

**Ganzheitliche Überwachung eines
CHO-K1 Zellkulturprozesses
mit multimodalen
spektroskopischen Methoden**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigte Dissertation

von

Shaobin Mike Lu, M.Sc.

2022

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

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

Institut für Prozessanalytik und Getreidewissenschaften

Universität Hohenheim

Tag der Promotion: 25.01.2022

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Dissertation beigetragen haben. An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheper dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, meine Promotion in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Danke für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Betreuung während meiner Zeit am TCI. Danke für die Geduld und die Motivation, die mir sehr geholfen hat, die Dissertation nach den Jahren fertigzustellen. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Bernd Hitzmann für die Übernahme des Korreferats sowie apl. Prof. Dr. Sascha Beutel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Frau Dr. Dörte Solle für die ausgezeichnete Betreuung, die exzellenten Forschungsideen und die wertvollen Ratschläge während meiner ganzen Zeit am TCI. Vielen Dank für all die fruchtbaren Inspirationen, das Korrekturlesen meiner Dissertation und die Unterstützung, die zu jeder Zeit zur Verfügung stand.

Als ehemaliger Kellermeister bedanke ich mich für die schönen Zeiten am TCI (2013 – 2016) bei allen TCI'lern verschiedener Generationen. Ich danke Euch für die vielen unvergesslichen Momente. Danke für die Kollegialität und Eure Freundschaft in all den Jahren.

Emi und Katha, Euch danke ich besonders für das Korrekturlesen und die langjährige Freundschaft. Schön, dass wir immer noch Nachbarn bzw. Kollegen sind!

Ein großes Dankeschön geht nach Hombressen, dem Tor zum Reinhardswald. Danke Gisela, Kerstin und Thomas für die zweite Heimat für mich. Danke für Eure ständige Unterstützung. Ich bin mehr als dankbar, dass wir uns damals im „koreanischen Büdchen“ getroffen haben!

در پایان تمایل دارم از صبر و بردباری شما عزیزان تشکر نمایم! بدون یاری و مساعدت شما این مهم هرگز به سرانجام نمی رسید! سپاسگزارم

Meine unendliche Dankbarkeit gebührt meinen Eltern. 感谢我的父母一直给我不懈的支持。即便相隔九千多公里，我都能够时刻感觉到你们对我无微不至的关爱。感谢你们支持我当年十几岁就想只身来到德国开始独立学习生活的决定。因为工作而间断写博士论文的那几年，感谢你们没有给我太大的压力，一切顺其自然。学历固然重要，但是我更感谢你们一直以身作则，让我先学会做人，再去追寻自己的梦想。希望在这里儿子可以让你们感到自豪！谢谢你们！

Kurzfassung

Die moderne biopharmazeutische Industrie beschäftigt sich mit der Herstellung von Wirkstoffen, die in Bioprocessen produziert werden. Ein breites Anwendungsgebiet haben Biopharmaka, zu denen Impfstoffe, therapeutische Proteine und biologische Moleküle gehören. Säugetierzellen bilden eine wichtige Gruppe der Wirtszellen in der Bioproduktion. Der Zellkultivierungsprozess der Säugetierzellen ist komplexer als andere Grundoperationen (Engl. *unit operations*), daher sind hierbei umfangreiche Prozessüberwachung und -kontrolle notwendig, um eine hohe Qualität und Sicherheit der Biopharmaka zu gewährleisten.

Im Rahmen der PAT-Initiative (Engl. *Process Analytical Technology*) setzen sich die biopharmazeutische Industrie und die regulatorischen Behörden dafür ein, dass der Bioprocess genauer überwacht und verstanden wird. Auf Basis von Multivariate Datenanalyse (MVDA) und Sensorik mit modernen Prozessanalysetechniken, zwei PAT-Elemente, stellt die Methode der Spektroskopie zur Bioprocessüberwachung als geeignet dar.

Die Arbeit behandelt die Evaluierung der MIR-, 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie zur Überwachung eines Zellkultivierungsprozesses mit CHO-Zellen. Methoden aus der MVDA wurden stets verwendet. In erstem Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der MIR- und 2DF-Spektroskopie fünf CPPs (Engl. *critical process parameters*) untersucht: Glucose-, Laktat- und Glutamin-Konzentrationen, sowie Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden spektroskopischen Methoden parallel zu einander verschiedene Zielanalyten simultan detektieren können. In zweitem Teil der Arbeit wurde eine Methode zur gezielten Induktion von Apoptose in CHO-Zellen entwickelt. Es konnten mit der Methode Zellkulturen mit verschiedenem Anteil apoptotischer Zellen generiert werden. Die induzierte Apoptose wurde als ein neuer Prozessparameter im letzten Teil der Arbeit eingeführt. Die 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie diente hierbei erfolgreich der Überwachung, um den Anteil apoptotischer Zellen sowie die Gesamtzellzahl im Bioreaktor zu detektieren.

Schlagwörter: Bioprocessüberwachung, MIR-Spektroskopie, 2DF-Spektroskopie, UV/VIS-Spektroskopie, Multivariate Datenanalyse (MVDA), Apoptose, Säugetierzellkultivierungsprozess

Abstract

The modern biopharmaceutical industry is engaged with the production of therapeutics that are manufactured in bioprocesses. Biopharmaceutical drugs can be used in different fields, such as vaccines, therapeutic proteins and further biological molecules. Mammalian cells belong to one of the most important systems for bioproduction. The cell culture process is more complex compared to other unit operations. An extensive process monitoring and control is essential to ensure the high quality and safety of the biopharmaceutical drugs.

The biopharmaceutical industry and the regulatory authorities are promoting through PAT-Initiative that bioprocesses should be monitored properly and understood thoroughly. Spectroscopy, which combines both PAT elements of multivariate data analysis (MVDA) and modern sensor technology in process analytics, makes a good method for monitoring bioprocesses.

This thesis evaluates the MIR-, 2DF- and UV/VIS-spectroscopy for monitoring a CHO cell culture process. Methods of MVDA were used throughout the thesis. The first part of the thesis investigated the implementation of MIR- and 2DF-spectroscopy to monitor five different CPPs (critical process parameters) which were glucose-, lactate- and glutamine concentrations as well as TCC (total cell counts) and VCC (viable cell counts). It showed that parallel to each other, both spectroscopic methods could detect different analytes simultaneously. In the second part of the thesis, a method to conduct targeted induction of apoptosis in CHO cell cultures was developed. This easy-to-handle method was able to generate cell cultures with different degrees of apoptosis as desired. The induced apoptosis was then defined as a new process parameter to be monitored in the last part of the thesis. Using 2DF- and UV/VIS-spectroscopy, the degrees of apoptosis in the cell culture as well as both total and viable cell counts were monitored. The results showed that the UV/VIS spectroscopy was able to predict the progression of apoptosis in the cell culture as well as the TCC in bioreactor.

Key words: bioprocess monitoring, MIR-spectroscopy, 2DF-spectroscopy, UV/VIS-spectroscopy, multivariate data analysis (MVDA), apoptosis, mammalian cell culture process

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Kurzfassung.....	II
Abstract.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungen.....	VII
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Bioprozessüberwachung mit Spektroskopie.....	4
2.1.1 CHO Zellen.....	4
2.1.2 CHO-Zellkulturprozess und Prozessüberwachung.....	5
2.1.3 Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung.....	9
2.1.3.1 MIR-Spektroskopie.....	11
2.1.3.2 UV/VIS-Spektroskopie.....	12
2.1.3.3 2D Fluoreszenz (2DF) - Spektroskopie.....	13
2.2 Multivariate Datenanalyse mit Spektraldaten.....	15
2.2.1 Datenmanagement und Vorverarbeitung.....	15
2.2.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	16
2.2.3 Partial Least Square Regression (PLS-R).....	17
2.3 Gezielte Induktion der Apoptose in CHO-K1.....	19
2.3.1 Apoptose – programmierter Zelltod.....	19
2.3.2 Induktion zur Apoptose mit Camptothecin.....	21
3. CHO-K1 Bioprozessüberwachung.....	23
3.1 CHO-K1 Kultivierungsprozess im 15 L Bioreaktor.....	23
3.2 Multivariate Datenauswertung (MIR- und 2DF-Spektren).....	26
3.3 Erstellung von Kalibrationsmodellen auf Basis von MIR-Spektren.....	29
3.4 Erstellung von Kalibrationsmodellen auf Basis von 2DF-Spektren.....	35
3.5 Validierung der Modelle durch Vorhersage am K08.....	38
3.6 Automatisierte Glucose-Zugaben bei Prozess K08.....	41
3.7 Zusammenfassung und Diskussion der Prozessüberwachung an K08.....	42
4. Gezielte Induktion der Apoptose in CHO-K1 Zellen.....	45

4.1	Apoptose in CHO-K1 Zellen und deren Bestimmung	45
4.2	Camptothecin als Induktionsmittel für Apoptose	48
5.	UV/VIS- und 2DF spektroskopische Sonde zur Beobachtung der Zellzustände (Zellzahl und Apoptose).....	52
5.1	Vorstellung der Kultivierungsprozesse K09 – K13.....	52
5.2	Apoptose am Standardprozess.....	55
5.3	Vorhersagemodelle von Zellzahlen mit 2DF- und UV/VIS-Spektren	57
5.3.1	Auswahl der Datenbereiche	57
5.3.2	Vorhersage der Zellzahlen von K13.....	58
5.4	Beobachtung der induzierten Apoptose mit einer UV/VIS-spektroskopischen Sonde 63	
5.4.1	Auswahl der spektroskopischen Methode für die Beobachtung der induzierten Apoptose.....	63
5.4.2	PCA – Spektren von K10 und K12	66
5.4.3	PLS Kalibrationsmodelle für den Anteil apoptotischer Zellen im Prozess.....	68
5.5	Zusammenfassung und Diskussion der Beobachtung der Zellzustände mit 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie	72
6.	Zusammenfassung und Ausblick	73
7.	Literatur	80
8.	Anhang.....	87
8.1	Material und Geräte.....	87
8.2	Methoden.....	89
8.2.1	Bioreaktorkultivierungen	89
8.2.1.1	Ansetzen der Vorkultur	89
8.2.1.2	15 Liter Bioreaktorkultivierung	89
8.2.2	Analyse der offline Proben aus 15 L – Edelstahlbioreaktor.....	91
8.2.2.1	Manuelle Probenahme (Tagesüber)	91
8.2.2.2	Vorbereitung der Nachtsproben am Tag danach.....	91
8.2.2.3	Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen	91
8.2.2.4	Zellzahlbestimmung	92
8.2.3	Anbindung und Messung mit spektroskopischen Sensoren.....	93
8.2.3.1	MIR-spektroskopischer Sensor	93
8.2.3.2	2DF-spektroskopischer Sensor.....	94

8.2.3.3	UV/VIS-spektroskopischer Sensor	94
8.2.4	Untersuchung auf Zellschaden mit 0,5 % V/V DMSO	95
8.2.5	Mittelwertkorrektur (Vorverarbeitung MIR- und UV/VIS-Spektren)	95
8.2.6	Berechnung der RMSE.....	96
8.3	Assay „Gezielte Apoptose-Induktion in Schüttelkolben-kultur von CHO-K1 Zellen“	97
9.	Abbildungsverzeichnis	100
10.	Lebenslauf.....	103

Abkürzungen

2DF	2-D Fluoreszenz
ADC	Engl. <i>antibody drug conjugates</i>
ATF	Engl. <i>Alternating Tangential Flow</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Engl. <i>attenuated total reflectance</i> (abgeschwächte Totalreflexion)
CD	Engl. <i>chemically defined</i>
cGMP	Engl. <i>current Good Manufacturing Practice</i>
CHO	Engl. <i>Chinese hamster ovary</i>
CPP	Engl. <i>critical process parameter</i> (kritische Prozessparameter)
CPT	Camptothecin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoE	Engl. <i>Design of experiment</i>
DSP	Engl. <i>Downstream Processing</i>
FDA	Engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GMP	Engl. <i>Good Manufacturing Practice</i>
Gy	Einheit für Energiedosis: Gray
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (für Medium)
HCP	Engl. <i>Host cell proteins</i>
ICH	Engl. <i>International council on harmonization of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use</i>

IPC	Inprozesskontrolle
K	Kultivierungsprozess
M	Molar
MIR	mittleres Infrarot
MSC	Multiplikative Streukorrektur
MVDA	Engl. <i>multivariate data analysis</i> (multivariate Datenanalyse)
N/A	Engl. <i>Not applicable</i> (unzutreffend)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NIR	nahes Infrarot
nm	Nanometer
PAT	Prozess Analysen Technologien
PC	Engl. <i>principal component</i> (Hauptkomponente)
PCA	Engl. <i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
pH	Engl. <i>potentia Hydrogenii</i> (Potential des Wasserstoffs)
PI (Chemikalie)	Propidiumiodid
PI (Bioprozess)	Engl. <i>Process intensification</i>
PLS	Engl. <i>partial least square</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PTM	posttranslationale Proteinmodifikationen
QbD	Engl. <i>Quality by design</i>
QC	Engl. <i>Quality control</i> (Qualitätskontrolle)
R ²	Bestimmtheitsmaß

RMSE	Engl. <i>Root mean square error</i>
RMSEC	Engl. <i>Root mean square error of calibration</i>
RMSECV	Engl. <i>root mean square error of cross validation</i>
RMSEP	Engl. <i>Root mean square error of prediction</i>
SNV	Engl. <i>Standard Normal Variate</i>
TCC	Engl. <i>total cell count</i> (Gesamtzellzahl)
USP	Engl. <i>Upstream Processing</i>
UV	Ultraviolett
VCC	Engl. <i>viable cell count</i> (Lebendzellzahl)
VIS	Engl. <i>visible</i> , sichtbares Licht

1. Einleitung und Zielsetzung

„*Ich sehe was, was du nicht siehst und das ist ...*“

Datenanalyse macht das Unsichtbare sichtbar. Heutzutage sind Daten eine enorm wichtige Ressource, die überall und zu jeder Zeit generiert und aufgezeichnet wird. Die Kunst der Datenanalyse ist es, mit passenden Werkzeugen die verborgene Information für weitere Zwecke nutzbar zu machen, wie z.B. eine Prozessüberwachung durch Rückschlüsse aus den gewonnenen Daten einer indirekt überwachten Prozessgröße.

In der biopharmazeutischen Industrie werden Daten aus allen Bereichen akribisch gespeichert und analysiert, wie von den regulatorischen Behörden vorgegeben. All diese Daten dienen der Einhaltung von Qualität und Sicherheit der Biopharmaka. Zu den meistverbreiteten Biopharmaka gehören Antikörper und Impfstoffe, sowie weitere biologisch hergestellte Moleküle. Der Anwendungsbereich der biologisch hergestellten Produkte ist vielfältig, vom Einsatz in Arzneimitteln zur Senkung des Cholesterinspiegels [1] bis zur Verwendung der monoklonalen Antikörper oder ADCs (Engl. *antibody drug conjugates*) für die Behandlung von Krebspatienten [2].

Gegenwärtig befindet sich die ganze Welt in einer globalen Pandemie (COVID-19). Impfstoffe und therapeutische Antikörper, viele davon biologisch hergestellt, sind Hoffnungsträger, um dieser Pandemie ein Ende setzen zu können. Im Fokus der internationalen Aufmerksamkeit steht die Qualität der Impfstoffe und Arzneimittel. Um eine größtmögliche Akzeptanz der Vakzine in der Bevölkerung zu erreichen, ist es unerlässlich Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit der Impfstoffe weltweit auf hohem Niveau zu prüfen und sicherzustellen. Zwei wichtige Aspekte sollen dabei garantiert werden: Die hohe Qualität bei der Produktherstellung und die konstante Reproduzierbarkeit des Prozesses, um eine stets gleichbleibend hohe Qualität der Impfstoffe garantieren zu können.

Die PAT-Initiative (Engl. *Process Analytical Technology*) der FDA und der QbD-Ansatz (Engl. *Quality by Design*) der ICH stellen Methoden und Werkzeuge für die Entwicklung und Herstellung sicherer und qualitativ hochwertiger Arzneimittel zur Verfügung. Und sie sind zwei Kerndokumente zur Definition der cGMP im 21. Jahrhundert [3]. Der QbD-Ansatz fokussiert sich darauf, Qualität von Anfang an in ein Produkt zu integrieren, statt sie nachträglich in Produkte hineinzutesten [4]. Als ein wissenschaftlicher und risikobasierter

Ansatz betont QbD die Notwendigkeit eines tiefgreifenden Verständnisses aller Aspekte der Produktionsprozesse und deren Kontrolle sowie darüber, welche Einflüsse die wichtigen Prozessparameter auf die Produkteigenschaften nehmen. Ein wesentlicher Bestandteil des QbD-Ansatzes ist somit die Identifizierung dieser kritischen Prozessparameter (CPPs) und deren Überwachung in Echtzeit während der Prozessführung [5] mit dem Ziel, die Qualität des Endproduktes durch diese Prozessüberwachung sicherzustellen.

In den letzten Jahren erwiesen sich die im Rahmen der PAT-Initiative eingesetzten Methoden als effizient und zuverlässig für die kontinuierliche Prozessüberwachung und -kontrolle. Die PAT-Elemente beinhalten u.a. die Multivariate Datenanalyse (MVDA), die Sensorik mit modernen Prozessanalysetechniken sowie Prozessführungsstrategien. Unter den PAT-Sensoren, die für die Bioprozessüberwachung verwendet werden, zeichnet sich die Spektroskopie durch ihre Fähigkeit zur gleichzeitigen Überwachung verschiedener kritischer Prozessparameter in Echtzeit aus [6]. Aus den riesigen - mittels spektroskopischer Methoden - im Bioprozess erhobenen Datenmengen, werden durch Einsatz der MVDA die relevanten Prozessinformationen extrahiert und somit die Bioprozessüberwachung mittels Spektroskopie realisiert [7].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Evaluierung der multimodalen spektroskopischen Methoden zur Überwachung (bzw. Beobachtung oder Beschreibung) eines Industrie-ähnlichen Kultivierungsprozesses mit Säugetierzellen im Rahmen der PAT- und QbD-Ansätze. Die Multimodalität der Überwachungsmethoden soll in drei Teilen dieser Arbeit sukzessiv erläutert werden. Im ersten Teil der Arbeit wird untersucht, ob mit Hilfe der MIR- und 2DF-Spektroskopie eine ganzheitliche Prozessüberwachung an drei niedermolekularen Analyten und den Zellzahlen (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl) erfolgreich ist. Im zweiten Teil der Arbeit soll eine einfache Methode zur gezielten Induktion der Apoptose in CHO-K1 Kulturen entwickelt werden, um dadurch den Anteil apoptotischer Zellen in einer Kultur steuern zu können. Die gezielt induzierte Stärke der Apoptose dient nun im letzten Teil der Arbeit als ein neuer Parameter in einer vertieften Überwachung der zellphysiologischen und -morphologischen Zustände mittels 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie. In der vertieften Betrachtung der Zellzustände sollen zunächst die Möglichkeiten der spektroskopischen Methode UV/VIS zur Beobachtung der Zellzahlen mit 2DF-Spektroskopie verglichen werden. Die abschließende Untersuchung soll zeigen, ob die Stärke der Apoptose im Kultivierungsprozess überwacht werden kann. Anhand der

Ergebnisse werden die Machbarkeit und Grenzen der MIR-, 2DF- und UV/VIS-spektroskopischen Methoden in der Bioprozessüberwachung untersucht und diskutiert.

2. Theoretische Grundlagen

Dieser Teil bietet eine theoretische Grundlage zur Fragestellung dieser Arbeit an. Drei Teilbereiche werden erklärt und erläutert. Der erste Teil soll den Hintergrund der Bioprozessüberwachung mit Spektroskopie schildern. Folgend werden die Prinzipien der Multivariate Datenanalyse mit Spektraldaten erklärt. Zum Schluss im dritten Teil werden die theoretischen Grundlagen der Apoptose und deren gezielte Induktion vorgestellt.

2.1 Bioprozessüberwachung mit Spektroskopie

Die *Process Analytical Technology* (PAT) Initiative ist seit 2004 ein viel diskutiertes Thema in der biopharmazeutischen Industrie. Die Initiative wirbt dafür, dass mit neuen wissenschaftlichen Methoden eine kontinuierliche Überwachung der Herstellungsprozesse von Biopharmaka für eine zuverlässige und gleichbleibende Produktqualität erreicht werden kann. Die Prozessüberwachung soll auf Basis von tiefgreifendem Prozessverständnis realisiert werden. Mit Hilfe der Überwachung von kritischen Qualitätsparametern und kritischen Prozessparametern soll die Qualität des Endprodukts gesichert werden. Die Qualität soll nach vorgegebenen Prozessabläufen und Prozessparametern bereits geplant sein (Engl. *Quality by Design*, QbD). In diesem Abschnitt wird der theoretische Hintergrund von Zellkulturprozessen mit CHO Zellen und die Überwachungsmöglichkeiten von Bioprozessen vorgestellt.

2.1.1 CHO Zellen

Säugetierzellen dienen als wichtigstes Vehikel für die Herstellung von rekombinanten Proteinen für die klinische Anwendung, da sie in der Lage sind, wichtige posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM) durchzuführen. Die dadurch hergestellten rekombinanten Proteine haben eine ähnliche Struktur zu den Human-Proteinen [8]. Unter den bereits vermarkteten und sich noch unter klinischen Studien befindenden therapeutischen Proteinen, wird eine große Mehrheit in den *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen hergestellt [9].

CHO Zelllinien haben eine lange Geschichte in der biopharmazeutischen Industrie für die Herstellung von therapeutischen Proteinen (z.B. monoklonale Antikörper). Eine CHO Zelllinie wurde im Jahr 1956 zum ersten Mal im Labor des *Eleanor Roosevelt Institute for Cancer Research* etabliert. Im Jahr 1971 wurde die CHO Zelllinie so angepasst, dass sie in Suspensionskultur wachsen kann. Diese Fähigkeit bringt einen wesentlichen Vorteil für die spätere Produktion im großen Maßstab. Das erste von CHO Zellen hergestellte therapeutische Protein (ein Gewebespezifischer Plasminogenaktivator, Handelsname: Activase[®]) wurde im Jahr 1986 von Genentech in den Markt gebracht. Heutzutage werden mehr als 100 rekombinante therapeutische Proteine von CHO Zellen hergestellt, die erfolgreich bei der FDA und EMA registriert sind [10–12].

Die Anpassung von CHO Zelllinien an chemisch definierte Medien bringt den Vorteil, dass der Rohstoff kontrolliert werden kann und minimiert die Variabilität der Zusammensetzung von Charge zu Charge. Diese Eigenschaft besitzen die serumhaltigen Medien nicht, da Serum ein biologisches Produkt ist. Eine klar definierte chemische Zusammensetzung ist eine Voraussetzung für die Medien-Optimierung. Das Ziel der Medien-Optimierung ist eine bessere Produktivität zu erzielen [13].

In den letzten Jahrzehnten wurden bereits zuverlässige Expressionssysteme mit CHO Zellen entwickelt und diese ermöglichen eine hohe Prozessausbeute an Endprodukt [14, 15]. CHO Zellen sind somit die beliebtesten Produktionsvehikel für therapeutische Proteine. Ebenfalls durch die lange Geschichte und Erfahrung mit regulatorischen Behörden, ist es leichter mit bereits gut entwickelten CHO Zelllinien biopharmazeutische Forschung und Produktion zu betreiben. In Hinsicht auf die Weiterentwicklung von Bioprozessen mit CHO Zellen, zielen Forschungs- und Entwicklungsgebiete auf Hochzelldichte, kontinuierliche Bioprozesse, intensivierte Bioprozesse (Engl. *Process Intensification*, PI) und Ausbeutesteigerung etc.

2.1.2 CHO-Zellkulturprozess und Prozessüberwachung

Zellkulturprozesse sind Herstellungs- und Aufreinigungsprozesse mit tierischen oder pflanzlichen Zellen für die Produktion von biopharmazeutischen Wirkstoffen. Die Wirkstoffe werden meist nach der intrazellulären Bildung in die Prozessumgebung ausgeschieden. In solchen Fällen erfolgt die Aufreinigung des Produktes durch eine

physikalische Abtrennung von Zellen und durch mehrere biochemischen/physikalischen Aufreinigungsschritte. Die zellfreien *Unit Operations* (trennbare Grundoperationen in Bioprozessen) sind Teile des *Downstream Processing* (DSP). Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wird meistens in mehrere Chromatographie-Schritte und Dia-/Ultrafiltration aufgeteilt. In der GMP-Produktion kommen zudem noch Virus-Inaktivierung und Virus-Filtration dazu.

Im Gegensatz zum *Downstream Processing* ist das USP (Engl. *Upstream Processing*) komplexer, da lebende Zellen im Prozess beteiligt sind. Die wichtigste Grundoperation ist der Kultivierungsprozess im Bioreaktor. Im Bioreaktor ist eine definierte und kontrollierte Umgebung für das Zellwachstum und auch die Produktion des Wirkstoffs vorhanden. Der Bioreaktorinhalt besteht aus drei unterschiedlichen Phasen: den Zellen als Festphase, dem Medium als flüssige Phase und der Begasung als Gasphase [16]. Es besteht ein ständiger Austausch zwischen den drei Phasen. Der Bioreaktor ist kein geschlossenes System. Für das Wachstum der Zellen wird der Bioreaktor ständig begast. Substrate, Nährstoff und/oder Medium werden je nach Prozessführungsstrategie ebenfalls in den Bioreaktor zugegeben.

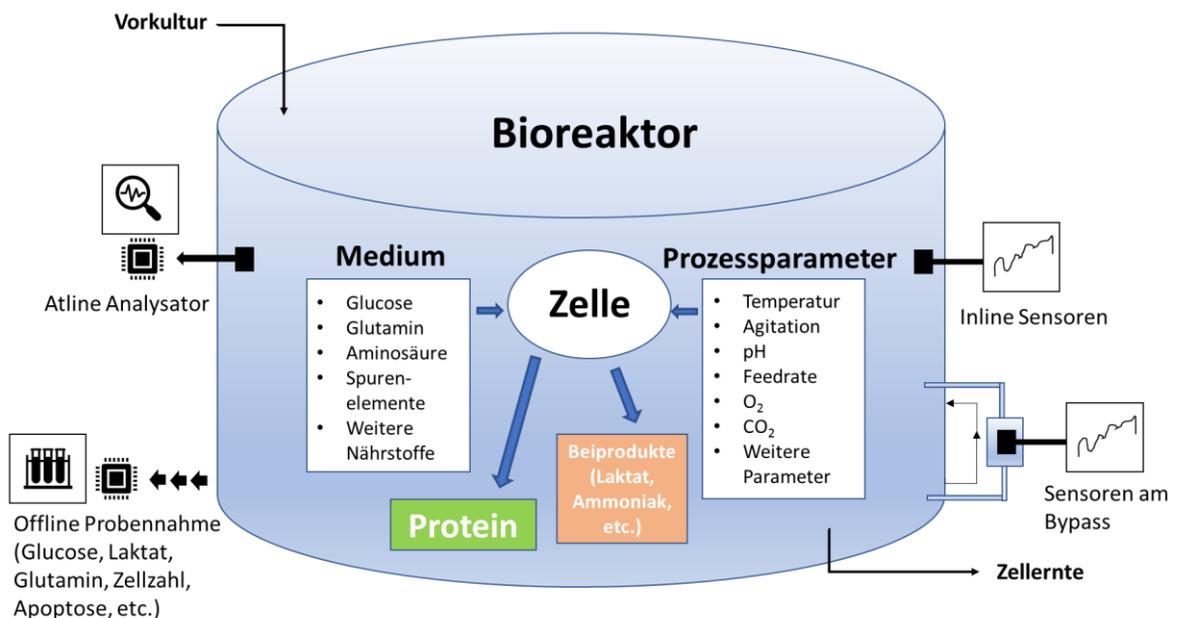


Abbildung 1: Skizze eines CHO-Kultivierungsprozesses im Bioreaktor mit Taxonomie von Prozesssensoren: *inline*, *atline*, *offline* und durch *Bypass*-System [17]

In Abbildung 1 ist eine Skizze von einem typischen CHO-Zellkulturprozess im Bioreaktor zu sehen. Die wichtigsten Bestandteile des Mediums sind zusammen mit den Prozessparametern aufgelistet. Unter den Bedingungen sind die CHO Zellen in der Lage, das Produkt herzustellen. Als Beiprodukte zählen Laktat und Ammoniak, die als Zellgifte für die CHO-Zellen wirken. Um die Produkt-Qualität und Zellzahl zu erhöhen ist ein detailliertes Wissen über den zellulären Metabolismus und deren Wechselwirkung mit den Medien-Komponenten erforderlich. Verbesserungen bringt eine gezielte Medien-Optimierung und Prozesssteuerung, um die Nebenprodukte zu reduzieren und möglichst lange optimale Wachstumsbedingungen zu erhalten.

