

Temperaturgesteuerte Zellzahlregelung für Bioreaktoren

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie

vorgelegt von
Karin Martina Loges

aus Essen
2021

Dekan:	Prof. Dr. Uwe Beifuss Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim
Promotionsausschussvorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Kohlus Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie Fachgebiet für Lebensmittelverfahrenstechnik und Pulvertechnologie Universität Hohenheim
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Bernd Hitzmann Institut für Lebensmittelwissenschaften und Biotechnologie Fachgebiete Prozessanalytik und Getreidewissenschaft Universität Hohenheim
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Karlheinz Preuß Fakultät Biotechnologie Institut für Technische Mikrobiologie Hochschule Mannheim
Eingereicht am:	28.06.2021
Datum der mündlichen Prüfung:	16.08.2021

Die vorliegende Arbeit wurde am 12.07.2021 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“ angenommen.

Abstract

Biopharmaceutical cell culture processes are multi-stage processes. Starting with low cell numbers and small culture volumes, the upstream process takes place step by step in a reactor cascade with increasing volume. To achieve constant product quality and high reproducibility, each reactor must be seeded with a defined initial cell concentration and all cultures must show very similar growth rates. However, batch to batch variations of growth rates can occur in biological systems and disrupt the reproducibility of the inoculation with defined cell concentrations.

In order to control the growth rate and thus increase the reproducibility from batch to batch, a self-adapting cell number controller was developed. This controller can be rapidly introduced in a typical industrial (biopharma) environment. At the beginning of the process, the user specifies the desired seed cell concentration and the point in time at which this cell concentration should be reached. In the following, the cell number controller automatically regulates the growth rate of the cells during the process and leads it to the specified process end parameters. The regulation of the cell growth rate is achieved with adjustment of the process temperature.

In the development phase of the cell number controller, a converted reactor system was adjusted and qualified. The temperature dependency of the biomass probe was examined. After that, the dependence of the cell growth rate on the temperature was analysed, described in the form of a mathematical model and implemented in a control algorithm. The required temperature is calculated with the aid of a numerical optimization process, using the previously derived mathematical model of the temperature-dependent growth rate, the online measured values and the specifications of the user.

In order to achieve greater flexibility within the upstream process and to be able to react to disruptions in the process flow, it is also possible to dynamically adjust the target parameter, set by the user at the beginning, during the running process.

To optimize the controller, it was analysed how the mathematical algorithm can be adapted to different cell clones and which tests are absolutely necessary to determine the cell specific, temperature-dependent growth rate. In this context, a self-learning algorithm was implemented so that it is now possible to use the

controller without preliminary tests and to ensure constant control quality in the event of possible changes in the cell growth of a cell clone.

During this research project, the functionality of the cell number controller, such as the changes in the process end parameters during the ongoing process and the iterative-adaptive optimization of the mathematical algorithm on different cell clones, could be verified experimentally.

The biological reactions of the cells to the temperature changes within the cell number-controlled precultures and within the subsequent production stage were also analysed. Furthermore, a possible influence on the quantity and quality of the products was examined. All examined biological reactions of the cells during the cell count regulation showed a reversible behaviour, which are normalized in the following process steps at 37 °C within two days. In addition, no negative influence of the cell-number-controlled preculture on product quality and quantity could be determined.

In summary, a functionally adaptable cell number controller was developed and tested with two different CHO cell clones for a possible influence on cell metabolism, apoptosis, product quantity and quality.

Zusammenfassung

Die Produktion biopharmazeutischer Glykoproteine erfolgt häufig durch die Kultivierung gentechnisch veränderter Säugetierzellen. Zu Beginn eines Produktionsprozesses wird eine geringe Menge tiefgefrorener Zellen aus einer Zellbank entnommen und in einer Kaskade aufeinanderfolgender Vermehrungsschritte kultiviert (Anzuchtprozess). Zellkulturprozesse sind sehr empfindliche Verfahren, in denen schon geringe Abweichungen in der Prozessführung das Zellwachstum, die Produktqualität und die Produktausbeute beeinflussen.

Unter anderem besitzt die Zellkonzentration einen Einfluss auf die Ausbeute und Qualität des Produktes. Die Qualitätsattribute der hergestellten Proteine werden im Zulassungsverfahren der einzelnen Länder und Gemeinschaften, wie zum Beispiel der Europäischen Union, mit entsprechenden Spezifikationen festgelegt. Da die Produktqualität auch von der initialen Zellkonzentration des Prozesses sowie dem Verlauf der gesamten Vermehrungsschritte abhängig ist, wird der Überimpfzeitpunkt innerhalb der Kaskade durch die Zellkonzentration vorgegeben. In der industriellen Praxis kann der optimale Zeitpunkt des Überimpfens, aufgrund der nicht immer genau vorhersagbaren Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen, nachts oder am Wochenende erreicht werden. In Zellkulturbetrieben gibt es häufig keine Nachtschichten, wodurch das Überimpfen ausschließlich tagsüber erfolgen kann. Dies hat zur Folge, dass der nächste Prozessschritt entweder mit einer zu geringen oder zu hohen Zelldichte gestartet werden muss.

Um die zu Teilen schwer zu kontrollierende Vermehrungsgeschwindigkeit und die resultierenden Planungsunsicherheiten im Prozess sowie die Problematik bezüglich der Produktqualität und –ausbeute zu lösen, sollte innerhalb dieses Forschungsprojekts ein industrietauglicher und selbstadaptiver Regler entwickelt werden, der es ermöglicht die Zellzahl während des Anzuchtprozesses im Reaktor zeitlich zu steuern.

Bei Verwendung des in dieser Dissertation beschriebenen Zellzahlreglers gibt der Anwender zu Prozessbeginn die zu erreichende Zellkonzentration, sowie den genauen Zeitpunkt des Überimpfens, bestehend aus dem Datum und der Uhrzeit, vor. Im Folgenden regelt der Zellzahlregler die Vermehrungsgeschwindigkeit der

Zellen während des Prozesses automatisch so, dass die am Prozessbeginn festgelegten Vorgaben am Prozessende erreicht werden. Die Regelung der Vermehrungsgeschwindigkeit, erfolgt durch Änderung der Temperatur.

Der entwickelte Zellzahlregler basiert auf der Nutzung einer kommerziell erhältlichen und in der Industrie eingesetzten Online-Biomassesonde die eine kontinuierliche Messung der Zellkonzentration im Reaktor ermöglicht. Ausgehend von dem Messwert der Zellzahlsonde berechnet der Regler den prognostizierten zeitlichen Verlauf der Zellkonzentration. Weicht die vorausgesagte Endzellkonzentration zum vorgegebenen Überimpfzeitpunkt von der angestrebten Zellkonzentration ab, passt der Regler die Prozesstemperatur so an, dass die Vorgaben erreicht werden. Der beschriebene Ablauf wird zyklisch über den gesamten Prozesszeitraum wiederholt.

In der Entwicklungsphase des Zellzahlreglers wurde zunächst eine umgebaute Reaktoranlage qualifiziert, der Zellkulturprozess validiert und die Temperaturabhängigkeit der Biomassesonde untersucht. Im Weiteren wurde die Abhängigkeit der Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen von der Temperatur analysiert, in Form eines mathematischen Modells beschrieben und in einen Regelungsalgorithmus implementiert. Die Berechnung der erforderlichen Temperatur erfolgt unter Zuhilfenahme eines numerischen Optimierungsverfahrens, basierend auf dem zuvor abgeleiteten mathematischen Modell der temperaturabhängigen Vermehrungsgeschwindigkeit, den Online-Messwerten und den Vorgaben des Anwenders.

Um eine größere Flexibilität zu erreichen und auf etwaige Störungen im Prozessablauf reagieren zu können, wurde eine Möglichkeit geschaffen, die vom Anwender zu Prozessbeginn festgelegten Zielvorgaben während des laufenden Prozesses zu ändern.

Zur Optimierung des Reglers wurde im Weiteren analysiert, inwiefern eine Adaptierung des Reglers an unterschiedliche Zellklone realisierbar ist, und in welchem Umfang Vorversuche zur Ermittlung der zellspezifischen, temperaturabhängigen Wachstumsgeschwindigkeit notwendig sind. Mit dem Ziel den Regler ohne Vorversuche nutzen zu können und bei möglichen Änderungen

des Zellwachstums eines Zellklons eine gleichbleibende Qualität der Regelung zu garantieren, wurde ein selbstlernender Algorithmus implementiert.

Innerhalb der Arbeit konnte experimentell die Funktionalität des Zellzahlreglers und die iterativ-adaptive Optimierung des mathematischen Algorithmus an unterschiedliche Zellklone, bestätigt werden. Alle während der Zellzahlregelung untersuchten biologischen Reaktionen der Zellen, wie die temperaturbedingten Anpassungen des Zellzyklus, der Apoptose und Nekrose, der Glukose- und Glutaminverbrauchsrate, sowie Ammonium- und Laktatbildungsrate, die Zirkularität und Größe der Zellen, zeigten sich als reversible Änderungen, welche sich in nachfolgenden Prozessstufen bei 37 °C innerhalb von 2 Tagen normalisierten. Zudem konnte kein negativer Einfluss, der zellzahlgeregelten Vorkultur auf die Produktqualität und -quantität festgestellt werden.

Danksagung

Wenn ich in der letzten Zeit von meiner Dissertation sprach, sei es in Bewerbungsgesprächen, im Gespräch mit anderen Wissenschaftlern oder mit Freunden wurde ich des Öfteren gefragt, ob es denn wirklich meine Arbeit sei, ich würde immer von „wir“ sprechen. „Meine Arbeit“- in gewisser Weise ja, ABER eine wissenschaftliche Arbeit, wie diese Dissertation, schreibt sich nicht alleine. Aus diesem Grund möchte ich mich bei allen, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, aufs herzlichste Bedanken.

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karlheinz Preuß für die unglaublich interessante Aufgabenstellung, die Gedankenanstöße im Hinblick auf regelungstechnische Fragestellungen und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hitzmann möchte ich für die Tipps und die Übernahme meiner Arbeit als Betreuer an der Universität Hohenheim Danke sagen.

Für seine nie enden wollende Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen zur Zellkultur und der Zellbiologie und die sehr zuvorkommende und hilfsbereite Art möchte ich Herrn Prof. Dr. Wiedemann danken.

Ich danke zudem der Karl-Völker-Stiftung der Fachhochschule Mannheim für die finanzielle Unterstützung und der Hamilton AG (Bonaduz, Schwitserland) für die Bereitstellung des Incyte-Zelldichtesensors.

Für die freundschaftliche, entspannte und immer offene Arbeitsatmosphäre aller Mitarbeiter des Instituts der Molekular- und Zellbiologie sowie des Instituts der technischen Mikrobiologie der Hochschule Mannheim möchte ich mich bedanken. Für die Unterstützung bei der Analyse und Aufreinigung mancher Proben möchte ich Stefanie Uhlig von FlowCore Mannheim und dem Institut für Transfusion Medizin und Immunologie sowie Carolin Stange vom Institut für Biochemie der Hochschule Mannheim meinen Dank aussprechen.

Auch wenn dies jetzt am Schluss meiner Danksagung steht, möchte ich mich nicht zuletzt ganz besonders bei meiner Familie, insbesondere bei Alexander Neufeld und meinen Kindern Nora und Judith für die Unterstützung und Toleranz bedanken. Quax, Danke für dein offenes Ohr und die Abwechslung in den letzten 15 Jahren.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abstract	iii
Zusammenfassung	iv
Danksagung	vii
Inhaltsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	6
3 Theoretische Grundlagen	8
3.1 Biologische Grundlagen	8
3.1.1 Wachstum von Zellen	8
3.1.2 Der Zellzyklus von Eukaryoten	12
3.1.3 Zelltod - Apoptose und Nekrose	13
3.1.4 Temperatureinfluss auf das Zellwachstum und die Zellbiologie	16
3.2 Regelungstechnische Grundlagen	19
3.2.1 Optimierung	22
3.2.2 Parameteridentifikation	26
4 Material und Methoden	28
4.1 Materialien	28
4.1.1 Geräte	28
4.1.2 Zubehör	30
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien	31
4.1.4 Assays	32
4.1.5 Eukaryotische Zelllinien	32

4.1.6 Medien	33
4.1.7 Software	33
4.2 Methoden der Zellkulturtechnik	33
4.2.1 Aseptisches Arbeiten	33
4.2.2 Kryokonservation von eukaryotischen Zellen	35
4.2.3 Auftauen eukaryotischer Zellen	36
4.2.4 Ungeregeltes Kultivieren suspensionsadaptierter Zellen	36
4.2.5 Subkultivieren suspensionsadaptierter Zellen	37
4.2.6 Kultivierung im Bioreaktor	38
4.3 Analytische Methoden	42
4.3.1 Analytik der Zellkonzentration und Viabilität mit Trypanblau	42
4.3.2 Online Bestimmung der Lebendzellzahl – Impedanzspektroskopie	44
4.3.3 Zellzyklusanalytik mittels Durchflusszytometrie	51
4.3.4 Apoptose / Nekrose-Assay mit dem Durchflusszytometer	55
4.3.5 Substrat- und Metabolitanalyse	57
4.3.6 Produktquantifikation	58
4.3.7 Analyse der Proteinqualität	58
4.4 Methoden der Auswertung	59
4.4.1 Ermittlung der Wachstumsrate- Eulerverfahren	59
4.4.2 Berechnung der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten	60
5 Entwicklung und Aufbau der Zellzahlreglung	62
5.1 Verfahrenstechnischer Aufbau	62
5.2 Methodischer Aufbau	64
5.2.1 Bestimmung der aktuellen Zellkonzentration	64
5.2.2 Abschätzen der erforderlichen spezifischen Wachstumsrate	66
5.2.3 Ermittlung der erforderlichen Temperatur	66

5.2.4 Berechnung der aktuellen spezifischen Wachstumsrate	68
5.2.5 Prädiktion der zu erwartenden Endzellkonzentration	69
5.3 Selbstoptimierender Algorithmus	70
5.3.1 Ermittlung der durchschnittlichen Prozessgrößen μ und T	72
5.3.2 Optimierung des funktionalen Zusammenhangs $\mu(T)$	73
5.3.3 Wichtung der neuen Parameter	73
6 Experimentelle Ergebnisse	75
6.1 Qualifizierung der umgebauten Bioreaktoranlage	75
6.2 Verifizieren der Messwerte der Incyte-Sonde	76
6.3 Bestimmung der temperaturabhängigen Wachstumsrate $\mu(T)$	79
6.3.1 Im Bioreaktor mit konstanten Temperaturen	80
6.3.2 Im Erlenmeyerkolben mit konstanten Temperaturen	83
6.3.3 Innerhalb eines Reaktorversuchs – Charakterisierungslauf	84
6.4 Funktionsfähigkeit der Zellzahlregelung	89
6.4.1 Zellzahlregelung in der Vorkultur (n-1)	89
6.4.2 Änderung der Endparameter während des Prozesses	92
6.4.3 Zellrast	95
6.5 Zellzahlregler mit iterativ-adaptiver online Optimierung	98
6.6 Reproduzierbarkeit der Zellzahlregelung	100
6.7 Einfluss der Zellzahlregelung auf nachfolgende Prozesse	103
6.8 Untersuchung der biologischen Parameter	104
6.8.1 Metabolische Auswirkungen erniedrigter Prozesstemperaturen	104
6.8.2 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zellmetabolismus	109
6.8.3 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zellzyklus	114
6.8.4 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zelltod	118
6.8.5 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf die Zellphysiologie	122

6.9 Auswirkung der Regelung auf die Produktquantität und -qualität	124
6.9.1 Produktquantität	124
6.9.2 Produktqualität-Glykosilierung	125
7 Diskussion	131
7.1 Qualifizierung der umgebauten Anlage	131
7.2 Verifizierung der Incyte-Sonde	132
7.3 Bestimmung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate $\mu(T)$	134
7.4 Zellzahlregelung	138
7.5 Iterativer selbstlernender Regler	141
7.6 Biologische Reaktion der Zellen auf die Zellzahlregelung	143
7.6.1 Primärmetabolismus	143
7.6.2 Zellzyklus und Zelltod	146
7.6.3 Produktquantität und Qualität	147
7.7 Ausblick	149
Literaturverzeichnis	152
Anhang	176
Abkürzungsverzeichnis	183
Abbildungsverzeichnis	186
Tabellenverzeichnis	190
Lebenslauf	191
Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.	192

1 Einleitung

Eine Vielzahl therapeutisch wirksamer Proteine entstammt tierischen Zellkulturprozessen. Im Allgemeinen werden Proteine im Organismus beispielsweise für den Aufbau von Geweben und Organen benötigt. Proteine wie Hormone wirken regulatorisch in zahlreichen Stoffwechselwegen mit und Antikörper sind ein wesentlicher Bestandteil des körpereigenen Schutzmechanismus. Viele dieser Proteine, sogenannte Glykoproteine, weisen eine komplizierte und individuelle Zuckerstruktur auf, welche die Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Organismus maßgeblich beeinflussen. Gemäß dem heutigen Kenntnisstand ist es ausschließlich mithilfe tierischer Zellen möglich, menschenähnliche Glykoproteine zu synthetisieren¹. Aus diesem Grund werden heutzutage zum Beispiel diverse therapeutisch eingesetzte monoklonale Antikörper, der Blutgerinnungsfaktor VIII oder Erythropoetin, mit Hilfe komplexer Zellkulturprozesse hergestellt. 2018 entstammen, 7 der 10 umsatzstärksten Arzneimittel, allesamt onkologisch eingesetzte monoklonale Antikörper, zellkulturbasierten Prozessen. Alleine durch diese sieben Antikörper konnte ein Umsatz von ~60,5 Mrd. USD (~54,92 Mrd. Euro) erwirtschaftet werden^{2,3}. Im Hinblick auf die jährliche Entwicklung der letzten Jahre und die in den klinischen Phasen befindlichen Arzneimittelkandidaten zeichnet sich weiterhin ein stark wachsender Markt ab.

In Anbetracht der historischen Entwicklung gehört die Zellkulturtechnik jedoch zu den jüngeren Wissenschaften. So sind die ersten Organ- und Gewebekulturen etwa auf den Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts zurückdatiert. 1885 gelang es Wilhelm Roux, einem deutschen Anatomen und Embryologen erstmals embryonale Hühnerzellen außerhalb des Organismus (in vitro) für mehrere Tage in einer Salzlösung zu kultivieren. Die größten Herausforderungen der damaligen Zeit sind vor allem in der unzureichenden Steriltechnik und dem geringen Wissen über die optimalen Kultivierungsbedingungen zu sehen. Steriltechnisches Arbeiten zielt darauf ab, Lösungen und Gerätschaften frei von vermehrungsfähigen Keimen zu halten⁴. Dies ist insbesondere bei den, in Relation zu Mikroorganismen langsam wachsenden tierischen Zellen von großer Bedeutung. Bakterielle, virale oder mykotische Kontaminationen treten in Bezug auf die Nährstoffe in Konkurrenz mit

den Zellen, erzeugen zytotoxische Stoffwechselprodukte oder schädigen die Zellenphysiologie aufgrund ihrer charakteristischen Vermehrungsweise. Trotz der steriltechnischen Voraussetzungen gelang es einigen Wissenschaftlern, bis zum ersten Einsatz des 1928 durch Sir Alexander Fleming entdeckten Penicillins⁵, unterschiedlichste Gewebe steril zu kultivieren.

Der französische Chirurg Alexis Carrel konnte bereits 1912 eine Kultur aus Herzmuskeln eines Hühnerembryos über eine Zeit von mehr als 30 Jahren in Kultur halten⁶. Auch wenn die Schlussfolgerung Carrels, Zellen seien in Kultur unbegrenzt teilungsfähig, nicht dem aktuellen Wissensstand entspricht und heute durch die tägliche Zugabe von frischen, lebenden Fibroblasten zu erklären ist, konnte Carrel die Kultur, den Angaben nach, kontaminationsfrei halten. In den ersten Publikationen wird ersichtlich, dass schon früh an verschiedenen Kultivierungsmethoden gearbeitet wurde.

Das Ziel der Forscher lag jedoch zu jener Zeit nicht in der wirtschaftlichen Produktion von komplexen Proteinen, sondern im Wissensgewinn über zelluläre Vorgänge und die Bedeutung einzelner Zellbestandteile sowie im Verständnis über die Abläufe der Zellteilung. Dieses spiegelt sich unter anderem in den verwendeten Zellkulturgefäßen wieder. Die ersten Zellen wuchsen auf Oberflächen (adhärent) in statischen Systemen. Da Zellen, mit Ausnahme einiger weniger, wie zum Beispiel Blut- oder Lymphzellen, im Zellverband in einer extrazellulären Matrix wachsen, kommt diese Art der Kultivierung den biologischen Bedingungen am Nächsten.

Durch den steten Wissensgewinn wurden die Methoden, Verfahren und Medien der Zellkulturtechnik kontinuierlich verbessert, sodass im Jahr 1986 die ersten therapeutisch verwendeten Proteine, ein menschlicher Gewebefibrinogen-aktivator (tPA, Activase; Genentech, USA) und ein monoklonaler Antikörper (Orthoclone OKT3, Johnson & Johnson, USA), mit Hilfe tierischer Zellkultur hergestellt werden konnten⁷⁻⁹.

In der heutigen Zeit werden einige tierische und menschliche Zelllinien, industriell genutzt. Insbesondere die von Prof. Dr. Theodore T. Puckowitz 1957 immortalisierte Ovarialzelle eines chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zelle) erwies sich in der Vergangenheit und aktuellen Produktion, als besonders geeignet¹⁰. Diese Zelle lässt sich sowohl in adhärenter Form als auch als Suspensionskultur nutzen.

Suspensionsadaptierte Zellen wachsen ohne eine extrazelluläre Matrix freibeweglich im Zellkulturmedium schwimmend, in Form einer Einzelzellsuspension. Da Zellen, naturgemäß in Ihrer Produktivität begrenzt sind, suspensionsadaptierte Zellen jedoch keinen Kontakt zur Oberfläche benötigen, konnte vor allen Dingen die Raum-Zeit-Ausbeute durch den Verzicht zusätzlicher Oberflächen verbessert werden. Des Weiteren ist die CHO-Zelle genetisch stabil, lässt sich reproduzierbar mit Expressionsvektoren, welche die genetische Information des herzustellenden Proteins tragen, transfizieren und zeigt innerhalb des Prozesses ein stabiles Wachstumsverhalten^{11,12}.

Trotz der vielen guten Eigenschaften der CHO-Zelle gestalten sich Zellkulturprozesse aufgrund der natürlichen Ansprüche tierischer Zellen komplex und kostenintensiv. So wachsen tierische Gewebezellen, wie die CHO-Zelle, ihrer ursprünglichen Umgebung gemäß, nicht von einer Zelle ausgehend, sondern benötigen auch in der Einzelzellsuspension eine minimale Zellkonzentration. Um die benötigte Startzellkonzentration eines Prozesses zu realisieren, erfolgt die zur wirtschaftlichen Produktion notwendige Expansion der Zellzahl in einer Kaskade aufeinanderfolgender Prozesse¹³, wie sie schematisch für die Suspensionskulturen in Abbildung 1 dargestellt ist.

Innerhalb der separaten Prozessstufen können die Zellen aufgrund der zeitlich auftretenden Limitierung einzelner Substrate, der Anreicherung diverser wachstumsinhibierender Stoffwechselprodukte sowie des verfügbaren Platzes nicht unbegrenzt wachsen, sodass eine maximale, durch den Prozessaufbau und die Zelllinie bestimmte, Zellkonzentration erreicht wird. In Folge dessen ergibt sich je Prozessstufe ein charakteristischer Verlauf der Zellkonzentration über die Zeit, dieser wird exemplarisch in Abbildung 1 durch die blaue Kurve repräsentiert. Um ein maximales Wachstum der Zellen über den gesamten Anzuchtprozess zu gewährleisten und so die Gesamtdauer des sogenannten Upstream-Prozesses zu reduzieren, erfolgt die Volumenexpansion, vor dem Erreichen der prozesscharakteristischen maximalen Zellkonzentration¹⁴. In Folge dessen ergibt sich das in Abbildung 1, auf den logarithmischen Achsen dargestellte Profil in der Expansion des Volumens und der Zellzahl.

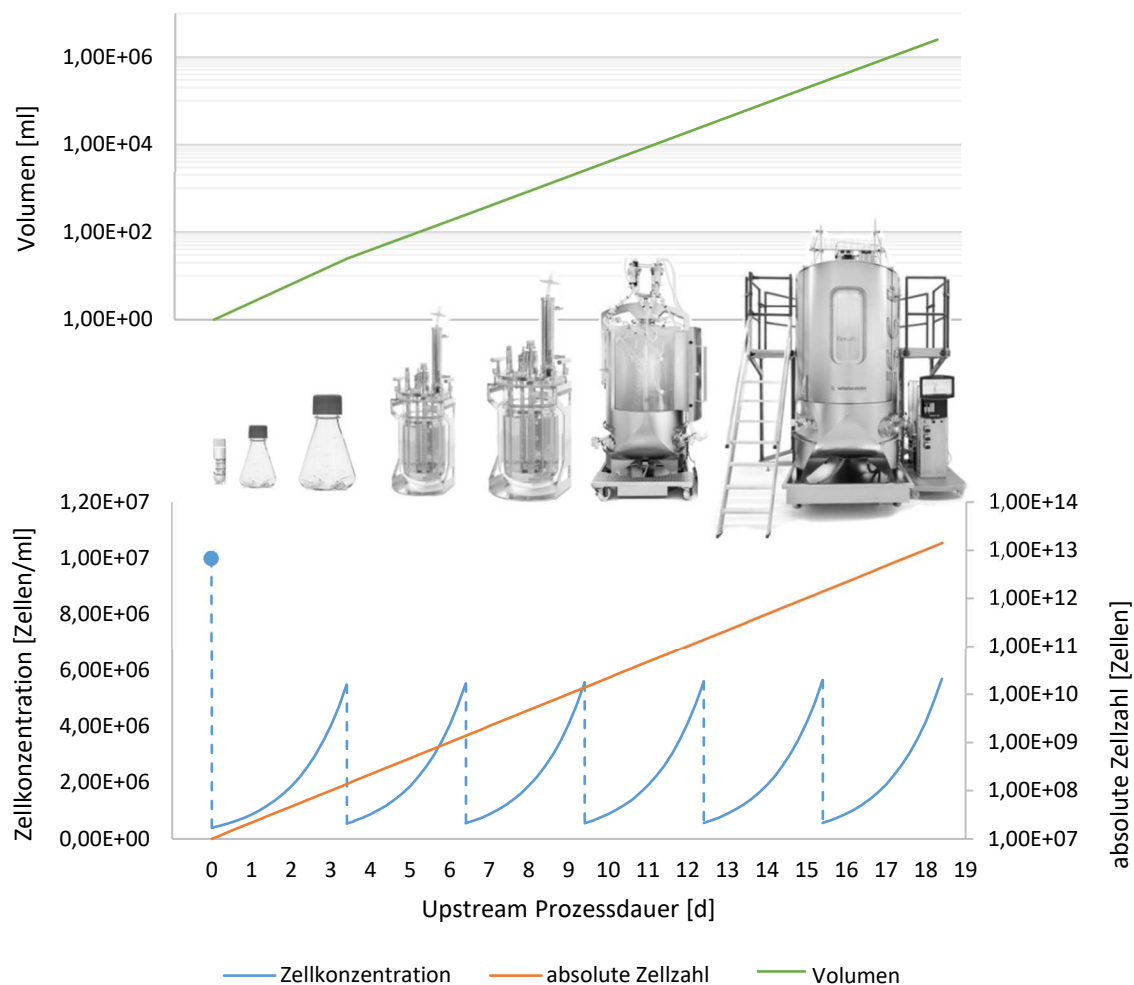


Abbildung 1: Schema des Anzuchtprozesses innerhalb der Zellkultur mit Darstellung des absoluten Volumens und der Zellzahlzunahme über die Zeit sowie der zeitlichen Verläufe der Zellkonzentration (eigene Abbildung)

Bei der Betrachtung des in Abbildung 1 dargestellten Verlaufs des Anzuchtprozesses zeigt sich, dass eine kleine Variation im Wachstumsverlauf eines Prozessschrittes die nachfolgenden Prozesse maßgeblich bestimmt. Prozessrelevante Variationen der Vermehrungsgeschwindigkeit kommen in Anbetracht der sensibel auf Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Osmolarität, verschiedenster Substrat- und Metabolitkonzentration reagierenden Zellen in nahezu jedem Prozess vor^{15–21}.

Wachsen die Zellen beispielsweise langsamer als zuvor angenommen, verschiebt sich der gesamte weitere Produktionsprozess, zu dem unter anderem die

anschließende Aufreinigung der Proteine aus dem Zellkulturprozess, die Reinigung der Produktionsanlagen, die Medienherstellung, die Kalibrierung und viele regulatorische Vorgänge gehören. Wurden Medien bereits für den folgenden Prozessschritt bereitgestellt, erhöht sich zudem die Kontaminationsgefahr und instabile Medienbestandteile zerfallen. Verschiebt sich der optimale Überimpfzeitpunkt um weniger als einen Tag, so wird die nachfolgende Prozessstufe mit einer erhöhten Zellkonzentration gestartet. Aufgrund des exponentiellen Zellwachstums, führt dies zu einer sich selbstverstärkenden Fehlerfortpflanzung. Die Wiederholbarkeit des Gesamtprozesses wird aufgrund der unkontrolliert auftretenden Variationen im Prozessgeschehen nicht mehr gewährleistet.

Viele Parameter, die einen Einfluss auf die Vermehrungsgeschwindigkeit ausüben, lassen sich in der heutigen Zeit durch die aufstrebende Prozessautomatisierung und Digitalisierung kontrollieren. Einige, zum Teil noch unbekannte Einflussfaktoren sind jedoch nicht vollständig kontrollierbar und erschweren die Prozessplanung²². Da der beschriebene Upstream-Prozess nur ein kleines Zahnrad im Herstellungsprozess biopharmazeutischer Arzneimitteln darstellt, ist eine akribische Prozessplanung für den erfolgreichen und effizienten Betrieb eines Zellkulturprozesses unerlässlich.

Eine mögliche Lösung die Reproduzierbarkeit der Prozesse zu gewährleisten, ist in der Kontrolle und Regelung der Vermehrungsgeschwindigkeit zu sehen. Die Bedeutung der spezifischen Wachstumsrate im Hinblick auf die Prozessoptimierung, wurde beispielsweise in einer zusammenfassenden Studie von Schuler und Marison herausgearbeitet. Innerhalb dieser Studie wird die spezifische Wachstumsrate der Zellen als bedeutende Schlüsselvariable in der weiteren Prozessentwicklung benannt. Durch die kontinuierliche Überwachung und Regelung der spezifischen Wachstumsrate könnten, gemäß Schuler und Marison, zuverlässigere und robustere Verfahren zur Herstellung hochwertiger Produkte entwickelt werden. Aktuelle Ansätze, die spezifische Wachstumsrate in mikrobiellen oder zellkulturbasierten Prozessen zu kontrollieren, basieren auf einer kontrollierten Substratzufuhr^{23–25}.

2 Zielsetzung

Innerhalb des Forschungsprojektes sollte ein industrietauglicher und selbstadaptiver Regler entwickelt werden, der es ermöglicht die Zellzahl während des Anzuchtprozesses (Upstream-Prozess) im Reaktor zeitlich zu steuern.

Gemäß des zu Beginn der Arbeit definierten Funktionsprinzips, gibt der Anwender zu Prozessbeginn die zu erreichende Zellzahl, sowie den genauen Zeitpunkt des Überimpfens (Animpfen), bestehend aus dem Datum und der Uhrzeit, vor. Im Folgenden soll der Zellzahlregler die Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen während des Prozesses automatisch so regeln, dass die am Prozessbeginn festgelegten Vorgaben am Prozessende erreicht werden. Die Vermehrungsgeschwindigkeit, welche auch als Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet wird, soll mithilfe der Temperatur geregelt werden.

Der zentrale Ablauf der Regelung, schematisch in Abbildung 2 dargestellt, sieht vor, dass die Zellkonzentration unter Zuhilfenahme einer kommerziell erhältlichen und in der Industrie eingesetzten inline-Sonde kontinuierlich bestimmt wird. Ausgehend von dem Messwert der Zellzahlsonde soll der Regler den prognostizieren zeitlichen Verlauf der Zellkonzentration berechnen. Weicht die vorausgesagte Endzellkonzentration zum vorgegebenen Überimpfzeitpunkt von der angestrebten Zellkonzentration ab, soll der Regler die Prozesstemperatur so anpassen, dass die Vorgaben erreicht werden. Der beschriebene Ablauf soll zyklisch über den gesamten Prozesszeitraum wiederholt werden.

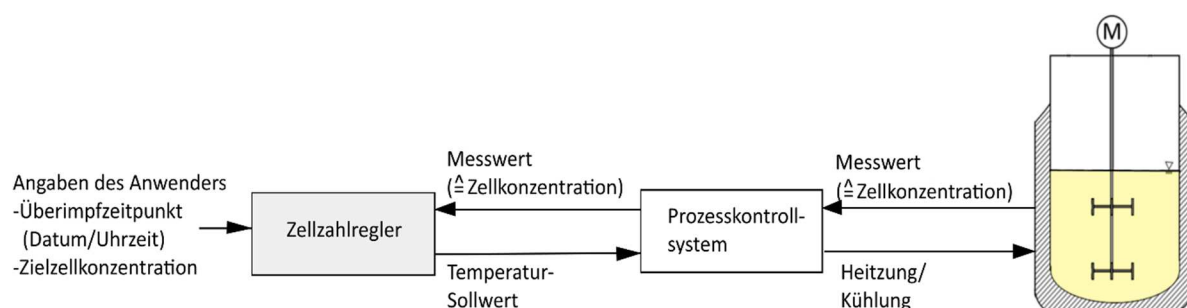


Abbildung 2: Schema der Zellzahlregelung in der Betriebsumgebung

In der zeitlichen Abfolge der zu bearbeitenden Themen sollte dabei zunächst die Abhängigkeit der Vermehrungsgeschwindigkeit von der Temperatur untersucht und

in Form eines mathematischen Modells beschrieben werden. Dieses sollte im Weiteren in einen Regelungsalgorithmus implementiert werden. Die Berechnung der erforderlichen Temperatur sollte unter Zuhilfenahme eines numerischen Optimierungsverfahrens, basierend auf dem zuvor abgeleiteten mathematischen Modell der temperaturabhängigen Vermehrungsgeschwindigkeit, den online-Messwerten und den Vorgaben des Anwenders berechnet werden²⁶.

Um eine größere Flexibilität innerhalb des Upstreamprozesses zu erreichen und auf etwaige Störungen im Prozessablauf reagieren zu können, sollte es möglich sein, die vom Anwender zu Prozessbeginn festgelegten Zielvorgaben während des laufenden Prozesses zu ändern.

Zur Optimierung des Reglers sollte im Weiteren analysiert werden, inwiefern eine Adaptierung des Reglers an unterschiedliche Zellklone realisierbar ist und in welchem Umfang Vorversuche zur Ermittlung der zellspezifischen, temperaturabhängigen Wachstumsgeschwindigkeit notwendig sind. Mit dem Ziel den Regler ohne Vorversuche nutzen zu können und bei möglichen Änderungen des Zellwachstums eines Zellklons eine gleichbleibende Qualität der Regelung zu garantieren, sollte ein selbstlernender Algorithmus implementiert werden.

Im Anschluss an die Entwicklung des Reglers sollte das Ausmaß etwaiger biologischer Reaktionen auf die Temperaturänderungen, in Bezug auf die Zellvitalität, den Metabolismus und die Produktqualität und -quantität, innerhalb der geregelten Vorkultur sowie einer angeschlossenen unregelten Prozessstufe untersucht werden.

3 Theoretische Grundlagen

Im folgenden Kapitel wird auf die biologischen und regelungstechnischen Grundlagen, mit Bezug zum bearbeiteten Thema, eingegangen.

3.1 Biologische Grundlagen

Organismen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, die Pro- und Eukaryoten. Eukaryoten, wie sie in dieser Arbeit Verwendung fanden, besitzen in Gegensatz zu den Prokaryoten einen echten Zellkern, der sich durch die Kern-Hülle vom Zytoplasma abgrenzt. Innerhalb des Zellkerns liegt das Genom in Form von linearen Proteinen vor, welche assoziativ die doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure - Moleküle (DNS-Moleküle) bilden und durch eine spezielle räumliche Anordnung die Chromosomen formen. Pro- und Eukaryoten unterscheiden sich jedoch nicht ausschließlich durch das Vorhandensein eines Zellkerns, sondern weisen eine Vielzahl von Abweichungen im Aufbau und der Funktion von Zellorganellen auf. Eukaryoten besitzen zum Beispiel mehrere Reaktionsräume, die sogenannten Zellkompartimente, sowie Zellorganellen, welche sich durch eine Biomembran abgrenzen. In Prokaryoten hingegen finden alle Stoffwechselprozesse innerhalb eines einzelnen Reaktionsraums statt, der häufig von einer vergleichsweise komplex aufgebauten Zellwand und Kapsel umgeben ist. Bedingt durch den unterschiedlichen Aufbau, unterscheiden sich die Transportprozesse der Organismen sowie deren Proteinsynthese und Abläufe der Zellteilung voneinander²⁷. Da während dieser Arbeit ausschließlich mit eukaryotischen Zellen gearbeitet wurde, wird im Folgenden auf die Abläufe des Zellwachstums, die verschiedenen Arten des Zelltods, sowie die biologische Reaktion dieser Zellenart auf eine Änderung der Prozesstemperatur eingegangen.

3.1.1 Wachstum von Zellen

Der zweideutige Begriff des Zellwachstums lässt sich zum einen als die Größen- und Volumenzunahme einzelner Zellen und zum anderen als die Zunahme der Zellzahl in einem definierten Volumen verstehen^{28–31}. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff des Zellwachstums im Zusammenhang mit der Vermehrung, also

der Erhöhung der Zellzahl in einem Bezugsraum verwendet. Da sich Zellen durch Zellteilung vermehren, entspricht das Zellwachstum einer geometrischen Progression und verläuft bei optimalen Umgebungsbedingungen exponentiell^{32,33}. Enthält eine Population zum Anfangszeitpunkt t_0 eine initiale Zellzahl von N_0 Zellen, so lässt sich die Zellzahl N zum Zeitpunkt t_n alleine durch die Anzahl der Teilungen n wie folgt berechnen:

$$N(t_n) = N(t_0) \cdot 2^n \quad (3-1)$$

Um das Wachstum einer Kultur in Bezug auf die Wachstumskinetik zu beurteilen, wird die zeitliche Änderung der Zellzahl N oder einer proportionalen Größe, zum Beispiel der Zellkonzentration, betrachtet. Das Wachstum entspricht einer Reaktion 1. Ordnung mit der spezifischen Wachstumsrate μ . Aufgrund eines exponentiellen Zusammenhangs lässt sich die Wachstumsgeschwindigkeit wie folgt berechnen:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \cdot N(t) \quad (3-2)$$

Auf Basis von Gleichung (3-1) lässt sich die Wachstumsrate der Zellen mit der Verdopplungszeit t_d durch die Gleichung (3-3) beschreiben.

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (3-3)$$

Liegt ein maximales Zellwachstum vor, kann die zeitliche Änderung der Zellverdopplungszeit und der Wachstumsrate vernachlässigt werden. Insofern lässt sich die Zellzahl mit Hilfe der allgemein bekannten Exponentialfunktion aus Gleichung (3-4) berechnen.

$$N(t) = N(t_0) \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (3-4)$$

Werden die Zellen in einer Satzkultur, das heißt, ohne eine weitere Zugabe von Nährstoffen und Zellen nach dem Animpfen, kultiviert, führt dies im Laufe der Kultur zu einer Limitierung einzelner Nährstoffe und zu einer Akkumulation inhibierender Stoffwechselprodukte. Folglich ist eine Reduktion der maximalen Teilungsrate der Zellen zu verzeichnen, sodass die Zellzahl oder Zellkonzentration über die Zeit

betrachtet einen typischen sigmoidalen Verlauf aufweist. In diesem Zusammenhang kann die Zellzahl unter Berücksichtigung der zeitlich ändernden Wachstumsrate, mithilfe der numerisch, iterativen Berechnung nach Gleichung (3-5) ermittelt werden. Innerhalb der Gleichung entspricht n der Anzahl an Iterationen.

$$N(t_n) = N(t_0) + \sum_{i=1}^n \left(\frac{dN(t_{i-1})}{dt} \cdot (t_i - t_{i-1}) \right) \quad (3-5)$$

Eine typische Wachstumskurve lässt sich, wie in Abbildung 3 dargestellt, in vier charakteristische Wachstumsphasen unterteilen.

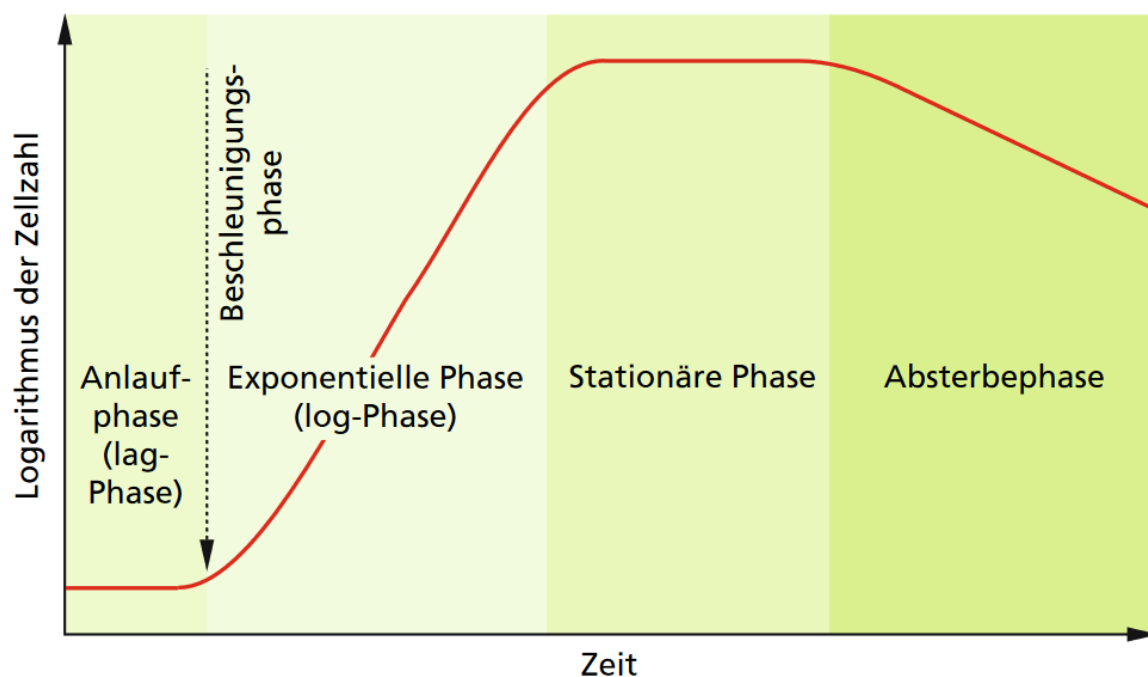


Abbildung 3: Charakteristische Wachstumskurve einer Satzkultur (Batch-Kultur)³⁴

Anlaufphase (lag-Phase)

In der ersten Phase der sogenannten lag-Phase (aus dem engl. lag: = hinterherhinken) adaptieren sich die Zellen nach dem Animpfen der Kultur an die neuen Kulturbedingungen. Die Dauer, der lag-Phase ist hierbei abhängig von den Bedingungen in der Vorkultur und dem Zustand (Alter, Passagenzahl nach dem Auftauen) der Initialzellen.

Exponentielle Phase (log-Phase)

In der exponentiellen Wachstumsphase teilen sich die Zellen mit einer maximalen Wachstumsrate. Diese kann nur erreicht werden, wenn ausreichend Nährstoffe im

Medium vorhanden sind und es zu keiner Inhibierung des Zellwachstums kommt. Zellen können auf vielfältige Weise in ihrem Wachstum limitiert werden. Beispielsweise kommt es im Verlaufe einer Satzkultur zu einer Akkumulation inhibierender Stoffwechselprodukten. Ein weiterer wachstumsinhibierender Effekt kann durch die Zellen selbst ausgelöst werden. Im Besonderen wenn Zellen auf einer Oberfläche wachsen (adhärent) kommt es bei einem konfluenten Bewuchs zu einer sogenannten Kontaktinhibition. Diese ist in Suspensionskulturen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, insbesondere bei Satzkulturen, infolge der zuvor auftretenden Inhibierung durch eine Nährstofflimitierung und Akkumulation von Stoffwechselprodukten zu vernachlässigen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt, aufgrund des beabsichtigten Einsatzes der temperaturgesteuerten Zellzahlregelung im Anzuchtprozess, auf der exponentiellen Wachstumsphase.

Stationäre Phase

In der stationären Phase lässt sich, makroskopisch betrachtet, kein Zellwachstum verzeichnen. Dies ist durch zweierlei Effekte zu erklären. Zum einen ist es möglich, dass die Zellen aufgrund von limitierenden Faktoren das Wachstum eingestellt haben und sich in einer sogenannten Ruhephase des Zellzyklus, auf den im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird, befinden. Zum anderen kann sich ein Gleichgewichtszustand zwischen dem Zellwachstum und dem Absterben der Zellen einstellen.

Absterbephase

Innerhalb der Absterbephase ist die Lebendzellkonzentration rückläufig und die Vitalität der Zellen sinkt zunehmend. Es gibt unterschiedlichste Gründe, die zum Absterben der Zellen führen. Im Allgemeinen ist dies der Fall, wenn die Kulturbedingungen (Nährstoffkonzentration, pH-Wert, Osmolarität, Temperatur, toxische Stoffwechselprodukte) oder das Alter der Zellpopulation ein Wachstum der Zellen nicht mehr zulassen.

3.1.2 Der Zellzyklus von Eukaryoten

Seit Mitte des 19.-Jahrhunderts ist bekannt, dass Zellen sich durch Zellteilung vermehren³⁵. Grundvoraussetzung für diesen Prozess ist, dass die Zellen ihre genetischen Informationen genau einmal vollständig verdoppeln und diese dann exakt auf die entstehenden Tochterzellen aufteilen. Durch einen festgelegten Ablauf dem sogenannten Zellzyklus gelingt es den Zellen, sich mit einer sehr geringen Fehlerhäufigkeit zu teilen. Der Zellzyklus, welcher schematisch in Abbildung 4 aufgezeigt ist, lässt sich in vier aufeinanderfolgende und voneinander abgrenzbare Phasen sowie einer Arrestphase oder Ruhephase unterteilen. Die Dauer des Zellzyklus ist hierbei individuell vom Zelltyp und Zellklon abhängig und kann zwischen zwei und fünfzig Stunden in Anspruch nehmen³⁶. In der längsten Phase, die in etwa die Hälfte des Zellzyklus ausmacht, der Synthese-Phase (S-Phase), verdoppelt sich die DNS in den Zellen³⁷. Die Zelle teilt sich in der zeitlich von der S-Phase getrennten M-Phase oder Mitose in die beiden Tochterzellen. Die M- und S-Phase werden durch sogenannte Gab-Phasen oder Zwischenphasen, G1- und G2-Phasen getrennt. Diese Phasen dienen dazu, das Zellwachstum zu steuern und sicherzustellen, dass die vorhergegangene Phase vollständig und korrekt abgeschlossen wurde. Durch die Anwesenheit stimulierender (mitogender) oder hemmender (antiproliferativer) Signale entscheidet sich in der G1-Phase, welche sich der Mitose anschließt, ob die Zelle sich aufs Neue teilt oder den Zellzyklus verlässt und in einen Ruhezustand, die G0-Phase, eintritt. Kommt es während der Ruhephase zu einer mitogenen Stimulation, kann die Zelle die Ruhephase verlassen und abermalig in den Zellzyklus eintreten. Tritt die Zelle wieder in den Zellzyklus ein und überschreitet den sogenannten Restriktionspunkt, durchläuft sie den vollständigen Zellzyklus und kann erst nach wiederholtem Erreichen der G1-Phase wieder in die G0-Phase übergehen^{38–40}.

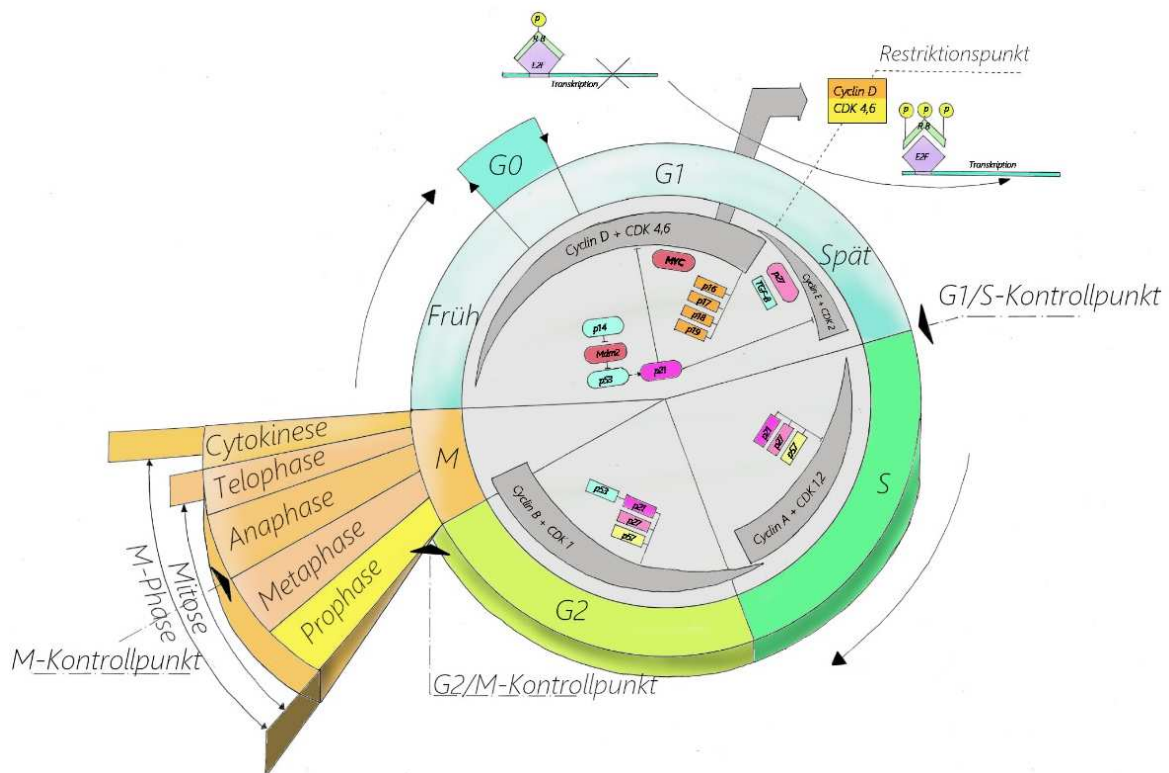


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus (eigene Abbildung)

Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus werden durch die Aktivität spezifischer Enzyme der Proteinkinase gesteuert. Diese gehören zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und beeinflussen durch Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen deren Stabilität, Aktivität und Funktion. Für jeden Übergang im Zellzyklus sind andere CDKs verantwortlich. Das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Enzyme, sowie der mitogener und antiproliferativer Komponenten, kann dem in Abbildung 4 schematisch aufgezeigten Zellzyklus entnommen werden.

3.1.3 Zelltod - Apoptose und Nekrose

Zellen entstammen streng regulierten Organismen, innerhalb derer, sowohl das Zellwachstum, als auch der Zelltod zwar von den Umgebungsbedingungen beeinflusst, jedoch auch vom Organismus kontrolliert wird. Im Allgemeinen werden zwei Formen des Zelltods unterschieden, die Nekrose und die Apoptose.

Die Nekrose stellt eine passive, unkontrollierte und energieunabhängige Form des Zelltods dar. Ausgelöst durch Zellschädigungen, beispielsweise durch zu große Hitzeeinwirkung oder Strahlung, kommt es zu einem Anschwellen der Zelle. Infolge der massiven Volumenzunahme platzen die Zellen auf und die Zellorganellen ergeben sich, wie in Abbildung 5 A) dargestellt, in den extrazellulären Raum. Innerhalb des Organismus wird aufgrund der frei werdenden Zellorganellen eine Entzündungsreaktion initiiert und der Heilungsprozess des geschädigten Organismus gestartet. Zellphysiologisch lässt sich bei der Nekrose neben der Volumenzunahme der Gesamtzelle auch eine Volumenexpansion der Mitochondrien, sowie eine Auflockerung des Chromatins feststellen. Durch die unkontrollierte Auflösung des Zellkerns, der sogenannten Karyolyse, können zudem DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge im extrazellulären Raum detektiert werden^{27,41}.

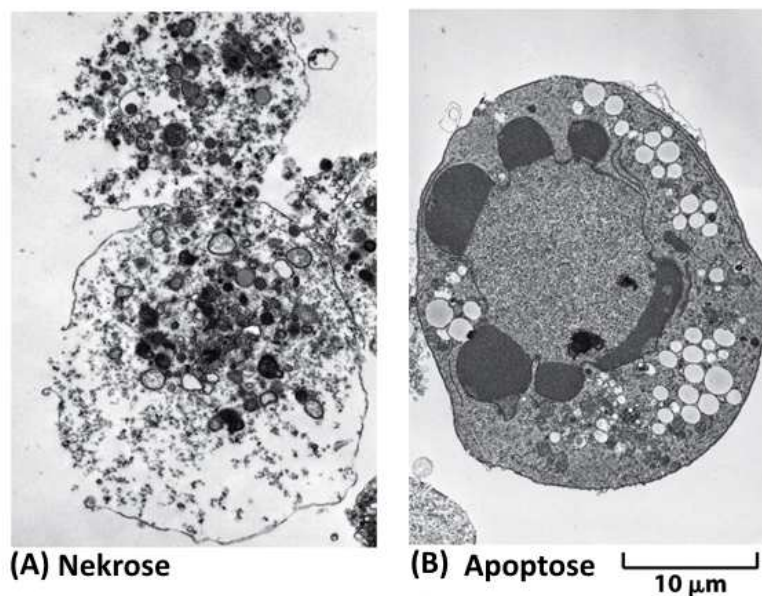


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Bilder nekrotischer und apoptotischer Zellen²⁷

Die zweite Form des Zelltodes ist der, in Abbildung 5 B) dargestellte und 1972 durch Andrew Wyllie und John Kerr als Apoptose bezeichnete, programmierte Zelltod⁴². Innerhalb des Organismus stellt die Apoptose einen wichtigen Bestandteil in der Embryogenese, der Kontrolle der Zellzahl, sowie der Eliminierung entarteter Zellen dar. Aus der Literatur wird ersichtlich, dass der Apoptose in allen industriell-relevanten Zelllinien eine bedeutende Rolle zugesprochen wird⁴³. Einige Literaturquellen geben an, dass 60 % - 90 % der Zellen innerhalb der Zellkultur

infolge der Apoptose sterben^{41,44,45}. Im Gegensatz zur Nekrose, kommt es bei der Apoptose zu einer Volumenabnahme und einem kontrollierten Auflösen sowohl des Cytoskeletts, als auch der Kernhülle. Die intrazellulär vorliegende DNA wird in Folge enzymatischer Prozesse in Fragmente definierter Länge gespalten. Zusätzlich verändert sich die Zelloberfläche. Zu den detektierbaren Oberflächenveränderungen gehört beispielsweise die Vesikelbildung, bei dieser werden Teile der Zellmembran abgeschnürt und eingeschlossene, intakte Zellorganellen für die Phagozytose benachbarter Zellen bereitgestellt. Des Weiteren kann eine Translokation des, in lebenden Zellen innen liegenden Proteins, Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Membran beobachtet werden. Das charakteristische translozieren von PS wird in der Analytik, wie auch in dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.3.4), häufig als Apoptosemarker verwendet. Der programmierte Zelltod wird durch proteolytische Enzyme, die im aktiven Zentrum ein Cystein aufweisen und in Zielproteinen spezifische Aspartylreste trennen, die sogenannten Caspasen, verursacht. Enzyme, die zur Familie der Caspasen gehören, führen beispielsweise zu einem irreversiblen Abbau der Kernlaminae oder zum Inaktivieren zytosolischer Schlüsselproteine. In jeder kernhaltigen, tierischen Zelle werden inaktive Caspasen, die sogenannten Procaspasen, synthetisiert. Die Aktivierung des programmierten Zelltods, und somit der Caspasen, kann auf extrinsischem und intrinsischem Wege erfolgen. Beim Auftreten sowohl extrazellulärer als auch intrazellulärer Todessignale wird durch intrazelluläre Adapterproteine die Aggregation und Aktivierung von Procaspasen initiiert. Wurden einige wenige Procaspasen innerhalb der Zelle aktiviert, ohne durch IPA (inhibitor of apoptosis) – Proteine, oder Proteine der Bcl-2-Familie gehemmt zu werden, aktivieren diese weitere Procaspasen, sodass eine zerstörende, selbstverstärkende und nicht umkehrbare Kaskade entsteht^{46,47}.

Wie zuvor beschrieben, kommt es durch die Apoptose zu einer Oberflächenveränderung der Zellen. Diese führen im Organismus zu einer Phagozytose. In Folge der Phagozytose, also dem Aufnehmen der abgestorbenen Zelle durch eine benachbarte, lebende Zelle, wird der Zellinhalt der toten Zelle vollständig wiederverwendet. Des Weiteren erfolgt die Phagozytose bevor Zellinhalte in den extrazellulären Raum gelangen, sodass keine Entzündungsreaktion initiiert wird²⁷.

3.1.4 Temperatureinfluss auf das Zellwachstum und die Zellbiologie

Der Zellstoffwechsel lässt sich auf ein komplexes Zusammenspiel biochemischer und biophysikalischer Prozesse zurückführen. Die überwiegende Anzahl biochemischer Reaktionen innerhalb des Metabolismus wird, zum Aufrechterhalten des, im höchsten Maßen geordnet ablaufenden Stoffwechsels, durch die Aktivität spezifischer Enzyme gesteuert und geregelt. Enzyme sind katalytisch aktive Polypeptidketten, die, aufgrund ihres Aufbaus und der charakteristischen, dreidimensionalen Struktur, substrat- und reaktionsspezifisch die Aktivierungsenergie einzelner Reaktionen herabsetzen. Ohne die katalytische Aktivität von Enzymen würden aus Gründen der Thermodynamik viele der stoffwechselrelevanten Reaktionen bei physiologischen Bedingungen nicht stattfinden⁴⁸. Die Rate der spezifischen Enzymaktivität ist unmittelbar von der Temperatur abhängig und weist den in Abbildung 6 dargestellten, typischen Verlauf auf.

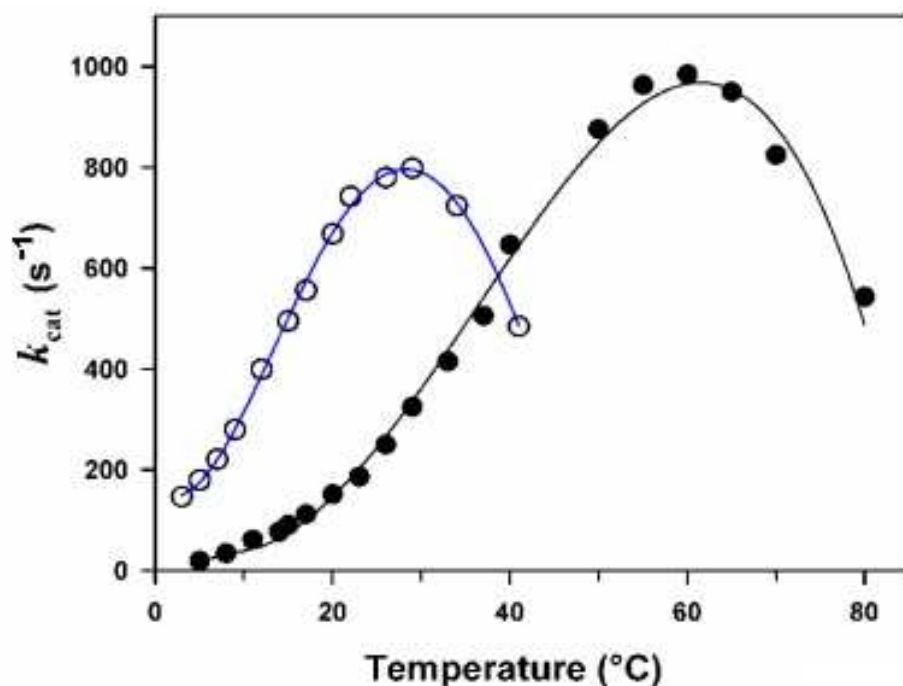


Abbildung 6: Temperaturabhängigkeit der katalytischen Wechselzahl k_{cat} und somit der katalytischen Aktivität, psychrophiler (offene Symbole, blaue Linien) und mesophiler (ausgefüllte Symbole) Amylasen (Enzyme)⁴⁹

Jedes Enzym besitzt ein eigenes Temperaturoptimum⁵⁰. Mark E. Ritchie beschreibt anschaulich, dass die beobachtete optimale Temperatur eines Enzyms nicht ausschließlich auf eine Abnahme der Enzymaktivität zurückzuführen ist. Vielmehr,

so Ritchie werde die ideale Temperatur auch durch die temperaturabhängige Reaktionsdiffusionsdynamik sowie die Entropie des Reaktionsprodukts bestimmt⁵¹. Ausgehend von der temperaturabhängigen katalytischen Aktivität einzelner Enzyme ist es nicht verwunderlich, dass in der Vergangenheit die Temperaturabhängigkeit des Zellwachstums umfassend untersucht wurde^{52,53}. So beschrieben Watanab und Okada 1967 ein deutlich vermindertes Zellwachstum einer Thymuskrebszelle einer Maus, bei Temperaturen kleiner 37 °C⁵⁴. In nachfolgenden Studien von Reuveny et al. (1986) und Chuppa et al. (1997) wurde die beobachtete Reduktion der spezifischen Wachstumsrate für unterschiedliche tierische Zelllinien innerhalb eines Temperaturbereichs von 34 °C und 31 °C bestätigt. Des Weiteren konnte in diesen Studien bei niedrigeren Temperaturen eine deutlich verlängerte Kultivierungszeit mit zeitverzögerter Absterbephase aufgezeigt werden^{55,56}. Die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate wurde in diversen Studien auf einen verstärkten Verbleib der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zurückgeführt^{54,57–59}. Im Rahmen der Untersuchungen von Moor et al. konnte zudem bei einer Reduktion der Prozesstemperatur von 37 °C auf 30 °C, nach einer Dauer von 48 Stunden eine Verringerung des Anteils apoptotischer Zellen beobachtet werden⁵⁹. Die Temperatur für ein optimales Wachstum tierischer Zellen liegt den Studien zufolge in einem Temperaturbereich von 33 °C und 38 °C^{56,60}.

In Anbetracht des Metabolismus zeigte Kurano et al., dass die Glukoseaufnahme, respektive die Laktatproduktion adhärent wachsender CHO-Zellen, durch die Reduktion der Prozesstemperatur auf 34 °C um 10 %-15 % sinkt⁶¹. Rössler et al. konnte, innerhalb von Hamsterzellkulturen (BHK), bei einer Reduktion der Prozesstemperatur auf 33 °C sogar eine Verringerung der Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsrate von 50 % verzeichnen. Die Glutaminaufnahme- und Ammoniumbildungsrate, sowie die Produktbildungsrate (Antithrombin III) änderten sich in diesem Fall jedoch nicht⁴⁴. In Bezug auf die maximale Lebendzellkonzentration konnten Rössler et al. keinen negativen Einfluss niedriger Prozesstemperaturen feststellen. Weidemann et al. konnte die Ergebnisse Rösslers et al., ebenfalls in der Kultivierung einer rekombinanten, Antithrombin III produzierenden Hamsterzelle (BHK) bei einer Temperatur von 30 °C bestätigen⁶².

In Anbetracht der Produktbildung zeigt sich ein zelllinien- und zellklonabhängiges Verhalten. Dieses zellklonspezifische Verhalten in der Produktbildungsrate, bei

reduzierter Temperatur wurde beispielsweise in einer Studie mit 12 unterschiedlichen antikörperproduzierender CHO-Klonen aufgezeigt⁶³. Tsao et al. wiesen zudem eine deutlich reduzierte spezifische Produktbildungsrate Erythropoetin (EPO) produzierender, adhärent wachsender CHO-Zellen bei einer Prozesstemperatur von 32 °C nach⁶⁴. Entgegen dessen, zeigte Ahn et al., ebenfalls unter Verwendung von CHO-Zellen, bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C eine erhöhte EPO-Bildungsrate in Kombination mit einer gleichbleibenden Produktqualität. Mit Reduktion der Kultivierungstemperatur auf einen Bereich unterhalb von 32 °C, konnte Ahn et al. einen negativen Einfluss auf die Glykanstruktur feststellen⁶⁵. Ein Effekt, der sich positiv auf die Produktqualität auswirken kann, ist die beobachtete Abnahme der proteolytischen Aktivität bei reduzierten Prozesstemperaturen^{66–68}.

Molekularbiologisch betrachtet wiesen Bedoya-López et al., bei einer Prozesstemperatur von 30°C, eine erhöhte Regulierung von Genen in CHO-Zellen nach, die im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel und der Biogenese von Mitochondrien, des zentralen Metabolismus und der Vermeidung des apoptotischen Zelltods stehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Zielprotein kodierende Gen nicht differentiell exprimiert wurde. Es wurden jedoch Schwankungen in den Transkripten festgestellt, die für Proteine kodieren, welche an der Sekretionsmaschinerie, insbesondere an der Glykosylierung, beteiligt sind⁶⁹.

In Bezug auf die Zellphysiologie konnte gezeigt werden, dass sich unter anderem eine gesenkte Prozesstemperatur aufgrund einer Verringerung der Membranfluidität positiv auf die Scherempfindlichkeit tierischer Zellen auswirkt^{70,71} und sich die Zellgrößenverteilung in Richtung kleiner und sphärischer Zellen verschiebt⁶².

In der Literatur lassen sich neben den diversen Studien, welche sich mit den Wirkungen einer reduzierten Prozesstemperatur beschäftigen, auch jene finden, welche die biologische Zellreaktion einer Prozesstemperatur größer 37 °C untersuchen. Innerhalb dieser Studien zeigte sich, dass eine nicht zellschädigende Erhöhung der Prozesstemperatur, durch gezieltes arretieren der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, die spezifische Produktivität erhöhen kann^{58,72,73}. So gelang es Jenkins und Hovey, mithilfe einer temperaturempfindlichen CHO-Zelle, in Kombination mit einer alternierenden Prozesstemperatur im Bereich von 34 °C und

39 °C die Gesamtausbeute innerhalb einer Batchkultur um 35% zu erhöhen, ohne die Lebensfähigkeit der Zellen zu beeinträchtigen⁵⁸. Eine weitere Erhöhung der spezifischen Produktbildung ließ sich durch die Optimierung der Zelle und das Erwirken einer hitzeinduzierten Proteinexpression erreichen. Die optimierte Zelllinie wurde innerhalb dieser Studie für zwei Stunden bei einer Reaktortemperatur von 42 °C kultiviert⁷².

3.2 Regelungstechnische Grundlagen

Analog zur ursprünglichen Umgebung benötigen in vitro kultivierte Zellen ein stark reguliertes Umfeld. In Bioreaktoren werden nach aktuellem Stand der Technik der pH-Wert, der Gehalt des gelösten Sauerstoffs, die Temperatur, der Flüssigkeitsstand, die Schaumhöhe und in einigen Fällen die Substanzkonzentrationen, sowie der Druck geregelt^{18,74–76}.

