgreich weitergeben.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder, sowie meinen Freunden danke ich für das gelassene Vertrauen sowie die Unterstützung während meinem Studium und in den vergangenen Jahren der Promotion.

Zu guter Letzt gilt der größte Dank meiner Frau Marie-Louise, die mir immer den Rücken freihält und mich durchweg unterstützt. Danke, dass du so geduldig mit mir bist und mir hilfst immer neue Dinge zu erkennen und zu lernen. Ein riesen Dankeschön auch an unsere kleine Thea Mathilde, die mir das letzte Jahr der Promotion zusätzlich versüßt hat.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Ole Jacob Wohlenberg (geb. Böhl)

Geburtsdatum und -Ort: 22.02.1993 in Celle

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

2019 – 2023 Promotionsstudium im Fach Chemie an der Leibniz Universität Hannover

2015 – 2018 Masterstudium Life Science an der Leibniz Universität Hannover (Masterarbeit: Expression of Secondary Metabolite Genes in Fungi)

2011 – 2015 Bachelorstudium Life Science an der Leibniz Universität Hannover (Bachelorarbeit: Interactions of Yjff in Escherichia coli)

2004 – 2011 Allgemeine Hochschulreife am Christian Gymnasium Hermannsburg

Beruflicher Werdegang

2022 – 2023 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie an der Leibniz Universität Hannover, Horizon-Europe-Program „Smart manufacturing for autologous cell therapies enabled by innovative biomonitoring technologies and advanced process control“

2019 – 2022 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie an der Leibniz Universität Hannover, BMBF-Projekt im UfiB-Programm „Anwendung eines PAT/QbD-Konzepts auf einen pharmazeutischen Bioprozess“

2016 Internationales Forschungspraktikum am Technion – Institute of Technology Haifa, Isreal

Publikationsliste

Veröffentlichungen (antichronologisch, peer-reviewed)

Ole Jacob Wohlenberg (80 %), Carlotta Kortmann, Katharina V. Meyer, Thomas Scheper, Dörte Solle „Employing QbD strategies to assess the impact of cell viability and density on the primary recovery of monoclonal antibodies“, *Eng. Life Sci.* n/a, e202200056 (2022)

Ole Jacob Wohlenberg (75 %), Carlotta Kortmann, Katharina V. Meyer, Jana Schellenberg, Katharina Dahlmann, Janina Bahnemann, Thomas Scheper, Dörte Solle „Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles“, *Eng. Life Sci.* 22, 484–494 (2022)

Jana Schellenberg, Tamanna Nagraik, **Ole Jacob Wohlenberg (5 %)**, Sebastian Ruhl, Janina Bahnemann, Thomas Scheper, Dörte Solle „Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells“, *Eng. Life Sci.* 22, 427–436 (2022)

Ole Jacob Böhl (80 %), Jana Schellenberg, Janina Bahnemann, Bernd Hitzmann, Thomas Scheper, Dörte Solle „Implementation of QbD strategies in the inoculum expansion of a mAb production process“, *Eng. Life Sci.* 21, 196–207 (2020)

Ibrahim Kutay Ozturk, Pierre-Yves Dupont, Pranav Chettri, Rebecca McDougal, **Ole Jacob Böhl (2 %)**, Russel J. Cox, Rosie E. Bradshaw „Evolutionary relics dominate the small number of secondary metabolism genes in the hemiotrophic fungus *Dothistroma septosporum*“, *Fungal Biology*, Volume 123, 5, 397–407 (2019)

Konferenzvorträge

Ole Jacob Wohlenberg, Carlotta Kortmann, Katharina V. Meyer, Jana Schellenberg, Thomas Scheper, Dörte Solle „Implementation of Quality by Design principles in a mAb upstream process with regard to robustness and product quality“, DEHEMA 17. PAT Colloquium, Amersfoort, Niederlande (2022)

Posterbeiträge

Ole Jacob Wohlenberg, Dörte Solle „Design of Experiments and Quality by Design for optimization of a mAb production process“, Leibniz University Chemistry Symposium Postersession, Hannover, Deutschland (2022)