Generell werden Bioprozesse in drei verschiedene Arten betrieben: Batch-Prozess, Fed-Batch-Prozess und kontinuierliche Prozesse. Bei einem Batch-Prozess sind alle benötigten Substrate, Medium und Nährstoffe zum Zeitpunkt der Inokulation bereits im Bioreaktor. Der Zellkulturprozess wird mit einem festen Volumen durchgeführt. Die Substrate werden verbraucht und Metaboliten/Beiprodukte werden im Bioreaktor akkumuliert. Ein Fed-Batch-Prozess wird für die Anfangsphase als Batch-Prozess durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Substrat-Limitierung, wird Nährstoff/Medium in den Bioreaktor gegeben, damit die Zellen weiterwachsen können. Ein Fed-Batch-Prozess kann zwar die Substrat-Limitierung kompensieren, aber der Akkumulation der Metaboliten nicht entgegenwirken. Viele Metaboliten wirken als Zellgift, Wachstumsinhibitoren oder als Induktionsfaktoren zur Apoptose. Pereira *et al.* hat 2018 in einer Publikation insgesamt 45 solche Metaboliten/Beiprodukte aus CHO Zellkultivierungsprozessen aufgelistet [18].

Damit bei einem Kultivierungsprozess keine Substrat-Limitierung und Akkumulation der Zellgifte auftreten, gibt es noch eine modernere Art von Prozessführung: kontinuierliche Prozesse. Mit Hilfe von Technologien, wie *Inclined Settler* oder ATF Module (Engl. *Alternating Tangential Flow*) können frische Nährstoffe ständig in den Bioreaktor hinzugefügt und gleichzeitig ungewünschte Zellgifte in niedriger Konzentration gehalten werden. Die Zellzahl kann durch eine kontinuierliche Prozessführung auf über 200 Millionen Zellen/mL steigen [19]. Mit der kontinuierlichen Prozessführung kann eine höhere Produktivität erreicht werden und die Dauer eines Prozesses kann vielfach verlängert werden. Ein typischer Fed-Batch Zellkulturprozess im Bioreaktor in der GMP-Produktion dauert ungefähr 12 – 14 Tage. Bei kontinuierlichen Kultivierungsprozess kann die stabile Phase über 50 Tage lang halten [20]. Der Perfusionsprozess entwickelt sich langsam und

stetig zu einer standardisierten Prozessführungsstrategie der biopharmazeutischen Industrie. Es gibt noch Hürden bei den regulatorischen Behörden zu nehmen. Es ist anspruchsvoll, die regulatorische Validierungsarbeit bei einem kontinuierlichen Prozess erfolgreich abzuschließen, da eine klare Definition des Batches schwierig ist [21].

Durch die Beteiligung von lebenden Zellen und vielfältigen Prozessführungsstrategien ist der Kultivierungsprozess eine komplexe Grundoperation mit vielen Prozessvariablen. Die Fähigkeit zur Überwachung und Kontrolle aller Prozessvariablen während eines Bioprozesses in Echtzeit ist erstrebenswert. Die PAT-Initiative der FDA hat einen engen Bezug zur Bioprozessüberwachung und -kontrolle. Die Produktqualität kann durch tiefgründiges Prozesswissen erhöht werden. Dieses Prozesswissen wird durch Einsetzen effektiver und geeigneter Sensoren erreicht [22].

In Abbildung 1 sind vier unterschiedliche Prozesssensoren-Anbindungsmethoden zu sehen. Die *offline* Probennahme mit anschließender Analyse stellt die klassische Methode dar. Ein Prozesssensor kann in drei unterschiedlichen Arten und Weisen am Bioreaktor angebunden sein, um den Prozess zu überwachen. Bei allen Anbindungsmethoden darf die Sterilität des Bioreaktors nicht gefährdet werden. Ein *inline* Sensor hat direkten Kontakt mit dem Inhalt des Bioreaktors (invasiv). Bei den optischen Sensoren ist oft ein Quarzglas zwischen dem Sensor und dem Inhalt des Bioreaktors (nicht-invasiv) als Trennung vorhanden [7]. Nicht-invasive Einbindung des Prozesssensors hat den Vorteil, dass das Risiko einer Kontamination des Zellkultivierungsprozesses minimiert wird. *Inline* Sensoren können an einem *Bypass*-System angebracht werden, denn ein Bioreaktor hat meist limitierte Anbindungsplätze. Der Vorteil eines *Bypass*-Systems ist die Möglichkeit zur zellfreien Messung. Zu den Nachteilen zählen Sauerstofflimitierung und evtl. geringe Repräsentativität für den Bioreaktorinhalt.

Bei *atline* Prozesssensoren ist meist ein automatisiertes Probennahme-System integriert und anschließend wird die Probe an einem Analysator gemessen. *Offline* Probennahme ist zeitaufwendig und je nach Anforderung der Qualitätskontrolle, kann eine häufige Probennahme notwendig sein. Das erhöht das Risiko der Kontamination. Durch die innovative Prozesssensor-Entwicklung sollen mehr Prozesssensoren mit der Fähigkeit zur *online* Überwachung in Echtzeit die *offline* Probennahme ersetzen. Eine Bioprozessüberwachung ist *online*, wenn *inline* oder *atline* Sensoren ununterbrochen Messungen/Analysen durchführen und die Ergebnisse zeitnah zur Verfügung stehen [22].

Inline Prozesssensoren für die Bioprozessüberwachung finden bereits Einsatz in der Industrie, und weitere neuartige Sensoren werden stetig entwickelt. So sind für die Prozessüberwachung und -kontrolle am Bioreaktor elektrochemische Sensoren notwendig, um die pH- und pO₂-Werte zu kontrollieren, damit optimale Bedingungen für das Zellwachstum und Produktbildung herrschen. Das Messprinzip für pH mit elektrochemischen Sensoren beruht auf Potentiometrie und Amperometrie. Das Messprinzip für Sauerstoffpartialdruck (pO₂) beruht auf die Messung der Veränderung des elektrischen Potentials. Für die pH und pO₂ Messungen stehen außerdem neuartige optische Chemosensoren zur Verfügung. Weitere physikalische Sensoren spielen eine wichtige Rolle, z.B. für die Temperatur-Messung und die Detektion von übermäßiger Schaumbildung [22]. Außerdem werden Sensoren für die elektrische Kapazität bereits für die Bestimmung viabler Zellen angewandt [23]. Neuartige optische und spektroskopische Sensoren finden mehr und mehr Zuspruch in Forschung und Industrie, um neue Möglichkeiten zur Bioprozessüberwachung zu ermöglichen [6, 7, 22, 24].

2.1.3 Spektroskopie zur Bioprozessüberwachung

In der Spektroskopie vereinen sich mehrere Messverfahren, die Wechselwirkungen zwischen der elektromagnetischen Strahlung und Materie untersuchen [25]. Die unterschiedlichen Methoden der Spektroskopie unterscheiden sich in dem verwendeten Spektralbereich und in dem daraus resultierenden Informationsgehalt. Die verwendeten Spektralbereiche erstrecken sich von langwelligen Radiowellen über Infrarot bis zu γ -Strahlung im Bereich des Picometers. Der breite Spektralbereich ermöglicht den Einsatz der Spektroskopie für unterschiedlichste Forschung und Anwendungen. In der Bioprozessüberwachung ist der Spektralbereich von UV bis Infrarot von Interesse. Biechele *et. al* hat zusammengefasst, welche Anwendungen für die Bioprozess-überwachung mit UV/VIS-, NIR-, MIR- und Fluoreszenzspektroskopie möglich sind. Abbildung 2 zeigt die detektierbaren Prozessvariablen mit den drei spektroskopischen Methoden [22].

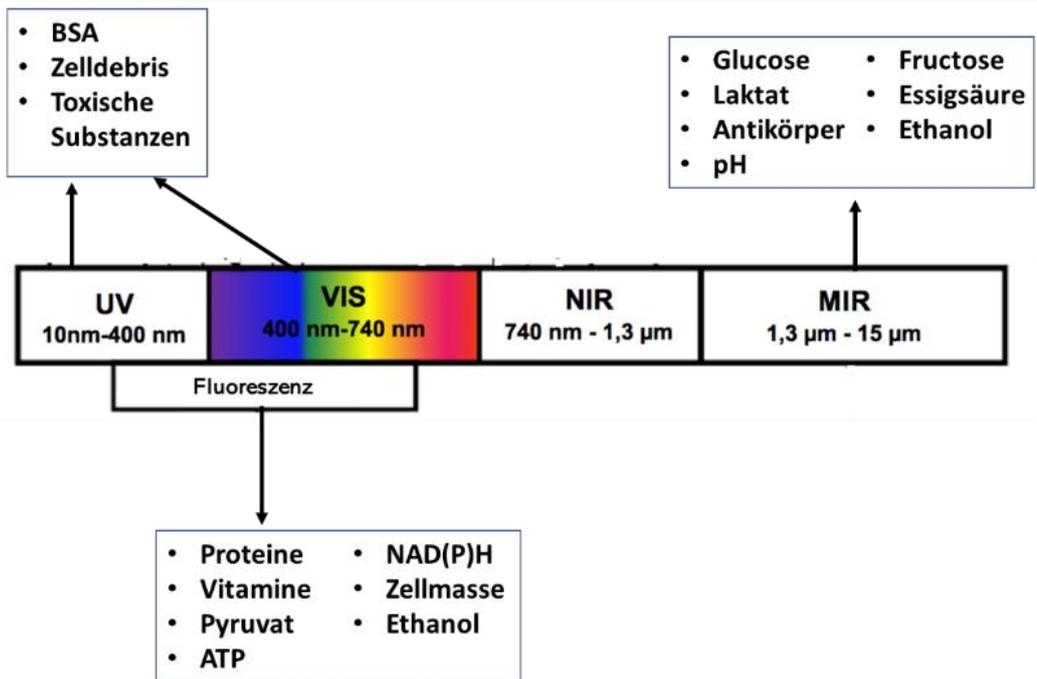


Abbildung 2: Spektralbereich für Bioprozessüberwachung mit detektierbaren Prozessvariablen [22]

In der optischen Spektroskopie sind Absorption, Reflexion, Emission und Streuung die Hauptwechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie. Die Absorption wird mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet (siehe Gleichung 1).

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = C \cdot d \cdot \varepsilon \quad (\text{Gleichung 1})$$

In der Gleichung ist gut zu erkennen, dass die Absorption A der elektromagnetischen Strahlung proportional zur Konzentration C des absorbierenden Stoffes, der Dicke bzw. der durchstrahlten Strecke der Probe d und dem molaren Absorptionskoeffizienten ε ist. Die optischen spektroskopischen Methoden haben vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Es bietet sich an, mehrere Messmethoden gleichzeitig für die Prozessüberwachung anzuwenden. Die Multimodalität kann somit mehr Informationen aus dem Prozess liefern und die Erweiterung an Prozessüberwachung bringt den Vorteil, dass die Methoden sich gegenseitig kalibrieren oder validieren können.

Kombiniert mit PAT sind die spektroskopischen Sensoren in der Lage, diverse CPPs (kritische Prozessparameter) zu überwachen, zu denen chemische, biologische und physikalische Variablen zählen [6]. Des Weiteren entfällt die ständige Probennahme und die Methode kann gleichzeitig mehrere Analyten/Prozessparameter detektieren. Weitere

Vorteile sind die schnelle Analyse, die robuste Datenaufzeichnung und die Sensitivität der Methode [6, 22, 24]. Mit Multivariate Datenanalyse (MVDA) werden Prozessinformation aus den Spektraldaten extrahiert. Die Theorie über die MVDA wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

2.1.3.1 MIR-Spektroskopie

IR-Spektroskopie ist eine schwingungs-spektroskopische Methode, wobei Molekülrotation und -schwingungen angeregt und detektiert werden. Diese Schwingungen sind charakteristisch für bestimmte funktionelle Gruppen des Moleküls und jeder organische/anorganische Stoff hat seine eigene Schwingungen [26]. Es wird zwischen dem nahen Infrarot (NIR: 740 nm – 1300 nm) und dem mittleren Infrarot (MIR: 1300 nm – 15000 nm) unterschieden. In der MIR-Spektroskopie können organische funktionelle Gruppe beobachtet werden, da in diesem Spektralbereich des MIR charakteristische Absorptionsbanden gut zu sehen sind. Somit enthalten die MIR Spektren Informationen über die funktionellen Gruppen der Moleküle und deren Struktur. Moleküle wie Glucose, Laktat, Fructose, Essigsäure und auch Antikörper haben charakteristische Absorptionsspektren und sie können im Bioprozess quantitativ und spezifisch bestimmt werden [27]. Die MIR Spektren von Gemischen zeigen Additionseffekte, d.h. dass die Spektren einzelner Komponenten addiert werden. Spektralbereiche können einzeln betrachtet werden, wenn einzelne Komponenten in diesen Bereichen Informationsgehalt (Stärke der Absorption) für die Quantifizierung aufweisen. Der Additionseffekt der MIR Spektren stellt somit kein Hindernis für die Quantifizierung der Komponenten im Gemisch dar [22].

Transmission ist die klassische Messmethode und dabei wird eine Probe mit Infrarot-Strahlung durchstrahlt. Danach wird der Anteil der Strahlung gemessen, der die Probe durchdrungen hat. Die Transmission ist abhängig von der Dicke der Probe. Für die Bioprozessüberwachung, ähnlich wie für die Überwachung chemischer Reaktionen, wird die ATR (Engl. *attenuated total reflectance*: abgeschwächte Totalreflexion) Messmethode verwendet. Hierbei wird unter anderem die Intensität des reflektierten Lichtes gemessen, unabhängig davon, wie tief die Infrarot-Strahlung in die Probe eindringen kann. Abbildung 3 zeigt die beiden Methoden.

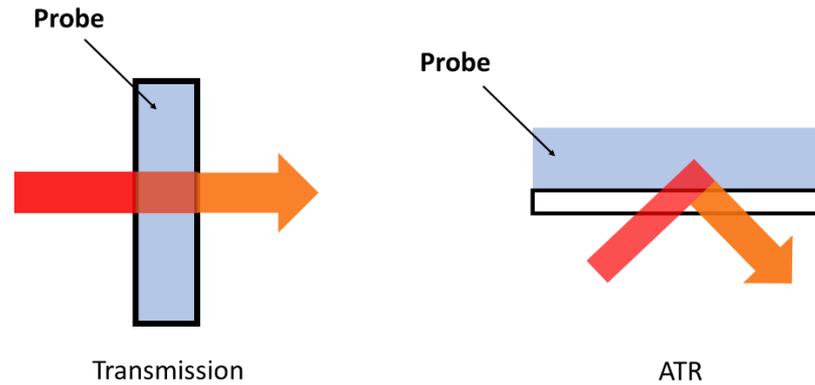


Abbildung 3: IR-Spektroskopie Messmethoden Transmission und ATR

Der ATR-Sensor ist robust und abriebfest und kann in rauer chemischer Umgebung verwendet werden. Für milde Bioprozessbedingungen bestehen keine Bedenken zur Nutzung dieser Methode.

MIR-Spektroskopie wurde bereits in diversen Applikationen und Publikationen für die Anwendung in der Bioprozessüberwachung beschrieben. Die Anwendung wurde sowohl *in-situ* als auch *ex vivo* erprobt. Die Wirtszellen erstrecken sich von Mikroorganismen (*E.coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* etc.) bis zu Säugetierzellen (CHO-Zellen) [22, 28, 29].

2.1.3.2 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektroskopie nutzt elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren (VIS: *visible*) Lichtes, um die Elektronen der Moleküle anzuregen. Lichtabsorption in diesem Bereich (UV und VIS) wird durch Elektronenübergänge zwischen unterschiedlichen Zuständen im Molekül verursacht. Die Übergänge werden in ungesättigten Bindungen, z.B. Aromaten, konjugierten Doppelbindungen, Heteroatome mit freien Elektronenpaaren beobachtet [97]. Proteine und DNA werden somit detektierbar.

In der UV/VIS-Spektroskopie werden Absorption, Streuung, Brechung, Beugung und Reflexion gemessen. Das sichtbare und UV-Licht wird durch die funktionellen Gruppen absorbiert. Eine charakteristische Absorptionsbande ist im UV/VIS-Spektrum zu sehen, wenn Licht in einer Wellenlänge absorbiert wird, die für die funktionelle Gruppe spezifisch ist. Tryptophan hat eine maximale Absorption bei 280 nm, während Tyrosin bei 275 nm und 195 nm eine maximale Absorption hat. NAD⁺ hat eine maximale Absorption bei 260

nm, während NADH/NADPH bei 340 nm und 260nm die maximale Absorption zeigt. Nukleotide haben maximale Absorptionen bei 271 nm (Cytosin), 267 nm (Adenosin), 265 nm (Thymin), 262 nm (Uridin) und 248 nm (Guanin) [98, 99].

Moderne UV/VIS Messgeräte basieren auf der Anwendung des Lichtwellenleiters, gekoppelt mit Photodiodenzellen. Diese Technologie ist in der Lage, einige Analyte in wässriger Lösung zu detektieren [30–32]. Moderne UV/VIS Spektrometer sind sensitiv, schnell, kompakt und robust für die Anwendung in der Prozessüberwachung. Hinzu kommt, dass UV/VIS Spektrometer kostengünstig sind. Der Einsatz der UV/VIS-Spektroskopie in der Bioprozessüberwachung wurden bereits in einigen Applikationen oder Veröffentlichungen beschreiben. Diese Methode wurde verwendet, um Substrate, Metaboliten, Produkt und auch toxische Substanzen im Bioprozess zu detektieren [6, 7, 31, 33].

2.1.3.3 2D Fluoreszenz (2DF) - Spektroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenz-Messung ist die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, bei der ein von Photonen angeregtes Molekül durch Emission von Licht wieder seinen Grundzustand annimmt. Diese ungerichtete Emission von Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet [34].

Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr verbreitete spektroskopische Methode. Seitdem die Autofluoreszenz lebender Zellen im Jahr 1957 entdeckt wurde, wird die Fluoreszenzspektroskopie häufig in der Bioanalytik eingesetzt [35]. Da die Fluoreszenzmessung sehr empfindlich gegenüber der Veränderung von strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Biomoleküle ist, bietet die Fluoreszenzspektroskopie vielfältige Einsatzmöglichkeiten, von einfacher Messung der Emissionsintensität bis zur anspruchsvollen Bioprozessüberwachung. Historisch gesehen waren die ersten Fluoreszenzsensoren auf die Messung der NAD(P)H-Fluoreszenz ausgerichtet [36]. Später wurde die Technik in der Kultivierung verschiedener Stämme von Mikroorganismen und Säugetierzellen zur Online-Bestimmung der Biomassen eingesetzt. Nachdem die Mehrkanal-Spektrometer entwickelt wurden, vervielfachten sich die Informationen aus dem gemessenen System, da die Spektren mehrerer Fluorophore gleichzeitig erfasst werden

können. Diese Mehrkanalspektroskopie (2D Fluoreszenz-Spektroskopie) spielt eine große Rolle bei der Bioprozessüberwachung [22, 24, 34, 37].

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird die Fluoreszenzintensität von bestimmten Anregungs- und Emissionswellenlänge gemessen. Bei der 2D Fluoreszenz-Spektroskopie werden Emissionsspektren für mehrere Anregungswellenlängen aufgezeichnet. Der Informationsgehalt ist dadurch um ein Vielfaches gestiegen. Ähnlich wie für andere spektroskopische Methoden der Bioprozessüberwachung in Echtzeit, ist ein Vorteil, dass die 2DF-Spektroskopie eine schnelle und non-invasive Methode ist.

Für die mehrdimensionale Fluoreszenzspektroskopie werden verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen genutzt, um eine Probe zu vermessen. Der Bereich erstreckt sich über die Wellenlängen von 260 - 560 nm für die Anregung und 300 nm - 600 nm bei der Emission. Somit können gleichzeitig Co-Faktoren, Proteine und weitere Fluorophoren detektiert werden. Eine Auswahl an natürlich vorkommenden Fluorophoren, die mit Hilfe der 2DF-Spektroskopie detektiert werden können, sind in der Tabelle 1 aufgeführt [37, 100].

Tabelle 1: Anzahl der Spektren für die Vorhersagemodelle

Fluorophor	Anregung (nm)	Emission (nm)
NADH/NADPH	340-360	450-460
Aminosäure: Tryptophan	280-290	340-350
Tyrosin	270-280	300-310
Flavin	365-375	520-530
	450-460	520-530

2.2 Multivariate Datenanalyse mit Spektraldaten

Multivariate Datenanalyse (MVDA) ist eine statistische Methode zur Datenanalyse. Die Datensätze werden aus mehreren Variablen generiert, und enthalten sehr viele Informationen. In den meisten Fällen handelt es sich um sehr große Datensätze. Datenanalyse ist eine Wissenschaft zur Analyse der Rohdaten, um verborgene Information zu extrahieren. Datenanalyse wird in vier unterschiedliche Arten aufgeteilt: *Descriptive Analytics*, *Diagnostic Analytics*, *Predictive Analytics* und *Prescriptive Analytics* [101-103].

1. *Descriptive Analytics* beantwortet die Frage „Was ist bereits in der Vergangenheit geschehen?“
2. *Diagnostic Analytics* beschäftigt sich mit der Fragestellung „Warum ist es in der Vergangenheit geschehen?“.
3. *Predictive Analytics* beantwortet die Frage „Was wird in der Zukunft passieren?“
4. *Prescriptive Analytics* beschäftigt sich mit der Fragestellung „Was soll vorgenommen werden, damit es (nicht) in der Zukunft passiert?“.

Daten werden ständig und überall generiert. Vor allem in den empirischen Wissenschaften, zum Beispiel in der Chemie und in den pharmazeutischen Wissenschaften, entstehen viele Datensätze. Die meisten Datensätze beinhalten gemessene Größen, die aus Experimenten oder aus der Überwachung von Prozessen generiert werden. Aus großen Datensätzen können verborgene Erkenntnisse gewonnen werden. Es können ebenfalls versteckte oder nicht auffällige Korrelationen zwischen zwei Messgrößen/Variablen in den Datensätzen gefunden werden. Es ist daher wichtig, die Daten korrekt zu analysieren, damit neue Erkenntnisse zu finden sind.

2.2.1 Datenmanagement und Vorverarbeitung

Spektroskopische Daten werden vorverarbeitet, bevor die chemometrischen Methoden angewandt werden. Um die Batch-zu-Batch Varianz zu kompensieren, werden meist die Werte eines Medium-Spektrums vor Innokulation des Bioreaktors bei allen Prozessspektren abgezogen (Normierung auf den Prozess) [24]. Eine Glättung der Spektren ist auch eine gängige Methode zur Vorverarbeitung. Die Glättung kann durch eine Mittelwertbildung von

mehreren Spektren innerhalb eines vordefinierten Fensters erfolgen [38, 39]. Der Savitzky-Golay-Filter mit seiner mathematischen Glättungsfunktion kann ebenfalls genutzt werden [40]. Eine Standardisierung der Spektren nach Mittelwertkorrektur (SNV-Transformation) kann Streueffekte aus den Spektren entfernen. Außerdem gibt es noch weitere Datenvorverarbeitungsmethoden, wie z.B. Multiplikative Streukorrektur (MSC), *Detrending*, 1. und 2. Ableitung, etc. [41].

2.2.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Nachdem alle Spektraldaten organisiert und vorverarbeitet sind, wird zunächst die Qualität der Spektren analysiert. Die Hauptkomponentenanalyse (Engl. *principal component analysis*: PCA) wird verwendet, um die Dimension der Datensätze zu reduzieren, ohne dabei Informationen zu verlieren. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse werden reduzierte latente Variablen durch Linearkombination berechnet. Die Datensätze werden durch die Methode so reduziert, dass nur wesentliche Informationen übrigbleiben [41].

Zu m Zeitpunkten während eines Prozesses wird jeweils ein Spektrum mit n Datenpunkten aufgenommen. Alle Spektren (bereits vorverarbeitet) werden in einer Matrix $\mathbf{X}^{(m \times n)}$ zusammengefasst. Im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse mit a Hauptkomponenten wird die Matrix $\mathbf{X}^{(m \times n)}$ in eine Hauptkomponentenmatrix $\mathbf{P}^{(n \times a)}$ und eine Scorematrix $\mathbf{T}^{(m \times a)}$ zerlegt, wobei die Residuenmatrix $\mathbf{E}^{(m \times n)}$ die nicht beschriebene Reststreuung der Daten beinhaltet. Gleichung 2 stellt das Ergebnis der PCA dar [41].

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Die Scorematrix $\mathbf{T}^{(m \times a)}$ hat insgesamt a Spalten und jeder der m Scorewerte entspricht einem Spektrum. Die Hauptkomponentenmatrix $\mathbf{P}^{(n \times a)}$, auch Loadings genannt, enthält Informationen über den jeweiligen Einfluss der ursprünglichen Variablen auf die jeweilige Hauptkomponente. Die erste Hauptkomponente beschreibt den größten Teil der Gesamtvarianz der Matrix \mathbf{X} [41]. Die Residuenmatrix \mathbf{E} , wie die Bezeichnung verrät, gibt die Abweichung des Produkts aus Scorematrix \mathbf{T} und Hauptkomponentenmatrix \mathbf{P} gegenüber der Eingangsmatrix \mathbf{X} wieder. Die Matrix \mathbf{E} wird auch als die Fehlermatrix

bezeichnet. Je mehr Hauptkomponenten verwendet werden, desto kleiner sind die Residuen in \mathbf{E} .

Aus der Scorematrix \mathbf{T} werden häufig die ersten zwei Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen, um das Ergebnis der PCA zu interpretieren. Die ersten zwei Hauptkomponenten beschreiben den Großteil der gesamten Varianz im Datensatz \mathbf{X} . Im Diagramm befinden sich insgesamt m (Anzahl der Spektren im Datensatz) Punkte und jeder Punkt stellt ein Spektrum dar. Liegen die Punkte weit auseinander sind die Varianzen und somit die Unterschiede zwischen den Spektren groß. Im Gegensatz bilden die nah beieinander liegenden Punkte Cluster und innerhalb eines Clusters sind die Unterschiede zwischen den Spektren gering [41].

2.2.3 Partial Least Square Regression (PLS-R)

Die Methode der multivariaten Regression wird verwendet, um die Korrelation zwischen Variablen zu beschreiben. In den spektroskopischen Daten zur Bioprozessüberwachung sind Zusammenhänge zwischen den Spektren (X-Variablen) und den zu beobachtenden Analyten bzw. CPPs (y-Variablen) zu beobachten, da die gemessene Absorption oder Fluoreszenz von der Konzentration der Komponenten abhängig ist [41]. Bei der Methode der PLS Regression (Engl. *partial least squares*) geht es darum diese Zusammenhänge herauszufinden und mit einem mathematischen Ausdruck zu beschreiben. Dieser mathematische Ausdruck wird in Form eines Kalibrationsmodells dargestellt. Mit dem Kalibrationsmodell kann die Konzentration eines Analyten (y-Variable) aus dem Spektrum (X-Variable) berechnet werden [41].