Unter dem Begriff der Regelung versteht man im Allgemeinen die fortlaufende Ermittlung einer Regelgröße $y(t)$, beispielsweise der Reaktortemperatur, welche mithilfe des Messgliedes, der Temperatursonde, ermittelt wird. Das Sondensignal (Ist-Wert) $y_M(t)$ wird durch Differenzbildung mit der Führungsgröße (Sollwert) $w(t)$ verglichen. Mit Hilfe der berechneten Regeldifferenz, oder Regelabweichung $e(t)$ wird nachfolgend die Stellgröße $u(t)$ entsprechend des gewünschten Zeitverhaltens des Regelkreises ermittelt. In unserem Beispiel bestimmt $u(t)$ anhand des Ist-Soll-Wert-Vergleichs, in welche Richtung und wie schnell sich die Temperatur der Heiz-/Kühleinheit ändern soll. Umwelteinflüsse, sogenannte Störgrößen $z(t)$, wirken sich innerhalb des Regelkreises auf die Regelgröße aus und werden im Idealfall vollständig vom Regler kompensiert.

Wie sich auch dem in Abbildung 7 dargestellten einfachen Regelkreis entnehmen lässt, ist eines der Hauptmerkmale innerhalb der Regelung ein geschlossener Wirkungsablauf (engl. closed-loop control), bei dem sich die Regelgröße im Wirkungsweg des Regelkreises selbst beeinflusst. Liegt kein geschlossener Wirkkreis vor, wird im Allgemeinen von Steuern (engl. open-loop control) gesprochen⁷⁷.

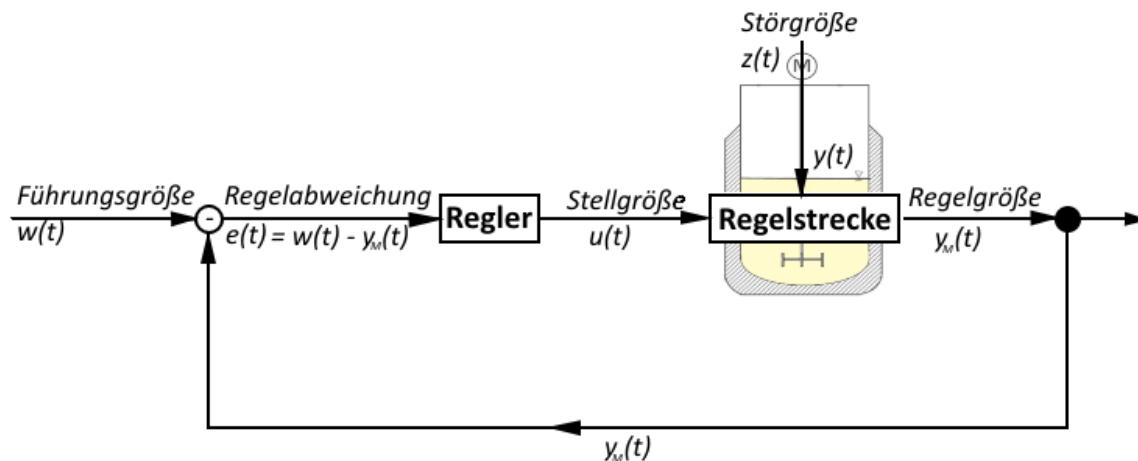


Abbildung 7: Blockschaltbild eines einfachen Regelkreises mit dynamischen Größen

Regler werden gemäß ihres Verhaltens, in stetige und unstetige Regler unterteilt und sind stets auf das Verhalten der Regelstrecke abzustimmen. Zu den stetigen, linearen Reglern gehören die, häufig als „Standardregler“ bezeichneten P- (Proportional), I- (Integral), PI- (Proportional-Integral), PD- (Proportional-Differential) und PID- (Proportional-Integral-Differential) Regler, welche ihren Namen gemäß der eingesetzten Regelgleichung erhalten. Innerhalb der P-Regelung wird die berechnete Regelabweichung, gemäß Gleichung (3-5), mit einem Verstärkungsfaktor K_p multipliziert. Aufgrund der Berechnung zählt diese Form der Regelung zu den schnelleren Reglern, jedoch bleibt bei Verwendung dieser Regler immer eine Regelabweichung bestehen.

$$u(t) = K_p \cdot e(t) \quad (3-5)$$

Innerhalb des I-Reglers errechnet sich die Stellgröße, dargestellt in Gleichung (3-6), aus der Summe der Regelabweichungen einer definierten Zeit, multipliziert mit dem Faktor K_i . Je länger die Regelabweichung besteht, desto größer wird die Stellgröße, sodass sich die Stellgröße verhältnismäßig langsam ändert, die Regelabweichung jedoch vollständig ausgeglichen wird.

$$u(t) = K_i \cdot \int_0^t e(t) dt \quad (3-6)$$

Der PI-Regler, kombiniert die Vorteile des P- und I-Reglers, sodass sich ein schnell reagierender Regler ergibt, welcher die Regelabweichung vollständig ausgleicht. Die Stellgröße des PI-Reglers berechnet sich aus der Summe der Einzelfunktionen der P- und I-Regler gemäß Gleichung (3-7).

$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \cdot \int_0^t e(t) dt \quad (3-7)$$

In der Praxis treten Störgrößen häufig unvermittelt und schnell auf, sodass es sinnvoll sein kann einen Regler zu nutzen, der auf die Änderungsgeschwindigkeit der Regelabweichung der Stellgröße reagiert. Da Regler, die ausschließlich auf zeitliche Änderungen der Regelabweichung ansprechen, im Fall konstanter Regelabweichungen nicht regulatorisch eingreifen, werden diese selten alleine eingesetzt. Bewährt haben sich diese Regler jedoch in Kombination mit anderen Standardreglern, beispielsweise ergänzend zu P-, I- oder PI-Reglern. So hat sich der PID-Regler als universellster klassischer Regler durchgesetzt, welcher sich in vielen Bereichen als schneller und genauer Regler erweist. In diesem Fall berechnet sich die Stellgröße aus der Summe der einzelnen Regelgleichungen der P- und I-Regler, sowie einem Anteil, der die Änderungsgeschwindigkeit der Regelabweichung multipliziert mit dem Faktor K_d beinhaltet, gemäß Gleichung (3- 8).

$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \cdot \int_0^t e(t) dt + K_d \cdot \frac{d e(t)}{dt} \quad (3-8)$$

Über die Faktoren K_p , K_i und K_d lässt sich der Regler, durch die Gewichtung der einzelnen Terme in vielen Fällen optimal, an die Bedürfnisse der Regelstrecke anpassen^{78,79}.

Innerhalb der Regelungstechnik lassen sich jedoch nicht alle Regelungsprobleme mithilfe der beschriebenen klassischen Regler lösen, sodass in diesen Fällen individuell auf die Problemstellung möglichst optimale Regelungsalgorithmen entwickelt werden müssen. Bei unstetigen Regelungsproblemen lässt sich beispielsweise durch Zweipunkt-, Mehrpunkt- oder Fuzzy-Reglern ein besseres dynamisches Verhalten der Regelgröße erzielen^{80,81}.

Komplexe Regelproblematiken mit verknüpften Regelgrößen oder Stellgrößen, sowie nicht lineare Regelstrecken benötigen beispielsweise Mehrgrößenregler, modellbasierte Regler oder vermaschte Regler⁸²⁻⁸⁴.

Der Bioreaktor stellt ein dynamisches System dar, innerhalb dessen, aufgrund der Zellen, ihres Metabolismus, der physikalischen Materie sowie der Energie, zeitliche

und räumliche Varianzen der einzelnen Regelgrößen auftreten⁸⁵. So ist in Bezug auf die Regelung stets zu bedenken, dass Stellgrößen sich aufgrund der speichernden Wirkung der Materie und der Mischverhältnisse nicht unmittelbar auf das System auswirken und aus den genannten Gründen nicht umgehend und in Echtzeit gemessen werden können⁸⁶.

Der Regler ist immer auf das Verhalten der Regelstrecke anzupassen, sodass es bei der Auslegung und Entwicklung stetiger und unstetiger Regler wichtig ist, die Reaktion des Gesamtsystems auf eine Änderung der Stellgröße möglichst genau zu kennen und diese mathematisch zu beschreiben. Insbesondere bei der Charakterisierung unstetiger Systeme mit verknüpften Regel- und Stellgrößen bedarf es ein fundiertes Wissen der physikalischen und biologischen Parameter. Auf Grundlage des theoretischen Wissens und experimentell gewonnener Versuchsdaten wird ein mathematisches Modell gesucht, welches die Beziehung zwischen Ein- und Ausgangsgrößen zunächst qualitativ beschreibt. Um eine quantitativ verbesserte Übereinstimmung des hergeleiteten mathematischen Modells in der Simulation mit den experimentell ermittelten Versuchsdaten zu erreichen, sind die eingefügten Parameter mithilfe einer Parameteridentifikation zu bestimmen. Versuchsdaten aus komplexen biologischen Systemen weisen häufig eine unberechenbare und unregelmäßige Streuung der Messwerte auf, so dass eine einfache Bestimmung und Interpretation der Parameter nicht möglich ist. In diesem Falle ist ein Kriterium zu betrachten, dass die Qualität der Übereinstimmung der experimentellen und simulierten Werte beschreibt. Die Suche nach den optimalen Parametern des mathematischen Modells, zur Beschreibung der experimentellen Versuchsergebnisse führt zu einem Optimierungsproblem⁸⁷.

Im Folgenden wird auf die Grundzüge der Optimierung sowie der Parameteridentifikation eingegangen.

3.2.1 Optimierung

Unter Optimierung wird im Allgemeinen die Suche nach Bedingungen, Parametern oder Eigenschaften verstanden, die bei gegebenen Voraus- und Zielsetzungen ein bestmögliches Ergebnis hervorbringen. Optimierungsmethoden sind vielseitig einsetzbar und können beispielsweise zur Bestimmung von Anlagen- und Prozessparameter, wie die im nachfolgenden Abschnitt 3.2.2 beschriebene

Parameteridentifikation sowie die online-Optimierung mit einer diskreten Regelung der Zielgröße verwendet werden^{88–90}. Die erfolgreiche Optimierung bedingt zunächst die mathematische Definition des sogenannten Optimierungsproblems, gefolgt von der Lösungsfindung, welche einen Kompromiss verschiedener Parameter beinhaltet und das bestmögliche Resultat der Gesamtfunktion liefert⁹¹. Eine Vielzahl technischer, wirtschaftlicher und naturwissenschaftlicher Probleme lässt sich mathematisch in sogenannten Zielfunktionen erfassen und lösen.

Mathematisch betrachtet stellt ein Optimum, ein Extremum (Minimum, Maximum) einer Funktion $f(x)$ dar, welches im Rahmen der Optimierung zu ermitteln ist. Im Fall der Optimierung werden jene Parameter, Variablen oder Eigenschaften gesucht, die ein Minimum der Zielfunktion erwirken. Generell lässt sich ein Optimierungsproblem wie folgt angeben:

$$\text{Zielfunktion} \quad \min_{x \in \mathbb{R}^n} f(x) \quad (3-9)$$

Im realen Alltag ist es ebenso möglich, dass die optimalen Parameter im Maximum der Zielfunktion liegen. Innerhalb der letzten Jahrzehnte hat es sich jedoch durchgesetzt, die Zielfunktion so zu definieren, dass die bestmöglichen Parameter, gemäß des in Gleichung (3-10) dargestellten Ansatzes, durch das Lösen eines Minimierungsproblems zu finden sind⁹².

$$\max_{x \in \mathbb{R}^n} f(x) = \min_{x \in \mathbb{R}^n} -f(x) \quad (3-10)$$

Optimierungsprobleme werden zudem häufig durch die Angabe von Parameterschranken definiert. Die Nebenbedingungen schränken den Bereich für mögliche Parameter auf einen plausiblen und realistischen Wertebereich ein und werden als Gleichungs- und Ungleichungsbeschränkungen, gemäß den Gleichungen (3-11) und (3-12), angegeben.

$$\text{Gleichungsbeschränkungen} \quad g_i(x) = 0, \quad i = 1, \dots, p \quad (3-11)$$

$$\text{Ungleichungsbeschränkungen} \quad h_i(x) \leq 0, \quad i = 1, \dots, q \quad (3-12)$$

Die Bereiche der Parameterbeschränkung entstammen dem naturwissenschaftlichen Kontext oder aus zuvor gewonnenen Erkenntnissen⁹³.

Im unkompliziertesten Fall besteht das Optimierungsproblem aus einer differenzierbaren, eindimensionalen Zielfunktion $f(x)$, sodass sich die Extremwerte

der Funktion aus den Nullstellen der ersten Ableitung $\frac{df(x)}{dx}$ ergeben. Abgeleitet aus dem einfachsten Fall wird ersichtlich, dass der Gradient der Zielfunktion, gemäß der mathematischen Notation aus Gleichung (3-13), verschwinden muss.

$$\nabla_x f(x) = 0 \quad (3-13)$$

Mit Verschwinden des Gradienten kann zunächst lediglich ein Extremum oder Sattelpunkt der Stammfunktion ermittelt werden. Zu Identifizierung eines globalen Minimums an der Stelle x^* ist die zweite Ungleichheitsbedingung gemäß Gleichung (3-14) zu erfüllen⁹⁴.

$$f(x^*) \leq f(x) \quad \forall x \in g_i(x), h_i(x) \quad (3-14)$$

In den meisten Fällen lassen sich Zielfunktionen jedoch nicht auf die einfachsten Optimierungsprobleme zurückführen, sondern sind ausschließlich durch lineare oder nicht lineare Gleichungen darzustellen. Eine analytische Lösung komplexer Optimierungsprobleme, mit mehreren skalaren oder vektoriellen Parametern ist häufig nicht möglich, sodass in den meisten Fällen numerische Optimierungsverfahren verwendet werden⁹⁵.

Die gängigen numerischen Optimierungsverfahren lassen sich gemäß dem Ausnutzen der Gradienteninformation oder gemäß den verwendeten Verfahren, zur Suche der optimalen Parameter unterteilen⁹⁶. So können die Parameter gemäß den deterministischen oder stochastischen Verfahren ermittelt werden. Einige bekannte Optimierungsverfahren sind in Tabelle 1 gemäß diesen zwei Charakterisierungspunkten dargestellt.

Tabelle 1: Beispiele für numerische Optimierungsverfahren, eingeteilt nach deterministischen, stochastischen Verfahren und gradientenbasierten beziehungsweise gradientenfreien Verfahren

Deterministisch	Stochastisch	Gradientenbasiert	Gradientenfrei
Newton-Rasphson-Verfahren	Monte-Carlo	Newton-Rasphson-Verfahren	Simplex-Methode
Gauss-Newton	Evolutionstrategie	Gauss-Newton	Evolutionstrategie
Quasi-Newton		Quasi-Newton	
Simplex-Methode		Levenberg-Marquard	
		SQP-Methode	

Gradientenbasierte Lösungsverfahren bestimmen auf Basis der Wertigkeit einer Ungleichung und mithilfe einer Iterationsvorschrift einen neuen Punkt x^{k+1} , welcher eine hinreichende Reduktion der Zielfunktion zur Folge hat, sodass gilt:

$$f(x^{k+1}) < f(x) \quad (3-15)$$

In der Praxis können Zielfunktionen sehr komplex ausfallen und sind nicht in allen Fällen stetig differenzierbar, sodass es in diesen Fällen nicht möglich ist, eine partielle Ableitung mit vertretbarem Rechenaufwand herzuleiten. Ist dies der Fall, können gradientenfreie Lösungsverfahren verwendet werden. Innerhalb dieser Verfahren wird mit Stichproben eine definierte Reihe von Funktionswerten berechnet und aus diesen ein neuer Iterationspunkt x^{k+1} ermittelt⁹⁷.

Eines der bekanntesten und in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Lösung nicht linearer Optimierungsprobleme ist das Simplex-Verfahren nach Nelder und Mead, welches nicht mit dem Simplex-Verfahren nach G. Danzig zum Lösen linearer Optimierungsprobleme verwechselt werden sollte. Die Suche der geeigneten Parameter basiert auf einem Algorithmus, der einen Simplex im n -dimensionalen Parameterraum mithilfe von $n + 1$ Punkten $x^{k,j}$ mit $j = 1, \dots, n + 1$ und dem Iterationsindex k aufspannt. Je nach Anzahl der gesuchten Parameter ergibt sich ein unterschiedlich großes n -dimensionales Polytop, sodass sich beispielsweise bei einem gesuchten Parameter ($n = 1$) eine Gerade und bei zwei gesuchten Parametern ($n = 2$) ein Dreieck ergibt. Durch Einsetzen der $n + 1$ Punkte in die Zielfunktion des Simplex werden die Funktionswerte $f(x^{k,j})$ berechnet und gemäß der Wertgröße sortiert, sodass sich folgende Anordnung ergibt:

$$f(x^{k,1}) \leq f(x^{k,2}) \leq \dots \leq f(x^{k,n+1}) \quad (3-16)$$

Da das Optimierungsproblem ein Minimierungsproblem darstellt, ist der größte Wert ($x^{k,n+1}$) jener, mit dem schlechtesten Ergebnis der Zielfunktion. Nach der Berechnung des Schwerpunktes (Mittelpunkt) $\bar{x}^k$ des Simplex, gemäß Gleichung (3-17), erfolgt die Ermittlung eines neuen Parameters und somit eines neuen n -dimensionalen Parameterraums mit Hilfe der in Gleichung (3-18) dargestellten, vom Parameter x abhängigen, Geradengleichung $g(x)$.

$$\bar{x}^k = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x^{k,j} \quad (3-17)$$

$$g(x) = \bar{x}^k + (\bar{x}^k - x^{k,n+1}) \quad (3-18)$$

Durch Variation des Parameters x und einem Vergleich der historischen und neuen Funktionswerte der Zielfunktion, kann sich das n -dimensionale Polytop durch Expansion, innere und äußere Kontraktion, Schrumpfung oder Reflexion ändern.

Die Berechnungen des Simplex-Verfahrens werden iterativ fortgesetzt, bis das zuvor gesetzte Konvergenzkriterium erfüllt wurde.

Generell gilt das Simplex-Verfahren als robustes und einfaches Verfahren, mit dessen Hilfe häufig gute Ergebnisse erzielt werden. Dennoch kann es in der Praxis vorkommen, dass das Verfahren zu nicht optimalen Bedingungen konvergiert und aufgrund des zum Teil hohen Rechenaufwandes relativ langsam ist^{98,99}.

3.2.2 Parameteridentifikation

In den Ingenieur- und Naturwissenschaften lassen sich eine Vielzahl aussagekräftiger Parameter nicht direkt messen, sondern müssen aus der Analyse experimentell gewonnener Daten indirekt bestimmt werden. Eine Möglichkeit, insbesondere Messwerte mit einer verhältnismäßig großen Streuung mit einer hohen Genauigkeit auszuwerten, ist die sogenannte Parameteridentifikation, oder Parameterschätzung. Diese Methode basiert auf einem angleichen simulierter Daten an Messwerte unter Variation der gesuchten Parameter. Im Allgemeinen beginnt die Parameteridentifikation mit der quantitativen mathematischen Beschreibung der zu untersuchenden Problemstellung. Dies erfolgt durch Differenzialgleichungen.

Im nachfolgenden werden die gesuchten Parameter durch das Angleichen der simulierten Kurve an die experimentellen Daten bestimmt. Ein möglichst hoher Grad der Übereinstimmung experimentell ermittelter und simulierter Werte kann beispielsweise durch die Minimierung einer Fehlerquadrantenfunktion erreicht werden und ist somit auf ein Optimierungsproblem zurückzuführen¹⁰⁰. Innerhalb dieser Methode ist die Differenz im Quadrat der simulierten Werte X_{sim} und der experimentellen Daten X_{mes} zum Zeitpunkt t_i zu ermitteln. Dieses kann beispielsweise mit Hilfe der in Gleichung (3-19) aufgeführten relativen quadratischen Abweichung F_{rel} erfolgen.

$$F_{rel}(t_i) = \left(\frac{X_{mes}(t_i) - X_{sim}(t_i)}{X_{mes}(t_i)} \right)^2 \quad (3-19)$$

Durch Summation der einzelnen Abweichungen, gemäß Gleichung (3-20), lässt sich sogenannte Gütefunktion berechnen. Anhand der Gütefunktion lässt sich ableiten, inwieweit die simulierten Funktionswerte des Modells von den experimentellen Daten abweichen. Verschwindet der Funktionswert, der auf Grundlage der relativen Abweichung berechneter Gütefunktion, entspricht der modellierte Kurvenverlauf dem Verlauf der Messwerte.

$$J(X) = \sum_{t=0}^n F_{rel}(t_i) \quad (3-20)$$

Diesen Zusammenhang wird bei der Parameteridentifikation insofern ausgenutzt, dass die gesuchten Modellparameter der simulierten Werte, unter Zuhilfenahme eines geeigneten Optimierungsverfahrens solange variiert werden, bis die Gütefunktion möglichst minimal wird. Entspricht die Gütefunktion näherungsweise einem Funktionswert von 0 ist davon auszugehen, dass die Modellparameter den experimentell ermittelten Parametern entsprechen^{81,101,102}. Das Optimierungsproblem lässt sich gemäß in Abschnitt 3.2.1 dargestellten Notation, wie folgt darstellen:

$$\min_{x \in \mathbb{R}^n} J(X) \quad (3-21)$$

Um realistische Parameterwerte zu erhalten, ist es generell sinnvoll Modellparameter auf einen realistischen Wertebereich einzuschränken, sodass sich die folgenden Nebenbedingungen $g_i(X)$ und $h_i(X)$ ergeben.

$$g_i(X) = 0, \quad i = 1, \dots, p \quad (3-22)$$

$$h_i(X) \leq 0, \quad i = 1, \dots, q \quad (3-23)$$

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien sind im Folgenden in tabellarischer Form zusammengefasst. Geräte und das eingesetzte Zubehör, Chemikalien und Reagenzien, sowie Assay, Zelllinien und Medien mit Angabe der zugegebenen Supplemente werden, ebenso wie die genutzten Softwarekomponenten, getrennt voneinander aufgeführt.

4.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analog-Digital Output Box		Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Autoklav	V 150	Systec GmbH , Wettenberg, Deutschland
Automatischer Zellzähler	ViCell® XR	Beckmann Coulter Inc. Brea, USA
Disk-Abluftfilterheizung	Filterheizung UniVessel®	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Chromatographieanlage	Äkta purifier 10	GE Healthcare, Chicago, USA
CO2-Inkubator	HeraCell® 240i	Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra, Hannover, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Fermenter	Biostat® B Twin	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Flowcytometer	BD FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M (Mikroskop), Axiocam HRm (Kamera), HBO 100 + Colibri.2 Controller (Lichtquelle)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Feinwaage	AT 400	Mettler-Toledo GmbH; Wien, Österreich
Flaschendruckminderer Edalgase/CO2	Kayser	Carl Roth GmbH&CO.KG, Karlsruhe, Deutschland
Gasmischstation	MX 4/4	DASGIP Information and Process Technology GmbH, Jülich, Deutschland
Grobwaagen	TE 1502S	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Häemocytometer	Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH&CO.KG, Karlsruhe, Deutschland
Kommunikationsschnittstelle Zellzahlsonde	PC-Box	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Kühl- und Gefrierschrank (+4°C, -20°C)	Comfort No Frost	Liebherr, Nürnberg, Deutschland
Kühl-Standzentrifuge	ZK 380	Hermle Labortechnik, Wehingen, Deutschland
Kühl-Tischzentrifuge	Fresco 21	Thermo Scientific, Waltham, USA
Metabolitanalyser	CedexBio	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Klasse II)	HeraSafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikropipetten	Pipetman® 0,5 - 1000µl	Gilson Inc. Middleton, USA
Mikroskop	DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Peristaltikpumpe	Ismatec ecoline	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	CG 843	Schott, Mainz, Deutschland
pH-Sonde Fermenter	EasyFerm Plus VP 160	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pO ₂ -Sonde Fermenter	Oxyferm FDA VP 160	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
pO ₂ -Sonde Fermenter	VisiFerm DO ECS 160 H0	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Reinstwasseranlage	Milli-Q® Reference	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Schnittstellenwandler	Jumpflex 857	WAGO Kontakttechnik GmbH & Co. KG, Minden, Deutschland
Schnittstellenwandler	MIKROKON	Friedrich Lütze GmbH & Co. KG, Weinstadt, Deutschland
Schüttelinkubator	Lab-Shaker ES-X	Kuhner, Birsfelden, Schweiz
Schüttelinkubator	Lab-Therm LT-X	Kuhner, Birsfelden, Schweiz
Spülmaschine	Miele Desinfektor MCU	Miele, Gütersloh, Deutschland
Temperatur-Sonde (Fermenter)	Pt 100	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80°C)	VIP Series	Sanyo, Osaka, Japan
Ultraschallbad	Sonorex Digital 10 P	BANDELIN electronic GmbH&Co.KG, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe	Absaugsystem N010 AV.18	KNF Neuberger, Trenton, USA
Vortexer	Yellow Line TTS 2	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad	W 22	Labortechnik Medingen, Arndsdorf, Deutschland
Zellzahlsonde	Incyte	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz

4.1.2 Zubehör

Tabelle 3: Verwendetes Zubehör

Bezeichnung	Information	Hersteller
Aufbewahrungsbox - 196°C	Rotilabo®-Cryobox aus Polycarbonat	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aufbewahrungsbox - 20°C	Rotilabo®-Cryobox aus Karton	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Clave Connector	CLAVE® Needlefree Connector	Neo Care GmbH, Lüdenscheid, Deutschland
Disk-Filter (groß)	Midisart®2000 (0,2µm PTFE)	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Disk-Filter (klein)	Minisart®SRP25 (0,2µm PTFE)	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Einfrierbehälter	Mr Frosty (Cryo 1°C Freezing Container)	Thermo Scientific, Waltham, USA (ehemals Nalgene)
Einweghandschuhe	Nitrile	VWR, Radnor, USA
Einweghandschuhe	Safetec	Unigloves, Rochester, UK
Einwegküvetten Cedex Bio	MicroCuvette Segments Bio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Erlenmeyerkolben	125 ml / 500ml, Polycarbonat	Corning, Corning NY, USA
Glaswaren	25ml-2000ml Flaschen	Schott Duran Group, Wertheim, Deutschland
Kosmetiktücher	Fusselfrei/Extra Weich	VWR, Radnor, USA
Kryovial	Cryo.s - 2 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT
Luer Lock Adapter	"female" und "male"	Applimed Critical Fluids, Mannheim, Deutschland
Luer Lock Spritzen	Syringe 5ml, 10ml, 20ml, 50ml	Terumo, Eschborn, Deutschland
Luer Lock Spritzenverschluss	Combination Caps	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
Luer Lock Stopfen	"female" und "male"	Applimed Critical Fluids, Mannheim, Deutschland
Micro Cuvett Segments Bio	Cuvetten CedexBio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß	0,5 - 2,0 ml	Greiner-Bio-One, Frickhausen, Deutschland
Parafilm	PM 999	Pechiney Plastics Packaging, Brampton, Kanada
Pipettenspitzen	SafeSeal-Tips® professional 10-1000µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Probengefäße ViCell	4 ml Sample Cup	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Serologische Pipetten	5-50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter	0,22µm (Cellulose Acetat)	VWR, Radnor, USA
Zentrifugenröhrchen	MWCO: 10.000 d	Merck Millipore, Burlington, USA

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Information	Hersteller
Calibrator A	Kalibrator CedexBio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Calibrator B	Kalibrator CedexBio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Control A Level 1-3 Bio	Kalibrationskontrollen Cedex Bio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Control B Level 1-3 Bio	Kalibrationskontrollen Cedex Bio	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	DMSO	
Ethanol	vergällt, 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flächendesinfektionsmittel	Bacillol® AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Geneticin (G418)	50 mg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Handdesinfektionsmittel	Sterillium® Virugard	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Methotrexat (MTX)	1000 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Leitfähigkeitsstandard	Basic Line Conductivity Standard 12880 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (25°C)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
L-Glutamin	200 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid	NaOH; Pellets	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phosphat gepufferte Saline	Dulbecco's 1x PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
pH Kalibratoren	pH 4,01; 7,00; Duracal buffer	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Pluronic F68	10 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Puffer A (Aufreinigung DPO)	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH 8.0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Puffer B (Aufreinigung DPO)	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 700 mM NaCl, pH 8.0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Citronensäure Monohydrat (Pulver)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4.1.4 Assays

Assay	Anwendung	Hersteller
eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	Apoptose-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FxCycle PI/RNase Staining Solution-Kit	Zellzyklus-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glukose Bio	Quantifizierung Glukose	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
IgG Bio	Quantifizierung IgG	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Lactat Bio	Quantifizierung Laktat	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
L-Glutamin Bio	Quantifizierung L-Glutamin	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
NH3 Bio	Quantifizierung NH3	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland

4.1.5 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten suspensionsadaptierten Zelllinien, wurden freundlicherweise durch das Zentrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld und das Steinbeis-Transferzentrum für angewandte biologische Chemie (STZ) Mannheim zur Verfügung gestellt. Nach Inkulturnahme der stabil transferierten rCHO C6000 Zelllinie zeigte sich zunächst ein sehr schlechtes Zellwachstum. Durch die weitere Subkultivierung, der zunächst schlecht wachsenden Zelllinie, konnte ein stabil wachsender Subklon selektiert werden, welcher sich im Wachstumsverhalten stark von der ursprünglichen Zelle unterscheidet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird der entstandene Subklon als KL - DPO bezeichnet.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Gewebe/Zelltyp	Sublinie	Quelle
CHO-DP12#1934	Cricetulus griseus	Ovar/Epithel	CHO-DXB11	CeBiTec Prof. Thomas Noll
rCHO C6000	Cricetulus griseus	Ovar/Epithel	CHO-K1	STZ

4.1.6 Medien

Bei dem verwendeten Zellkulturmedium handelt es sich um ein chemisch definiertes (CD) Medium, welches keine tierischen Zusätze enthält. Den Ansprüchen der verschiedenartigen Zelllinien entsprechend wurden dem Basismedium unterschiedliche Supplemente zugesetzt, die Tabelle 6 entnommen werden können.

Tabelle 6: Kultivierungs- und Einfriermedium

Zelllinie	Basismedium	Hersteller Basismedium	Supplemente Kultivierungsmedium	Supplemente Einfriermedium
CHO-DP12#1934	TC-42 mit Protein; ohne HT; ohne L- Glutamin, 0,1 mg/L IGF, 0,1 % Pluronic F68®	Xell, Bielefeld, Deutschland	4 mM L-Glutamin; 250 nM MTX	4 mM L-Glutamin; 250 nM MTX; 5 % DMSO
rCHO C6000	TC-42 mit Protein; ohne HT; ohne L- Glutamin, 0,1 mg/L IGF, 0,1 % Pluronic F68®	Xell, Bielefeld, Deutschland	4 mM L-Glutamin; 250 nM MTX; 0,3mg/ml G418 0,1 % Pluronic F68	4 mM L-Glutamin; 7,5 % DMSO 0,1 % Pluronic F68

4.1.7 Software

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
AxioVision 4.8	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
BD FACS Diva Version 8.1	FACS Analyse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Microsoft Excel 2016	Datenauswertung	Microsoft Corporation, Redmond, Washington
FlowJo 6.10.1	FACS Datenauswertung	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
MFCS/DA 3.0	Fermenter Datenaufnahme/ Softwareschnittstelle	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
Visual Studio Express 2015	Programmierung des Zellzahlreglers	Microsoft Corporation, Redmond, Washington

4.2 Methoden der Zellkulturtechnik

4.2.1 Aseptisches Arbeiten

Neben geeignetem Equipment ist eine aseptische Arbeitsweise für die erfolgreiche Tätigkeit in der Zellkulturtechnik unausweichlich. Aseptisches Arbeiten zielt darauf ab, Zellkulturen frei sowohl von vermehrungsfähigen Keimen (bakteriell, mykotisch,

viral), als auch von Kreuzkontaminationen mit anderen eukaryotischen Zellen zu halten. Auf die wesentlichen Punkte zur erfolgreichen steriltechnischen Arbeit und deren Ausführung während dieses Forschungsprojektes, wird im Folgenden eingegangen.

Sterilisationsverfahren der Arbeitsmaterialien

Die Sterilisation von thermisch stabilen Lösungen, Glas- und Kunststoffwaren erfolgte durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Thermisch instabile Flüssigkeiten wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Sterilfilter) sterilisiert. Kunststoffwaren, die nicht autoklaviert werden konnten, beispielsweise Clave-Conectoren und Luerlockverschlüsse wurden nach der Verwendung mit 70 % -tigem Ethanol und vollentsalztem Wasser gereinigt und bis zum folgenden Gebrauch in 70 % Ethanol gelagert.

Umgang mit und Reinigung der mikrobiologischen Sterilwerkbank

Alle sterilen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (laminar Sicherheitswerkbank) durchgeführt. Die für den jeweiligen Arbeitsschritt notwendigen Materialien wurden, vor dem Einführen in die Werkbank, gründlich, durch Einsprühen und Abreiben mit dem Flächendesinfektionsmittel Bacillol, gesäubert. Um die Partikelbelastung in der Werkbank zu minimieren, wurde nach dem Einschalten der Lüftung und dem Hochfahren der Glasscheibe eine Vorlaufphase von 15 – 20 min eingehalten. Vor und nach einzelnen Arbeitsschritten wurden die innenliegenden Oberflächen der Sicherheitswerkbank mit dem Flächendesinfektionsmittel Bacillol desinfiziert.

In regelmäßigen Abständen wurden die Bodenbleche der Werkbank ausgebaut und in der Laborspülmaschine bei 90 °C gewaschen. Während dieses Reinigungsvorgangs wurden zusätzlich alle Oberflächen und der Grobfilter (Ansaugschutz) mit Bacillol und Wasser gesäubert.

Reinigung der Brutschränke

Alle verwendeten CO₂-Inkubatoren wurden in regelmäßigen Abständen mit Bacillol desinfiziert und bei jeder sich bietenden Gelegenheit, wurde das Autosterilisationsprogramm ausgeführt. Vorbereitend wurde der Schüttelantrieb

ausgebaut. Während der automatischen Sterilisation wurde der Inkubator für 25 Stunden auf 90 °C aufgeheizt. Zur Gewährleistung einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre wurde ein Gefäß mit 350 ml vollentsalztem Wasser in den Brutschrank gestellt. Im Anschluss an das Autosterilisationsprogramm wurde der Inkubator mit Bacillol ausgewischt und der Schüttelantrieb, nach vorheriger Säuberung mit Bacillol, wie vorgeschrieben im gereinigten CO₂-Inkubator installiert. Nach Einbau des Schüttelantriebs erfolgte eine erneute Reinigung des Innenraums mit einem Flächendesinfektionsmittel. Vor Wiederverwendung des Inkubators wurde auf das vollständige Ausdampfen der Desinfektionsmittelrückstände geachtet.

4.2.2 Kryokonservation von eukaryotischen Zellen

Werden Zellen außerhalb des Körpers (in-vitro) kultiviert sind diese nicht unbegrenzt teilungsfähig. Besteht das Ziel, einen Zellklon über lange Zeit zu erhalten, ist es möglich, Zellen durch Kryokonservation, zum Beispiel in flüssigem Stickstoff, zu lagern.

Bei einer Temperatur unterhalb von -150 °C kommt der Zellstoffwechsel nahezu zum Erliegen, sodass bei diesen Temperaturen kein Zellwachstum zu verzeichnen ist. Um die Zellen möglichst unbeschadet einzufrieren und eine intrazelluläre Eiskristallbildung zu minimieren, ist es notwendig, ein Gefrierschutzmittel dem Einfriermedium zuzufügen und eine konstante Einfriergeschwindigkeit von 1 °C/min einzuhalten^{103,104}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von den verwendeten Zelllinien eine Arbeitszellbank mit insgesamt 10-15 Kryovials angelegt. Zur Vorbereitung der Kryokonservierung, wurde ein auf Raumtemperatur temperierter Einfrierbehälter (siehe Tabelle 3), sowie die beschrifteten Kryovials, bereitgelegt. Des Weiteren wurden 10 ml steriles Einfriermedium (siehe Tabelle 6) auf Eis gestellt und die Tischzentrifuge auf 4 °C vorgekühlt. Im Anschluss wurde die VCD, der sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Kultur, bestimmt und das benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ungefähr 6×10^7 Zellen/ml eingefroren. In der Literatur wird eine Einfrierzelldichte von 1×10^7 Zellen/ml empfohlen⁴, die Erfahrungen aus dem Labor zeigten jedoch, dass diese deutlich erhöhte Einfrierzelldichte zu einem besseren Ergebnis nach dem Auftauen der Zellen führt. Das berechnete Suspensionsvolumen wurde in 50 ml

Falcon-Röhrchen überführt und bei 148 x g für 5 min zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und die Zellpellets mit dem eiskalten Einfriermedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension auf die Kryovials verteilt und diese in den Einfrierbehälter gestellt. Der Einfrierbehälter wurde für 24 h bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Kryovials der Einfrierbox entnommen und in der flüssigen Phase, beziehungsweise der Gasphase von flüssigem Stickstoff, bei -196 °C bis -155 °C umgelagert¹⁰⁵.

4.2.3 Auftauen eukaryotischer Zellen

Das bei der Kryokonservation eingesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) weist bei Raumtemperatur eine zytotoxische Wirkung auf^{106–108}. Aus diesem Grund ist beim Auftauen der Zellen auf eine zügige Arbeitsweise zu achten.

Als Vorbereitung wurden 10 ml Kultivierungsmedium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Ein steriler Schüttelkolben wurde mit dem notwendigen Volumen von Kultivierungsmedium beimpft und zur Voreinstellung der Kulturbedingungen in den Schüttelbrutschrank gestellt. Anschließend wurde das Kryovial aus dem Stickstofftank entnommen und solange im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis ein kleiner Eiskristall zu erkennen war. Das Kryovial und das vorbereitete 15 ml Falcon-Röhrchen mit dem Kultivierungsmedium wurden zeitgleich aus dem Wasserbad herausgenommen, äußerlich desinfiziert. Danach wurden die Zellen unter der Sterilwerkbank vom Kryovial in das temperierte Medium überführt. Durch das Überführen der Zellsuspension aus dem Kryovial in die 10 ml des vorgewärmten Mediums konnte die DMSO-Konzentration von 5 % - 7,5% auf 0,83% - 1,5% gesenkt werden. Um das DMSO weitestgehend zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 148 x g für 5 min zentrifugiert und der Zellkulturüberstand verworfen. Das Resuspendieren des Zellpellets erfolgte mit 10 ml konditioniertem Medium aus dem zuvor vorbereiteten Schüttelkolben. Die VCD wurde nach dem Auftauen der Zellen auf 1 - 2,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt.

4.2.4 Ungeregeltes Kultivieren suspensionsadaptierter Zellen

Die suspensionsadaptierten Zellen wurden während dieser Arbeit in unregelmäßigem Erlenmeyerkolben und geregelten Rührkesselbioreaktoren kultiviert.

Innerhalb des unregulierten Systems erfolgte die Kultivierung der Zellen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre, bei einem CO₂-Gehalt von 5 Vol.%. Die Temperatur aller Vorkulturen betrug 37 °C. Um eine ausreichende Durchmischung und einen guten Gasaustausch zu gewährleisten, wurden die Erlenmeyerkolben bei 165 rpm (50 mm Hub) bewegt.

4.2.5 Subkultivieren suspensionsadaptierter Zellen

Besteht das Ziel, Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten, müssen diese in regelmäßigen Abständen verdünnt werden. Durch das Verdünnen der Zellkonzentration und die Zugabe von frischem Medium wird zum einen die Inhibierung des Wachstums durch die Zellen selbst (Kontaktinhibierung) oder ihre Stoffwechselprodukte unterbunden und zum anderen eine ausreichende Nährstoffzufuhr gewährleistet. Zum Erhalt eines optimalen Wachstumsverhaltens sollte die Subkultivierung, wie die Verdünnung der Zellkonzentration auch genannt wird, in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen erfolgen.

In der hier durchgeführten Arbeit wurden die Zellen zwei Mal innerhalb einer Woche subkultiviert. Hierfür wurde die entsprechende Kultur zunächst auf zellmorphologische Auffälligkeiten und mögliche Kontaminationen makro- und mikroskopisch untersucht. Aus einer möglichst homogenen Probe wurde im Anschluss die Gesamt- und Lebendzellzahl sowie die Vitalität der Zellen bestimmt (siehe Absatz: 4.3.1). Das zum Erreichen der gewünschten Einsaatdichte (SD := seed density) notwendige Kulturvolumen, wurde aus der Lebendzellzahl (VCD := viable cell density) des aktuellen Kulturansatzes bestimmt. Das berechnete Volumen wurde in eine serologische Pipette aufgenommen, vorgehalten und nach dem Abgießen der überschüssigen Zellsuspension in den leeren Erlenmeyerkolben zurückgeführt. Im Anschluss wurde der Kolben mit frischem, auf 37 °C vortemperiertem Medium bis zum Erreichen des gewünschten Endvolumens aufgefüllt. Mit Ausnahme der Vorkulturen für die Reaktorversuche, erfolgten die Kultivierung der Zellen in 125 ml Einweg-Erlenmeyerkolben mit einem initialen Kulturvolumen von 25 ml. Die SD wurde bei den verwendeten Zellen auf $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt.

Zur verbesserten Adaption der Zellen an die Kulturbedingungen erfolgte die erste Subkultivierung nach dem Auftauen der Zellen mit konditioniertem Medium. Hierfür

wurde das nicht benötigte Volumen der Zellsuspension in ein steriles 50 ml Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 148 x g zentrifugiert. Nachfolgend wurden dem frischen Medium 15 % des Überstandes zugefügt und in den Erlenmeyerkolben gegeben. Durch die Zugabe des konditionierten Mediums und den darin enthaltenen zellspezifischen Wachstumsfaktoren konnte die Zeitspanne zwischen dem Auftauen und dem ersten Reaktorlauf im Schnitt um fünf Tage verkürzt werden.

4.2.6 Kultivierung im Bioreaktor

Für die Kultivierung der Zellen im Bioreaktor wurde eine bestehende, für Mikroorganismen ausgelegte Reaktoranlage von Sartorius, an die Bedürfnisse eukaryotischer Zellen angepasst. Die Reaktoranlage vom Typ Biostat B besteht aus vier Reaktoren mit zwei getrennt voneinander arbeitenden Versorgungseinheiten. Das auf einem zentralen Rechner installierte Prozessüberwachungssystem BioPAT MFCS DA diente zum einen der Datenaufzeichnung aller Prozessgrößen und zum anderen als Schnittstelle für den selbstentwickelten Regler. Für die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurde eine selbst geschriebene CO₂-basierte pH-Regelung implementiert, die es ermöglichte, den pH-Wert zu Beginn der Kultur relativ konstant auf einen Wert von 7,2 zu halten. Im zeitlichen Verlauf der Kultur sank der pH-Wert, aufgrund der Akkumulation typischer Metaboliten und der freigesetzten DNA nekrotischer Zellen, auf einen Wert von 6,4 - 6,7. Auf ein Gegentitrieren mit Base wurde verzichtet. Die Kalibration der pH-Elektrode erfolgte vor dem Autoklavieren des Reaktors. Nach dem Autoklavieren und nach den Vorkulturläufen, welche 4-6 Tage in Anspruch nahmen, wurde die pH-Elektrode rekaliibriert. Im Gegensatz zu Reaktoren, die für eine Kultivierung eukaryotischer Zellen ausgelegt sind, besteht bei der verwendeten Anlage, nicht die Möglichkeit Stickstoff und Sauerstoff oder Luft mithilfe einer Gasmischstation exakt zu dosieren und somit einen konstanten Gehalt an Gelöstsauerstoff (DO-Gehalt, dissolved oxygen) im Medium zu generieren. Ein Sauerstoffgehalt über 40 % Luftsättigung kann eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum und die Produktbildung von Zellen ausüben¹⁰⁹. Aus diesem Grund wurde eine Festbegasung für den Kopfraum mit einer Mischung aus Luft und Stickstoff eingerichtet und der DO-Gehalt zu Beginn der Kultivierungen begrenzt. Der Gehalt an Gelöstsauerstoff wurde über den gesamten Zeitraum der Kultivierungen auf einen Wert zwischen 40 % - 55 % eingestellt. Die Kalibration der

DO-Elektrode erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und bei 100 % Stickstoff-respektive Luftsättigung. Clark-Elektroden, wie sie unter anderem in diesem Aufbau Verwendung fanden, zeigen nach einer längeren Laufzeit ein Driftverhalten. Dieses wurde nach jedem zweiten Reaktorlauf überprüft. Zeigte sich ein stärkeres Driften des SONDENSIGNALS, wurde die sauerstoffpermeable Membran auf Defekte geprüft, ein Elektrolytwechsel durchgeführt und gegebenenfalls die Kathode poliert.

Um die in der Druckluft enthaltenen Öle des Kompressors zu entfernen, wurden zwei Tiefenfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm in die zuführenden Druckluftleitungen der Versorgungsstationen eingebaut. Bei der Kultivierung der CHO-DP12 Zelle, erfolgte die Durchmischung anders, als bei Standarührkesselreaktoren für tierische Zellkultur üblich. Dabei wurden zwei im Abstand von 1 cm, angeordneten Rushton Turbinen mit einer Drehzahl von 150 min⁻¹ verwendet. Um eine möglichst gute Durchmischung zu garantieren, wurden die Rührer um 90° versetzt eingebaut, sodass die Rührblätter der beiden Rührer nicht direkt übereinanderstanden. Rushton Turbinen erzeugen hohe Scherkräfte und werden vorwiegend in der Mikrobiologie eingesetzt, um durch die radiale Strömung zusammen mit verhältnismäßig hohen Drehzahlen, einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu erwirken^{110,111}. In der Zellkultur liegt das Hauptaugenmerk auf einer zellschonenden Homogenisierung. Aus diesem Grund werden in der Zellkultur in der Regel Schrägblattrührer eingesetzt, die hauptsächlich eine axiale Strömung mit radialem Anteil erzeugen^{112,113}. Bei der Kultivierung des scherkraftempfindlicheren rCHO C6000 Subklons KL-DPO erfolgte die Durchmischung mithilfe eines Schrägblattrührers. Während der Kultivierung dieses Zellklons konnte zudem eine erhöhte Schaumbildung beobachtet werden. Die Schaumbekämpfung erfolgte, unter Zuhilfenahme einer Rushton Turbine und eines, auf die Blätter des Rührers aufgesteckten Silikonschlauches, 2 cm oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche, mechanisch ohne Zugabe eines Antischaummittels.

Die Temperaturregelung wurde im Allgemeinen durch die Versorgungseinheit und den im Prozessleitsystem der Biostat B Anlage implementierten PID Temperaturregler realisiert. Aufgrund des nicht autoklavierbaren Temperatursensors wurde selbiger nach dem Autoklavieren in ein zuvor installiertes Tauchrohr eingebaut.

Um einen guten Wärmeaustausch vom Reaktorinneren über die Wand des Tauchrohres bis zur Temperatursonde zu gewährleisten, wurde das Tauchrohr, vor der Installation der Sonde, mit Wasser gefüllt. Zusätzlich wurde, zur Vermeidung zellschädigender Temperaturen an der Reaktorinnenwand, der Reglerausgang der Temperaturregelung auf 27 % - 28 % (maximale Temperatur im Doppelmantel 40,5°C - 42°C) begrenzt.

Mit dem Ziel möglichst gleiche Bedingungen in den Reaktoren zu generieren, wurden die Reaktoren, die beidseits über eine Versorgungseinheit gesteuert wurden, spiegelbildlich aufgebaut. Durch diese Anordnung wurde sichergestellt, dass beispielsweise das Temperaturprofil, welches unter anderem durch die Ein- und Ausstromöffnungen der Doppelmantelkühlung bestimmt wird und die Strömungen innerhalb der vier Reaktoren möglichst identisch sind.

Medium fill in

Das Befüllen der Reaktoren mit Medium erfolgte unter der sterilen Sicherheitswerkbank.

Im ersten Schritt wurde ein zusätzlich autoklavierter Schlauch mit Luer-Lock-Anschluss in der Inokulationslinie installiert. Nachfolgend wurde das zum Schutz der Elektroden während des Autoklavierprozesses enthaltene Wasser unter Zuhilfenahme einer Peristaltikpumpe entnommen. Das Befüllen der Reaktoren erfolgte mit dem zuvor zum Entleeren des Reaktors verwendeten Schlauch. Dessen offenes Ende wurde nach der äußeren Reinigung mit 70 %- tigem Ethanol in die Medienflasche gehalten und das Grundmedium in die Reaktoren gepumpt. Das exakte Dosieren des Volumens erfolgte unter Zuhilfenahme einer Waage. Dem Medium wurden bei diesem Vorgang keine Supplemente zugegeben.

Inokulation der Bioreaktoren

Zur Vorbereitung der Inokulation wurden zunächst alle Supplemente vorbereitet. Diese wurden für das Gesamtvolumen aller verwendeten Reaktoren berechnet und die erforderlichen Volumina in einem sterilen Gefäß vermischt. Nach dem Sterilfiltrieren wurden die Supplemente auf die der Reaktoranzahl entsprechenden

Anzahl der 50 ml Spritzen mit Luer-Lock-Anschluss verteilt. Hierfür wurde der Stempel entnommen, die Spritze mit einem in 70 % Ethanol gelagerten Verschluss verschlossen und das entsprechende Volumen eingefüllt. Für das Einsetzen des Stempels wurde der Luer-Lock-Verschluss so weit geöffnet, dass die darin enthaltene Luft entweichen konnte.

Für die Inokulation der Reaktoren mit Zellen wurde die Zellzahl der Vorkultur bestimmt und das zum Erreichen der gewünschten Initialzellzahl benötigte Volumen in 50 ml Falcontubes überführt. Nach dem Zentrifugieren ($148 \times g$, 5 min), wurde der Überstand entnommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Pro Reaktor wurde ein Volumen von 9 ml des frischen Mediums verwendet. Analog zur Zugabe der Supplemente wurden die notwendigen 10 ml Spritzen vorbereitet, die Zellsuspension gleichmäßig aufgeteilt und der Spritzenstempel eingesetzt. Der Transport der vorbereiteten Spritzen in das benachbarte Gebäude erfolgte möglichst zügig.

Vor dem Inokulieren der Reaktoren wurden die Supplemente in den Reaktor überführt. Das Anschließen der Spritzen erfolgte nach der Reinigung der Verschlüsse unter einem mit 70 %-tigem Ethanol getränkten Tuch. Die Zugabe der Zellsuspension verlief analog. In einem letzten Schritt wurden die Schläuche durch die Beigabe steriler Luft über einen angeschlossenen Sterilfilter geleert und das darin enthaltene Restvolumen der Zellsuspension ins Reaktorinnere überführt.

Starten der simulierten Produktion

In einigen Fällen wurde den Prozessen eine simulierte Produktion nachgeschaltet. Dies erfolgte im Repeated-Batch Verfahren. Vorbereitend wurde unter der Sterilwerkbank eine, mit einem Tauchrohr und einem Sterilfilter versehene 500 ml Flasche mit frischem Medium gefüllt und für 30 min vorgewärmt. Nachfolgend wurde der Reaktorinhalt der Seed-Kultur in eine angeschlossene 500 ml Gefäß überführt. Dies erfolgte durch Ausnutzen des, bei tiefgestellter Ernteflasche auftretenden hydrostatischen Druckes. Die vorbereitete Flasche mit dem frischen Medium wurde mithilfe eines Luer-Lock-Verschlusses in die Inokulationslinie eingebaut. Nach Leerung des vollständigen Reaktorinhaltes wurde das frische Medium, ebenfalls durch Ausnutzen des hydrostatischen Druckes, dem Reaktor zugeführt. Die Zugabe der Zellsuspension erfolgte nach dem Einstellen aller Prozessparameter. Eine

möglichst exakte Dosierung des Volumens, konnte durch die Zugabe der entsprechenden Menge Luft über den Sterilfilter in die Ernteflasche erreicht werden. Die steril induzierte Luft verdrängte durch den entstehenden Druck das überschüssige Suspensionsvolumen, welches durch das angeschlossene Tauchrohr in den drucklosen Reaktor abfließen konnte. Nach einem vollständigen Druckabbau kam der Flüssigkeitsfluss zum Erliegen.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Analytik der Zellkonzentration und Viabilität mit Trypanblau

Die Offline Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellkonzentration, sowie der Vitalität der Zellen, erfolgte, auf Grundlage selektiven Trypanblau Färbungen, manuell, mit Hilfe eines Häemocytometers (Neubauer-Zählkammer), und automatisch, mit einem ViCell^{HT} XR. Trypanblau (3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4hydroxy-2,7-disulfonaphtyl-3-azo) - [1,1'-biphenyl]) ist ein polyanionischer Diazofarbstoff, der aufgrund seiner Größe von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen wird. In Zellen mit perforierter Zellmembran diffundiert Trypanblau hinein und färbt dort zytosolische Proteine ein und lässt diese Zellen unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen^{114,115}.

Manuelle Analytik der Zellkonzentration und Vitalitätsbestimmung

Für die manuelle Bestimmung der Zellkonzentration und der Vitalität wurde ein Hämozytometer, auch bekannt als Neubauer- Zählkammer verwendet.

Ein Hämozytometer besteht aus einem etwa 5 mm dicken Objektträger und einem Deckglas. In der Mitte des Objektträgers befindet sich eine Zählfläche mit je vier Großquadranten, welche innerhalb der Abbildung 8 B mit L gekennzeichnet sind.

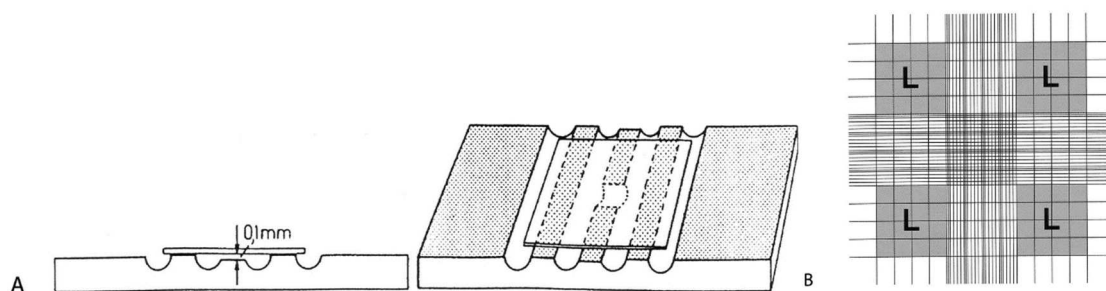


Abbildung 8: Schemata einer Neubauerzählkammer ¹¹⁶

Das Deckgläschen wird vor der Messung auf die leicht angefeuchteten, seitlich neben der Zählfläche befindlichen, plangeschliffenen Auflagestege aufgelegt. Durch die um 0,1 mm gegenüber der Zählkammer erhöhten Auflageflächen formt sich im Bereich der Zählfläche eine Kammer mit einem definierten Volumen von 0,1 µl. Um ein reproduzierbares Kammervolumen zu erreichen, wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass sich an der Auflagefläche des Deckgläschens Newtonsche Ringe bildeten.

Vor der Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit einer 0,4 %-tigen Trypanblaulösung gemischt. Anschließend wurde, die gefärbte Zellsuspension bei aufgelegtem Deckgläschen, an den Rand des Deckgläschens pipettiert. Die Suspension saugte sich durch die entstehenden Kapillarkräfte in die Zählkammer. Anschließend wurde die Zellkonzentration mithilfe des Durchlichtmikroskops und Gleichung (4-1) bestimmt.

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\emptyset \text{ Zellen pro Quadrant} [\text{Zellen}]}{\text{Kammervolumen} [\text{ml}]} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (4-1)$$

Automatische Analytik der Zellkonzentration und Vitalität

Die automatische Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit einem Vi-Cell™ XR von Beckmann Coulter. Während sich die manuelle Zählung bei einer großen Probenzahl sehr zeitaufwendig gestaltet und die Reproduzierbarkeit der Messung vom Anwender abhängig ist, kann mithilfe einer automatischen Zellzählung der Probendurchsatz erhöht und die Fehlerrate gesenkt werden.

Bei dem hier verwendeten System handelt es sich um eine Automatisierung der manuellen Zählung mit dem Hämozytometer. Für die Messung wurden 1000 µl Zellsuspension in gerätespezifische Probengefäße pipettiert und in den Probensamplern gestellt. Das minimale Probenvolumen für eine Messung lag, bei der verwendeten Gerätekonfiguration, bei 500 µl Zellsuspension. Wie bei der manuellen Zählung wurde die Zellsuspension automatisch in einem Verhältnis von 1:1 mit einer Trypanblaulösung gemischt und nachfolgend ein Teil der Probe in eine Durchflussszelle injiziert. Das mit einem integrierten CCD-Sensor gemachte Bild der Zellen in der Durchflussszelle, wurde durch ein Bildverarbeitungsprogramm, mit Zellklon spezifischen Erkennungsalgorithmus, ausgewertet und lieferte nicht nur die Gesamt- und Lebendzellzahl, und die Vitalität der Probe, sondern auch

Informationen zur Größenverteilung und Rundheit der Zellen. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde die Durchflusszelle 50-mal pro Probe mit der gefärbten Zellsuspension gefüllt und der arithmetische Mittelwert der Einzelergebnisse berechnet.

Der Messbereich des Gerätes lag bei 5×10^5 Zellen/ml bis 1×10^7 Zellen/ml. Gegebenenfalls wurden die Proben mit PBS-Puffer soweit verdünnt, dass der Messbereich des Gerätes erreicht wurde¹¹⁷.

4.3.2 Online Bestimmung der Lebendzellzahl – Impedanzspektroskopie

Eine hochfrequente Inprozesskontrolle der Lebendzellzahl wurde durch den Einsatz einer inline-Biomassesonde (Incyte; Hamilton) erreicht. Wird die Regelgröße mit einer hohen Messfrequenz analysiert, können in der Echtzeitregelung große Änderungen der Stellgröße vermieden werden.

Bei der eingesetzten Incyte-Sonde (Hamilton) erfolgt die Bestimmung der Lebendzellzahl indirekt durch die Messung der Leitfähigkeit und Permittivität der Biomasse. Die elektrische Leitfähigkeit σ ist eine Proportionalitätskonstante zwischen der Stromdichte $\vec{j}$ und der elektrischen Feldstärke $\vec{E}$.

$$\vec{j} = \sigma \cdot \vec{E} \quad (4-2)$$

Sie gilt als Maß für die Leitung geladener Teilchen durch ein Medium. Je höher die Leitfähigkeit eines Mediums ist, desto mehr geladene Teilchen werden aufgrund der Triebkräfte eines elektrischen Feldes senkrecht durch eine Querschnittsfläche bewegt. Wird eine konstante Spannung an ein leitendes Material angelegt, ist der resultierende Stromfluss von der Geometrie des Messaufbaus und dem Material abhängig^{118,119}.

Da die Leitfähigkeit nur indirekt gemessen werden kann, ist der oben beschriebene Zusammenhang für den messtechnischen Aufbau essenziell¹²⁰. Bei der hier verwendeten Incyte-Sonde handelt es sich um eine Form des offenen Messsystems, innerhalb dessen die Elektroden, mit bekannter Geometrie, wie in Abbildung 9 dargestellt, auf beiden Seiten eines nichtleitenden Materials verlaufen.

Bei Anlegen einer Spannung bildet sich ein kugelförmiges elektrisches Feld um die Messsonde aus, sodass ein geometrisch definierter Messraum um die Sonde

entsteht. Im Gegensatz zur Elektronenleitung im Leiterband der Elektrode ist der elektrische Strom innerhalb des Messraums an einen atomaren Ladungstransport in Form einer Ionenleitung gebunden und wird von einem dielektrischen Widerstand vermindert.

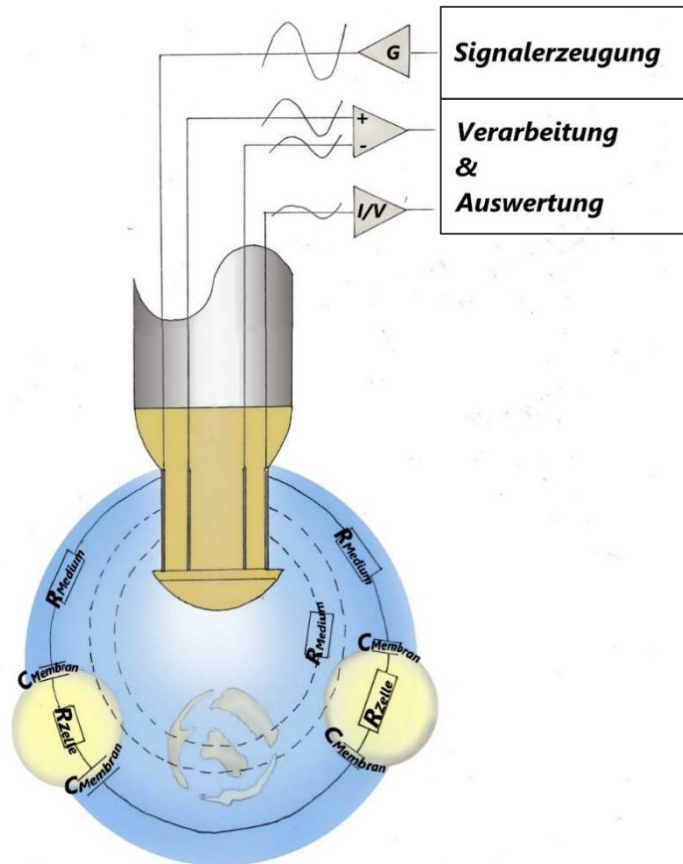


Abbildung 9: Prinzip der Incyte-Sonde; R_{Medium} := elektrischer Widerstand des Mediums, R_{Zelle} := elektrischer Widerstand der Zelle, C_{Membran} := elektrische Kapazität der Zellmembran, I := elektrische Stromstärke, V := elektrische Spannung (eigene Abbildung)

Der resultierende elektrische Gesamtwiderstand R ist umgekehrt proportional zur elektrischen Leitfähigkeit σ und gemäß Gleichung (4-3) von der Geometrie des Messraums abhängig¹²¹.

$$R = \frac{l}{\sigma \cdot A} \quad (4-3)$$

Da sich die Leitfähigkeit, gemäß der physikalischen Beziehung aus Gleichung (4-3) durch die Messung des elektrischen Widerstandes bestimmen lässt, ist es prinzipiell denkbar, diese, unter Zuhilfenahme zweier Elektroden, festzustellen. Können Anschluss- und Leitungswiderstände die Messung signifikant verfälschen, ist es möglich, sowohl die Leitfähigkeit, als auch die Permittivität mithilfe einer

Vierleitermessung zu ermittelt. Innerhalb dieses Aufbaus fließt durch zwei Leiter, sowie die Messlösung, ein bekannter elektrischer Strom. Die über die Messlösung abfallende Spannung wird hochohmig über zwei weitere Elektroden abgegriffen und gemessen. Durch das Ohmsche Gesetz kann im Anschluss der Widerstand ermittelt werden. Der elektrische Widerstand R ist der Kehrwert des Leitwertes G . Sind die geometrischen Abmessungen des Systems bekannt, kann aus dem Leitwert die Leitfähigkeit σ berechnet werden¹²².

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} = \sigma \cdot \frac{A}{l} \quad (4-4)$$

Für die Analyse der Lebendzellzahl spielt jedoch vor allem die dielektrische Leitfähigkeit (Permittivität) eine entscheidende Rolle.

Die Permittivität gilt als Kennzahl für die Durchlässigkeit eines elektrischen Wechselfeldes durch ein Dielektrikum und ist, ebenso wie die Leitfähigkeit, eine materialabhängige Konstante. Analog zur Leitfähigkeit (Gleichung 4-2) stellt die dielektrische Leitfähigkeit ε im Falle zeitlicher Konstanz gemäß Gleichung (4-5), eine Proportionalitätskonstante zwischen der elektrischen Flussdichte $\vec{D}$ und dem elektrischen Feld $\vec{E}$ dar¹²³.

$$\vec{D} = \varepsilon \cdot \vec{E} \quad (4-5)$$

Die absolute Permittivität ε berechnet sich aus dem Produkt der Permittivität des Vakuums ε_0 und der frequenz- und materialabhängigen relativen Permittivität ε_r , gemäß Gleichung (4-6).

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \quad (4-6)$$

Werden Zellen einem elektrischen Wechselfeld ausgesetzt, kann die in Abbildung 10 dargestellte, frequenzabhängige und stufenweise Reduktion der relativen Permittivität beobachtet werden. Die typischen Relaxationen im Frequenzspektrum resultieren aus unterschiedlichen Reaktionen der Ionen, geladenen Teilchen und Zellkomponenten des Mediums und der Zellen. Zur Bestimmung des Biomassezuwachses ist vor allem der mittlere Frequenzbereich, die sogenannte β -Dispersion, mit Frequenzen von 100 kHz bis 10 MHz von Interesse.

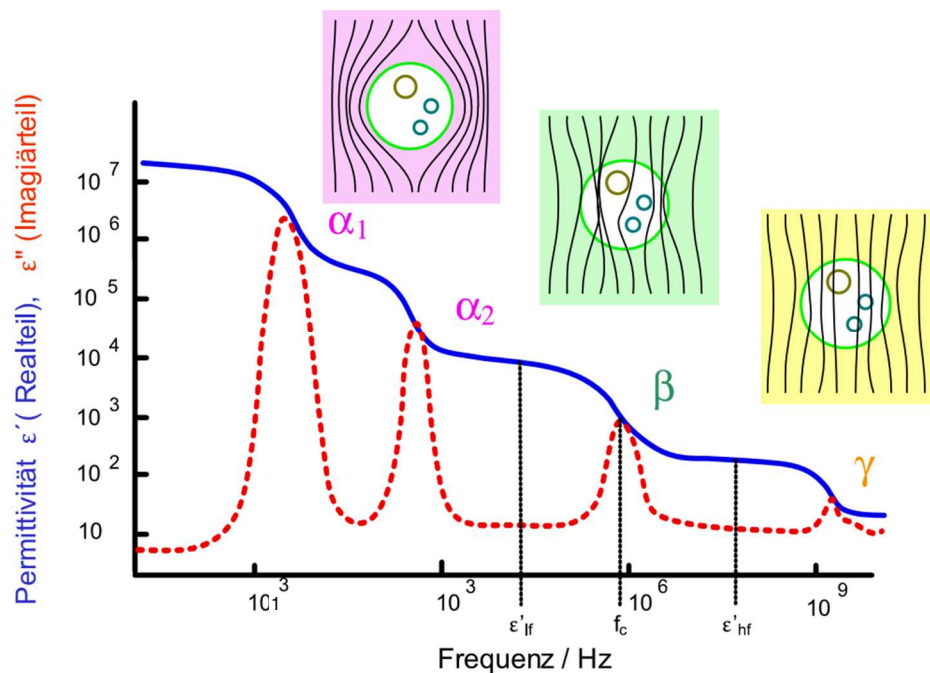


Abbildung 10: Darstellung der frequenzabhängigen Permittivität biologischer Objekte¹²⁴

Werden Zellen einem elektrischen Wechselfeld im unteren Frequenzbereich von etwa 0,1 MHz, ausgesetzt, orientieren sich die gelösten Ladungsträger des Mediums und des Zellinneren, mit einer gewissen Reaktionszeit τ , entsprechend der Polarität des elektrischen Feldes. Die Doppellipidschicht der Zellmembran stellt hierbei, aufgrund der nichtleitenden Eigenschaften einen Widerstand für die Ladungsträger dar, so dass sich diese entlang der Membran anordnen. Als Resultat dieser sogenannten Polarisation, bildet sich über die wenige Nanometer Dicke Zellmembran eine spezifische Kapazität aus. Die sich ausbildende Gesamtkapazität ist dabei im Wesentlichen von den Eigenschaften des Dielektrikums und somit im Falle der Zellsuspension, von den komplexen Permittivitäten der Zellmembran ϵ_m^* , des Zytoplasmas ϵ_i^* und des umgebenen Mediums ϵ_a^* , sowie dem Volumenanteil der Zellen P im Messraum abhängig¹²⁵.