Bei der PLS-Regression wird eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf die Referenzwerte (y-Variable) angewandt, ähnlich wie die PCA auf Spektraldaten (X-Variable). Gleichung 3 beschreibt das Ergebnis der PCA auf die Referenzwerte.

$$y = U \cdot q^T + f \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Ähnlich wie die Scorematrix \mathbf{T} bei PCA auf Spektraldaten (X-Variablen), ist die Scorematrix \mathbf{U} in Zusammenhang mit der Anzahl der Faktoren (Hauptkomponente bei PCA). Die Kovarianz zwischen den \mathbf{T} - und \mathbf{U} -Scores wird maximiert. Die Maximierung der Kovarianz ergibt sich durch die Berechnung latenter Variablen. Beide Scorematrices \mathbf{T} und \mathbf{U} haben die gleiche Dimension von $(m \times a)$, und die Loadings \mathbf{q} ist eine Vektormatrix mit der Dimension von $(1 \times a)$. Die y-Variable hat eine Dimension von $(m \times 1)$. Ähnlich wie die Residuenmatrix \mathbf{E} (auch Fehlermatrix) stellt Residuenvektor \mathbf{f} die bei der Rekonstruktion der \mathbf{y} Funktion auftretenden Fehler dar [41].

Die PLS Regression berechnet den Modelloffset $\mathbf{b}_0^{(1 \times 1)}$ und den Regressionskoeffizientenvektor $\mathbf{b}^{(1 \times m)}$. Mit der Gleichung 4 wird aus dem gemessenen Spektrum $\mathbf{x}_i^{(1 \times m)}$ die Konzentration des Analyten \mathbf{y}_i berechnet.

$$y_i = b_0 + x_i^T \cdot b \quad \text{(Gleichung 4)}$$

Das Modell kann mit der Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers (RMSE: Engl. *root mean square error*) als Kriterium bewertet werden. Die Berechnung der RMSE wird im Anhang vorgestellt (8.2 Methoden). In drei Situationen kann die Güte des Modells beurteilt werden. Werden alle Referenzwerte für die Erstellung des Modells verwendet, wird aus der Abweichung zwischen der Referenz und Vorhersage der RMSEC (Engl. *root mean square error of calibration*) berechnet. Der RMSEC kann keine Aussage über die Güte des Modells geben, wenn es sich um die Vorhersage von neuen Messwerten handelt. Ein weiteres Beurteilungskriterium, RMSECV (Engl. *root mean square error of cross validation*), beruht auf der Kreuzvalidierung. Hier wird ein einzelner Referenzwert aus der Erstellung der Kalibration ausgeschlossen. Anschließend wird das Modell für die Vorhersage des ausgeschlossenen Wertes angewandt und hieraus der RMSECV bestimmt.

Um eine genauere Aussage über die Vorhersagefähigkeit des Modells treffen zu können, wird das Modell für die Vorhersage von fremden Datensätze verwendet. Der Fehler wird als RMSEP (Engl. *root mean square error of prediction*) bezeichnet. Der RMSEP erlaubt eine quantitative Aussage über die Güte und Robustheit des Modells.

2.3 Gezielte Induktion der Apoptose in CHO-K1

CHO Zellen dienen seit Jahrzehnten als verlässliches Produktionsvehikel für therapeutische Proteine. Ein Hauptgrund für die Bevorzugung der CHO Zellen in der biopharmazeutischen Produktion ist sowohl die Fähigkeit, komplexe therapeutische Proteine herstellen zu können, als auch die Adaptabilität der Zelllinien in der Bioproduktion [42].

Seit der Entstehung der CHO-K1 Zelllinie in den 1950er Jahren, ist die genetische Stabilität der Zelllinie für die biopharmazeutische Forschung und Produktion vorteilhaft. Seit der Zeit sind viele therapeutische rekombinante Proteine und Biopharmaka, die in der CHO-K1 Zelllinie produziert wurden, zugelassen worden, was sich auf die weiteren Zulassungen von Proteinen aus CHO-Zellen positiv auswirkt [12]. Des Weiteren zeigen die CHO-K1 eine geringe virale Empfänglichkeit, da viele Gene nicht exprimiert werden, die für die Aufnahme der Viren in die Zellen notwendig sind [10, 43].

Die genetische Stabilität der Zelllinie CHO-K1 ist eine wichtige Voraussetzung für diese Arbeit. Durch die genetische Stabilität können die Prozesse miteinander besser verglichen werden und bei gleichbleibenden Prozessumgebungen findet ein vergleichbares Wachstum statt. Die Reproduzierbarkeit der Prozesse wird nicht durch die genetische Instabilität beeinträchtigt, sodass die spektroskopischen Daten aus unterschiedlichen Prozessen miteinander kombiniert und zu Modellen verarbeitet werden können. Des Weiteren ist die Stabilität der CHO-K1 eine wichtige Voraussetzung, um die Fremdeinwirkung auf die Zellen untersuchen zu können.

2.3.1 Apoptose – programmierter Zelltod

Eine besondere Art des Zelltodes stellt die Apoptose dar, auch bekannt als programmierter Zelltod. Die Apoptose ist ein essenzieller biologischer Prozess für die Homöostase von Gewebe und dessen Differenzierung [44, 45]. Apoptose stellt die physiologische Form des Zelltodes dar, während Nekrose die pathologische Form des Zelltodes ist [46]. Der Prozess des programmierten Zelltodes ist bereits genetisch fixiert und er ist mit morphologischen und biochemischen Merkmalen gekennzeichnet. Dazu zählen die nach außen gekehrten

Phosphatidylserine, ein Bestandteil der Zellmembran, die Kondensation des Chromatins, die DNA-Fragmentierung und die Bläschen-Bildung der Zellen [47, 48].

Die Einleitung oder Auslösung der Apoptose wird durch unterschiedliche intrazelluläre oder externe Faktoren ausgelöst. Zu den Faktoren gehören z.B. die Aktivierung membranständiger Rezeptoren, Anomalie von Zell-Zell-Kontakten, Schädigung der DNA oder Störung der Nukleotidsynthese [49–51]. Sobald die Apoptose in den Zellen initiiert ist, wird ein einheitlicher Ablauf bis zum vollständigen Zelltod beobachtet, der zumeist nicht reversibel ist.

Unter dem Lichtmikroskop ist das Schrumpfen der Zellen und die Karyopyknose zu beobachten. Unter dem Begriff Karyopyknose wird das Schrumpfen des Zellkerns und eine Verdichtung des Chromatins beschrieben. Karyopyknose ist ein charakteristisches Anzeichen für das Fortschreiten der Apoptose [50]. Während die apoptotische Zelle schrumpft, bilden sich auf der Zelloberfläche intakte Bläschen aus, die Apoptosekörper (Engl. *apoptotic bodies*) genannt werden. Die Bläschen sind membranumhüllte Zellfragmente, in denen Zytoplasma, Zellorganellen und Zellkernfragmente zu finden sind [52]. Das Bilden der Bläschen ist ein dynamischer Prozess mit Beteiligung des Zytoskeletts der Zellen [53]. Mit dem Fortschreiten der Apoptose werden die Zelle in mehrere Apoptosekörper aufgeteilt und es endet der programmierte Zelltod [52].

Apoptose ist die am meisten vorkommende Ursache für Zelltod in den industriellen Zelllinien [54]. In den CHO Zellen entsteht 80% des Zelltods durch Apoptose [55]. Es ist daher von Interesse, ob und wie die Apoptose überwacht werden kann. Während eines Zellkultivierungsprozesses im Bioreaktor entstehen viele Stressfaktoren, die zu Apoptose führen können. Dazu gehören Faktoren wie Hypoxie, Scherstress, Nährstoffentzug, Temperatur-, pH-Schwankungen, Osmolarität und Proteinefehlfaltung etc. Die Stressfaktoren können die Produktqualität, Prozessvariablen und Prozessbedingungen unterschiedlich beeinflussen [56]. Apoptose führt zum Abbau der viablen Zellen und zu einer Abnahme der Viabilität im Bioreaktor. Verschiedene Methoden werden angewandt, um das Eintreten der Apoptose zu verzögern. Das Verlangsamen des Zelltod-Prozesses steigert die Produktivität [57, 58]. Es gibt zwei Strategien zur Erhöhung der Zellviabilität: 1. Durch die Zufuhr von Medium wird die Prozessumgebung verbessert. 2. Genetische Modifikation der Zelllinie, damit sie weniger anfällig ist für die Stressfaktoren, die zu Apoptose führen [58].

Apoptose dient als ein interessanter Anhaltspunkt für eine Erweiterung der Bioprozessüberwachung mit CHO Zellen. Zusammen mit den vielen überwachten Prozessparametern können so weitere Informationen aus dem Bioprozess extrahiert werden.

2.3.2 Induktion zur Apoptose mit Camptothecin

Bestimmte chemische Reagenzien oder physikalische Außeneinwirkungen können Apoptose induzieren. Im Folgenden werden ein paar Beispiele genannt. Tripchlorolid, ein Antikrebsmittel kann Apoptose in CHO Zellen induzieren, wobei der Mitochondrien-vermittelte apoptotische Signalweg aktiviert wird [59]. Apomorphin, ein starkes Emetikum (Brechmittel) ruft cytotoxische Effekte mit Apoptose-Induktion hervor [60]. Apoptose in CHO Zellen kann beobachtet werden, wenn die Zellen Röntgenstrahlung von 2 bis 20 Gy für über 48 h oder 72 h ausgesetzt werden. Die Induktion der Apoptose beruht auf der Schädigung der DNA [61]. Weitere biochemische/chemische Moleküle wie Caspase Inhibitor [62], Doxorubicin [63], Phosphatidylserin [64] haben ebenfalls in Studien gezeigt, dass sie Apoptose in CHO Zellen induzieren können.

Für diese Arbeit wird Camptothecin (CPT) als Induktionsmittel für Apoptose verwendet. In Abbildung 4 ist die chemische Struktur des CPTs zu sehen. Camptothecin ist ein chiraler Arzneistoff: Die S-Konfiguration ist pharmakologisch aktiv und die R-Konfiguration zeigt keine Wirkung bei der Induktion von Apoptose [65]. Das aromatische System hat ein signifikantes Fluoreszenzspektrum.

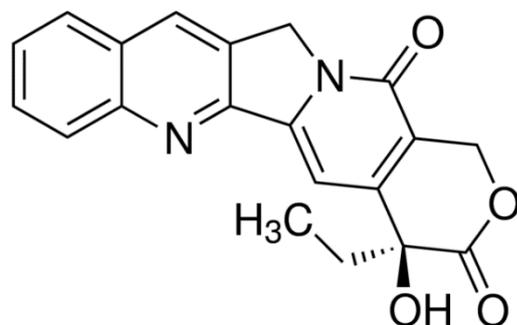


Abbildung 4: Strukturformel (S)-(+)-Camptothecin, Summenformel $C_{20}H_{16}N_2O_4$

Camptothecin ist ein Monoterpenalkaloid und es wurde in den 1950er Jahren aus der Stammrinde des Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert [65]. Camptothecin wurde in diversen klinischen Studien für die Anwendung als Krebsmedikament getestet [94]. Camptothecin ist ein Inhibitor für das Enzym DNA Topoisomerase I. Die DNA Topoisomerase Familie gehört zu den Enzymen, die in lebenswichtigen Prozessen wie Replikation, Transkription, Rekombination der DNA beteiligt sind [66]. Camptothecin verbindet sich mit der DNA-Topoisomerase I und stabilisiert den kovalenten Isomerase-Komplex, wodurch das Zusammenfügen von DNA-Brüchen verhindert wird. Das ist die Wirkungsweise des CPTs als Antikrebsmittel [95]. DNA-Brüche, die durch Außeneinwirkung entstanden sind, sind Anomalien und induzieren Apoptose. In einer Studie mit dem einzelligen eukaryontischen intrazellulären Parasit *Leishmania donovani* wurde gezeigt, dass CPT eine mitochondriale Dysfunktion hervorruft und hierdurch die Apoptose in Gang gesetzt wird [66]. CPT ist ein potentes Induktionsmittel für Apoptose in CHO Zellen. Nur bei bestimmten genetisch manipulierten Stämmen, zeigen die CHO Zellen eine geschwächte Sensitivität gegenüber der CPT induzierten Apoptose [96].

3. CHO-K1 Bioprozessüberwachung

In diesem Kapitel und den zwei folgenden Kapiteln werden sämtliche Ergebnisse aus dieser Arbeit vorgestellt. In diesem Kapitel wird das Ergebnis der Bioprozessüberwachung mit MIR- und 2DF-Spektroskopie vorgestellt. In Kapitel 4 wird das Ergebnis der gezielten Apoptose-Induktion gezeigt. In Kapitel 5 ist das Ergebnis einer vertieften Prozessüberwachung der Zellenzuständen dargestellt.

Die Überwachung des Bioprozesses erfolgt anhand der offline Referenzmesswerte. Zusätzlich wurden spektroskopische MIR- und 2DF-Sonde an den Standardprozess mit CHO-K1 Zellen angebracht und während der gesamten Prozesse Spektraldaten aufgenommen. Durch Kombination der Referenzmesswerte mit den spektralen Daten wurden Kalibrationsmodelle für verschiedene Prozessvariablen erstellt. Die Modelle wurden zur Vorhersage der Prozessvariablen in weiteren Kultivierungsprozessen eingesetzt, um die Qualität der Überwachung zu beurteilen. Basierend auf der online Vorhersage aus den Spektren wurde eine automatisierte Zugabe des Hauptsubstrats Glucose realisiert. Die ganzheitliche Überwachung am Prozess bestand somit aus der online Vorhersage der Prozessvariablen und Prozessregelung anhand der In-Prozess Glucose-Zufütterung.

3.1 CHO-K1 Kultivierungsprozess im 15 L Bioreaktor

Der Standardprozess mit CHO-K1 Zellen im 15 L Bioreaktor wurde achtmal durchgeführt, um eine Datengrundlagen einer ganzheitlichen Prozessüberwachung für den Standardprozess zu schaffen. Fünf Prozessvariablen, Glucose, Laktat und L-Glutamin, die Gesamtzellzahl (TCC) und die Lebendzellzahl (VCC) wurden umfassend beobachtet. Die Kalibrationsmodelle basieren auf den Spektraldaten von K01 bis K07 und K07A. Der Prozess K07A war nach 36 Stunden kontaminiert und abgebrochen. Die Beteiligung des Prozesses K07A in Modellerstellung soll die Vielfältigkeit der Daten bereichern. Der neunte Bioprozess K08 wird für die Validierung der Vorhersagemodelle verwendet. Die Abbildung 5 bis 9 zeigen die Verläufe der fünf Prozessvariablen in den acht Kultivierungsprozessen (K01 – K08).

Abbildung 5: Verlauf der Glucosekonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)

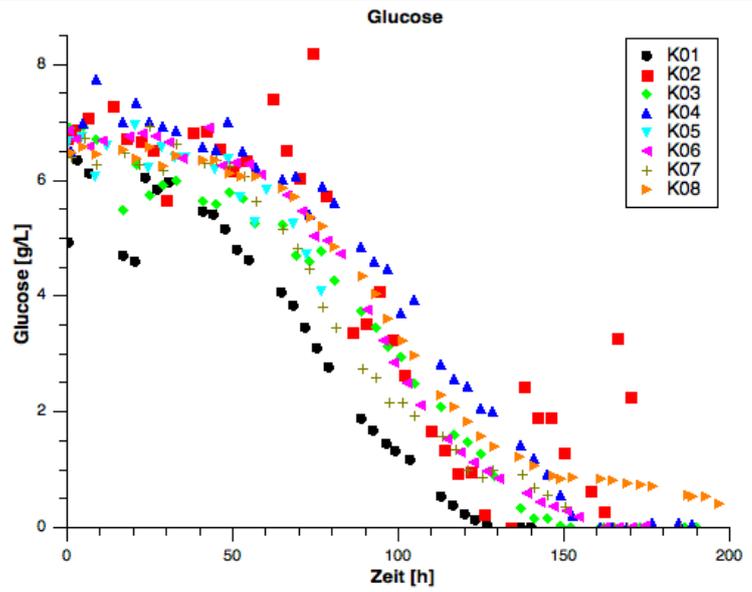


Abbildung 6: Verlauf der Laktatkonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)

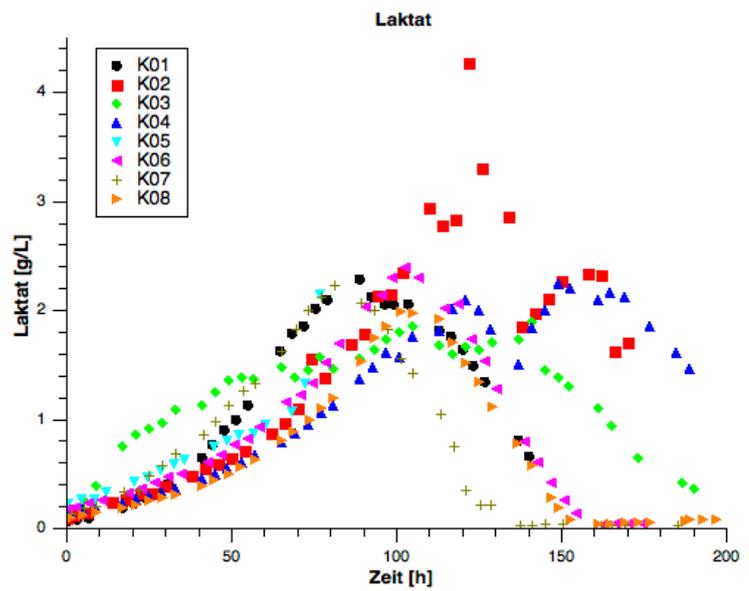


Abbildung 7: Verlauf der L-Glutaminkonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)

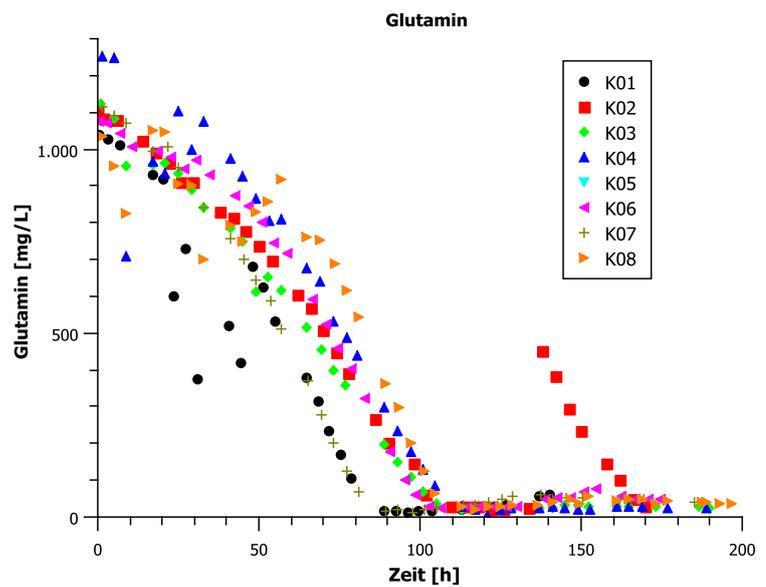


Abbildung 8: Verlauf der Gesamtzellzahl TCC der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)

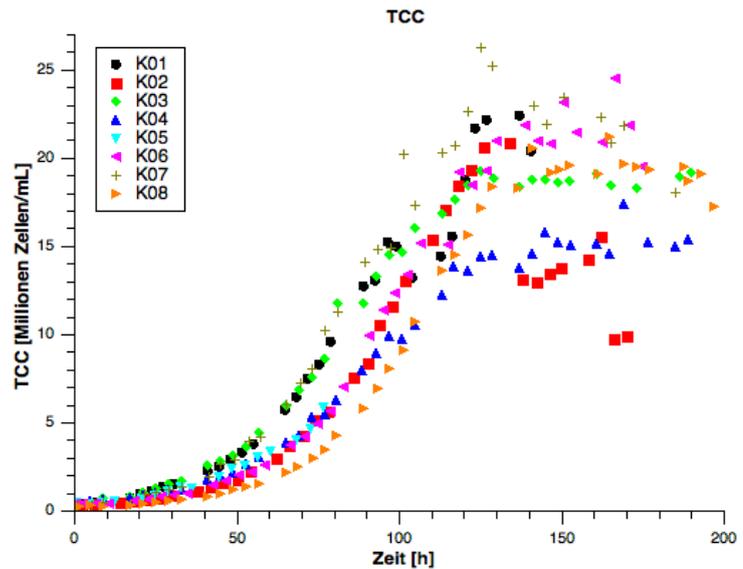
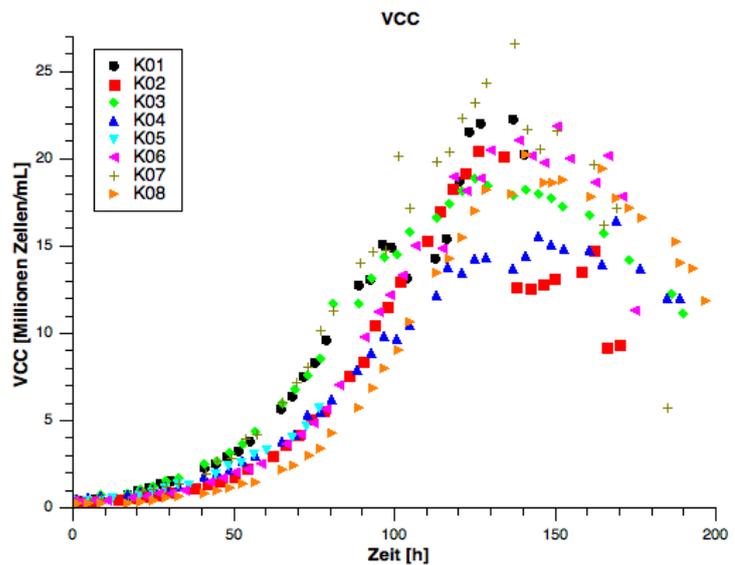


Abbildung 9: Verlauf der Lebendzellzahl VCC der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)



Die Verläufe der jeweiligen Prozessvariablen in allen acht Kultivierungsprozessen sind ähnlich, aber nicht identisch. Sechs Prozesse wurden als Batch-Kultivierung durchgeführt: K01, K03, K04, K05, K06 und K07. Die Bioprozesse K05 und K07A wurde aufgrund von Kontaminationen nach 76,5 h bzw. 36 h abgebrochen. Aufgrund der Kontamination wurde die Messung der Glutaminkonzentration bei K05 nicht durchgeführt. Die Kultivierungsprozesse K02 und K08 wurden als Fed-Batch-Prozesse durchgeführt. Beim Kultivierungsprozess K02 wurden 2 L vom Bioreaktorinhalt zum Zeitpunkt 137 h entfernt und 2 L frisches Medium mit 100 mL einer 200 mM L-Glutamin Lösung in den Bioreaktor

dazugegeben. Zum Zeitpunkt 165 h wurden erneut 2 L aus dem Bioreaktor entfernt und durch 2 L frisches Medium ersetzt.

Bei den Batchprozessen nahm die Konzentration der beiden Substrate Glucose und L-Glutamin ab. Im Vergleich zu Glucose, wurde L-Glutamin schneller komplett verbraucht. Laktat wurde durch den Zellstoffwechsel zuerst gebildet und dann als alternatives Substrat abgebaut, somit ist eine maximale Laktatkonzentration zu beobachten. Da Laktat durch die Glutaminolyse aus L-Glutamin aufgebaut wird, ist die Akkumulation des Laktats mit dem Abbau des Glutamins gekoppelt [67]. Der Zeitpunkt der Ausschöpfung des L-Glutamins bei jeder Batch-Kultivierung ist gleich dem Zeitpunkt der maximalen Laktat-Konzentration.

Bis die stationäre Phase und Absterbephase des Zellwachstums erreicht werden, verlaufen die Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl gleichmäßig, da die Viabilität bei weit über 99% liegt. Die Verläufe der Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl trennten sich sobald der Zelltod anfängt einzutreten. Eine höhere Zellzahl bei der Inokulation des Bioreaktors führte zu einem steileren Verlauf der Zellzahlentwicklung während der exponentiellen Wachstumsphase. Diesen Verlauf zeigen die beiden Bioprozesse K01 und K03.

Beim Fed-Batch-Kultivierungsprozess K02 sind die zwei Zeitpunkte zum Austausch des Mediums gut anhand der Glucosekonzentration zu erkennen (Zeitpunkt ca. 140 h und ca. 170 h). In den frischen Medien ist eine Glucosekonzentration von ca. 6,7 g/L vorhanden, und die Zufütterung ist deutlich durch zwei Sprünge im Verlauf der Glucosekonzentration zu sehen. Die Zufütterung von L-Glutamin bei K02 ist ebenfalls gut in Abbildung 7 zu erkennen. Bei den anderen drei Prozessvariablen ist ein Verdünnungseffekt an den beiden Zeitpunkten zu sehen. Beim Fed-Batch-Kultivierungsprozess K08 ist die automatisierte Zugabe von Glucose auf dem Graph (Abbildung 5) zu sehen, sowie dass die gemessenen Glucose-Konzentrationen am Ende des Prozesses über 0,4 g/L betragen. Die automatisierte Glucose-Zugabe wird im späteren Abschnitt vorgestellt.

3.2 Multivariate Datenauswertung (MIR- und 2DF-Spektren)

An den vorgestellten CHO-K1-Kultivierungsprozessen wurden MIR- und 2DF-Spektraldaten aufgenommen, um Vorhersagemodelle aus acht Prozessen (K01, K02, K03,

K04, K05, K06, K07 und K07A) zu erstellen. Alle 3 - 4 Minuten wurde sowohl ein MIR-Spektrum als auch ein 2DF-Spektrum vom laufenden Prozess aufgenommen. Die MIR-Spektren wurden für die Erstellung der Vorhersagemodelle der Glucose, Laktat und L-Glutamin Konzentrationen verwendet. Die Modelle für die Zellzahlen (Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl) basieren auf 2DF-Spektren. Die Datenbasis besteht aus den Spektren, bei denen zum Aufnahmezeitpunkt eine Offline-Analyse von den fünf CPPs vorhanden ist. Jeder Kultivierungsprozess lieferte 30 – 40 MIR- und 2DF-Spektren für die Modellerstellung. In der Tabelle 2 wird die genaue Anzahl der Spektren angegeben. Insgesamt wurden für die Glucose 232, für Laktat 152 und für L-Glutamin 211 MIR Spektren in der Modellerstellung verwendet. Für die Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl wurden 180 2DF Spektren analysiert.

Tabelle 2: Anzahl der Spektren für die Vorhersagemodelle

		Anzahl der im Modell verwendeten Spektren								Insgesamt
		K01	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K07A	
MIR- Modelle	Glucose	30	38	36	39	17	37	35	0	232
	Laktat	30	38	36	39	0	0	0	9	152
	L-Glutamin	30	37	34	38	0	37	35	0	211
2DF- Modelle	TCC & VCC	30	29	31	38	17	35	0	0	180

Um eine höhere Vergleichbarkeit der Daten aus den verschiedenen Prozessen zu ermöglichen, wurden die Spektraldaten vorverarbeitet, z.B. durch Mittelwertzentrierung. Die Datenvorverarbeitung dient dazu, dass die Unterschiede in den Medienchargen ausgeglichen werden bzw. der Alterungsprozess der Spektrometer berücksichtigt wird. Des Weiteren können Verschiebungen innerhalb eines Kultivierungsprozesses behoben werden, die zum Beispiel durch leichte Temperaturschwankungen oder pH Änderungen zustande kommen.

Zum Start jedes Kultivierungsprozesses wurde jeweils ein MIR- und 2DF-Spektrum vom reinen Medium aufgenommen. Die erste Verarbeitung der Rohdaten, sowohl bei MIR- als auch bei 2DF-Spektren bestand darin, dass das Mediumspektrum des jeweiligen Bioprozesses von allen anderen Spektren abgezogen wurde.