Bei Erhöhung der Frequenz des von außen angelegten Feldes können die Ladungsträger, die verhältnismäßig großen Dipols, innerhalb der Zelle nicht mehr folgen, sodass die messbare relative Permittivität stetig sinkt. Im hohen Frequenzbereich, bei tierischen Zellen in etwa ab einer Frequenz größer 10MHz, können die Ladungsträger innerhalb der Zelle dem äußeren Feld nicht mehr folgen, sodass die Zelle quasi kurzgeschlossen wird und keinen nennenswerten Einfluss auf das elektrische Wechselfeld ausübt. Die daraus resultierende relative

Permittivität bei hohen Frequenzen ist somit nicht mehr von den Zellen, sondern ausschließlich vom umgebenden Medium abhängig.

Die beschriebene zeitverzögerte Reaktion der Zellen auf die Änderung des elektrischen Wechselfeldes, wird dabei als Relaxation bezeichnet. Kann, wie im Falle der Zellkultur, vereinfacht von einem gleichen aber unabhängigen Verhalten der einzelnen Dipole ausgegangen werden, wird dieses auch als Debye-Relaxation benannt. Unter den Annahmen einer vernachlässigbaren Leitfähigkeit der Zellmembran und einer, im Verhältnis zum Zellradius deutlich reduzierten Membrandicke, kann somit die komplexe Permittivität gemäß Gleichung (4-7) beschrieben werden.

$$\varepsilon^* = \varepsilon_h + \frac{\varepsilon_n - \varepsilon_h}{1 + j\omega\tau} + \frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0} \quad (4-7)$$

Innerhalb dieser Gleichung stellen die Terme ε_n und ε_h den realen Anteil der Permittivität bei einer niedrigen (ε_n) beziehungsweise hohen (ε_h) Frequenz ω dar. Das frequenzabhängige Verhalten des Real- und Imaginärteils kann Abbildung 10 entnommen werden. Durch die konjugierte-komplexe Erweiterung des Nenners aus Gleichung (4-7) ergibt sich der, in Gleichung (4-8) dargestellte, frequenzabhängige Realteil der Permittivität $\varepsilon(\omega)$.

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_h + \frac{\varepsilon_n - \varepsilon_h}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \quad (4-8)$$

Aufgrund des für die Permittivitätsmessung angelegten Wechselfeldes ist die Frequenzabhängigkeit der Leitfähigkeit ebenfalls zu beachten. Diese lässt sich wie folgt beschreiben:

$$\sigma(\omega) = \sigma_n + (\sigma_h - \sigma_n) \cdot \frac{\omega^2 \cdot \tau^2}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \quad (4-9)$$

Ist im Rahmen des Kultivierungsprozesses ein Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen, erhöht sich der Volumenanteil der Zellen im Messraum. Wie Abbildung 11, durch die Variation der Plateauhöhen im niedrigen Frequenzbereich, entnommen werden kann, führt diese Zunahme des Zellvolumens P innerhalb des Messraums, im niedrigen Frequenzbereich, zu einer Erhöhung der relativen Permittivität der Gesamtlösung^{125–128}.

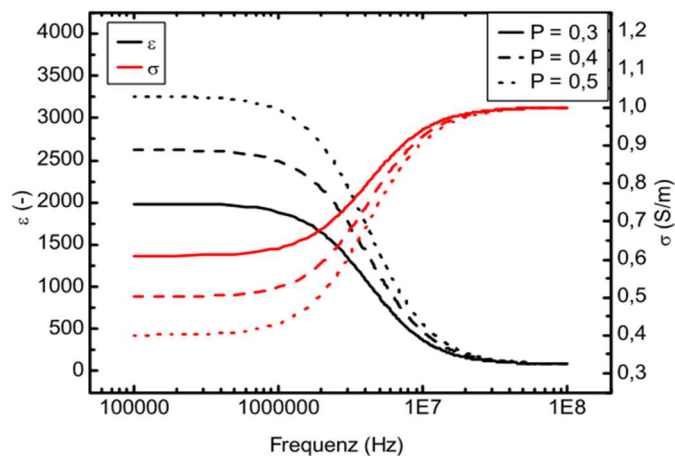


Abbildung 11: Relative Permittivität und Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Frequenz und dem Zellvolumen im Messraum ¹²⁵

Aus dem Verhältnis der ermittelten Permittivitäten bei niedrigen und hohen Frequenzen lässt sich, wie in Abbildung 11 zu sehen ist, auf den Volumenanteil der Zellen im Messraum und bei bekanntem Zellvolumen auf die Zellzahl oder Zellkonzentration in der Messlösung schließen.

Die in dieser Arbeit verwendete Incyte-Sonde bietet die Möglichkeit zweier verschiedenartiger Messmethoden. Wie in Abbildung 12 dargestellt, basiert die erste Methode auf der Messung der Permittivität bei zwei Frequenzen. Die Bestimmung des Volumenanteils der Zellen im Messraum erfolgt durch Integration der relativen Permittivität zwischen den festen Messfrequenzen f_{mes} und f_{high} .

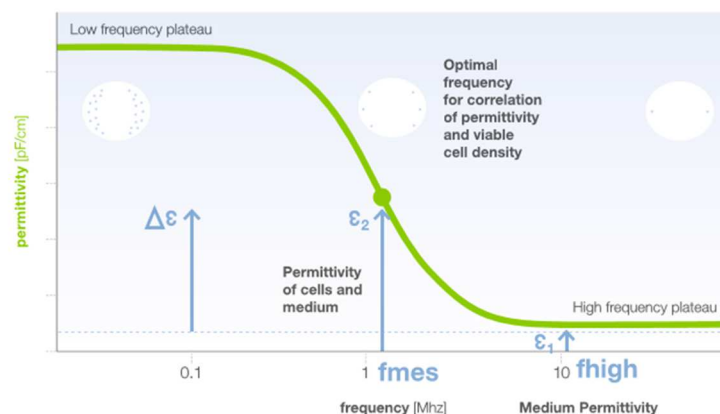


Abbildung 12: Bestimmung der Biomassekonzentration mithilfe zweier Frequenzen Incyte-Sonde ¹²⁹

Die Umrechnung der Permittivität kann, aufgrund des in weiten Teilen linearen Zusammenhangs der Permittivität und der Lebendzellkonzentration, unter

Zuhilfenahme des sogenannten Zellfaktors, gemäß Gleichung (4-10) erfolgen. Die Bestimmung des Zellfaktors ist in Abschnitt 5.2.1 dieser Arbeit beschrieben.

$$\text{Zellkonzentration} = (\text{Permittivität} - \text{Offset}) \cdot \text{Zellfaktor} \quad (4-10)$$

Innerhalb des zweiten möglichen Messmodus der Incyte-Sonde, dem sogenannten Frequenzscan, wird die Permittivität der Gesamtlösung, wie in Abbildung 13 dargestellt, bei 17 unterschiedlichen Frequenzen in einem Bereich von 0,3 - 10 MHz gemessen. Aus dem Verlauf des Frequenzspektrums über die Kultivierungsdauer lassen sich zusätzliche Informationen bezüglich der Zellphysiologie gewinnen. Aus der Höhe des Plateaus bei niedrigen Frequenzen lässt sich, wie bereits dargelegt, auf die Konzentration intakter Zellen schließen. Die charakteristische Frequenz F_c beschreibt den Wendepunkt im Kurvenverlauf der relativen Permittivität über der Frequenz, mithilfe dessen sich der mittlere Zelldurchmesser abschätzen lässt. Die Steigung α gibt Auskünfte über die Homogenität der Zellgrößenverteilung.

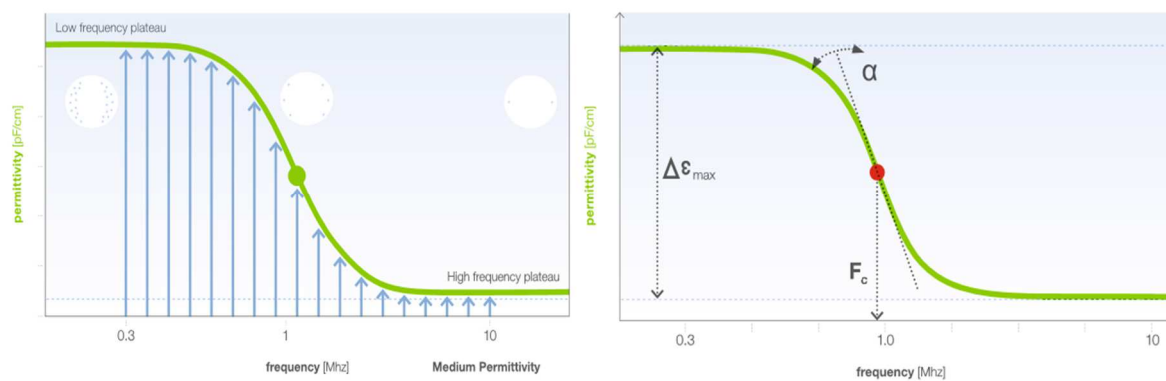


Abbildung 13: Prinzip des Frequenzscan und Zuordnung der ermittelten Größen ¹²⁹

Da Luftblasen, oder bewegte Oberflächen, wie etwa die Rührblätter des Rührers, die Messung signifikant beeinflussen könnten, wurde beim Einbau der Sonde auf deren genaue Positionierung geachtet und das vom Hersteller empfohlene freie Volumen von 3 cm³ eingehalten. Eine stufenlose Höheneinstellung wurde im Rahmen der Arbeit, durch den Einsatz des in Abbildung 14 abgebildeten hochschulintern gefertigten, verstellbaren Adapters erreicht.



Abbildung 14: Verstellbarer Adapter der Biomassesonde in Form einer explosionszeichnungsähnlichen Fotografie und als CDA-Bauteil in der geschlossenen Darstellung (eigene Abbildung)

4.3.3 Zellzyklusanalytik mittels Durchflusszytometrie

Werden Zellen unter Standardbedingungen kultiviert, liegt in Bezug auf den Zellzyklus eine Mischpopulation, mit einer heterogenen Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus vor^{130,131}. Zu welchen Anteilen sich die Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden wurde mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in Bezug auf die physikalischen und molekularen Eigenschaften in einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom. Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich neben der Größe und Granularität gesonderter Zellen, durch geeignete Fluoreszenzmarkierungen auch Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine nachweisen. Für die Analytik werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung durch einen orthogonal zum Probenfluss ausgerichteten, gebündelten monochromatischen Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge geleitet.

Die Intensität des in einem Winkel von 0,5° - 5° gegenüber dem Laser gestreuten Lichtes wird durch einen Photonendetektor erfasst und in das Forward Scatter (FSC)-Signal umgewandelt. Das FSC-Signal wird beispielsweise durch die Größe des detektierten Objektes bestimmt. Die Lichtstreuung in einem Winkel von 15° bis 150° zum Laserstrahl, das Side Scatter Signal (SSC) wird hingegen durch interne und externe Unregelmäßigkeiten des Objektes beeinflusst. Unter Zuhilfenahme der FCS- und SSC-Signale können demzufolge Informationen zu den physikalischen

Zelleigenschaften, beispielsweise der Granularität des Zytoplasmas, die Größe der Zellen und des Zellkerns gewonnen werden.

Wurden die Zellen oder Zellbestandteile zuvor durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, erfolgt die Anregung der Fluorophore in ein höheres Energieniveau. Nach Durchqueren des Laserstrahls folgt die Relaxation der angeregten Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge der Fluorophore und kann mittels Photodetektoren erfasst werden. Aufgrund der Proportionalität der Fluorophore und der entsprechenden Proteine oder Moleküle, an welche der betreffende Fluoreszenzfarbstoff gebunden wurde, erfolgt eine indirekte, quantitative Bestimmung der entsprechenden Komponenten. Eine geschickte Kombination verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht zudem, eine zeitgleiche Analytik mehrerer Moleküle oder Proteine. Voraussetzung ist in diesem Falle, dass die gewählten Fluorophore ein möglichst gleiches Absorptionsmaximum aufweisen, sich die Emissionsspektren jedoch deutlich voneinander unterscheiden^{132,133}.

Der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 15 dargestellt.

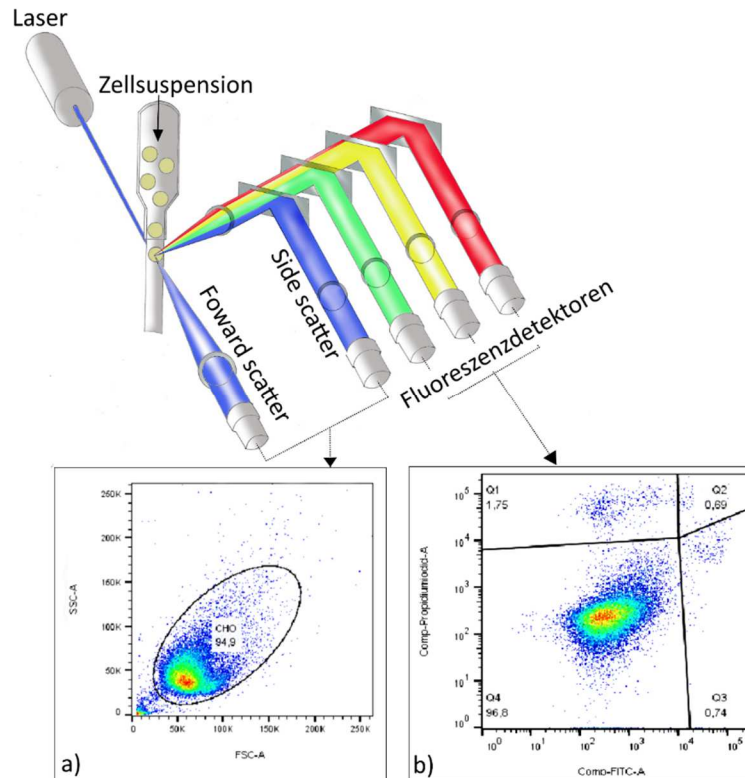


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers mit exemplarischen Ergebnissen eines Annexin V-FITC-Apoptoseassays; Q4:= vitale Zellen, Q3:= früh-apoptotische Zellen, Q2:= spät-apoptotische Zellen, Q1:= nekrotische Zellen, SSC:= Side Scatter Signal, FSC:= Forward Scatter Signal (eigene Abbildung in Anlehnung an ¹³⁴)

Die Analytik der prozentualen Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus erfolgte durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes der einzelnen Zellen¹³⁵.

Wie in Kapitel 3.1.2 dargestellt, halbiert sich der DNA-Gehalt einer Zelle am Ende der Mitose und wird nach dem Durchschreiten der G1-Phase in der S-Phase dupliziert. Am Ende der S-Phase hat sich die DNA einmal vollständig verdoppelt, sodass in der G2-Phase und während der M-Phase der höchste DNA-Gehalt zu verzeichnen ist. Durch die Quantifizierung des DNA-Gehalts kann demzufolge abgeschätzt werden, welcher Zellanteil sich in den G1/G0-Phase, der S-Phase oder der G2/M-Phasen befindet. Aufgrund des identischen Gehalts der DNA können die Zellen in der G1- und G0-Phase, sowie die Zellen der G2- und M-Phase nicht weiter unterschieden werden.

Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehaltes, und somit die Zellzyklus-Analytik unter Zuhilfenahme des FXCycle PI/RNase Staining Solution-Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff

Propidiumiodid (PI) interkaliert sequenzunabhängig in die Nukleinsäuren der Zellen. Aufgrund der unspezifischen Bindung des PI's an Nukleinsäuren, ist bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes darauf zu achten, dass die Ribonukleinsäuren der Zellen, beispielsweise durch die Zugabe des Enzyms Ribonuklease (RNase) abgebaut werden. Der verwendete Farbstoff kann aufgrund seiner molekularen Größe die intakte Zellmembran nicht passieren, sodass diese vor der Färbung, zum Beispiel durch eine geeignete Methode der Zellfixierung, permeabilisiert werden muss.

Probenvorbereitung - Ethanolfixierung:

Nach der Probenahme und der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 4×10^6 Zellen in ein 1,5 ml überführt und in einer, auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge mit $3000 \times g$, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Phosphat gepufferter Saline (PBS) resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung des zuvor beschriebenen Waschschriffs wurden 500 µl der Zellsuspension (entspricht 2×10^6 Zellen) entnommen und unter Vortexen tropfenweise in - 20°C kalte 70 %-tige Ethanollösung pipettiert. Die Ethanollösung mit den Zellen wurde für mindestens 1 Stunde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Assay-Durchführung:

Vor dem Färben der Zellen wurde das zum Fixieren der Zellen eingesetzte Ethanol durch einen Waschschriff entfernt. Abweichend von den Herstellerangaben, wurden die fixierten Zellen bei $17.500 \times g$ für 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entnommen und die Zellen in 500 µL FxCycle-Staining Solution resuspendiert und durch Vortexen bestmöglich gemischt. Im Anschluss wurden die Proben lichtgeschützt, bei Raumtemperatur zur weiteren Analyse in das Labor der zentralen Serviceeinrichtung FlowCore, der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg transportiert. Die Transportzeit entsprach der vom Hersteller empfohlenen Inkubationszeit des Farbstoffes.

Analyse und Auswertung:

Vor der flowzytometrischen Analyse wurden die Proben erneut durch Vortexen gemischt. Die Messung wurde mit einer Extinktionswellenlänge von 585 nm durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei einer Emissionwellenlänge von 617 nm. Für die Auswertung wurde die Software FlowJo 10.6.1 verwendet.

Wie zuvor beschrieben beruht der Zellzyklus-Assay auf der Analyse des DNA-Gehaltes einer Zelle. Aneinanderhaftende Zellen, sogenannte Doubletten, können, aufgrund des doppelten DNA-Gehalts fälschlicherweise der G2/M-Einzelzellen zugeordnet werden^{136,137}. Die Identifikation und der Ausschluss der Doubletten erfolgte auf Grundlage des Größenunterschiedes von Doppel- und Einzelzellen der G2/M-Phase und der dadurch bedingten längeren Verweilzeit der Doubletten im Laserstrahl. Die Messdauer, die eine Zelle zum Durchqueren des Laserstrahls benötigt, kann durch das Auftragen des FSC-W Signal gegen das FSC-A Signal, wie aus Abbildung 15 ersichtlich wird, ermittelt werden. Im Weiteren erfolgte der Ausschluss von Zelltrümmern und sonstiger kleiner Partikel durch Auswahl der beiden typischen Peaks der Zellen in der G1/G0- und G2/M-Phase. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem in FlowJo 10.6.1 implementierten „Cell Cycle Tool“ unter Nutzung des „Watson Pragmatic“-Modells durchgeführt. Die Variationskoeffizienten des G2/M-Peaks und des G1/G0-Peaks wurden gleichgesetzt.

4.3.4 Apoptose / Nekrose-Assay mit dem Durchflusszytometer

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die flowzytometrische Analyse des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen auf Grundlage des eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA). Apoptotische Zellen mit transloziertem Phosphatidylserin (PS) werden, bei Nutzung dieses Kits, durch das Fluoresceinisothiocyanate (FITC) markierte Annexin V detektiert. Nekrotische Zellen, mit permeabilisierter Zellmembran werden unter Zuhilfenahme des Farbstoffes Propidiumiodid (PI) kenntlich gemacht¹³⁸.

Assay-Durchführung:

Nach der Probenahme und der Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 4×10^6 Zellen in ein 1,5 mL Volumen überführt und in einer, auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge mit $3000 \times g$, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 mL Phosphat gepufferter Saline (PBS) suspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung des zuvor beschriebenen Waschschriffs wurden 100 µL der Zellsuspension (entspricht $0,4 \times 10^6$ Zellen) in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, 2 µL Annexin V-FITC –Lösung hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Im Folgenden wurden die Zellen bei Raumtemperatur, 15 min inkubiert und im Anschluss 5 min bei $4700 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen in 100 µL Binding Puffer resuspendiert. Der Waschschriff wurde einmal wiederholt. Nach diesem Waschschriff wurden 5 µL Propidiumiodid-Lösung hinzugegeben und die Proben zur weiteren Analyse lichtgeschützt in das Labor der zentralen Serviceeinrichtung FlowCore, der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg transportiert

Analyse und Auswertung:

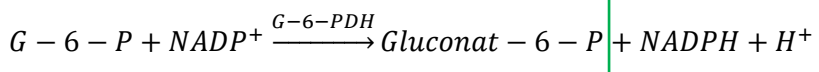
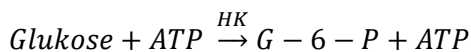
Die Auswertung der Messdaten wurde, wie bei der Zellzyklusanalytik, unter Zuhilfenahme der Software FlowJo 10.6.1 durchgeführt. Nach der Kompensation der Messwerte, bei der die Eigenfluoreszenz der ungefärbten Zellen vom Messsignal subtrahiert wird, wurde die Zellpopulation durch Auftragen der Peakflächen des SSC- Signals (SSC-A) und des FCS-Signals (FCS-A) identifiziert. Der Dubletten-Ausschluss erfolgte, wie bei der Zellzyklusanalytik durch das Auftragen der Peakweite des FSC-Signals (FSC-W) gegen die Fläche des FSC-Signals (FCS-A). Die Einteilung der einzelnen Populationen der lebenden (Q4), früh-apoptotischen (Q3), spät-apoptotischen (Q2) und nekrotischen Zellen (Q1) erfolgte anhand der FITC- und PI-Signale, wie sie in Abbildung 15 b dargestellt. Die einzelnen Gates wurde dabei entsprechend der Minima der Histogramm Darstellung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Farbstoffe festgelegt.

4.3.5 Substrat- und Metabolitanalyse

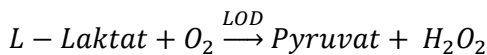
Die Konzentrationsbestimmung der Substrate D-Glukose und L-Glutamin, sowie der Metabolite L-Laktat und Ammonium erfolgte mithilfe des Bioanalysers CedexBio (Roche). Für die auf einer enzymatisch-fotometrischen Messung beruhende Analyse wurde 1 mL zellhaltige Probe für 5 min bei 148 * g zentrifugiert und der möglichst zellfreie Überstand in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und dieses in den Probenhalter des Analysegerätes gestellt. Innerhalb dessen erfolgte, nach entsprechender Auswahl der Analyseprotokolle die automatische Konzentrationsbestimmung.

Die Nachweisreaktionen der verwendeten Assay sind im Folgenden dargestellt. Die detektierten Komponenten sind durch farbliche Markierungen kenntlich gemacht¹³⁹.

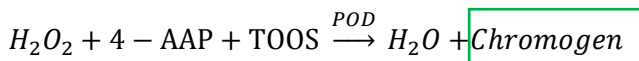
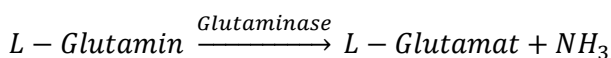
D-Glukose



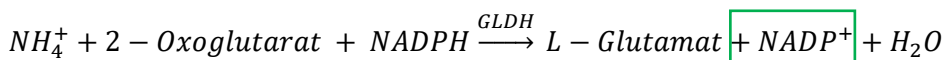
L-Laktat



L-Glutamin



Ammonium



4.3.6 Produktquantifikation

IgG-Antikörper

Im Falle des, durch den Zellklon CHO-DP12 ins Medium sekretierten IgG-Antikörpers erfolgte die Bestimmung des Produkttiters unter Verwendung des Bioanalysers CedexBio (Roche). Die Produktkonzentration wird in diesem Fall mithilfe eines turbidimetrischen Immunoassays bestimmt. Durch die Bindung mehrerer Zielantikörper an ein Antigen vom Kaninchen bilden sich Antikörper-Antigenkomplexe aus. Die resultierende Erhöhung der Trübung ist von der Konzentration des Zielantikörpers abhängig und wird durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen¹³⁹.

Darbepoetin alpha

Die Bestimmung der DPO-Konzentration wurde vom MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen (Heidelberg, Germany) unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIA) durchgeführt.

4.3.7 Analyse der Proteinqualität

IgG-Antikörper

Die Bestimmung der Glykan-Verteilung des IgG-Antikörpers erfolgte mithilfe einer Intakt - Massen - Analyse. Die von der Biofidus AG (Bielefeld, Germany) durchgeführte Analyse basiert auf einer Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) in Kombination mit einer Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).

Darbepoetin alpha

Zur Vorbereitung der Qualitätsanalytik wurden die Proben bei erreichter maximalen Zellkonzentration sowie jene einen Tag vor Erreichen der PCD gepoolt. Nachfolgend wurden die Proben mithilfe von Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert und eine Konzentration von etwa 0,3 mg/ml DPO eingestellt. Die Aufreinigung erfolgte nach einem Pufferwechsel (Puffer A) mit einer Affinitätschromatographie unter Verwendung einer HiTrap Blue High Performance (HP) Säule. Der Arbeitsplan kann Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Methode der DPO-Aufreinigung; CV = Säulenvolumen, A = Puffer A, B = Puffer B

Phase	Flusseinstellung	Dauer
Equilibrierung	100% A	5 CV
Inject	SamplePump	Bis Probe komplett aufgetragen
Wash	14% B	3 CV
Elution	100% B	Stufe in 3CV
Reequilibration	100% A	10 CV

Die Analytik der relativen Anteile an Mono-, Di-, Tri- und Tetrasialoformen des Darbepoetin wurde, von der Biofidus AG (Bielefeld, Germany) mithilfe einer SAX HPLC bestimmt. Um mögliche Unterschiede in der Proteingröße zu erkennen wurde zusätzlich ein SDS-Page durchgeführt.

4.4 Methoden der Auswertung

4.4.1 Ermittlung der Wachstumsrate- Eulerverfahren

Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate erfolgte innerhalb der exponentiellen Phase unter Zuhilfenahme des explizierten Eulerverfahrens, in Kombination mit einer Parameteridentifikation. Das hier verwendete Verfahren beruht auf dem Prinzip der Approximation simulierter Werte (Index: sim) an experimentelle Messwerte (Index: mess) unter Variation der gesuchten Funktionsterme. Die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ erfolgte durch, das numerische Lösen der folgenden, das Zellwachstum beschreibenden Differenzialgleichung (4-11) gemäß des von Leonhard Euler beschriebenen Verfahrens zur numerischen Integration von Differentialgleichungen:

$$\frac{dX}{dt}(t_{i-1}) = \mu(t_{i-1}) \cdot X(t_{i-1}) \quad (4-11)$$

Beginnend mit der Initialzellkonzentration $X(t_0)$ zum Zeitpunkt der Inokulation t_0 wird unter Verwendung der Steigung des letzten Punktes $dX/dt(t_{i-1})$ und einer Diskretisierungsschrittweite $dt > 0$ die Zellkonzentration zum Zeitpunkt t_i durch folgende Gleichung (4-12) ermittelt:

$$X(t_i) = X(t_0) + \frac{dX(t_{i-1})}{dt} \cdot \Delta t \quad (4-12)$$

Die Summation der auf diese Weise erzeugten Geraden, dargestellt in Gleichung (4-13), führt bei kleinen Diskretisierungsschrittweiten, zur Approximation des Kurvenverlaufs der Wachstumsfunktion.

$$X(t_n) = X(t_0) + \sum_{i=1}^n \left(\frac{dX(t_{i-1})}{dt} \cdot \Delta t \right) \quad (4-13)$$

Zur Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate μ wurde eine Parameteridentifikation, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, auf Basis der folgenden Gütefunktion $J(X)$ durchgeführt.

$$J(X) = \sum_{i=1}^n \left| \left(\frac{X_{mess}(t_i) - X_{sim}(t_i)}{X_{mess}(t_i)} \right) \right| \quad (4-14)$$

Das resultierende Optimierungsproblem wurde, in der vorliegenden Arbeit mit der Software Microsoft Excel unter Verwendung des „Solver“ Tools berechnet. Die Gütefunktion wurde durch Variation der spezifischen Wachstumsrate der simulierten Wachstumskurve μ_{sim} in den Grenzen $0 < \mu < 1$ und der Variation der Initialzellkonzentration der simulierten Kurve $X_{sim}(t_0)$ um maximal $\pm 10\%$ der gemessenen Startzellkonzentration $X_{mess}(t_0)$ minimiert.

4.4.2 Berechnung der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten

Zur Abschätzung der metabolischen Zellaktivität wurden die zellspezifischen Raten des D-Glukose- und L-Glutamin-Verbrauchs, sowie spezifischen Produkt-, Laktat- und Ammoniumbildungsrate berechnet. Für die Ermittlung der zellspezifischen Raten q_{spez} wurde der Quotient aus der experimentell ermittelten Konzentrationsdifferenz C_x und des Integrals der Lebendzellzahl LZZ , im betrachteten Zeitraum, gemäß Gleichung (4-15), gebildet:

$$q_{spez} = \frac{(C_x(t_i) - C_x(t_0))}{\int_{t_0}^{t_i} LZZ(t)} \quad (4-15)$$

Der Index 0 bezieht sich auf den Startzeitpunkt $t_0 = 0$, für den Zeitpunkt t_i wurde der Zeitpunkt der höchsten Zellkonzentration (PCD) gewählt.

Eine positive spezifische Rate zeigt eine Bildung der Komponente an, während ein negativer Wert einen Verbrauch aufzeigt.

Zur möglichst genauen Integration der Lebendzellzahl wurde die Lebendzellzahl grafisch über die Zeit aufgetragen und eine Trendlinie (Polynomfunktion höheren Grades mit der Darstellung von mindestens 6 Nachkommastellen) eingeführt. Anhand der Polynomfunktion erfolgte die Ermittlung des bestimmten Integrals in den Integrationsgrenzen $t_0 = 0$ bis t_i .

Im Fall der Aminosäure Glutamin wurde bei der Berechnung der spezifischen Rate die Rate für die spontane thermische Degradation berücksichtigt. Die thermische Zerfallsreaktion wird in der Literatur als Reaktion 1. Ordnung beschrieben^{140–142}, sodass sich die Glutaminkonzentration der thermischen Zerfallsreaktion thC_{GLN,t_i} nach Gleichung (4-16) berechnet.

$$thC_{GLN,t_i} = C_{GLN,t_0} \cdot e^{-k_{dGLN}(T) \cdot t_i} \quad (4-16)$$

Die Temperaturabhängigkeit der Zerfallskonstante $k_{dGLN}(T)$ wurde experimentell für das verwendete Medium TC-42 (Xell, Bielefeld) ermittelt, mit den Daten der Literatur korreliert und kann in einem Temperaturbereich von 20 °C – 37 °C durch Gleichung (4-17) beschrieben werden:

$$k_{dGLN}(T) = 0,000161 \cdot T^2 - 0,003744 \cdot T + 0,023633 \quad (4-17)$$

Gemäß Gleichung (4-15) und (4-16) erfolgte die Berechnung der zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate $GLN q_{spez}$ unter Berücksichtigung der thermischen Zerfallsreaktion gemäß nachfolgender Gleichung (4-18):

$$GLN q_{spez} = \frac{(C_{GLN}(t_i) - (C_{GLN}(t_0) - thC_{GLN}(t_i)))}{\int_{t_0}^{t_i} LZZ(t)} \quad (4-18)$$

Die spezifische Ammoniumbildungsrate wurde aufgrund des thermischen Zerfalls des Glutamins aus der Summe der zellspezifischen Bildungsrate und dem Anteil, des vom thermischen Glutaminzerfalls gebildeten Ammonium berechnet. Auf Grundlage der experimentellen Daten und entgegen der Reaktionsstöchiometrie, wurde angenommen, dass aus 2 Molekülen Glutamin aufgrund des thermischen Abbaus 1 Molekül Ammonium im Medium gebildet wird. Die Ergebnisse der experimentellen Werte, sowie die temperaturabhängige thermische Zerfallsrate können den Abbildungen Anhang-Abbildung 1 und Anhang-Abbildung 2 des Anhangs entnommen werden.

5 Entwicklung und Aufbau der Zellzahlreglung

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines industriell nutzbaren, selbstadaptiven Zellzahlreglers. Im Folgenden wird der entwickelte Regler, sowie der, für die Zellzahlreglung relevante Prozessaufbau und die daraus resultierenden Signalwege, beschrieben.

5.1 Verfahrenstechnischer Aufbau

In Bezug auf den verfahrenstechnischen Prozessaufbau basiert die Zellzahlreglung im Wesentlichen auf der online ermittelten Zellkonzentration. Innerhalb des Forschungsprojektes wurde zur Bestimmung der Lebendzellkonzentration der Incyte-Biomassesensor (Hamilton, Bonaduz, CH) verwendet. Dieser wurde, wie Abbildung 16 entnommen werden kann, unter Verwendung einer PC-Box, eines Digital-Analog-Wandlers, sowie zweier Trennverstärker, an das Prozessleitsystem angeschlossen.

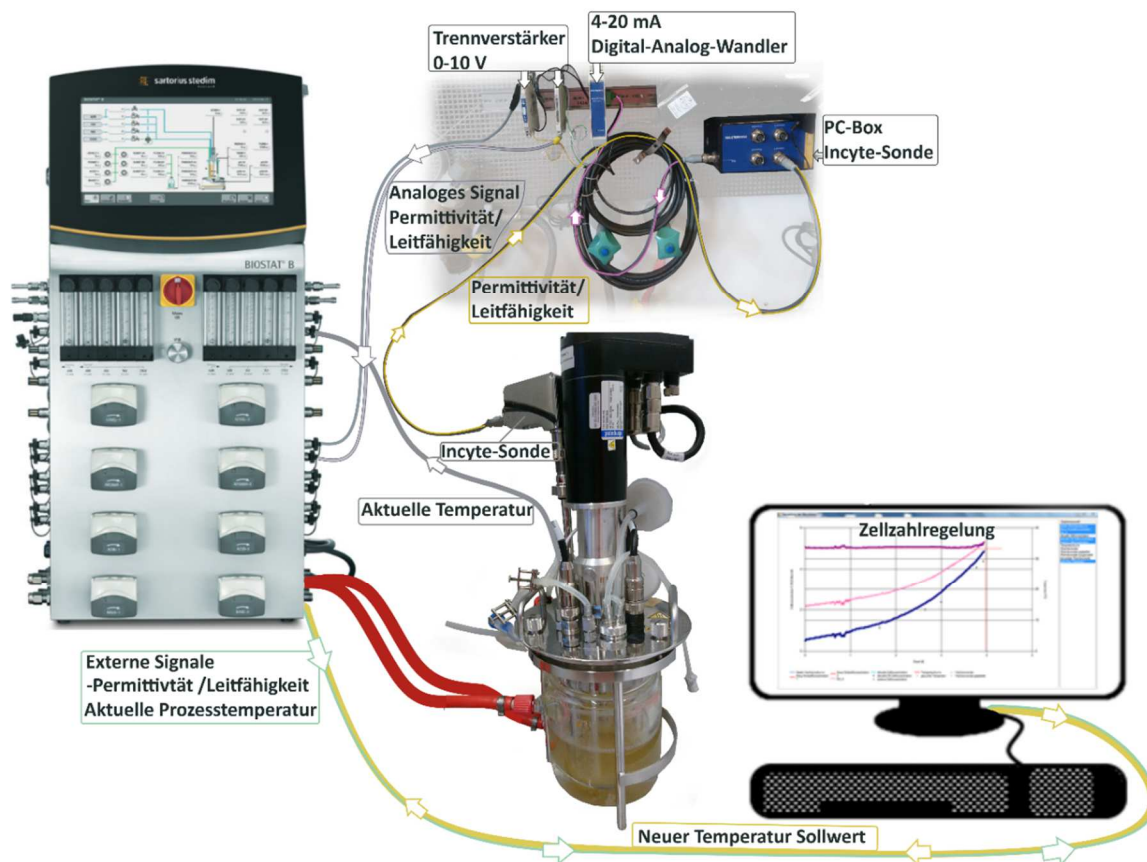


Abbildung 16: Schema des verfahrenstechnischen Aufbaus der Zellzahlreglung

Zu Beginn eines jeden Prozesses ist die autoklavierbare Incyte-Sonde, unter Zuhilfenahme des in Absatz 4.3.2 aufgezeigten, verstellbaren Adapters, in den Reaktordeckel zu installieren. Nach dem Autoklavieren wird der Vorverstärker auf den Sondenkopf aufgeschraubt, von welchem die Signale der Leitfähigkeit und der Permittivität, über das in Abbildung 16 gelbschwarz markierte Kabel zur PC-Box der Incyte-Sonde geleitet werden. Im weiteren Verlauf werden die Messsignale von der PC-Box zum einen über eine USB-Schnittstelle direkt zur Software der Incyte-Sonde übertragen und zum anderen über das lila-schwarze Kabel der Abbildung 16 zum Digital-Analog-Wandler geleitet. Nachfolgend werden die Signale unter Zuhilfenahme eines Digital-Analog-Wandlers in ein analoges 4 mA - 20mA Signal transformiert. Aufgrund des 0 V – 10 V Eingangs des Leitsystems, erfolgt über zwei Trennverstärker eine weitere Signalwandlung der 4 mA – 20 mA Signale in 0 V - 10V Signale, welche anschließend an das Prozessleitsystem weitergeleitet werden. Das transformierte Signal der Permittivität wird in diesem Aufbau über den Eingang des externen Signals A und das der Leitfähigkeit in den Eingang des externen Signals B eingespeist. Da das Prozessleitsystem keine negativen Werte ausgibt, die Permittivität jedoch sowohl negative als auch positive Werte annehmen kann, ist der Messbereich der Prozesswerte (PV Ranges) innerhalb des Prozessleitsystems auf einen Bereich von – 10 % bis 100 % einzustellen. Diese bewirkt einen konstanten Versatz der eingehenden Signale in die positive Richtung, sodass keine negativen Messwerte am Prozessleitsystem ausgegeben werden. Alle vom Prozessleitsystem aufgezeichneten Prozessparameter werden im Weiteren mit der, auf einem externen Rechner installierten SCADA-Software (Supervisory Control and Data Acquisition) MFCS-DA (Sartorius, Göttingen) aufgezeichnet. Diese Software erlaubt es, Messwerte abzufragen und neue Sollwerte zu übergeben, welche zur Regelung an das Prozessleitsystem gesendet werden. Im Falle der Zellzahlregelung werden die Werte der externen Signale A und B, welche der Permittivität und der Leitfähigkeit entsprechen, sowie die aktuelle Prozesstemperatur von dem Programm der Zellzahlregelung abgefragt. Innerhalb des Zellzahlreglers erfolgt die Berechnung des neuen Temperatursollwertes. Dieser wird über die Software MFCS DA an das Prozessleitsystem gesandt. Die Einstellung des neuen Temperatursollwertes wird unter Verwendung des, im Prozessleitsystem implementierten PID-Reglers vollzogen.

5.2 Methodischer Aufbau

Im Folgenden wird der methodische Aufbau des entwickelten Zellzahlreglers mit allen relevanten Berechnungen dargelegt. Das in Abbildung 17 dargestellte Fließbild beschreibt schematisch die Abfolge der einzelnen Berechnungsschritte der online-Optimierung, auf die im Weiteren schrittweise eingegangen wird.

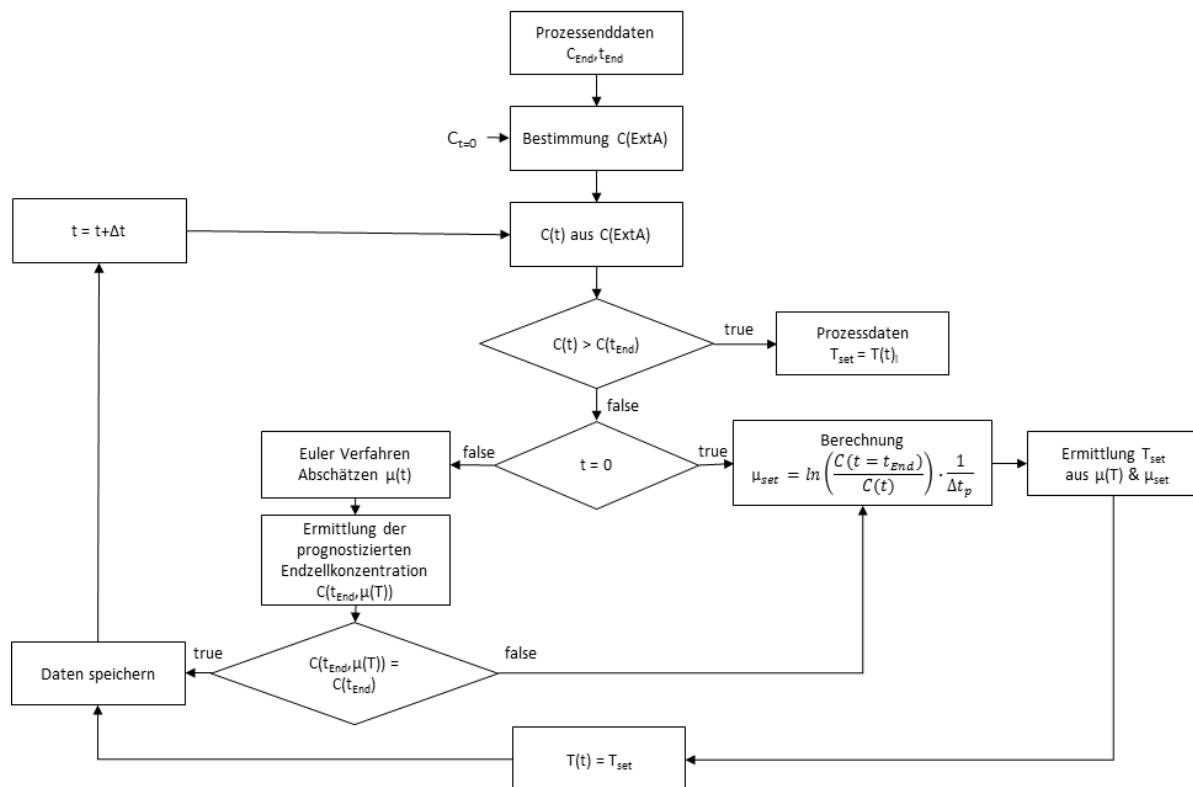


Abbildung 17: Fließbild des Zellzahlreglers

Mit dem Beginn des Prozesses erfolgt durch den Operator die Eingabe der gewünschten Prozessenddaten, bestehend aus der Endzellkonzentration C_{end} und dem genauen Endzeitpunkt t_{end} . Des Weiteren werden, während des Startvorgangs alle notwendigen Parameter zur Ermittlung der Zellkonzentration berechnet.

5.2.1 Bestimmung der aktuellen Zellkonzentration

Der funktionelle Zusammenhang der Permittivität und der Zellkonzentration wird vom Sondenhersteller auf folgende Weise definiert,

$$\text{Zellkonzentration} = (\text{Permittivität} - \text{Offset}) \cdot \text{Zellfaktor} \quad (5-1)$$

Aufgrund des proportionalen Zusammenhangs der Permittivität und des externen Signals $ExtA$ erfolgt die Berechnung der Zellkonzentration C mit Hilfe folgender Gleichung,

$$C(ExtA) = (ExtA - \overline{ExtA_{-1}}) \cdot Zellfaktor \quad (5-2)$$

Das Hintergrundsignal der Sonde $ExtA_{-1}$, welches die Permittivität des Mediums ohne Einfluss der Zellen bemisst, wird unmittelbar vor Inokulation der Zellen aufgenommen und als in Gleichung (5-1) angegebene Offset bei der Berechnung der Zellkonzentration von dem Sondensignal abgezogen. Um den systematischen Fehler bei der Konzentrationsberechnung durch die Ungenauigkeit der Offsetmessung zu eliminieren, soll der Einfluss des Messrauschens auf die Offsetberechnung minimiert werden. Dies wird durch die Mittelung von n gleich 10 äquidistanten $ExtA_{-1}$ -Messwerten, die im Zeitabstand Δt von 1 s über eine Dauer von t gleich 10 s Messung aufgenommen werden. Daraus wird der Mittelwert des externen Signals $\overline{ExtA_{-1}}$ gemäß Gleichung (5-3) berechnet,

$$\overline{ExtA_{-1}} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{k=0}^{n-1} ExtA_{-1}(\Delta t \cdot k) \quad (5-3)$$

mit

$$n = \frac{t}{\Delta t} \quad (5-4)$$

Der in Gleichung (5-2) angegebene Zellfaktor wird einmalig, zu Beginn des Prozesses, unmittelbar nach dem Animpfen des Reaktors, aus dem externen Signal nach der Inokulation $\overline{ExtA_0}$ und der extern gemessenen Initialzellkonzentration C_0 gemäß Gleichung (5-5) bestimmt.

$$Zellfaktor = \frac{C_0}{\overline{ExtA_0} - \overline{ExtA_{-1}}} \quad (5-5)$$

Analog zur Ermittlung des Hintergrundsignals $\overline{ExtA_{-1}}$ erfolgt die Berechnung des $\overline{ExtA_0}$ Wertes ebenfalls durch die Mittelwertbildung des externen Signals nach Inokulation $ExtA_0$ über den Zeitraum von 10 s gemäß Gleichung (5-6),

$$\overline{ExtA_0} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{k=0}^{n-1} ExtA_0(\Delta t \cdot k) \quad (5-6)$$

Die Ermittlung der für die Anwendung des funktionellen Zusammenhangs zwischen der Zellkonzentration und dem Sondensignal notwendigen Parameter macht es möglich, die aktuelle Zellkonzentration zu jedem Prozesszeitpunkt $C(t)$ zu berechnen. Nachdem diese Parameter aufgenommen sind, werden zum Startzeitpunkt t_0 , die zum Erreichen der Prozessenddaten notwendige spezifische Wachstumsrate μ_{set} und die entsprechende optimale Prozesstemperatur T_{set} bestimmt.

5.2.2 Abschätzen der erforderlichen spezifischen Wachstumsrate

Die benötigte spezifische Wachstumsrate μ_{set} berechnet sich durch umstellen, der in Kapitel 3.1.1 hergeleiteten, das exponentielle Zellwachstum beschreibenden, analytischen Gleichung 3.3, nach Gleichung (5-7);

$$\mu_{set}(t) = \ln\left(\frac{C(t_{end})}{C(t)}\right) \cdot \frac{1}{(t_{end} - t)} \quad (5-7)$$

Im Anschluss erfolgt auf Grundlage der erforderlichen spezifischen Wachstumsrate μ_{set} die Berechnung der benötigten Prozesstemperatur T_{set} .

5.2.3 Ermittlung der erforderlichen Temperatur

Wie in der Literatur bekannt, kann die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate tierischer Zellen durch die in der chemischen Verfahrenstechnik weitverbreiteten Arrhenius Gleichung theoretisch beschrieben werden^{143,144}. Es stellte sich jedoch innerhalb der Arbeit heraus, dass die folgende Funktion die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate hinreichend genau beschreibt und innerhalb der Regelung zu genaueren Ergebnissen führt; des Weiteren haben die Parameter eine physikalisch/biologische Bedeutung und sind mit weniger Aufwand zu identifizieren und verifizieren.

$$\mu(T) = \phi_{\mu max} * \frac{[(T - T_{MAX}) \cdot (T - T_{MIN})^2]}{[(T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot ((T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot (T - T_{OPT}) - (T_{OPT} - T_{MAX}) \cdot (T_{OPT} + T_{MIN} - 2 \cdot T))]} \quad (5-8)$$

$\phi_{\mu_{max}}$ ist der aus den verschiedenen Kultivierungsversuchen gemittelte maximale spezifische Wachstumsrate. T_{MIN} steht in dieser Gleichung für jene Temperatur, unter der kein Zellwachstum zu verzeichnen ist, während T_{MAX} die obere Temperaturgrenze für ein mögliches Zellwachstum darstellt. Die maximale spezifische Wachstumsrate wird bei der optimalen Temperatur T_{OPT} erreicht, während T die gesuchte Temperatur darstellt. Die Parameter $T_{MIN}, T_{OPT}, T_{MAX}$ wurden innerhalb der Arbeit experimentell durch die in Abschnitt 6.3 dargestellten Versuche, unter zu Hilfenahme der Parameteridentifikation (Abschnitt 3.2.2) bestimmt. Das Auflösen der dargestellten Funktion nach der gesuchten Temperatur ist aufgrund der Funktionsstruktur nicht möglich, so dass die Ermittlung der erforderlichen Temperatur iterativ erfolgt. Dies geschieht durch die Unterteilung der Funktionsgleichung $\mu(T)$ in n gleich 100 äquidistante Teile, und das schrittweise Einsetzen aufsteigender Temperaturen in Gleichung (5-8). Beginnend mit der minimalen Temperatur T_{MIN} , erhöht sich die eingesetzte Temperatur T_i um $1/100$ der Funktionsgrenzen $(T_{MAX} - T_{MIN})$ bis der Funktionswert für die iterativ erhaltene spezifische Temperatur $\mu(T_i)$ dem gesuchten μ_{set} entspricht. Liegt die gesuchte Temperatur T_{set} zwischen μ_{set} und $\mu(T_i)$, wird die T_{set} , ersichtlich in Gleichung (5-9), durch das Abziehen der halben Schrittlänge $dT/2$ von der zu hohen T_i berechnet.

$$T_{set} = T_i - \frac{1}{2} \left(\frac{T_{MAX} - T_{MIN}}{n} \right) \quad (5-9)$$

Es wäre auch denkbar das iterative Verfahren durch eine Optimierung mit der Zielfunktion $\mu_{set} - \mu(T) \rightarrow 0$ zu ersetzen. Innerhalb der online Optimierung wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurde, erfolgte die Berechnung der gesuchten Temperatur mit dem iterativen Verfahren.

Die ausgewählte Temperatur T_{set} wird im Folgenden dem untergeordneten PID-Regler des Prozessleitsystems als neuer Temperatursollwert übergeben.

Der bis zu diesem Punkt dargelegte Ablauf beschreibt den Startfortgang des Programms. Im Verlauf des Prozesses wird die aktuelle Zellkonzentration anhand des minütlich aufgenommenen externen Signals, wie im Unterpunkt: „5.2.1 Bestimmung der aktuellen Zellkonzentration“ dargestellt, berechnet. Die weiteren Berechnungsschritte des nachfolgend beschriebenen modellprädiktiven Reglers erfolgen in einem Intervall von 5 min.

5.2.4 Berechnung der aktuellen spezifischen Wachstumsrate

Zur Prädiktion des zeitlichen Verlaufs der Zellkonzentration, wird zunächst die aktuelle spezifische Wachstumsrate $\mu_{mes}(t)$ berechnet. Wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt, wird für die Ermittlung von μ_{mes} zum aktuellen Zeitpunkt t die mit dem online Sensor gemessene Zellkonzentration $C_{mes}(t)$ innerhalb eines festgelegten Zeithorizontes Δt_h mit der modellierten Zellkonzentration $C_{mod}(t)$ verglichen. Unter Verwendung des multidimensionalen nichtlinearen Optimierungsverfahrens nach Nelder-Mead-Simplex erfolgt der Kurvenangleich der modellierten und der gemessenen Zellkonzentration unter Variation der Zellkonzentration zu Beginn des Zeithorizontes $C_{mod}(t - \Delta t_h)$ und der spezifischen Wachstumsrate $\mu_{mod}(t)$. Die Differenz der nach Gleichung (5-10) und (5-11) modellierten und gemessenen Werte soll bei dem Angleich minimal sein.

$$C_{mod}(t) = C(t - \Delta t_h) * e^{\mu_{mod}(t) \cdot \Delta t_h} \quad (5-10)$$

$$\sum_{t-\Delta t_h}^t |C_{mod}(t_i) - C_{mes}(t_i)| \quad (5-11)$$

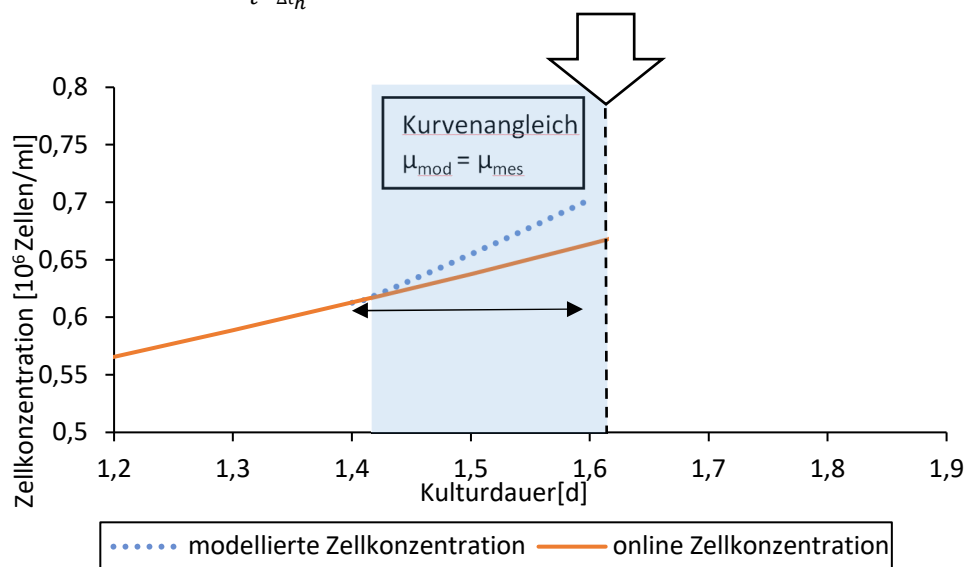


Abbildung 18: Ermittlung der aktuellen spezifischen Wachstumsrate - schematische Darstellung

Im weiteren Verlauf der Regelung wird die, mit der aktuellen Wachstumsrate zu erwartende Endzellkonzentration abgeschätzt und gegebenenfalls die benötigte Wachstumsrate, wie im Abschnitt 5.2.5 erläutert, berechnet.

5.2.5 Prädiktion der zu erwartenden Endzellkonzentration

Unter Annahme einer im Verlauf des Prozesses konstanten spezifischen Wachstumsrate erfolgt die Berechnung der zu erwartenden Endzellkonzentration $C(t_{end})$ gemäß der folgenden Gleichung:

$$C(t_{end}) = C(t) * e^{\mu(t) \cdot (t_{end} - t)} \quad (5-12)$$

Die prädiktiv erreichbare Zellkonzentration $C(t_{end})$ wird anschließend mit der Zielzellkonzentration C_{end} verglichen.

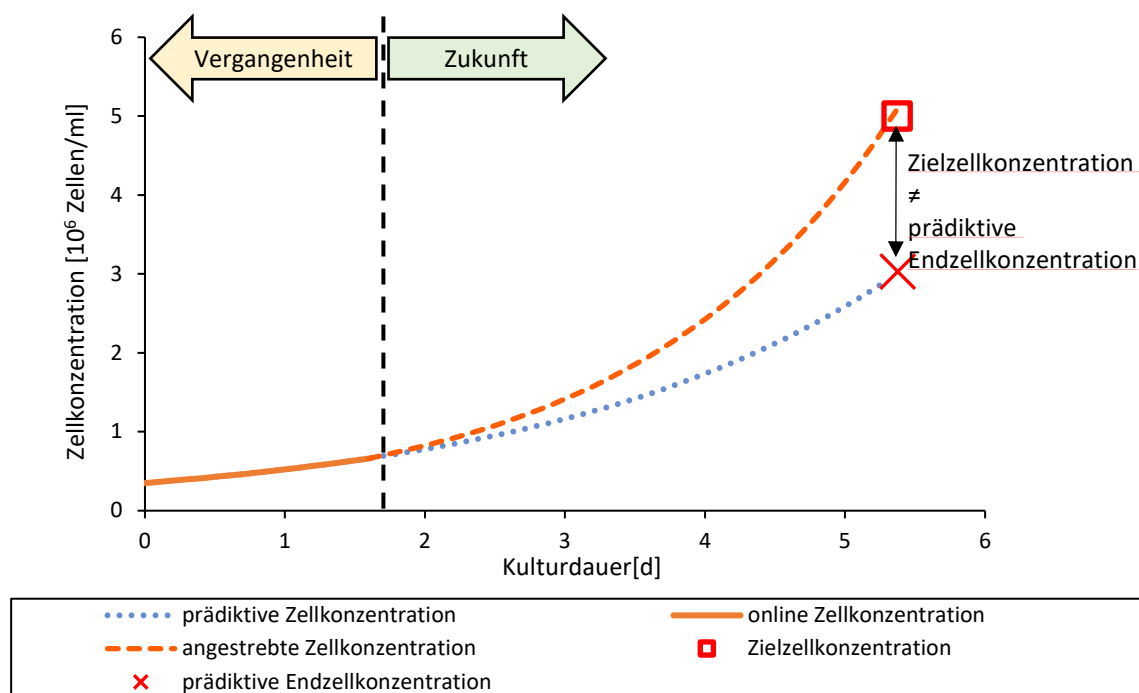


Abbildung 19: Berechnung der notwendigen Wachstumsrate $\mu_{set}(t)$, durch Vergleich der Zielzellkonzentration C_{end} und der mit der aktuellen spezifischen Wachstumsrate $\mu_{mes}(t)$ prädiktiv erreichbaren Endzellkonzentration $C(t_{end})$

Kommt es, wie in Abbildung 19 dargestellt, zu einer Abweichung der beiden Endzellkonzentrationen, folgt das Abschätzen der erforderlichen spezifischen Wachstumsrate μ_{set} , gemäß Abschnitt 5.2.2 und die Ermittlung der erforderlichen Temperatur, gemäß Kapitel 5.2.3. Nachfolgend werden alle erzeugten Daten und möglicherweise auftretenden Änderungen als ein „Microsoft Excel“-Arbeitsblatt gespeichert.

5.3 Selbstoptimierender Algorithmus

Zur kontinuierlichen Optimierung und Anpassung der, die temperaturabhängige Wachstumsrate beschreibenden Gleichung, wurde ein selbstoptimierender Algorithmus in die Regelung implementiert. Im graublau hinterlegten Fenster der folgenden Abbildung 20 ist schematisch der Ablauf des iterativ-adaptiven Optimierungsalgorithmus, dargestellt. Adaptive Regler, innerhalb derer eine Anpassung der Kenngrößen an den Prozess vollzogen wird, sind in der der Entwicklung biotechnologischer Prozesse ebenso bekannt^{145–148}, wie prädiktive Regler, bei welchen die Regelung der Stellgröße auf Grundlage mathematischer Modellen vorausschauend erfolgt^{149–153}. Prädiktive Regler mit iterativ-adaptiver online-Optimierung innerhalb derer eine Anpassung der Kenngrößen nicht kontinuierlich, sondern nach Erfüllung definierter Bedingungen sowie nach Ende eines Prozesses erfolgt¹⁵⁴ wurden nach heutigem Kenntnisstand in der aktuellen Fachliteratur für biologische Prozesse noch nicht beschrieben. Im Weiteren wird aufgezeigt, wie die Anpassung der für die Regelung notwendigen mathematischen Gleichungen an unterschiedliche Zellklone oder möglicherweise auftretende zeitliche Änderungen im Wachstumsverhalten eines Zellklons (Driftverhalten) erfolgt.

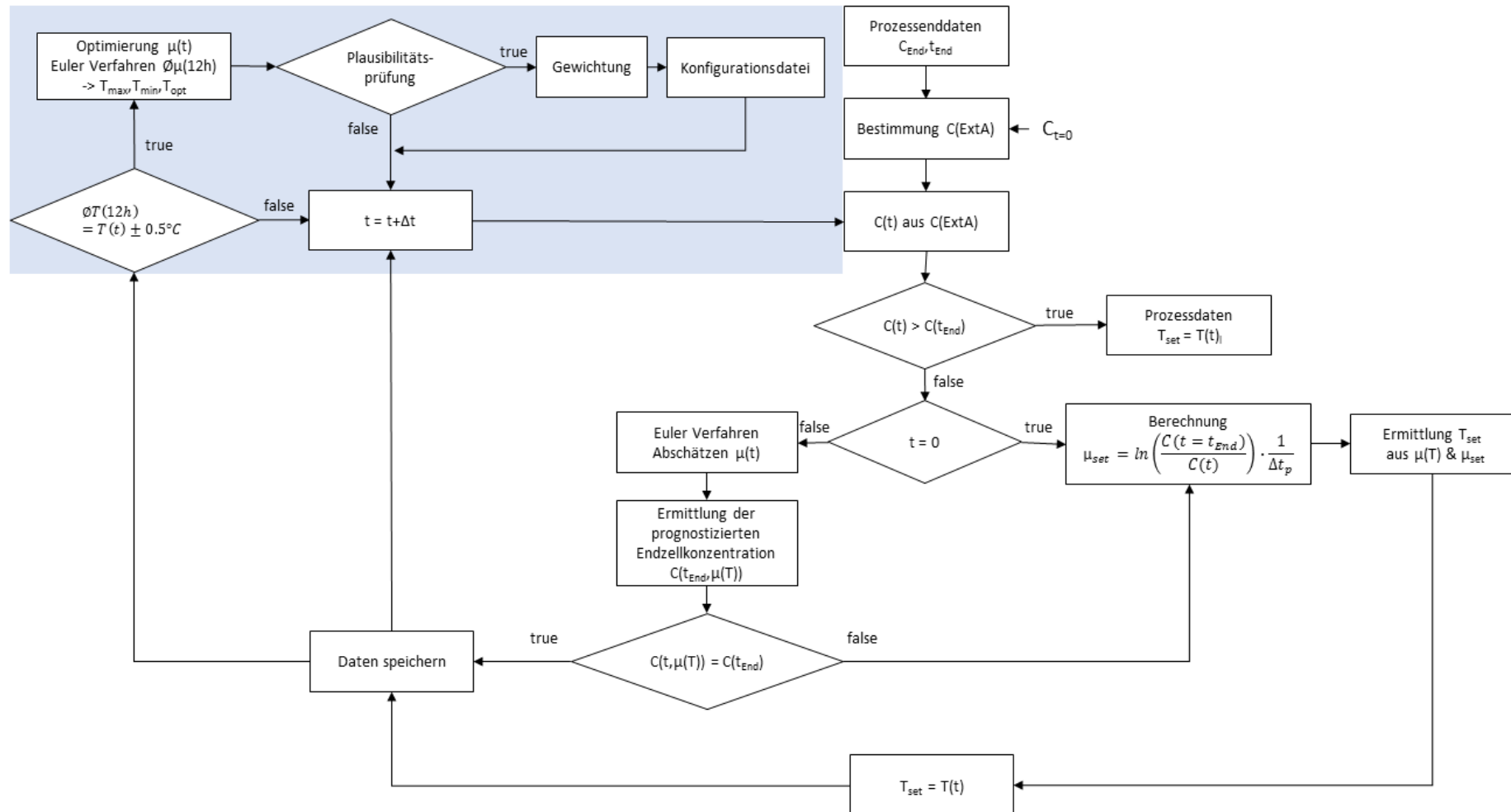


Abbildung 20: Fließbild Zellzahlreglung inklusive des selbstoptimierenden Algorithmus

Wie Abbildung 20 entnommen werden kann, beginnt der Optimierungsprozess nach dem Kernprogramm, genauer gesagt nach dem Speichern aller berechneten und durch das Programm erfassten Daten. Um den Fehler einer möglicherweise auftretenden Lag-Phase zu minimieren, starten alle Berechnungen des selbstoptimierenden Algorithmus 12 h nach dem Starten des Programms. Der Aufnahme der volatilen Prozesstemperatur folgt die Berechnung der durchschnittlichen Temperatur, gemäß des im Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Ablaufs.

5.3.1 Ermittlung der durchschnittlichen Prozessgrößen μ und T

Für die Bestimmung der durchschnittlichen Prozesstemperatur wird diese über eine Dauer von mindestens 12 h aufgezeichnet. Treten aufgrund der Zellzahlreglung Temperaturschwankungen größer $\pm 0,5^\circ\text{C}$ auf, wird die zwölfstündige Aufnahme der Prozesstemperatur erneut gestartet. Falls sich die Temperatur um mehr als $\pm 0,5^\circ\text{C}$ geändert hat und die 12 h Mindestaufnahmezeit überschritten wurde, wird die Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, sowie der Standardabweichung der einzelnen Temperaturen von Mittelwert initialisiert. Im Falle einer Standardabweichung $< 0,35^\circ\text{C}$ innerhalb der Temperaturwerte, folgt die Bestimmung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate. Diese berechnet sich durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes der zuvor von der Zellzahlreglung berechneten spezifischen Wachstumsraten im betreffenden Zeitintervall. Aufgrund des relativ starken Messrauschens der Sonde und der daraus resultierenden Varianz in der berechneten spezifischen Wachstumsrate, werden Werte mit einer Standardabweichung $> 0,05 \text{ 1/d}$ vom Mittelwert aussortiert und bei der finalen Ermittlung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate nicht berücksichtigt. Anschließend wird die durchschnittliche Prozesstemperatur des Auswertzeitraums sowie die dazugehörige durchschnittliche spezifische Wachstumsrate berechnet. Beide Parameter werden zur Erweiterung der entsprechenden zellartspezifischen Konfigurationsdatei gespeichert und für die im Abschnitt 5.3.2 aufgezeichnete Ermittlung der definierenden Funktionsparameter μ , T_{MIN} , T_{OPT} , T_{MAX} bereitgestellt.

5.3.2 Optimierung des funktionalen Zusammenhangs $\mu(T)$

Die Ermittlung der Funktionsparameter der temperaturabhängigen Wachstumsrate erfolgt auf Basis des Eulerverfahrens. Die benötigten Messwerte entstammen zum einen aus den im Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Prozessgrößen $\bar{\mu}$ und $\bar{T}$ des laufenden Prozesses und zum anderen aus den, durch vorherige Läufe bestimmten und in der Konfigurationsdatei gespeicherten Prozessgrößen. Der Kurvenangleich der modellierten Kurve an die Messwertkurve erfolgt unter Einhaltung folgender Nebenbedingungen;

$$0 < \mu < 1 \quad (5-13)$$

$$20 < T_{MIN} < 30 \quad (5-14)$$

$$30 < T_{OPT} < 39 \quad (5-15)$$

$$37 < T_{MAX} < 40 \quad (5-16)$$

Das resultierende Ergebnis der ermittelten Parameter μ_{MAX} , T_{MIN} , T_{OPT} , T_{MAX} wird auf seine Plausibilität überprüft. Zu diesem Zweck werden die in der Konfigurationsdatei befindlichen historischen Werte in Bezug auf die Standardabweichung mit den neu ermittelten Parametern verglichen. Die neu ermittelten Werte gelten als plausibel, wenn die Standardabweichung der Temperatur $< 1,5^\circ\text{C}$ und die spezifische Wachstumsrate $< 0,1 \text{ 1/d}$ beträgt.

Sowohl die natürliche Varianz der Zellen, als auch die fortwährende Prozessentwicklung können einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten eukaryotischer Zellen ausüben. Aus diesem Grund wird der finale Parametersatz unter Zuhilfenahme des gewichteten Mittelwertes wie im Abschnitt 5.3.3 beschrieben, berechnet.