Bei den MIR-Spektren wurde außerdem noch eine Mittelwertkorrektur genutzt. In Abbildung 10 wird der Effekt der Mittelwertkorrektur anhand von drei Spektren des Kultivierungsprozesses K07 gezeigt. Nach der Mittelwertzentrierung werden die Spektren um die X-Achse zentriert. Der Verlauf der Spektren und die Peakhöhen werden ohne Informationsverlust beibehalten. Die Vorverarbeitung hilft dabei, dass die wesentlichen Informationen hervorgehoben werden können.

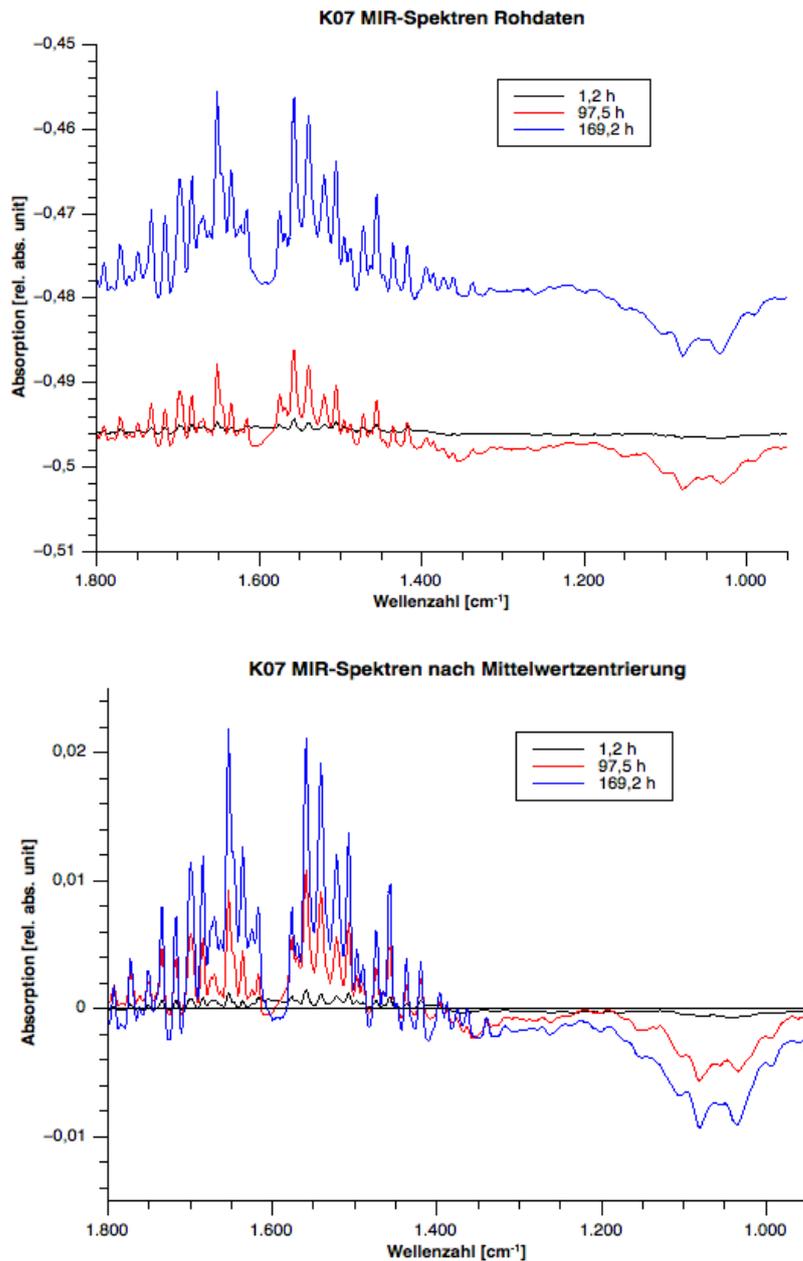


Abbildung 10: Beispiel einer Mittelwertkorrektur anhand von drei MIR Spektren (vorher und nachher), durch die Mittelwertzentrierung bleiben die Peakhöhe-Information ohne Verlust für weitere Evaluierung.

Für die 2D Fluoreszenz-Spektren wurde keine weitere Vorverarbeitungsmethoden benötigt. Die vorbereiteten MIR- und 2DF-Spektren wurden anschließend mit den Methoden aus der multivariaten Datenanalyse untersucht, um die Korrelation zwischen den spektralen Informationen und den offline gemessenen Prozessvariablen zu finden. Diese Korrelation wurde in Vorhersagemodellen dargestellt.

3.3 Erstellung von Kalibrationsmodellen auf Basis von MIR-Spektren

Während eines Kultivierungsprozesses verändert sich die biochemische Umgebung im Bioreaktor stetig. Die Konzentrationen an niedermolekularen Prozessvariablen verändern sich dementsprechend. Diese Gegebenheiten rufen auch Veränderungen an den MIR-Spektren hervor, in den wichtige spektrale Informationen zu Glucose, Laktat und L-Glutamin aus dem Prozess enthalten sind. Jeder Analyt hat seinen besonderen *Fingerprint* im MIR-Spektrum. Die Spektralregionen der *Fingerprints* beinhalten Informationen zu dem jeweiligen Analyten und diese Informationen werden mit multivariaten datenanalytischen Methoden extrahiert, um die Konzentrationen der Analyten vorherzusagen.

In Abbildung 11 sind die MIR-Spektren von den drei niedermolekularen Prozessvariablen dargestellt. Der gemessene Bereich erstreckt sich von 1800 cm^{-1} bis 950 cm^{-1} . Die Region von 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} des Glucose-MIR-Spektrums ist im Vergleich flacher als der Rest. Dagegen besitzt der vorher genannte Bereich beim Glutamin-MIR-Spektrum mehrere Peaks und somit beinhaltet diese Region mehr spektrale Informationen für L-Glutamin. Aufgrund dieser Beobachtung werden zwei unterschiedliche Spektralbereiche für die Modelle von Glucose und L-Glutamin verwendet. Das ist die Region von 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} für das Glutamin-Modell und die Region von 1200 cm^{-1} bis 950 cm^{-1} für das Glucose-Modell. Des Weiteren waren die Konzentrationsverläufe von Glucose und L-Glutamin ähnlich in allen Batch-Prozessen, da die Konzentrationen während eines Kultivierungsprozesses stetig sanken. Um die lineare Unabhängigkeit der Modelle zu gewährleisten, ist die Verwendung getrennter Spektralregionen sinnvoll. Somit haben die Modelle zur Glucose-Vorhersage und Glutamin-Vorhersage unterschiedliche Datenbasen.

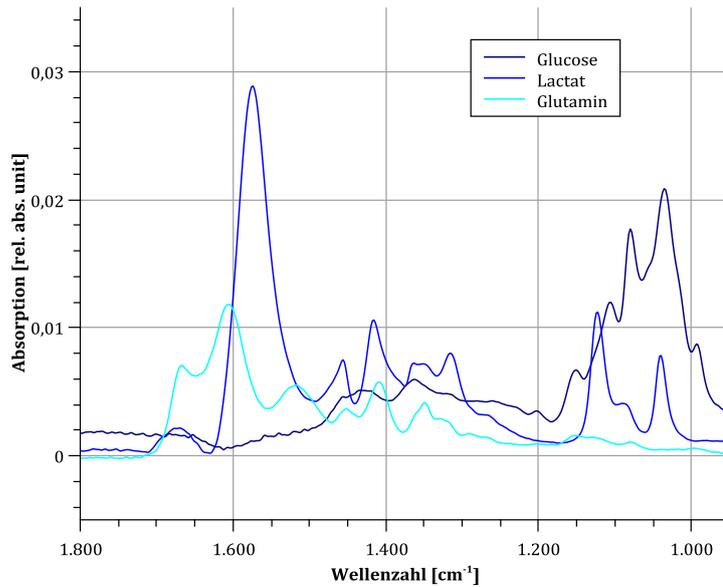


Abbildung 11: MIR-Spektren von drei niedermolekularen CPPs (Glucose, Laktat und Glutamin) am Standardprozess (zur Verfügung gestellt von Dr. Marko Sandor)

Beim Reinspektrum von Laktat hingegen, sind im Vergleich zu den Daten von Glucose und L-Glutamin in der ganzen Spektralregion Peaks zu sehen. Die Region von 1200 cm⁻¹ bis 950 cm⁻¹ wurde für die Modellerstellung von Laktat ausgesucht, um die Korrelation zu Glutamin auszuschließen.

Nachdem die MIR-Spektren mit der im Kapitel 8.2.5 (Mittelwertkorrektur) beschriebenen Methode vorbearbeitet wurden, wurden eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und PLS-Kalibrationsmodelle für alle drei Analyten erstellt. Mit Hilfe der PLS-Kalibrationsmodelle wird die Beziehung zwischen Spektren und den Konzentrationen der Analyten dargestellt. Die PLS-Kalibrationsmodelle sind mathematische Beschreibungen, mit denen die spektralen Informationen in die Konzentration umgerechnet werden. Auf Basis von acht Kultivierungsprozessen sind genau 232 Offline-Messungen und dazugehörige MIR-Spektren vorhanden. Der große Datensatz bei der Modellerstellung hat den Vorteil, dass die Kalibrationsmodelle genügende *Trainings* bekommen, um die Stabilität der Modelle und die Qualität der Kalibrationsmodelle zu gewährleisten [7].

Die Ergebnisse von den drei Kalibrationsmodellen werden in Abbildung 12 gezeigt. Die Vorhersagekonzentrationen des jeweiligen Analyten werden gegen die Referenzwerte aufgetragen. Das PLS-Kalibrationsmodell für Glucose benötigt drei Hauptkomponenten (3 PCs; Engl. *principal components*), um die mathematische Beziehung zwischen den Spektren und der Glucosekonzentration gut zu beschreiben. Die ersten drei

Hauptkomponenten beschreiben 98,1 % der gesamten Varianz im Modell. Der RMSEC (Engl. *root mean square error of calibration*) vom Glucose-Modell beträgt 0,39 g/L und entspricht ca. 10 % des Mittelwertes der Glucosekonzentration während eines Kultivierungsprozesses. Das Laktat-Kalibrationsmodell braucht fünf Hauptkomponenten, um 98,4 % der gesamten Varianzen zu beschreiben. Dabei beträgt der RMSEC des Laktatmodells 0,094 g/L und dies entspricht ca. 7 % des Mittelwertes der Laktatkonzentration während eines Kultivierungsprozesses.

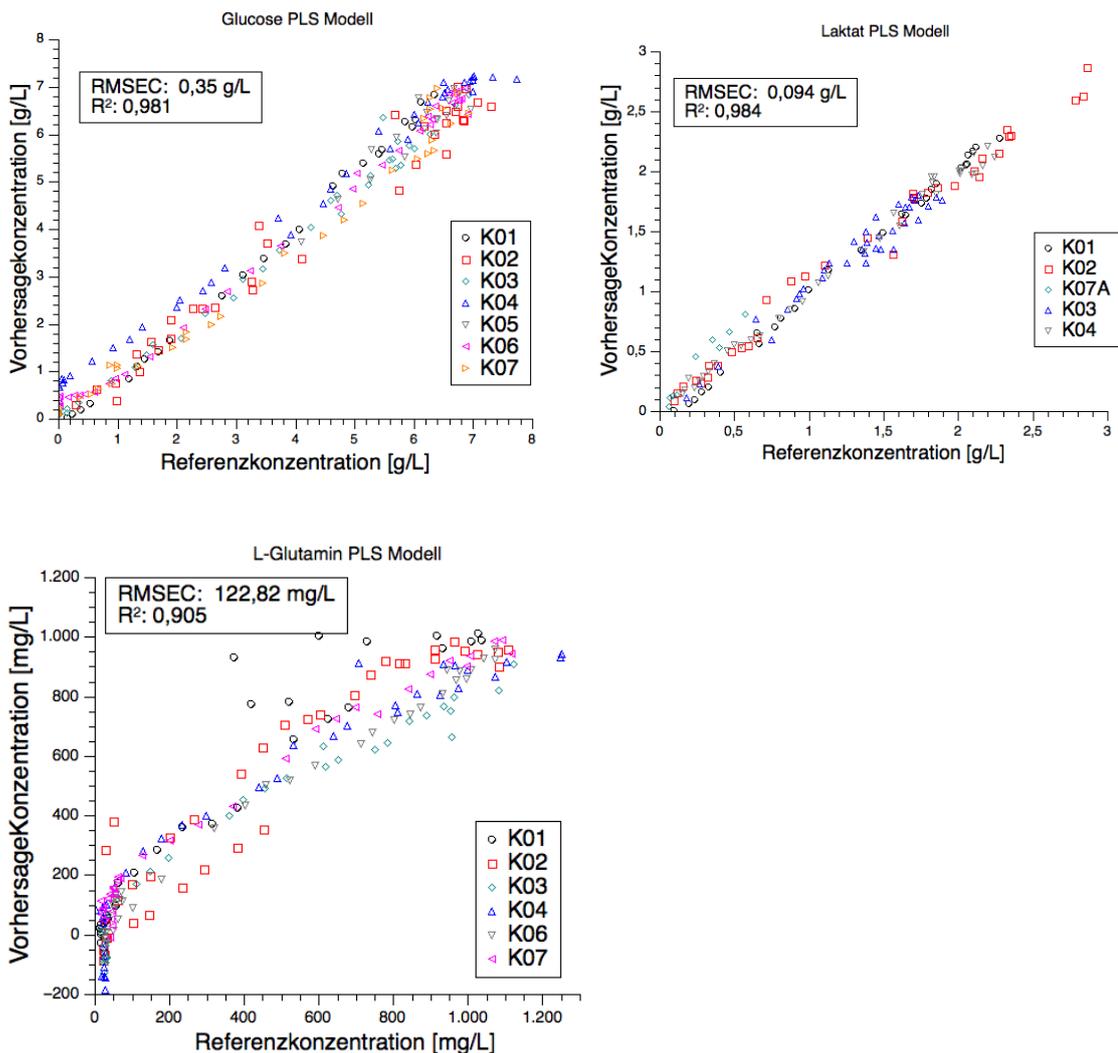


Abbildung 12: PLS-Kalibrationsmodelle von Glucose, Laktat und L-Glutamin (Referenz- und Vorhersage-Konzentration)

Das L-Glutamin-Kalibrationsmodell benötigt fünf Hauptkomponenten, um 90,5% der gesamten Varianzen zu beschreiben (siehe Abbildung 12 - Glutamin). Dabei beträgt der

RMSEC des Glutaminmodells 122,82 mg/L und dies entspricht ca. 10 % der höchsten Glutaminkonzentration während eines Kultivierungsprozesses. Es ist gut zu erkennen, dass das Kalibrationsmodell für L-Glutamin weniger optimal ist als die Modelle von Glucose und Laktat, da die Daten stärker streuen. Im Konzentrationsbereich kleiner als 50 mg/L zeigt das Kalibrationsmodell keine hohe Präzision. Der prozentuale Fehler RMSEC beim Glutamin-Modell ist im Vergleich größer als bei den anderen zwei Kalibrationsmodellen.

Um weitere Aussagen über die Güte der Kalibrationsmodelle zu machen, werden die Regressionskoeffizienten der Modelle näher untersucht. Der Regressionskoeffizient gibt an, wie viel Einfluss die einzelne Wellenzahl auf das Modell nimmt. Die Regressionskoeffizienten, die sich deutlich von null unterscheiden, sind entscheidend für die Modellerstellung und nehmen dabei den größten Einfluss. In Abbildung 11 wird gezeigt, dass Glucose, Laktat und L-Glutamin unterschiedliche *Footprints* in den MIR-Spektren haben. Die Regressionskoeffizienten des Modells wurden mit dem MIR-Reinstoffspektrum der jeweiligen CPPs verglichen. Dabei wurde das Augenmerk auf den Vergleich zwischen *Footprints* des Reinstoffspektrums und den Bereichen der Regressionskoeffizienten gelegt, wo die meisten Einflüsse auf das Modell auftreten. Durch den Vergleich soll zu erkennen sein, ob die Modelle hauptsächlich die jeweiligen Zielanalyten detektieren können und ob die größten Einflüsse in den Modellen durch die Zielanalyten verursacht werden.

In Abbildung 13, Abbildung 14 und Abbildung 15 werden die Vergleiche der Regressionskoeffizienten des jeweiligen Modells mit dem dazugehörigen Reinstoffspektrum gezeigt.

Das Reinstoffspektrum von Glucose hat zwei deutliche Peaks bei 1035 cm^{-1} und 1080 cm^{-1} (Abbildung 13). Beim Regressionskoeffizienten sind Peaks bei den gleichen Wellenzahlen zu sehen. Das bedeutet, dass in dieser Spektralregion die meisten Einflüsse auf das Modell von Glucose einwirken. Im Spektralbereich der Peaks führt eine höhere gemessene Absorption zu einer höheren Vorhersagekonzentration. Des Weiteren ist nur ein kleiner Peak auf dem Reinstoffspektrum von Glucose in der Region zwischen 1170 cm^{-1} und 1140 cm^{-1} zu sehen. Auf diesen Spektralbereich nimmt das Modell großen Einfluss. Das kann durch die hohe Komplexität der biologischen Umgebung in einem Bioprozess erklärt werden. Um die Wellenzahl 1120 cm^{-1} ist ein lokales Minimum bei den Regressionskoeffizienten zu sehen, obwohl beim Reinstoffspektrum von Glucose kein

lokales Minimum zu sehen ist. Dieses Minimum kommt zu Stande, da bei dieser Wellenzahl Laktat detektiert wird.

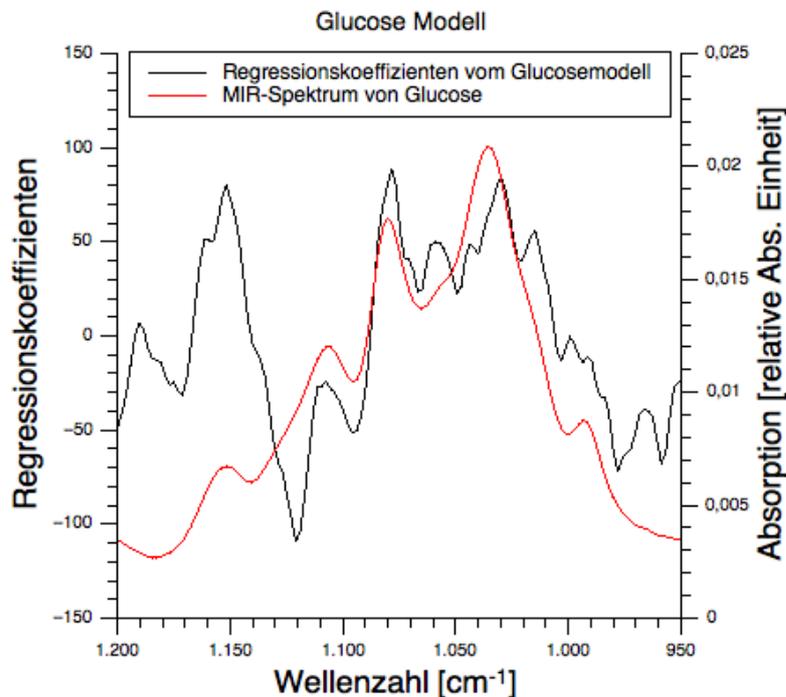


Abbildung 13: Glucose-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Glucose-Reinstoffspektrum (MIR)

In Abbildung 14 ist ein hoher Peak beim Laktat-Reinstoffspektrum zu sehen. Um die Absorption, die durch die Anwesenheit von Laktat entsteht, zu kompensieren, hat das Glucose-Modell diesen Einfluss berücksichtigt. Beim Reinstoffspektrum von Laktat sind zwei deutliche Peaks bei den Wellenzahlen 1120 cm^{-1} und 1040 cm^{-1} zu detektieren. Beim Verlauf der Regressionskoeffizienten sind zwei vergleichbare Peaks, bei denselben Wellenzahlen zu sehen. Dies zeigt, dass das Laktatmodell hauptsächlich die Anwesenheit des Laktats beschreibt. Das Modell kann die Laktatkonzentration gut vorhersagen.

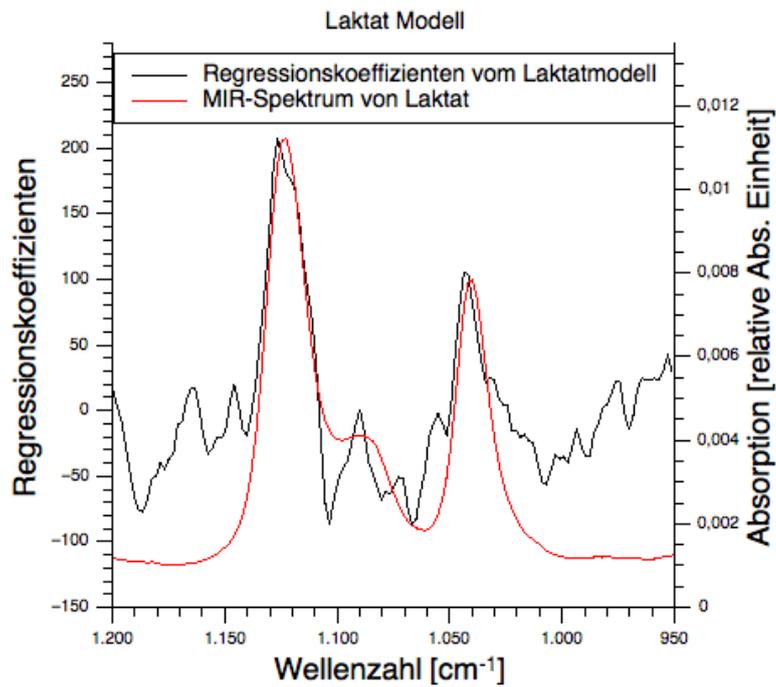


Abbildung 14: Laktat-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Laktat-Reinstoffspektrum (MIR)

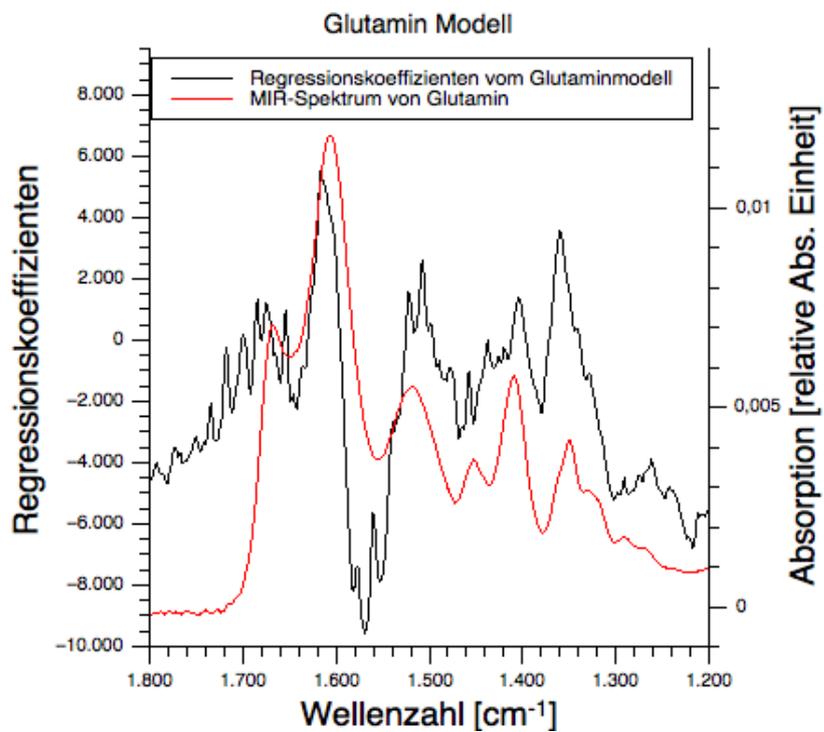


Abbildung 15: Glutamin-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Glutamin-Reinstoffspektrum (MIR)

Der Vergleich vom Glutamin-Reinstoffspektrum und dem Verlauf des Regressionskoeffizienten zeigt, dass es in den Regressionskoeffizienten mehr Rauschen gibt (Abbildung 15). Dieses Rauschen der Regressionskoeffizienten wird die Vorhersage beeinflussen. Die charakteristischen Peaks und Täler sind auf beiden Kurven gut zu erkennen. Die Peaks vom Reinstoffspektrum um die Wellenzahlen 1350 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} sind deutlich im Regressionskoeffizienten zu erkennen. Bei der Wellenzahl 1775 cm^{-1} ist eine kleine „Schulter“ in beiden Kurven zu sehen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Regressionskoeffizienten eine bessere Vorhersage bei Glutaminkonzentrationen größer als 50 mg/L liefern. Des Weiteren ist das Verhältnis zwischen den Höhen der Peaks auffällig. Beim Verlauf der Regressionskoeffizienten ist ein tiefes Tal kurz vor der Wellenzahl 1600 cm^{-1} zu sehen, und nach der Wellenzahl von 1600 cm^{-1} ist der Peak im Vergleich zum Reinstoffspektrum nicht proportional. Dies kann durch das Reinstoffspektrum von Laktat erklärt werden. Abbildung 15 zeigt einen hohen Peak im Laktat-Reinstoffspektrum bei der Wellenzahl 1600 cm^{-1} . Die Verläufe der Laktatkonzentration und Glutaminkonzentration sind gegensätzlich und somit wirkt das Kalibrationsmodell für Glutamin in diesem Bereich entgegen.

Die Erstellung der drei MIR-basierten Kalibrationsmodelle war erfolgreich. Die mathematischen Beziehungen zwischen Spektren und Konzentrationen können durch die PLS-Kalibrationsmodelle beschrieben werden. Bei der Untersuchung der Regressionskoeffizienten der Modelle wird gezeigt, dass die Modelle die jeweiligen CPPs detektieren können. Um die Überprüfung der Modellqualität zu vervollständigen, wurden die Modelle bei einem unabhängigen Kultivierungsprozess eingesetzt. Die Vorhersagenwerte wurden mit den Referenzwerten verglichen. Die Ergebnisse werden im Abschnitt 3.5 gezeigt, nachdem die 2DF-Spektren-basierten Modelle vorgestellt wurden.

3.4 Erstellung von Kalibrationsmodellen auf Basis von 2DF-Spektren

Während die MIR-spektroskopische Sonde die niedermolekularen CPPs im Prozess überwachte, wurde eine 2DF-spektroskopische Sonde verwendet, um die zwei zellphysiologischen Größen, TCC und VCC, zu überwachen. Die Zellzahlen veränderten

sich während des Bioprozesses rasant und diese Veränderung an Zellzahlen wurde mit 2DF-Spektren aufgezeichnet. In den 2DF-Spektren werden Informationen zu Proteinen, NADH, Vitaminen und Cofaktoren widerspiegelt [37]. Außerdem wird das Streulichtverhalten während eines Bioprozesses mit der 2DF-spektroskopischen Sonde erfasst. Diese Informationen werden zusammengeführt, um die Zellzahlen zu überwachen.

Wie bei der Modellerstellung mit MIR-Spektren, wurden die Kalibrationsmodelle mit vorverarbeiteten 2DF-Spektren erstellt. In Abbildung 16 werden die Ergebnisse der Kalibrationsmodelle von TCC und VCC gezeigt. Das Kalibrationsmodell von TCC braucht eine Hauptkomponente, um die mathematische Beziehung zwischen den 2DF-Spektren und die Gesamtzellzahl zu beschreiben. Die erste Hauptkomponente beschreibt 91,3 % der gesamten Varianz in den Spektren. Der RMSEC des TCC-Modells beträgt 2,12 Millionen Zellen/mL. Dagegen braucht das VCC-Modell sieben Hauptkomponenten, um 97,8 % der gesamten Varianz zu beschreiben. Der RMSEC des VCC-Modells beträgt 1,01 Millionen Zellen/mL. Der große Unterschied der Anzahlen an Hauptkomponenten bei den Modellen ist notwendig, um Modelle für TCC und VCC auseinander zu halten. Bis zur stationären Phase verlaufen beide Größen nahezu identisch, erst danach trennt sich der Verlauf auf, wobei die dominierenden optischen Eigenschaften durch die Gesamtzellzahl hervorgerufen werden. Das Absinken der viablen Zellzahl kann daher nur aus wenigen Datenpunkten und den Veränderungen in den untergeordneten spektralen Bereichen bestimmt werden, was zu einer signifikanten Erhöhung der benötigten Hauptkomponenten führt.

Der Bereich mit den kleinen Zellzahlen beim TCC-Modell zeigt eine geringere lineare Korrelation zwischen der Vorhersage und Referenz. Der Kalibrationsfehler beim TCC-Modell beträgt ca. 15 % der durchschnittlichen Gesamtzellzahl während eines Kultivierungsprozesses. Der Kalibrationsfehler beim VCC-Modell (1,01 Millionen Zellen/mL) liegt unter dem Fehler des TCC-Modells (2.12 Millionen Zellen/mL). Die statistischen Werte des VCC-Kalibrationsmodells sind besser als die für das TCC-Modell. Die finale Überprüfung der Qualität der TCC- und VCC-Modelle wird im nächsten Abschnitt zusammen mit den MIR-Spektren-basierten Modellen anhand eines unabhängigen Kultivierungsprozess K08 gezeigt.

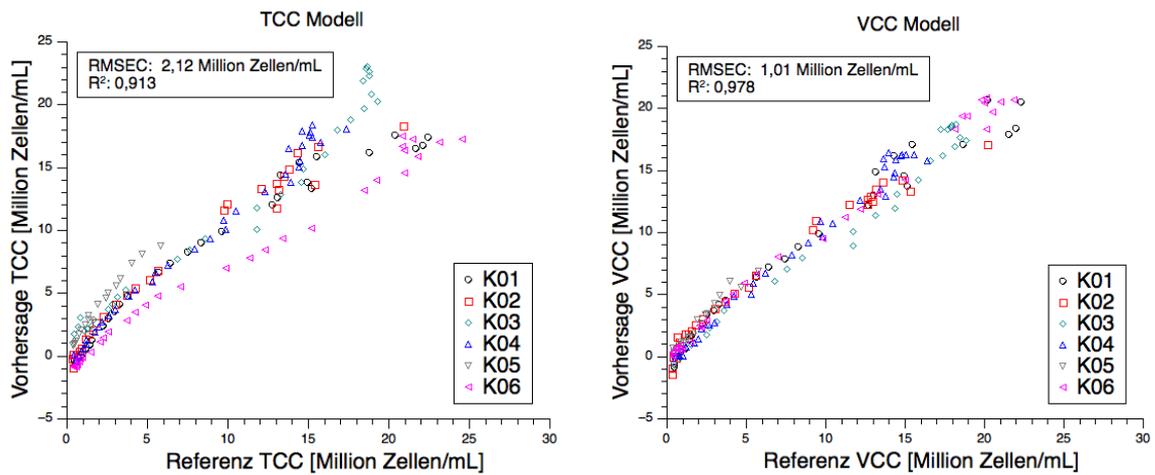


Abbildung 16: PLS-Kalibrationsmodelle von TCC und VCC (Referenz und Vorhersage)

Abbildung 17 stellt den Vergleich der Regressionskoeffizienten der beiden Modelle für die Zellzahlen dar. Der Verlauf der Regressionskoeffizienten von 150 Wellenlängenkombinationen (2DF Spektren) bei dem TCC-Modell ist deutlich flacher und glatter als das VCC-Modell. Es ist zu erkennen, dass die Verläufe der Regressionskoeffizienten bei den beiden Modellen große Unterschiede aufweisen. Bei der Modellerstellung wirkt sich jede einzelne Wellenlängenkombination unterschiedlich aus. Die Modelle können die Vorhersagen von TCC und VCC gut unterscheiden.

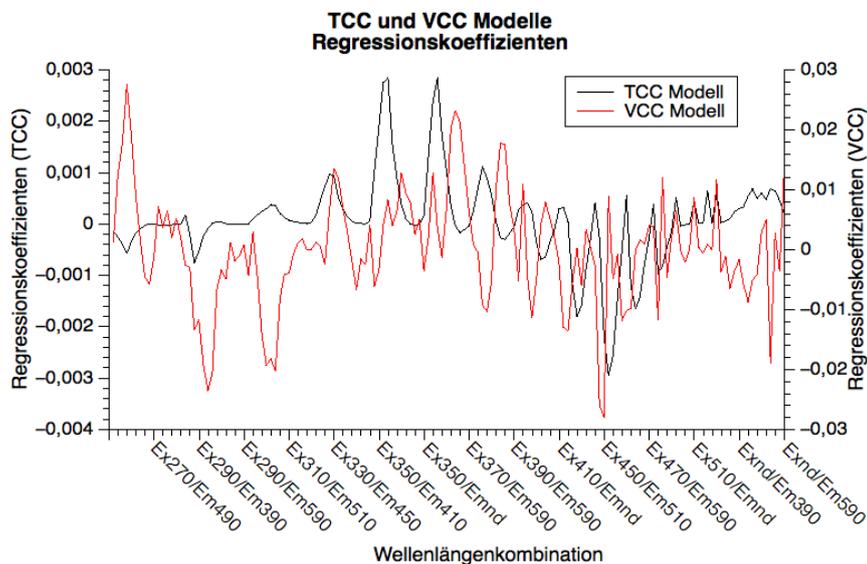


Abbildung 17: Vergleich der Regressionskoeffizienten von TCC- und VCC-Modell.

3.5 Validierung der Modelle durch Vorhersage am K08

Der Kultivierungsprozess K08 wurde als normaler Batch-Prozess bis 150 h durchgeführt. Danach wurde eine automatisierte Glucose-Zufuhr exemplarisch durchgeführt. Die fünf auf MIR- und 2DF-Spektren basierten Modelle wurden dabei für die Vorhersage eingesetzt. Die Qualität der Modelle wird durch die Vorhersage beurteilt. Die Qualität der Modelle ist besser, wenn die Vorhersagen näher an den Referenzwerten liegen. In Abbildung 18 werden die Ergebnisse der Vorhersage aller CPPs während des Kultivierungsprozesses K08 gezeigt. Die linke y-Achse stellt die Einheit der niedermolekularen Analyten dar, während die rechte y-Achse die Zellzahlen darstellt. Für die Glucose- und Laktatkonzentration gilt die Einheit [g/L]. Für die Skalierung für die Glutamin-Konzentration gilt [100 mg/L]. Die durchgezogenen Linien stellen die Verläufe der Vorhersagewerte von den CPPs dar und die Punkte repräsentieren die Referenzwerte der Offline-Analyse.

Das Glucose-Modell war in der Lage, den Verlauf der Glucosekonzentration während der unterschiedlichen Wachstumsphasen vorherzusagen, z.B. die Lag-Phase bis zum Zeitpunkt von 60 h und die schnelle Abnahme der Konzentration während der exponentiellen Wachstumsphase. Der Vorhersage-Fehler RMSEP beträgt 0,23 g/L. Glucosekonzentration ist ein sehr wichtiger Parameter für den Zellstoffwechsel. Verschiedene Prozessführungsstrategien werden basierend auf der Glucosekonzentration entwickelt [68, 69]. Während eines Fed-Batch Zellkultivierungsprozesses oder eines kontinuierlichen Prozesses ist die Zufuhr von Feed-Medium von großer Bedeutung. Glucose ist einer der wichtigsten Bestandteile der Medien. Ein stabiles und gutfunktionierendes Vorhersagemodell von Glucosekonzentration bringt Vorteile für die Prozessüberwachung und Regelung [70].

Beim Laktatmodell liegen die Vorhersagenwerte durchgängig oberhalb der Referenzwerte. Der Vorhersage-Fehler RMSEP beträgt 0,32 g/L; dies entspricht ungefähr 15 % der maximalen Konzentration des Laktats während des Prozesses. Allerdings war das Modell in der Lage, den Wendepunkt von Laktatakkumulation zu Laktatabbau bei 110 h vorherzusagen. Um die Produktivität der CHO-Zellen zu erhöhen, ist es sehr wichtig, den metabolischen Zustand der Zellen in den Laktatabbau zu lenken [71]. Demzufolge ist die Vorhersage dieses Metabolismus-Shifts ein wichtiger Aspekt bei der Überwachung des Zellkultivierungsprozesses mit CHO Zellen. Aus den Datensätzen ist zu erkennen, dass der

Zeitpunkt der Metabolismusveränderung von Laktat mit der Ausschöpfung des Glutamins korreliert. Glutamin ist ein wichtiges Substrat zur Förderung des Zellwachstums [72–74].

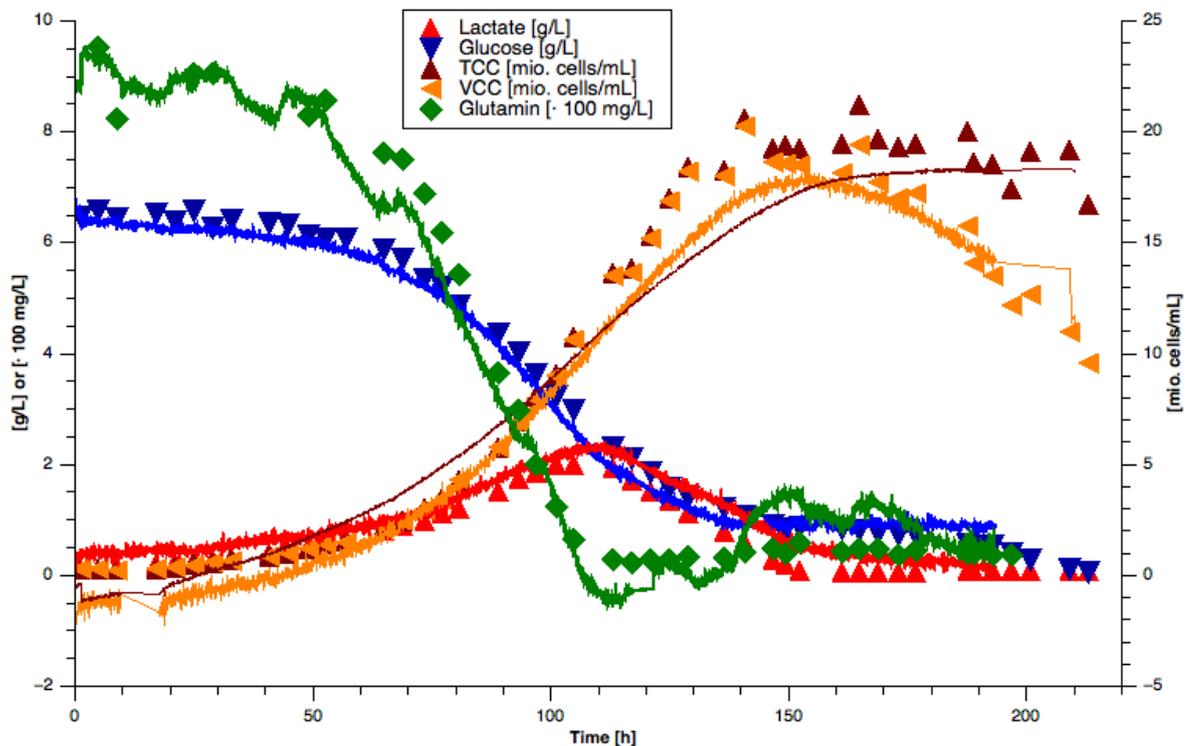


Abbildung 18: Vorhersagen aller fünf CPPs während des Kultivierungsprozesses K08

Das Glutamin-Modell hat im Gegensatz zu den Glucose- und Laktat-Modellen eine schlechtere Vorhersagequalität. Der Vorhersage-Fehler RMSEP beträgt 56,2 mg/L. Die Vorhersage ist in der exponentiellen Wachstumsphase stabiler als in den anderen Phasen des Prozesses, weist aber eine hohe Streuung auf, die durch einen geeigneten Filter etwas reduziert werden könnte. Der Verlauf der Glutamin-Konzentration kann vorhergesagt werden, am Ende des Prozesses zeigt die Vorhersage aber mehr Abweichung zu den Referenzwerten. Die Vorhersagewerte sind am Ende leicht gestiegen, bevor sie wieder gesunken sind. Ein Grund kann die Beeinträchtigung durch die Glucose-Zugabe sein. Am Ende des Prozesses wurde Glucose automatisiert zugegeben und das könnte sich auf die Vorhersage der Glutamin-Konzentration ausgewirkt haben. Das Modell ist auf die Zugabe von Glucose nicht trainiert worden, daher ist eine begrenzte Vorhersagefähigkeit zu beobachten. In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass um die Wellenzahl von 1400 cm^{-1} für

die beide Analyten (Glucose und Glutamin) noch kleine Peaks im Reinstoffspektrum zu sehen sind.

Der RMSEP des TCC Modells beträgt 1,33 Millionen Zellen/mL, ungefähr 7 % der maximalen TCC während des Kultivierungsprozesses von K08. Der RMSEP für das VCC Modell mit 1,96 Millionen Zellen/mL ist im Vergleich höher als für das TCC Modell. Der Vorhersage-Fehler des VCC Modells entspricht ca. 10 % der maximalen Lebendzellzahl VCC. Abbildung 18 zeigt, dass sich die Vorhersagen der beiden Zellzahlen unterscheiden können. Die charakteristischen Verläufe der beiden Zellzahlen können in den Vorhersagen erkannt werden. Die vorhergesagten TCC und VCC steigen zuerst in der Lag-Phase langsam an und während der exponentiellen Wachstumsphase ist der Anstieg der Vorhersagen rasanter. In der stationären Phase sinkt die VCC-Vorhersage, während sich die vorhergesagte TCC am Ende des Kultivierungsprozesses stabilisiert.

Die VCC-Vorhersage (orange Linie in Abbildung 18) ist während des ganzen Prozesses positiv und höher als die Referenz. Der Anfangswert stimmt mit dem Referenzwert überein. Zwischen den Zeitpunkten 100 h und 140 h kann die Lebendzellzahl durch das VCC-Modell in der exponentiellen Wachstumsphase mit nur einem geringen Fehler vorhergesagt werden.

Die Vorhersage für Gesamtzellzahl TCC ist für die ersten 30 h im negativen Bereich, was wider Erwarten und nicht logisch ist, da die Zellzahlen nicht negativ sein können. In der exponentiellen Wachstumsphase ist das TCC-Modell auch in der Lage, die Gesamtzellzahl vorherzusagen. In der stationären Wachstumsphase und Absterbe-Phase kann das TCC-Modell mit einem kleinen Fehler von weniger als 1,5 Millionen Zellen/mL die Gesamtzellzahl vorhersagen. Die Qualität des TCC-Modells ist laut dem RMSEP besser als das VCC-Modell. Des Weiteren ist die Vorhersage des VCC-Wertes höher als der TCC-Werte. Diese kann nicht der Realität entsprechen, da die Gesamtzellzahl stets größer oder gleich der Lebendzellzahl sein muss. Dieses Prozesswissen geht in die datengetriebene Modellbildung nicht ein, daher ist die Vorhersage nicht in der Lage diese Abhängigkeit zu berücksichtigen. Eine alternative Methode könnte die Betrachtung von TCC und Viabilität sein, und daraus ergibt sich VCC. Durchaus waren die beiden Zellzahlenmodelle in der Lage, während der exponentiellen Wachstumsphase die beiden Zellzahlen mit geringem Fehler vorherzusagen.

Die exponentielle Wachstumsphase bildet den wichtigsten Prozessabschnitt, da sich die chemische und biologische Prozessumgebung in diesem Zeitraum schnell verändert. Es ist von Vorteil, wenn die Modelle während der exponentiellen Wachstumsphase die Prozessvariable gut vorhersagen können. Die Modelle der niedermolekularen Analyten konnten diesen wichtigen Bedarf abdecken. Die Modelle der Zellzahlen haben im Großen und Ganzen die Referenzwerte vorhersagen können.

3.6 Automatisierte Glucose-Zugaben bei Prozess K08

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass die spektroskopischen Sonden am Standardprozess in der Lage waren, wichtige CPPs aus dem Prozess zu beschreiben und vorherzusagen. Die Überwachung mit spektroskopischen Sonden war erfolgreich.

Insbesondere die online Glucose-Vorhersage erfüllte die Voraussetzungen, um hierauf basierend eine Prozessregelung von den Feeds zu ermöglichen. In diesem Abschnitt wird anhand eines Beispiels die Regelung eines Standardprozesses mit Hilfe der MIR-spektroskopischen Sonde vorgestellt. Am Ende des Kultivierungsprozesses K08, ab ca. 150 h wurde der Prozess mit einer automatisierten Glucose-Zufuhr weitergeführt. Aus der Glucose-Vorhersage wurde alle drei Minuten ein Vorhersagewert ermittelt. Sobald der Vorhersagewert unterhalb von 0,5 g/L lag, wurden 10 mL einer Glucose-Lösung in den Bioreaktor gepumpt.

In

Abbildung 19 ist das Ergebnis der automatisierten Glucose-Zugabe dargestellt. Die rote Kurve beschreibt den Verlauf der online Vorhersage und die schwarzen Punkte stellen die offline gemessene Glucosekonzentration dar. Die Glucose-Konzentration wurde durch die automatisierte Zugabe in kleinen Portionen erhöht. Nach ungefähr 150 h wurde das erste Mal Glucose-Feed-Lösung in den Bioreaktor gepumpt, da hier erstmals die Vorhersage unter den Schwellenwert von 0,5 g/L gesunken war. Im weiteren Verlauf pendelt sich die Vorhersage zwischen 0,5 und 0,6 g/L ein. Es ist gut zu erkennen, dass bis zum Ende des Prozesses insgesamt zehnmal Glucose-Lösung dazugegeben wurde.

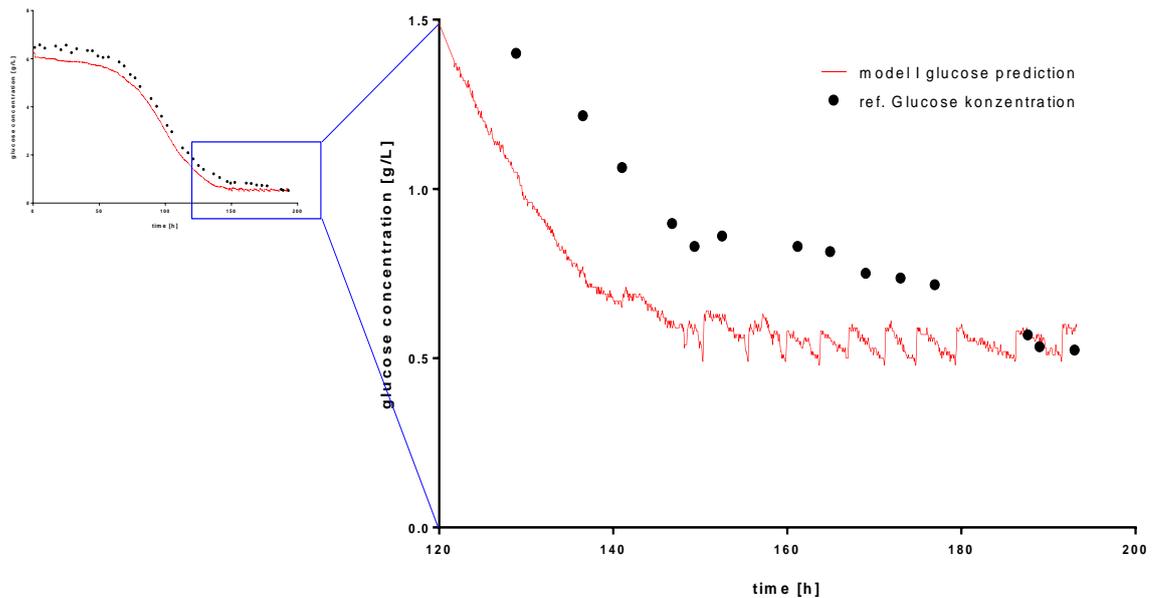


Abbildung 19: Automatisierte Glucose-Zugabe beim Kultivierungsprozess K08

Die offline Glucose-Messungen wurden etwa alle 3 – 4 h durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt, dass die online Vorhersage zumeist niedriger als die offline gemessenen Referenzwerte liegen. Trotz der niedriger ausgefallenen Vorhersagewerten ist das Modell in der Lage, die automatisierte Glucose-Zugabe durchzuführen. Es zeigt, dass MIR-spektroskopische Sonden für die Überwachung und Regelung der Glucose-Konzentration am Standardprozess erfolgreich eingesetzt werden können.

3.7 Zusammenfassung und Diskussion der Prozessüberwachung an K08

Die Überwachung mit MIR- und 2DF-spektroskopischen Sonden an einem Standard-Zellkulturprozess zeigte, dass fünf wichtige CPPs erfolgreich mit den beiden spektroskopischen Methoden beobachtet werden konnten. Vorhersagemodelle wurden mit Spektraldaten aus acht Kultivierungsprozessen erstellt. Beim Kultivierungsprozess K08 wurden die Modelle von Glucose-, Laktat- und Glutamin-Konzentrationen, sowie Gesamt-

und Lebendzellzahlen validiert. Der Vergleich zwischen den Vorhersagewerten und Referenzwerten bestätigte eine gelungene Überwachung.

Die beobachteten Ergebnisse unterstützen die Methode der Prozessüberwachung mit Spektroskopie, die bereits oft in der Forschung und Industrie verwendet werden [28, 75, 76]. Die Qualität der Prozessüberwachung mit zwei unterschiedlichen spektroskopischen Methoden ist zufriedenstellend. Hierbei zeigt die Multimodalität der Methode, dass beide spektroskopischen Methoden sich sehr gut ergänzen. Die MIR-Spektroskopie wird für die Überwachung der niedermolekularen biochemischen Analyten eingesetzt, während 2DF-Spektroskopie die Zellzahl wiedergibt. Der Prozessverlauf konnte zwar nicht mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden, aber die charakteristischen Prozessverläufe der CPPs konnten mit den Modellen passend beschrieben werden. Das Prozessverständnis wird durch die Modelle und durchgeführten Untersuchungen an den Spektraldaten vertieft und erweitert [70]. Des Weiteren ist die Güte der Modelle abhängig von der Güte der offline gemessenen Referenzwerte. Der Messfehler relativiert sich durch die große Menge an hier verwendeten Datensätze.

Das Ergebnis der Regelung der Glucose-Konzentration mit einer automatisierten Feed-Zugabe zeigte, dass eine erfolgreiche Überwachung die Voraussetzung einer gelungenen Regelung im Prozess ist. Die Glucose-Regelung ergänzt die ganzheitliche Prozessüberwachung. Für zukünftige Prozessüberwachung und -regelung sollen die Modelle mit aktuellen Datensätzen angepasst werden, damit ein besseres Überwachungsergebnis erzielt werden kann. Das hat mit dem Alterungsprozess der Spektrometer zu tun. Regelmäßiges Kalibrieren der Geräte könnte die Ergebnisse verbessern. Hier sollte das Lifecycle Management von Prozessmodellen berücksichtigt werden. Nach jedem Kultivierungsprozess sollten die Modelle an die neuen Daten angepasst und ggf. ältere Kultivierungsdaten aus der Modellerstellung herausgenommen werden.

Die Verarbeitung der großen Menge an Spektraldaten benötigt MVDA (Engl. *multivariate data analysis*). Es gibt weitere Datentransformationsmethoden und statistische Methoden, um die Spektraldaten zu analysieren. Es ist für die zukünftige Weiterentwicklung der Prozessüberwachung mit multimodalen spektroskopischen Sonden von Interesse, die Daten mit weiteren statistischen Methoden zu untersuchen, um maximales Daten-Mining betreiben zu können. Durch weitere Kombination von mehreren spektroskopischen Methoden könnte es zu einem Wissenszuwachs kommen. Des Weiteren ist ein Vorteil der

Multimodalität, dass sich verschiedene Modelle gegenseitig kalibrieren können. Hybride Modelle aus mehreren Methoden wären ebenfalls interessant für die Bioprozessüberwachung.

Die Prozessregelung kann auch auf weitere CPPs erweitert werden, wie z.B. auf die Glutamin-Konzentration. Das Niedrighalten der Glutamin-Konzentration ist besonders wichtig, um Ammoniak- und Laktat-Produktion zu hemmen [77, 78]. Die Regelung der Glutamin-Zugabe hängt mit dem Zellwachstum zusammen. Daher kann in Zukunft eine Glutamin-Regelung durch ein gemeinsames Modell basierend auf MIR- und 2DF-Spektren realisiert werden.

4. Gezielte Induktion der Apoptose in CHO-K1 Zellen

Die Apoptose, ein natürlicher Alterungsvorgang in Säugetierzellen, und wird in dieser Arbeit durch Zugabe von Camptothecin (CPT) gezielt in den CHO-K1 Zellen induziert. Durch die gezielte Induktion zur Apoptose ist es möglich, Zellpopulationen mit unterschiedlichen Stärken an Apoptose zu generieren. Die Morphologie der Zellen verändert sich während der Apoptose und die Viabilität der Zellen sinkt bei der Entwicklung der Apoptose. Die Apoptose gehört neben den Zellzahlen und der Viabilität zu den zellphysiologischen Zuständen, die überwacht werden sollten. Aus der Apoptose ergibt sich Information über den Prozesszustand, da Apoptose meistens durch äußere Anreize induziert wird, z.B. durch oxidativen Stress oder Limitierung der Substrate [79].

Diese gezielte Induktion der Apoptose in CHO-K1 Zelle wurde zuerst im Schüttelkolben-Maßstab etabliert und ein Apoptose-Assay mit Hilfe der Ergebnisse entwickelt. Der Apoptose-Assay wurde anschließend auf den Maßstab des Bioreaktors übertragen, um die Apoptose in einem Standardprozess mit CHO-K1 Zellen einzuleiten. Dabei wurden 2DF- und UV/VIS-spektroskopische Sonden am Prozess eingesetzt, um die morphologischen Veränderungen, die Zellzahlunterschiede und die sinkende Viabilität der Zellen zu beobachten.

4.1 Apoptose in CHO-K1 Zellen und deren Bestimmung

Camptothecin (CPT) induziert Apoptose in CHO-K1 Zellen, wodurch sich die Zellmorphologie im Laufe der Apoptose-Entwicklung verändert. In Abbildung 20 ist die Morphologie von Zellen in unterschiedlichen apoptotischen Zuständen während einer normalen Schüttelkolben-Kultivierung gezeigt. Die Bilder wurden mit einem Lichtmikroskop aufgenommen. Die Zellen wuchsen in einer Schüttelkolbenkultur in einem CO₂-Inkubator. CPT wurde einen Tag nach einer Passage in die Schüttelkolbenkultur zugegeben und die Zellen wuchsen zwei weitere Tage im Inkubator bevor die Aufnahmen entstanden.