5.3.3 Wichtung der neuen Parameter

Erfahrungsgemäß kann, in Abhängigkeit von der Einsatzdauer der Zelllinien eine dynamische, nicht vorhersagbare Veränderung im Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet werden. Diese Varianz ist einerseits ein natürlicher Vorgang des Zellwachstums und kann andererseits durch eine fortlaufende Prozessentwicklung

hervorgerufen werden. In beiden Fällen kann eine zeitliche Abhängigkeit beobachtet werden, so dass die Wichtung der einzelnen Parametersätze nach dem Zeitstempel der entsprechenden Messung erfolgt. Zu diesem Zweck werden alle Parameter der Konfigurationsdatei in einem Array gespeichert und die Zeitdifferenz zwischen dem ersten ermittelten Parametersatz zum Zeitpunkt t_0 und dem aktuellsten Wertepaar zum Zeitpunkt t_i berechnet. Der Wichtungsfaktor lässt sich gemäß Gleichung (5-17) definieren

$$\text{Wichtungsfaktor}(t_i) = \frac{(t_i - t_0)}{\sum_{i=0}^{n-1} (t_i - t_0)} \quad (5-17)$$

Im Weiteren wird der gewichtete Mittelwert entsprechend Gleichung (5-18) ermittelt

$$\text{gewichteter Mittelwert} = \sum_{i=0}^{n-1} \text{Wichtung}(i) \cdot \text{Wert}(i) \quad (5-18)$$

Der gewichtete Mittelwert wird für alle ermittelten Parameter berechnet und in der ersten Wertezeile der Konfigurationsdatei gespeichert. Der nachfolgende Prozess erhält für die Berechnung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate während des Startvorgangs den Parametersatz aus der ersten Wertezeile. Da für jeden Zellklon ein eigenes Arbeitsblatt innerhalb der Konfigurationsdatei angelegt wird, werden auf diese Weise ausschließlich die zellklonspezifischen Parametersätze für den nachfolgenden Prozess bereitgestellt.

6 Experimentelle Ergebnisse

6.1 Qualifizierung der umgebauten Bioreaktoranlage

Um sicherzustellen, dass die umgebaute Bioreaktoranlage zur Kultivierung tierischer Zellen geeignet ist, wurden Vergleichskulturen zu bestehenden Arbeiten des Institutes für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim durchgeführt. Alle Fermentationen erfolgten mit dem, im Medium TC-42 kultivierten Zellklon CHO-DP12 bei einer Prozesstemperatur von 37 °C, einem pH-Wert von 7,2 und einem Gelöstsauerstoffgehalt von 40 % Luftsättigung. Die für den Vergleich herangezogenen Kultivierungen^{137,155}, wurden in der für tierische Zellkultur ausgelegten Reaktoreinheit R'ALF⁺ (Bioengineering, Schweiz) durchgeführt. Zur Qualifizierung der umgebauten Reaktoranlage vom Typ Biostat B (Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland) wurden die Kulturdauer bis zum Erreichen der maximalen Lebendzellzahl $t_{VCD_{PCD}}$, die maximale Lebendzellkonzentration VCD_{PCD} und die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate $\emptyset\mu_{PCD}$ bis zum Erreichen der maximalen Lebendzellzahl untersucht. Eine Zusammenfassung der betrachteten Kriterien kann Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Zusammenfassende Daten zur Qualifizierung der Bioreaktoranlage

Reaktoranlage	R'ALF ⁺	Biostat B
Versuchsanzahl n	7	5
$t_{VCD_{PCD}}$ [d]	$6,60 \pm 0,72$	$4,89 \pm 0,19$
VCD_{PCD} [Zellen/ml]	$9,29 \times 10^6 \pm 1,50 \times 10^6$	$7,58 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^6$
$\emptyset\mu_{PCD}$ [1/d]	$0,45 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,05$

Die Versuche zur Qualifizierung der Reaktoranlage zeigten, dass die $\emptyset\mu_{PCD}$ in der umgebauten Biostat B Anlage im Vergleich zur Zellkulturanlage deutlich erhöht ist, die VCD_{PCD} der Zellkulturanlage jedoch nicht mit der umgebauten Anlage erreicht wird. So lag nach einer Kulturdauer von 4,89 d die Zellkonzentration in der Reaktoranlage R'ALF⁺ bei $5,75 \times 10^6 \pm 0,75 \times 10^6$ Zellen/ml. Nach etwa der selben Kultivierungsdauer konnte in der umgebauten Biostat B Anlage, wie aus Tabelle 8

entnommen werden kann, die Konzentration von $7,58 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht werden. Dieser Vergleich bestätigt die höhere $\emptyset\mu_{PCD}$ in der umgebauten Biostat B Anlage. Des Weiteren zeigte sich, dass die Zellen innerhalb der R'ALF+ Anlage nach Abschluss der exponentiellen Wachstumsphase längere Zeit ein nicht exponentielles Wachstum aufwiesen und somit eine höhere VCD_{PCD} im Unterschied zur Biostat B Anlage erreicht werden kann.

6.2 Verifizieren der Messwerte der Incyte-Sonde

Sowohl die Permittivität als auch die Leitfähigkeit sind physikalisch betrachtet temperaturabhängige Größen. In der aktuellen Praxis erfolgt die Kultivierung eukaryotischer Zellen bei einer konstanten Prozesstemperatur von 37°C. Aufgrund dessen wurde zu Beginn des Forschungsprojektes davon ausgegangen, dass die verwendete Zellzahlsonde für eine konstante Temperatur von 37°C ausgelegt ist. Zur Verifizierung der Incyte-Sonde, bei niedrigeren Prozesstemperaturen, wurden Kultivierungsversuche bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und die Abhängigkeit der Zellkonzentration von der Permittivität analysiert. Die Auftragung der Zellkonzentration über der Permittivität, dargestellt in Abbildung 21, weist einen deutlichen und in einem Temperaturbereich von 31 °C-37 °C temperaturunabhängigen, linearen Messbereich bei den niedrigeren Zellkonzentrationen auf. Ab einer Zellkonzentration von 7×10^6 Zellen/ml ist bei den 33 °C und 35 °C Läufen, sowie ab 2×10^6 Zellen/ml bei dem 31 °C Lauf eine größere Streuung zu verzeichnen. Es ist jedoch zu bedenken, dass die durchgeführten Messungen, vier Reaktorversuchen entstammen, die höheren Zellkonzentrationen demzufolge gegen Prozessende erreicht wurden. Diese erhöhte Streuung bei höheren Zellkonzentrationen deckt sich also mit den Angaben des Herstellers über eine höhere Messunsicherheit der Sonde gegen Ende eines Prozesses¹²⁹.

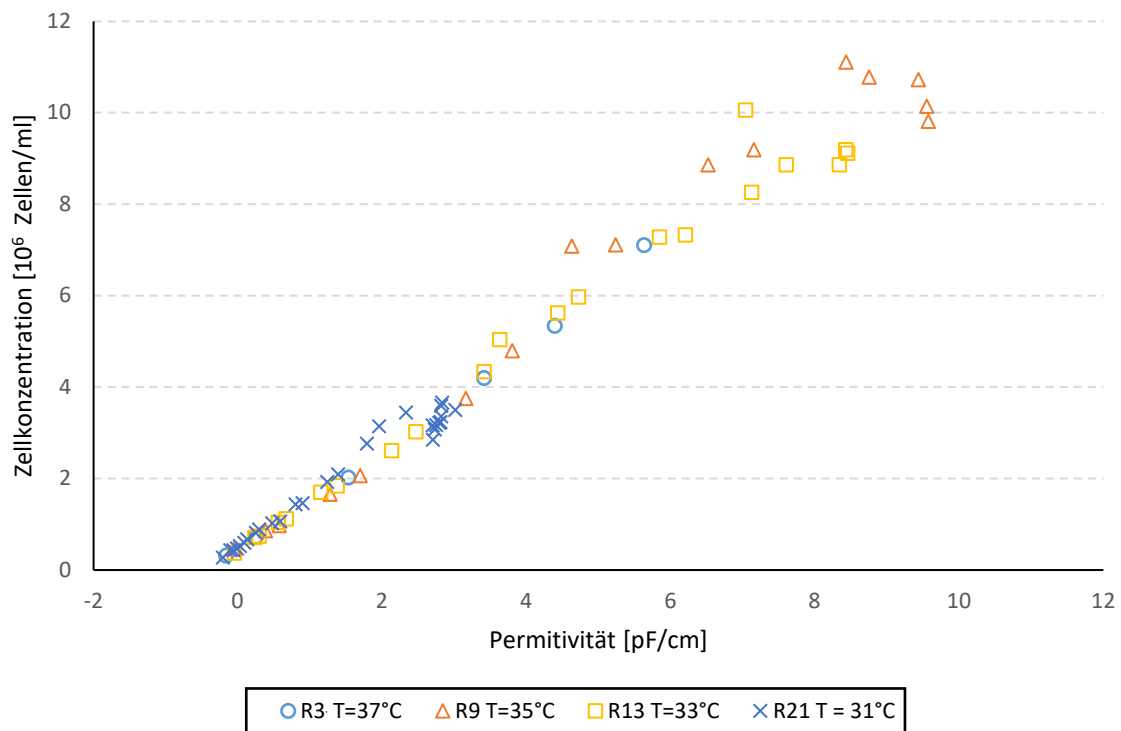


Abbildung 21: Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Permittivität und der Temperatur

Nach der Verifizierung der Messwerte der Incyte-Sonde bei konstanten, niedrigeren Temperaturen wurde der Einfluss von Temperaturänderungen während des Prozesses auf die Messeigenschaften der Permittivitätssonde untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Kultivierung mit sprunghafter Änderung der Prozesstemperatur und dem anschließenden Vergleich der online und offline gemessenen Zellkonzentrationen durchgeführt. Den in Abbildung 22 dargestellten Versuchsergebnissen kann entnommen werden, dass die Prozesstemperatur (grün gestrichelte Linie) zu Beginn 35,3 °C betrug und ungefähr zu Prozessmitte auf 33,2 °C gesenkt wurde. Es wird zudem ersichtlich, dass die online gemessene Zellkonzentration (orangene Linie) den Werten der offline ermittelten Konzentrationen (blaue Punkte) über den gesamten Prozesszeitraum entspricht. Die Änderung der Steigung im Kurvenverlauf der online ermittelten Zellkonzentration ist auf die verminderte Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zurückzuführen.

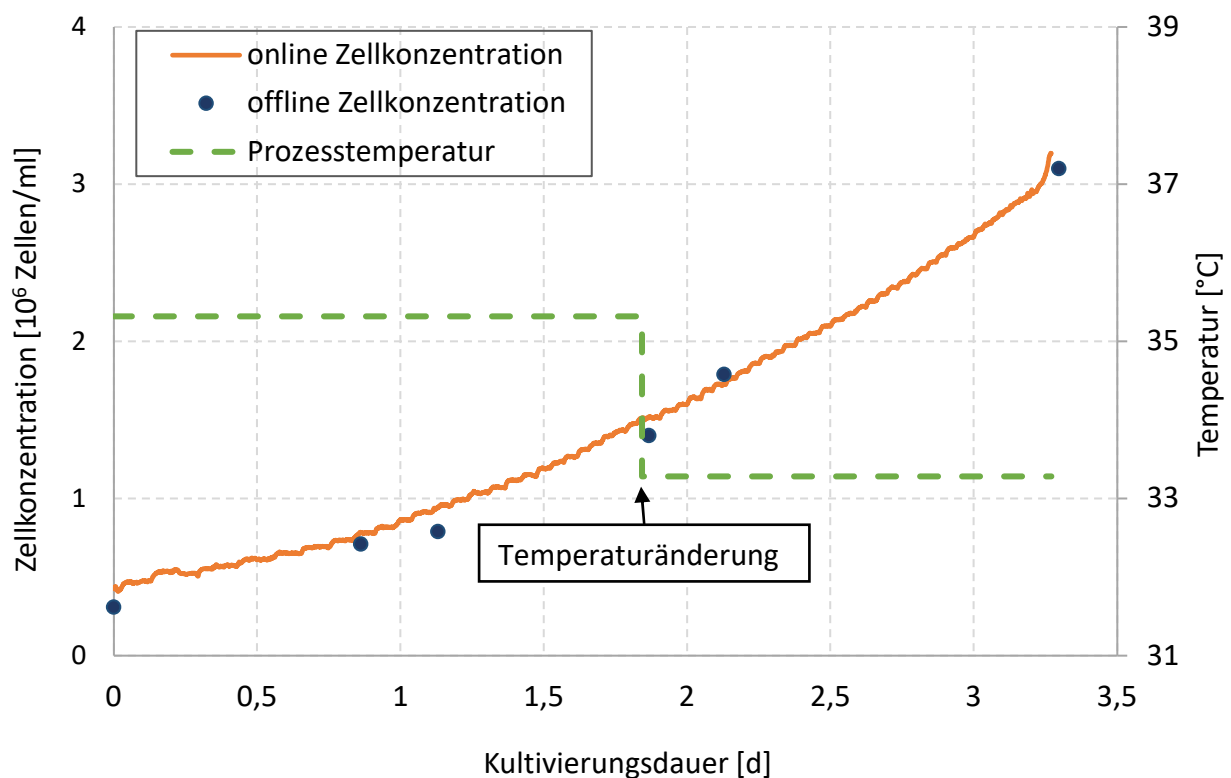
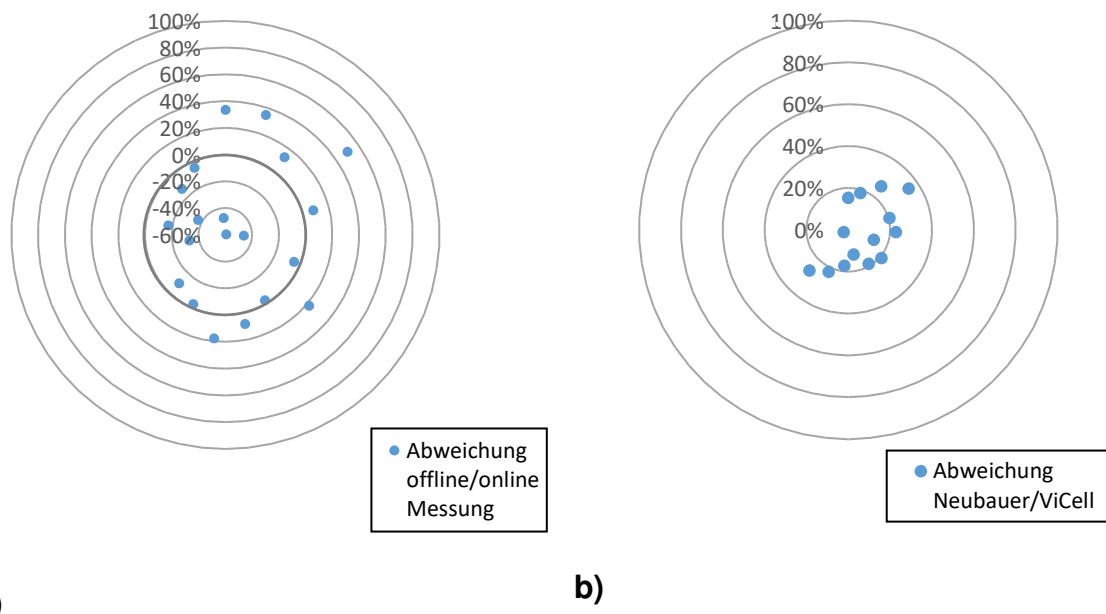


Abbildung 22: Darstellung des Messverhaltens der Permittivitätssonde bei sprunghafter Temperaturänderung

Im Verlaufe der Arbeit traten zum Teil deutliche Differenzen zwischen den online und offline ermittelten Zellkonzentrationen (ViCell) auf.

Die angesprochenen Messunterschiede traten sowohl bei erniedrigter als auch bei einer konstanten Prozesstemperatur von 37 °C auf. Wie sich Abbildung 23 a) entnehmen lässt, konnten sowohl positive als auch negative Abweichung der offline ermittelten Zellkonzentrationen gegenüber der online ermittelten Zellkonzentrationen verzeichnet werden. Definitionsgemäß weisen positive Abweichungen darauf hin, dass die online ermittelte Zellkonzentration kleiner der offline ermittelten Konzentration ist. Während bei negativen Abweichungen die online ermittelte Zellkonzentration einen größeren Wert aufwies als die offline ermittelte Zellkonzentration. Einen Zusammenhang zwischen den Abweichungen der online und offline ermittelten Messwerte und der Temperatur konnte nicht gefunden werden. Es konnte jedoch im zeitlichen Verlauf des Forschungsprojektes eine Zunahme der prozentualen Abweichungen beobachtet werden.



**Abbildung 23: a) Prozentuale Abweichung der online und offline ermittelten Zellkonzentration
b) Prozentuale Abweichung der offline mit dem ViCell und der Neubauerzählkammer ermittelten Messwerte**

Aufgrund der zum Teil erheblichen Abweichungen der online und offline ermittelten Zellkonzentrationen wurde zur Absicherung der offline Messwerte die Zellkonzentration zusätzlich unter Zuhilfenahme der Neubauerzählkammer bestimmt. Im Vergleich der beiden offline Messverfahren zeigten sich im Schnitt eine prozentuale Abweichung von durchschnittlich 20%. In Abbildung 23 b) sind exemplarisch die, zum Zeitpunkt der maximalen Zellkonzentration ermittelten, prozentualen Abweichungen der offline Messungen dargestellt. Auffällig sind die stets niedrigeren Messwerte der manuell mittels Neubauerzählkammer ermittelten Zellkonzentration. Dies ist in Abbildung 23 b) an stets positiven Abweichung zu erkennen. Im Allgemeinen Vergleich der Inline- und Offline-Messungen, weisen die Offline-Messwerte im Vergleich zur Inline-Messung eine geringere Streuung auf.

6.3 Bestimmung der temperaturabhängigen Wachstumsrate $\mu(T)$

Grundlage des entwickelten Zellzahlreglers ist die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate. In diesem Kapitel werden drei unterschiedlichen Herangehensweisen zu Ermittlung des funktionellen Zusammenhangs der

temperaturabhängigen Wachstumsrate dargelegt. Die dargestellten Ergebnisse basieren ausschließlich auf Versuchen mit dem Zellklon CHO-DP12.

6.3.1 Im Bioreaktor mit konstanten Temperaturen

Die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur wurde zunächst innerhalb von 21 Reaktorversuchen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die vier Reaktoren der Biostat B Anlage parallel mit einem Inokulum gestartet und Versuche, mit äquidistant verteilten Prozesstemperaturen von 31 °C bis 37 °C durchgeführt. Exklusive eines Versuchsansatzes, wurden drei der vier Reaktoren mit einer konstanten Temperatur kleiner 37 °C betrieben. Der vierte Reaktor diente als Referenzkultur, die bei 37 °C durchgeführt wurde. Mit dem Ziel den Einfluss der unterschiedlichen Sensoren innerhalb der vier Reaktoren im Gesamtergebnis zu minimieren, wurden für die Referenzkultur bei jedem Versuchsansatz ein anderer Reaktor der Anlage verwendet. Zur statistischen Absicherung der mittleren Temperaturen, wurden innerhalb eines Versuchsansatzes je zwei Kulturen mit einer Prozesstemperatur von 33 °C und 35 °C durchgeführt, so dass im Laufe dieses Versuchs keine Referenzkultivierung durchgeführt werden konnte. Die wesentlichen Parameter, die eine Charakterisierung der Wachstumskurven erlauben, können Tabelle 9 entnommen werden. Es ist ersichtlich, dass die Startzellkonzentration der einzelnen Versuche, mit Ausnahme der Versuche bei 31 °C, im Mittel reproduzierbar auf $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt werden konnte. Des Weiteren ist Tabelle 9 zu entnehmen, dass die maximale Lebendzellkonzentration PCD_{VCD} im mittleren Temperaturbereich von 33°C bis 35°C ein Maximum aufweist. Wie sich den im Anhang dargestellten Wachstumskurven (Anhang-Abbildung 4 - Anhang-Abbildung 7) bei unterschiedlichen Temperaturen entnommen werden kann, zeigt sich im Vergleich der Referenzkulturen die Referenzkultur zur Versuchsreihe bei 37 °C auffällig. In diesem Fall weist die Referenzkultur, im Vergleich zu den weiteren Kulturen bei 37 °C, eine erhöhte Varianz der PCD_{VCD} auf. Dennoch kann bei einer Temperatur von 31 °C, aufgrund der deutlich verlängerten Kulturdauer, trotz der vergleichbar geringen Initialzellzahl, eine, über die Gesamtdauer des Prozesses betrachtete, doppelt so hohe Lebendzellzahl verzeichnet werden.

Tabelle 9: Reaktorkulturen bei konstanten Temperaturen - Darstellung der wesentlichen Parameter Die Referenzkulturen liefen parallel zu den Kulturen bei variablen Temperaturen.

$C(t=0)$:= Startzellkonzentration, PCD_{VCD} := maximale Lebendzellkonzentration, $\int LZZ_{PCD}$:= Integral der Lebendzellkonzentration, Varianz $PCDVCD$:= Varianz der maximale Lebendzellkonzentration in Relation zur Referenzkultur, Varianz $\int LZZ_{PCD}$:= Varianz des Integrals der Lebendzellkonzentration in Relation zur Referenzkultur

Temperatur	37°C	35°C	33°C	31°C
Versuchsanzahl n	8	5	5	3
$C(t=0)$ [10 ⁶ Zellen/ml]	0,42±0,11	0,44±0,04	0,41±0,05	0,27±0,03
PCD_{VCD} [10 ⁶ Zellen/ml]	7,03±1,40	9,99±1,70	10,09±1,16	4,59±0,72
$\int LZZ_{PCD}$ [10 ⁷ Zellen/ml]	1,72±0,17	2,78±0,20	2,71±0,06	4,64±0,42
Referenzkulturen T=37°C				
PCD_{VCD} [10 ⁶ Zellen/ml]	-	7,40	6,15	4,8
Varianz $PCDVCD$ [10 ⁶ Zellen/ml]	-	0,07	0,39	2,49
$\int LZZ_{PCD}$ [10 ⁷ Zellen/ml]	-	1,92	1,83	1,47
Varianz $\int LZZ_{PCD}$ [10 ⁷ Zellen/ml]	-	0,02	0,01	0,03

In der Abbildung 24 wurde die spezifische Wachstumsrate der einzelnen Reaktorversuche wie in Abschnitt 4.4.1 dargelegt bestimmt und über die Prozesstemperatur aufgetragen.

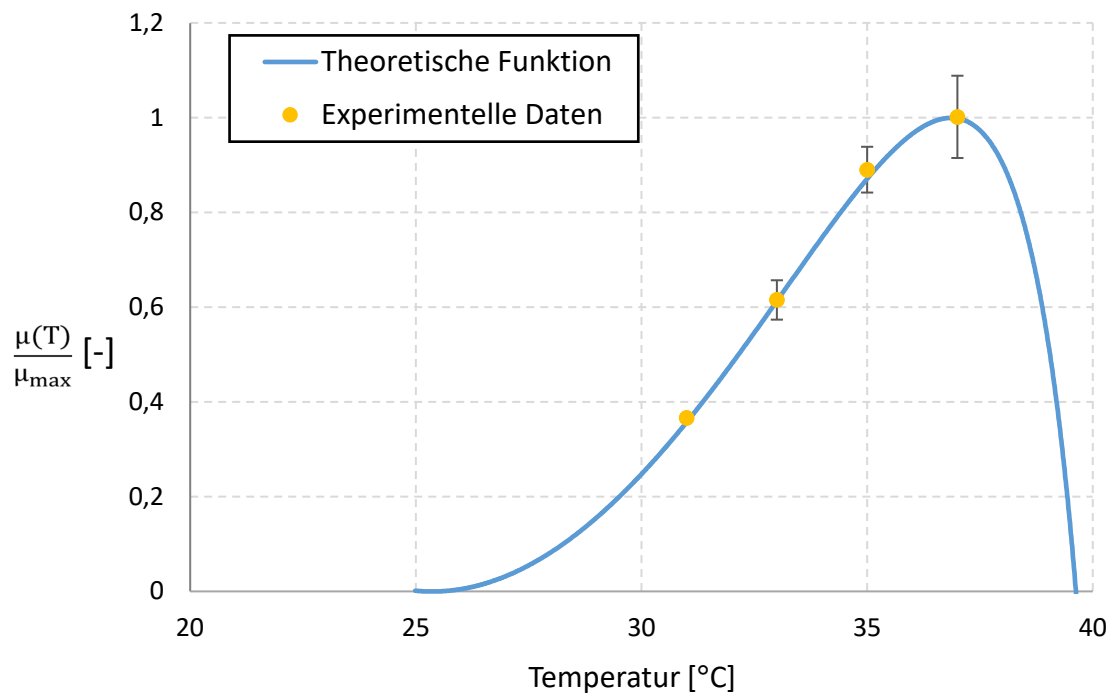


Abbildung 24: Reaktorversuche zur Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Der funktionale Zusammenhang der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate weist den, aus der Literatur für die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität bekannten Verlauf auf ^{156,157}. Des Weiteren wird durch die größeren Fehlerbalken der experimentellen Daten ersichtlich, dass die maximale spezifische Wachstumsrate mit steigenden Temperaturen deutlich stärker variiert. Die Ermittlung der funktionsbeschreibenden Parameter T_{MIN} , T_{MAX} , T_{OPT} und μ_{MAX} erfolgte unter Zuhilfenahme des Eulerverfahrens und auf Grundlage der in Abbildung 24 dargestellten Kurvenverläufe. Die funktionsbeschreibenden Parameter können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Im Reaktorversuch experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Parameter	Wert
Minimale Temperatur T_{MIN} [°C]	25,35
Optimale Temperatur T_{OPT} [°C]	36,86
Maximale Temperatur T_{MAX} [°C]	39,62
Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{MAX} [1/d]	0,776

6.3.2 Im Erlenmeyerkolben mit konstanten Temperaturen

Die zuvor beschriebenen Reaktorversuche sind ausgesprochen kosten-, arbeits- und zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde im Weiteren überprüft, in wie weit sich die Reaktorkulturen bei konstanten Temperaturen durch äquivalente Kulturen im ungeregelten System ersetzen lassen.

Zu diesem Zweck wurden drei Versuchsreihen mit je fünf 125 ml Einweg-Erlenmeyerkolben gestartet. Analog zum Vorgehen der Reaktorkulturen wurden vier der fünf Erlenmeyerkolben im Schüttelbrutschrank Lab-Therm LT-X (Kuhner, Brisfelden, Schweiz) bei Temperaturen von 31 °C, 35 °C und 37 °C kultiviert. Die Kultivierung des fünften Erlenmeyerkolbens, welche als Referenzkultur angelegt wurde, erfolgte bei 37 °C im Schüttelbrutschrank Lab-Shaker ES-X (Kuhner, Brisfelden, Schweiz). Nach der Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase konnte der in Abbildung 25 dargestellte funktionelle Zusammenhang der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate ermittelt werden. Des Weiteren weisen die in Abbildung 25 vergleichend dargestellten Verläufe der mittels Erlenmeyerkolben und Reaktoren ermittelten theoretischen Funktionen einen ähnlichen Funktionsverlauf auf.

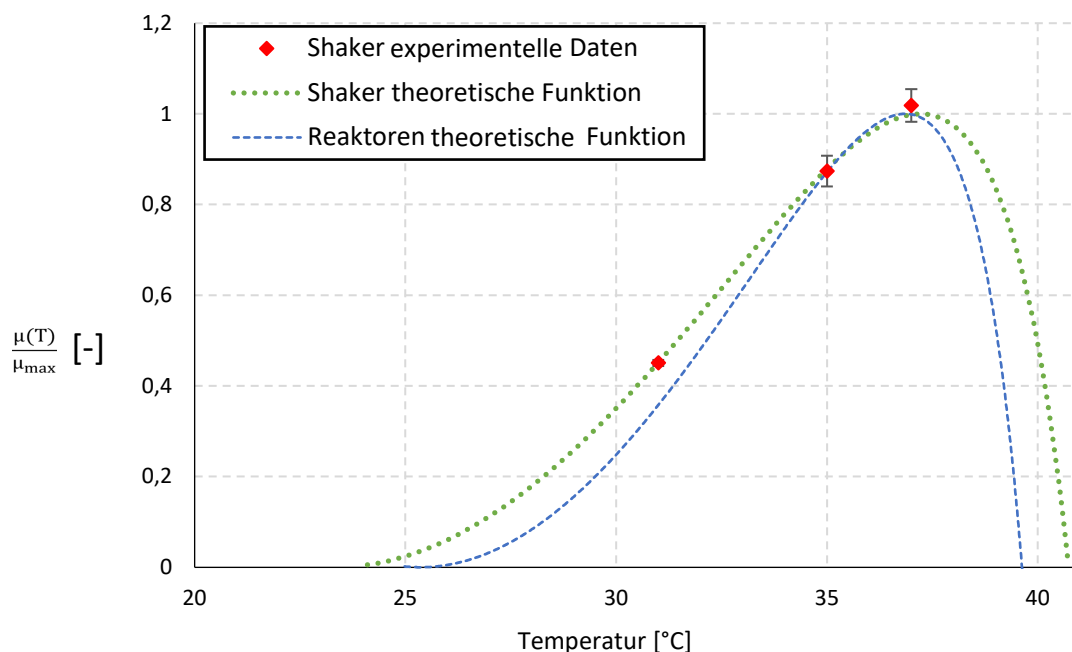


Abbildung 25: Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur im Erlenmeyerkolben

Wie zuvor bei der Ermittlung des funktionellen Zusammenhangs der maximalen spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur in den Reaktoren, zeigt sich auch hier eine, wenn auch weniger deutlich ausgeprägte Zunahme der Standardabweichung bei höheren Temperaturen.

Die Ermittlung der funktionsbeschreibenden Parameter erfolgte analog zur den Reaktorversuchen bei konstanten Temperaturen. Die ermittelten Parameter können Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Im Erlenmeyerkolben experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Parameter	Wert
Minimale Temperatur T_{MIN} [°C]	23,31
Optimale Temperatur T_{OPT} [°C]	37,21
Maximale Temperatur T_{MAX} [°C]	40,72
Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{MAX} [1/d]	0,887

6.3.3 Innerhalb eines Reaktorversuchs – Charakterisierungslauf

Zur weiteren Optimierung der Bestimmung des funktionellen Zusammenhangs der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate wurde untersucht, ob es möglich ist, die notwendigen Parameter innerhalb eines Reaktorversuches zu ermitteln. Im Hinblick auf dieses Ziel wurde im Programm der Zellzahlregelung die Möglichkeit geschaffen, bei Eingabe eines neuen Zellklons, einen Charakterisierungslauf durchführen zu können. Innerhalb dieses Reaktorlaufs folgt die Prozesstemperatur einem vorgegebenen Temperaturprofil. Die spezifische Wachstumsrate der unterschiedlichen Temperaturen wird innerhalb des Programms ermittelt und die notwendigen Parameter zur Beschreibung der $\mu(T)$ -Kurve ermittelt. Die Versuchsergebnisse eines Charakterisierungslaufes sind Abbildung 26 zu entnehmen. Auf der Y-Achse ist die Zellkonzentration über die Kultivierungsdauer dargestellt. Die spezifische Wachstumsrate über die Kultivierungsdauer kann der Y-Sekundärachse entnommen werden.

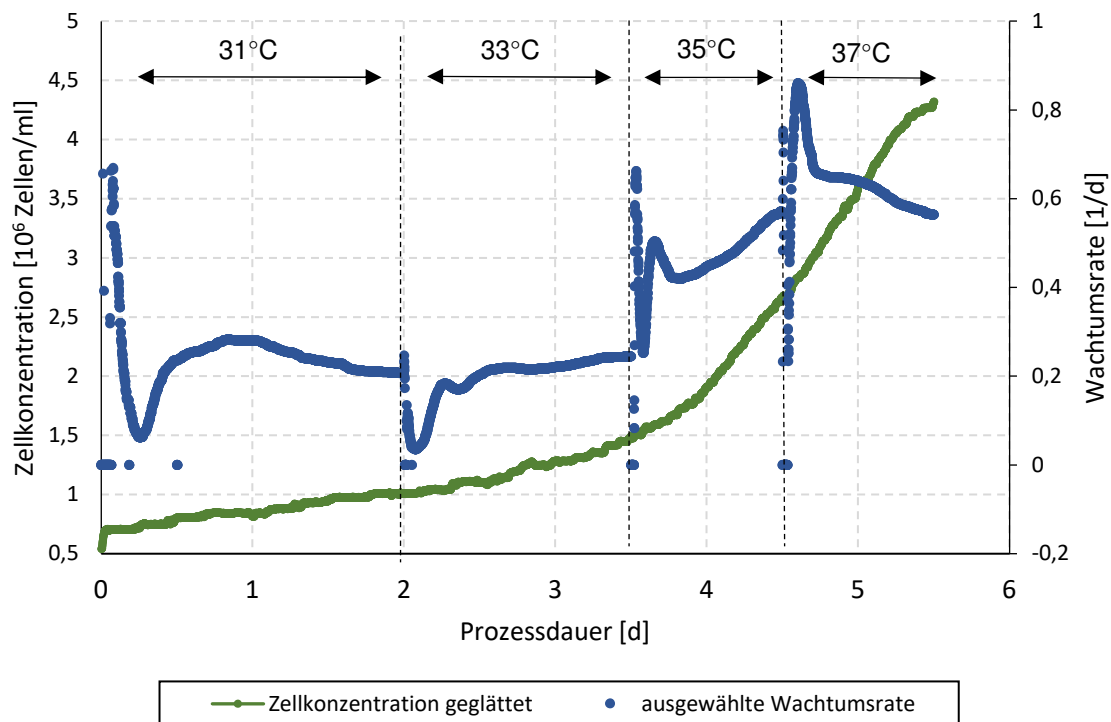


Abbildung 26: Ergebnisse eines Charakterisierungslaufs zur Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Bei der Betrachtung der aufgetragenen spezifischen Wachstumsrate über die Kulturdauer fällt zunächst das Abfallen selbiger nach Änderung der Prozesstemperatur auf. Dies weist nicht auf einen tatsächlichen Abfall des Zellwachstums hin, sondern ist im methodischen Vorgehen der Berechnung begründet. Die spezifische Wachstumsrate wird unter Zuhilfenahme des Eulerverfahrens berechnet. Mit Änderung der Prozesstemperatur wird ein neuer Abschnitt zur Berechnung der spezifischen Wachstumsrate gestartet. Je weniger Datenpunkte für einen Kurvenangleich zur Verfügung stehen, desto stärker wirkt sich beispielsweise das Messrauschen der Sonde auf die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate aus. Demzufolge benötigt es nach der Änderung der Prozesstemperatur eine Anlaufphase, die insbesondere vom Messverhalten der Zellzahlsonde abhängig ist. Auf Grundlage dessen erfolgt die Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate, innerhalb des Charakterisierungslaufs, anhand der zweiten Hälfte der Messdaten bei einer Temperatur. Einflüsse, wie zum Beispiel die im dargestellten Versuch entstandene steigende Wachstumsrate bei einer Temperatur von 35 °C, oder die sinkende Wachstumsrate bei einer Temperatur von 37 °C, können auf diese Weise jedoch nicht eliminiert werden.

Die vom Programm der Zellzahlregelung ermittelten funktionsbeschreibenden Parameter der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate können Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Während des Charakterisierungslaufs im Reaktor experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Parameter	Wert
Minimale Temperatur T_{MIN} [°C]	24,17
Optimale Temperatur T_{OPT} [°C]	37,18
Maximale Temperatur T_{MAX} [°C]	37,01
Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{MAX} [1/d]	0,766

Auf Grundlage der in Tabelle 12 dargestellten Parameter wurde der in Abbildung 27 aufgezeigte grafische Verlauf des theoretischen Verlaufs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur ermittelt. Innerhalb dieses Verlaufs zeigt sich im Temperaturbereich von 24°C bis 37°C der erwartete Funktionsverlauf. Im Temperaturbereich größer 37°C ist aufgrund der ermittelten optimalen und maximalen Temperatur jedoch eine sprunghafte Veränderung des Kurvenverlaufs festzustellen.

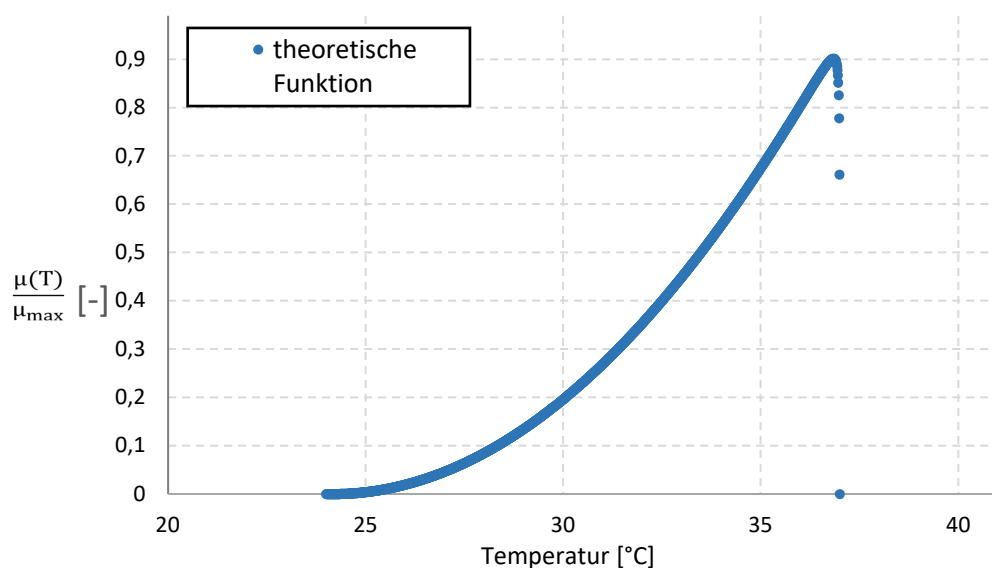


Abbildung 27: Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur auf Grundlage des Charakterisierungslaufs im Reaktor

Zur optimalen Versuchsplanung des Charakterisierungslaufes wurde die Fischer- Informations-Matrix, wie von Paquet-Durand et.al^{158,159}, Lindner et.al¹⁶⁰ und Ataíde et.al¹⁶¹ beschrieben, aufgestellt.

Optimale Versuchsplanung- Fischer- Informations-Matrix

Mit Hilfe dieser Matrix können die optimalen Temperaturen für die Ermittlung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde die Funktion

$$\mu(T) = \mu_{max} * \frac{(T - T_{MAX}) \cdot (T - T_{MIN})^2}{(T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot ((T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot (T - T_{OPT}) - (T_{OPT} - T_{MAX}) \cdot (T_{OPT} + T_{MIN} - 2 \cdot T))} \quad (6-1)$$

nach den vier Parametern T_{MIN} , T_{OPT} , T_{MAX} und μ_{MAX} abgeleitet, so dass sich folgende Gleichungen ergeben:

$$\frac{\partial \mu}{\partial T_{MIN}} = \frac{2 \cdot \mu_{MAX} (T - T_{OPT})^2 \cdot (T - T_{MAX}) \cdot (T_{MIN} + T_{MAX} - 2 \cdot T_{OPT}) \cdot (T_{MIN} - T)}{(T_{MIN} - T_{OPT})^2 \cdot ((T - T_{MAX}) \cdot T_{MIN} + (2 \cdot T_{MAX} - 3 \cdot T_{OPT}) \cdot T - T_{OPT} \cdot T_{MAX} + 2 \cdot T_{OPT}^2)^2} \quad (6-2)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial T_{OPT}} = \frac{2 \cdot \mu_{MAX} (T - T_{MIN})^2 \cdot (T - T_{MAX}) \cdot (T_{OPT} - T) \cdot (3 \cdot T_{OPT} - T_{MAX} - 2 \cdot T_{MIN})}{(T_{OPT} - T_{MIN})^2 \cdot (2 \cdot T_{OPT}^2 - (3 \cdot T + T_{MAX}) \cdot T_{OPT} + (2 \cdot T_{MAX} + T_{MIN}) \cdot T - T_{MIN} \cdot T_{MAX})^2} \quad (6-3)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial T_{MAX}} = \frac{2 \cdot \mu_{MAX} \cdot (T - T_{MIN})^2 \cdot (T - T_{OPT})^2}{(T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot ((2 \cdot T - T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot T_{MAX} + (T_{MIN} - 3 \cdot T_{OPT}) \cdot T + 2 \cdot T_{OPT}^2)^2} \quad (6-4)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial \mu_{MAX}} = \frac{(T - T_{MIN})^2 \cdot (T - T_{MAX})}{(T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot ((T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot (T - T_{OPT}) - (T_{OPT} - T_{MAX}) \cdot (T_{OPT} + T_{MIN} - 2 \cdot T))} \quad (6-5)$$

Die partiellen Ableitungen der Funktion weisen alle eine Abhängigkeit von der gesuchten Temperatur und den vier funktionsbeschreibenden Parametern auf, sodass die Fischer-Informationsmatrix FIM wie folgt aufgestellt wurde;

$$FIM = \frac{1}{\sigma^2} \sum_{k=1}^N \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}}\right)_k^2 & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}}\right)_k \\ \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}}\right)_k^2 & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}}\right)_k \\ \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}}\right)_k^2 & \left(\frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}}\right)_k \\ \left(\frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Min}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{opt}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}} \cdot \frac{\partial \mu}{\partial T_{Max}}\right)_k & \left(\frac{\partial \mu}{\partial \mu_{Max}}\right)_k^2 \end{bmatrix} \quad (6-6)$$

N entspricht der Anzahl der zu untersuchenden Temperaturen. In Anlehnung an die durchgeführten Experimente wurde von einer Anzahl $N = 4$ ausgegangen. Die, anhand der zuvor durchgeführten Reaktorversuchen bei konstanter Temperatur ermittelte Varianz der Messfehler ist durch σ^2 gegeben und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden;

$$\sigma^2 = (2 \cdot 10^{-24} \cdot T^{14,51})^2 \quad (6-7)$$

Für die, in den abgeleiteten Funktionen notwendigen Parameter T_{MIN} , T_{OPT} , T_{MAX} , μ_{MAX} wurden die experimentell ermittelten und in Tabelle 10 aufgeführten Werte eingesetzt.

In der Literatur zur optimalen Versuchsplanung werden verschiedene Optimierungskriterien angegeben. Beispielsweise lassen sich die optimalen Versuchsparameter durch die Maximierung der Determinante der FIM, dem sogenannten D-Kriterium, oder durch die Minimierung der Spur der Inversen FIM, dem A-Kriterium ermitteln. Die unter Anwendung des A- und D-Kriteriums ermittelten optimalen Temperaturen T1 - T4, zur Ermittlung der Parameter der $\mu(T)$ -Abhängigkeit, können der nachfolgenden Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: Optimale Versuchsplanung: ermittelte Temperaturen zur Charakterisierung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur

Bezeichnung	A-Kriterium	D-Kriterium
Temperatur T1 [°C]	25,35	25,35
Temperatur T2 [°C]	30,67	30,28
Temperatur T3 [°C]	38,29	39,24
Temperatur T4 [°C]	39,62	39,62

Zur Maximierung der Determinante bzw. Minimierung der Spur der inversen FIM wurden folgende Nebenbedingungen gewählt:

$$T_1 \leq T_2 \leq T_3 \leq T_4 \quad (6-8)$$

6.4 Funktionsfähigkeit der Zellzahlregelung

Den Vorversuchen nachfolgend, wurden die in Kapitel 6.3.1 dargestellten Ergebnisse, in das Programm der temperaturgesteuerten Zellzahlregelung implementiert und getestet. Aufgrund der Zielsetzung, den Zellzahlregler im Upstream-Prozess einzusetzen, nicht aber innerhalb des Produktionsreaktors zu verwenden, wurde zunächst ausschließlich die Funktionsfähigkeit der Regelung getestet. Nachfolgend wurde zusätzlich der Einfluss der Zellzahlregelung auf einen nachgeschalteten Produktionsprozess mit konstanter Prozesstemperatur untersucht. Zur Verifizierung der einzelnen Ergebnisse wurde in allen Prozessen Referenzkulturen im benachbarten Reaktor durchgeführt. Dieser wurde zeitgleich und mit denselben Zellen des eigentlichen Versuchsreaktors inokuliert. Die weitere Beschreibung der einzelnen Ergebnisse wird in den folgenden Unterkapiteln getrennt voneinander dargestellt.

6.4.1 Zellzahlregelung in der Vorkultur (n-1)

Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Zellzahlreglers, erfolgte innerhalb zweier zeitlich aufeinanderfolgenden Reaktorversuche.

Der erste Reaktorprozess RT1, startete mit einer initialen Zellkonzentration von $0,39 \times 10^6$ Zellen/ml. Die vom Anwender zu Prozessbeginn gewünschte Endzellkonzentration von $5,0 \times 10^6$ Zellen/ml sollte nach einer Prozessdauer von 3,96 d erreicht werden.

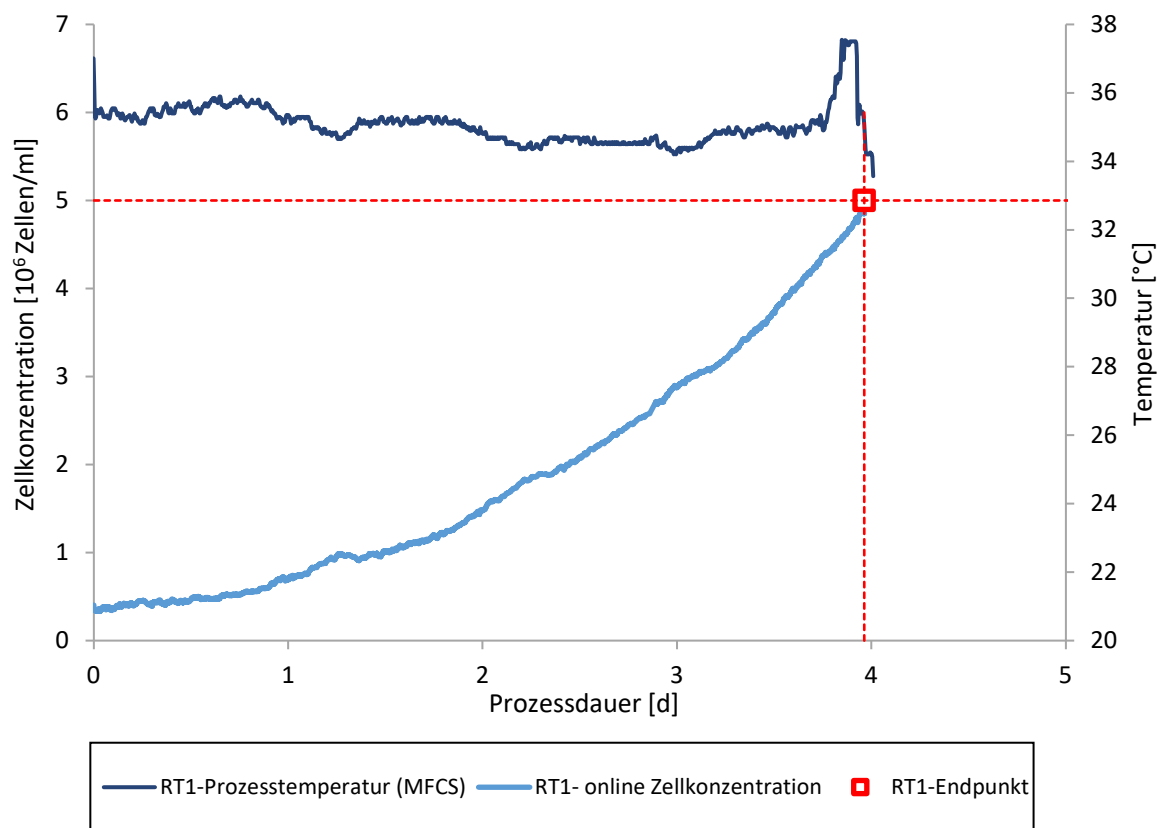


Abbildung 28: Ergebnisse der ersten zellzahlgeregelten Kultivierung RT1 mit dem Zellklon CHO-DP12

Im nachfolgenden Schritt wurde untersucht, inwieweit es mithilfe der Zellzahlregelung möglich ist, bei möglichst gleicher Initialzellkonzentration dieselbe Endzellkonzentration nach einer verlängerten Prozessdauer zu erreichen. Im Rahmen dessen sollte im nachfolgenden Kultivierungsprozess RT2, beginnend mit einer Startzellkonzentration von $0,38 \times 10^6$ Zellen/ml, nach der geplanten Prozessdauer, von 5,37 d ebenfalls eine Endzellkonzentration von $5,0 \times 10^6$ Zellen/ml erzielt werden. Abbildung 28 zeigt den Vergleich der Verläufe der online ermittelten Lebendzellkonzentration über die Zeit, sowie der zeitliche Verlauf der Prozesstemperatur der zellzahlgeregelten Kulturen RT1 und RT2.

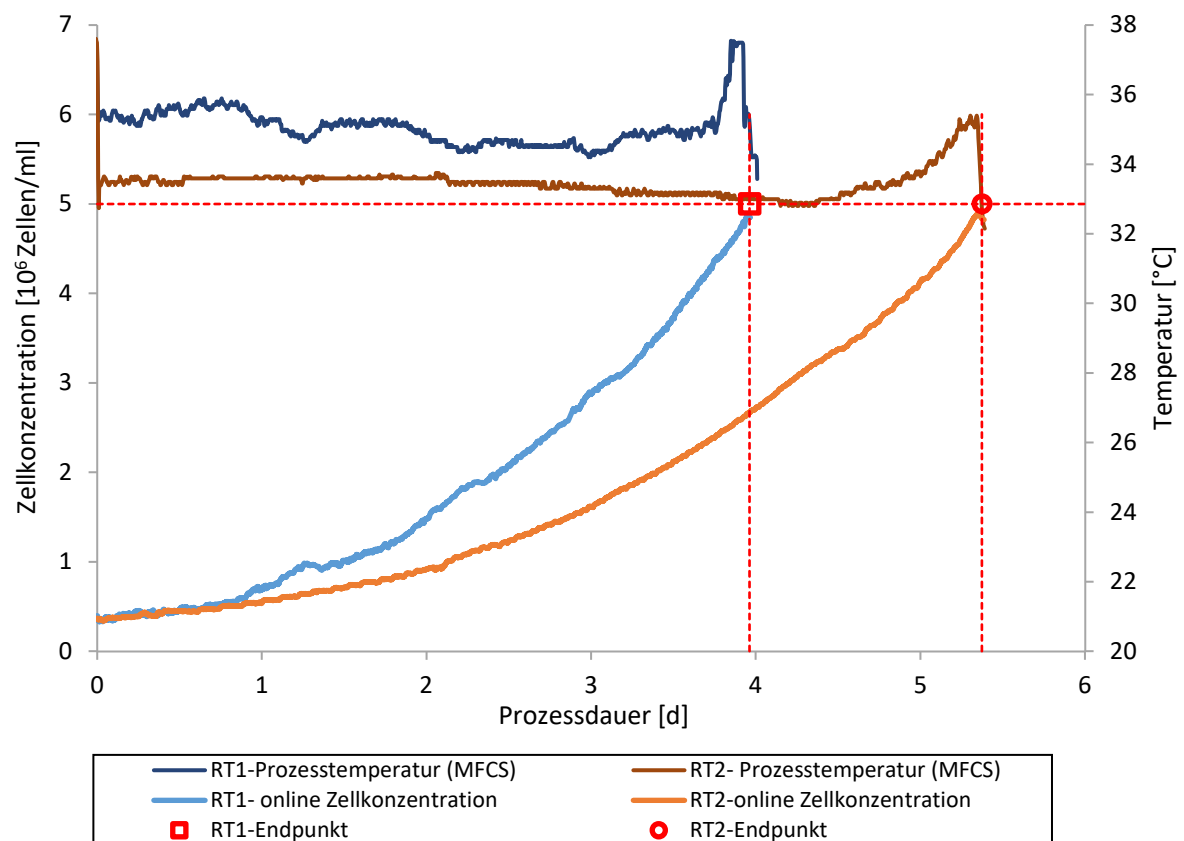


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der zellzahlgeregelten Reaktorkultur RT1 und RT2 durchgeführt mit dem Zellklon CHO-DP12 auf Basis der Vorversuche

Die in Abbildung 29 dargestellten Wachstumskurven der Reaktorversuche RT1 und RT2 weisen, den für die Zellkultur typischen exponentiellen Verlauf auf.

Aus den differenten Steigungen der beiden Kurvenverläufe werden unterschiedlichen Wachstumsraten ersichtlich. Des Weiteren kann Abbildung 29 entnommen werden, dass zu den geplanten Prozessendpunkten, Endzellkonzentrationen von (RT1) $4,85 \times 10^6$ Zellen/ml beziehungsweise (RT2) $4,83 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht wurden. Die zeitlichen Verläufe der Prozesstemperaturen weisen einen recht konstanten Verlauf auf. Innerhalb des Prozesses RT1 steigt die Temperatur gegen Prozessende in einem Zeithorizont von 0,16 d um $2,5^\circ\text{C}$ deutlich schneller an als im Prozess RT2. Hier konnte eine innerhalb der letzten 0,87 d ein stetiger Anstieg der Prozesstemperatur um $3,81^\circ\text{C}$ verzeichnet werden. Im Allgemeinen kann im Vergleich der beiden Reaktorläufe, innerhalb der RT1-Kultur ein leicht unruhigerer Verlauf der Zellkonzentration über die Zeit registriert werden, der in eine dezente Erhöhung der Temperaturschwankungen mündet.

6.4.2 Änderung der Endparameter während des Prozesses

Bei der Entwicklung des Zellzahlreglers, wurde die Erhöhung der Prozessflexibilität durch die variable Einstellung der Prozessenddaten während der laufenden Kultivierung als Ziel festgelegt. Aus diesem Grunde wurde innerhalb des Programms eine Möglichkeit geschaffen, die Prozessenddaten während der Kultivierung zu ändern. In zwei Reaktorversuchen wurde diese Funktion des Reglers unter Verwendung des aus den Vorversuchen gut bekannten Zellklons CHO-DP12 getestet. Zu diesem Zweck wurde die zu Prozessbeginn eingestellte Endzellkonzentration der Kulturen RT3 und RT4 in etwa zur Mitte der geplanten Prozessdauer herabgesetzt. Die Wachstumskurven, sowie die Verläufe der Prozesstemperaturen sind Abbildung 30 und Abbildung 31 zu entnehmen. Der Y-Achse der nachfolgenden Abbildungen kann der zeitliche Verlauf der Zellkonzentration entnommen werden. Die von der Software MFCS-DA (Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland) aufgezeichnete Prozesstemperatur ist auf der Y-Sekundärachse dargestellt.

Der erste Versuch dieser Versuchsreihe, mit den in Abbildung 30 dargestellten Ergebnissen, wurde mit einer Initialzellzahl von $0,31 \times 10^6$ Zellen/ml gestartet. Durch das rote Dreieck wird visualisiert, dass die zum Startzeitpunkt definierte Endzellkonzentration von $3,80 \times 10^6$ Zellen/ml nach einer Prozessdauer von 3,25 d erreicht werden sollte. Im Verlauf der Kultur wurde die angestrebte Endzellkonzentration, bei gleichbleibenden Endzeitpunkt, auf eine Konzentration von $3,00 \times 10^6$ Zellen/ml herabgesetzt. Die Änderung der Prozessenddaten wird insbesondere durch die sprunghafte Erniedrigung der Prozesstemperatur um $2,24^\circ\text{C}$ nach 1,84 d markiert. Des Weiteren ist bei der Betrachtung der online ermittelten Zellkonzentration über die Zeit, nach dem Änderungszeitpunkt, eine leicht reduzierte Steigung in der Wachstumskurve erkennbar. Die online ermittelte Endzellkonzentration betrug $3,13 \times 10^6$ Zellen/ml. Für die in Abbildung 30 nicht dargestellte offline ermittelte Endzellkonzentration konnte eine Konzentration von $3,10 \times 10^6$ Zellen/ml, gemessen mit dem ViCell, und $2,51 \times 10^6$ Zellen/ml, bestimmt unter Verwendung der Neubauerzählkammer, festgehalten werden. Da die Berechnung des Zellfaktors auf Basis der offline, mit dem ViCell ermittelten Initialzellkonzentration erfolgte, ist es nicht weiter überraschend, dass die online

gemessene Endzellkonzentration besser mit der ViCell-Messung als mit der Neubauerzählkammer-Messung korreliert.

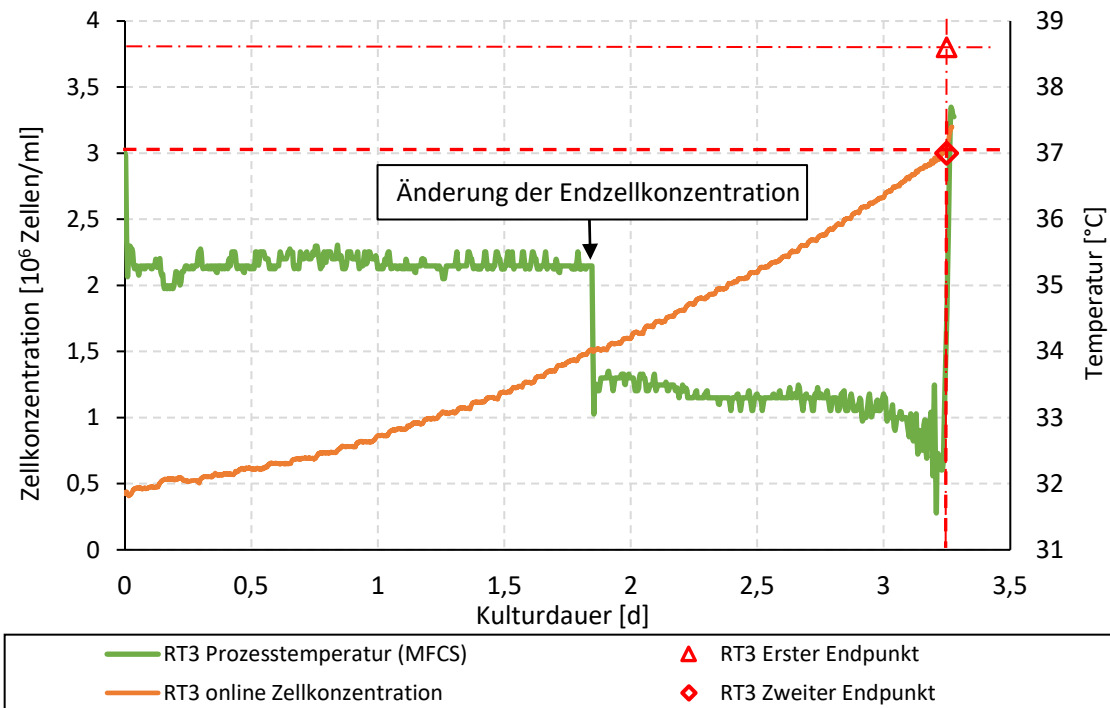


Abbildung 30: Änderung der gewünschten Endzellkonzentration innerhalb einer CHO-DP12 Kultur- RT3

Zur statistischen Absicherung der Versuchsergebnisse aus der Kultur RT3 wurde ein Wiederholungsversuch mit variierenden Prozessenddaten gestartet. Beginnend mit einer initialen Zellkonzentration von $0,38 \times 10^6$ Zellen/ml wurde, nach einer Prozessdauer von 4,25 d, eine Endzellkonzentration von $6,00 \times 10^6$ Zellen/ml angestrebt. Die Änderung der Endzellkonzentration auf eine gewünschte Konzentration von $4,00 \times 10^6$ Zellen/ml erfolgte nach einer Prozesslaufzeit von 2,13 d. Wie Abbildung 31 entnommen werden kann, wird der Änderungszeitpunkt durch eine sprunghafte Erniedrigung der Prozesstemperatur von 1,8 °C gekennzeichnet. Die online ermittelte Endzellkonzentration betrug $4,05 \times 10^6$ Zellen/ml. Die offline mittels ViCell und Neubauerzählkammer bestimmten Endkonzentrationen betrugen $4,58 \times 10^6$ Zellen/ml beziehungsweise $4,02 \times 10^6$ Zellen/ml. Wie bereits der Verlauf der Kultur RT3 zeigte, weist der Kurvenverlauf der online ermittelten Lebendzellkonzentration eine deutlich verringerte Steigung nach der Temperaturänderung auf.

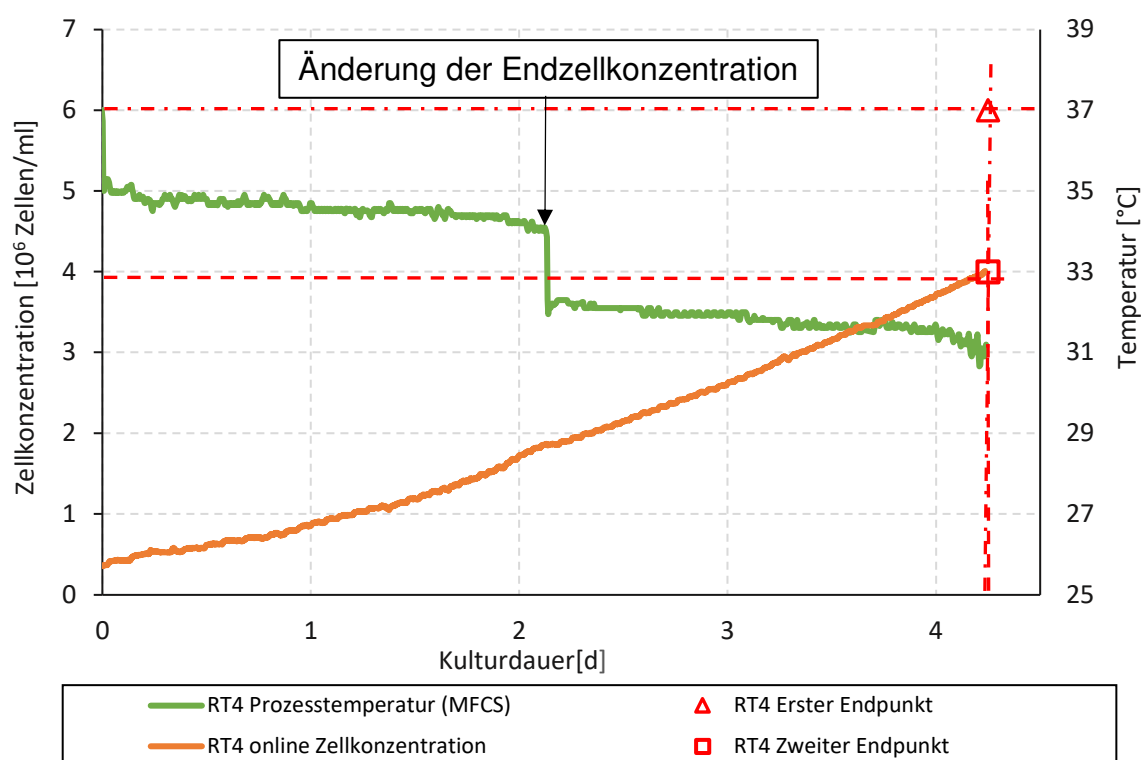


Abbildung 31: Änderung der gewünschten Endzellkonzentration innerhalb einer CHO-DP12 Kultur- RT4

Unabhängig von den zuvor in diesem Kapitel vorgestellten Versuchen, wurde innerhalb eines Prozesses mit dem CHO-C6000 Subklon DPO-KL, das Reglerverhalten bei Änderung aller Prozessenddaten untersucht. Mit einer Initialzellzahl von $0,63 \times 10^6$ Zellen/ml startend, wurde der erste, in Abbildung 32 durch ein rotes Dreieck markierte Prozessendzeitpunkt nach einer Kultivierungsdauer von 3,84 d und einer angestrebten Endzellkonzentration von $5,00 \times 10^6$ Zellen/ml festgelegt. Nach einer Prozessdauer von 1,21 d wurde die erwünschte Gesamtdauer der Kultivierung, um einen Tag auf 4,84 d und die angestrebte Endzellkonzentration auf $6,00 \times 10^6$ Zellen/ml erhöht. Der zweite und somit endgültige Prozessendpunkt, ist in der nachfolgenden Graphik durch ein rotes Quadrat gekennzeichnet. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die blaue Kurve, welche den zeitlichen Verlauf der online ermittelten Lebendzellkonzentration wiedergibt, im quadratischen Endzielpunkt mündet. Während die Temperatur innerhalb der zuvor dargelegten Versuche RT3 und RT4 unter Verwendung des CHO-DP12 Zellklons vor und nach der Änderung des Prozessendpunktes einen nahezu konstanten Verlauf aufweisen, weist die Prozesstemperatur der DRT1-

Kultivierung, dargestellt in der grauen Kurve, einen parabelförmigen Verlauf auf. Die in den Kulturen RT3 und RT4, durch die Änderung der Prozessendzellkonzentration initiierte, sprunghafte Erniedrigung der Temperatur mit einer Temperaturdifferenz von 2,5 °C beziehungsweise 1,8 °C ist im Temperaturverlauf der DRT1-Kultivierung mit 0,77 °C deutlich geringer ausgefallen.

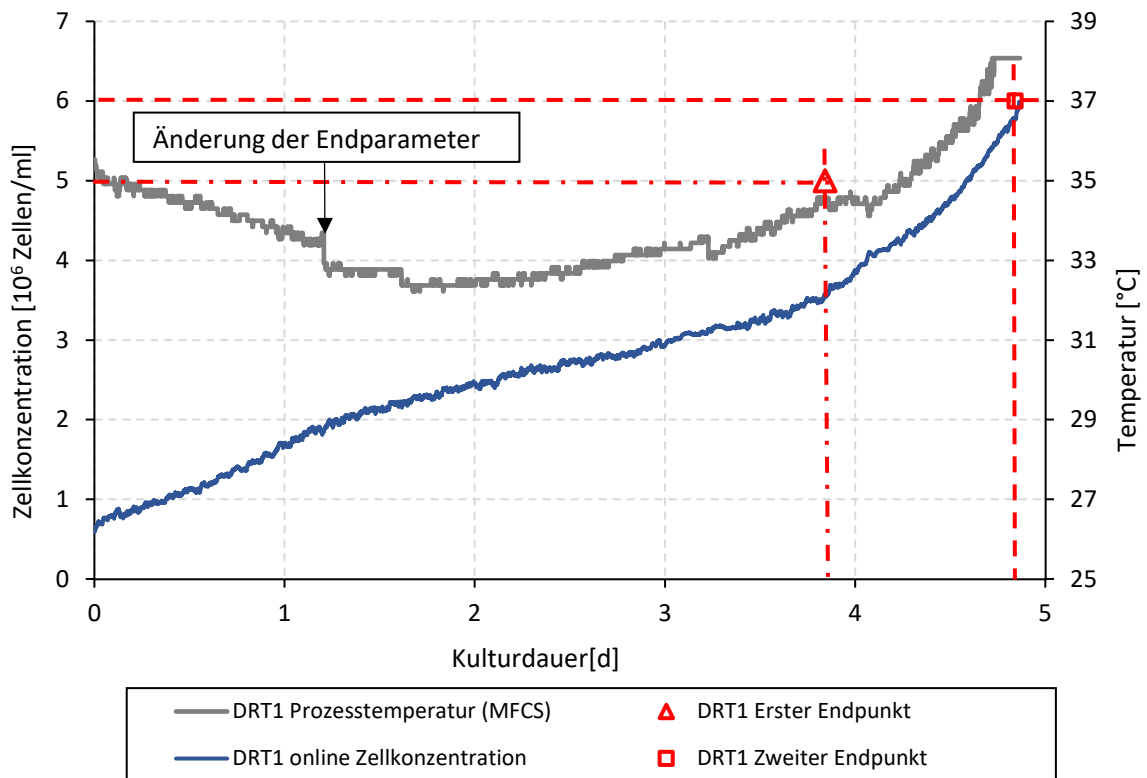


Abbildung 32: Änderung der Prozessenddaten während der Kultivierung des CHO-C6000 Subklons DPO-KL

6.4.3 Zellrast

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit geschildert, sind die Zellen in der aktuellen Praxis, beispielsweise innerhalb von Perfusionsprozessen für Temperaturschwankungen mit minimalen Temperaturen von etwa 20°C ausgesetzt^{162–165}. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass eine kurzzeitige Verringerung der Reaktortemperatur in der gängigen Praxis der Industrie akzeptiert wird, und die Auswirkungen der kurzzeitigen Temperaturänderung, zum Beispiel auf die Produktqualität und die biologische Reaktion der Zellen, gut untersucht sind^{19,166–173}. Aus den geschilderten Gründen wurde versucht die Zeitspanne, in der

die Zellen niedrigeren Temperaturen ausgesetzt sind, zu verringern und möglicherweise auftretende negative Effekt einer längeren Kultivierung bei niedrigen Temperaturen auf die Zelle zu vermeiden oder zu vermindern. Im nachfolgenden Versuch wurde eine sogenannte Zellrast getestet. Mit dem Ziel die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten, das Zellwachstum jedoch für eine geringe Zeitspanne auf ein Minimum zu begrenzen, wurde ab einer vom Programm berechneten notwendigen Temperatur kleiner 34 °C, ein Temperatursetpoint von 24 °C an das Prozessleitsystem weitergeleitet. Stieg die zum Erreichen des Endpunktes notwendige Prozesstemperatur im Verlauf der Kultivierung auf eine Temperatur größer 34 °C, wurde die Zellrast beendet, und die vom Programm berechnete notwendige Temperatur zum Erreichen der gewünschten Endzellkonzentration eingestellt. Zur Vermeidung einer zu abrupten Temperaturänderung erfolgte die Temperaturerhöhung respektive Verringerung mit einer Änderungsrate von 4 °C/h.

Um die Auswirkungen der Zellrast auf die Zellzahlregelung zu untersuchen, wurde, innerhalb einer Reaktorkultivierung des CHO-C6000 Subklons DPO-KL, der gewünschte Prozessverlauf durch die Eingabe der offline ermittelten Initialzellzahl von $0,38 \times 10^6$ Zellen/ml und die nach einer Prozessdauer von 3,87 d zu erreichende Endzellkonzentration von $3,00 \times 10^6$ Zellen/ml definiert. Abbildung 33 zeigt die zeitlichen Verläufe sowohl der online und offline ermittelten Lebendzellkonzentration, als auch der Prozesstemperatur dieses Versuches DRT2.

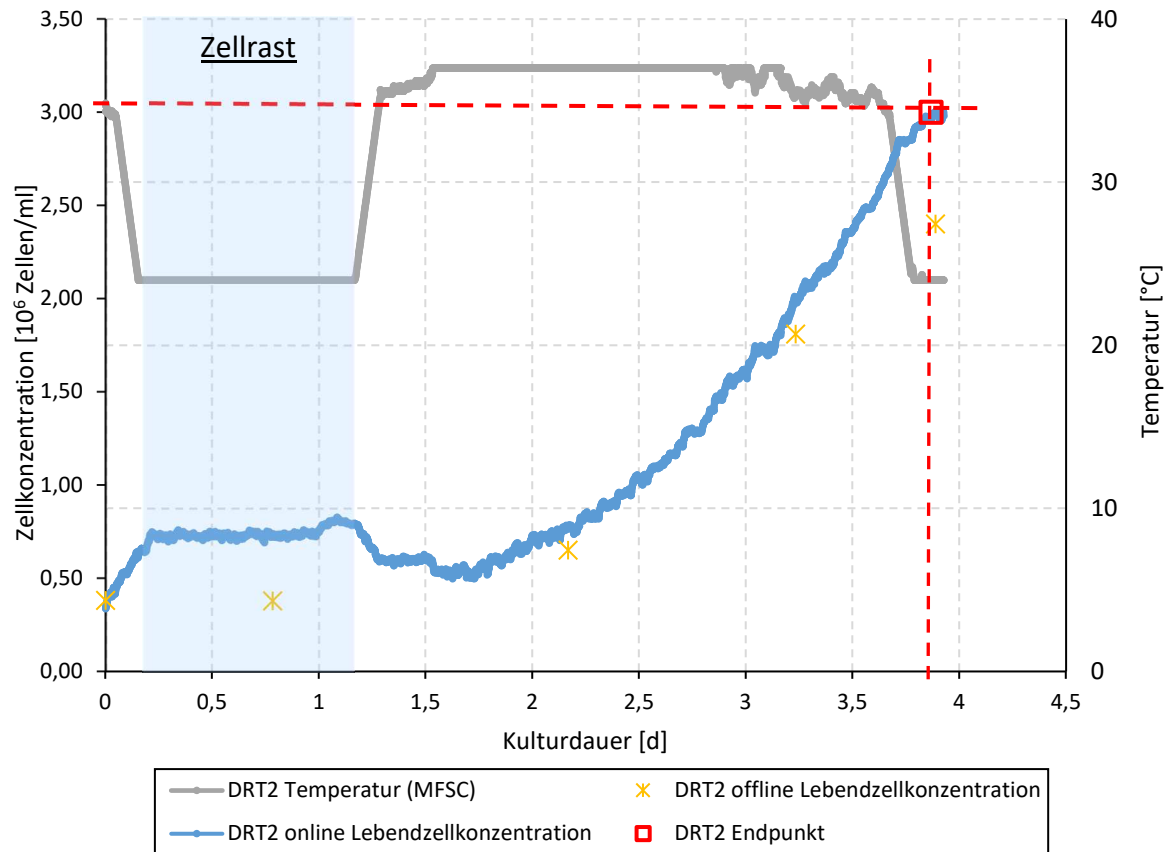


Abbildung 33: Reaktorkultivierung des C6000-CHO Subklons DPO-KL mit Zellrast

Wie sich dem in grau dargestellten Verlauf der Prozesstemperatur aus Abbildung 33 entnehmen lässt, startete die Phase der Zellrast zu Beginn der Kultivierung. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 1,01 d mit einer eingestellten Temperatur von 24 °C kultiviert. Nachfolgend stieg die errechnete Temperatur auf 37 °C an und sank zum Abschluss des Prozesses, vor dem Erreichen der online gemessenen Endzellkonzentration, erneut auf 24 °C herab. Der Verlauf der online ermittelten Zellkonzentration überrascht, unter Berücksichtigung des Kapitels 6.2 durch eine augenscheinlich enorme Abhängigkeit der Permittivität von der Temperatur. Diese wird insbesondere im Vergleich des zeitlichen Temperaturverlaufs und des online ermittelten Verlaufs der Zellkonzentration deutlich. Die Permittivität und somit die daraus berechnete Zellkonzentration steigt analog zum Abfall der Prozesstemperatur an und sinkt ebenso gegenläufig bei Erhöhung der Prozesstemperatur wieder ab. Verstärkt wird der Eindruck einer bestehenden Abhängigkeit der online Zellzahlmessung und der Prozesstemperatur durch die konstante, mit orangenen Sternen gekennzeichnete, zusätzlich offline ermittelte Zellkonzentration innerhalb der Zellrast. Nach dem Einstellen einer konstanten

Temperatur von 37 °C, entsprechen die online und offline ermittelten Zellkonzentrationen einander. Erst mit Reduktion der Prozesstemperatur gegen Ende der Kultur sind erneut Abweichungen von 20 % zwischen den online und offline ermittelten Lebendzellkonzentrationen zu verzeichnen.

6.5 Zellzahlregler mit iterativ-adaptiver online Optimierung

Wie Anfangs dargestellt, bestand bei der Entwicklung des Zellzahlreglers das Ziel, einen möglichst flexiblen Regler zu entwickeln, der etwaige Änderungen des Zellwachstums über die Dauer der Subkultivierungen kompensiert und ohne viel Aufwand für verschiedene Zelllinien und Zellklone eingesetzt werden kann. Um den im Regler implementierten und in Abschnitt 5.3 beschriebenen iterativen Optimierungsalgorithmus zu testen, wurde der Zellzahlregler ohne jegliche Vorversuche in Prozessen mit dem CHO-Zellklon DPO-KL getestet. Abbildung 34 zeigt den Verlauf der vom Regler über die vier Versuche ermittelten Parametersätze. Der erste blau gestrichelte Balken verdeutlicht den für die Regelung des ersten Prozesses angenommenen Parametersatz. Dieser entspricht den gerundeten Parametern der zuvor innerhalb der Projektes ermittelten Werte des Zellklons CHO-DP12. Der in Rot dargestellte Balken zeigt die aktuellen und für den Folgeprozess berechneten Parameter, den fünf ausgefüllten blauen Balken können die vom Regler automatisch angepassten Parameter entnommen werden. Die Intensität der einzelnen Blautöne verdeutlicht dabei die unterschiedliche Wichtung der einzelnen Werte für die Berechnung des Parametersatzes des Folgeprozesses. Die Wichtung der einzelnen Werte orientiert sich am Datum und der Aktualität der einzelnen ermittelten Werte, sodass der im ersten Parametersatz in der Berechnung des letzten Satzes die geringste Wichtung erfährt. Des Weiteren kann der Abbildung 34 entnommen werden, dass die Anzahl der ermittelten Parametersätze nicht zwingendermaßen von der Anzahl der Prozesse abhängig ist, sondern vom Verlauf der einzelnen Kulturen. So konnten im Prozess DPO-R3 zwei Parametersätze ermittelt werden.

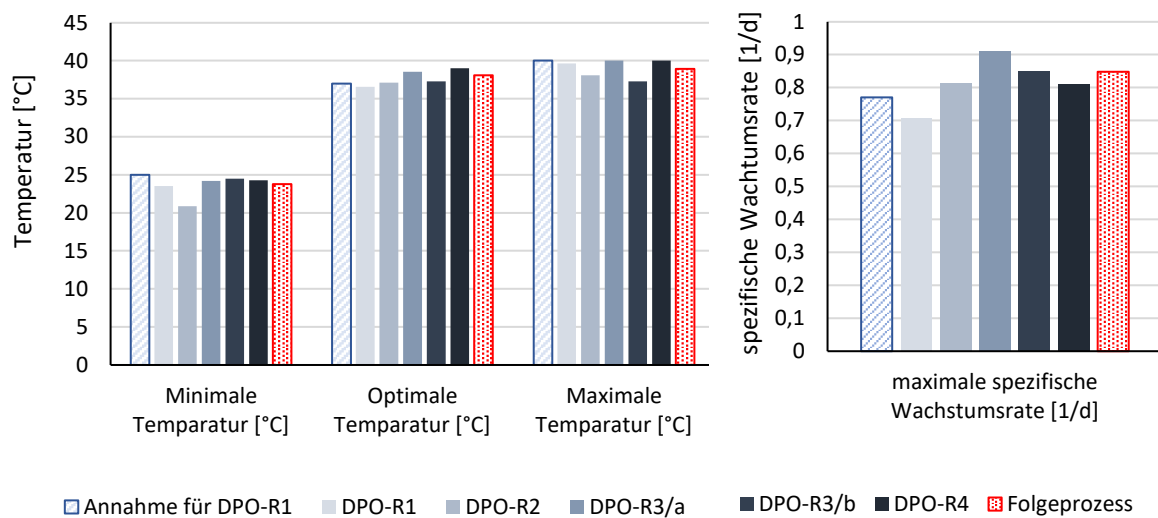


Abbildung 34: Ermittelte Parameter des iterativen Regelalgorithmus, innerhalb der Kulturen des CHO-Subklons DPO-KL

In Bezug auf die maximale spezifische Wachstumsrate wurde vom Regelalgorithmus, im Vergleich zur CHO-DP12 Zelle, für den CHO-Subklon DPO-KL ein leicht erhöhter Wert festgestellt. Dieser Trend entspricht den Erfahrungen aus dem Wachstumsverhalten beider Zellklone im Erlenmeyerkolben. Auch innerhalb des Anzuchtprozesses wies der Zellkon DPO-KL eine, im Vergleich zur CHO-DP12 Zelle höhere spezifische Wachstumsrate auf.

Um die Funktionsweise des iterativen Regelalgorithmus zu bewerten, wurden die relativen Abweichungen der online Messwerte von der Zielzellkonzentration in Abbildung 35 gemäß den einzelnen Prozessen durch blaue Balken grafisch dargestellt. Der Verlauf der blauen Balken verdeutlicht, dass in dem ersten und im dritten Prozess die Abweichungen der online ermittelten Zellkonzentration von der angestrebten Zielzellkonzentration am Größten war, jedoch kein Trend einer präziser werdenden Regelung zu erkennen ist. Dieses wäre der Fall, wenn die angesprochenen Abweichungen mit Zunahme der Prozessstufen kontinuierlich abnehmen oder zumindest stagnieren würden.

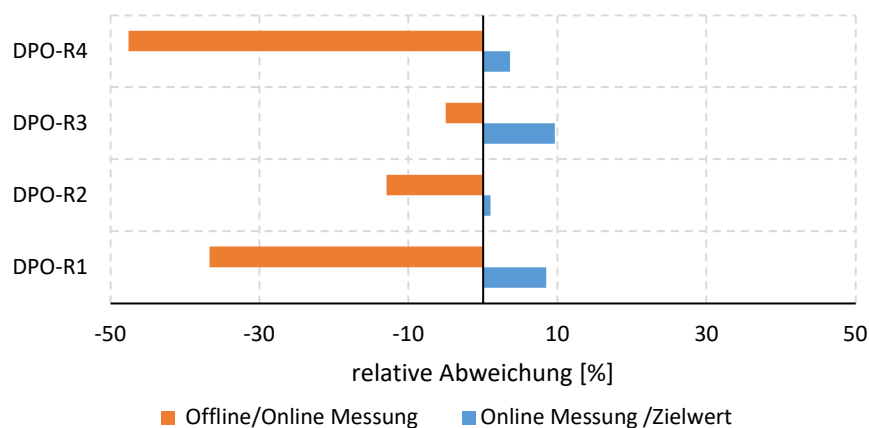


Abbildung 35: Relative Abweichungen der Online-Messwerte der Zellkonzentration zum geplanten Prozessendzeitpunkt von der Zielzellkonzentration, sowie die relativen Abweichungen der offline und online Messwerte der Zellkonzentration der Prozesse des CHO-Subklons DPO-KL

Zur weiteren Analyse der Funktionsweise des iterativen Regelalgorithmus wurden die relativen Abweichungen der Offline- und Online-Messungen, in Abbildung 35 orange dargestellt, berechnet. Im Rahmen dessen, zeigte sich innerhalb der ersten drei Prozesse eine Abnehmende Abweichung der offline ermittelten Messwerte von den Online-Messungen, sodass in der dritten Prozessstufe die Richtigkeit der Online - Messung augenscheinlich am besten war. Im vierten Prozess konnte jedoch erneut eine massive Differenz zwischen den Online- und Offline-Messwerten aufgezeigt werden.

6.6 Reproduzierbarkeit der Zellzahlregelung

Eines der Hauptkriterien in der Funktionalitätsprüfung des Reglers lag in der Reproduzierbarkeit des zu erreichenden Endpunktes. In einer Replikationsstudie wurde die Regelung mit unterschiedlichen Startzellkonzentrationen und variabel gesetzten Endparametern getestet. Zur Überprüfung der Wiederholgenauigkeit wurde die relative Zellkonzentration sowie die relative Kulturdauer, bezogen auf der definierten Endzellkonzentration respektive den Endzeitpunkt berechnet. Für diese Untersuchung wurden alle Versuche analysiert die innerhalb des Projektes mit der Zelle CHO-DP12 durchgeführt wurden. Demzufolge beinhalten die Ergebnisse sowohl jene Versuche, die auf Basis der Vorversuch- und des Charakterisierungslaufs zur Ermittlung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate durchgeführt wurden, als auch jene Kulturen die eine Änderung der

Endparameter im laufenden Prozess beinhalten. Die resultierenden Kurvenverläufe sind Abbildung 36 zu entnehmen.

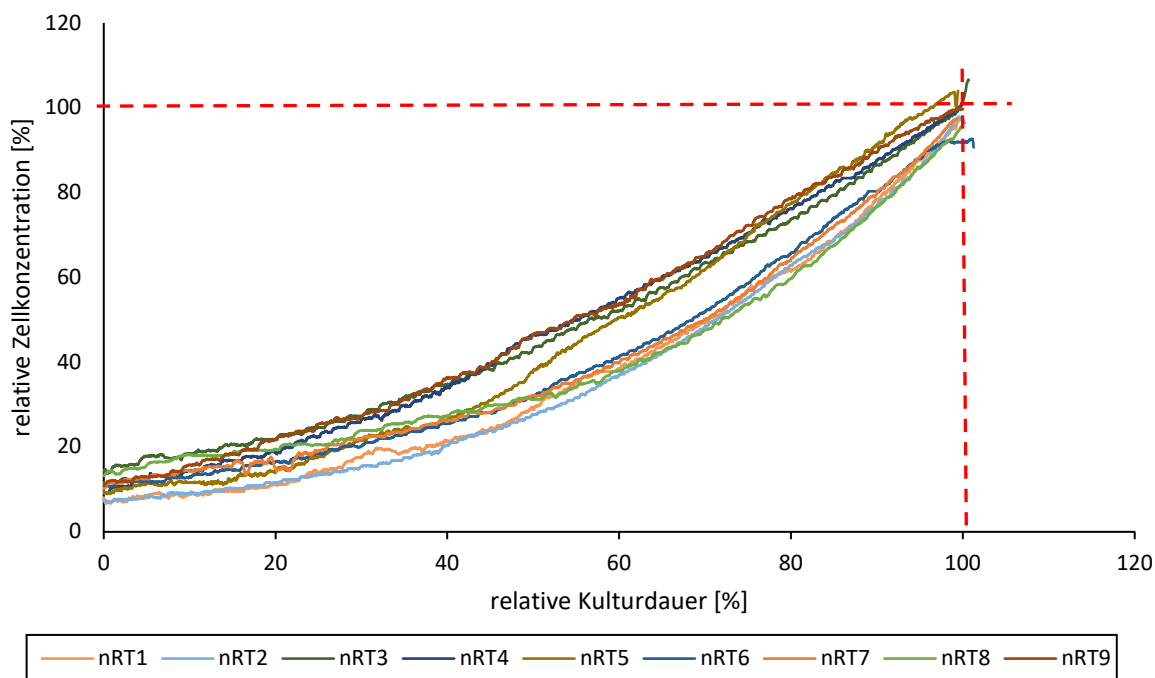


Abbildung 36: Ergebnisse der Reproduktionsstudie unter Verwendung des Zellklons CHO-DP12; n = normierten Prozessdaten. Die Normierung erfolgte auf die gewünschte Endzellkonzentration respektive den geforderten Endzeitpunkt.

Die mit dem Zellklon CHO-DP12 durchgeführte Reproduktionsstudie ergab eine maximale Abweichung zwischen der erreichten Endzellkonzentration und der zu Prozessbeginn festgelegten Zielzellkonzentration von 8 %. Abbildung 36 kann zudem entnommen werden, dass die Zielzellkonzentration zum definierten Endzeitpunkt, in den meisten Fällen minimal unterschritten wurde. Lediglich in einem Fall (nRT5) wurde die gewünschte Endzellkonzentration überschritten.

Analog zu den Kulturen mit der CHO-DP12 Zelle wurden, innerhalb der Projektes, Versuche mit dem Subklon DPO-KL durchgeführt. Anschließend wurde hiermit auch die Reproduzierbarkeit der Regelung untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen mit der CHO-DP12 Zelle, wurden jedoch alle Versuche mit dem Subklon DPO-KL ohne eine vorherige Ermittlung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate durchgeführt. Des Weiteren beinhalten die ausgewerteten Versuche zwei Versuche mit einem normalen Verlauf

(ohne jegliche Änderungen im Prozess), einen Versuch mit induzierter Zellrast, sowie einen Versuch mit Änderung der definierten Endparameter innerhalb des laufenden Prozesses. Die relativen Verläufe der online ermittelten Zellkonzentration über die relative Kulturdauer kann Abbildung 37 entnommen werden.

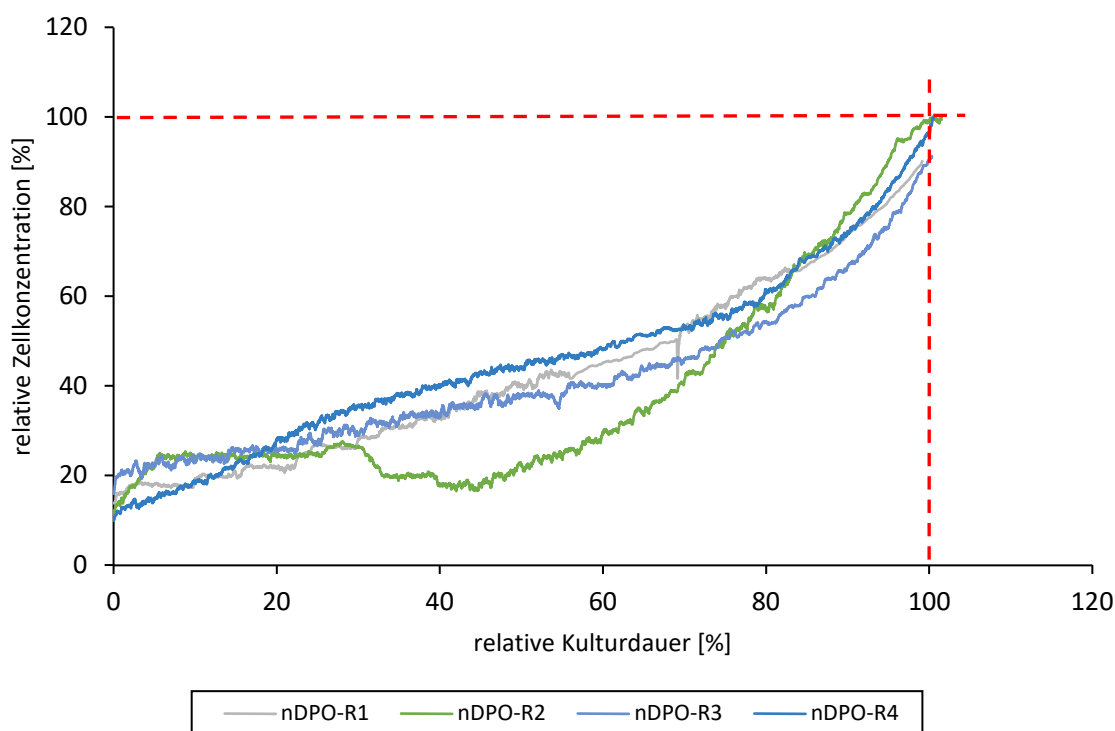


Abbildung 37: Reproduktionsstudie Zellklon C6000 CHO Subklon DPO-KL; n= normierte Prozessdaten. Die Normierung erfolgte auf die gewünschte Endzellkonzentration respektive den geforderten Endzeitpunkt. Der Verlauf der Kultur nDPO-R2 weicht aufgrund der durchgeführten Zellrast deutlich von den drei weiteren Kulturen ab.

Im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit konnte, mit fiktiv angenommenen Regelparametern, eine maximale Abweichung von der Zielzellkonzentration von 10 % verzeichnet werden. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe der Versuche nDPO-R2 und nDPO-R4 sind auf initiierte Zellrast sowie die Veränderung der Endparameter im laufenden Prozess zurückzuführen. Ebenso, wie in den Versuchen mit der CHO-DP12 Zelle, wird die Zielzellkonzentration stets unterschritten.

6.7 Einfluss der Zellzahlregelung auf nachfolgende Prozesse

Die Zellzahlregelung wurde für den Einsatz innerhalb der Inokulationsstrecke entwickelt. Zum Ausschluss eines möglicherweise negativen Einflusses auf eine nachgeschaltete Produktionsstufe wurde einigen geregelten Kulturen ein Prozess unter produktionsähnlichen Bedingungen nachgeschaltet. Aufgrund der nicht durchgeführten Maßstabsvergrößerung zwischen der Vorkultur und dem nachfolgenden Prozess, jedoch einer konstanten Prozesstemperatur, ist von produktionsähnlichen Bedingungen auszugehen.

Innerhalb dieser Versuche wurde untersucht, in wie weit sich eine vorschaltete zellzahlgeregelte Vorkultur sich auf die spezifische Wachstumsrate und den Stoffwechsel eines produktionsähnlichen Prozesses auswirkt. Die Ergebnisse der biologischen Reaktionen beispielsweise der Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten werden in Abschnitt 6.8 dieser Arbeit aufgezeigt.

Die mittleren spezifischen Wachstumsraten der produktionsähnlichen Prozesse mit vorgelagertem zellzahlgeregeltem Prozess (SP RT) und Vorkultur bei einer konstanten Temperatur von 37 °C (SP REF RT) beider untersuchter Zellklone können Abbildung 38 entnommen werden.

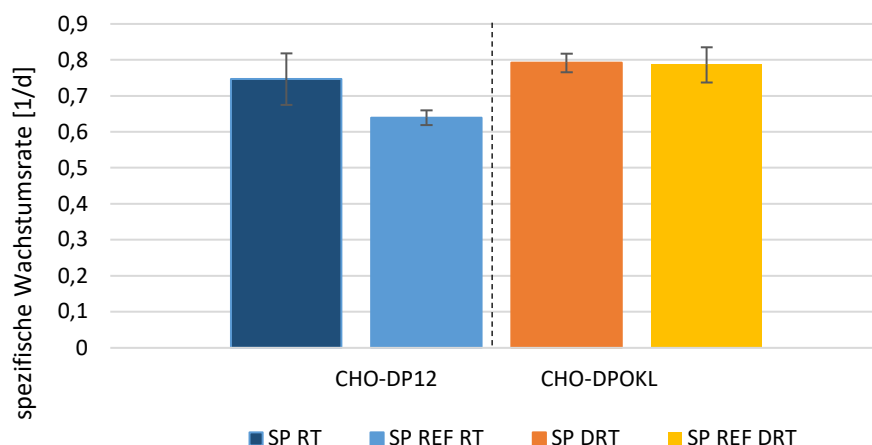


Abbildung 38: Mittleren spezifischen Wachstumsraten der produktionsähnlichen Prozesse mit (SP RT, SP DRT) und ohne (SP REF RT, SP REF DRT) zellzahlgeregelter Vorkulturen der Zellklone CHO-DP12 (Replikationen n=4) und CHO-DPO KL (Replikationen n=4).

Im Vergleich der mittleren spezifischen Wachstumsraten der produktionsähnlichen Prozesse mit und ohne zellzahlgeregelter Vorkultur kann im Fall des Zellklons CHO-DP12 mit einer Zellzahlgeregelten Vorkultur eine leicht erhöhte mittlere spezifische

Wachstumsrate im produktionsähnlichen Prozess festgestellt werden. Die erhöhte mittlere spezifische Wachstumsrate geht jedoch auch mit einer erhöhten Standardabweichung einher, welche durch die Fehlerbalken dargestellt ist. Im Fall der CHO-DPO KL Kulturen unterscheiden sich die mittleren spezifischen Wachstumsraten mit und ohne zellzahlgeregelter Vorkultur im produktionsähnlichen Prozess nicht. Hier zeigt sich ein leicht erhöhter Fehlerbalken bei den Kulturen mit zellzahlungeregelter Vorkultur.

6.8 Untersuchung der biologischen Parameter

Wie bereits in Kapitel 3.1.4 dargelegt, führt das Absenken der Prozesstemperatur zu einer zellklonabhängigen Anpassung des Metabolismus und einem vermehrten verbleiben in der G0-Phase des Zellzyklus. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der metabolischen Analysen, sowie die Zellzyklus- und Apoptose Assays, bei konstant niedriger Prozesstemperatur, mitlaufender Regelung und innerhalb eines angeschlossenen produktionsähnlichen Prozessschrittes dargelegt.

6.8.1 Metabolische Auswirkungen erniedrigter Prozesstemperaturen

Im Zusammenhang mit den Versuchen zur Ermittlung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate, wurde die metabolische Anpassung des Zellklons CHO-DP12 an konstant niedrige Prozesstemperaturen im Reaktor untersucht. Im Rahmen dessen wurden die Glukose- und Laktatkonzentrationen der externen Proben bestimmt und die spezifischen Glukoseverbrauchsraten q_{GLC} respektive die Laktatbildungsraten q_{LAC} für vier äquidistant verteilte Temperaturen im Bereich von 31 °C bis 37 °C berechnet. Abbildung 39 können die mittleren spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten sowie die mittleren maximalen spezifischen Reaktionsraten $MW_{\mu_{MAX}}$ der unterschiedlichen Temperaturen entnommen werden. Verbrauchsdaten sind in der Abbildung 39 durch die negativen Vorzeichen gekennzeichnet, während die Laktatbildungsraten positive Vorzeichen besitzen.

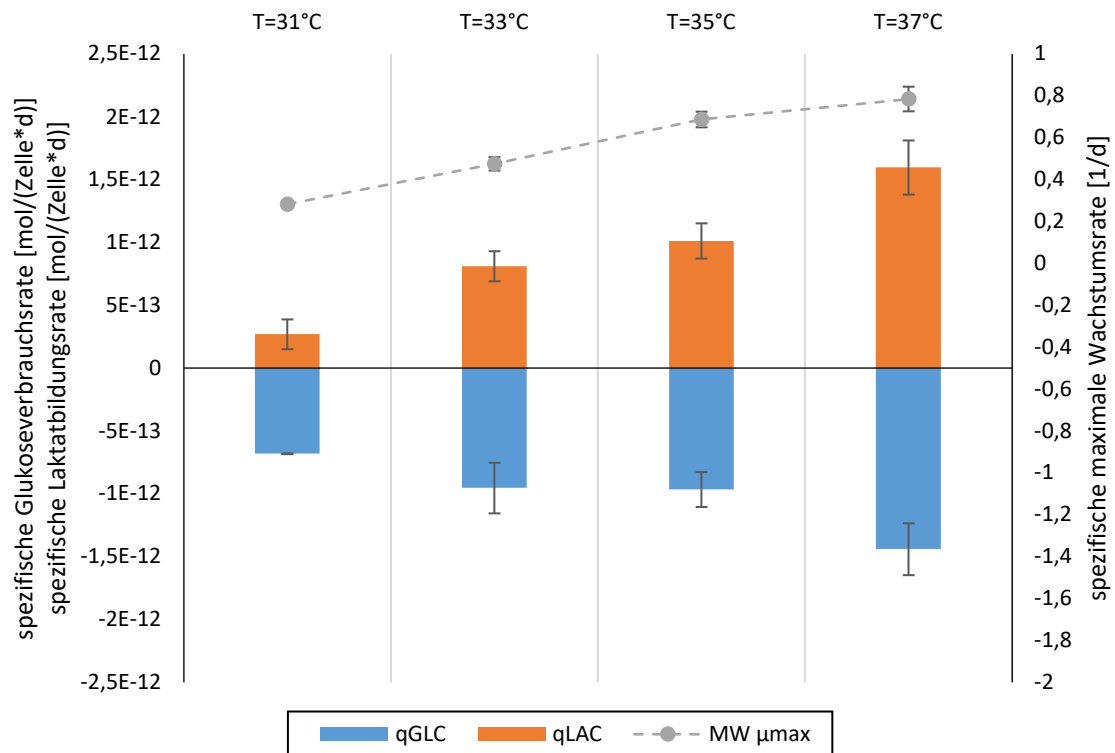


Abbildung 39: Spezifische Glukoseverbrauchsrate und Laktatbildungsrate im Reaktorversuch bei unterschiedlichen konstanten Temperaturen. Die Versuchszahl n betrug bei einer Temperatur $T=31\text{ °C}$ $n=3$, $T=33\text{ °C}$ $n=6$, $T=35\text{ °C}$ $n=6$, $T=37\text{ °C}$ $n=8$

Neben der Bereits zuvor beschriebenen reduzierten spezifischen Wachstumsrate bei Temperaturen kleiner 37 °C kann ebenso eine Verringerung der spezifischen Glukoseverbrauchs- sowie Laktatbildungsrate verzeichnet werden. Des Weiteren ist die, in Relation zur Glukoseverbrauchsrate, deutlich stärker zunehmende Laktatbildungsrate bei steigender Temperatur auffällig. Zur Überprüfung dieses Eindrucks wurde der zellspezifische, relative Umsatz von Glukose in Laktat gemäß folgender Gleichung berechnet.

$$\text{relativer Umsatz}_{GLC/LAC}[\%] = \frac{q_{LAC} \left[\frac{\text{mol}}{\text{Zelle} \cdot d} \right]}{|q_{GLC}| \left[\frac{\text{mol}}{\text{Zelle} \cdot d} \right]} \cdot 100\% \quad (6-9)$$

Ein Vergleich der relativen, zellspezifischen Größen für den Glukose/Laktat-Umsatz und der Wachstumsrate in Bezug zur Prozesstemperatur, kann Abbildung 40 entnommen werden.

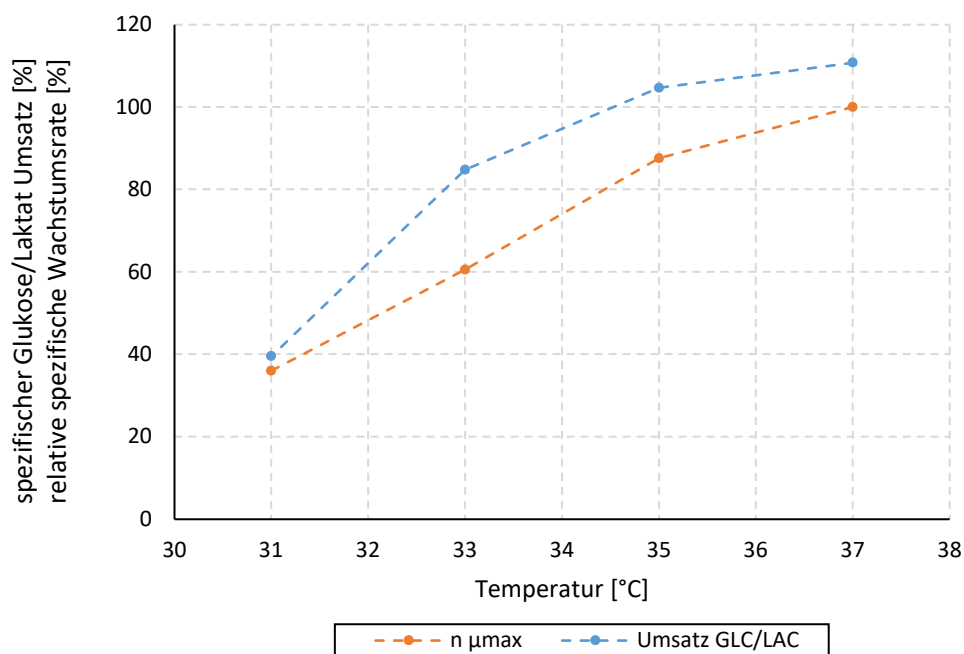


Abbildung 40: Relativer spezifischer Glukose/Laktat Umsatz im Vergleich mit der relativen spezifischen Wachstumsrate

Aus Abbildung 40 wird ersichtlich, dass eine Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 31 °C, in einer Reduktion der maximalen spezifischen Wachstumsrate von 64 % und einer Verringerung der spezifischen Glukoseverbrauchsrate von 52,7 % mündet. Infolgedessen wird, bei einer Prozesstemperatur von 31 °C lediglich 40 % der Glukose in Laktat umgesetzt, während die mittlere spezifische Laktatbildungsrate bei 37 °C die mittlere spezifische Glukoseverbrauchsrate übersteigt und somit augenscheinlich mehr Laktat gebildet als Glukose verbraucht wird.

Des Weiteren wurden die spezifischen Glutaminverbrauchsrate, sowie die Ammoniumbildungsrate berechnet. Aufgrund der thermischen Instabilität des Glutamins, wurden die von den Zellen umgesetzte Glutaminkonzentration durch Subtraktion der thermisch abgebauten Glutaminkonzentration von den gemessenen Substratkonzentrationen berechnet. Im Weiteren folgte die in Kapitel 4.3.5 beschriebene Ermittlung der spezifischen Glutaminverbrauchs- und Ammoniumbildungsrate. Zur Verdeutlichung der Größenordnung des thermisch abgebauten Glutamins werden in der nachfolgenden Abbildung 41 neben den spezifischen Verbrauchs- und Bildungsrate, die spezifischen Akkumulationsrate

aufgezeigt. In Abbildung 41 sind die spezifischen Verbrauchsrate q_{GLN} und q_{NH4} flächig ausgefüllt, während die schraffierten Flächen den auf die Zelle bezogenen thermischen Abbau des Glutamins r_{GLN} und die daraus resultierende Ammoniumbildung r_{NH4} beschreiben. Die auf Grundlage der reinen Messwerte und ohne Berücksichtigung der thermischen Degradation berechneten zellspezifischen Akkumulationsraten, beziehungsweise Abbauraten bei unterschiedlichen Temperaturen werden durch die Gesamthöhe der einzelnen Balken wiedergegeben. Um die spezifischen Verbrauchs- und Bildungsrate mit der spezifischen Wachstumsrate zu korrelieren, wurde in der nachfolgenden Abbildung 41 die spezifische Wachstumsrate in Form eines Punktlinien-Diagramms dargestellt.

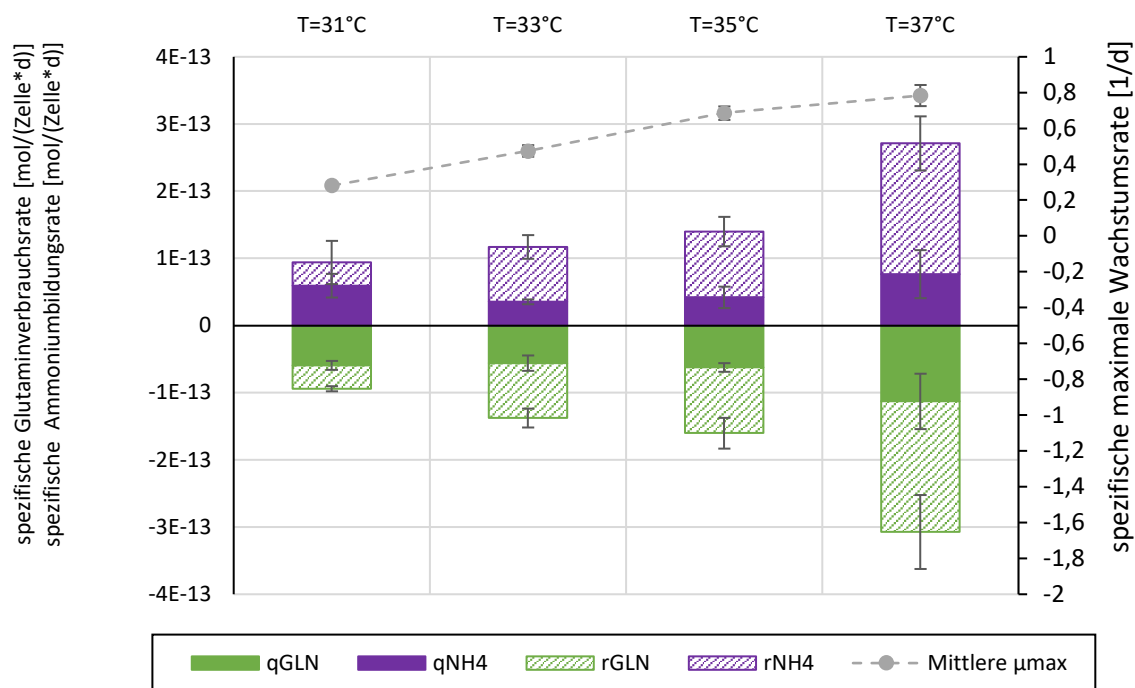


Abbildung 41: Spezifische Glutaminverbrauchsrate und Ammoniumbildungsrate (ausgefüllte Balken) bei unterschiedlichen konstanten Prozesstemperaturen im Vergleich mit der spezifische Akkumulationsrate von Glutamin und Ammonium (schraffierte Balken). Die Versuchszahl n betrug bei einer Temperatur $T=31^{\circ}\text{C}$ $n=3$, $T=33^{\circ}\text{C}$ $n=6$, $T=35^{\circ}\text{C}$ $n=6$, $T=37^{\circ}\text{C}$ $n=8$

Wie Abbildung 41 zu entnehmen ist, kann in einem Temperaturbereich von 31°C – 35°C und unter Berücksichtigung der Fehlerbalken, keine nennenswerte Änderung der spezifischen Glutaminaufnahmerate festgestellt werden. Lediglich bei einer Temperatur von 37°C ist eine, im geringen Maße erhöhte

Glutaminaufnahmerate zu verzeichnen. In Bezug auf die Gesamtakkumulationsraten ist ein mit der Temperatur deutlich steigender spezifischer Glutaminabbau zu verzeichnen. In Anbetracht der Relation der zellspezifischen Raten des Glutaminverbrauchs und der Ammoniumbildung überwiegt in einem Temperaturbereich von 37 °C – 33 °C der Glutaminverbrauch. Diese Beobachtung bestätigt sich auch bei der Betrachtung des nachfolgend in Abbildung 42 dargestellten relativen Glutamin-Ammonium-Umsatzes über die Prozesstemperatur. Innerhalb dieser Grafik wird deutlich, dass in dem angesprochenen oberen Temperaturbereich im Schnitt 66% des von einer Zelle aufgenommenen Glutamins zu Ammonium umgesetzt werden. Lediglich bei 31°C wurde gleichermaßen Glutamin von den Einzelzellen aufgenommen, wie Ammonium ins Medium sekretiert. Der erhöhte Glutaminabbau in Verhältnis zur Ammoniumbildung kann ebenso bei der Betrachtung der Reaktionsraten, also der aus den tatsächlich gemessenen Stoffkonzentrationen berechneten Abbau und Bildungsrate beobachtet werden.

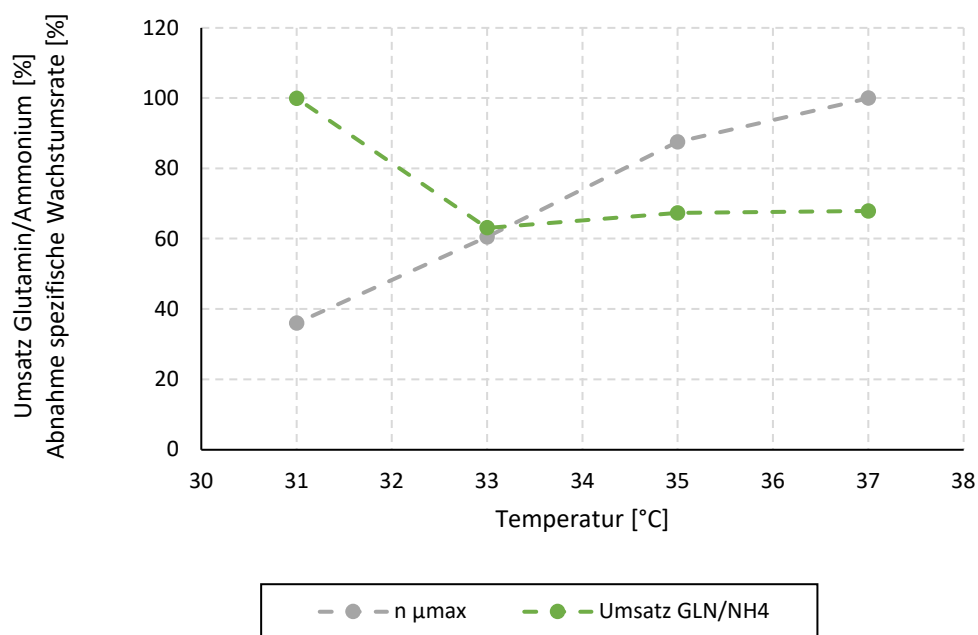


Abbildung 42: Vergleich des relativen spezifischen Glutaminumsatzes mit der relativen spezifischen Wachstumsrate bei unterschiedlichen Temperaturen.

Abbildung 43 können die spezifischen Produktbildungsrate $q_{Produkt}$ bei drei unterschiedlichen Prozesstemperaturen entnommen werden.

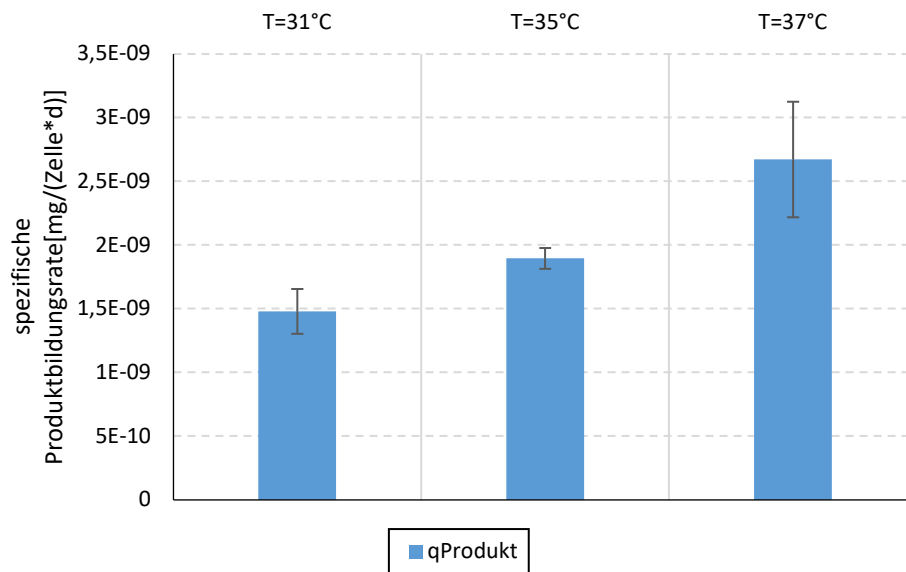


Abbildung 43: Spezifische Produktbildungsrate bei unterschiedlichen konstanten Prozesstemperaturen mit dem Zellklon CHO-DP12

In Anbetracht der spezifischen Produktbildung des Zellklons CHO-DP12 konnte bei Verringerung der Prozesstemperatur eine reduzierte Produktbildungsrate verzeichnet werden. Die spezifische Produktbildungsrate reduzierte sich bei einer Reduktion der Temperatur von 37 °C auf 31 °C um den Faktor 1,8.

6.8.2 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zellmetabolismus

Wie zuvor bei konstanten Temperaturen wurde innerhalb der Vorkulturen mit und ohne Regelung, sowie der folgenden produktionsähnlichen Kulturen, prozessbegleitend die Glutamin-, Ammonium-, Glukose- und Laktatkonzentration zu diskreten Zeitpunkten bestimmt. Im nachfolgenden wurden die spezifischen Aufnahme- und Bildungsraten ermittelt und gemäß den Stoffwechselzusammenhängen aufgetragen. In Abbildung 44 a) sind die mittleren spezifischen Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsraten der drei näher untersuchten Versuche mit der Zelllinie CHO-DP12 dargestellt, während Abbildungsteil b) die Ergebnisse des CHO-Subklons CHO DPO-KL aufzeigt. Innerhalb der Abbildungen werden Vorkulturen mit Zellzahlregelung durch die Kürzel RT (Reaktor mit Temperaturprogramm) und durch graue überlagerte Flächen gekennzeichnet. Die durchgeführten Referenzkulturen mit einer konstanten

Prozesstemperatur von 37 °C werden durch das Kürzel REF RT, markiert. Das Kürzel SP steht für simulierte Produktion und weist die angeschlossenen produktionsähnlichen Prozesse den Vorkulturen zu. Verbrauchsraten werden durch negative Vorzeichen dargestellt während Bildungsraten ein positives Vorzeichen aufweisen.

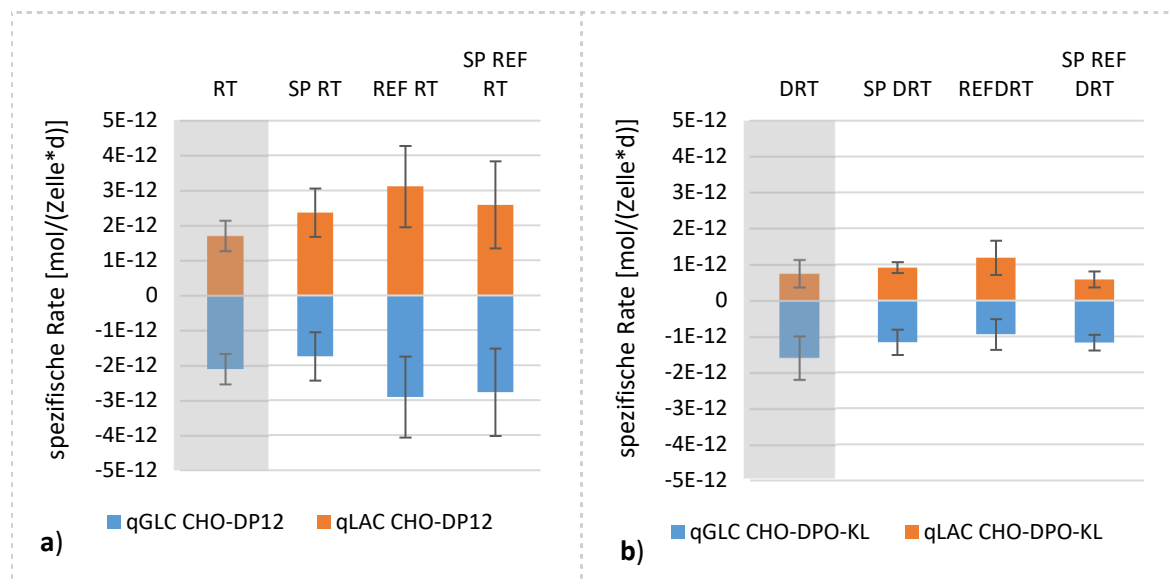


Abbildung 44: Mittlere spezifische Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsraten der Versuche mit Zellzahlregelung (RT, DRT), der Referenzkulturen ohne Zellzahlregelung (REF RT, REF DRT), sowie der dazugehörigen Prozesse unter Produktionsbedingungen (SP), a) Ergebnisse des Zellklons CHO-DP12, b) Ergebnisse des Zellklons DPO-KL

In den Ergebnissen der mittleren spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten der CHO-DP12 Zelle kann sowohl in der zellzahlgeregelten Vorkultur, als auch in dem dazugehörigen produktionsähnlichen Prozess eine minimal verringerte Glukoseverbrauchsrate und Laktatbildungsrate im Vergleich zur Referenz verzeichnet werden. Der CHO-Subklon DPO-KL weist, im Vergleich mit der CHO-DP12 Zelle, im Gesamten eine deutlich geringere spezifische Glukoseaufnahme und Laktatverbrauchsrate, mit einer geringen Varianz bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf. In den Versuchen beider Zellklone fällt die großen Standardabweichungen der einzelnen Raten, erkennbar an den Fehlerbalken, auf. Dies lässt sich auf die geringen Versuchszahlen von drei respektive vier Replikaten pro Prozessschritt und die große Schwankungsbreite der einzelnen Raten, welche den Abbildungen Anhang-Abbildung 8 und Anhang-Abbildung 10 entnommen werden kann, und die geringe Versuchsanzahl zurückzuführen. Aus der Betrachtung der Verhältnisse der spezifischen Raten eines jeden Versuchs wird

zudem ersichtlich, dass die Verbrauchsrate nicht in jedem Fall der Bildungsrate entspricht. Gemäß der Literatur, neigen CHO-Zellen zu einem Überfluss Metabolismus innerhalb dessen Glukose nicht vollständig in zu CO₂-Oxidiert wird sondern auf direktem Wege in Laktat umgesetzt wird^{174–176}.

Aus diesem Grunde wurde zur weiteren Analyse des Glukose-Laktat-Metabolismus der spezifische Umsatz $sU_{\text{Verbrauch/Bildung}}$ gemäß Gleichung (6-10) berechnet.

$$sU_{\text{Verbrauch/Bildung}} = \frac{q_{\text{Verbrauch}}}{q_{\text{Bildung}}} \quad (6-10)$$

Definitionsgemäß wird bei einem spezifischen Umsatz von 1 je Zelle ein Glukosemolekül in ein Laktatmolekül umgesetzt. Ein spezifischer Umsatz >1 zeigt an, dass pro Zelle und Glukosemolekül weniger als ein Molekül Laktat gebildet wird. Der spezifische Glukose-Laktat-Umsatz der einzelnen Versuche beider untersuchter Zellklone kann Abbildung 45 entnommen werden. Der erwartete spezifische Umsatz von 1 ist durch eine orangene Gitternetzlinie markiert.

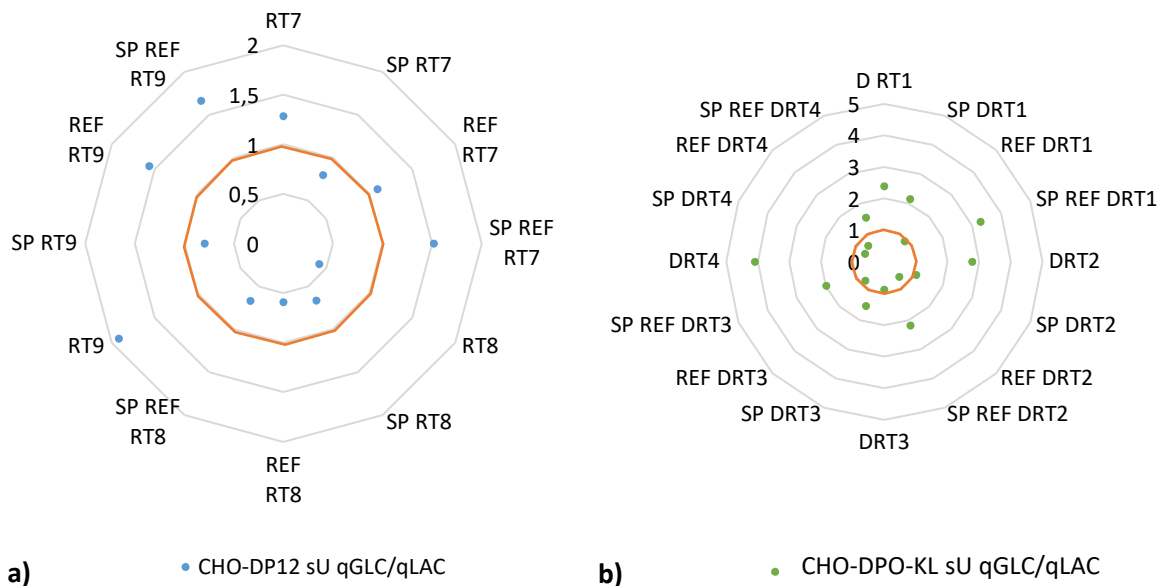


Abbildung 45: Spezifischer Glukose-Laktat-Umsatz $sU_{qGLC/qLAC}$ a) CHO-DP12 b) CHO-DPO-KL

Wie sich Abbildung 45 a) entnehmen lässt, ist ein ausgeglichenes Verhältnis der spezifischen Umsatzenes zuerkennen. In 6 von 12 Versuchen lag der spezifische Umsatz bei einem Wert > 1 in der anderen Hälfte der Versuche konnte ein Umsatz < 1 verzeichnet werden. Des Weiteren kann kein Bezug zu den

Prozessbedingungen aufgezeigt werden. Die Analyse des spezifischen Umsatzes der CHO-DPO-KL Zelle weist ein vergleichbares Bild auf. In diesem Fall lag der spezifische Umsatz in 7 von 16 Fällen unterhalb von 1.

Im Falle des Glutaminmetabolismus zeigt sich in den Ergebnissen der mittleren spezifischen Raten der Zelllinie CHO-DP12, dargestellt in Abbildung 46, in den Kulturen RT und SP RT eine, in Vergleich zu den Referenzkulturen minimal verringerte Glutaminaufnahme- q_{GLN} beziehungsweise Ammoniumbildungsrate q_{NH_4} . Die Akkumulationsraten r_{GLC} und r_{NH_4} ist entsprechend der Temperaturen innerhalb der Referenzkultur und den produktionsähnlichen Kulturen SP (simulierte Produktion) erhöht. Die Berechnung des Integrals der Lebendzellzahl erfolgte im Falle der Vorkulturen zum Endzeitpunkt der Kultivierung, während dies in den produktionsähnlichen Prozessen zum Zeitpunkt der maximalen Zellkonzentration PCD ermittelt wurde. Aus diesem Grunde lässt sich die Variation der spezifischen Akkumulationsrate der Referenzkultur und den SP-Prozesse durch die unterschiedlichen Zellkonzentrationen erklären. Im Falle des CHO-Subklons DPO-KL zeigt sich der Einfluss, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten verwendeten Zellkonzentrationen noch deutlicher. Innerhalb der DPO-KL Vorkulturen wurde der Prozess, in 3 von 4 Fällen mit Erreichen einer Zellkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml beendet. Die PCD der nachfolgenden SP-Kultur erreichte eine Zellkonzentration $> 10 \times 10^6$ Zellen/ml. Diese These würde die, in Abbildung 46 dargestellten, großen Schwankungen zwischen den Vorkulturen und den produktionsähnlichen Kulturen erklären. Des Weiteren wird diese These durch die dem Anhang in Abbildung Anhang-Abbildung 11 beigefügte Darstellung der einzelnen spezifischen Verbrauchs- und Bildungsdaten gestützt. Innerhalb des Versuchs DRT 4 wurde die Endzellkonzentration auf 5×10^6 Zellen/ml erreicht und es zeigt sich eine homogenere Verteilung der spezifischen Raten.

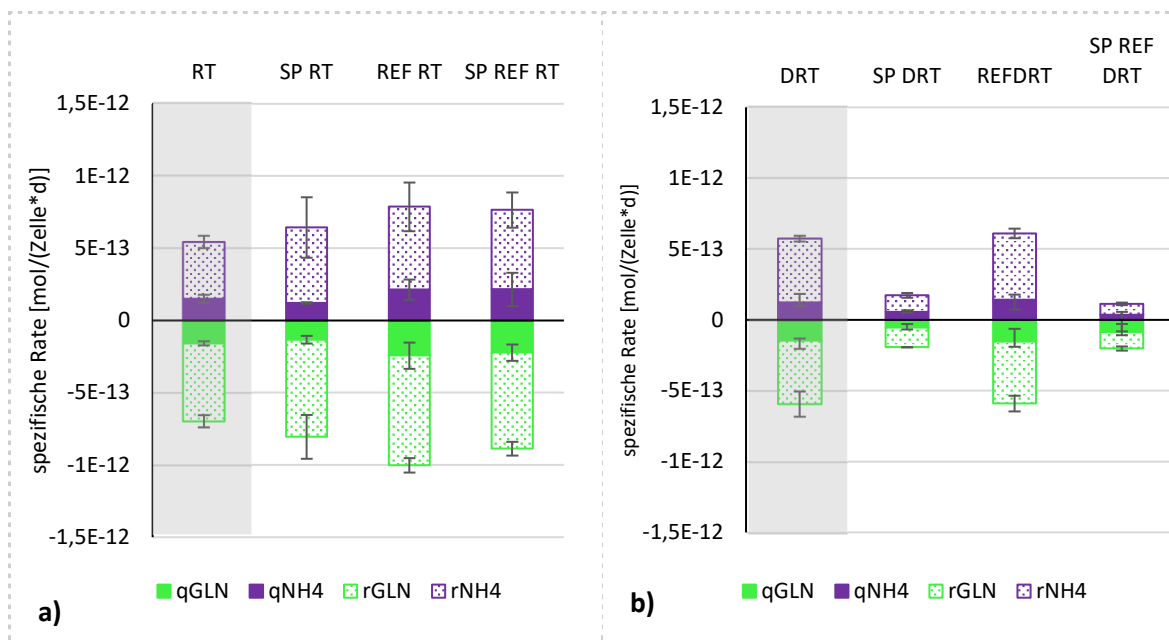


Abbildung 46: Mittlere spezifische Glutaminaufnahme- und Ammoniumbildungsrate (ausgefüllte Balken) der Versuche mit Zellzahlregelung (RT, DRT), der Referenzkulturen ohne Zellzahlregelung (REF RT, REF DRT), sowie der dazugehörigen Prozesse unter Produktionsbedingungen (punktierte Balken). a) Ergebnisse des Zellklons CHO-DP12, b) Ergebnisse des Zellklons DPO-KL

Zur Beurteilung des Glutaminmetabolismus wurde der spezifische Umsatz gemäß Gleichung (6-10) berechnet.

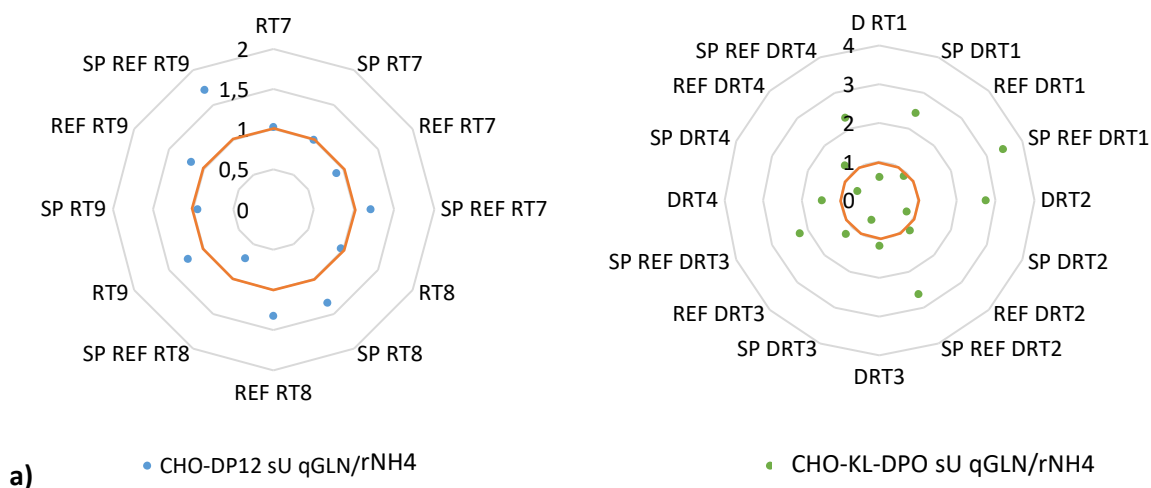


Abbildung 47: spezifischer Glutamin/Ammonium-Umsatz $sU_{qGLN/qNH4}$ a) CHO-DP 12 b) CHO-DPO-KL

Ebenso wie bei der Betrachtung des spezifischen Glukose-Stoffwechsels, liegt der spezifische Umsatz der CHO-DP12 Zelle im Mittel bei einem Wert von 1,12. Für den

CHO-Subklon DPO-KL kann ein mittlerer spezifischer Umsatz von 1,6 angegeben werden. Im Vergleich der beiden Zelllinien, weisen die Daten der spezifischen Raten des Zellklons CHO-DP12 eine deutlich geringere Streuung auf.

6.8.3 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zellzyklus

Wie bereit in Abschnitt 3.1.4 dargelegt, wird in der einschlägigen Fachliteratur das vermehrte arretieren der Zellen in der G₀ - Phase des Zellzyklus bei niedrigen Temperaturen beschrieben. Im Laufe des Forschungsprojektes stellte sich die Frage; in welchem Umfang die Zellen, unter der temperaturgesteuerten Zellzahlregelung in der G₀/G₁ - Phase des Zellzyklus verbleiben und ob eine Verschiebung in der Verteilung des Zellzyklus reversibel ist. Zur Abklärung dieser Fragestellung wurden zwei Reaktorversuche, mitlaufender Zellzahlregelung innerhalb der Vorkultur und angeschlossenen produktionsähnlichem Prozess, sowie jeweiligen Referenzkulturen durchgeführt. Während dieser Versuche wurde die Verteilung der Zellen im Zellzyklus, mit Hilfe des in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Zellzyklusassays analysiert.

Innerhalb des ersten Versuches dieser Versuchsreihe, kam es im Verlauf der geregelten Vorkultur, zu dem in Abbildung 48 dargestellten, nahezu konstanten Abfall der Prozesstemperatur von 35,6 °C auf 29,9 °C. Wie sich dem darunterliegenden Säulendiagramm der Abbildung 48 entnehmen lässt, kann im Laufe der Vorkultur, anhand der flächig blau ausgefüllten Säulen eine Zunahme der Zellen in der G₁/G₀ - Phase, bei gleichzeitiger Verringerung des Anteils an Zellen in der S - Phase, dargestellt durch den gepunkteten Anteil der Säulen, verzeichnet werden. Der Anteil der Zellen in der G₂/M - Phase änderte sich innerhalb dieses Prozesses nicht. Im darauffolgenden produktionsähnlichen Prozess, mit einer konstanten Prozesstemperatur von 37°C zeigte sich nach 2,7 d ein, im Vergleich zum Startzeitpunkt der Vorkultur leicht erhöhter Anteil der Zellen in der S - Phase bei gleichzeitig verringertem Anteil der Zellen in der G₁/G₀ - Phase. Nach einer Prozessdauer von 3,9 d und somit vor dem Erreichen der maximalen Zellkonzentration des Prozesses, entspricht die Zellzyklusverteilung der Verteilung zu Beginn der Vorkultur.

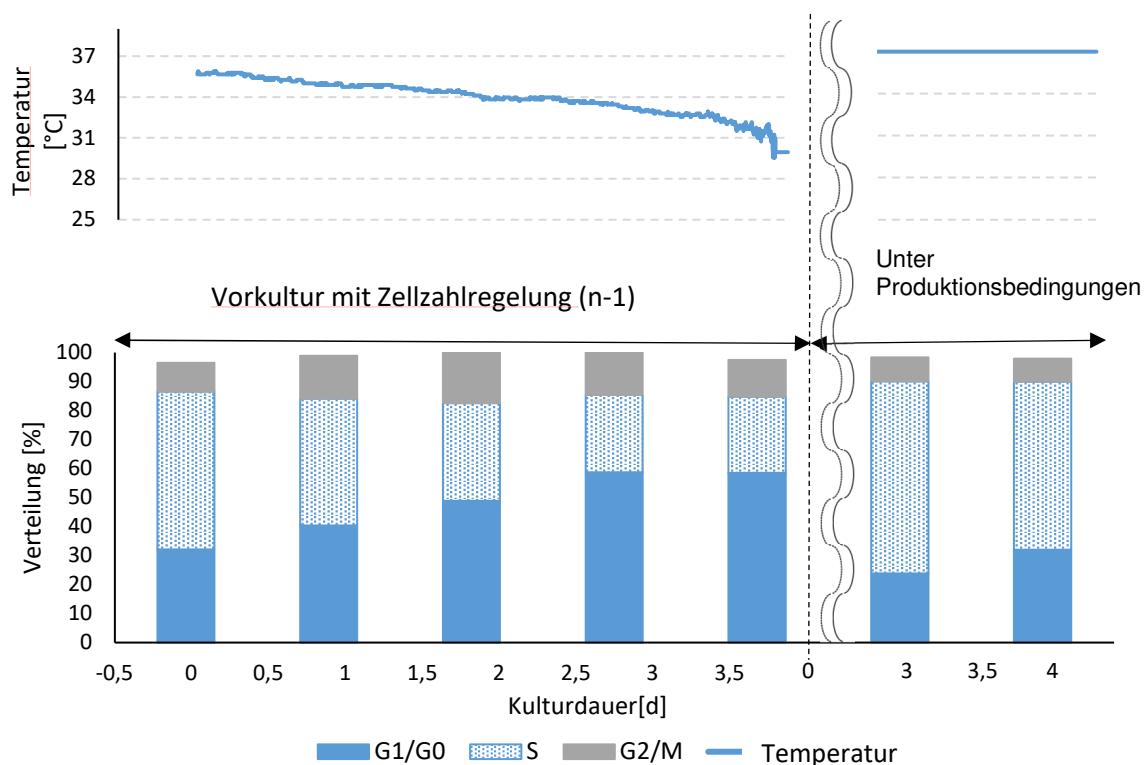


Abbildung 48: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch RT9 - mit geregelter Vorkultur

Vergleichend zum zuvor vorgestellten Versuch mit geregelter Vorkultur wurde zeitgleich und mit demselben Inokulum ein Referenzversuch ohne geregelte Vorkultur und mit nachgeschaltetem produktionsähnlichem Prozess gestartet. Wie in der Versuch RT9 mit geregelter Vorkultur wurde innerhalb des Referenzversuchs REF RT9 die Zellzyklusverteilung über die Zeit analysiert. Aus den in Abbildung 49 dargestellten Ergebnissen bezüglich der Verteilung der Zellen im Zellzyklus geht hervor, dass der Anteil der Zellen in der G0/G1 - Phase, S - Phase, sowie der G2/M - Phase sowohl in der Vorkultur, als auch im produktionsähnlichen Prozess nahezu konstant blieb. Die Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen entspricht zudem der in Abbildung 48 dargestellten Verteilung zum Startzeitpunkt der geregelten Vorkultur, sowie der simulierten Produktion des Versuches RT9 nach 3,9 d.