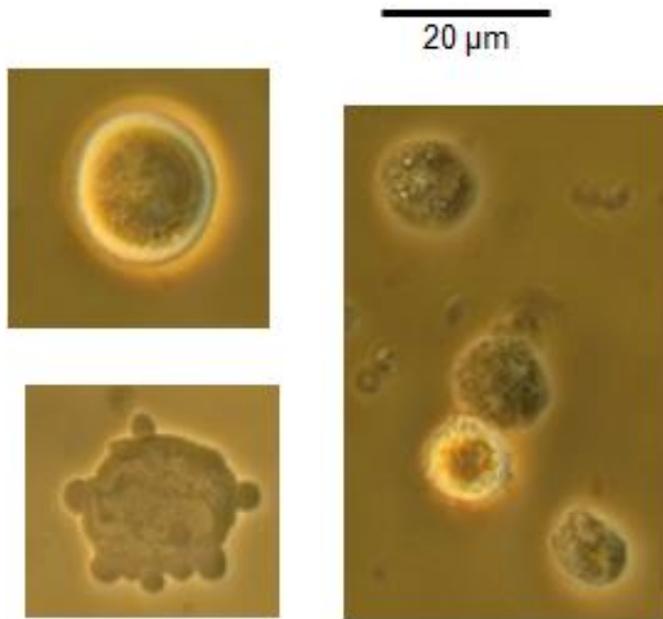


Abbildung 20: Morphologie der CHO-K1 Zellen nach Zugabe von CPT in einer Schüttelkolben-Kultur (links oben.: gesund; links unten: früh apoptotisch; rechts: fortgeschritten apoptotisch)

Gesunde CHO-K1 Zellen sind rund und zeigen unter dem Lichtmikroskop einen hellen Rand. Das Zellinnere ist homogen und die einzelnen Zellorganellen können nicht erkannt werden. Bei den früh apoptotischen Zellen ist eine Bläschenbildung an der Zellmembran zu beobachten. In dieser Phase der Apoptose-Entwicklung fangen die Zellen an sich zu verkleinern und die Kondensation der Chromatine (Material aus dem die Chromosomen bestehen) setzt ein. Allerdings bleibt die Zellmembran intakt und durch die Bläschenbildung werden Vesikel mit Zellorganellen und Fragmente der DNA aus den Zellen freigesetzt [56]. Die Zelle verkleinert sich dadurch und in der fortgeschrittenen Phase der Apoptose-Entwicklung schrumpfen die Zellen weiter. Abbildung 20 zeigt, dass die apoptotischen Zellen unter dem Lichtmikroskop klein und kompakt sind. Die morphologischen Veränderungen verursachen eine Verschiebung des Streulichtzentrums, welches Änderungen in den 2DF- und UV/VIS-Spektren verursacht und somit detektiert werden kann. Des Weiteren können andere durch Apoptose hervorgerufenen Veränderungen, wie z.B. ein zunehmender Zelltod und Zellyse, in den Spektren zu sehen sein [56, 80, 81].

Die Stärke der Apoptose kann durch verschiedene Messverfahren detektiert werden. Als eine schnelle und zuverlässige Referenzmethode zur Apoptose-Bestimmung in CHO-K1

Zellen ist die Färbung mit Annexin V FITC (rekombinantes Annexin V Protein gekoppelt mit Fluorescein-Isothiocyanat) und PI (Propidiumiodid) geeignet [82, 83]. Bei den apoptotischen Zellen kehrt sich das Phosphatidylserin der Innenseite der Zellmembran nach außen und bindet das Annexin V FITC. Die Zellmembran der apoptotischen Zellen ist noch intakt und der Zellkern kann nicht mit PI angefärbt werden. Somit ist eine Subpopulation, die Annexin V FITC positiv und PI negativ ist, eine apoptotische Population der Zellen. Der Anteil apoptotischer Zellen wird durch das Verhältnis zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen und Anzahl aller Zellen in einer Probe gebildet.

Die angefärbten Zellen werden mittels der Durchflusszytometrie analysiert, wodurch die unterschiedlichen Subpopulationen detektiert werden können. Die Subpopulationen weisen unterschiedliche Färbungen auf. Der Anteil der apoptotischen Zellen wird somit schnell und reproduzierbar bestimmt. Die Detektion mit Durchflusszytometrie ist zeitsparend und sehr sensitiv.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis einer Messung am Durchflusszytometer. Auf dem linken Bild ist das Ergebnis mit Zellen aus einer normalen vitalen Kultur zu sehen, während auf dem rechten Bild das Ergebnis aus einer Apoptose-induzierten Kultur gezeigt wird.

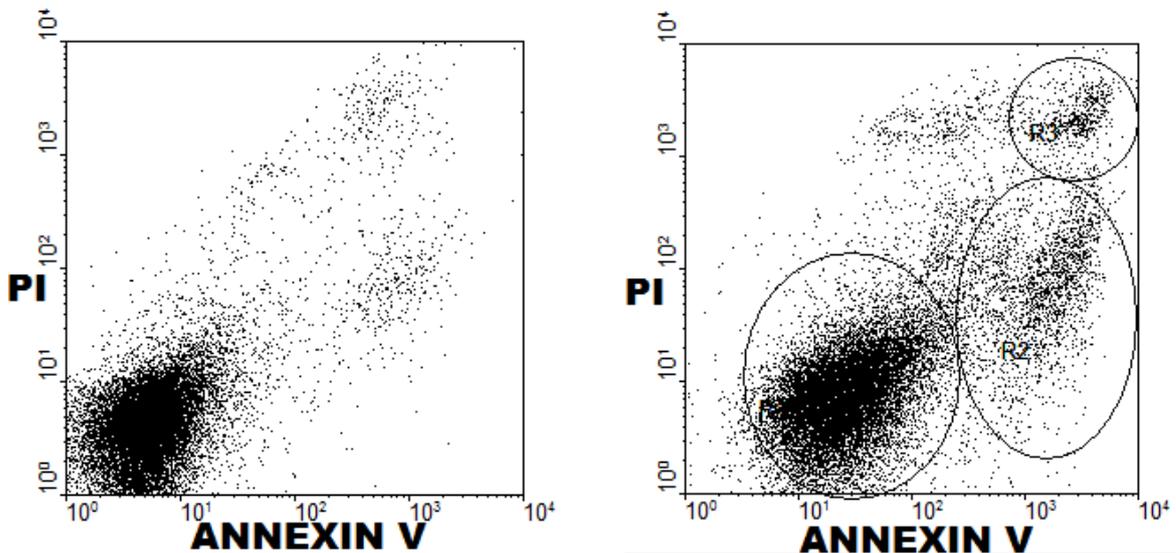


Abbildung 21: Ergebnis der Analyse nach Messung an einem Durchflusszytometer (CHO-K1 Zellen mit Annexin V und PI Färbung)

Jeder Punkt stellt eine Zelle und deren Status der Annexin V- und PI-Färbung dar. Die x-Achse zeigt, ob die Annexin V Färbung negativ (linker Bereich) oder positiv (rechter Bereich) ist. Die y-Achse zeigt, ob die PI Färbung negativ (unterer Bereich) oder positiv

(oberer Bereich) ist. Die Population unten links repräsentiert die gesunden Zellen, da die Zellen keine Verfärbung mit Annexin V oder PI aufweisen. Der Quadrant unten rechts stellt die apoptotischen Zellen dar, während der Quadrant oben rechts die toten (nekrotischen) Zellen repräsentiert.

Apoptotische Zellen können sowohl in der Mikroskopie beobachtet, als auch mit biochemischen Färbungsmethoden im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Die Bestimmung des apoptotischen Anteils der Zellen ist einfach und zuverlässig.

4.2 Camptothecin als Induktionsmittel für Apoptose

Camptothecin wurde in DMSO gelöst, um eine Stammlösung herzustellen. Eine DMSO Konzentration größer als 1 % (V/V) wirkt allerdings toxisch auf tierische Zellen [84]. Bei der Entwicklung des Apoptose-Assays war die Endkonzentration von DMSO im Medium daher nie höher als 0,1 %. Um Toxizität ausschließen zu können, die durch DMSO verursacht werden könnte, wurde zuerst überprüft, ob eine Konzentration von 0,5 % DMSO den Zellen schadet.

In Abbildung 22 ist das Zellwachstum (VCC) und die Viabilität der Kulturen dargestellt. Zwischen den Kulturen 1 und 2 sind keine großen Unterschiede zu erkennen, da bei den beiden Kulturen nur DMSO bzw. ddH₂O zugegeben wurde. Die Zellviabilität blieb über 99,5 % bei beiden Kulturen. Bei Kulturen 3 und 4, die jeweils mit 20 µM CPT kultiviert wurden, sank die Lebendzellzahl stetig auf unter 0,4 Millionen Zellen/mL und die Viabilität betrug nur noch ca. 50 % 68 h nach der Zugabe von CPT.

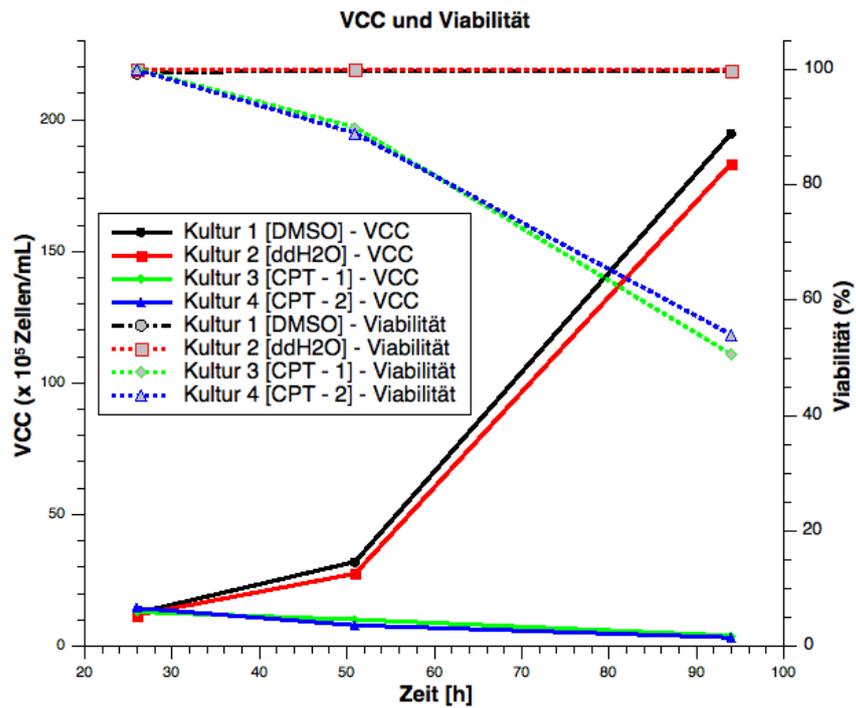


Abbildung 22: Ergebnis der Untersuchung auf Zellschaden mit 0,5 % V/V DMSO.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kultur mit CHO-K1 Zellen im Medium mit 0,5 % DMSO kein schlechteres Wachstum aufweist (Kultur 1) und die Apoptose wird durch 0,5 % DMSO nicht induziert oder verstärkt. Die Apoptose wurde ausschließlich durch Zugabe von CPT verursacht.

Im folgenden Abschnitt wird der Assays „Gezielte Apoptose-Induktion in Schüttelkolbenkultur von CHO-K1“ vorgestellt, mit dem eine vordefinierte Stärke (ein prozentualer Bereich) an Apoptose in den Zellkulturen erzielt werden kann.

Die induzierten apoptotischen Zellen mit vordefinierter Intensität können für andere Zwecke eingesetzt werden, wie z.B. zur Beobachtung unter dem Mikroskop oder als Objekt in anderen Experimenten [85].

Die Herstellung der apoptotischen Zellen soll unkompliziert und schnell sein. Die vordefinierte Stärke an Apoptose muss nicht hochpräzise sein, sondern es genügt eine Bereichsangabe. In Abbildung 23 ist das Ergebnis von fünf verschiedenen Stufen an Apoptose-Stärke gezeigt, die gezielt durch Zugabe von CPT und Variation der Inkubationszeit induziert wurden.

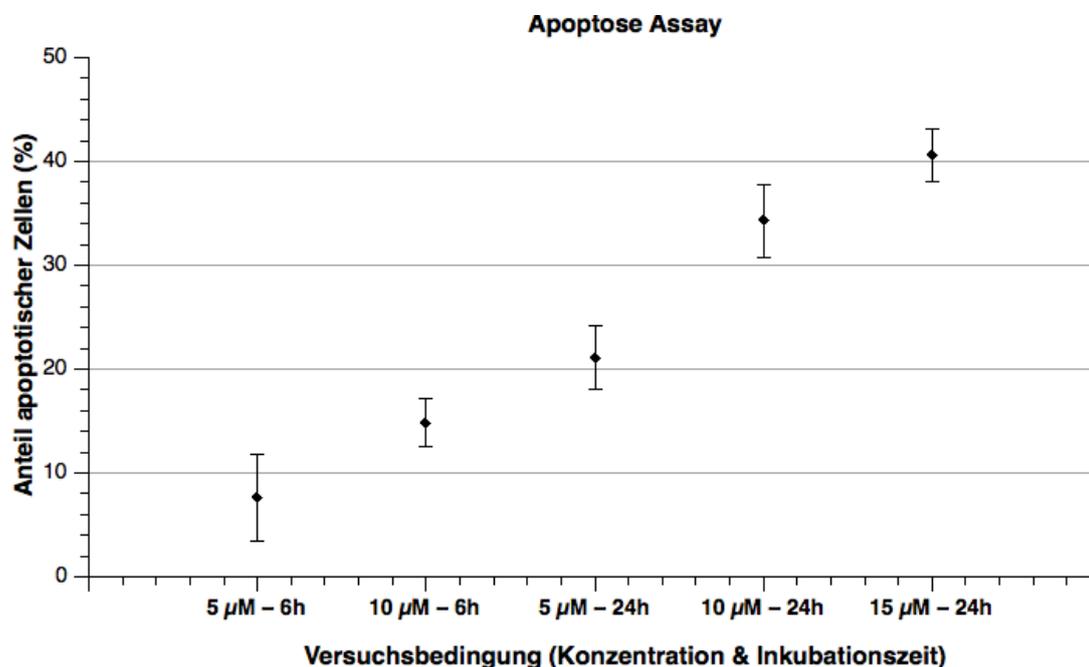


Abbildung 23: Ergebnis – gezielte Induktion von Apoptose in Schüttelkolbenkulturen.

Jede Versuchsreihe wurde mindestens 5-mal wiederholt ($n > 5$), wobei die Anfangszellzahlen der Kulturen von 1,5 bis 6,5 Millionen Zellen/mL variiert wurden. Die Zellzahl kann als TCC und VCC verstanden werden, da die Viabilität am Anfang der Versuche immer weit über 99% liegt. Mit drei verschiedenen CPT-Konzentrationen (5 μM , 10 μM und 15 μM) und zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten (6 und 24 Stunden) wurden fünf Apoptose-Stärken von knapp unter 10% bis auf über 40% gezielt erreicht. Der Assay „Gezielte Apoptose-Induktion in Schüttelkolbenkultur von CHO-K1“ wird im Anhang (Kapitel 8.3) aufgeführt.

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Apoptose durch definierte Versuchsbedingungen gezielt induziert werden kann. In einem kleinen Maßstab in Schüttelkolbenkultur ist die gezielte Induktion erfolgreich.

Durch diese einfache Methode kann innerhalb eines Arbeitstages (6 Stunden) oder am Tag danach (24 Stunden) die gewünschte Apoptose-Stärke erreicht werden. Die Schnelligkeit

und die praktische Ausführbarkeit sind wichtig für den Assay. Hier ist die gezielte Induktion zur Apoptose nicht das Ziel, sondern ein Werkzeug zu weiteren experimentellen Zwecken.

Um einen tieferen Einblick in die Ausbildung der Apoptose in den CHO-K1 Zellkulturen zu ermöglichen, können in Zukunft noch weitere Faktoren untersucht werden.

5. UV/VIS- und 2DF spektroskopische Sonde zur Beobachtung der Zellenzustände (Zellzahl und Apoptose)

Bei der ganzheitlichen Prozessüberwachung für den Kultivierungsprozesses K08 wurde gezeigt, dass mit MIR- und 2DF spektroskopische Sonden alle fünf wichtigen CPPs am Standardprozess überwacht werden konnten.

Die Überwachung des Standardprozesses mit CHO-K1 Zellen wird nun durch die Beobachtung von zellphysiologischen Prozessvariablen vertieft. Hierbei werden die Zellzahlen in den Mittelpunkt gestellt. Des Weiteren wird die Apoptose am Standardprozess beobachtet und deren Detektierbarkeit erprobt. Die Ergebnisse aus der ganzheitlichen Überwachung zeigten, dass die 2D Fluoreszenz Spektroskopie für die Vorhersage der Zellzahlen geeignet ist. Für die vertiefte Beobachtung wurde zusätzlich eine UV/VIS spektroskopische Sonde am Standard-Zellkulturprozess angebunden.

Ähnlich wie bei der ganzheitlichen Zellkulturprozessüberwachung, wurden spektroskopische Daten aus mehreren Prozessen benötigt, um Vorhersagemodelle für die Zellzahlen zu erstellen. Die Zellzahlen wurden jeweils mit 2DF und UV/VIS spektroskopische Sonden mit Hilfe der Kalibrationsmodelle untersucht.

5.1 Vorstellung der Kultivierungsprozesse K09 – K13

Die 2DF- und UV/VIS-Spektraldaten wurden während der Prozesse K09, K10, K11 und K12 aufgenommen, um Vorhersagemodelle zu erstellen. Die Modelle wurden für die Vorhersage von TCC und VCC des Kultivierungsprozesses K13 verwendet. K10, K11, K12 und K13 wurden als Batch-Prozesse geführt, während der Kultivierungsprozess K09 ein Fed-Batch-Prozess war. Eine weitere wichtige Besonderheit für die Prozesse K10 und K12 war die Zugabe von Camptothecin (CPT), um die Apoptose einzuleiten.

Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen die Entwicklung der Zellzahlen und die daraus errechnete Viabilität der Kultivierungsprozesse K09 – K13.

Abbildung 24: Verlauf der Gesamtzellzahl TCC der Kultivierungsprozesse (K09 – K13)

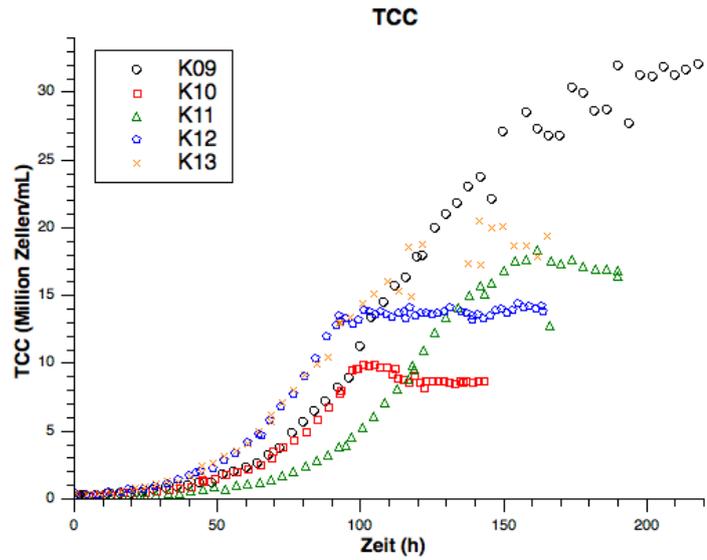


Abbildung 25: Verlauf der Lebendzellzahl VCC der Kultivierungsprozesse (K09 – K13)

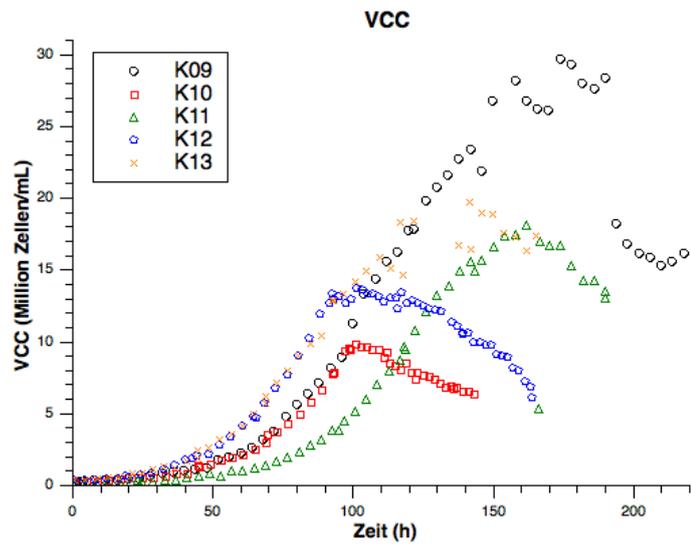
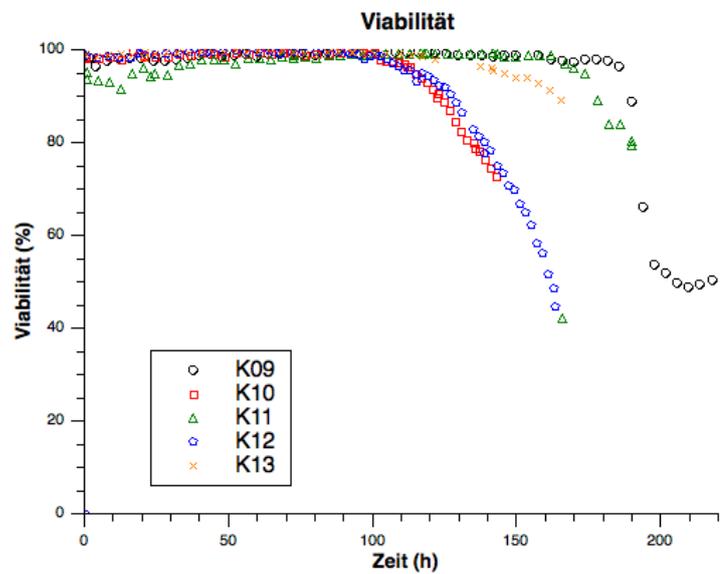


Abbildung 26: Verlauf der Viabilität (zusammengesetzt aus VCC und TCC) der Kultivierungsprozesse (K09 – K13)



Dem Kultivierungsprozess K09 wurden 5-mal Feed-Medium während der Kultivierung zugegeben. Darunter befanden sich die drei Zeitpunkte (96 h, 120h und 144 h) während der exponentiellen Wachstumsphase (bis ca. 165 h). Die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase verlängerte sich hierdurch und es wurde eine maximale Zellzahl von über 31 Millionen Zellen/ mL erreicht. Der Anteil der Lebendzellzahl ist nach einer kurzen stationären Wachstumsphase schnell gesunken.

Die zwei normalen Batch-Prozesse, K11 und K13, erreichten die stationäre Wachstumsphase bereits zwischen 120 und 150 h und die maximale Zellzahl betrug ca. 18 Millionen Zellen/ mL. In der stationären Phase des Zellwachstums bei K13 sind sprunghafte Messwerte (Artefakt in der offline Messung) an TCC und VCC zu erkennen. Die Sprünge in der TCC und VCC beruhen auf offline Messfehlern. Bei der späteren Evaluierung der Kalibrationsmodelle kann verglichen werden, ob sich diese Sprünge in der spektroskopischen Beobachtung wiederfinden lassen.

Bei den Kultivierungsprozessen K10 und K12 ist gut zu erkennen, dass nach der Zugabe von CPT die Sterbephase sofort eingeleitet wurde. Beide Kultivierungsprozesse wurden ungefähr 95 h (4 Tage) als gewöhnlicher Batch-Kultivierungsprozess durchgeführt, bevor die Apoptose induziert wurde. Die Gesamtzellzahl blieb nach der Induktion mit CPT relativ konstant und die Lebendzellzahl nahm stetig ab. Das spiegelt den Verlauf der Viabilität wider.

Bei den normalen Batch-Prozessen K11 und K13 blieb die Viabilität hoch (um die 99%) bis 120 – 150 h, bevor die Sterbephase eintritt. Beim Fed-Batch-Prozess K09 konnte die Viabilität der Zellen durch mehrfache Zugabe von Feed-Medium länger hochgehalten werden und eine Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase kam zustande. Bei den zwei Prozessen K10 und K12 war durch die Induktion der Apoptose eine schnelle Abnahme der Viabilität zu erkennen.

5.2 Apoptose am Standardprozess

Die Prozesse K10 und K12 wurden ca. 95 h nach Prozessstart mit CPT (Camptothecin) zu Apoptose induziert. Zusätzlich zu den offline Proben-Analyse wurde in den Proben der Anteil der apoptotischen Zellen mit Hilfe der Annexin V & PI – Färbungsmethode und einem Durchflusszytometer bestimmt. Abbildung 27 zeigt die Entwicklung der Apoptose in den Prozessen K10 und K12 nach der Zugabe von CPT (Induktion der Apoptose im Standardprozess). Die Bestimmung des apoptotischen Anteils bei K12 endet nach 138 h, da die Anteile apoptotische Zellen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden konnten [86]. Dies war bei den Proben der Fall, bei denen die Viabilität bereits unter 60% lag.

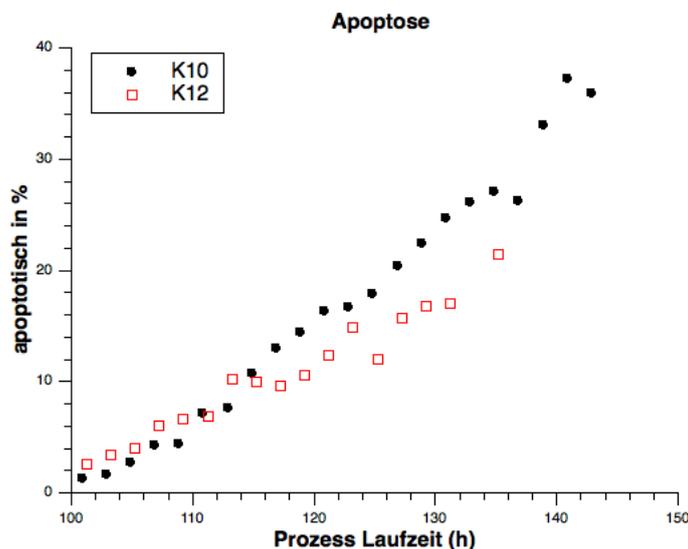


Abbildung 27: Verlauf der apoptotische Anteil der Zellen in Prozess K10 und K12

Die Bestimmung der apoptotischen Zellen ist zusätzlich durch die höhere Zelldichte bei Prozess K12 erschwert. Während des Zellkultivierungsprozesses entstehen mit der Zeit immer mehr Zelltrümmer, die die Messung im Durchflusszytometer stören. Die Bestimmung von apoptotischen Zellen ist sehr genau, wenn die Zellzahlen unter 10 Millionen Zellen/ mL liegen und wenn die Viabilität über 60% - 70% ist.

Beim Kultivierungsprozess K10 konnte der Anteil apoptotischer Zellen bis zum Ende der Prozessführung bestimmt werden. Der maximale Anteil erreichte knapp 36%. Beim Prozess K12 ist der Anstieg kleiner als bei K10. Der maximale Anteil liegt bei knapp über 23%.

Die Entwicklung der Zellen nach Zugabe von Camptothecin in den Bioreaktor ist in beiden Kultivierungsprozessen ein kontinuierlicher Anstieg apoptotischer Zellen. Durch die komplexe Prozessumgebung ist eine sehr hohe Vergleichbarkeit zweier Apoptose-induzierter Prozesse nicht zu erwarten. Eine Aussage über einen linearen oder exponentiellen Anstieg ist ebenfalls nicht eindeutig.

Sowohl die Zellzahlen als auch der Anteil apoptotischer Zellen gehören zu den zellphysiologischen und zellmorphologischen Prozessgrößen. Die Veränderung der Zellphysiologie und der Morphologie kann mit sensitiven spektroskopischen Sonden beobachtet werden, wie zum Beispiel mit der 2DF Spektroskopie. Im folgenden Abschnitt soll gezeigt werden, wie eine weitere spektroskopische Sonde (UV/VIS) bei der Prozessüberwachung mitwirken kann, um die Zellzahlen zu überwachen. Eine Machbarkeitsuntersuchung an der Beobachtung der Apoptose-Entwicklung im Kultivierungsprozess mit der UV/VIS Sonde wird ebenfalls vorgestellt.

5.3 Vorhersagemodelle von Zellzahlen mit 2DF- und UV/VIS-Spektren

Während der Kultivierungsprozesse K09, K10, K11 und K12 wurden sowohl 2DF-Spektren als auch UV/VIS-Spektren aufgenommen. Aus beiden Datensätzen wurden Kalibrationsmodelle für TCC und VCC erstellt. Die Modelle wurden anhand der Spektraldaten von K13 für die Vorhersage der beiden Zellzahlen angewendet. Ähnlich wie bei der ganzheitlichen Prozessüberwachung des Kultivierungsprozesses K08, wurde die Güte und Qualität der Modelle und deren Vorhersage überprüft.

5.3.1 Auswahl der Datenbereiche

Den Kultivierungsprozessen K10 und K12 wurde CPT (Camptothecin) in den Bioreaktor zugegeben, um die Apoptose im Prozess zu induzieren. Reines CPT hat einen typischen „Footprint“ sowohl im UV/VIS Spektrum, als auch im 2DF-Spektrum. Im UV/VIS Spektrum hat CPT zwischen 350 nm und 390 nm eine starke Absorption. Im 2DF-Spektrum hat CPT bei der Wellenlängenkombination *Excitation* 370nm/*Emission* 450nm eine hohe Intensität. Die hohe Absorption in den UV/VIS Spektren und hohe fluoreszierende Intensität im 2DF Spektrum können bei der Aufnahme der Spektren aus den Kultivierungsprozessen interferieren. Des Weiteren erfolgt nur bei K10 und K12 die Zugabe von CPT nach ca. 95h - 100 h, während die beiden Kultivierungsprozesse K09 und K11 ganz normale Batch-Prozesse waren. Es ist wichtig, dass die Kalibrationsmodelle aus Daten von ähnlich verlaufenden Prozessen erstellt werden. Aus diesem Grunde werden bei den Apoptose-Prozessen K10 und K12 nur Spektren bis zum Zeitpunkt kurz vor der Zugabe von CPT verwendet. Das heißt, dass die Spektren von K10 und K12 ausschließlich aus der exponentiellen Wachstumsphase stammten. Die TCC in K10 erreichte einen maximalen Wert von knapp 10 Millionen Zellen/ mL und im Kultivierungsprozess K12 war die maximale TCC um die 14 Millionen Zellen/ mL.

Damit sich die Kalibrationsmodelle für die Zellzahlen besser für die Vorhersage eignen, wird der Bereich der Spektraldaten weiter untersucht. Aus vorheriger Diskussion über die Zellzahl-Entwicklung während der Prozessen K09 – K12 ist gut zu erkennen, dass K09

sowohl höhere TCC als auch VCC im Vergleich zu den anderen Prozessen hat. Wenn die Kalibrationsmodelle auch mit den höheren Zellzahlen des Prozesses K09 erstellt würden, könnte die Vorhersage dadurch größer ausfallen. Aus diesem Grund werden bei K09 nur die Spektren bei der Modellerstellung berücksichtigt, bei denen die TCC kleiner als 20 Millionen Zellen/ mL ist. Um den Effekt besser zu veranschaulichen, werden zusätzliche Modelle mit allen K09 Spektren (auch bei denen TCC größer als 20 Millionen Zellen/ mL ist) erstellt (siehe Abbildung 24). Das zusätzliche Modell mit größeren TCC aus K09 basiert auf 2DF Spektren, und der Vergleich wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

In Tabelle 3 wird die Anzahl der verwendeten Spektren für die jeweiligen Modelle aufgeführt. In dieser Arbeit wird das Apoptose-Modell nur für den ersten Beobachtungsversuch erstellt. Für ein stabiles Vorhersagemodell sollten mehr Datensätze vorhanden sein.

Tabelle 3: Anzahl der Spektren für die Vorhersagemodelle

		Anzahl der im Modell verwendeten Spektren				
		K09	K10	K11	K12	Insgesamt
UV/VIS- Modelle	TCC & VCC	34	25	53	22	134
	Apoptose	0	22	0	21	43
2DF- Modelle	TCC & VCC	34	25	48	22	129

Der Kultivierungsprozess K13 hat eine Lücke von knapp 13 h in der Aufzeichnung der 2DF Spektren aufgrund eines technischen Defekts. Die Datenlücke befindet sich zwischen Prozesszeit 123 h und 136 h bei den 2DF Spektraldaten.

5.3.2 Vorhersage der Zellzahlen von K13

Vier verschiedene Kalibrationsmodelle wurden erstellt, um die Vorhersage von TCC und VCC in Kultivierungsprozess K13 zu ermöglichen. Zwei Modelle basieren auf 2DF-Spektren, während die anderen zwei auf UV/VIS-Spektren basieren. Das Ergebnis der

einzelnen Vorhersagen wird zunächst vorgestellt. Ein Vergleich zwischen den Modellen wird am Ende gezeigt.

Die 2DF-Spektren wurden durch Abzug des Medien-Spektrums vorbehandelt. Bei den UV/VIS Spektren wurde eine Mittelwert-Korrektur vorgenommen, ähnlich zur Vorbehandlung der MIR-Spektren. In Abbildung 28 werden die zwei PLS Modelle für TCC gezeigt. Es ist zu erkennen, dass beide Kalibrationsmodelle grundsätzlich die TCC aus den Datensätzen gut vorhersagen können. Das UV/VIS Modell hat einen höheren absoluten Fehler und die Korrelation zwischen der Referenz und der Vorhersage ist ähnlich genau. Das TCC-Kalibrationsmodell von 2DF benötigt vier Hauptkomponenten, um 98,16 % der gesamten Varianz zu beschreiben. Dagegen braucht das TCC-Kalibrationsmodell von UV/VIS fünf Hauptkomponenten, um 99% der gesamten Varianz zu beschreiben. Beide Kalibrationsmodelle für TCC wurden für die Vorhersage von TCC in K13 verwendet.

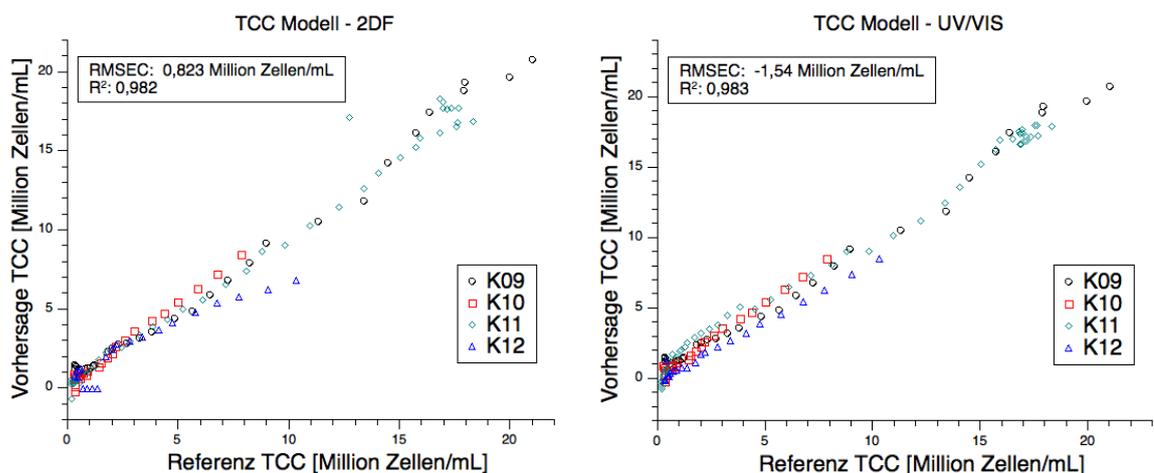


Abbildung 28: PLS Modelle für TCC (links: Modell basiert auf 2DF Spektren; rechts: Modell basiert auf UV/VIS Spektren).

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Vorhersage. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Vorhersage mit dem Modell der 2DF-Spektren (rot) besser funktioniert als das Modell der US/VIS Spektren. Aufgrund einer Datenlücke von ca. 13 h entsteht eine Lücke bei den Vorhersagewerten zwischen 123 h und 136 h. Bis 120 h stimmen die Vorhersagewerte mit dem 2DF-Modell mit den Referenzwerten mit sehr großer Genauigkeit überein. Die Zellzahlen um die 110 h und am Ende des Kultivierungsprozesses haben in den TCC-

Referenzwerten eine sprunghafte Entwicklung. Die Gesamtzellzahl sollte keinen plötzlichen Anstieg oder Abnahme aufweisen, da die Zellen nicht in kürzerer Zeit verschwinden und wiederauftauchen können. Der Vorteil von einer zusätzlichen Prozessüberwachung ist, dass dies eine zweite Sicht auf den Prozessverlauf liefern kann. Die blaue zusätzliche Kurve stellt die Vorhersage aus einem Modell mit allen K09 Spektren dar. Hier wird gezeigt, dass die Vorhersagewerte höher liegen, wenn die Spektren mit höherer Zellzahl als 20 Millionen Zellen/mL in der Modellerstellung berücksichtigt werden. Das verringert die Vorhersagequalität des Modells.

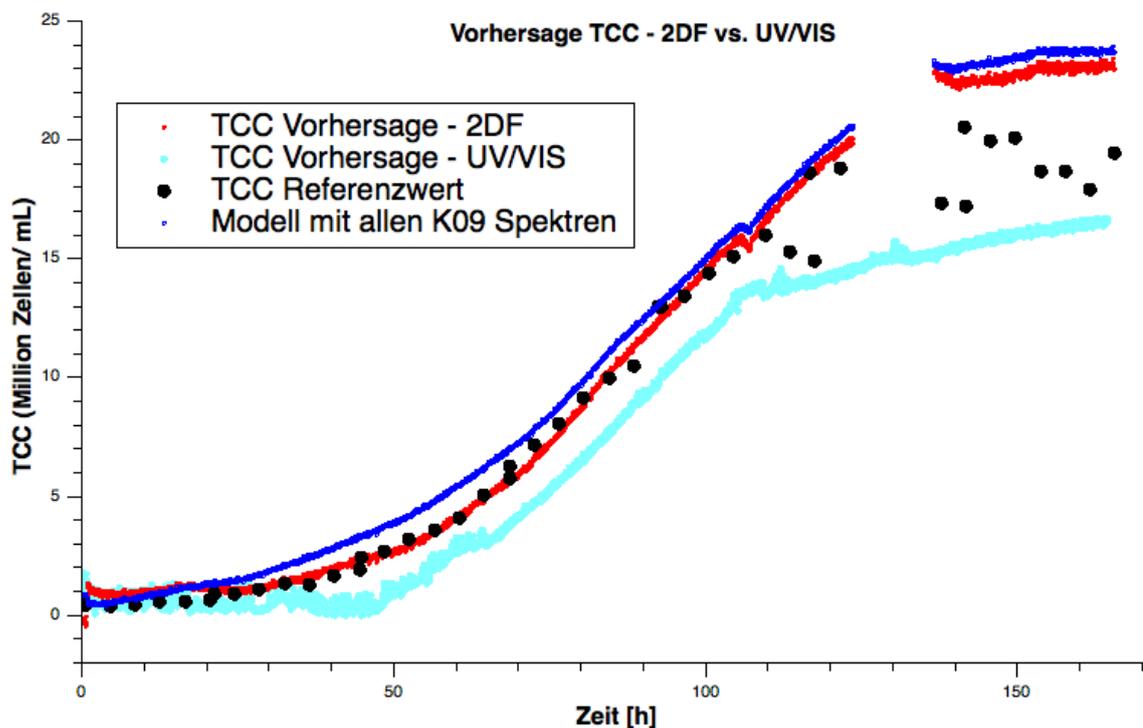


Abbildung 29: Vorhersage der TCC am K13 mit 2DF- und UV/VIS-Modell.

Im Vergleich zu der Vorhersage aus dem Modell mit 2DF-Spektren, ist die Vorhersage weniger präzise mit dem Modell aus UV/VIS-Spektren. Die Vorhersagewerte liegen unter den Referenzwerten und bis 100 h der Prozesszeit haben beide Vorhersage-Ergebnisse keinen großen Unterschied. Nach 100 h entwickeln sich die Vorhersagewerte aus dem UV/VIS-Modell nicht mehr so stark nach oben und es bildet sich ein Plateau, das der stationären Phase des Zellwachstums ähnelt. Am Ende des Prozesses haben beide Vorhersagemodelle einen Unterschied von 7 Millionen Zellen/mL.

UV/VIS- und 2DF spektroskopische Sonde zur Beobachtung der Zellenzustände (Zellzahl und Apoptose)

In Abbildung 30 werden die PLS Modelle für VCC gezeigt. Es ist klar zu sehen, dass beide Kalibrationsmodelle die Lebendzellzahl gut beschreiben können. Anders als die TCC-Modelle, hat hier das UV/VIS Modell einen kleineren absoluten Fehler. Die Korrelation zwischen Referenz und Vorhersage ist ebenfalls gut. Das VCC-Kalibrationsmodell von 2DF benötigt sechs Hauptkomponenten, um 96,35 % der gesamten Varianz zu beschreiben. Das VCC-Kalibrationsmodell von UV/VIS benötigt ebenfalls sechs Hauptkomponenten, um 98,75 % der gesamten Varianz zu beschreiben. Beide Kalibrationsmodelle wurden für die Vorhersage von VCC in K13 genutzt.

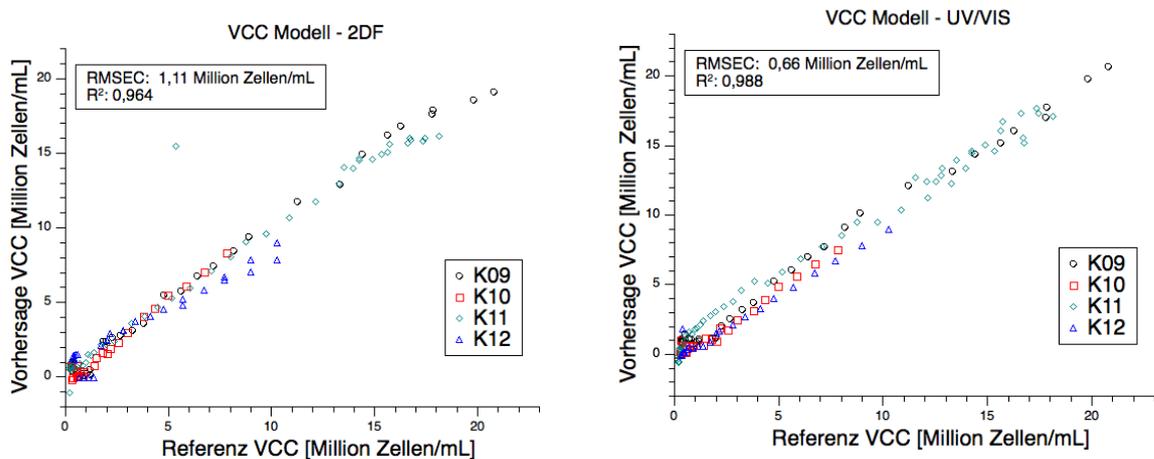


Abbildung 30: PLS Modelle für VCC (l.: Modell basiert auf 2DF Spektren; r.: Modell basiert auf UV/VUS Spektren).

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Vorhersage von VCC. Es ist gut zu sehen, dass die Vorhersage mit dem Modell aus den 2DF-Spektren (orange) erheblich besser funktioniert als die Vorhersage aus den UV/VIS-Spektren. Der Verlauf der Zellzahl VCC kann sehr gut durch das Vorhersagemodell beschrieben werden. Die Vorhersagewerte liegen meistens etwas höher als die Referenzwerte. Am Ende des Prozesses sind die Vorhersagewerte kleiner als die Referenzwerte. In den Referenzwerten sind auch die Messfehler zu sehen, denn es liegen ein paar Referenzwerte außerhalb des erwarteten Verlaufs. Am Ende des Kultivierungsprozesses sinkt die VCC und diese Abnahme der VCC und der Wendepunkt korreliert sehr gut mit den Vorhersagewerten.

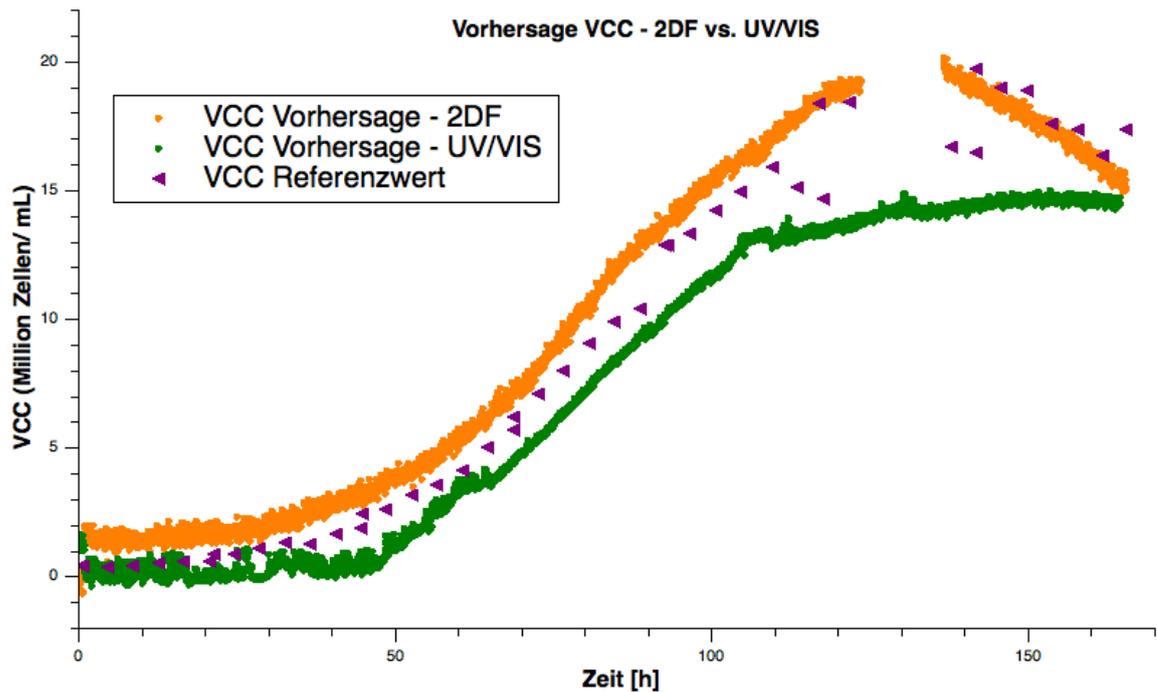


Abbildung 31: Vorhersage der TCC am K13 mit 2DF- und UV/VIS-Modell.

Ähnlich zu der TCC-Vorhersage aus dem Modell mit UV/VIS-Spektren, ist die Vorhersage mit dem VCC-Modell aus UV/VIS-Spektren weniger effizient. Die Vorhersagewerte liegen unter den Referenzwerten. Die Vorhersagewerte von TCC und VCC mit UV/VIS-Modelle sind sehr ähnlich, was darauf hindeutet, dass mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen getroffen werden kann.

5.4 Beobachtung der induzierten Apoptose mit einer UV/VIS-spektroskopischen Sonde

Für die Erstellung von Vorhersagemodellen (Kalibrationsmodelle) für die Apoptose werden ausschließlich die Spektren nach Zugabe von CPT (Camptothecin) berücksichtigt. Der Grund dafür ist die starke Eigenabsorption und Fluoreszenzintensität von CPT. Es ist wichtig, dass die Modelle aus vergleichbaren Daten entstehen. In diesem Teil der Arbeit wird daher nach Einleitung der Apoptose nach Korrelationen in den Spektren und der Apoptose gesucht.

Die Apoptose verändert die Zellmorphologie und -physiologie. Mit den spektroskopischen Sonden können auch kleinste Änderungen im Prozess wahrgenommen werden [76]. Die Herausforderung liegt darin, diese Änderungen aus den Spektraldaten zu extrahieren, zu interpretieren und zu quantifizieren. Es ist ebenfalls wichtig, dass eine ausreichende Datengrundlage vorhanden ist, damit die Modelle genügend „Trainings“ haben.

Obwohl nur begrenzte Datensätze aus Apoptose-induzierten Kultivierungsprozessen vorhanden sind, kann eine erste Untersuchung die Machbarkeit der Apoptose-Bestimmung aus spektralen Daten zeigen.

5.4.1 Auswahl der spektroskopischen Methode für die Beobachtung der induzierten Apoptose

2DF-Spektroskopie ist eine sehr sensitive Methode [37]. Camptothecin (CPT) hat bei der Wellenlängenkombination *Excitation*370nm/*Emission*450nm eine hohe Intensität. Aus dem Kultivierungsprozess K10 werden sowohl die 2DF-Spektren als auch die UV/VIS-Spektren unmittelbar vor und nach der Zugabe von CPT in Abbildung 32 dargestellt. Die Einflüsse von CPT auf die 2DF-Spektren werden in der Abbildung gezeigt. Der Effekt auf die UV/VIS-Spektren ist hingegen kaum wahrzunehmen.

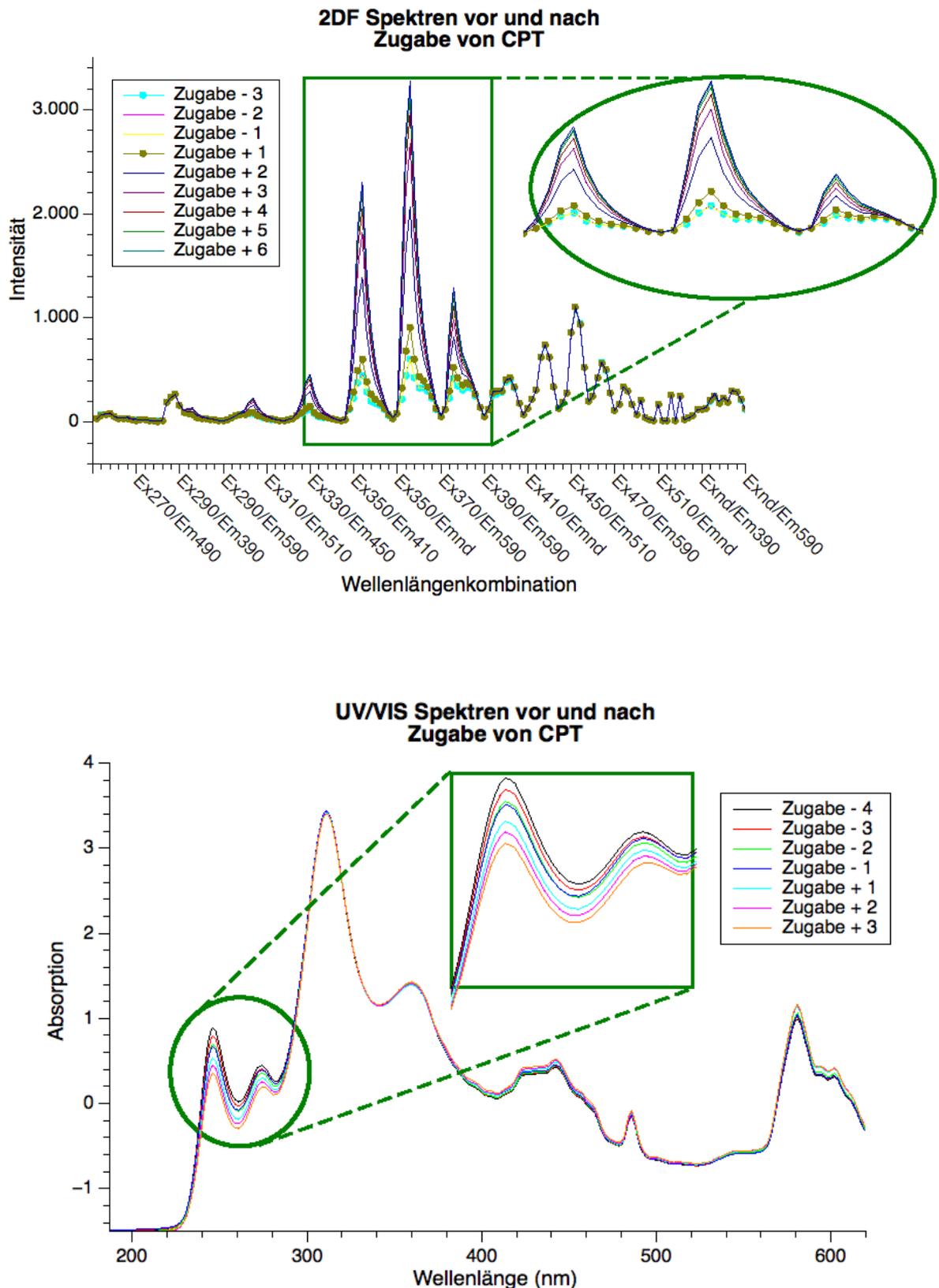


Abbildung 32: Rohdaten der 2DF- und UV/VIS-Spektren vor und nach Zugabe von CPT (Camptothecin) – (oben: 2DF Spektren, CPT hinterlässt große *Footprints*; unten: UV/VIS Spektren, CPT im Bioprozess hat keinen deutlichen Einfluss auf die Spektren.)

Die Legenden in der Abbildung 32 zeigen welche Reihenfolge die Spektren haben. Zugabe - 1 bedeutet, dass es das letzte Spektrum vor Zugabe von CPT ist. Und Zugabe - 2 ist das vorletzte Spektrum vor Zugabe von CPT, während Zugabe + 1 das erste Spektrum nach der Zugabe von CPT repräsentiert.

Hervorzuheben ist, dass die 2DF-Spektren im Abstand von 3 Minuten aufgenommen wurden. Bei den gezeigten UV/VIS-Spektren ist ein zeitlicher Abstand von ca. 4 h zwischen jedem Spektrum und dem darauffolgenden Spektrum. Bei den UV/VIS-Spektren ist die Veränderung viel langsamer zu erkennen, daher wurde ein 4 stündiger Zeitabstand gewählt, damit die kleinen Änderungen zwischen den Spektren zu erkennen sind.

Der Anstieg der Intensität in den 2DF-Spektren nach der Zugabe von CPT ist deutlich zu erkennen. Die 2DF-Spektren von Zugabe - 3 (hellblaue mit Punkten), Zugabe - 2 und Zugabe - 1 sind miteinander überlagert, da die Veränderung an Spektren kaum zu erkennen ist. Innerhalb von 10 Minuten (Aufnahme von 4 2DF-Spektren) nach der Zugabe von CPT hat sich die Intensität bei einigen Wellenlängenkombinationen mehr als verdoppelt. Es ist zu erkennen, dass sich nach der Zugabe von CPT die Intensität der 2DF-Spektren vermehrt im Bereich der CPT „Footprints“ ändert. Diese Änderung an Intensität ist in kurzer Zeit hundert- bis auf tausendfach höher als die Intensitätsänderung, die durch das Fortschreiten des Prozesses hervorgerufen werden. Die Zugabe von CPT hat die Dynamik der Beobachtung mit 2DF-spektroskopischer Sonde deutlich geändert. Daher ist es nicht sinnvoll hieraus ein Apoptose-Modell zu erstellen, da dieses Modell aus den stark durch CPT beeinflussten Spektren nicht die Apoptose in unbeeinflussten Kultivierungsprozessen beschreiben kann. Ein einfaches Abziehen des CPT Spektrums für alle Spektren nach der Zugabe von CPT wäre nicht ausreichend, da eine Vergleichbarkeit zwischen den Spektren vor und nach der Zugabe nicht möglich ist. Vor allem ist in Abbildung 32 (2DF- Spektren) gut zu erkennen, dass die kleine Menge an CPT erst nach 10 – 15 Minuten im Bioreaktor durchmischt wurde. Die 2DF-Spektren wurden ausschließlich von der Prozessumgebung in unmittelbarer Nähe der Sonde aufgenommen. Dadurch dass eine konkrete Bestimmung der finalen Durchmischung von CPT im Bioreaktor nicht möglich ist, wurde entschieden nicht mit den 2DF-Spektren weitere Evaluierung durchzuführen.