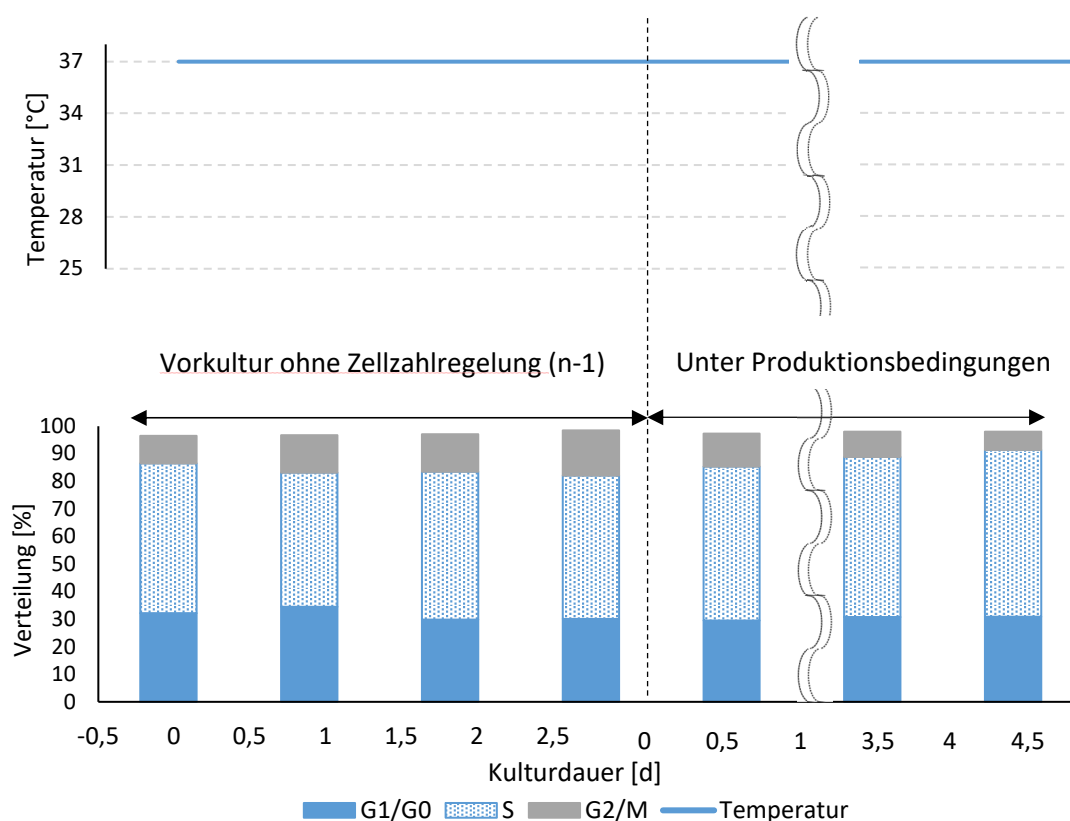


Abbildung 49: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch REF RT9 - mit unregelter Vorkultur

Zur Absicherung der zuvor dargestellten Ergebnisse erfolgte die Versuchswiederholung in den Prozessen RT10 mit geregelter Vorkultur und der dazugehörigen Referenzkultur REF RT10. Innerhalb der geregelten Kultur RT10, dargestellt in Abbildung 50, sank die Prozesstemperatur in den ersten 0,38 d von 35,6 °C auf 34,8 °C und stieg in den folgenden 2,22 d auf eine Temperatur von 36,13°C, bevor die Temperatur in den nächsten 1,2 d erneut auf eine Temperatur von 34,8 °C sank. Zu Beginn entspricht die Zellzyklusverteilung der aus dem vorherigen Versuch der Reaktoren RT9 und REF RT9 bekannten Verteilung. Die erste Probe wurde zu Beginn der Kultur entnommen, historisch betrachtet kommen die Zellen der ersten Probe aus einer Shakerkultur mit einer konstanten Temperatur von 37°C. Aufgrund der zeitlich direkten Entnahme der Proben nach dem Animpfen des Reaktors, ist davon auszugehen, dass die Zellen noch die selbe Verteilung aufweisen, wie bei 37°C. Im weiteren Verlauf der Kultur zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zellen in der G0/G1 - Phase mit einer gleichzeitigen Verringerung der Zellen in der S - Phase. Mit dem Anstieg der Temperatur nach einer Kulturdauer von 1,8 d kann, im Vergleich zum Startzeitpunkt, ein minimal erhöhter Anteil der

Zellen in der S - Phase und ein verringerter Anteil der Zellen in der G1/G0 - Phase verzeichnet werden. In der letzten Messung der Vorkultur zeigte sich bei abgesenkter Prozesstemperatur ein erneuter Anstieg der G1/G0 - Phase mit einer Verminderung der S - Phase. Im Vergleich mit der Startverteilung zeigt sich eine leicht minimierte G1/G0 - Phase. Mit dem Starten des produktionsähnlichen Prozesses traten technische Schwierigkeiten auf, so dass dieser zunächst mit einer Prozesstemperatur von 35 °C gelaufen ist. Es zeigte sich dennoch eine Normalisierung in der Verteilung des Zellzyklus-Phasen. Im weiteren Verlauf, mit Erhöhung der Prozesstemperatur auf eine Temperatur von 37 °C konnte zunächst eine Zunahme der S - Phase verzeichnet werden, während es im Folgenden zu einer stabilen und normalen Verteilung der Zellen im Zellzyklus kommt.

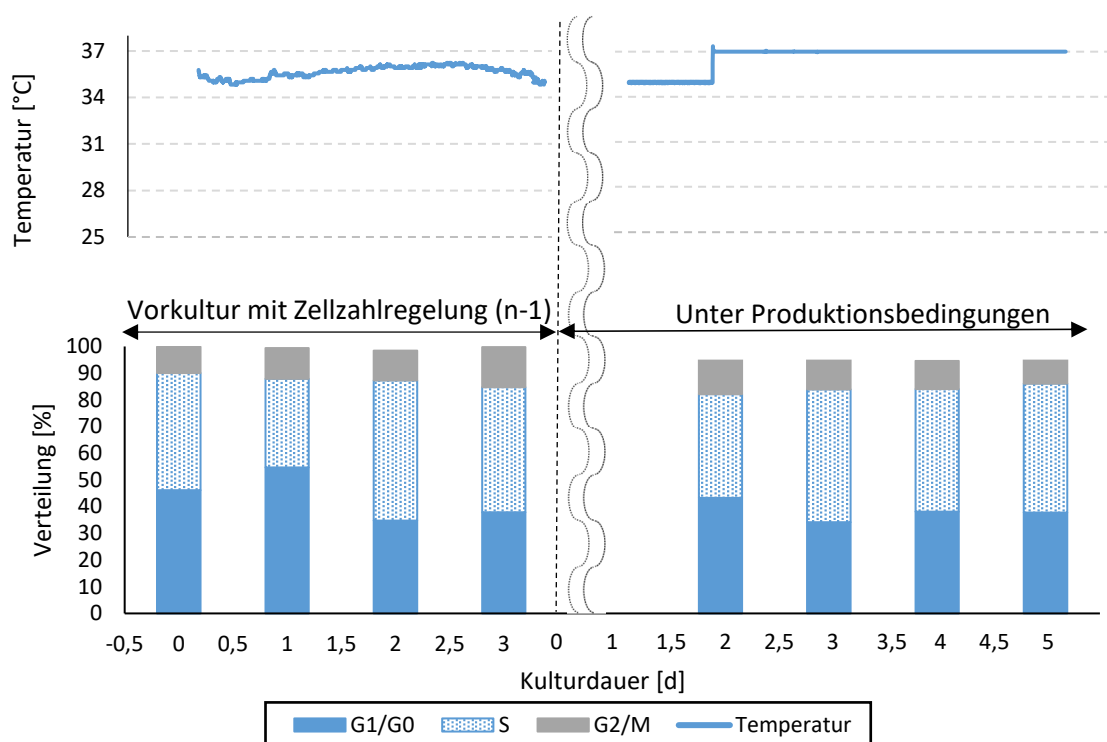


Abbildung 50: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch RT10 - mit geregelter Vorkultur

In der Referenzkultur, mit den in Abbildung 51 dargestellten Ergebnissen, zeigte sich zunächst eine stetige Abnahme der G1/G0 - Phase bis zu einer Prozessdauer von 1,8 d mit einem anschließenden minimalen Anstieg. Innerhalb des Prozesses unter produktionsähnlichen Bedingungen kann ein gegenläufiger Trend beobachtet werden, mit einem Anstieg des Zellanteils in der G0/G1 - Phase innerhalb der ersten 4 Tage. Nach einer Prozessdauer von 4 d wurde die maximale Zellzahl erreicht. Innerhalb des folgenden Tages verringerte sich die Zellenzahl um

$0,4 \times 10^6$ Zellen/ml einhergehend mit einer Abnahme der Vitalität um 18,2 %. Die Zellzyklusanalytik ergab eine Verringerung der Zellen in der G0/G1 - Phase mit einem erhöhten Anteil der Zellen in der S-Phase.

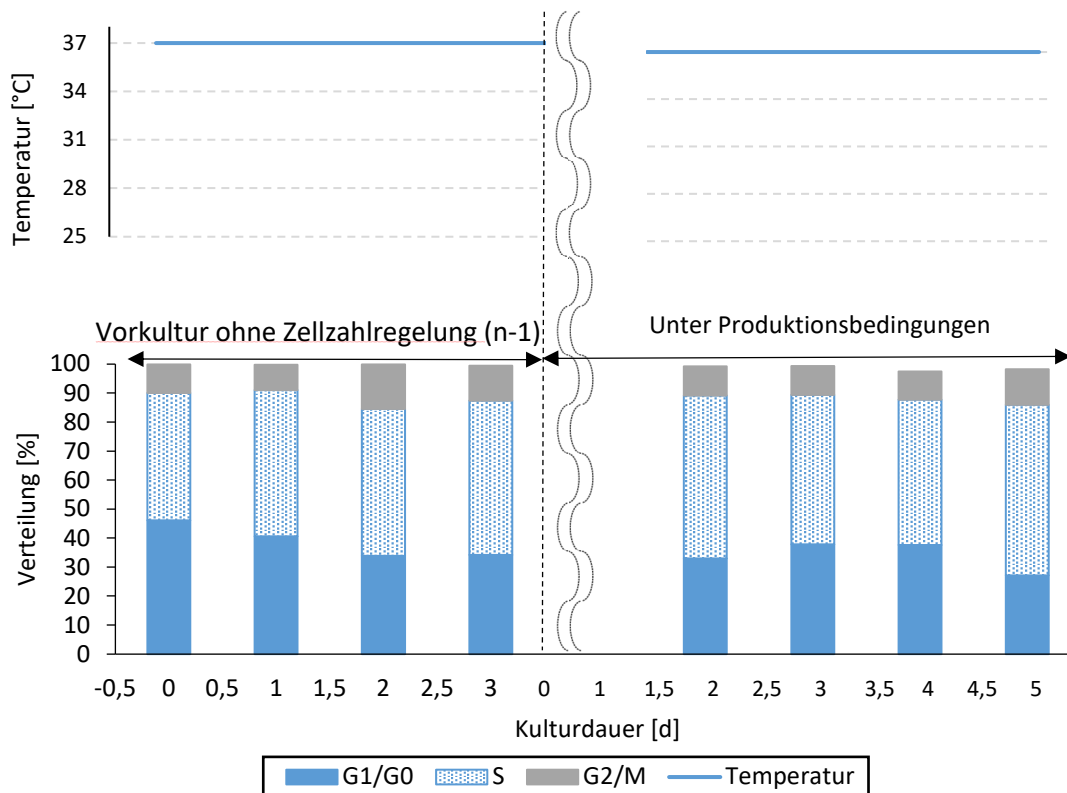


Abbildung 51: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch REF RT10 - mit ungeregelter Vorkultur

6.8.4 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Zelltod

Zur Analyse der biologischen Reaktion der Zellen auf die Zellzahlregelung wurde in den Versuchen RT9, RT10 und den dazugehörigen Referenzkulturen parallel zur Zellzyklusanalytik ein Apoptose-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse des Versuchs RT9, sowie des zugehörigen Referenzprozesses, wurden mit Bezug zur offline ermittelten Gesamtzellkonzentration in den folgenden zwei Abbildungen Abbildung 52 und Abbildung 53, dargestellt.

Die gestapelten Säulen geben Auskunft, welcher Anteil der Zellen von der Gesamtprobe mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid PI oder mittels Annexin-FITC angefärbt wurde, beziehungsweise Träger beider

Fluoreszenzmarkierungen darstellt. Q1 gibt den Anteil der Zellen wieder, die einen hohen PI-Gehalt aufweisen, während die Zellen des Quadranten Q3 ausschließlich durch Annexin-FITC gefärbt wurden. Zellen des Quadranten Q2 weisen sowohl eine PI, als auch eine Annexin-FITC Färbung auf. Der überwiegende Anteil der Zellen konnte durch keinen der Farbstoffe gefärbt werden und ist dem Quadranten Q4 zuzuordnen. Wie in Abschnitt 4.3.4 dargelegt, lässt sich anhand der Färbung der Zustand der Zellen im Hinblick auf den bevorstehenden, oder vollzogenen Zelltod unterscheiden. In einem großen Teil der Literatur werden Zellen des Quadranten Q4 den lebenden Zellen zugeordnet. Der Anteil der Zellen in Q2 beschreibt die Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose befinden, während Zellen des Quadranten Q3 den früh-apoptotischen Zellen zugeordnet werden. In der allgemeinen Literatur wird angegeben, dass dem Quadranten Q1 keine Zellen zugeordnet werden können. Innerhalb einer im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Bachelorarbeit konnte anhand parallel durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung die Existenz jener Zellen, die ausschließlich mittels PI gefärbt wurden, belegt werden. Aus diesem Grund werden im Folgenden, die Zellen der Quadranten Q1 mit aufgeführt.

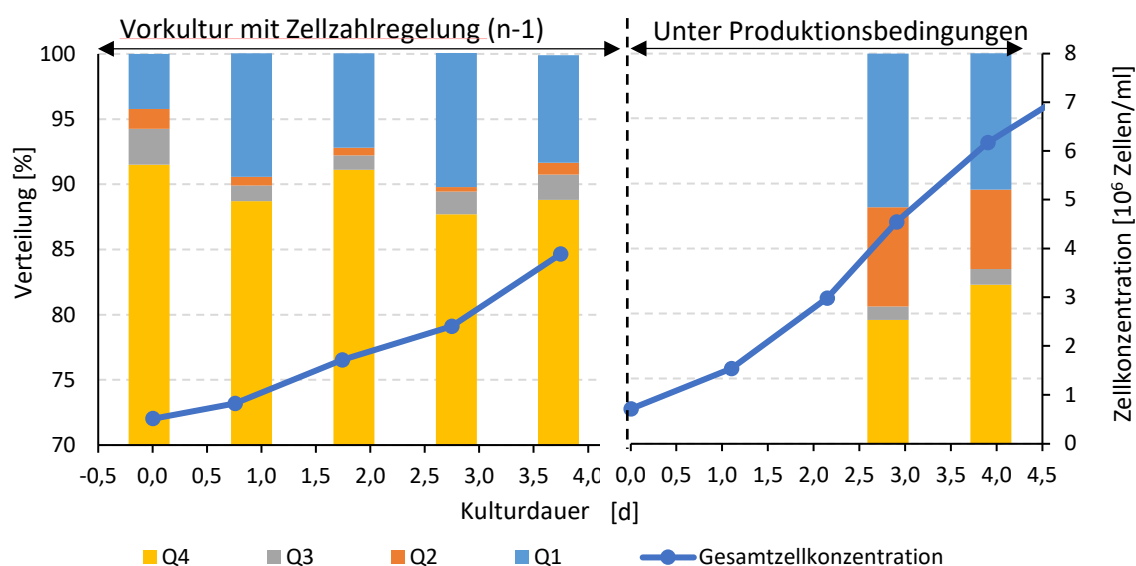


Abbildung 52: Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor RT9

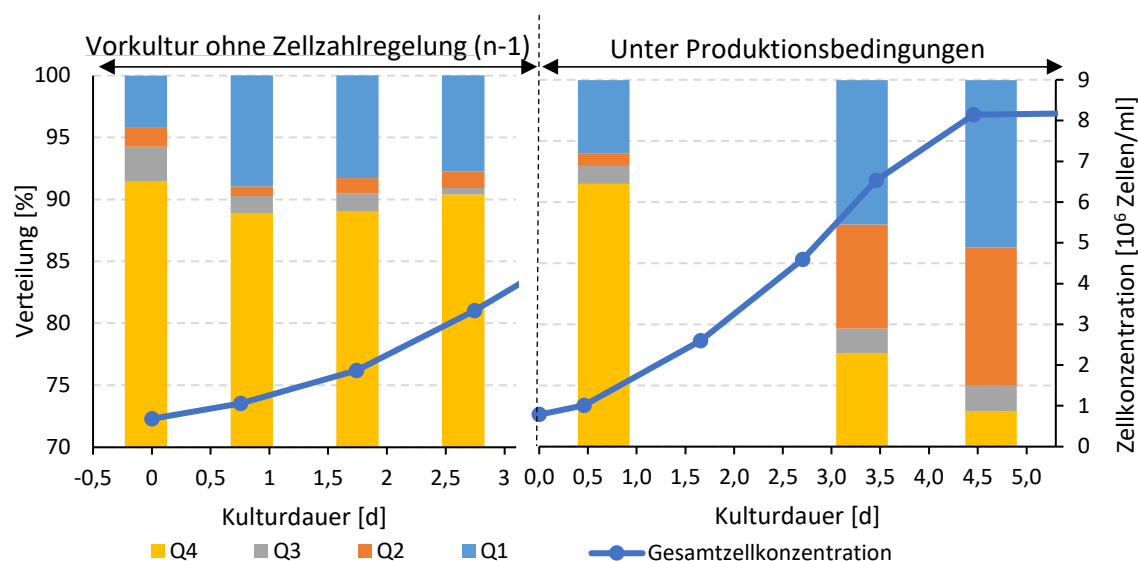


Abbildung 53: Ergebnisse des Apoptoseassays Reaktor REF RT9

Im Vergleich der Ergebnisse des Apoptoseassays der zellzahlgeregelten Vorkultur und der Referenzkultur, dargestellt in Abbildung 52 und Abbildung 53, zeigt sich eine nahezu identische Verteilung der Zellen in die vier Quadranten. Innerhalb der Vorkulturen kann sowohl in der Vorkultur mit Zellzahlregelung, als auch der Kultur ohne Regelung ein Lebendzellanteil von etwa 90% verzeichnet werden. Gegen Ende der Prozesse unter produktionsähnlichen Bedingungen kann ein Anstieg der spät-apoptotischen Zelle und Zellen in Q1, bei gleichzeitiger Reduktion des Lebendzellanteils detektiert werden. Der zeitliche Verlauf der Gesamtzellkonzentration weist darauf hin, dass die exponentielle Wachstumsphase zum Zeitpunkt des beobachteten Anstiegs apoptotischer Zellen bereits überschritten wurde.

Innerhalb des Versuchs RT10 und der in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellten Ergebnisse des Apoptoseassays, zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Verteilungen. Im Allgemeinen ist ein minimal verringerter Anteil der vitalen Zellen in Q4 und ein im gesamten Prozess erhöhter Anteil apoptotischer Zellen festzustellen. Während der Vorkultur ohne Zellzahlregelung konnte im Verlauf der Gesamtzellzahl zu Prozessbeginn eine Reduktion der Zellzahl verzeichnet werden, welche vermutlich durch eine Nachlässigkeit während des Inokulationsvorgangs begründet ist. Im Vergleich der produktionsähnlichen Prozesse weist der Prozess mit geregelten Vorkultur eine deutlich verringerte Lebendzellzahl auf. Dieser Eindruck

lässt sich bei der Betrachtung der hier nicht dargestellten Wachstumskurven nicht bestätigen. Die mit dem Vicell bestimmte Vitalität war über dem gesamten Zeitraum der Kultur unverändert hoch. Es ist jedoch zu bedenken, dass innerhalb des Prozesses technische Probleme zu einer eingeschränkten Bedienbarkeit des Prozessleitsystems führten und in einer kurzzeitig verminderten Sauerstoffversorgung und reduzierten Starttemperatur des produktionsähnlichen Prozesses von 35°C führte, eine Temperatur von 37°C konnte zwei Tage nach Start des produktionsähnlichen Prozesses eingestellt werden.

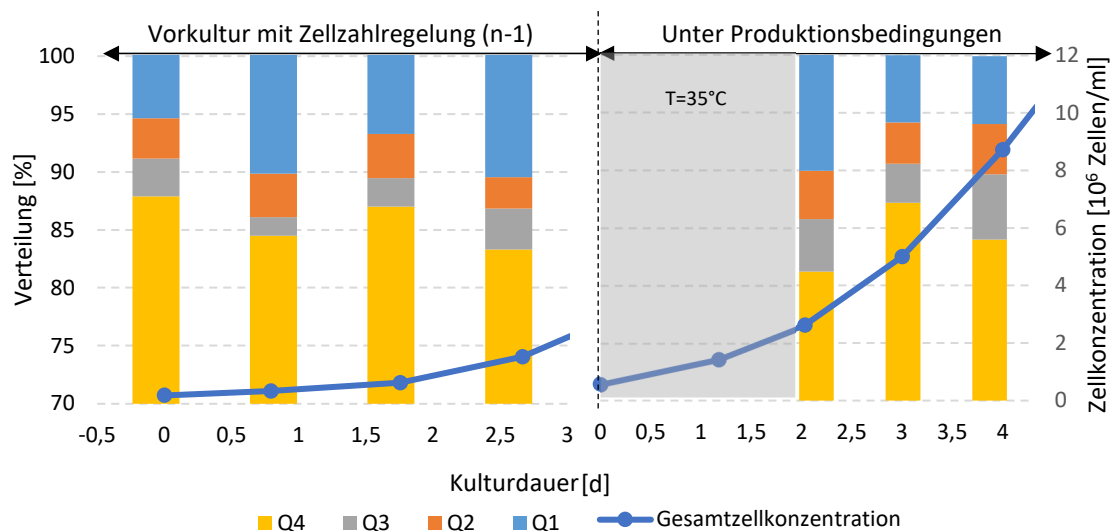


Abbildung 54 Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor RT10

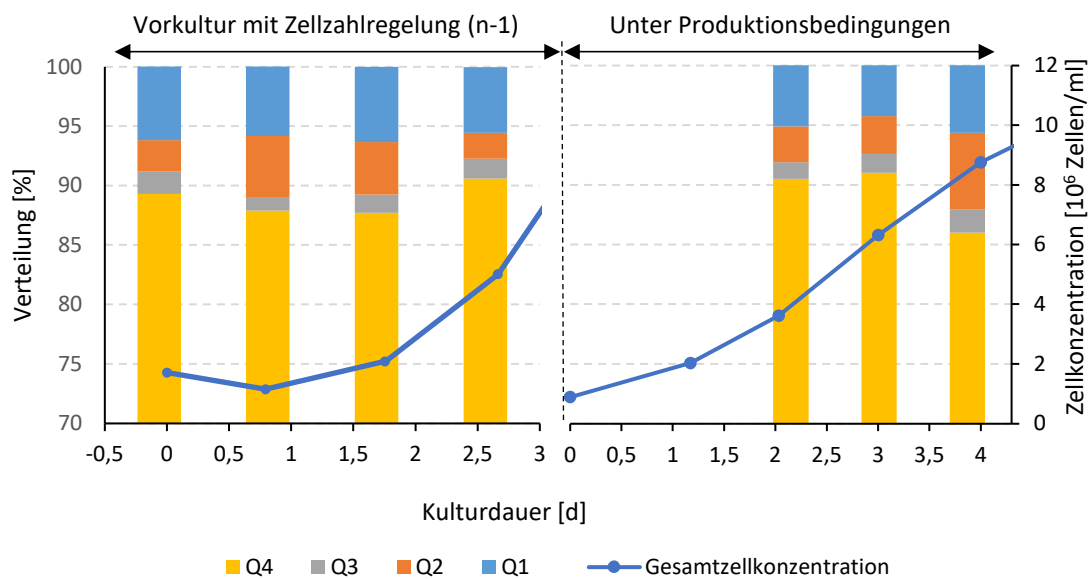


Abbildung 55: Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor REF RT10

6.8.5 Auswirkungen der Zellzahlregelung auf die Zellphysiologie

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, wird in der allgemeinen Fachliteratur bei Verringerung der Prozesstemperatur eine Reduktion des Zelldurchmessers beobachtet. Auf Grundlage dessen wurde der Einfluss der Zellzahlregelung auf die Zellgröße und die Zirkularität ermittelt. Alle Daten wurden mit Hilfe der automatischen Zellzahlmessung des ViCell® (Beckmann Coulter Inc. Brea, USA) erhoben.

Der nachfolgenden Abbildung 56 kann der Verlauf der Zellgröße über die Zeit beider untersuchten Zellen entnommen werden. In den geregelten Prozessen der CHO-DP12 Zelle nimmt der mittlere Zelldurchmesser, analog zur Zunahme der Zellen in G0/G1 - Phase des Zellzyklus, zu. Im Laufe des produktionsähnlichen Prozesses der Kultur RT9 wird ein maximaler Zelldurchmesser von 16,65 µm erreicht. Nach Durchlaufen des Maximums verringert sich der Durchmesser auf 14,24 µm. Die Analogie bezüglich der Zellgröße und des Anteils der Zellen in der G0/G1 - Phase des Zellzyklus ist ebenfalls in der Kultur RT10 zu sehen, jedoch zeigt sich in der nachfolgenden produktionsähnlichen Produktionsstufe kein Maximum innerhalb des Zelldurchmessers, sondern eine fortlaufende Reduktion der Zellgröße. In der Referenzkultur REF RT9 verringert sich der Zelldurchmesser zunächst und steigt zum Ende der Vorkultur an. Ebenso zeigt sich im produktionsähnlichen Prozess ein maximaler Zelldurchmesser von 16,25 µm mit anschließend sinkendem Durchmesser. In der Referenzvorkultur REF RT10 kann zunächst ein konstanter Zelldurchmesser verzeichnet werden, welcher sich beim Start der simulierten Produktion sprunghaft reduziert. In den Prozessen des CHO-Subklon DPO_KL kann eine schwankende, im Mittel jedoch nahezu konstante Zellgröße von etwa 15 µm verzeichnet werden. Unter produktionsähnlichen Bedingungen zeigt sich in allen Kulturen im Mittel eine konstante Reduktion des Zelldurchmessers.

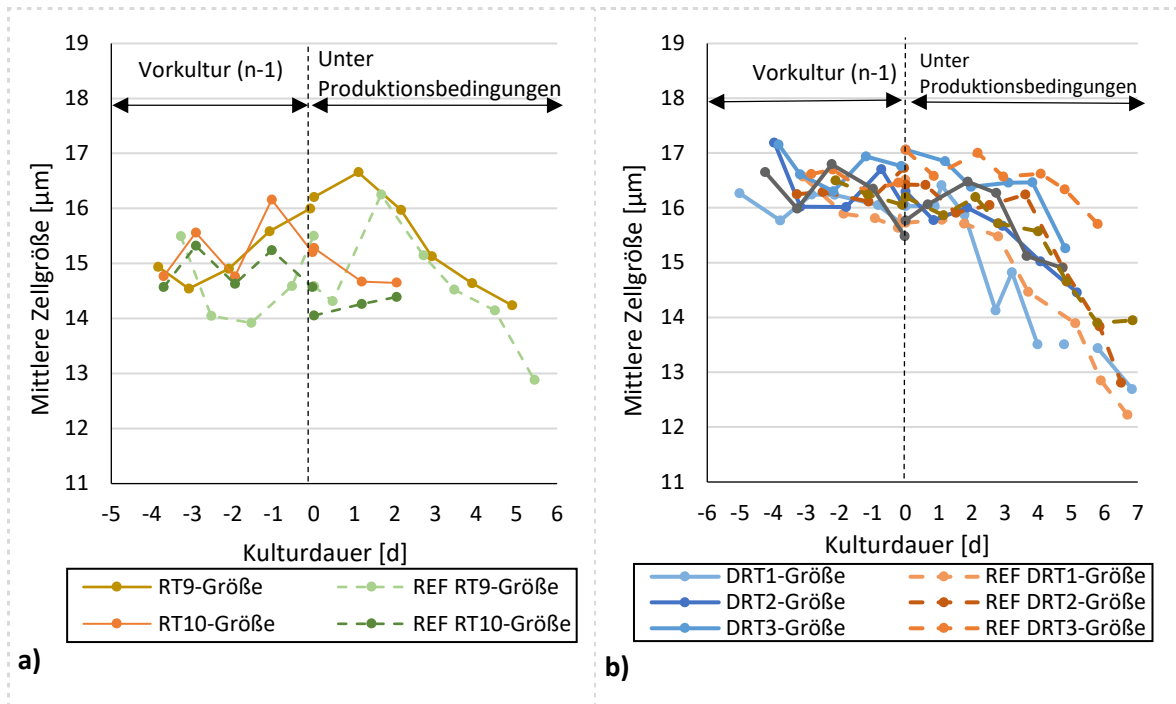


Abbildung 56: Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellgröße des Zellklons a) CHO-DP12 b) CHO-DPO_KL

Wie Abbildung 56 und Abbildung 57 entnommen werden kann verhält sich die Zirkularität umgekehrt proportional zur Zellgröße, so dass größere Zellen eine verminderte Zirkularität aufweisen.

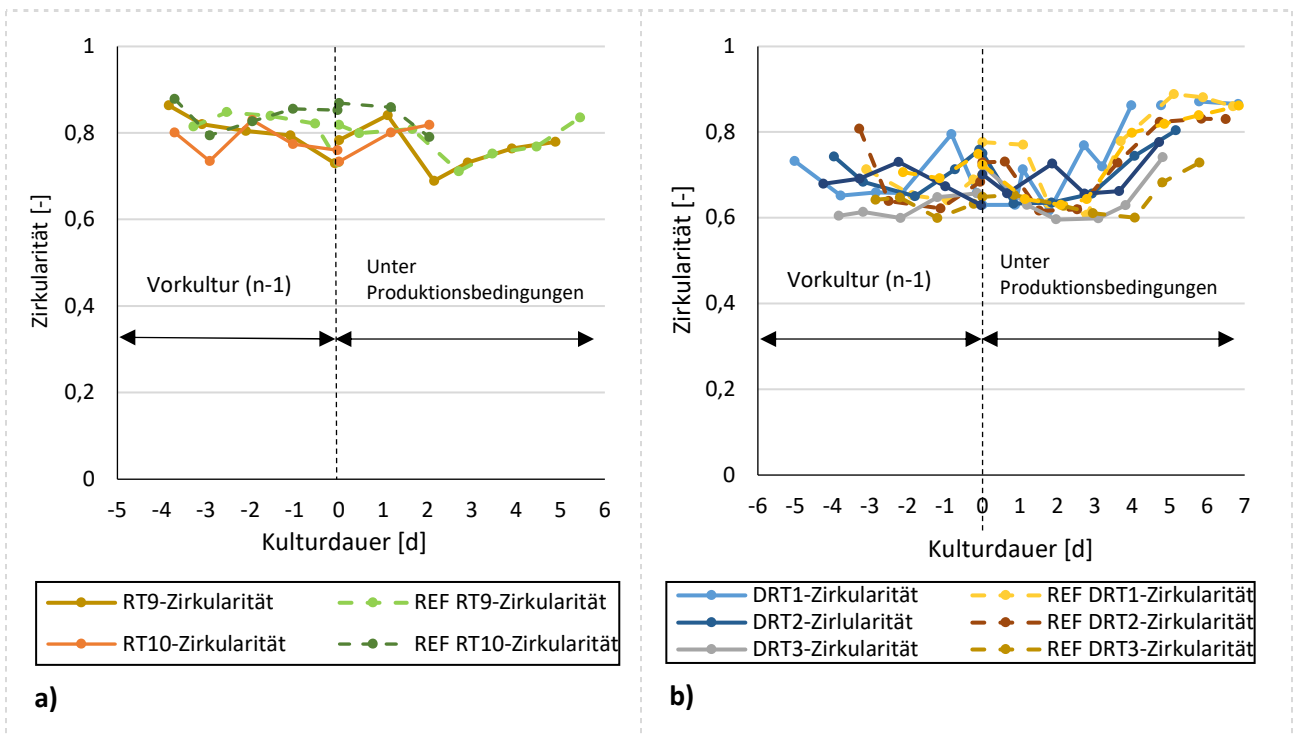


Abbildung 57: Zeitlicher Verlauf der mittleren Zirkularität des Zellklons a) CHO-DP12 b) CHO-DPO_KL

6.9 Auswirkung der Regelung auf die Produktquantität und -qualität

Ein maßgeblicher Punkt bei der Charakterisierung des Zellzahlreglers lag auf der Beurteilung des Einflusses auf die Quantität und Qualität der Produkte.

6.9.1 Produktquantität

Um die Auswirkungen der Zellzahlregelung auf die Produktquantität der nachfolgenden Produktionsstufe zu eruieren, wird im Folgenden sowohl der zeitliche Verlauf des Produkttiters, als auch die spezifischen Produktbildungsrate betrachtet. Hinsichtlich der in Abbildung 58 a) dargestellten Konzentration des von der CHO-DP12 gebildeten IgG – Produktantikörpers kann in jenen produktionsähnlichen Prozessen mit vorheriger zellzahlgeregelter Vorkultur eine höhere Antikörperkonzentration verzeichnet werden. Die in Abbildung 58 b) dargestellte, spezifische Produktbildung der zellzahlgeregelten Vorkultur nachfolgenden Produktionsstufe SP RT liegt in allen drei Fällen oberhalb der Produktbildungsrate der entsprechenden Referenzkultur SP REF.

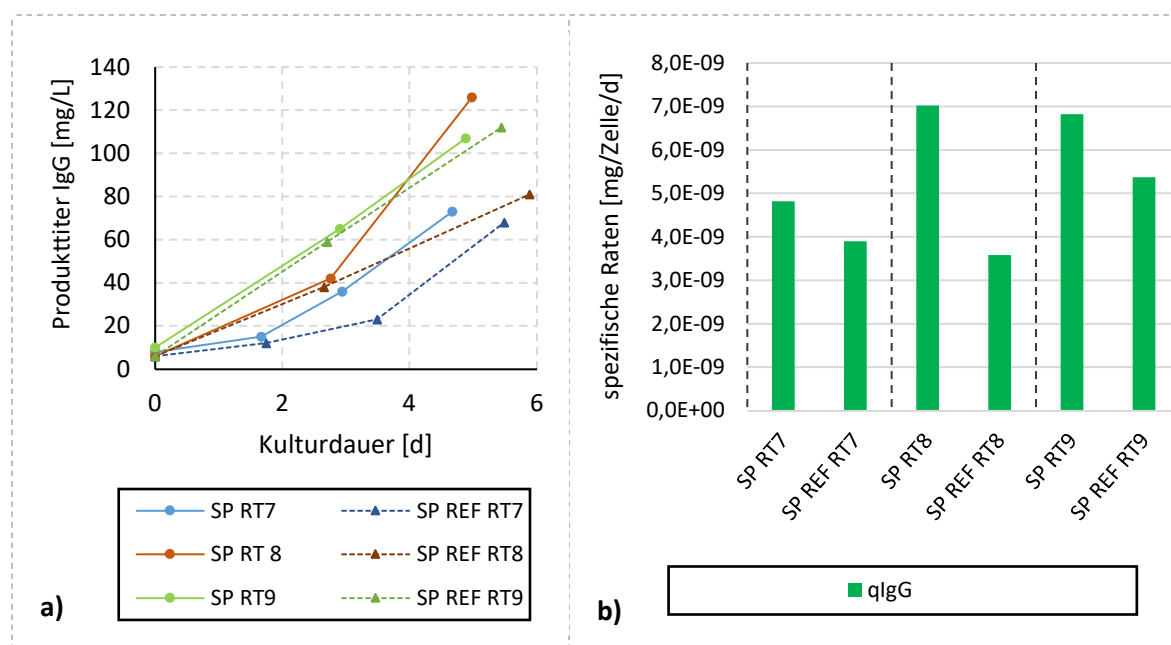


Abbildung 58: zeitlicher Verlauf a) der Produktkonzentration und b) der spezifischen Produktbildungsrate IgG

Ebenso wie zuvor bei der antikörperproduzierenden CHO-Zelle kann innerhalb von 3 der 4 produktionsähnlichen Prozessen mit Zellen aus der zellzahlgeregelten Vorkultur der DPO produzierenden Zelle, dargestellt in Abbildung 59 a), ein nicht signifikant erhöhter Titer festgestellt werden. Innerhalb der Prozesse SP DRT2 und der dazugehörigen Referenzkultur stimmen die DPO-Endkonzentrationen überein. Die in Abbildung 59 b) dargestellten spezifischen Produktbildungsrate der produktionsähnlichen Kulturen mit Zellen aus der zellzahlgeregelten Vorkultur verhalten sich äquivalent zum Produkttiter.

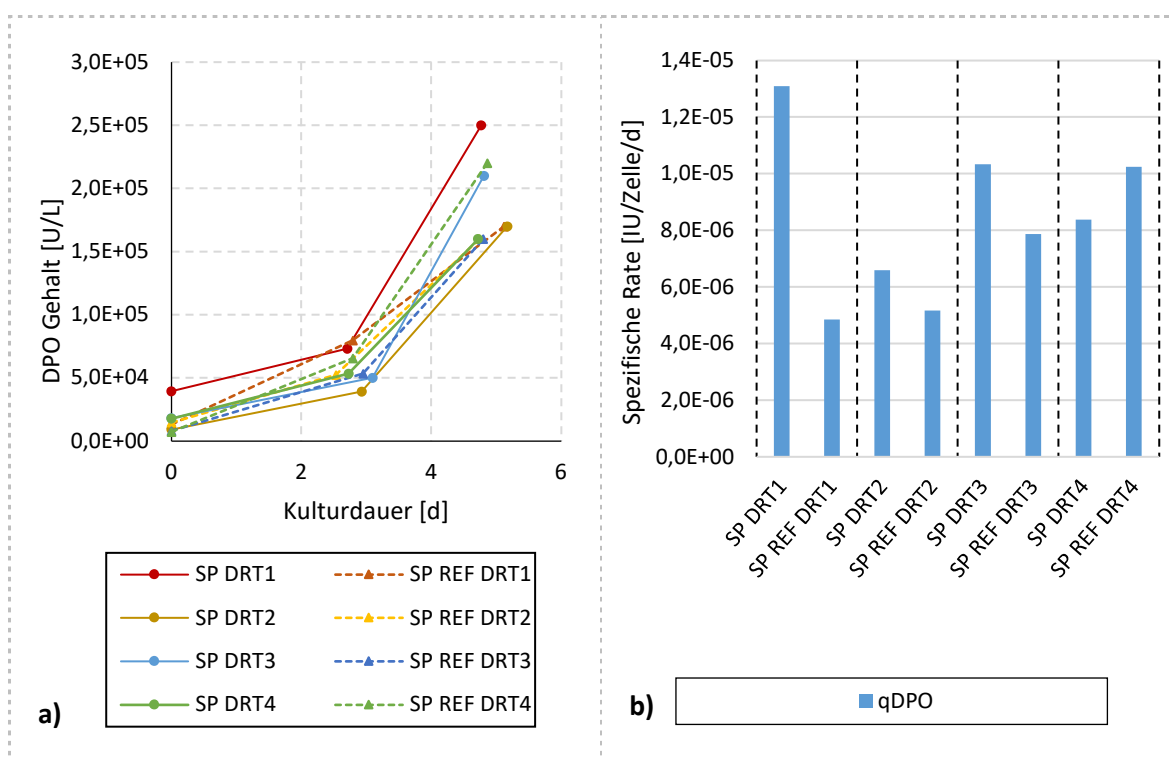


Abbildung 59: zeitlicher Verlauf a) der Produktkonzentration und b) der spezifischen Produktbildungsrate DPO

6.9.2 Produktqualität-Glykosylierung

Bei der Produktion therapeutisch wirksamer Glykoproteine wird im Besonderen auf die Glykosylierung geachtet. Die Glykosylierung beeinflusst im Wesentlichen die Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit der Proteine im Zielorganismus. Entspricht die Glykosylierung des hergestellten Proteins nicht der im Organismus vorliegenden Glykosylierung, können im schlimmsten Falle immunogene Reaktionen hervorgerufen werden^{177,178}. Auf Grund dieser Tatsache stellt die Glykosylierung häufig eines der kritischen Qualitätsattribute dar. Der Einfluss der zellzahlgeregelten Vorkultur auf

die Glykosylierung des in der Produktionsstufe hergestellten Proteins wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit sowohl für den IgG-Antikörper als auch des Darbepoetin alfa von der Biofidus AG (Bielefeld, Germany) untersucht und die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse gewonnen.

Glykoanalytik des Immunoglobulins G des Zellklons CHO-DP 12:

Nachfolgend sind die Ergebnisse der, mittels LC-ESI-Massenspektrometrie untersuchten Qualitätsattribute des Antikörpers aufgeführt. Die Produktionsstufe mit vorheriger zellzahl geregelter Vorkultur ist in Abbildung 60 durch grau, die ohne zellzahl geregelte Vorkultur durchgeführten produktionsähnlichen Prozesse gelb dargestellt.

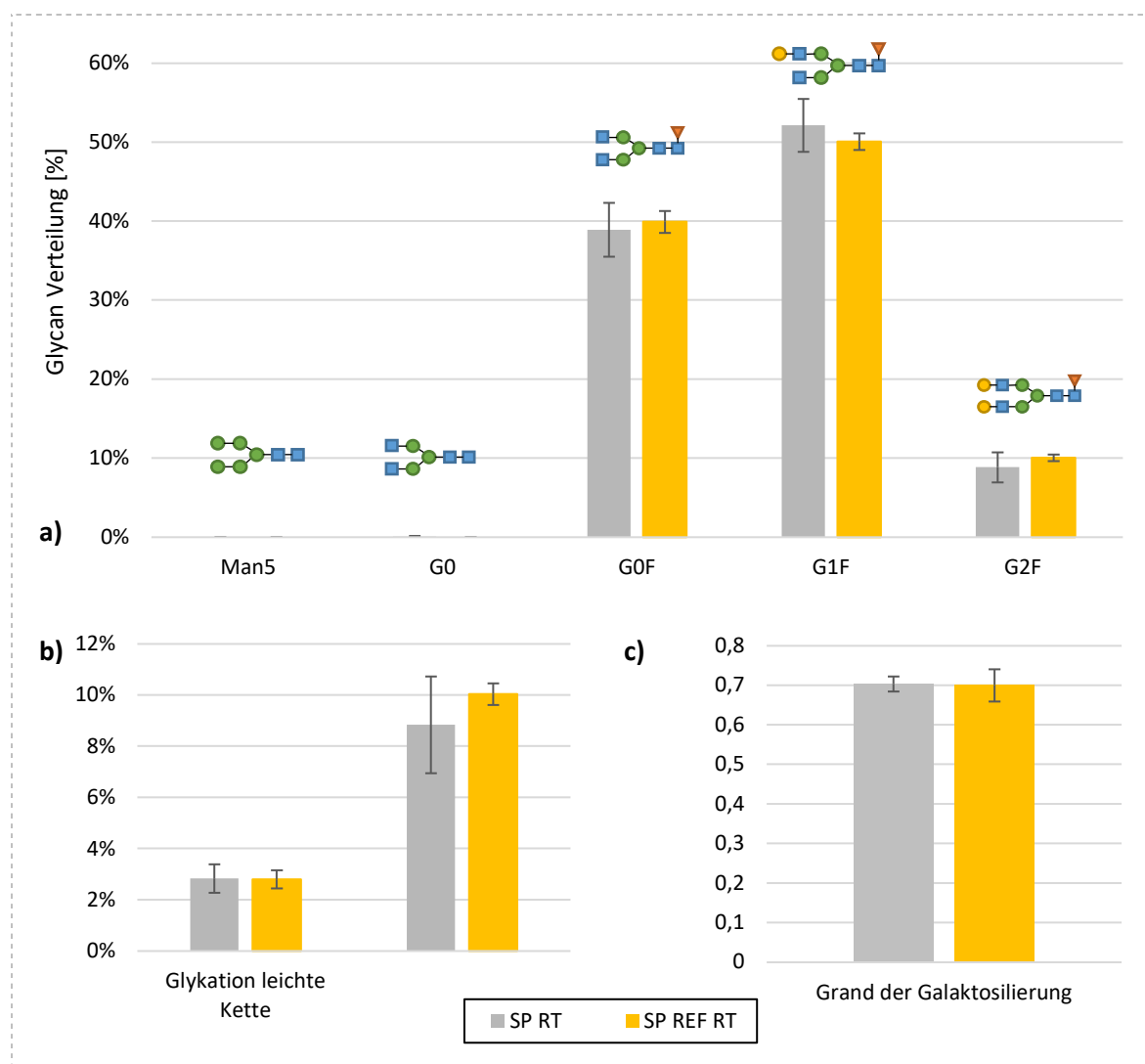


Abbildung 60 Vergleich des Glykosylierungsprofils a) sowie der Glykation der leichten Ketten b) und der Grad der Galaktosylierung c) des IgG-Produktes für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahl geregelte Vorkultur.

Dem Glykosylierungsprofilen der SP RT und SP REF kann in beiden Fällen entnommen werden, dass hauptsächlich Glykosilierungen des Typs G1F mit einer Galaktose und einer Fruktose sowie vom Typ G0F mit einer Galaktose vorliegen. Niederwertige Manose 5 sowie G0 Strukturen liegen weder in den produktionsähnlichen Prozessen SP RT als auch den SP REF RT Prozessen in einem nennenswerten Maße vor. Im Allgemeinen lässt sich für die SP RT und SP REF RT Prozesse ein sehr ähnliches Glykosilierungsprofil feststellen. Im Falle der Produktionsstufe nach der zellzahlgeregelten Vorkultur SP RT kann eine im Vergleich mit den SP REF RT Prozessen leicht erhöhte Standardabweichung festgehalten werden. Der Grad der Galaktosilierung liegt bei den untersuchten Prozessen im Mittel bei einem Wert von 0,7. Die Standardabweichung der Produktionsstufe SP REF RT ist in diesem Fall höher als in der Produktionsstufe SP RT mit zellzahlgeregelter Vorkultur.

Glykoanalytik des Darbepoetin alfas:

Mit dem Ziel eine gesicherte Aussage zur Qualität des Darbepoetin alfas zu tätigen wurde im Rahmen der Analytik die Größe des Gesamtproteins mittels einer SDS-Pages (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gelelektrophorese) und die Ladungsverteilung der Glykane unter Zuhilfenahme der SAX-FLD (Anionenaustauschchromatographie mit gekoppelter Fluoreszenz Detektion) untersucht.

In Abbildung 61 ist ein Bild des SDS-Gels der reduzierten Proben aufgezeigt. Für alle Proben wird bei einer Bande im Bereich von 42 kDa bis 51 kDa (roter Kasten), höchstwahrscheinlich Darbepoetin, nachgewiesen.

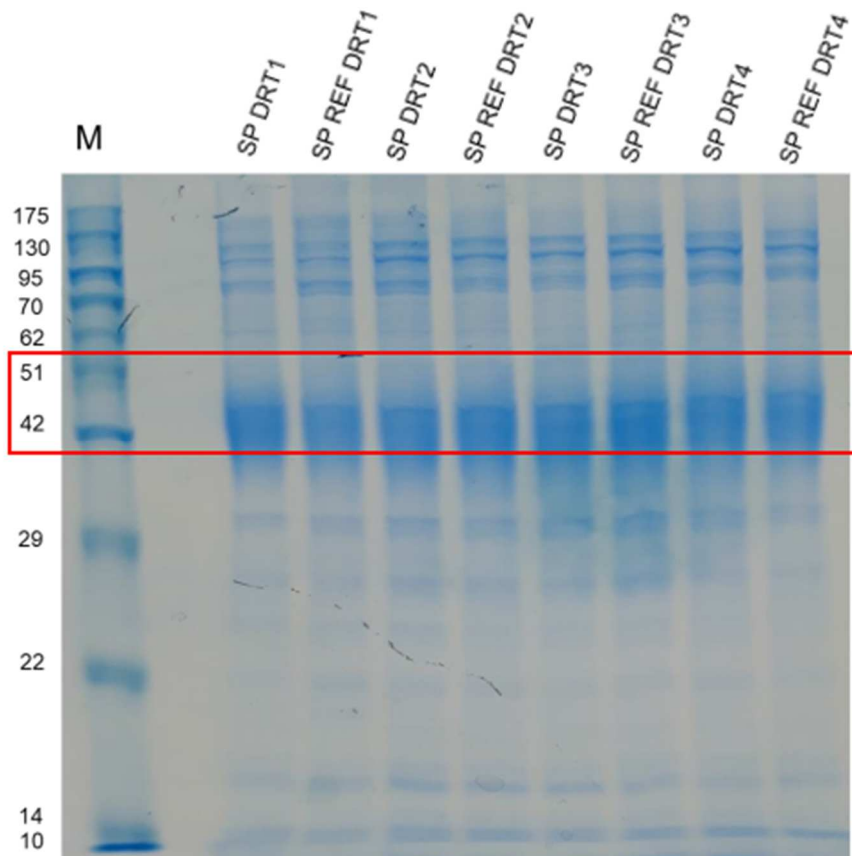


Abbildung 61: SDS-Gel der produktionsähnlichen Prozesse mit zellzahleregelter Vorkultur (SP DRT 1-4) und ohne zellzahleregelter Vorkultur (SP REF DRT 1-4). Darbepoetin alfa wird bei innerhalb des roten Kastens bei 42 kDa bis 51 kDa nachgewiesen

Wie aus Abbildung 61 ersichtlich wird traten in jeder Probe bis zu 14 weitere Banden auf. Diese Daten deuten auf eine Kontamination der Probe hin, die die Glykananalyse beeinflussen kann. Wenn sich in der Probe neben Darbepoetin andere Glykoproteine befinden, zeigen die Ergebnisse der SAX-FLD-Ergebnisse nicht das N-Glykanprofil von Darbepoetin, sondern aller Glykoproteine in der Probe.

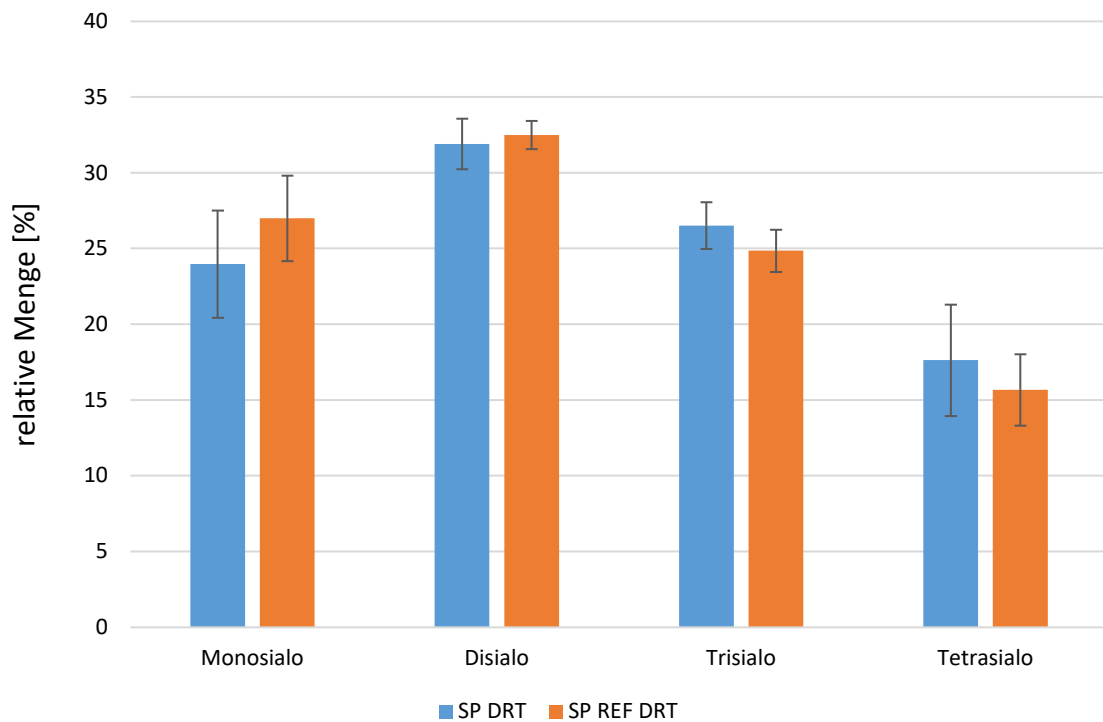


Abbildung 62: N-Glykanprofil von Darbepoetin alfa für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahl geregelter Vorkultur

Die N-Glykanprofile der analysierten Proben der produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahl geregelter Vorkultur zeigen ein sehr ähnliches Bild und aufgrund der sich überschneidenden Standardabweichungen kann von einer nahezu gleichen Verteilung der Ladungsformen ausgegangen werden. Zu besserer Vergleichbarkeit wurde die hypothetische Ladungsnummer, gemäß Gleichung (6-11) berechnet¹⁷⁹.

$$z = 0 \cdot AS + 2 \cdot MS + 2 \cdot DS + 3 \cdot TrS + 4 \cdot TeS \quad (6-11)$$

mit

AS = relativer Anteil Assialo N-Glycane

MS = relativer Anteil Monosialo N-Glycane

DS = relativer Anteil Disialo N-Glycane

TrS = relativer Anteil Trisialo N-Glycane

TeS = relativer Anteil Tetrasialo N-Glycane

In Abbildung 63 ist die hypothetische Ladungsnummer des Gesamtproteins des produktionsähnlichen Prozesses mit zellzahl geregelter Vorkultur (SP DRT) und ohne zellzahl geregelter Vorkultur (SP REF DRT) vergleichend dargestellt.

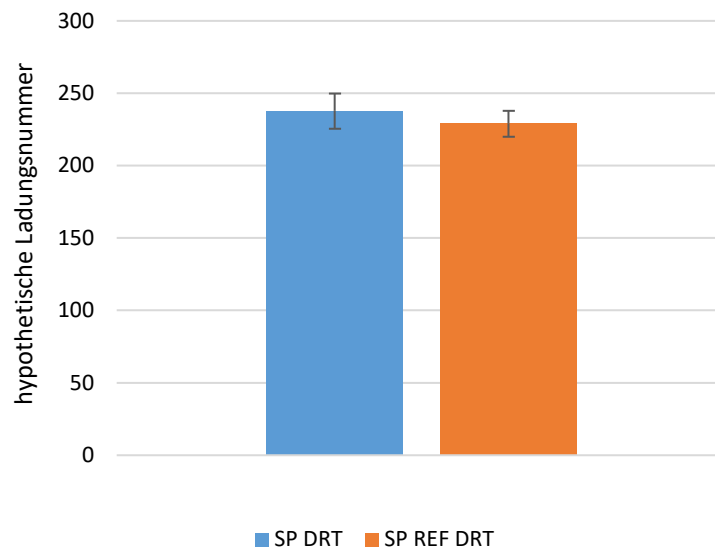


Abbildung 63: Hypothetische Ladungsnummer von Darbepoetin alfa für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahl geregelter Vorkultur

Abbildung 63 zeigt deutlich, dass sich die Ladungsnummer der produktionsähnlichen Prozesse mit (SP DRT) und ohne (SP REF DRT) zellzahl geregelter Vorkultur mit Werten von $237,75 \pm 12,2$ und $229,00 \pm 9,0$ entsprechen.

7 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines industrietauglichen und selbstadaptiven Zellzahlreglers, der unter Ausnutzung der temperaturabhängigen Wachstumsrate die Vermehrungsgeschwindigkeit tierischer Zellen regelt. Grundvoraussetzung für die temperaturgesteuerte Zellzahlregelung ist die Ermittlung und mathematische Beschreibung der temperaturabhängigen Wachstumsrate, die mit der Qualifizierung der Reaktoreinheit sowie der Verifizierung der online-Messsonde einhergeht. Nach der Entwicklung der Zellzahlregelung ist diese im Versuch zu testen und zu optimieren.

Da eine Änderung der Wachstumsrate mit einer Beeinflussung des Zellmetabolismus einhergeht, sind die biologischen Auswirkungen der Zellzahlregelung sowohl innerhalb der Inokulationsstrecke, als auch in einem produktionsähnlichen Prozess zu ermitteln und zu bewerten.

7.1 Qualifizierung der umgebauten Anlage

Mit dem Ziel, eine Reaktoranlage zu erhalten, innerhalb derer vier parallele Prozesse durchgeführt werden können, wurde im ersten Teil der Arbeit eine bestehende für Mikroorganismen ausgelegte Anlage an die Bedürfnisse eukaryotischer Zellen angepasst. Im Rahmen dessen wurde beispielsweise eine CO₂-basierte pH - Regelung implementiert und zur Einstellung des gelösten Sauerstoffgehalts eine Festbegasung über den Kopfraum installiert. Nachfolgend wurde in Rahmen von Qualifizierungsversuchen bei einer konstanten Reaktortemperatur überprüft, inwieweit es möglich ist, Zellen zu kultivieren und deren Wachstumsverhalten zu bestimmen. Innerhalb von fünf Reaktorversuchen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eukaryotische Zellen ohne die Zugabe von Antibiotika steril in der umgebauten Anlage zu kultivieren. Der in Abschnitt 6.1 aufgestellte Vergleich der Wachstumskurven des selben Zellklons bei unterschiedlichen Reaktoranlagen zeigte, dass eine verringerte maximale Zellkonzentration mit einer erhöhten mittleren spezifischen Wachstumsrate die umgebaute Reaktoranlage ausgezeichnet hat. Die mittlere spezifische Wachstumsrate innerhalb der beiden verglichenen Reaktoranlagen entsprach zudem der von Heinrich et.al. für den Zellklon CHO-PF12#1934 im Medium TC-42

(Xell,Bielefeld) dokumentierten spezifischen Wachstumsrate von 0,7 [1/d] - 0,8 [1/d] in speziell, für die Zellkultur ausgelegten Bioreaktoren¹⁸⁰. In Anbetracht der Standardabweichungen beider Reaktoranlagen und der für die Zellzahlregelung relevanten exponentiellen Wachstumsphase wurde die verringerte mittlere maximale Zellkonzentration für das Forschungsprojekt als unkritisch eingestuft. Da die Biostat B-Anlage und die verwendete SCADA-Software MFCS-DA über eine Dybanic Link Library (DLL) einen einfachen Zugriff auf einzelne Prozessparameter erlaubt, wurden alle Versuche mithilfe dieser Anlage durchgeführt.

7.2 Verifizierung der Incyte-Sonde

Innerhalb der Verifizierung der Incyte-Sonde mit konstanten Prozesstemperaturen zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der Zellkonzentration zwischen $0,37 \times 10^6$ Zellen/ml bis 7×10^6 Zellen/ml über den Temperaturbereich von 31°C - 37°C. Bei der Zellkonzentration größer 7×10^6 Zellen/ml zeigt sich eine deutlich größere Streuung der Messwerte. In Anbetracht der in Abschnitt 4.3.2 erläuterten Funktionsweise der Zellzahlsonde ist diese Abweichung vermutlich in der Variation des Zellvolumens gegen Ende des Prozesses und der über die Kultivierungszeit konstanten Berechnung, unter Verwendung der am Anfang der Kultur bestimmten Umrechnungsparameter, der Zellkonzentration zu erklären. Bereits 1989 zeigten Frame et. al.¹⁸¹ eine Reduktion des Zellvolumens über die Dauer einer Batchkultur auf. Die Verringerung des Zellvolumens über die Zeit lässt sich zum einen durch mögliche Erhöhung der Osmolarität über den Prozesszeitraum und den damit einhergehenden Wasserverlust der Zelle an das Medium erklären¹⁸². Zum anderen erhöht sich die Anzahl apoptotischer Zellen gegen Ende der Kultur. Die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen führt wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben zu einer Verringerung des mittleren Zelldurchmessers und somit des Zellvolumens. Im Hinblick auf die Alterung der Kultur innerhalb der durchgeführten Versuche kann im Konzentrationsbereich größer 7×10^6 Zellen/ml keine unabhängige und allgemeingültige Aussage bezüglich der linearen Abhängigkeit der Permittivität und der Zellkonzentration getroffen werden.

Aufgrund der von Weidemann et.al⁶² beschriebenen temperaturabhängigen Verringerung der Zellgröße konnte zu Beginn des Forschungsprojektes nicht abgeschätzt werden inwiefern sich eine sprunghafte Änderung der

Prozesstemperatur auf die Qualität der Onlinemessung der Zellkonzentration auswirkt.

In Anbetracht dieser Unsicherheit wurde experimentell der Einfluss einer abrupten Temperaturänderung auf das Messverhalten der Sonde untersucht. Innerhalb der in Abschnitt 6.2 dargestellten Versuchsergebnisse konnte kein Einfluss auf die Bestimmung der Zellkonzentration ermittelt werden. Bestätigt werden diese Ergebnisse von Carvell et al., welcher den Einsatz der Permittivitätssonde in einem cGMP-Prozess beschreibt, innerhalb dessen die Temperatur von 37,0 °C auf 33,5 °C gesenkt wurde. In den vorgestellten Ergebnissen lassen sich, trotz Änderung der Prozesstemperatur, ebenfalls keine signifikanten Abweichungen der offline und online ermittelten Zellkonzentrationen feststellen¹⁸³.

Entgegen aller Vorversuche zeigte sich über die gesamte Laufzeit des Projektes, eine zum Teil erhebliche Differenz der online und offline ermittelten Zellkonzentrationen. Ein Zusammenhang dieser Differenzen mit der Regelung beziehungsweise mit den Temperaturänderungen konnte, aufgrund der sowohl bei konstanten, als auch bei variablen Temperaturen auftretenden Messwertabweichungen nicht festgestellt werden. Die Differenzen der online und offline Messungen sind sehr variabel in ihrer Ausprägung. So lag der online Messwert sowohl oberhalb, als auch unterhalb der offline ermittelten Zellkonzentration. Die Höhe der Messwertabweichung nahm im Laufe des Projektes geringfügig zu, sodass zum Beispiel das Alter der Sonde oder die Anzahl der Autoklavierzyklen die Qualität der Messergebnisse beeinflusst haben könnte. Entgegen der getätigten Beobachtung attestieren Moore et al. der permittivitätbasierten Zellzahlbestimmung generell eine hohe, prozessmodus- und sondenunabhängige Reproduzierbarkeit¹⁸⁴. Da in der hier durchgeführten Arbeit entsprechende Abweichungen in den online und offline ermittelten Werten auftraten, wäre im Weiteren zu eruieren beispielsweise durch das Messen mit baugleichen Sonden, ob diese in einem Defekt der Sonde oder des Messaufbaus zu finden sind. Ist dies nicht der Fall könnten die online Messwerte der Zellzahlsonde in dreierlei Weisen optimiert beziehungsweise überprüft werden. Zum Ersten könnte die Konzentrationsmessung durch weitere Messungen zum Beispiel, wie von Schuler et al. es für Mikroorganismen beschreibt, durch die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme OTR überprüft und angepasst werden²³. Als zweite

.

Korrekturmöglichkeit der Online-Messungen wäre das zusätzliche Berechnen des für die Umrechnung der Permittivität in die Zellkonzentration notwendigen Zellfaktors mit jeder neuen Offline-Messung denkbar. Da innerhalb des Zellzahlreglers die Möglichkeit vorhanden ist, die extern bestimmte Zellkonzentration einzugeben, könnte die Anpassung des Zellfaktors mit wenig Aufwand in den Zellzahlregler implementiert werden. Diese Möglichkeit bedingt jedoch, dass im Idealfall mehrere exakt arbeitende Offline-Messmethoden zur Bestimmung der Zellkonzentration vorliegen. In der vorliegenden Arbeit gestaltete sich die Messung der tatsächlichen Zellkonzentration innerhalb des Reaktors, durch die ebenfalls auftretenden Abweichungen der beiden offline Messungen, die mithilfe der Neubauerzählkammer und dem ViCell durchgeführt wurden, schwierig. In Falle der Offline-Messungen konnte jedoch eine verhältnismäßig konstante Abweichung festgestellt werden, innerhalb derer die Messwerte der automatischen (ViCell) Zählung oberhalb der manuell (Neubauer) gezählten Zellen lag. Aufgrund des zudem anwenderunabhängigen Auftretens der Differenzen kann in Bezug auf die Offline-Messungen von einem systematischen Fehler ausgegangen werden.

Als dritte denkbare Möglichkeit die Abweichungen der Online- und Offline-Messungen zu reduzieren ist in der mathematischen Modellbildung zu sehen. Es wäre denkbar die zeitliche, prozessbedingte Variation des Zellfaktors mathematisch zu beschreiben und in das Programm zu implementieren. Für diese Optimierung sind zum einen weitere systematische Versuche notwendig, innerhalb derer der Einfluss einzelner Prozessparameter auf die Messung untersucht und miteinander in Bezug gesetzt werden müssten. Durch die Vielzahl der Prozessparameter, die einen Einfluss auf das Zellvolumen ausüben^{31,181,185}, gestaltet sich die hinreichend genaue mathematische Beschreibung als schwierig.

7.3 Bestimmung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate $\mu(T)$

Wie bereits von Watanabe⁵⁴ 1967 und im weiteren von Chuppa et al.⁵⁶ und Furukawa et al.¹⁸⁶ bestätigt, konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bei einer verringerten Prozesstemperatur eine reduzierte spezifische Wachstumsrate tierischer Zellen beobachtet werden. Wie aus den im Anhang beigefügten Wachstumsverläufen (Anhang-Abbildung 4 bis Anhang-Abbildung 7) ersichtlich

wird, konnte ebenso die von Fogolín et al.¹⁸⁷, Kim et al.¹⁸⁸ und Yoon et al.¹⁸⁹ dokumentierte, deutliche Verlängerung der Kultivierungsdauer bei gleichbleibend hoher Vitalität der Zellen erfasst werden. In Bezug auf die maximale Lebendzellkonzentration konnte entgegen der Arbeiten von Chuppa et al.⁵⁶, Reuveny et al.⁵⁵ und Weidemann et al.⁶² ein deutlicher Temperatureinfluss festgestellt werden. Unter Einbezug der bei 37 °C durchgeführten Referenzkulturen konnten bei Temperaturen von 33 °C und 35 °C deutlich erhöhte maximale Lebendzellkonzentrationen erfasst und somit zum Teil die Ergebnisse von Trummer et al.¹⁹⁰ bestätigt werden. Mit der weiteren Reduktion der Prozesstemperatur auf 31 °C konnte eine im Vergleich zu den Versuchsreihen bei 33 °C, 35 °C und 37 °C verringerte maximale Lebendzellzahl festgestellt werden. Da in den Kulturen bei 31 °C jedoch auch die mitlaufende Referenzkultur bei 37 °C eine deutlich reduzierte maximale Lebendzellzahl aufwies und diese den bei 31 °C erreichten Zellkonzentrationen entsprach (siehe Anhang-Abbildung 7), kann die von Fox et al.¹⁹¹ aufgezeigte Verringerung der maximalen Lebendzellkonzentration bei einer Temperatur von 32 °C nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die verringerte maximale Lebendzellkonzentration von anderen Parametern, wie zum Beispiel von dem fortgeschrittenen Alter der Zellen vor Inokulation der Reaktoren, hervorgerufen ist.

Als maßgebliche Voraussetzung für die Entwicklung des Zellzahlreglers ist die Ermittlung und mathematische Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der temperaturabhängigen Wachstumsrate zu sehen. Da die spezifische Wachstumsrate durchaus Analogien zur Umsatzrate chemischer Reaktionen aufweist, wird die temperaturabhängige spezifische Wachstumsrate häufig auf Grundlage der Arrhenius Gleichung beschrieben^{144,192,193}. In Bezug auf die Entwicklung der Zellzahlregelung und insbesondere mit Blick auf die möglichst einfache Übertragung der Regelung auf unterschiedliche Zellklone und Reaktorsysteme, wurde eine einfache und dennoch präzise mathematische Beschreibung für das temperaturabhängige Verhalten der Wachstumsrate gesucht. Des Weiteren wurde bereits zu Beginn der Arbeit angestrebt, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt die zellklon- und zelllinienspezifische temperaturabhängige Wachstumsrate mit möglichst geringem Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand zu ermitteln.

Innerhalb der Arbeit wurde mithilfe dreier Methoden das temperaturabhängige Wachstumsverhalten untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte die, in der Literatur beschriebene und vielfach im Labor aufgetretene, prozessabhängige Wachstumsrate beobachtet werden. Die Zellen wuchsen in diesem Fall innerhalb der ungeregelten Erlenmeyerkolben deutlich schneller als in den geregelten Rührkesselreaktoren. Liu et. al.¹⁹⁴ konnten ebenfalls eine im Vergleich mit Rührkesselreaktoren erhöhte spezifische Wachstumsrate und maximale Zellkonzentration im geschüttelten Erlenmeyerkolben nachweisen. Eine Studie von Zhang et al.¹⁹⁵ zeigt eine identische maximale spezifische Wachstumsrate, mit einer erhöhten maximalen Zellkonzentration auf. Innerhalb dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass Zellen in Bezug auf die temperaturabhängige Reduktion der spezifischen Wachstumsrate tendenziell ein kulturgefäßunabhängiges Verhalten aufweisen. So lässt sich, wie in Abschnitt 5.2.3 und 5.2.2 aufgezeigt wird, die bei einer Temperatur resultierende spezifische Wachstumsrate durch das Produkt aus der kulturgefäßabhängigen maximalen spezifischen Wachstumsrate und einem kulturgefäßunabhängigen Faktor berechnen. Aus dieser Erkenntnis heraus, lässt sich ableiten, dass es im Hinblick auf die durchzuführenden Vorversuche zur Programmierung der Zellzahlregelung, im Falle der CHO-DP12 Zelle ausreicht, Versuche im Erlenmeyerkolben durchzuführen. Wäre es möglich diesen Zusammenhang mit weiteren Zellklonen zu erfassen, könnte auf die Zeit-, Kosten- und arbeitsintensiven Reaktorvorversuche bei verschiedenen konstanten Prozesstemperaturen verzichtet werden. Ähnlich der Variation des Wachstumsverhaltens der Zelle in unterschiedlichen Kulturgefäßen, wie dem Erlenmeyerkolben und dem Rührkesselreaktor, treten innerhalb der Maßstabsvergrößerung eines Kulturgefäßes abweichende Wachstumscharakteristiken auf^{196–198}. Da in der durchgeführten Arbeit alle Versuche in Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 500 ml durchgeführt wurden, stellt sich die Frage, inwieweit die Berechnung der temperaturabhängigen Wachstumsrate an die jeweiligen Prozesse angepasst werden muss. Anhand der vergleichenden Ergebnisse, der Kulturen im Erlenmeyerkolben und dem Rührkessel, lässt sich, aufgrund der deutlich geringeren Unterschiede bei der Maßstabsvergrößerung des Reaktorsystems vermuten, dass die Zellen sich in Bezug auf das temperaturabhängige Wachstumsverhalten ähnlich

verhalten könnten. Dies würde bedeuten, dass sich das im Zellzahlregler implementierte mathematische Modell zur Beschreibung der temperaturabhängigen Wachstumsrate auch in der Maßstabsvergrößerung durch die Änderung der maximalen spezifischen Wachstumsrate anpassen ließe. Diese These ist jedoch ausschließlich aus den Ergebnissen des Vergleichs der durchgeführten Versuche abgeleitet und müsste unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Zellklone und Reaktoren bestätigt werden. Aus diesem Grund bleibt die Fragestellung, inwieweit sich die Ermittlung der notwendigen Parameter optimieren lässt, und ob es unter Umständen möglich ist, alle für die Zellzahlregelung notwendigen Parameter aus einem Versuch zu gewinnen, nicht vollständig geklärt.

Bezüglich dieser Fragestellung zeigten die Versuche des Charakterisierungslaufs, dass der Zellzahlregler auf Grundlage eines Reaktorlaufs mit festgelegtem Temperaturprofil generell in der Lage ist, alle notwendigen Parameter zu bestimmen. Für eine sichere Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate durfte die Dauer der einzelnen Temperaturstufen aufgrund des Rauschverhaltens der Incyte-Sonde und einer Adaptationsphase der Zellen an die neue Prozesstemperatur einen Tag nicht unterschreiten. Aus diesem Grund und wegen der natürlichen zeitlichen Begrenzung des Zellwachstums innerhalb der Batchkultur, können maximal vier Temperaturen in Bezug auf die spezifische Wachstumsrate innerhalb eines Charakterisierungslaufs untersucht werden. Trotz der durch Simulationen festgestellten maximalen Anzahl zu untersuchender Temperaturen, zeigte sich im Rahmen des Versuchs, dass die zeitliche Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate¹⁹⁹, insbesondere innerhalb der als letztes eingestellten Temperatur, nicht zu vernachlässigen ist.

Im Vergleich der mit den unterschiedlichen Methoden ermittelten Parametersätze zur Definition des mathematischen Modells der temperaturabhängigen Wachstumsrate, dargestellt in Abbildung 64, zeigt sich eine für die Regelung hinreichend gute Übereinstimmung aller ermittelten Parameter. Dennoch sind, insbesondere bei der minimalen und maximalen Temperatur, Unterschiede in den Parametern zu erkennen. Gleichzeitig zeigt sich in Abbildung 64 b eindrucksvoll die bereits in Abschnitt 6.3 beschriebene kultursystemabhängige Änderung der maximalen spezifischen Wachstumsrate.

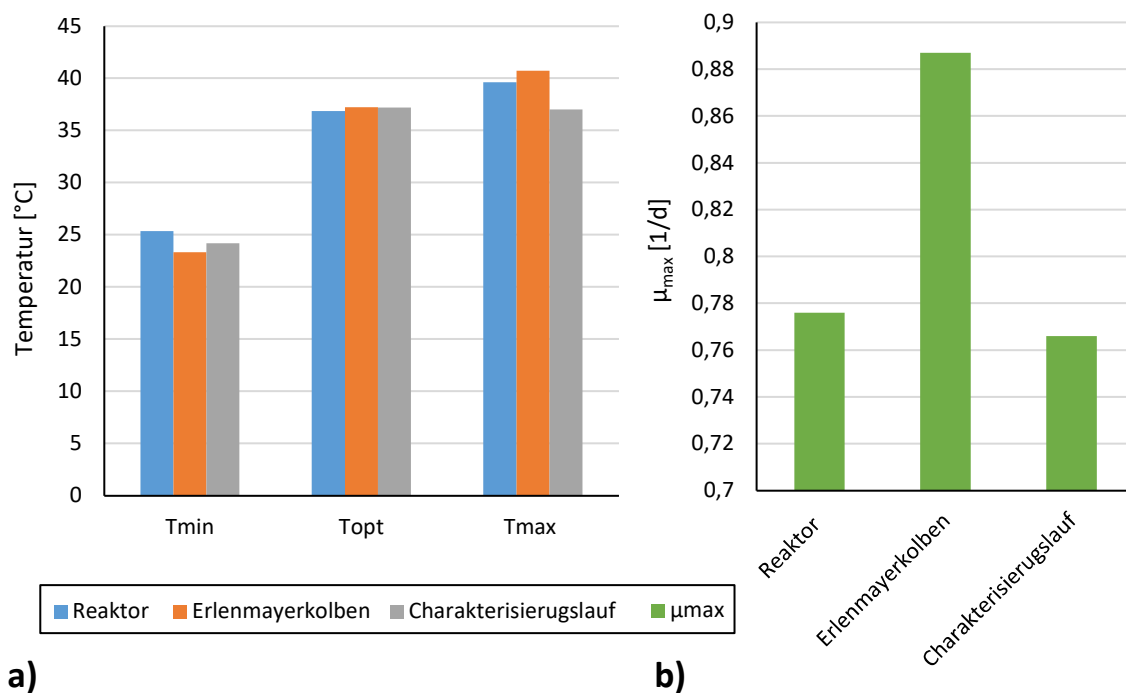


Abbildung 64: Vergleich der ermittelten Parametersätze in Bezug auf die unterschiedlichen Methoden zur Ermittlung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate

Zur Optimierung des Temperaturprofils des Charakterisierungslaufs und mit dem Ziel die in Abbildung 64 a dargestellten Parameterdifferenzen zu reduzieren, wurde die Fischer-Informations-Matrix aufgestellt und zur Ermittlung der vier Parameter zur Definition der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate mithilfe des D- und A-Kriteriums gelöst. Eine experimentelle Überprüfung der ermittelten Temperaturen wäre im Weiteren interessant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass innerhalb der Arbeit ein mathematisches Modell gefunden wurde, welches eine einfache Anpassung an unterschiedliche Reaktionsbedingungen erlaubt. Zudem konnte gezeigt werden, dass es generell möglich ist, alle für dieses Modell notwendigen Parameter mithilfe der drei durchgeführten Methoden zu bestimmen.

7.4 Zellzahlregelung

Mit dem während dieser Arbeit entwickelten Zellzahlregler ist es möglich, die spezifische Wachstumsrate und somit die Zellzahl zu regeln. Dabei konnte es verdeutlicht werden, dass in Versuchen mit unterschiedlichen Initialzellzahlen die

zuvor vom Anwender definierte online ermittelte Zellzahl zum geplanten Endzeitpunkt mit einer Genauigkeit von +3% bis -10% und einer mittleren Abweichung von 2,05% erreicht werden kann. Entgegen vergleichender Studien von Aehle et al., innerhalb derer ebenfalls ein Zellzahlregler für tierische Zellen, jedoch auf Basis einer Substratlimitierung entwickelt wurde, konnte keine Normalverteilung in Bezug auf die Abweichungen der online gemessenen Endzellkonzentration von der Zielkonzentration festgestellt werden. Diese Beobachtung ist vermutlich in der Vernachlässigung der zeitlichen Abhängigkeit der Vermehrungsgeschwindigkeit der Zellen begründet. So wurde in der temperaturbasierten Zellzahlregelung die Annahme getroffen, dass Zellen sich über die Dauer des angestrebten Prozessabschnittes in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und sich somit bei einer Prozesstemperatur von 37°C mit der konstanten maximalen spezifischen Wachstumsrate vervielfältigen. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass entweder die Annahme der konstanten maximalen spezifischen Wachstumsrate nicht zutreffend ist oder, dass die Zeit der Adaptation der Zellen an neue Prozesstemperaturen eine dämpfende Wirkung in Bezug auf die spezifische Wachstumsrate ausübt. Im Verlauf der Arbeit wurde dieses Regelverhalten erkannt und versucht, durch ein gezieltes additives Erhöhen der vom Regler berechneten Soll-Wert-Temperatur zu kompensieren. Im Rahmen dessen wurde die Gesamtdauer des Prozesses in drei Zeitbereiche unterteilt und additiv die vom Zellzahlregler berechnete Soll-Wert-Temperatur je nach Zeitabschnitt um 0,5 °C bis 0 °C erhöht. Aufgrund dessen wuchsen die Zellen, in den ersten zweidritteln der Prozessdauer schneller als vom Regler zum Prozessstart als idealen Verlauf angenommen. Resultierend aus der Temperaturüberhöhung konnten die Differenzen der online-gemessenen Zellkonzentration gegenüber der Zielzellkonzentration zwar nicht verringert werden, der beobachtete und nachfolgend noch beschriebene Temperaturanstieg gegen Ende des Prozesses wurde jedoch gemildert. In Anbetracht dessen wäre es in der weiteren Optimierung des Reglers ratsam die zeitliche Variation der spezifischen Wachstumsrate und möglicherweise des Zellvolumens einzubeziehen. Inwiefern die zeitlichen Abhängigkeit des Zellwachstums in den Zellzahlregler implementiert werden könnte, wird in Abschnitt 7.7 erläutert.

Hinsichtlich des, durch die Zellzahlregelung entstehenden Temperaturprofils konnten, im Falle der Versuche ohne Änderungen der Endparameter, keine größeren Temperatursprünge, sondern vielmehr eine stetige Temperaturanpassung über die Gesamtdauer der Prozesse verzeichnet werden. Gegen Ende der Prozesse änderte sich, wie bereits angesprochen, die Prozesstemperatur aufgrund der geringen Restlaufzeit am stärksten und erreichte in den meisten Fällen zum Ende des Prozesses die optimale Prozesstemperatur. Im Allgemeinen stieg die Temperatur jedoch auch zum Prozessende moderat an. Die größten Variationen der Temperaturen wurden, wie erwartet in den Versuchen mit Änderung der Endparameter während des laufenden Prozesses, sowie dem Versuch mit induzierter Zellrast verzeichnet. Auch in diesen Fällen konnten die zuvor definierten Endparameter erreicht werden. Unvorhergesehen zeigte sich, dass die online gemessene Endzellkonzentration in den Prozessen mit einer größeren, vom Anwender, oder im Falle des Versuchs der Zellrast, vom Zellzahlregler verursachten Störung des Normalbetriebs mit einer höheren Genauigkeit erreicht werden konnte, als in Versuchen mit zuvor festgelegten Endparametern und durchlaufender Zellzahlregelung. Die Präzision der Zellzahlregelung ist maßgeblich von der Reaktionszeit der Zellen abhängig. Je schneller die Zellen auf die induzierten Temperaturänderungen reagieren desto genauer ist die Regelung. Dieser Zusammenhang und die zuvor beschriebenen Beobachtungen könnte darauf hinweisen, dass schnelle Temperaturänderungen einen stärkeren antiproliferativen Einfluss auf die Zellen ausüben als langsame Änderungen der Temperatur. Klevecz et al.²⁰⁰ weist auf eine Gewöhnung der Zellen in Bezug auf die intermitotische Zeit an konstant niedrige Temperaturen hin und bekräftigt somit die aufgestellte These. In der aktuellen Literatur lassen sich jedoch keine weiteren Studien finden, die einen zunehmenden antiproliferativen Einfluss schneller Temperaturänderungen im Vergleich mit moderaten Temperaturänderungen systematisch untersuchen.

In Anbetracht der Differenzen der in Abschnitt 6.2 angesprochenen Online- und Offline-Messwerte ist, im Hinblick auf die Funktionsfähigkeit des Zellzahlreglers, die Abhängigkeit von der Online- Zellkonzentrationsmessung zu bedenken. Dies bedeutet, dass die Zellzahlregelung nur so gut sein kann, wie die Online-Messung der Zellkonzentration. Ist die Online- Bestimmung der Zellkonzentration nicht mit

einer hinreichenden Richtigkeit möglich, kann der Zellzahlregler die tatsächlich im Reaktor vorliegende Zellkonzentration nicht beeinflussen. In diesem Zusammenhang wäre eine Absicherung der Online-Messwerte durch eine Anpassung des Zellfaktors unter Verwendung der Offline-Messwerte, wie in Abschnitt 7.2 beschrieben, zu überdenken. Durch eine Anpassung des Zellfaktors, welcher zur Umrechnung der Permittivität in die Zellkonzentration benötigt wird, könnten die offline und online Messungen angeglichen werden. Dieses würde jedoch zu einer mehr oder weniger sprunghaften Änderung der Temperatur führen, bei täglichem angleichen der Offline- und Online- Messwerte würden sich diese im Gesamtprozess kaum bemerkbar machen.

7.5 Iterativer selbstlernender Regler

Die Versuche zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des selbstlernenden Algorithmus zeigen, dass eine Regelung der Zellzahl ohne Vorversuche mit einer Genauigkeit von 10 % möglich ist. Der Verlauf der sechs ermittelten Parametersätze aus vier Prozessen zeigt, dass mit Ausnahme eines Versuches alle Parameter im realistischen Bereich lagen. Die Ausnahme stellte der zweite Parametersatz des dritten Reaktorlaufs dar, innerhalb dessen die optimale Prozesstemperatur minimal oberhalb der ermittelten maximalen Temperatur für ein mögliches Zellwachstum lag. Da die maximale Temperatur definitionsgemäß nicht größer sein darf, als die optimale Prozesstemperatur, zeigt sich hier eine Optimierungsnotwendigkeit des iterativen Regelungsalgorithmus. Zur Optimierung und Ausschluss solcher Parametersätze sollte die in Abschnitt 5.3.1 beschriebene Plausibilitätsprüfung der ermittelten Werte mit der folgenden Bedingung (7-1) ergänzt werden:

$$T_{MIN} < T_{OPT} < T_{MAX} \quad (7-1)$$

Beide Werte unterscheiden sich jedoch ausschließlich in der Nachkommastelle, der Wert für die optimale Temperatur lag im Verhältnis zu den weiteren Versuchen im akzeptablen Wertebereich. Der Einfluss auf die Berechnung des nachfolgenden Parametersatzes kann aufgrund der Gewichtungen und der Versuchsanzahl als mäßig gering eingestuft werden, dennoch wäre es ratsam, solche Parameter von vornherein auszuschließen.

In Bezug auf die ermittelte maximale spezifische Wachstumsrate kann in der ersten Hälfte der Versuchsreihe ein Anstieg verzeichnet werden. Dieser mündet zum

Zeitpunkt des dritten Reaktorlaufs in einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von 0,91 1/d. Innerhalb der folgenden Kulturen wurde, durch den iterativen Regelungsalgorithmus, ein Abnehmen der maximalen spezifischen Wachstumsrate verzeichnet. Dieser Verlauf spiegelt den in der Literatur^{201–203} angesprochenen und in der Praxis beobachteten Verlauf der spezifischen Wachstumsrate in Bezug auf die Anzahl der Passagen eines Kulturansatzes wieder. In der Literatur lässt sich keine Studie finden, innerhalb derer dieser Zusammenhang automatisch erfasst wird, so dass sich in Bezug auf die Prozessentwicklung ein weiterer Einsatzbereich dieses Algorithmus eröffnet. Die umfassende automatische Analytik der kinetischen Prozessparameter könnte bei der Prozessoptimierung bestehender Anzuchtprozesse, in Bezug auf die optimale Passagenzahl vom Auftauprozess bis zum Produktionsprozess hilfreiche Informationen liefern^{204,205}.

Innerhalb der Versuche zeigte sich, dass die relative Abweichung der offline und online ermittelten Zellkonzentration mit der Anzahl der Versuche zunahm. Aufgrund dessen lässt sich die erhöhte spezifische Wachstumsrate auch durch die geringere Abweichung der Offline- und Online- Messwerte erklären. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass die angegebene relative Abweichung aus den Differenzen der Online und Offline- Messwerte zum Prozessende ermittelt wurde, jedoch über den zeitlichen Verlauf eines jeden Reaktorlaufs nicht konstant ist, sondern zunimmt. Dies führt im Umkehrschluss dazu, dass das tatsächliche Wachstum der Zellen innerhalb der ersten Reaktorlaufs aufgrund der deutlich stärker zunehmenden relativen Abweichung der Online- und Offline-Messwerte gedämpft wird und sich innerhalb des Reglers deutlich reduzierte kinetische Prozessparameter ergeben. Die Online-Messwerte des dritten Reaktorlaufs spiegeln durch die geringe Abweichung der Online- und Offline- Messwerte das reale Zellwachstum im Reaktor deutlich besser wieder als im ersten Reaktorlauf. Hinsichtlich der Funktionsprüfung des iterativen selbstlernenden Algorithmus lässt sich festhalten, dass die mathematischen Berechnungen auf Grundlage der Online-Messungen seine Funktionsfähigkeit anhand der ermittelten Parametersätze bewiesen hat. Es ist allerdings festzuhalten, dass aufgrund der Diskrepanzen der online und offline Messungen dieser Versuchsreihe keine nennenswerte Verbesserung der Parametersätze festzustellen ist. In Anbetracht der Ergebnisse

ist auch in diesem Punkt eine Absicherung der online ermittelten Messwerte mithilfe der offline Messungen ratsam.

7.6 Biologische Reaktion der Zellen auf die Zellzahlregelung

Im Folgenden werden die Ergebnisse in Bezug auf den Primärmetabolismus, den Zellzyklus sowie den Zelltod und die Qualität und Quantität des Produktes getrennt voneinander diskutiert.

7.6.1 Primärmetabolismus

Bezüglich des Glukose- und Laktatmetabolismus konnte die in der Literatur vielfach beobachtete Reduktion der Abbau- beziehungsweise Bildungsraten festgestellt werden. Den Ergebnissen zufolge mündete eine in Relation zu der maximalen spezifischen Wachstumsrate um den Faktor 2,8 reduzierte spezifische Wachstumsrate in einer Verringerung der Glukoseabbaurate um den Faktor 2,11. Unter Einbezug der Messfehler kann angenommen werden, dass sich die Glukoseaufnahmerate und die spezifische Wachstumsrate gleichermaßen reduzieren. Auffällig ist zudem die um den Faktor 5,9 gegenüber den Kulturen bei 37 °C reduzierte Laktatbildungsrate. In-vitro kultivierte tierische Zellen neigen häufig zu einem Überflusmetabolismus innerhalb dessen Glukose nach Durchlaufen der Glykolyse über Pyruvate auf direktem Weg in Laktat umgesetzt und nicht dem Zitronensäurezyklus zugeführt wird^{174,206}. Infolgedessen entspricht die Glukoseaufnahmerate in vielen Kulturen der Laktatbildungsrate. Eine reduzierte Glukoseaufnahmerate kann entweder durch das verminderte Überflusmetabolismus, oder durch Aufnahme von Laktat erklärt werden. Die Aufnahme von Laktat wird in der Zellkultur gelegentlich bei hohen Laktat und niedrigen Glukosekonzentrationen²⁰⁷ beobachtet, sodass im hier betrachteten Fall die Unterdrückung des Überflusmetabolismus als wahrscheinlicher gilt. Diese Annahme bestätigt den Verdacht von Fernandez-de-Cossio-Diaz et.al.²⁰⁸, dass der Überflusmetabolismus tierischer Zellen durch Erhöhung der Temperatur induziert werden kann. Innerhalb einer Bachelorarbeit mit Bezug zum Forschungsprojekt konnten die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden. Des Weiteren konnte ein Anstieg der Glukoseverbrauchsrate um 30 %, sowie die Erhöhung der Laktatbildungsrate um 20 % bei einer Prozesstemperatur von 39 °C festgestellt werden. Diese Beobachtung bestärkt die These bezüglich des

.

Temperatureinflusses in Zusammenhang mit dem Überflussmetabolismus. Neben der reduzierten Laktatbildung wird in der Literatur auch eine Verringerung der Ammoniumbildung bei Temperaturen kleiner 37 °C aufgezeigt. Ammonium wird hauptsächlich durch die metabolische Umsetzung von Glutamin gebildet. Glutamin dient wie Glukose, nach der Umwandlung zu Glutamat, ebenfalls der Energiegewinnung. Des Weiteren besitzt Glutamin einen Einfluss auf die Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Aminosucker und Asparagin. Hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit des Glutaminabbaus können der Literatur folgende Angaben entnommen werden. Chuppa et al.⁵⁶ beschreibt entgegen Trummer et al.¹⁹⁰ eine Reduktion der spezifischen Glutaminabbaurate. Rössler et al.²⁰⁹ und Weidemann et al.^{62,68} konnten das auch in dieser Arbeit festgestellte temperaturunabhängige Verhalten dokumentieren. Da als Nebenprodukt des Glutamins primär Ammonium entsteht, ist für die Bewertung des Zellmetabolismus auch das Verhältnis beider Substrate zueinander von Interesse. Der Literatur können unterschiedliche Angaben bezüglich des Verhältnisses entnommen werden, so wird unter anderem angegeben, dass pro umgesetztes Mol Glutamin 0,7 Mol Ammonium entstehen^{210–214}. Da in der vorliegenden Arbeit bei einer Temperatur von 37 °C pro Mol Glutamin 0,66 Mol Ammonium gebildet wurden entspricht dies den angesprochenen Literaturwerten. Mit abnehmender Temperatur konnte jedoch eine Verschiebung Verhältnisses des Glutaminabbau- zu Ammoniumbildungsverhältnis festgestellt werden. In Folge der Temperaturreduktion wurde pro Mol Glutamin ein Mol Ammonium gebildet. Auch dieses Verhältnis liegt im Rahmen des für die Zellkultur möglichen²¹⁵, zeigt jedoch, dass die Temperatur durchaus einen Einfluss auf den Glutaminmetabolismus ausüben könnte. Hinsichtlich der Gründe, warum sich das Verhältnis ändert, wären zwei Möglichkeiten denkbar. Es wäre zum einen möglich, dass sich, wie bereits angesprochen, der Glutaminstoffwechsel der Zellen bei Reduktion der Temperatur verändert. Eine zweite denkbare Erklärung wäre, dass bei einer höheren Temperatur mehr Ammonium ausgetragen wird. Unter Berücksichtigung der steigenden Begasungsrate und Dissoziationszahlen für Ammonium bei höheren Temperaturen wäre es durchaus möglich, dass mehr Ammonium über den Abgasstrom ausgetragen wird und die festgestellte Änderung im Verhältnis des Glutaminabbaus und der Ammoniumbildung rein durch die physikalischen

Zusammenhänge zu erklären ist. Für eine genaue Analyse der Gründe wären weitere Versuche notwendig.

Hinsichtlich der Auswirkungen der Zellzahlregelung auf den Metabolismus kann im Falle des Zellklons CHO-DP12 die erwartete reduzierte Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate während der zellzahlgeregelten Vorkultur beobachtet werden. Innerhalb der produktionsähnlichen Prozesse konnte, unter Berücksichtigung der großen Fehlerbalken, kein Einfluss der Zellzahlregelung innerhalb der Vorkultur auf die Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate erkannt werden. In Anbetracht des spezifischen Glutaminverbrauchs- und Ammoniumbildungsrate kann aufgrund des nahezu konstanten Verlaufs kein Einfluss festgestellt werden. Lediglich in Bezug auf die Reaktionsrate des Glutaminabbaus, inklusive der thermischen Degradation des Glutamins, kann innerhalb der zellzahlgeregelten Vorkultur eine Reduktion verzeichnet werden.

Überraschenderweise zeigt sich innerhalb der zellzahlgeregelten Kulturen eine minimal erhöhte Glukoseverbrauchsrate. Eine genaue Erklärung dafür kann aufgrund der fehlenden Versuche bei konstanten Temperaturen nicht gefunden werden. Da innerhalb der produktionsähnlichen Reaktoren eine nahezu identische Glukoseverbrauchs- respektive Laktatbildungsrate verzeichnet werden kann, ist auch im Falle der DPO-KL Zelle kein Einfluss der Zellzahlregelung innerhalb der Vorkultur auf nachfolgende Prozesse auszumachen. Hinsichtlich der Glutaminverbrauchs- und Ammoniumbildungsrate konnte in den Kulturen der DPO-KL-Zelle in Bezug auf den Vergleich der beiden Vorkulturen und der produktionsähnlichen Prozesse zwischen einander nahezu identische Raten dokumentiert werden. Die großen Unterschiede der Raten aus den Vorkulturen und den nachfolgenden produktionsähnlichen Prozessen sind den um den Faktor 3 bis 4 höheren Zellkonzentrationen innerhalb der produktionsähnlichen Prozesse und der gleichen vorgelegten Glutaminkonzentration zu Beginn aller Prozesse geschuldet. Diese Varianzen in den berechneten Raten sind folglich nicht durch zellbiologische Gegebenheiten begründet, sondern ausschließlich mit der Berechnung der unterschiedlichen Raten zu erklären. Ein Vergleich der Vorkulturen und der produktionsähnlichen Prozesse wäre generell möglich, wenn die Glutamin-beziehungsweise Ammoniumkonzentration zum Zeitpunkt gleicher Zellkonzentrationen gemessen worden wäre. Da die Auswirkungen der

Zellzahlregelung jedoch aufgrund eines Vergleiches mit einer Referenzkultur ermittelt wurden und dies mit den ermittelten Werten möglich ist, wurde auf eine weitere Analytik verzichtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hinsichtlich des Primärmetabolismus bei den untersuchten Zellklonen kein Einfluss der zellzahlgeregelten Vorkultur auf einen nachfolgenden produktionsähnlichen Prozess erkannt werden konnte.

7.6.2 Zellzyklus und Zelltod

Zellzyklus

Hinsichtlich der Zellzyklusanalytik konnte die in der Literatur vielfach beschriebene, vermehrte Arretierung der Zellen in der Ruhephase (G0-Phase) des Zellzykluses bestätigt werden^{19,38,59,216–219}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der beobachtete temperaturinduzierte Verbleib der Zellen in der G0-Phase des Zellzykluses ein reversibler Prozess ist. So zeigte sich innerhalb beider zellzahlgeregelter Versuche mit anschließendem produktionsähnlichen Prozess zunächst der erwartete Anstieg der Zellen in der G0-Phase mit gleichzeitiger Reduktion der Zellen innerhalb der S-Phase. Mit Beginn der Produktionsstufe und der damit einhergehenden Erhöhung der Prozesstemperatur konnte in beiden Versuchen ein erhöhter Anteil von Zellen in der S-Phase beobachtet werden, der in einer Normalisierung der Zellzyklusverteilung mündete. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass innerhalb der Arbeit keine durch die Zellzahlregelung verursachte irreversible Änderungen der Zellzyklusverteilung festgestellt werden konnten.

Apoptose

In einer Studie von Moor et al.¹³⁸ wird bei einer Reduktion der Prozesstemperatur eine Verzögerung der Apoptose beobachtet. Die Kinetik der Apoptose ist gemäß Moor et al. somit analog zum Zellzyklus als temperaturabhängig zu betrachten. Da die durchgeführten zellzahlgeregelten Prozesse innerhalb der exponentiellen Phase beendet wurden, ist es nicht weiter verwunderlich, dass innerhalb dieser Prozesse kein Einfluss der Temperaturänderung auf die Apoptose der Zellen beobachtet werden konnte. Der innerhalb der Versuchsreihe RT10 beobachtete erhöhte Anteil apoptotischer Zellen ist aufgrund der Konstanz innerhalb der Vorkultur und der

anschließenden produktionsähnlichen Stufe vermutlich nicht auf die Zellzahlregelung zurückzuführen. In der Summe kann zwar kein direkter Zusammenhang einer frühzeitigen Apoptose mit der Zellzahlregelung gefunden werden, dennoch wäre es ratsam weitere Untersuchungen diesbezüglich durchzuführen. Insbesondere wäre es im Hinblick auf die induzierte Zellrast interessant, die von de la Broise 1991 aufgestellte Annahme des Zusammenhangs der Zellteilung und der Apoptose gemäß der Aussage „wachse oder sterben“ weiter zu verfolgen.

7.6.3 Produktquantität und Qualität

Hinsichtlich der Produktquantität und Qualität lassen sich in der Literatur unterschiedlichste Angaben finden. Yoon et al.²²⁰ konnte beispielsweise bei der Kultivierung einer Erythropoetin produzierenden rekombinanten CHO Zelle (LGE10-9-27) mit Reduktion der Prozesstemperatur von 37 °C auf 33 °C eine 2,5-fach höhere Produktkonzentration feststellen. Rodriguez et al.²²¹ konnte bei der Kultivierung einer beta-Interferon produzierende CHO-Zelle bei der Reduktion der Prozesstemperatur auf 32 °C eine 3,5-fach erhöhte Produktivität festgestellt werden. Tsao et al.²²² konnte entgegen dessen bei einer reduzierten Temperatur eine reduzierte spezifische Produktbildungsrate festgestellt werden.

Kaufmann et al.²²³ konnte durch die Auftrennung von Gesamtproteinextrakten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 30 °C ein verändertes Expressionsniveaus von CHO-K1-Proteinen nachweisen. Diese Veränderungen im Proteom legen nahe, dass Säugetierzellen auf niedrige Temperaturen reagieren, indem diese, spezifische kaltinduzierbare Proteine synthetisieren. Diese Erkenntnisse könnten die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Zellklone hinsichtlich der zellklonspezifischen, temperaturabhängigen Produktivität erklären. Innerhalb der Zellzahlregelung konnte eine geringfügig erhöhte spezifische Produktbildungsrate festgestellt werden. Diese ist jedoch nicht signifikant erhöht. Die zellzahlgezielte Vorkultur hat den Ergebnissen zur Folge, keinen Einfluss auf die Produktivität des Antikörpers als auch des Darbepoetin alfas innerhalb der simulierten Produktionsstufe.

.

Basierend auf dem Wissen, dass die Kultivierungsbedingungen einen maßgeblichen Einfluss auf die Glykosylierung der Proteine ausüben^{224,225} wurde neben der Produktquantität die Produktqualität untersucht.

Ebenso wie bei der Produktivität gibt es hinsichtlich des Temperatureinflusses unterschiedliche Ergebnisse. Bollati-Fogolín et al.²²⁶ konnte keinen signifikanten Effekt auf das Glykosylierungsprofil durch Änderung der Prozesstemperatur erkennen. In einem von Agarabi et al.²²⁷ durchgeführten Screening-Versuch, innerhalb dessen die Wirkung von elf Prozessparametern auf die Fruktosylierung, Galaktosylierung und Sialylierung untersucht wurde, konnte ein signifikanter Einfluss der Temperatur festgestellt werden. Liegen diese Einflüsse auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen vor, so ist aufgrund der Ergebnisse davon auszugehen, dass diese Einflüsse reversibel sind. Innerhalb der Glykoanalytik des Immunglobulins G des Zellklons CHO-DP 12 konnte in den Proben der produktionsähnlichen Prozesse mit und ohne zellzahlgeregelter Vorkultur kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden.

Im Hinblick auf das Ladungsprofil des Darbepoetin alfas konnten die Ergebnisse institutsintern mit Ergebnissen der Kulturen bei 37 °C verglichen werden. Mario Lederle²²⁸ konnte in einer noch nicht veröffentlichten Dissertation eine verringerte hypothetische Ladungsnummer des Darbepoetin alfas bei reduzierter Temperatur feststellen. Den Ergebnissen zu folge reduzierte sich die hypothetische Ladungsnummer innerhalb einer Fed-Batch Kultur mit einer geringen Glukosekonzentration und einer Prozesstemperatur von 31 °C auf einen Wert von 200. Die hypothetische Ladungsnummer der Kulturen bei einer Prozesstemperatur von 37 °C lag in einem Bereich von 226-259. Vergleichend zu den von Mario Lederle gewonnen Ergebnissen liegen die hypothetischen Ladungsnummern der in der simulierten Produktionsstufe mit und ohne zellzahlgeregelter Vorkultur im Mittel mit Werten von 237,75 und 229,00 innerhalb des Ranges der Kulturen bei 37 °C.

Auf Grundlage der gewonnenen Messwerte ist kein Einfluss der Zellzahlregelung auf die Produktqualität der nachfolgenden Produktionsstufe festzustellen. Es ist jedoch im Hinblick auf die im SDS-Page festgestellten Kontamination der Proben der DPO-Analytik ratsam die Versuche zu wiederholen oder weitere Analytik in Bezug auf die Art der Kontamination durchzuführen.

7.7 Ausblick

Zur weiteren Optimierung der Regelung wäre es denkbar, die zeitliche Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate in den prädiktiven Regler zu implementieren.

Eine erste Abschätzung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Zeit und der Temperatur wurde für den Zellklon CHO-DP12 aus den Daten der Reaktorkulturen bei konstanten Temperaturen abgeleitet. Aus den gewonnenen Daten konnte der in Gleichung (7-2) dargestellte mathematische Zusammenhang ermittelt werden.

$$\mu(T, t) = \alpha t^2 + bt^2 + c \quad (7-2)$$

mit

$$\alpha = (-0,00086 \cdot T^2 + 0,05279 \cdot T - 0,81388) \quad (7-3)$$

$$b = (0,00113 \cdot T^2 - 0,06867 \cdot T + 1,03452) \quad (7-4)$$

$$c = \mu_{max} \cdot \frac{[(T - T_{MAX}) \cdot (T - T_{MIN})^2]}{[(T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot ((T_{OPT} - T_{MIN}) \cdot (T - T_{OPT}) - (T_{OPT} - T_{MAX}) \cdot (T_{OPT} + T_{MIN} - 2 \cdot T))]} \quad (7-5)$$

Die grafische Darstellung des Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur und der Zeit, wie in Abbildung 65 dargestellt ist, zeigt eindrucksvoll die ebenfalls in den Versuchen verzeichnete verlängerte positive Wachstumsrate in einem Temperaturbereich von 31 °C – 33 °C. Bei einer Temperatur von 35 °C konnte in den Versuchen eine im Vergleich zu 37 °C zwar verringerte Wachstumsrate festgestellt werden, die verlängerte Kultivierungsdauer führte jedoch zu einer deutlich höheren maximalen Lebendzellkonzentration.

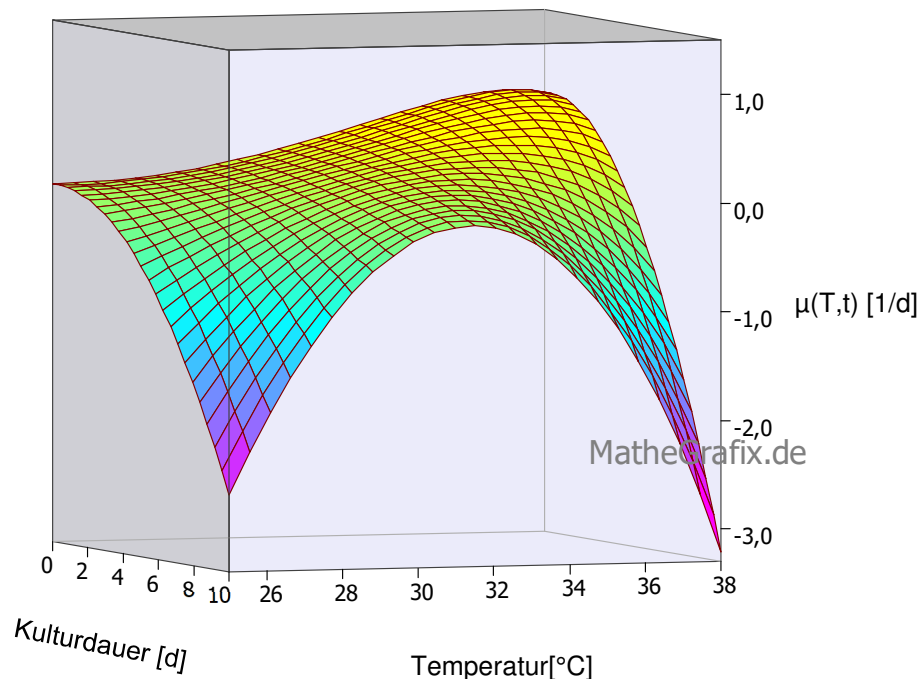


Abbildung 65: Spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Zeit (t) und der Temperatur (T) in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 38 °C

Abbildung 65 kann zudem entnommen werden, dass das Zellwachstum bei einer Temperatur von 25 °C zum Erliegen kommt. Aufgrund der fehlenden experimentellen Daten bei Temperaturen kleiner 31 °C konnte der zeitliche Verlauf bei niedrigen Temperaturen ausschließlich theoretisch hergeleitet werden und sind nicht durch experimentelle Daten abgesichert. Zu bedenken ist ebenfalls, dass der zeitliche Verlauf des Zellwachstums von vielen Parametern abhängig ist und der hier gefundene mathematische Zusammenhang nicht in jedem Fall gültig ist. Der dargestellte Zusammenhang soll an dieser Stelle zunächst die Problematik des zeitlichen Verlaufs der spezifischen Wachstumsrate aufzeigen und einen ersten Einblick geben inwieweit ein einbeziehen selbiger bei der Optimierung der Zellzahlregelung behilflich sein könnte.

Im Hinblick auf das weitere Vorgehen wäre eine weitreichendere Untersuchung des zeitlichen und temperaturabhängigen Verhalten der spezifischen Wachstumsrate von Interesse. Das Einbeziehen des zeitlichen Verlaufs der Wachstumsrate in die Regelung würde voraussichtlich, zu einem noch gleichmäßigeren Temperaturverlauf der Zellzahlregelung führen. Begründet ist diese Annahme in der Tatsache, dass in vielen Fällen der zellzahlgeregelten Prozesse zunächst ein Absinken und im weiteren Verlauf ein Erhöhen der Prozesstemperatur beobachtet werden kann. Durch eine zeitaufgelöste Regelung würde der Regler bereits zu

Beginn der Regelung die Information der im zeitlichen Verlauf absinkenden spezifischen Wachstumsrate bekommen und somit die erforderliche Prozesstemperatur noch besser berechnen können. Desweiteren ist davon auszugehen, dass eine Implementierung des zeitlichen Ablaufs der spezifischen Wachstumsrate auch zu einer noch präziseren und genaueren Zellzahlregelung beitragen würde. In der aktuellen Regelung wird die Zielzellkonzentration in vielen Fällen leicht unterschritten. In allen Prozessen bei denen diese Abweichungen auftraten, verlief das Zellwachstums im ersten Drittel der Prozessdauer wie zuvor vom Regler als ideal vorausberechnet. Erst im weiteren Verlauf konnte eine zunehmende Abweichung des realen Verlaufs der Zellkonzentration vom zu Prozessbeginn idealen Verlauf festgestellt werden. Diese Abweichung ist darin begründet, dass der Regler für die Berechnung des idealen Verlaufs der Zellkonzentration eine konstante maximale spezifische Wachstumsrate nutzt. Im realen Zellkulturprozess kann jedoch mit der Zeit eine reduzierte spezifische Wachstumsrate festgestellt werden, so dass die zuvor getätigte Annahme die Realität nicht optimal abbildet. Aus diesen Gründen wäre für eine weitere Optimierung der Zellzahlregelung das Einbeziehen des zeitlichen und temperaturabhängigen Verlaufs der spezifischen Wachstumsrate zu Empfehlen.

Eine weiteres Verbesserungspotenzial ist in der optimierten Berechnung der aktuellen Zellkonzentration aus dem Sondensignal der Biomassesonde zu sehen. Da im Rahmen dieses Projektes nicht zu vernachlässigende Abweichungen der online und offline ermittelten Zellkonzentrationen auftraten wäre zu überdenken andere Methode zur Bestimmung der Zellkonzentration zu verwenden oder die ermittelte Zellkonzentration mithilfe indirektere Methoden zum Beispiel über den Abgleich mit Metabolische Raten (Glukose-/Laktatmetabolismus²²², Aminosäureverbrauchsrate²²⁹, Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidproduktion) abzusichern.

Literaturverzeichnis

1. Sethuraman, N. & Stadheim, T. A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current opinion in biotechnology* **17**, 341–346; 10.1016/j.copbio.2006.06.010 (2006).
2. Megan Brooks. Cancer Drugs Dominate Top 10 Best-Selling Drugs in 2018. Available at <https://www.medscape.com/viewarticle/910600> (2019).
3. Megan Brooks. Arzneimittel-Ranking: Welche 10 Medikamente 2018 weltweit die größten Umsätze gebracht haben (2019).
4. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7th ed. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., 2013).
5. Hare, R. New light on the history of penicillin. *Medical history* **26**, 1–24; 10.1017/s0025727300040758 (1982).
6. Carrel, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of experimental medicine* **15**, 516–528; 10.1084/jem.15.5.516 (1912).
7. Reichert, J. & Pavolu, A. Monoclonal antibodies market. *Nature reviews. Drug discovery* **3**, 383–384; 10.1038/nrd1386 (2004).
8. Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* **22**, 1393–1398; 10.1038/nbt1026 (2004).
9. Knäblein, J. *Modern Biopharmaceuticals. Recent Success Stories* (Wiley, Weinheim, 2013).
10. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* **36**, 1136–1145; 10.1038/nbt.4305 (2018).
11. Lai, T., Yang, Y. & Ng, S. K. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **6**, 579–603; 10.3390/ph6050579 (2013).
12. PUCK, T. T., CIECIURA, S. J. & ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and

- animal subjects. *The Journal of experimental medicine* **108**, 945–956; 10.1084/jem.108.6.945 (1958).
13. Yang, J.-D. *et al.* Fed-batch bioreactor process scale-up from 3-L to 2,500-L scale for monoclonal antibody production from cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 141–154; 10.1002/bit.21413 (2007).
14. Schoenherr, I., Stapp, T. & Ryll, T. A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up. *Biotechnology progress* **16**, 815–821; 10.1021/bp000074e (2000).
15. Sinclair, C. G., Kristiansen, B. & Heinzle, E. eds. *Fermentationsprozesse. Kinetik und Modelling* (Springer, Berlin, 1995).
16. Andersen, D. C., Bridges, T., Gawlitzek, M. & Hoy, C. Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator. *Biotechnology and bioengineering* **70**, 25–31 (2000).
17. Gad, S. C. ed. *Pharmaceutical sciences encyclopedia. Drug discovery, development, and manufacturing* (John Wiley & Sons, New York, 2010).
18. Kimura, R. & Miller, W. M. Effects of elevated pCO₂ and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 152–160; 10.1002/(SICI)1097-0290(19961005)52:1<152::AID-BIT15>3.0.CO;2-Q (1996).
19. Bloemkolk, J. W., Gray, M. R., Merchant, F. & Mosmann, T. R. Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAb production. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 427–431; 10.1002/bit.260400312 (1992).
20. Vergara, M. *et al.* High glucose and low specific cell growth but not mild hypothermia improve specific r-protein productivity in chemostat culture of CHO cells. *PLoS ONE* **13**, e0202098; 10.1371/journal.pone.0202098 (2018).
21. Aii, K., Kobayashi, H., Kai, T. & Kokuba, Y. Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **9**, 75–78; 10.1016/S0928-0987(99)00047-0 (1999).
22. Mercier, S. M., Diepenbroek, B., Wijffels, R. H. & Streefland, M. Multivariate PAT solutions for biopharmaceutical cultivation: current progress and
- .

- limitations. *Trends in biotechnology* **32**, 329–336; 10.1016/j.tibtech.2014.03.008 (2014).
- 23.Schuler, M. M. & Marison, I. W. Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **94**, 1469–1482; 10.1007/s00253-012-4095-z (2012).
- 24.Aehle, M., Kuprijanov, A., Schaepe, S., Simutis, R. & Lübbert, A. Increasing batch-to-batch reproducibility of CHO cultures by robust open-loop control. *Cytotechnology* **63**, 41–47; 10.1007/s10616-010-9320-y (2011).
- 25.Aehle, M., Schaepe, S., Kuprijanov, A., Simutis, R. & Lubbert, A. Simple and efficient control of CHO cell cultures. *Journal of biotechnology* **153**, 56–61; 10.1016/j.jbiotec.2011.03.006 (2011).
- 26.Karlheinz Preuß. Karl-Völker-Stiftung an der Hochschule Mannheim Antrag auf Förderung eines FuE-Projektes. Projekttitle: Temperaturgesteuerte Zellzahlregelung für Bioreaktoren (2016).
- 27.Alberts, B. *Molekularbiologie der Zelle*. 5th ed. (Wiley-VCH, Weinheim, 2011).
- 28.Björklund, M. Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* **1866**, 409–417; 10.1016/j.bbamcr.2018.10.002 (2019).
- 29.Halter, M., Elliott, J. T., Hubbard, J. B., Tona, A. & Plant, A. L. Cell volume distributions reveal cell growth rates and division times. *Journal of theoretical biology* **257**, 124–130; 10.1016/j.jtbi.2008.10.031 (2009).
- 30.Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. in *The molecular basis of cancer*, edited by J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel & C. Thompson (Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2015), 179-190.e1.
- 31.Bell, G. I. & Anderson, E. C. Cell Growth and Division. *Biophysical Journal* **7**, 329–351; 10.1016/S0006-3495(67)86592-5 (1967).
- 32.Srivastava, S. & Srivastava, P. S. *Understanding bacteria* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, 2003).

33. Rothblat, G. *Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells In Culture V3* (Elsevier Science, Oxford, 1977).
34. Fritsche, O. ed. *Mikrobiologie* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2016).
35. Magner, L. N. *A history of the life sciences*. 3rd ed. (M. Dekker, New York, 2002).
36. Schafer, K. A. The cell cycle: a review. *Veterinary pathology* **35**, 461–478; 10.1177/030098589803500601 (1998).
37. Vermeulen, K., van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation* **36**, 131–149; 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x (2003).
38. Donjerkovic, D. & Scott, D. W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell research* **10**, 1–16; 10.1038/sj.cr.7290031 (2000).
39. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**, 1501–1512; 10.1101/gad.13.12.1501 (1999).
40. Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1170**, 29–40; 10.1007/978-1-4939-0888-2_2 (2014).
41. Singh, R. P., al-Rubeai, M., Gregory, C. D. & Emery, A. N. Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnology and bioengineering* **44**, 720–726; 10.1002/bit.260440608 (1994).
42. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239–257; 10.1038/bjc.1972.33 (1972).
43. Zhang, J. in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Third Edition*, edited by L. R. Lynd, et al. (American Society of Microbiology, Washington, D.C, 2010), pp. 157–178.
44. Goswami, J., Sinskey, A. J., Steller, H., Stephanopoulos, G. N. & Wang, D. I. C. Apoptosis in batch cultures of Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol.*
- .

- Bioeng.* **62**, 632–640; 10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<632::AID-BIT2>3.0.CO;2-I (1999).
45. Al-Rubeai, M. & Singh, R. P. Apoptosis in cell culture. *Current opinion in biotechnology* **9**, 152–156; 10.1016/s0958-1669(98)80108-0 (1998).
46. Grilo, A. L. & Mantalaris, A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances* **37**, 459–475; 10.1016/j.biotechadv.2019.02.012 (2019).
47. Meikrantz, W. & Schlegel, R. Apoptosis and the cell cycle. *Journal of cellular biochemistry* **58**, 160–174; 10.1002/jcb.240580205 (1995).
48. OSHIRO TAKEDA, AKIRA ICHIHARA, HIROAKI TANIOKA, AND HIDEO INOUE. The Biochemistry of Animal Cells. THE EFFECT OF CORTICOSTEROIDS ON LEAKAGE OF ENZYMES FROM DISPERSED RAT LIVER CELLS. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 239:3590-3596 (1964).
49. Struvay, C. & Feller, G. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International journal of molecular sciences* **13**, 11643–11665; 10.3390/ijms130911643 (2012).
50. Lee, C. K. *et al.* Eurythermalism and the temperature dependence of enzyme activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 1934–1941; 10.1096/fj.06-7265com (2007).
51. Ritchie, M. E. Reaction and diffusion thermodynamics explain optimal temperatures of biochemical reactions. *Scientific reports* **8**, 11105; 10.1038/s41598-018-28833-9 (2018).
52. Yoon, S. K., Ahn, Y.-H. & Jeong, M. H. Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor. *Applied microbiology and biotechnology* **76**, 83–89; 10.1007/s00253-007-0985-x (2007).
53. Burkhard Riessler, Holger Liibben and Gerlinde Kretzmer. Temperature: A simple parameter for process optimization in fed-batch cultures of recombinant

- Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 423–427 (1996).
54. Watanabe, I. EFFECTS OF TEMPERATURE ON GROWTH RATE OF CULTURED MAMMALIAN CELLS (L5178Y). *The Journal of Cell Biology* **32**, 309–323; 10.1083/jcb.32.2.309 (1967).
55. Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. & Miller, L. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods* **86**, 53–59; 10.1016/0022-1759(86)90264-4 (1986).
56. Chuppa, S. *et al.* Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 328–338; 10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<328::AID-BIT10>3.0.CO;2-D (1997).
57. Kumar, N., Gammell, P. & Clynes, M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture. *Cytotechnology* **53**, 33–46; 10.1007/s10616-007-9047-6 (2007).
58. Jenkins, N. & Hovey, A. Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cells synthesizing a recombinant protein. *Biotechnology and bioengineering* **42**, 1029–1036; 10.1002/bit.260420903 (1993).
59. Moore, A. *et al.* Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology* **23**, 47–54; 10.1023/A:1007919921991 (1997).
60. Pugh, G. G. The Role of Oxygen Consumption Rate in Bioreactor Process Control. *Nat Biotechnol* **6**, 524–526; 10.1038/nbt0588-524 (1988).
61. Kurano, N., Leist, C., Messi, F., Kurano, S. & Fiechter, A. Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments. *Journal of biotechnology* **15**, 101–111; 10.1016/0168-1656(90)90054-F (1990).
62. Weidemann, R., Ludwig, A. & Kretzmer, G. Low temperature cultivation ? A step towards process optimisation. *Cytotechnology* **15**, 111–116; 10.1007/BF00762385 (1994).
- .

63. Yoon, S. K., Hwang, S. O. & Lee, G. M. Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnology progress* **20**, 1683–1688; 10.1021/bp049847f (2004).
64. Tsao, E. I., Bohn, M. A., Omstead, D. R. & Munster, M. J. Optimization of a roller bottle process for the production of recombinant erythropoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **665**, 127–136; 10.1111/j.1749-6632.1992.tb42580.x (1992).
65. Ahn, W. S., Jeon, J.-J., Jeong, Y.-R., Lee, S. J. & Yoon, S. K. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and bioengineering* **101**, 1234–1244; 10.1002/bit.22006 (2008).
66. Enfors, S.-O. Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends in biotechnology* **10**, 310–315; 10.1016/0167-7799(92)90256-U (1992).
67. Kratje, R. B., Lind, W. & Wagner, R. Evaluation of the proteolytic potential of in vitro-cultivated hybridoma and recombinant mammalian cells. *Journal of biotechnology* **32**, 107–125; 10.1016/0168-1656(94)90174-0 (1994).
68. Teige, M., Weidemann, R. & Kretzmer, G. Problems with serum-free production of antithrombin III regarding proteolytic activity and product quality. *Journal of biotechnology* **34**, 101–105; 10.1016/0168-1656(94)90171-6 (1994).
69. Bedoya-López, A. *et al.* Effect of Temperature Downshift on the Transcriptomic Responses of Chinese Hamster Ovary Cells Using Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator Production Culture. *PloS one* **11**, e0151529; 10.1371/journal.pone.0151529 (2016).
70. Ludwig, A., Tomeczkowski, J. & Kretzmer, G. Influence of the temperature on the shear stress sensitivity of adherent BHK 21 cells. *Applied microbiology and biotechnology* **38**, 323–327; 10.1007/BF00170080 (1992).
71. Ramírez, O. T. & Mutharasan, R. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnology and bioengineering* **36**, 911–920; 10.1002/bit.260360906 (1990).

- 72.Hovey, A., Bebbington, C. R. & Jenkins, N. Control of growth and recombinant protein synthesis by heat-shock in a mutant mammalian cell line. *Biotechnol Lett* **16**, 215–220; 10.1007/BF00134614 (1994).
- 73.Passini, C. A. & Goochee, C. F. Response of a Mouse Hybridoma Cell Line to Heat Shock, Agitation, and Sparging. *Biotechnol Progress* **5**, 175–188; 10.1002/btpr.5420050408 (1989).
- 74.Moran, E. B. *et al.* A systematic approach to the validation of process control parameters for monoclonal antibody production in fed-batch culture of a murine myeloma. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 242–255; 10.1002/1097-0290(20000805)69:3<242::AID-BIT2>3.0.CO;2-I (2000).
- 75.Borys, M. C., Linzer, D. I. & Papoutsakis, E. T. Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **11**, 720–724; 10.1038/nbt0693-720 (1993).
- 76.Lin, A. A., Kimura, R. & Miller, W. M. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnology and bioengineering* **42**, 339–350; 10.1002/bit.260420311 (1993).
- 77.Lunze, J. *Regelungstechnik 1. Systemtheoretische Grundlagen, Analyse und Entwurf einschleifiger Regelungen*. 12th ed. (Springer Berlin; Springer Vieweg, Berlin, 2020).
- 78.Mann, H., Schiffelgen, H., Webers, K. & Froriep, R. *Einführung in die Regelungstechnik. Analoge und digitale Regelung, Fuzzy-Regler, Regel-Realisierung, Software*. 12th ed. (Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München, 2019).
- 79.Visioli, A. *Practical PID Control* (Springer-Verlag London Limited, London, 2006).
- 80.Strohrmann, G. *Automatisierungstechnik*. 4th ed. (Oldenbourg, München, 1998).
- 81.Nürnberg, A., Kruse, R., Klawonn, F. & Michels, K. *Fuzzy Control* (Springer Berlin Heidelberg,).
- .

82. Dittmar, R. & Pfeiffer, B.-M. *Modellbasierte prädiktive Regelung. Eine Einführung für Ingenieure* (Oldenbourg, München, Wien, 2009).
83. Winter, H. & Böckelmann, M. *Prozessleittechnik in Chemieanlagen*. 5th ed. (VERLAG EUROPA-LEHRMITTEL Nourney, Vollmer GmbH et Co. KG, Haan-Gruiten, 2018).
84. Grötschel, M., Lucas, K. & Mehrmann, V. *Produktionsfaktor Mathematik. Wie Mathematik Technik und Wirtschaft Bewegt* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009).
85. Tolle, H., Bettenhausen, K. D., Gehlen, S. & Marenbach, P. Optimierungsansätze für die Bioverfahrenstechnik. *at - Automatisierungstechnik* **60**, 352–361; 10.1524/auto.2012.1006 (2012).
86. Bonvillani, P., Ferrari, M. P., Ducrós, E. M. & Orejas, J. A. Theoretical and experimental study of the effects of scale-up on mixing time for a stirred-tank bioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.* **23**, 1–7; 10.1590/S0104-66322006000100001 (2006).
87. Mikleš, J. & Fikar, M. *Process modelling, identification, and control. With 13 tables* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2010).
88. Grötschel, M., Krumke, S. O. & Rambau, J. *Online optimization of large scale systems*. 1st ed. (Springer, Berlin, 2001).
89. King, R. *et al. in 14th Mediterranean Conference on Control and Automation. Ancona - Università Politecnica delle Marche, Facoltà di Ingegneria, via Brecce Bianche, June 28-30, 2006* (IEEE, New York, 2007), pp. 1–6.
90. Heine, T., Kawohl, M. & King, R. Ein neuer Ansatz zur robusten Trajektorienplanung und robusten nichtlinearen modellprädiktiven Regelung für Prozesse mit Parameterunsicherheiten (A New Approach for Robust Optimization Based Open- and Closed-Loop Control of Nonlinear Processes). *at - Automatisierungstechnik* **54**, 467; 10.1524/auto.2006.54.12.614 (2006).
91. Snyman, J. A. & Wilke, D. N. *Practical mathematical optimization. Basic optimization theory and gradient-based algorithms* (Springer, Cham, 2018).

92. in *Optimal economic operation of electric power systems*, edited by M. E. El-Hawary & G. S. Christensen (Academic Press, New York, 1979), pp. 59–123.
93. Banga, J. R., Balsa-Canto, E., Moles, C. G. & Alonso, A. A. Dynamic optimization of bioprocesses: efficient and robust numerical strategies. *Journal of biotechnology* **117**, 407–419; 10.1016/j.jbiotec.2005.02.013 (2005).
94. Forster, O. *Analysis 1. Differential- und Integralrechnung einer Veränderlichen*. 5th ed. (Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 1999).
95. Jarre, F. & Stoer, J. *Optimierung. Einführung in Mathematische Theorie und Methoden*. 2nd ed. (Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019).
96. Nocedal Jorge, Wright Stephan J. ed. *Numerical Optimization* (Springer Science+Business Media, LLC., New York, NY 10013, USA, 2006).
97. Papageörgiu, M., Leibold, M. & Buss, M. *Optimierung. Statische, dynamische, stochastische Verfahren für die Anwendung*. 4th ed. (Springer Vieweg, Berlin, 2015).
98. Bonnans, J. F. *Numerical Optimization* (Springer Science+Business Media, LLC, [New York], 2006).
99. Davis, M. E. *Numerical Methods and modeling for chemical engineers* (Wiley, New York, 1984).
100. Saraiva, I., Vande Wouwer, A. & Hantson, A.-L. Parameter identification of a dynamic model of CHO cell cultures: an experimental case study. *Bioprocess and biosystems engineering* **38**, 2231–2248; 10.1007/s00449-015-1461-0 (2015).
101. Häfner, F., Sames, D. & Voigt, H.-D. *Wärme- und Stofftransport* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1992).
102. Cassandras, C. G. Complexity Made Simple - At a Small Price. *IFAC Proceedings Volumes* **34**, 1–5; 10.1016/S1474-6670(17)40787-7 (2001).
103. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3rd ed. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011).
104. Yokomuro, H. *et al.* Effect of cryopreservation on cell proliferation and immunogenicity of transplanted human heart cells. *Annals of thoracic and*

- cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia* **16**, 105–112 (2010).
105. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology* **247**, C125-42; 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125 (1984).
106. Rule, G. S., Law, P., Kruuv, J. & Lepock, J. R. Water permeability of mammalian cells as a function of temperature in the presence of dimethylsulfoxide: correlation with the state of the membrane lipids. *Journal of cellular physiology* **103**, 407–416; 10.1002/jcp.1041030306 (1980).
107. Galvao, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**, 1317–1330; 10.1096/fj.13-235440 (2014).
108. Elmoazzen, H. Y. *et al.* Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage. *Cell and tissue banking* **8**, 125–133; 10.1007/s10561-006-9023-y (2007).
109. Ozturk, S. S. & Palsson, B. O. Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture. *Biotechnology progress* **6**, 437–446; 10.1021/bp00006a006 (1990).
110. Storhas, W. *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender* (Springer, Berlin, 2000).
111. Präve, P. ed. *Handbuch der Biotechnologie. Mit 401 Abbildungen, 150 Tabellen, 26 Fließschemata sowie 80 Strukturformeln und zahlreichen weiteren Zusammenstellungen und Formeln* (Oldenbourg, München, 1994).
112. Hua, J., Erickson, L. E., Yiin, T. Y. & Glasgow, L. A. A review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability. *Critical reviews in biotechnology* **13**, 305–328; 10.3109/07388559309075700 (1993).
113. Odeleye, A. O. O., Marsh, D. T. J., Osborne, M. D., Lye, G. J. & Micheletti, M. On the fluid dynamics of a laboratory scale single-use stirred bioreactor. *Chemical engineering science* **111**, 299–312; 10.1016/j.ces.2014.02.032 (2014).

114. Tennant, J. R. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. *Transplantation* **2**, 685–694 (1964).
115. Schmitz, S. & Desel, C. *Der Experimentator Zellbiologie* (Springer Spektrum, Berlin, 2018).
116. Baum, H. in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, edited by Gressner (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019), pp. 2529–2530.
117. Beckman coulter Inc. *Reference Manual. Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer*. Available at <https://www.usf.edu/research-innovation/rf/usf-connect/documents/vi-cell-xr-beckman-coulter.pdf> ,
118. Lasia, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications* (Springer New York, New York, NY, s.l., 2014).
119. Grabski, R. *Grundwissen Physik* (Kohlhammer, Stuttgart, 2005).
120. Belitz, H.-D., Bergner, K.-G., Berndt, D., Diemair, W., Drawert, F., Eisenbrand, J., Feiling, K., Flügge, J., Freund, H., Grüne, A. M. B., Hecker, E., Heimann, W., Henning, H.-J., Jägerhuber, P., Johannsen, H., Mahling, A., Pfeilsticker, K., Pfeilsticker, K., Ramb, R., Seher, A., Slevogt, K. E., Volz, K., Walter, F., Werner, H., Wissner, K., Wohlleben, G., Wollenberg, H. & Schormüller, J. eds. *Analytik der Lebensmittel. Physikalische und Physikalisch-Chemische Untersuchungsmethoden* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., 1965).
121. Pflüger, P. M. *Elektrizitätszähler. Tarifgeräte, Meßwandler, Schaltuhren. Ein Buch für Zählerfachleute* (Springer, Berlin, Heidelberg, 1954).
122. Bernstein, H. *Messelektronik und Sensoren. Grundlagen der Messtechnik, Sensoren, analoge und digitale Signalverarbeitung* (Springer Vieweg, Wiesbaden, 2014).
123. Lvovich, V. F. *Impedance spectroscopy. Applications to electrochemical and dielectric phenomena* (Wiley, Hoboken, N.J, 2012).

124. Nacke, T. *et al.* Messsystem für die impedanzspektroskopische Breitband-Prozessmesstechnik. *tm - Technisches Messen* **78**, 147; 10.1524/teme.2011.0077 (2011).
125. Mirko Hofmann. *Integrierte Impedanzspektroskopie aerober Zellkulturen in biotechnologischen Hochdurchsatzscreenings. Dissertationsschrift* (Aachen, 2009).
126. Shireen Goh & Rajeev J. Ram. IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR IN SITU BIOMASS MEASUREMENTS IN MICROBIOREACTORS. *UR - <https://www.semanticscholar.org/paper/IMPEDANCE-SPECTROSCOPY-FOR-IN-SITU-BIOMASS-IN-Goh-Ram/1ffcfe012d5d81e894f3afc9244a33c75a4f90f>* (2010).
127. Párta, L., Zalai, D., Borbély, S. & Putics, A. Application of dielectric spectroscopy for monitoring high cell density in monoclonal antibody producing CHO cell cultivations. *Bioprocess and biosystems engineering* **37**, 311–323; 10.1007/s00449-013-0998-z (2014).
128. Konakovsky, V. *et al.* Universal Capacitance Model for Real-Time Biomass in Cell Culture. *Sensors (Basel, Switzerland)* **15**, 22128–22150; 10.3390/s150922128 (2015).
129. Hamilton Company. The Power of Permittivity. Continuous Data (2020).
130. Lloyd, D. R., Holmes, P., Jackson, L. P., Emery, A. N. & al-Rubeai, M. Relationship between cell size, cell cycle and specific recombinant protein productivity. *Cytotechnology* **34**, 59–70; 10.1023/A:1008103730027 (2000).
131. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*; 10.21775/cimb.003.067 (2001).
132. Shapiro, H. M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. (Wiley-Liss, New York, 2003).
133. Watson, J. V. *Introduction to flow cytometry* (Cambridge University Press, Cambridge, 1991).
134. Pierre Bodénès, Hsiang-Yu Wang, Tsung-Hua Lee, Hung-Yu Chen & Chun-Yen Wang. Microfluidic techniques for enhancing biofuel and biorefinery

- industry based on microalgae. *Biotechnology for Biofuels* **12**; 10.1186/s13068-019-1369-z (2019).
135. Jayat, C. & Ratinaud, M. H. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biology of the cell* **78**, 15–25 (1993).
136. Ramirez, O. T. & Mutharasan, R. Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and bioengineering* **36**, 839–848; 10.1002/bit.260360814 (1990).
137. Sebastian Öxler. *In situ mikroskopische Analyse von CHO Zellen im Bioreaktor und Charakterisierung eines Bioreaktors im Bereich der Säugerzellfermentation. Bachelorarbeit* (Mannheim, 2015).
138. Moore, A. *et al.* Apoptosis in CHO cell batch cultures: examination by flow cytometry. *Cytotechnology* **17**, 1–11; 10.1007/BF00749215 (1995).
139. Roche Diagnostics International Ltd. Metabolite Testing Cedex Bio Analyzer.
140. Tritsch, G. L. & Moore, G. E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Experimental Cell Research* **28**, 360–364; 10.1016/0014-4827(62)90290-2 (1962).
141. Heeneman, S., Deutz, N.E.P. & Buurman, W. A. The concentrations of glutamine and ammonia in commercially available cell culture media. *Journal of Immunological Methods* **166**, 85–91; 10.1016/0022-1759(93)90331-z (1993).
142. Jagušić, M. *et al.* Stability of Minimum Essential Medium functionality despite L-glutamine decomposition. *Cytotechnology* **68**, 1171–1183; 10.1007/s10616-015-9875-8 (2016).
143. Corkrey, R., Olley, J., Ratkowsky, D., McMeekin, T. & Ross, T. Universality of thermodynamic constants governing biological growth rates. *PloS one* **7**, e32003; 10.1371/journal.pone.0032003 (2012).
144. Kretzmer, G., Buch, T., Konstantinov, K. & Naveh, D. in *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology*, edited by O.-W. Merten, P.
- .

- Perrin & B. Griffiths (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002), pp. 363–366.
145. Galvanauskas, V., Simutis, R. & Vaitkus, V. Adaptive Control of Biomass Specific Growth Rate in Fed-Batch Biotechnological Processes. A Comparative Study. *Processes* **7**, 810; 10.3390/pr7110810 (2019).
146. Müller, D., Doblhoff-Dier, O. & Katinger, H. in *Animal cell technology. Products from cells, cells as products : proceedings of the 16th ESACT Meeting : April 25-29, 1999, Lugano, Switzerland*, edited by A. Bernard (Kluwer Academic Publishers, New York, 2008], 2002), pp. 171–173.
147. Pörtner, R. *et al.* in *Cell technology for cell products. Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, June 5-8, 2005*, edited by R. Smith (Springer, Dordrecht, 2007), pp. 497–501.
148. Frahm, B., Lane, P., Märkl, H. & Pörtner, R. Improvement of a mammalian cell culture process by adaptive, model-based dialysis fed-batch cultivation and suppression of apoptosis. *Bioprocess and biosystems engineering* **26**, 1–10; 10.1007/s00449-003-0335-z (2003).
149. Kovárová-Kovar, K. *et al.* Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production. *Journal of biotechnology* **79**, 39–52; 10.1016/S0168-1656(00)00211-X (2000).
150. Legmann, R. *et al.* A predictive high-throughput scale-down model of monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnology and bioengineering* **104**, 1107–1120; 10.1002/bit.22474 (2009).
151. Teixeira, A. P., Oliveira, R., Alves, P. M. & Carrondo, M. J. T. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnology advances* **27**, 726–732; 10.1016/j.biotechadv.2009.05.003 (2009).
152. Brandon Berry, Justin Moretto, Thomas Matthews, John Smelko & Kelly Wiltberger. Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biotechnology progress* **31**, 566–577; 10.1002/btpr.2035 (2015).

153. Matthews, T. E. *et al.* Closed loop control of lactate concentration in mammalian cell culture by Raman spectroscopy leads to improved cell density, viability, and biopharmaceutical protein production. *Biotechnology and bioengineering* **113**, 2416–2424; 10.1002/bit.26018 (2016).
154. Monimoy Bujarbaruah, Xiaojing Zhang, Ugo Rosolia & Francesco Borrelli (2018), pp. 6322–6327.
155. Marcel Pralle. *Establishment of a Batch-cultivation of CHO suspension cell DP-12 in a CSTR. Lab Project* (2014).
156. Clark, K. J. R., Chaplin, F. W. R. & Harcum, S. W. Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnology progress* **20**, 1888–1892; 10.1021/bp049951x (2004).
157. Eisenthal, R., Peterson, M. E., Daniel, R. M. & Danson, M. J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology. *Trends in biotechnology* **24**, 289–292; 10.1016/j.tibtech.2006.05.004 (2006).
158. Paquet-Durand, O., Zettel, V. & Hitzmann, B. Optimal experimental design for parameter estimation of the Peleg model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **140**, 36–42; 10.1016/j.chemolab.2014.10.006 (2015).
159. Paquet-Durand, O., Zettel, V., Kohlus, R. & Hitzmann, B. Optimal design of experiments and measurements of the water sorption process of wheat grains using a modified Peleg model. *Journal of Food Engineering* **165**, 166–171; 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.025 (2015).
160. Oliver Lindner, P. F. & Hitzmann, B. Experimental design for optimal parameter estimation of an enzyme kinetic process based on the analysis of the Fisher information matrix. *Journal of theoretical biology* **238**, 111–123; 10.1016/j.jtbi.2005.05.016 (2006).
161. Ataíde, F. & Hitzmann, B. When is optimal experimental design advantageous for the analysis of Michaelis–Menten kinetics? *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **99**, 9–18; 10.1016/j.chemolab.2009.07.005 (2009).

162. Bielser, J.-M., Wolf, M., Souquet, J., Broly, H. & Morbidelli, M. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review. *Biotechnology advances* **36**, 1328–1340; 10.1016/j.biotechadv.2018.04.011 (2018).
163. La Broise, D. de, Noiseux, M., Lemieux, R. & Massie, B. Long-term perfusion culture of hybridoma: a "grow or die" cell cycle system. *Biotechnology and bioengineering* **38**, 781–787; 10.1002/bit.260380712 (1991).
164. Adamson, S. R. & Schmidli, B. Industrial mammalian cell culture. *Can. J. Chem. Eng.* **64**, 531–539; 10.1002/cjce.5450640402 (1986).
165. Pohlscheidt, M. *et al.* Optimizing capacity utilization by large scale 3000 L perfusion in seed train bioreactors. *Biotechnology progress* **29**, 222–229; 10.1002/btpr.1672 (2013).
166. Chen, Z.-L., Wu, B.-C., Liu, H., Liu, X.-M. & Huang, P.-T. Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture. *Journal of bioscience and bioengineering* **97**, 239–243; 10.1016/S1389-1723(04)70198-X (2004).
167. Ducommun, P., Ruffieux, P.-A., Kadouri, A., Stockar, U. von & Marison, I. W. Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process. *Biotechnology and bioengineering* **77**, 838–842; 10.1002/bit.10185 (2002).
168. J. H. GIBBS, R. A. BROWN, A. J. ROBERTSON, J. SWANSON BECK. The effect of culture temperature on the kinetics of human lymphocyte stimulation by phytohaemagglutinin. *Clin. exp. Immunol.* **1979**, 175–180.
169. Schulte, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism. Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology* **218**, 1856–1866; 10.1242/jeb.118851 (2015).
170. Jorjani, P. & Ozturk, S. S. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* **64**,

- 349–356; 10.1002/(SICI)1097-0290(19990805)64:3<349::AID-BIT11>3.0.CO;2-V (1999).
171. Vergara, M. *et al.* Differential effect of culture temperature and specific growth rate on CHO cell behavior in chemostat culture. *PloS one* **9**, e93865; 10.1371/journal.pone.0093865 (2014).
172. Francis, D. & Barlow, P. W. Temperature and the cell cycle. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **42**, 181–201 (1988).
173. García Münzer, D. G. *et al.* An unstructured model of metabolic and temperature dependent cell cycle arrest in hybridoma batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal* **93**, 260–273; 10.1016/j.bej.2014.10.013 (2015).
174. Amribt, Z., Niu, H. & Bogaerts, P. Macroscopic modelling of overflow metabolism and model based optimization of hybridoma cell fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal* **70**, 196–209; 10.1016/j.bej.2012.11.005 (2013).
175. Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H. & Wurm, F. M. Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New biotechnology* **30**, 238–245; 10.1016/j.nbt.2012.05.021 (2013).
176. Wilkens, C. A., Altamirano, C. & Gerdtzen, Z. P. Comparative metabolic analysis of lactate for CHO cells in glucose and galactose. *Biotechnol Bioproc E* **16**, 714–724; 10.1007/s12257-010-0409-0 (2011).
177. Jefferis, R. Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics. *Journal of immunology research* **2016**; 10.1155/2016/5358272 (2016).
178. Klaudia Grundwald. Dissertation. Universität Bielefeld (2019).
179. Lottspeich, F. & Engels, J. W. eds. *Bioanalytik* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2012).
180. Heinrich, C., Wolf, T., Kropp, C., Northoff, S. & Noll, T. Growth characterization of CHO DP-12 cell lines with different high passage histories. *BMC proceedings* **5 Suppl 8**, P29; 10.1186/1753-6561-5-S8-P29 (2011).
- .

181. Frame, K. K. & Hu, W. S. Cell volume measurement as an estimation of mammalian cell biomass. *Biotechnology and bioengineering* **36**, 191–197; 10.1002/bit.260360211 (1990).
182. Strange, K. *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation* (CRC Press, Boca Raton, 1994).
183. Carvell, J. P. & Dowd, J. E. On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance. *Cytotechnology* **50**, 35–48; 10.1007/s10616-005-3974-x (2006).
184. Moore, B., Sanford, R. & Zhang, A. Case Study: The Characterization and Implementation of Dielectric Spectroscopy (Biocapacitance) for Process Control in a Commercial GMP CHO Manufacturing Process. *Biotechnology progress*, e2782; 10.1002/btpr.2782 (2019).
185. Pappenreiter, M., Sissolak, B., Sommeregger, W. & Striedner, G. Oxygen Uptake Rate Soft-Sensing via Dynamic kLa Computation: Cell Volume and Metabolic Transition Prediction in Mammalian Bioprocesses. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **7**, 195; 10.3389/fbioe.2019.00195 (2019).
186. Furukawa, K. & Ohsuye, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alpha-amidating enzyme. *Cytotechnology* **26**, 153–164; 10.1023/A:1007934216507 (1998).
187. Fogolín, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M. & Kratje, R. Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *Journal of biotechnology* **109**, 179–191; 10.1016/j.jbiotec.2003.10.035 (2004).
188. Kim, H. S. & Lee, G. M. Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two Chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *Journal of microbiology and biotechnology* **17**, 712–720 (2007).
189. Yoon, S. K. *et al.* Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. *Journal of biotechnology* **122**, 463–472; 10.1016/j.jbiotec.2005.09.010 (2006).

190. Trummer, E. *et al.* Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and bioengineering* **94**, 1033–1044; 10.1002/bit.21013 (2006).
191. Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G. S. & Wang, D. I. C. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 177–184; 10.1002/bit.10861 (2004).
192. Bauer, K. D. & Henle, K. J. Arrhenius Analysis of Heat Survival Curves from Normal and Thermotolerant CHO Cells. *Radiation Research* **78**, 251; 10.2307/3575042 (1979).
193. Dewey, W. C. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* **25**, 3–20; 10.1080/02656730902747919 (2009).
194. Liu, C.-M. & Hong, L.-N. Development of a shaking bioreactor system for animal cell cultures. *Biochemical Engineering Journal* **7**, 121–125; 10.1016/S1369-703X(00)00111-X (2001).
195. Zhang, X. *et al.* Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **115**, 33–53; 10.1007/10_2008_18 (2009).
196. Paul, K. & Herwig, C. Scale-down simulators for mammalian cell culture as tools to access the impact of inhomogeneities occurring in large-scale bioreactors. *Eng. Life Sci.* **20**, 197–204; 10.1002/elsc.201900162 (2020).
197. Neunstoecklin, B. *et al.* Determination of the maximum operating range of hydrodynamic stress in mammalian cell culture. *Journal of biotechnology* **194**, 100–109; 10.1016/j.jbiotec.2014.12.003 (2015).
198. Gao, Y. *et al.* Combined metabolomics and proteomics reveals hypoxia as a cause of lower productivity on scale-up to a 5000-liter CHO bioprocess. *Biotechnology journal* **11**, 1190–1200; 10.1002/biot.201600030 (2016).

199. López-Meza, J. *et al.* Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology* **68**, 1287–1300; 10.1007/s10616-015-9889-2 (2016).
200. KLEVECZ, R. & KING, G. Temperature compensation in the mammalian cell cycle. *Experimental Cell Research* **140**, 307–313; 10.1016/0014-4827(82)90119-7 (1982).
201. Schrödel, A. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellkulturzellen. *Biol. Unserer Zeit* **39**, 308; 10.1002/biuz.200990072 (2009).
202. GOOD, P. Aging in mammalian cell populations: A review. *Mechanisms of Ageing and Development* **4**, 339–348; 10.1016/0047-6374(75)90034-2 (1975).
203. Good, P. I. Subcultivations, splits, doublings, and generations in cultures of human diploid fibroblasts. *Cell and tissue kinetics* **5**, 319–323; 10.1111/j.1365-2184.1972.tb00370.x (1972).
204. Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R. & Lubbert, A. Process Analytical Technology (PAT): batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *Journal of biotechnology* **132**, 180–186; 10.1016/j.jbiotec.2007.03.020 (2007).
205. Justice, C. *et al.* Process control in cell culture technology using dielectric spectroscopy. *Biotechnology advances* **29**, 391–401; 10.1016/j.biotechadv.2011.03.002 (2011).
206. Doverskog, M., Ljunggren, J., Öhman, L. & Häggström, L. Physiology of cultured animal cells. *Journal of biotechnology* **59**, 103–115; 10.1016/S0168-1656(97)00172-7 (1997).
207. Freund, N. W. & Croughan, M. S. A Simple Method to Reduce both Lactic Acid and Ammonium Production in Industrial Animal Cell Culture. *International journal of molecular sciences* **19**; 10.3390/ijms19020385 (2018).
208. Fernandez-de-Cossio-Diaz, J. & Vazquez, A. A physical model of cell metabolism. *Scientific reports* **8**, 8349; 10.1038/s41598-018-26724-7 (2018).

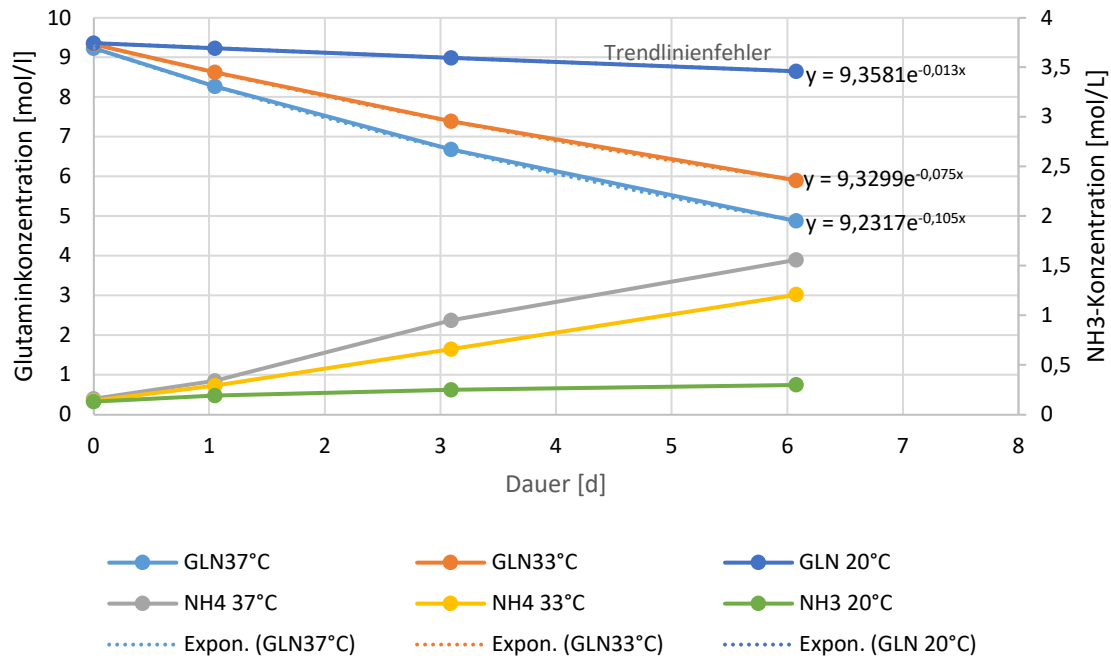
209. Rössler, B., Lübben, H. & Kretzmer, G. Temperature. A simple parameter for process optimization in fed-batch cultures of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology* **18**, 423–427; 10.1016/0141-0229(95)00121-2 (1996).
210. Yang, M. & Butler, M. Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnology and bioengineering* **68**, 370–380; 10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4<370::AID-BIT2>3.0.CO;2-K (2000).
211. Wang, M.-D., Yang, M., Huzel, N. & Butler, M. Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 194–203; 10.1002/bit.10144 (2002).
212. Zielke, H. R., Zielke, C. L. & Ozand, P. T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Federation proceedings* **43**, 121–125 (1984).
213. Eibl, R., Catapano, G., Czermak, P., Eibl, D. & Pörtner, R. *Cell and Tissue Reaction Engineering. With a Contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2009).
214. Janina Stephanie Bahnemann. Neue Ansätze zur systembiologischen Untersuchung der Mitochondrien und des Metabolismus in tierischen Zellkulturen. Dissertation, 17–18 (2014).
215. Beuvery, E. C., Griffiths, J. B. & Zeijlemaker, W. P. *Animal Cell Technology. Developments Towards the 21st Century* (Springer Netherlands, Dordrecht, 1995).
216. Rieder, C. L. & Cole, R. W. Cold-Shock and the Mammalian Cell Cycle. *Cell Cycle* **1**, 168–174; 10.4161/cc.1.3.119 (2002).
217. SOROKIN, C. Kinetic studies of temperature effects on the cellular level. *Biochimica et biophysica acta* **38**, 197–204 (1960).
218. McHugh, K. P., Xu, J., Aron, K. L., Borys, M. C. & Li, Z. J. Effective temperature shift strategy development and scale confirmation for simultaneous optimization of protein productivity and quality in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology progress*, e2959; 10.1002/btpr.2959 (2020).
- .

219. Sureshkumar, G. K. & Mutharasan, R. The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering* **37**, 292–295; 10.1002/bit.260370313 (1991).
220. Yoon, S. K., Song, J. Y. & Lee, G. M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 289–298; 10.1002/bit.10566 (2003).
221. Rodriguez, J. *et al.* High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture. *Journal of biotechnology* **150**, 509–518; 10.1016/j.jbiotec.2010.09.959 (2010).
222. Tsao, Y.-S. *et al.* Monitoring Chinese hamster ovary cell culture by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of biotechnology* **118**, 316–327; 10.1016/j.jbiotec.2005.05.016 (2005).
223. Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M. & Bailey, J. E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and bioengineering* **63**, 573–582 (1999).
224. Kunkel, J. P., Jan, D. C., Butler, M. & Jamieson, J. C. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. *Biotechnology progress* **16**, 462–470; 10.1021/bp000026u (2000).
225. Müthing, J. *et al.* Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 321–334; 10.1002/bit.10673 (2003).
226. Bollati-Fogolín, M. *et al.* Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnology progress* **21**, 17–21; 10.1021/bp049825t (2005).
227. Agarabi, C. D. *et al.* Bioreactor Process Parameter Screening Utilizing a Plackett-Burman Design for a Model Monoclonal Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**, 1919–1928; 10.1002/jps.24420 (2015).

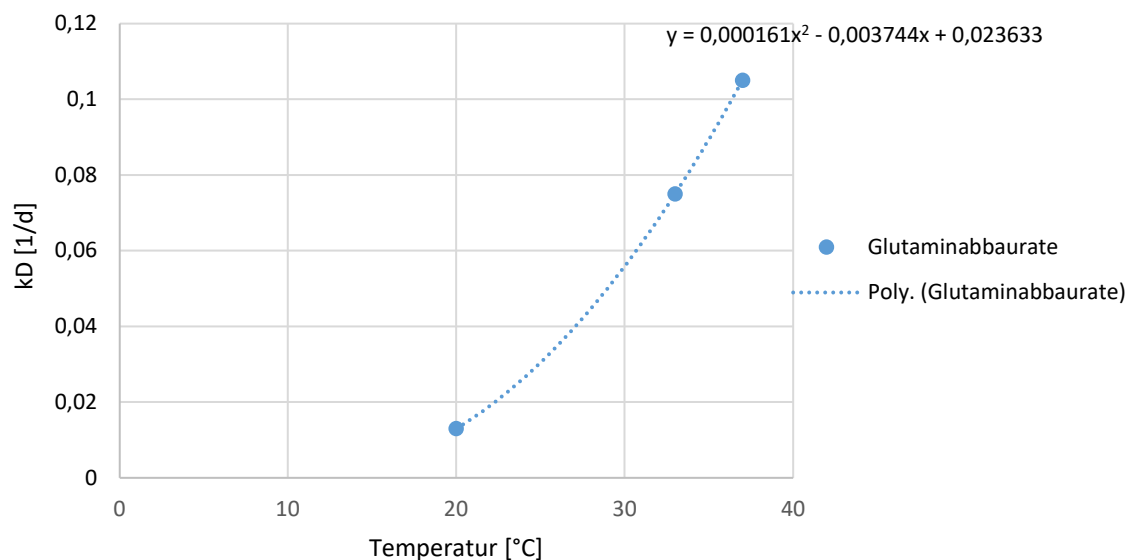
228. Mario Lederle. Ruperto Carola University Heidelberg, Germany
(Submission: 2018).
229. Vriezen, N., Romein, B., Luyben, K. C. A. M. & van Dijken, J. P. Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 272–286; 10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<272::AID-BIT8>3.0.CO;2-C (1997).

Anhang

Thermischer Glutaminzerfall



Anhang-Abbildung 1: Thermische Glutamindegradation- Konzentrationsverlauf über der Zeit



Anhang-Abbildung 2: Temperaturabhängigkeit der thermischen Glutaminzerfallsrate mit Zerfallskoeffizient $k_D = k_{dGLN}(T)$

Quantifizierung der umgebauten Reaktoranlage

Die zur Berechnung der $\emptyset\mu_{PCD}$ benötigte Kulturdauer zum Erreichen der VCD_{PCD} der von Marcel Pralle *MP* durchgeführten Reaktorläufe konnte aufgrund der Angaben im Bericht lediglich abgeschätzt werden und wurde in Tabelle 14 entsprechend gekennzeichnet.

Tabelle 14: Grunddaten Qualifizierung der umgebauten Reaktoranlage

Anlage/ Operator	Bezeichnung	Kulturdauer bei erreichter VCD_{PCD} [h]	VCD_{PCD} [Zellen / ml]	$\emptyset\mu_{PCD}$ [1/d]
R'alf//MP	R1.1	~167	$11,1 \cdot 10^6$	~0,45
R'alf//MP	R1.2	~190	$9,09 \cdot 10^6$	~0,39
R'alf//MP	R1.3	~140	$9,40 \cdot 10^6$	~0,50
R'alf//MP	R2.1	~167	$10,9 \cdot 10^6$	~0,43
R'alf/SÖ	Fermentation 1	143,5	$10,20 \cdot 10^6$	0,50
R'alf/SÖ	Fermentation 2	162,0	$6,95 \cdot 10^6$	0,41
R'alf/SÖ	Fermentation 3	139,5	$7,42 \cdot 10^6$	0,45
Biostat/KL	R1	117,84	$7,10 \cdot 10^6$	0,64

Aus der zusammenfassenden Darstellung in Tabelle 14 wird ersichtlich, dass die in der umgebauten Reaktoranlage erreichte VCD_{PCD} mit den Fermentationen 2 & 3 vergleichbar ist. Im Durchschnitt liegt die erreichte VCD_{PCD} der, in der für tierische Zellkultur ausgelegten Reaktoranlage durchgeführten Kultivierungen, mit $9,29 \cdot 10^6$ Zellen/ml über der im ersten Versuch erreichten VCD_{PCD} der umgebauten Reaktoranlage. Auffällig ist jedoch die deutlich früher erreichte VCD_{PCD} in der umgebauten Reaktoranlage und die draus resultierende höhere $\emptyset\mu_{PCD}$.

Nach der Qualifizierung einer der vier Reaktoren, der umgebauten Reaktoranlage, wurde im Weiteren die Vergleichbarkeit der vier Reaktoren untersucht. Zu diesem Zweck wurden parallel vier Kultivierungen bei 37°C durchgeführt und wie zuvor die VCD_{PCD} sowie die $\emptyset\mu_{PCD}$ betrachtet und in Tabelle 15 zusammengefasst.

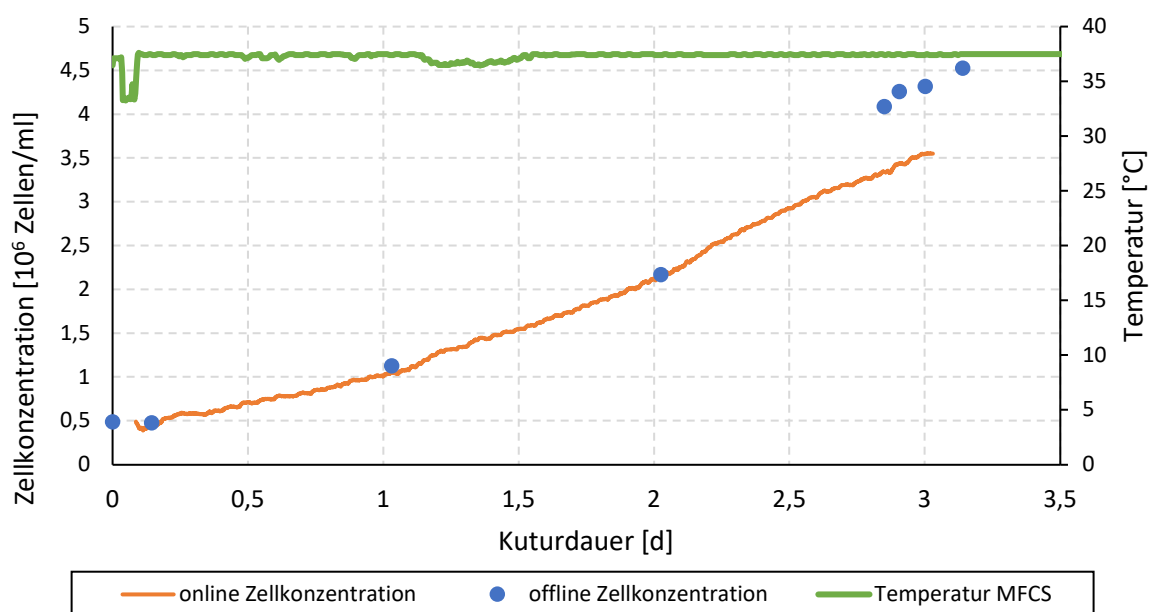
Tabelle 15: Qualifizierung der vier Reaktoren

Prozesseinheit	Bezeichnung	Kulturdauer bei erreichter VCD_{PCD} [d]	VCD_{PCD} [Zellen / ml]	$\emptyset \mu_{PCD}$ [1/d]
Unit 1	R2	5,24	$6,04 \cdot 10^6$	0,50
Unit 2	R3	4,76	$9,78 \cdot 10^6$	0,57
Unit 3	R4	4,76	$7,28 \cdot 10^6$	0,58
Unit 4	R5	4,76	$7,72 \cdot 10^6$	0,61

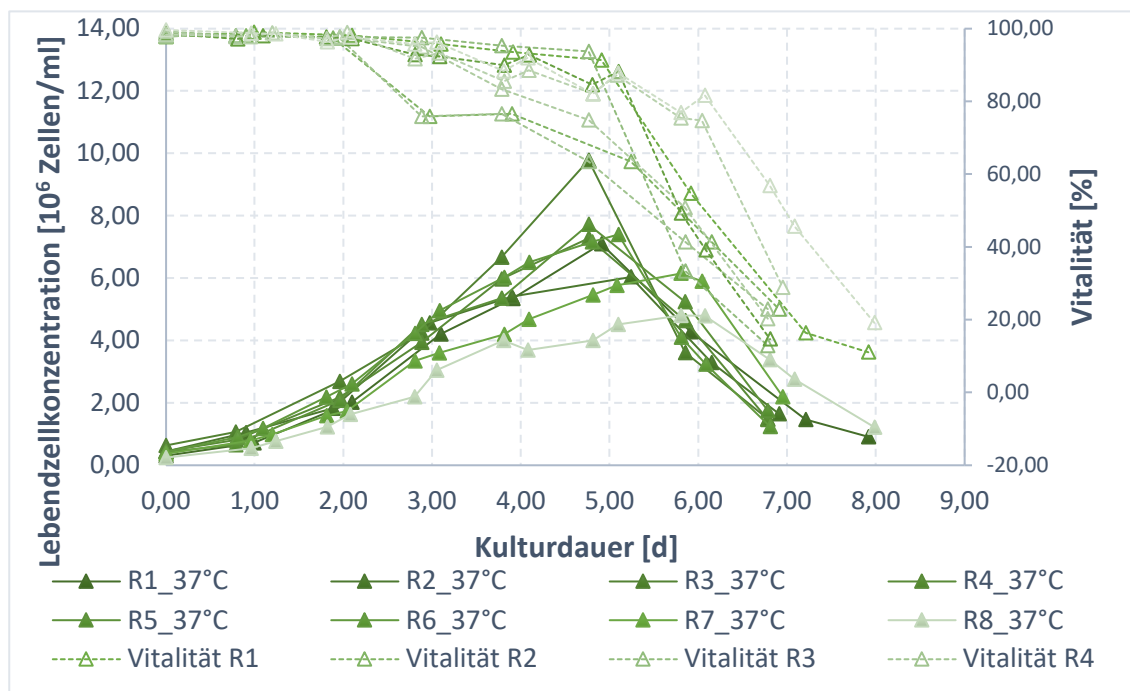
Tabelle 15 kann entnommen werden, dass die VCD_{PCD} mit Ausnahme des Reaktorlaufs R3 (Unit 2) nahezu identisch verlaufen sind.

Verifizierung der INcyte-Sonde

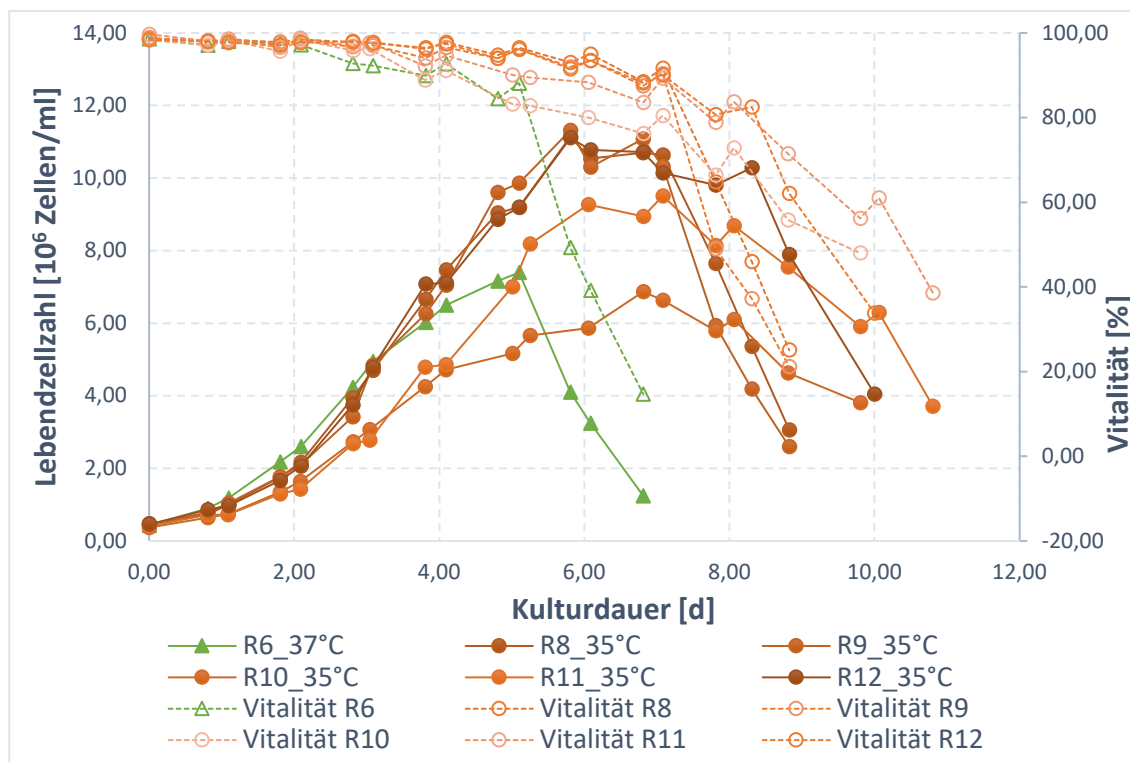
Wie aus den in Anhang-Abbildung 3: Abweichungen der online und offline gemessenen Zellkonzentrationen aufgetragenen Versuchsergebnissen eines Kultivierungsprozesses mit einer nahezu konstanten Prozesstemperatur von 37°C ersichtlich wird, sind die angesprochenen Varianzen zwischen den online und offline Messwerten nicht ausschließlich auf die Änderung der Prozesstemperatur zurückzuführen.

**Anhang-Abbildung 3: Abweichungen der online und offline gemessenen Zellkonzentrationen**

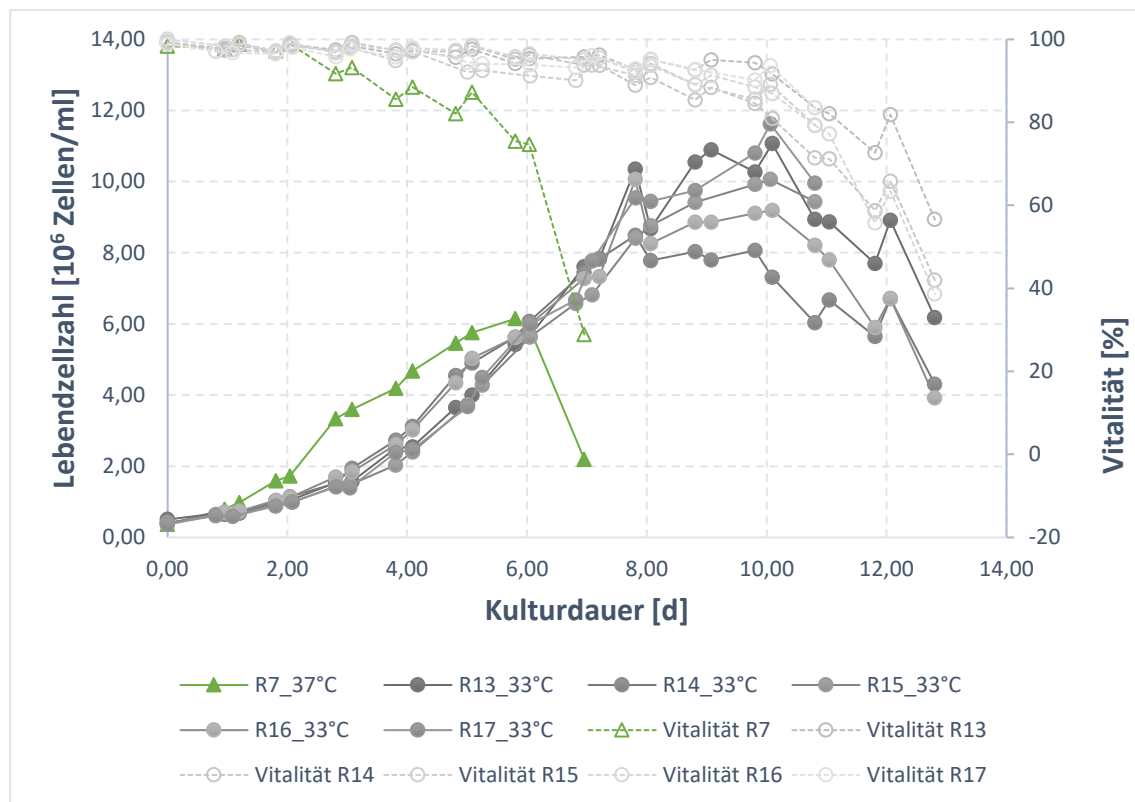
Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate



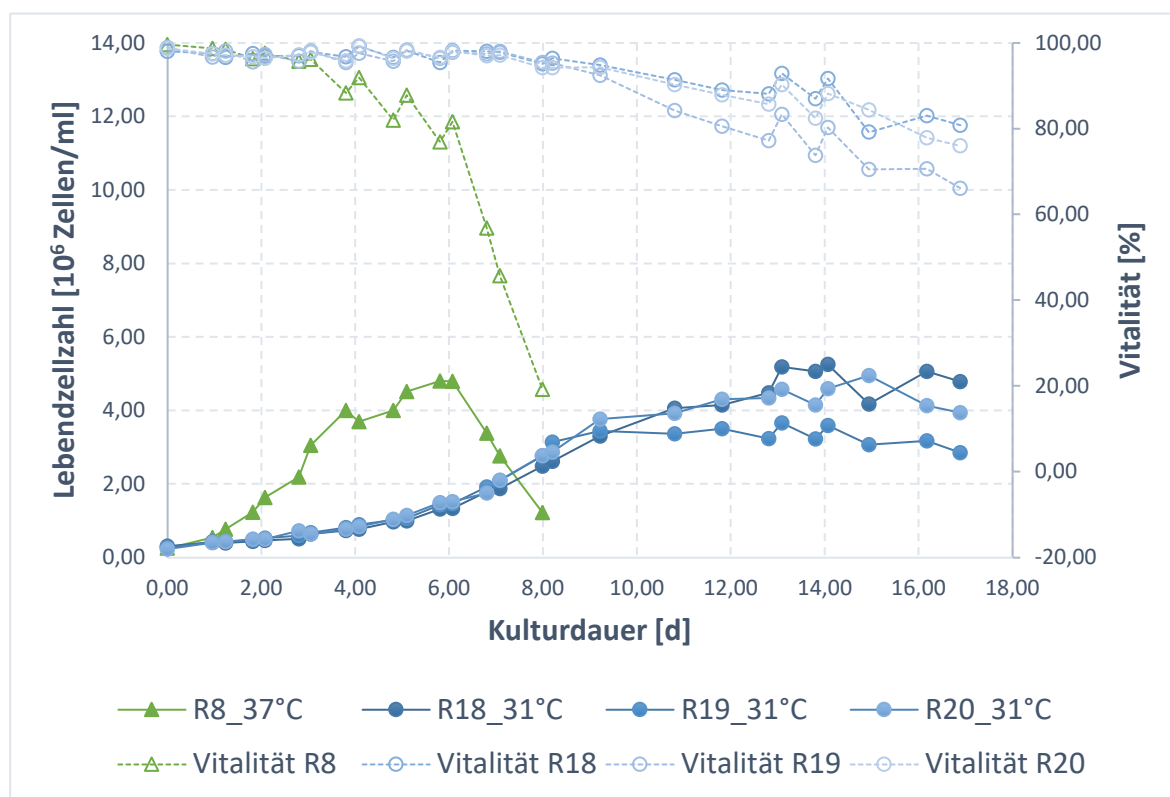
Anhang-Abbildung 4: Wachstumskurven bei 37°C



Anhang-Abbildung 5: Wachstumskurven bei 35°C inklusiver der Referenzkultur bei 37°C

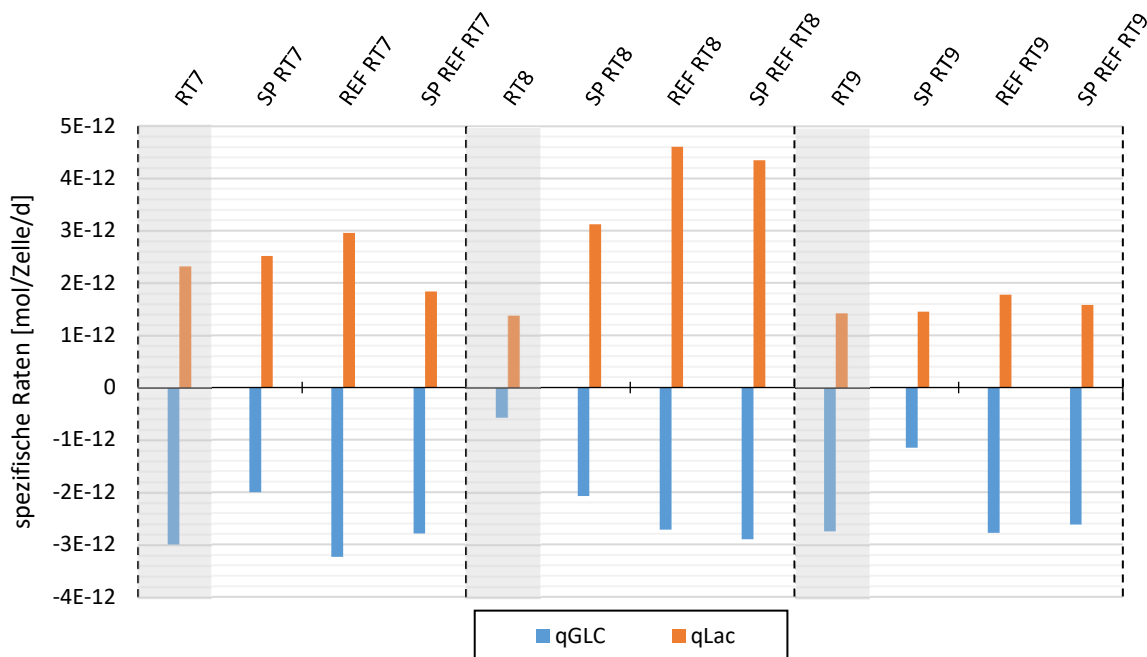


Anhang-Abbildung 6: Wachstumskurven bei 33°C inklusiver der Referenzkultur bei 37°C

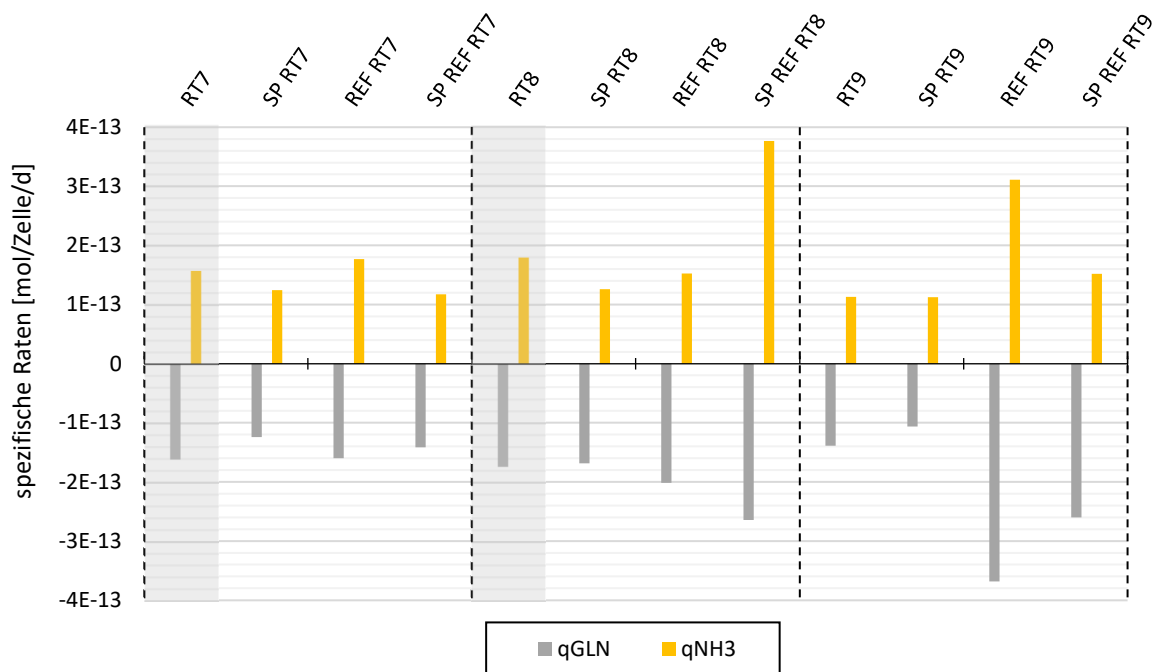


Anhang-Abbildung 7: Wachstumskurven bei 31°C inklusiver der Referenzkultur bei 37°C

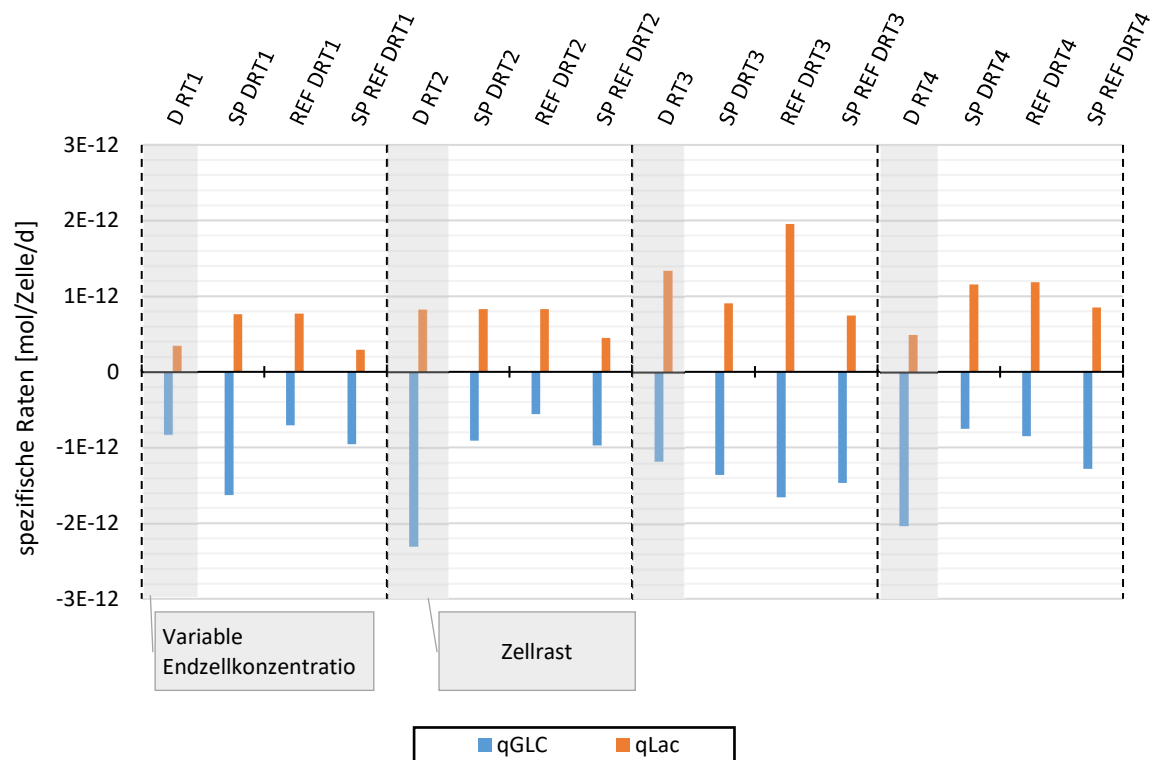
Spezifische Raten



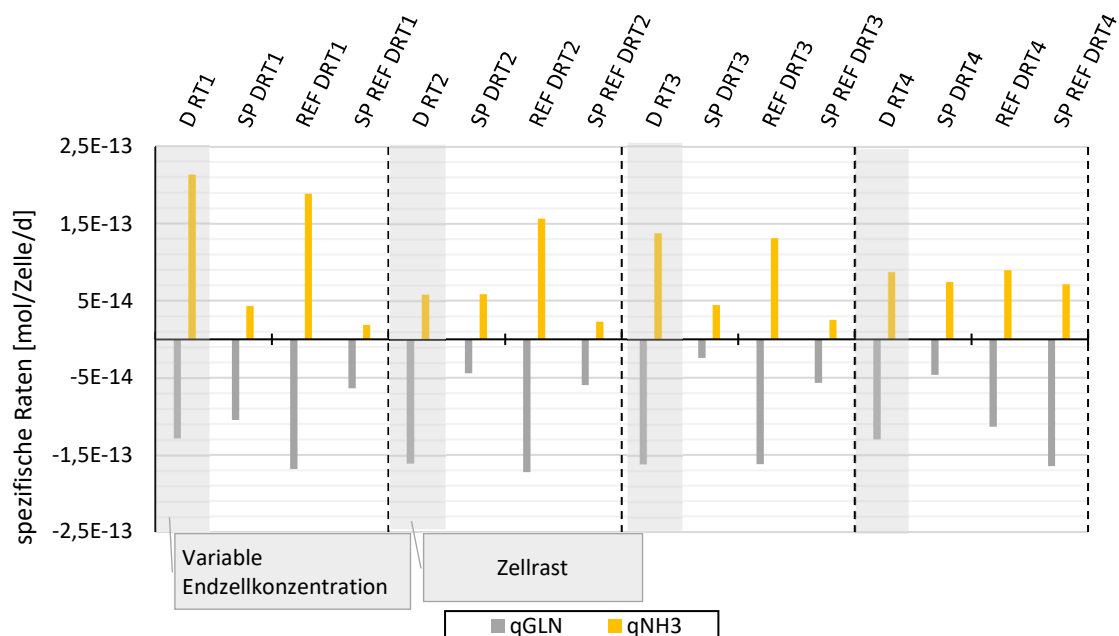
Anhang-Abbildung 8: Spezifischen Glukoseaufnahmeraten und Laktatbildungsraten Zellklon CHO-DP12. RT:= Vorkultur mit Zellzahlregelung, REF RT:= Referenzvorkultur ohne Zellzahlregelung, SP:= (Simulierte Produktion) produktionsähnliche Prozesse



Anhang-Abbildung 9: Spezifischen Glutaminaufnahmeraten und Ammoniumbildungsraten Zellklon CHO-DP12. RT:= Vorkultur mit Zellzahlregelung, REF RT:= Referenzvorkultur ohne Zellzahlregelung, SP:= (Simulierte Produktion) produktionsähnliche Prozesse



Anhang-Abbildung 10: Spezifischen Glukoseaufnahmeraten und Laktatbildungsraten Zellklon CHO DPO-KL. RT:= Vorkultur mit Zellzahlregelung, REF RT:= Referenzvorkultur ohne Zellzahlregelung, SP:= (Simulierte Produktion) produktionsähnliche Prozesse



Anhang-Abbildung 11: Spezifischen Glutaminaufnahmeraten und Ammoniumbildungsraten Zellklon CHO-DPO-KL. RT:= Vorkultur mit Zellzahlregelung, REF RT:= Referenzvorkultur ohne Zellzahlregelung, SP:= (Simulierte Produktion) produktionsähnliche Prozesse

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/Formelzeichen	Bedeutung
$\vec{D}$	Elektrische Flussdichte
$\vec{E}$	Elektrische Feldstärke
$\vec{J}$	Stromdichte
μ	Spezifische Wachstumsrate
A	Fläche
BHK	Baby-Hamster Nierenzelle
C	Konzentration
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	Chemisch Definiert
CDK	Cyklin-abhängige Kinase
CHO	Chinesische Hamster Eierstock Zelle
CLIA	Chemilumineszenz Immunoassay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN / DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPO	Darbepoetin alpha
e(t)	Regelabweichung
EPO	Erythropoetin
ESI-MS	Elektrosprayionisatios-Massenspektrometrie
ExtA / ExtB	Externes Signal A / B
FIM	Fischer-Informationsmatrix
Frel	Quadratische Abweichung
FSC	Forward Scatter

Abkürzung/Formelzeichen	Bedeutung
fx	Frequenz
G	Leitwert
GLC	Glukose
GLN	Glutamin
I	Strom
IPA	Inhibitor of apoptosis
J(x)	Gütefunktion
K _D	Differenzialfaktor Regler
K _i	Integralfaktor Regler
K _p	Proportionalfaktor Regler
LAC	Laktat
LZZ	Lebendzellzahl
Max	Maximal
Min	Minimal
Mrd.	Milliarden
MW	Mittelwert
N	Anzahl
n	Anzahl der Teilungen
NH ₃	Ammonium
P	Volumen
PCD	Maximale Zellkonzentration
PS	Phosphatidylserin
q _{Spez}	Spezifische Rate
R	Elektrischer Widerstand

Abkürzung/Formelzeichen	Bedeutung
REF RT x	Referenzreaktorlauf zum zellzahlgeregelten Reaktor x
RT x	Zellzahl geregelter Reaktor x
SD	Einsaatdichte
SP	Simulierte Produktion
SSC	Side Scatter
sU	Spezifischer Umsatz
T	Temperatur
t_d	Verdopplungszeit
U	Elektrische Spannung
$u(t)$	Stellgröße
USD	US Dollar
VCD	Lebendzellkonzentration
$w(t)$	Führungsgröße
X	Zellzahl
$y(t)$	Regelgröße
$y_M(t)$	Messwert der Regelgröße
$z(t)$	Störgröße
ϵ	Permittivität
σ	Elektrische Leitfähigkeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Anzuchtprozesses innerhalb der Zellkultur mit Darstellung des absoluten Volumens und der Zellzahlzunahme über die Zeit, sowie der zeitlichen Verläufe der Zellkonzentration.....	4
Abbildung 2: Schema der Zellzahlregelung in der Betriebsumgebung	6
Abbildung 3: Charakteristische Wachstumskurve einer Satzkultur (Batch-Kultur) ²³	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus	13
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Bilder nekrotischer und apoptotischer Zellen ¹⁶	14
Abbildung 6: Temperaturabhängigkeit der katalytischen Wechselzahl k_{cat} und somit der katalytischen Aktivität, psychrophiler (offene Symbole, blaue Linien) und mesophiler (ausgefüllte Symbole) Amylasen (Enzymen) ³⁸	16
Abbildung 7: Blockschaltbild eines einfachen Regelkreises mit dynamischen Größen	20
Abbildung 8: Schemata einer Neubauerzählkammer ¹⁰¹	42
Abbildung 9: Prinzip der Incyte-Sonde; R_{Medium} := elektrischer Widerstand des Mediums, R_{Zelle} := elektrischer Widerstand der Zelle, $C_{Membran}$:= elektrische Kapazität der Zellmembran, I := elektrische Stromstärke, V := elektrische Spannung	45
Abbildung 10: Darstellung der frequenzabhängigen Permittivität biologischer Objekte ¹⁰⁸	47
Abbildung 11: Relative Permittivität und Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Frequenz und dem Zellvolumen im Messraum ¹⁰⁹	49
Abbildung 12: Bestimmung der Biomassekonzentration mithilfe zweier Frequenzen Incyte-Sonde ¹¹³	49
Abbildung 13: Prinzip des Frequenzscan und Zuordnung der ermittelten Größen ¹¹³	50
Abbildung 14: Verstellbarer Adapter der Biomassesonde in Form einer explosionszeichnungsähnlichen Photographie und als CDA-Bauteil in der geschlossenen Darstellung	51
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers mit exemplarischen Ergebnissen eines Annexin V-FITC-Apoptoseassays; Q4:= vitale Zellen, Q3:= früh-apoptotische Zellen, Q2:= spät-apoptotische Zellen, Q1:= nekrotische Zellen, SSC:= Side Scatter Signal, FSC:= Forward Scatter Signal.....	53
Abbildung 16: Schema des verfahrenstechnischen Aufbaus der Zellzahlregelung	62
Abbildung 17: Fließbild des Zellzahlreglers	64
Abbildung 18: Ermittlung der aktuellen spezifischen Wachstumsrate - schematische Darstellung.....	68
Abbildung 19: Berechnung der notwendigen Wachstumsrate μ_{sett} , durch Vergleich der Zielzellkonzentration C_{end} und der mit der aktuellen spezifischen Wachstumsrate μ_{mest} prädiktiv erreichbaren Endzellkonzentration C_{tend}	69
Abbildung 20: Fließbild Zellzahlregelung inklusive des selbstoptimierenden Algorithmus.....	71

Abbildung 21: Zellkonzentration in Abhängigkeit von der Permittivität und der Temperatur.....	77
Abbildung 22: Darstellung des Messverhaltens der Permittivitätssonde bei sprunghafter Temperaturänderung	78
Abbildung 23: a) Prozentuale Abweichung der online und offline ermittelten Zellkonzentration b) Prozentuale Abweichung der offline mit dem ViCell und der Neubauerzählkammer ermittelten Messwerte.....	79
Abbildung 24: Reaktorversuche zur Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur	82
Abbildung 25: Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur im Erlenmeyerkolben	83
Abbildung 26: Ergebnisse eines Charakterisierungslaufs zur Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur.....	85
Abbildung 27: Ermittlung des funktionalen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur auf Grundlage des Charakterisierungslaufs im Reaktor	86
Abbildung 28: Ergebnisse der ersten zellzahlgeregelten Kultivierung RT1 mit dem Zellklon CHO-DP12	90
Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der zellzahlgeregelten Reaktorkultur RT1 und RT2 durchgeführt mit dem Zellklon CHO-DP12 auf Basis der Vorversuche	91
Abbildung 30: Änderung der gewünschten Endzellkonzentration innerhalb einer CHO-DP12 Kultur- RT3	93
Abbildung 31: Änderung der gewünschten Endzellkonzentration innerhalb einer CHO-DP12 Kultur- RT4	94
Abbildung 32: Änderung der Prozessenddaten während der Kultivierung des CHO-C6000 Subklons DPO-KL	95
Abbildung 33: Reaktorkultivierung des C6000-CHO Subklons DPO-KL mit Zellrast.....	97
Abbildung 34: Ermittelte Parameter des iterativen Regelalgorithmus, innerhalb der Kulturen des CHO-Subklons DPO-KL	99
Abbildung 35: Relative Abweichungen der online Messwerte der Zellkonzentration zum geplanten Prozessendzeitpunkt von der Zielzellkonzentration, sowie die relativen Abweichungen der offline und online Messwerte der Zellkonzentration der Prozesse des CHO-Subklons DPO-KL	100
Abbildung 36: Ergebnisse der Replikationsstudie unter Verwendung des Zellklons CHO-DP12; n = normierten Prozessdaten. Die Normierung erfolgte auf die gewünschte Endzellkonzentration respektive den geforderten Endzeitpunkt.....	101
Abbildung 37: Replikationsstudie Zellklon C6000 CHO Subklon DPO-KL; n= normierte Prozessdaten. Die Normierung erfolgte auf die gewünschte Endzellkonzentration respektive den geforderten Endzeitpunkt. Der Verlauf der Kultur nDPO-R2 weicht aufgrund der durchgeführten Zellrast deutlich von den drei weiteren Kulturen ab.	102
Abbildung 38: Mittleren spezifischen Wachstumsraten der produktionsähnlichen Prozesse mit (SP RT, SP DRT) und ohne (SP REF RT, SP REF DRT)	

zellzahl geregelter Vorkulturen der Zellklone CHO-DP12 (Replikationen n=4) und CHO-DPO KL (Replikationen n=4).....	103
Abbildung 39: Spezifische Glukoseverbrauchsrate und Laktatbildungsrate im Reaktorversuch bei unterschiedlichen konstanten Temperaturen. Die Versuchsanzahl n betrug bei einer Temperatur T=31°C n=3, T=33°C n=6, T=35°C n=6, T=37°C n=8	105
Abbildung 40: Relativer spezifischer Glukose/Laktat Umsatz im Vergleich mit der relativen spezifischen Wachstumsrate	106
Abbildung 41: Spezifische Glutaminverbrauchsrate und Ammoniumbildungsrate (ausgefüllte Balken) bei unterschiedlichen konstanten Prozesstemperaturen im Vergleich mit der spezifische Akkumulationsrate von Glutamin und Ammonium (schraffierte Balken). Die Versuchsanzahl n betrug bei einer Temperatur T=31°C n=3, T=33°C n=6, T=35°C n=6, T=37°C n=8	107
Abbildung 42: Vergleich des relativen spezifischen Glutaminumsatzes mit der relativen spezifischen Wachstumsrate bei unterschiedlichen Temperaturen.	108
Abbildung 43: Spezifische Produktbildungsrate bei unterschiedlichen konstanten Prozesstemperaturen mit dem Zellklon CHO-DP12	109
Abbildung 44: Mittlere spezifische Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsrate der Versuche mit Zellzahlregelung (RT, DRT), der Referenzkulturen ohne Zellzahlregelung (REF RT, REF DRT), sowie der dazugehörigen Prozesse unter Produktionsbedingungen (SP), a) Ergebnisse des Zellklons CHO-DP12, b) Ergebnisse des Zellklons DPO-KL	110
Abbildung 45: Spezifischer Glukose-Laktat-Umsatz $sU_{qGLC/qLAC}$ a) CHO-DP12 b) CHO-DPO-KL	111
Abbildung 46: Mittlere spezifische Glutaminaufnahme- und Ammoniumbildungsrate (ausgefüllte Balken) der Versuche mit Zellzahlregelung (RT, DRT), der Referenzkulturen ohne Zellzahlregelung (REF RT, REF DRT), sowie der dazugehörigen Prozesse unter Produktionsbedingungen (punktierte Balken). a) Ergebnisse des Zellklons CHO-DP12, b) Ergebnisse des Zellklons DPO-KL	113
Abbildung 47: spezifischer Glutamin/Ammonium-Umsatz Umsatz sU_{qGLN/qNH_4} a) CHO-DP 12 b) CHO-DPO-KL	113
Abbildung 48: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch RT9 - mit geregelter Vorkultur	115
Abbildung 49: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch REF RT9 - mit ungeregelter Vorkultur	116
Abbildung 50: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch RT10 - mit geregelter Vorkultur	117
Abbildung 51: Zellzyklusverteilung Reaktorversuch REF RT10 - mit ungeregelter Vorkultur	118
Abbildung 52: Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor RT9	119
Abbildung 53: Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor REF RT9	120
Abbildung 54 Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor RT10	121
Abbildung 55: Ergebnisse des Apoptoseassay Reaktor REF RT10	121
Abbildung 56: Zeitlicher Verlauf der mittleren Zellgröße des Zellklons a) CHO-DP12 b) CHO-DPO_KL	123

Abbildung 57: Zeitlicher Verlauf der mittleren Zirkularität des Zellklons a) CHO-DP12 b) CHO-DPO_KL.....	123
Abbildung 58: zeitlicher Verlauf a) der Produktkonzentration und b) der spezifischen Produktbildungsrate IgG	124
Abbildung 59: zeitlicher Verlauf a) der Produktkonzentration und b) der spezifischen Produktbildungsrate DPO	125
Abbildung 60 Vergleich des Glykosylierungsprofils a) sowie der Glykation der leichten Ketten b) und der Grad der Galaktosylierung c) des IgG-Produktes für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahlgeleiteter Vorkultur.	126
Abbildung 61: SDS-Gel der produktionsähnlichen Prozesse mit zellzahlgeleiteter Vorkultur (SP DRT 1-4) und ohne zellzahlgeleiteter Vorkultur (SP REF DRT 1-4). Darbepoetin alfa wird bei innerhalb des roten Kastens bei 42 kDa bis 51 kDa nachgewiesen	128
Abbildung 62: N-Glykanprofil von Darbepoetin alfa für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahlgeleiteter Vorkultur.....	129
Abbildung 63: Hypothetische Ladungsnummer von Darbepoetin alfa für die produktionsähnlichen Reaktoren mit (SP RT) und ohne (SP REF RT) zellzahlgeleiteter Vorkultur	130
Abbildung 64: Vergleich der ermittelten Parametersätze in Bezug auf die unterschiedlichen Methoden zur Ermittlung der temperaturabhängigen spezifischen Wachstumsrate	138
Abbildung 65: Spezifische Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Zeit (t) und der Temperatur (T) in einem Temperaturbereich von 25°C bis 38°C	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für numerische Optimierungsverfahren, eingeteilt nach deterministischen, stochastischen Verfahren und gradientenbasierten beziehungsweise gradientenfreien Verfahren	24
Tabelle 2: Geräteliste	28
Tabelle 3: Verwendetes Zubehör.....	30
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	31
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.....	32
Tabelle 6: Kultivierungs- und Einfriermedium	33
Tabelle 7: Methode der DPO-Aufreinigung; CV =Säulenvolumen, A = Puffer A, B = Puffer B.....	59
Tabelle 8: Zusammenfassende Daten zur Qualifizierung der Bioreaktoranlage.....	75
Tabelle 9: Reaktorkulturen bei konstanten Temperaturen - Darstellung der wesentlichen Parameter Die Referenzkulturen liefen parallel zu den Kulturen bei variablen Temperaturen. $C(t=0)$:= Startzellkonzentration, PCD_{VCD} := maximale Lebendzellkonzentration, $\int LZZ_{PCD}$:= Integral der Lebendzellkonzentration, Varianz $PCDVCD$:= Varianz der maximale Lebendzellkonzentration in Relation zur Referenzkultur, Varianz $\int LZZ_{PCD}$:= Varianz des Integrals der Lebendzellkonzentration in Relation zur Referenzkultur.....	81
Tabelle 10: Im Reaktorversuch experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur	82
Tabelle 11: Im Erlenmeyerkolben experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur	84
Tabelle 12: Während des Charakterisierungslaufs im Reaktor experimentell ermittelte Parameter zur Beschreibung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur	86
Tabelle 13: Optimale Versuchsplanung: ermittelte Temperaturen zur Charakterisierung des funktionellen Zusammenhangs der spezifischen Wachstumsrate von der Temperatur	88
Tabelle 14: Grunddaten Qualifizierung der umgebauten Reaktoranlage.....	177
Tabelle 15: Qualifizierung der vier Reaktoren.....	178

Lebenslauf**Karin Martina Loges****PERSÖNLICHE
DATEN**

Geboren: 18.04.1988 / Essen
2 Kinder

KONTAKTDATEN

Karin_Loges@web.de

Teterow, 19.05.2021
Karin Martina Loges

**BERUFLICHER WERDEGANG**

- Seit 10/2020 **Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG in Teterow**
Produktionsspezialist
Qualifizierung/Validierung
Adsorber Produktion
- 10/2018 – 7/2020 **Lehrbeauftragte an der Hochschule Mannheim**
Modul: Mathematische Berechnungssoftware
- 4/2018 - 12/2018 **Elternzeit**
- 10/2016 – 2/2020 **Akademische Mitarbeiterin bei der Hochschule Mannheim Transfer gGmbH**
Selbstständige Mitarbeit im Forschungsprojekt mit eigenständiger Projektplanung
- 6/2015 - 10/2016 **Elternzeit**

**AUSBILDUNG**

- 06/2020-9/2020 **Weiterbildung bei der Alfatraining Bildungszentrum GmbH**
GMP-Projekt- und Prozessmanagerin
- Seit 10/2016 **Promotion an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hohenheim in Kooperation mit der Hochschule Mannheim**
Temperaturgesteuerte Zellzahlregelung für Bioreaktoren
- 10/2012 - 6/2015 **Masterstudium im Fach Biotechnology and Process Engineering; Universität Bayreuth**
Abschluss: Master of Science mit dem Schwerpunkt Chemische Verfahrenstechnik (Note 1,6)
Abschlussarbeit: Enzymatische Brennstoffzellen
- 10/2008 - 9/2012 **Bachelorstudium im Fach Apparative Biotechnologie; Fachhochschule Bielefeld**
Abschluss: Bachelor of Science (Note: 2,2)
Abschlussarbeit: Untersuchung der Langzeitstabilität von on-line Sensoren in unterschiedlichen Zellkulturprozessen im Laborbioreaktor
- 9/2005 - 6/2008 **Augustin-Wibbelt-Gymnasium Warendorf**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Eidesstattliche Versicherung über die eigenständig erbrachte Leistung

gemäß § 18 Absatz 3 Satz 5 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim für die Fakultäten Agrar-, Natur- sowie Wirtschafts- und Sozialwissenschaften

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Temperaturgesteuerte Zellzahlregelung für Bioreaktoren

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Teterow, 19.05.2021

Ort und Datum



Unterschrift