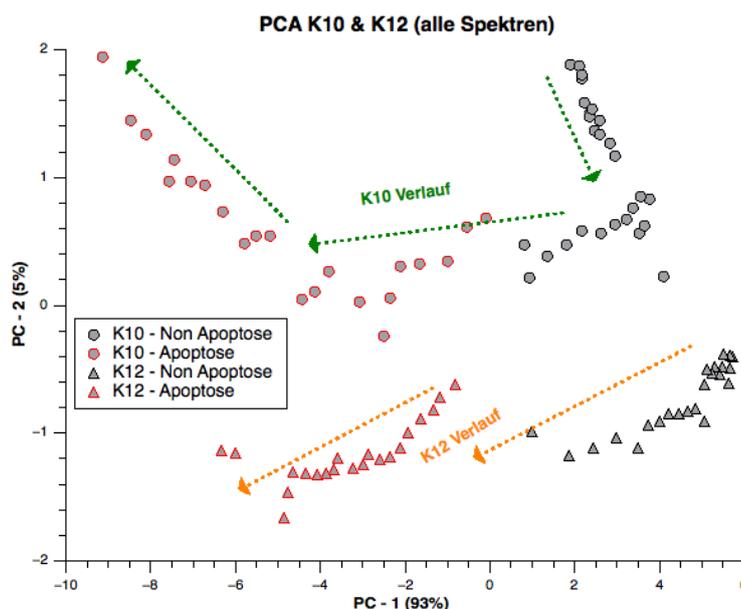
Bei den UV/VIS-Spektren ist zu erkennen, dass keine deutliche Veränderung durch die Zugabe von CPT bewirkt wird. Die UV/VIS-spektroskopische Methode ist im Vergleich zu 2DF nicht so sensitiv. Das Ergebnis zeigt, dass CPT kaum Einfluss auf die UV/VIS Spektren

hat. Für die Beobachtung der induzierten Apoptose ist die UV/VIS-spektroskopische Methode daher besser geeignet.

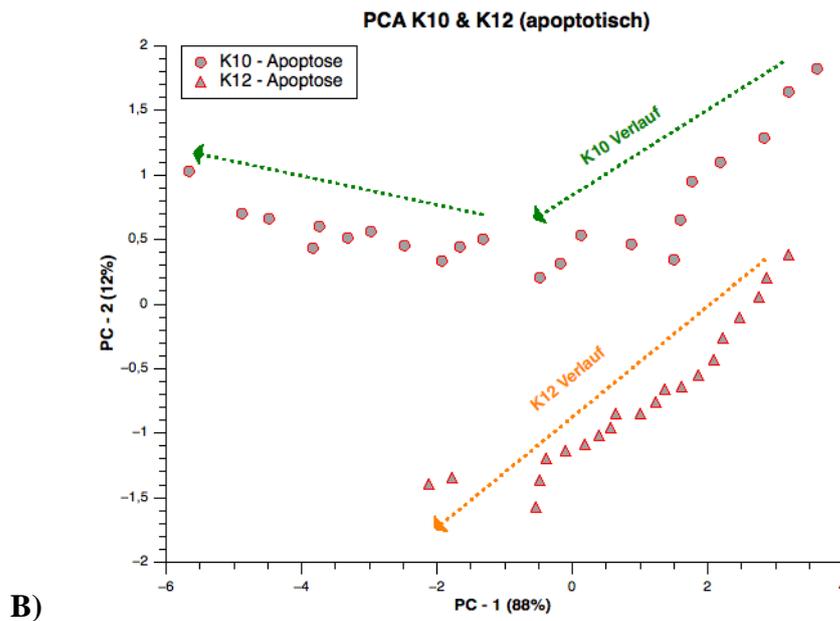
5.4.2 PCA – Spektren von K10 und K12

Mit den insgesamt 49 UV/VIS Spektren des Kultivierungsprozesses K10 und 59 UV/VIS-Spektren des Prozesses K12 wird eine Hauptkomponentenanalyse (PCA: Engl. *principal component analysis*) durchgeführt, um den Datensatz zu strukturieren und um die wesentliche Information über den Verlauf/Muster der Prozesse zu finden [87]. Die Hauptkomponentenanalyse kann die Qualität der Spektren analysieren, bevor Kalibrationsmodelle anhand der Datensätze erstellt werden. Um die beiden Datensätze besser zu veranschaulichen, werden die Spektren nach der Zugabe von CPT (apoptotisch) besonders gekennzeichnet.

In Abbildung 33 werden zwei Hauptkomponentenanalysen gezeigt. Die obere Analyse (A) wurden mit allen Spektren aus K10 und K12 erstellt. Sowohl die Spektren vor Zugabe von CPT als auch nach der Zugabe wurden berücksichtigt. Die untere Analyse (B) beinhaltet nur die Spektren nach der Zugabe von CPT.



A)



B) **Abbildung 33: Hauptkomponentenanalyse von UV/VIS Spektren aus K10 und K12.** A) Alle Spektren wurden berücksichtigt. B) Nur Spektren nach der Apoptose-Induktion wurden berücksichtigt.

Die Hauptkomponentenanalyse von allen Spektren zeigt, dass die Richtung der Prozessentwicklung auf der ersten Hauptkomponente (PC: Engl. *principal component*) gut zu erkennen ist. Die Richtung der Prozessentwicklung verläuft von rechts nach links. Bei den K10 Spektren können mindestens drei Gruppierungen entdeckt werden. Die Richtung der Prozessentwicklung bei den K10 Spektren in der zweiten Hauptkomponente ist nicht eindeutig. Die strikte Unterscheidung zwischen Spektren, die vor und nach der Zugabe von CPT aufgenommen wurden, ist nicht möglich.

Bei den K12 Spektren sind zwei deutliche Gruppierungen zu sehen. Die Spektren vor Zugabe von CPT und nach der Zugabe sind in unterschiedliche Gruppierung aufgeteilt. Die Entwicklung des Prozesses innerhalb der jeweiligen Gruppierung ist deutlich zu erkennen, sowohl in der ersten als auch in der zweiten Hauptkomponente.

Dagegen zeigt das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse mit den Spektren nach der Zugabe von CPT sehr ähnliche und geordnete Verläufe. Die Richtung der Prozessentwicklung ist bei den beiden Prozessen ähnlich. Mit Bezug auf die Prozesszustände, sind die Zellzahlen bei K12 (13 Millionen Zellen/mL) höher als bei K10 (8 Millionen Zellen/mL). Der Anteil der apoptotischen Zellen ist bei K10 höher entwickelt

als bei K12. Aus der PCA können Vermutungen über die Prozessverläufe entstehen. Es ist schwierig mit begrenzten Datensätzen aus zwei Kultivierungsprozessen, weitere Aussagen über die Qualität der Spektren zu treffen. Weitere Datensätze werden benötigt, um die These zu bekräftigen.

Im nächsten Abschnitt werden die PLS Kalibrationsmodelle vorgestellt. Die Modelle wurden mit den Spektren nach Zugabe von CPT erstellt.

5.4.3 PLS Kalibrationsmodelle für den Anteil apoptotischer Zellen im Prozess

Kalibrationsmodelle werden mit den UV/VIS Spektren von K10 und K12 für die Beobachtung der induzierten Apoptose erstellt, um die Korrelation zwischen UV/VIS-Spektren und der Apoptose-Entwicklung zu finden.

Hier werden zwei verschiedene Kalibrationsmodelle untersucht. Das erste Modell besteht aus Spektren von den beiden Prozessen K10 und K12. Das andere Kalibrationsmodell wird nur aus den Spektren vom Kultivierungsprozess K10 erstellt. Trotz der geringen Anzahl an Datensätze, wird eine Vorhersage für K12 mit Hilfe des Modells von K10 durchgeführt. Das Ergebnis soll als Machbarkeitsversuch dienen.

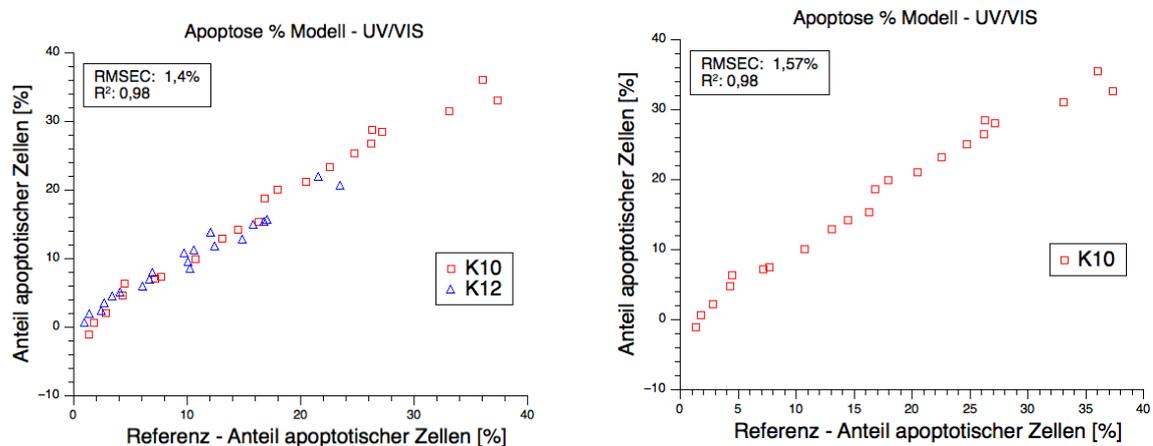


Abbildung 34: Kalibrationsmodelle aus UV/VIS – Induzierte Apoptose (l.: Daten aus K10 & K12; r.: Daten aus K10)

In Abbildung 34 wird das Ergebnis beider Kalibrationsmodelle vorgestellt. Das Modell aus Spektren von beiden Prozessen benötigt eine Hauptkomponente, um 97,92 % der gesamten Varianz zu beschreiben. Das K10-Modell beschreibt ebenfalls nur mit einer Hauptkomponente 97,97 % der gesamten Varianz. Mit Daten aus nur einem Prozess ist es nicht aussagekräftig, ob das Modell tatsächlich die Apoptose-Entwicklung beschreibt. Allerdings soll es ausreichend sein, um die Machbarkeit zu prüfen und um Erkenntnisse aus der Vorhersage zu gewinnen. Des Weiteren ist das ein vielversprechendes Ergebnis, das durch mehr Datengrundlage validiert werden kann.

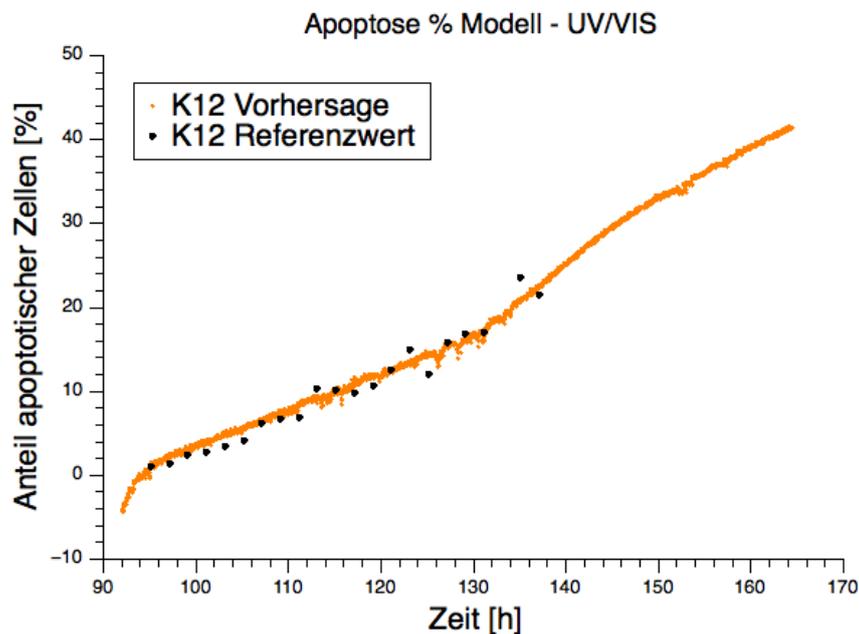


Abbildung 35: Vorhersage von Anteil apoptotischer Zellen im Prozess K12. Der Verlauf der Apoptose-Entwicklung konnte mit dem Modell aus Apoptose-Entwicklung von K10 vorhergesagt werden.

Abbildung 35 zeigt die Vorhersage der apoptotischen Zellen im Kultivierungsprozess K12. Es wurde hierfür der Abschnitt der UV/VIS Spektren zwischen 95 h und bis zum Ende des Prozesses nach 163 h verwendet. Es zeigt, dass die Vorhersagekurve sehr gut mit den Referenzwerten übereinstimmt. Der Bereich vor dem Zeitpunkt der Apoptose-Induktion (erster Referenzmesswert) wird als negative Werte vorhergesagt, die nicht zu den realen Werten passen, da der Anteil apoptotischer Zellen nicht kleiner als 0 % sein kann. Es wird deutlich gezeigt, dass das Modell nicht direkt die Apoptose beschreibt oder vorhersagt, sondern andere Variablen, die mit dem Anteil apoptotischer Zellen korrelieren.

In Abbildung 36 sind die Regressionskoeffizienten dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Absorption im Bereich zwischen 200 nm und 300 nm den größten Einfluss auf das Modell hat. Ein weiterer Bereich liegt zwischen 550 nm und 700 nm.

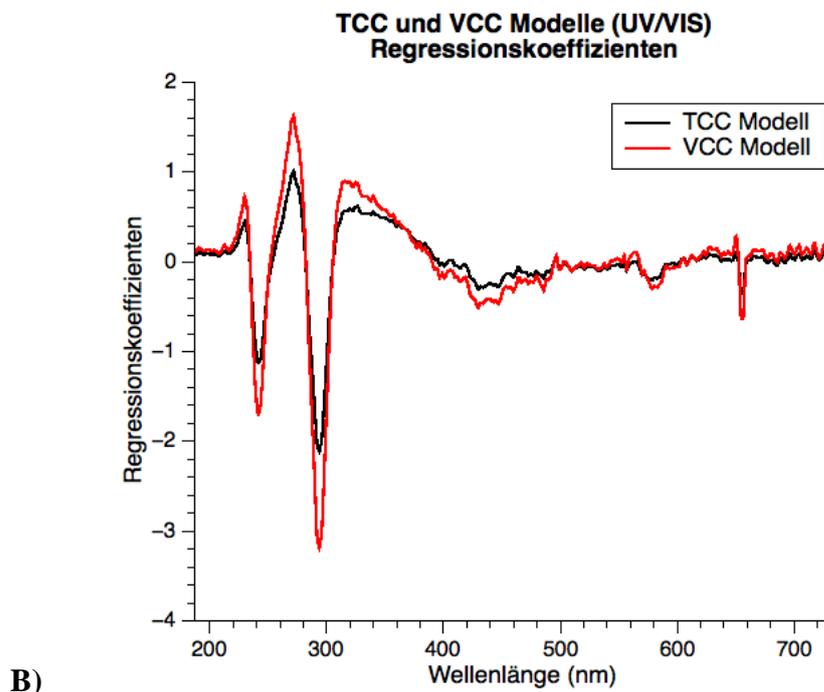
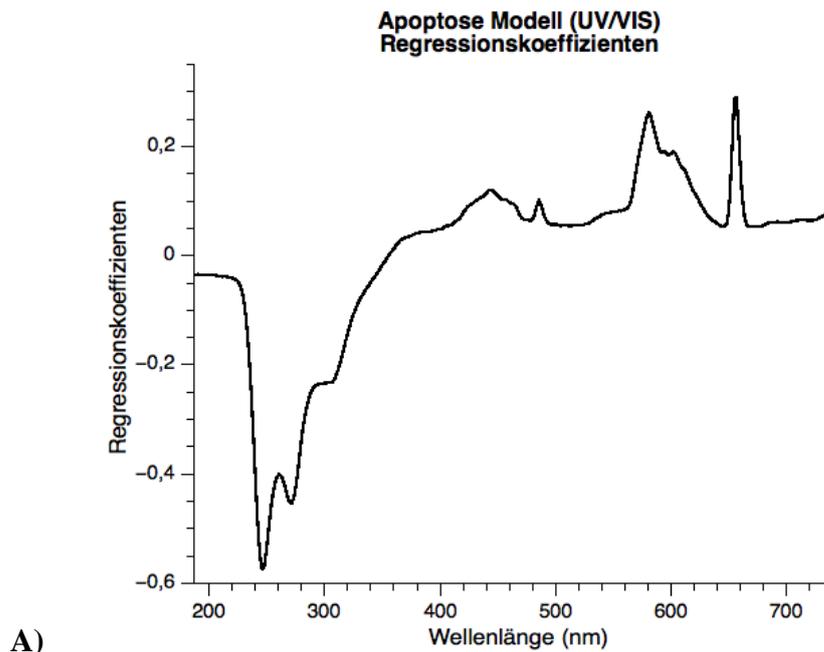


Abbildung 36: Regressionskoeffizienten bei PLS-Modell Apoptose (A) (basiert auf apoptotische Spektren von K10) und PLS-Modellen TCC & VCC (B) (basiert auf K09, K10 – nicht apoptotisch, K11 und K12 – nicht apoptotisch).

Im Vergleich zum UV/VIS PLS Modell von TCC/VCC, haben die Regressionskoeffizienten des Apoptose-Modells eine andere Charakteristik, obwohl sich die zwei genannten Bereiche mit der höchsten Dynamik ähneln. Die Beschreibung der Apoptose mit den UV/VIS-Spektren korreliert nicht direkt mit den Modellen zu TCC/VCC. Proteine haben im UV-Bereich eine maximale Absorption bei 280 nm, während Nukleinsäure die maximale Absorption bei 260 nm besitzt. Es wurde bereits in der Forschung mit mikrobiellen Zellen gezeigt, dass zwischen 350 nm und 400 nm Information zur Differenzierung zwischen viablen und toten Zellen zu finden ist [6]. Die Beobachtung lässt sich nicht ohne Weiteres von mikrobiellen Zellen auf Säugertierzellen übertragen, legt aber die Vermutung nahe, dass die vermehrte Apoptose die Zellyse fördert und somit nehmen die beobachteten Proteine und Nukleinsäuremenge im Prozess zu.

Es ist gelungen mit der UV/VIS-Spektroskopie, die Entwicklung der Apoptose zu beobachten. Allerdings benötigt das Modell noch weitere Validierung und Datensätze.

5.5 Zusammenfassung und Diskussion der Beobachtung der Zellzustände mit 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie

Es ist gelungen mit der UV/VIS-Spektroskopie, die Entwicklung der Apoptose zu beobachten. Die Evaluierungsmethoden sind etabliert und mit zukünftigen Datensätzen kann die Beobachtung auf Apoptose mit UV/VIS-spektroskopischer Methode präzisiert und modelliert werden.

Die Zellzahlen konnten mit der UV/VIS-spektroskopischer Methode beobachtet werden. Die Qualität der Vorhersage mit der 2DF-spektroskopischen Methode ist besser. Die Vorhersage mit UV/VIS Modellen ist sehr gut während der exponentiellen Wachstumsphase. Die zusätzliche Anbindung mit UV/VIS-spektroskopischer Sonde am Standardprozess erweiterte die Multimodalität der Prozessüberwachung auf Apoptose.

Durch die sehr starke Fluoreszenzintensität von CPT sind die 2DF Spektren nach der Induktion von Apoptose schwierig zu handhaben. Aber es gibt durchaus andere Methoden, um Apoptose zu induzieren und dabei keine Interferenz mit der Spektroskopie haben. Eine Möglichkeit wäre die Apoptose mit Nanopartikeln, wie z.B. ZnO (Zinkoxid) zu induzieren [88–91].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt die Evaluierungen der spektroskopischen Methoden MIR-, 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie zur ganzheitlichen Überwachung eines Säugetierzellen-Kultivierungsprozesses. Die Methode der Prozessüberwachung mit den multimodalen spektroskopischen Sensoren an einem Standardprozess in einem 15 L-Edelstahlbioreaktor mit CHO-K1 Zellen wurde erfolgreich etabliert. Darüber hinaus wurde eine Methode zur gezielten Apoptose-Induktion mit Camptothecin (CPT) in den CHO-K1 Zellen entwickelt, mit der die Prozessüberwachung auf die zellphysiologischen und -morphologischen Zustände erweitert wurde.

Die Untersuchung der ganzheitlichen Überwachung fokussiert dabei auf zwei Aspekte: Zum einen die Überwachung der niedermolekularen Analyten, zu denen Glucose, Laktat und Glutamin gehören. Zum anderen die Beobachtung der Zellzustände, z.B. Zellzahl, Viabilität und Apoptose. Die niedermolekularen Nährstoffe / Metaboliten werden mit Hilfe der MIR-Spektroskopie beobachtet, während die Zellzustände sowohl mittels 2DF- als auch UV/VIS-Spektroskopie überwacht wurden. Für die Bioprozessüberwachung wurde zuerst mit der MVDA-Methodik die Korrelation zwischen den *in-line* aufgenommenen Spektren (MIR-, 2DF- und UV/VIS-Spektren) und den *off-line* gemessenen Konzentrationen (Dichte, Stärke usw.) der Zielanalyten (Glucose-, Laktat-, Glutamin-Konzentration, Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl und Anteil apoptotischer Zellen) untersucht. Nachfolgend wurden die Korrelationen in Form von Kalibrationsmodellen dargestellt. Die Modelle dienen hierbei als „Translator“, um die Spektren aus dem Bioprozess in die quantitative Größe des jeweiligen Zielanalyten zu übersetzen. Zum Schluss wurde das „Übersetzungsergebnis“ qualitativ und quantitativ bewertet. Um die Stabilität und Qualität der Modelle besser bewerten zu können, wurde die Prozessüberwachung stets an den Kultivierungsprozessen erprobt, die von der Erstellung der Modelle unabhängig waren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Stärke und die präferierten Anwendungsbereiche der drei spektroskopischen Methoden in der Überwachung von Bioprozessen liegen. Die MIR-Spektroskopie ist eine sensitive Methode vorzugsweise für die Detektion der Rotationsschwingung in den funktionellen Gruppen der organischen Verbindungen. Daher ist sie eine geeignete Methode für die Überwachung der Nährstoffe (Glucose und Glutamin) und des Metaboliten (Laktat). Die 2DF-Spektroskopie eignet sich

insbesondere, um Informationen zu Proteinen, NADH, Vitaminen und Cofaktoren im Bioprozess zu ermitteln. Gemeinsam mit der Möglichkeit zum Erfassen des Streulichtverhaltens während eines Bioprozesses ist die 2DF-Spektroskopie ein guter Kandidat für die Detektion und Überwachung der Gesamtzellzahl und der Lebendzellzahl, die dadurch indirekt beobachtet werden. Die UV/VIS-Spektroskopie mit einem breiten Wellenlängenbereich zur Absorptionsmessung ist in der Lage, Chromophore und die Trübungsveränderung zu detektieren. Daher ist sie geeignet für die Beobachtung an Zellenänderungen, die durch Vermehrung der Zellen und morphologische Veränderungen hervorgerufen werden. CPT hinterlässt in 2DF-Spektren signifikante „Footprints“, was die Interpretation der 2DF-Spektren erschwert. Daher wurde für die Beobachtung der Apoptose die UV/VIS-Spektroskopie eingesetzt, da CPT kaum Einfluss auf die UV/VIS-Spektren hat.

Aufgrund limitierter Anbindungsplätze am Standardprozess (15 L – Edelstahlbioreaktor) konnten nicht alle drei spektroskopischen Methoden gleichzeitig an der Prozessüberwachung eingesetzt werden. Die erste Evaluierung diente der ganzheitlichen Prozessüberwachung, welche durch eine Kombination von MIR- und 2DF-spektroskopischen Sonden realisiert wurde. Die zweite Aufstellung mit 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie fokussierte die vertiefte Betrachtung der Zellzustände, zu denen Zellzahl und Apoptose gehören.

Im Ergebnis des ersten Teils dieser Arbeit zeigten im Rahmen der ganzheitlichen Prozessüberwachung fast alle Kultivierungsprozesse ähnliche Prozessverläufe hinsichtlich der fünf zu untersuchenden CPPs. Dieses Resultat stellte die notwendige Basis für die Modellbildung dar. Weiterhin zeigten sich Variationen in der Prozessführung, unter denen fünf Batch-Prozesse, zwei Fed-Batch-Prozesse und zwei kontaminierten Prozesse waren. Ähnliche Zusammensetzungen der durchgeführten Prozesse wurden im letzten Teil dieser Arbeit im Rahmen der vertieften Prozessüberwachung der Zellzustände mit 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie beobachtet.

Eine der Herausforderungen der ganzheitlichen Prozessüberwachung besteht darin, die wesentlichen Informationen aus der großen Menge an Spektraldaten zu extrahieren, damit tragfähige Modelle für die Beschreibung und Vorhersage der CPPs möglich sind. Ebenso herausfordernd ist die Differenzierung der Modelle, da aus MIR-Spektren drei Modelle für die Überwachung der Glucose, des Laktats und des Glutamins resultieren sowie zwei weitere Modelle aus den 2DF-Spektren für Gesamtzellzahl (TCC) und Lebendzellzahl

(VCC). Die Multimodalität hat den Vorteil, dass sie die geeignetste Methode für die Überwachung verschiedener CPPs auswählt. Ferner könnten sich die Modelle gegenseitig kalibrieren und hybride Modelle wären aus mehreren spektroskopischen Methoden möglich. Ein Prozesswissenszuwachs wäre ebenfalls durch die Multimodalität möglich.

Ein wesentliches Ergebnis der ganzheitlichen Prozessüberwachung mit MIR- und 2DF-Spektroskopie liegt in der Vorhersage aller fünf CPPs bei dem unabhängigen Kultivierungsprozess K08. Alle typischen Verläufe der CPPs konnten vorhergesagt werden. Die Modelle sind somit in der Lage, charakteristische Wendepunkte und die exponentielle Wachstumsphase eines typischen CHO-K1 Zellkultivierungsprozesses zu erkennen und korrekt vorherzusagen. Die Glutamin-Vorhersage weist ein etwas schlechteres Ergebnis auf. Der Verlauf der Vorhersagewerte der Glutamin-Konzentration hat im Vergleich zu anderen CPPs mehr Rauschen. Für die zukünftige Modellerstellung bzw. ein Modell-Update des Glutamins können weitere Datenvorverarbeitungen oder Glättungsmethoden angewandt werden, um einen besseren Verlauf der Vorhersagewerte des Glutamins zu erzielen. Ein weiteres wesentliches Ergebnis der ganzheitlichen Prozessüberwachung stellt eine automatisierte Glucose-Regelung am Ende des Kultivierungsprozesses K08 dar. Mit Hilfe eines Glucose-Vorhersagemodells wurde während des laufenden Prozesses K08 die Glucosekonzentration direkt nach Aufnahme des MIR-Spektrums ermittelt und basierend auf der Vorhersage Glucose hinzufüttert oder nicht. Das Ergebnis zeigte, dass die Regelung gelang und am Ende des Prozesses die Glucose-Zugabe im Rahmen der vorgegebenen Konzentration von 0,5 g/L (vorhergesagter Wert) lag.

In einem weiteren Teilbereich dieser Arbeit wurde eine Methode zur gezielten Apoptose-Induktion in der Zellkultur mit CHO-K1 Zellen entwickelt. Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist einer der wichtigen Zellzustände. Sie ist ein natürlicher Vorgang und ein ständiger Begleiter während eines Zellkultivierungsprozesses. Lediglich der Anteil der Zellen, die sich gerade in der apoptotischen Phase befinden, variiert. Die Methode der gezielten Induktion zur Apoptose in der CHO-K1 Zellkultur soll daher Zellkulturen mit vordefinierter Stärke an Apoptose generieren, damit weitere Untersuchungen an der apoptotischen Zellkultur möglich sind.

Die Apoptose-Messung wurde als Bestimmung des Anteils der apoptotischen Population im Zellkulturprozess definiert. Die Bestimmung wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers anhand der Zellfärbung mit Annexin V und PI durchgeführt.

Aufgrund der einfachen Handhabung wurde Camptothecin (CPT) als Induktionsmittel festgelegt. Das Ergebnis der gezielten Apoptose-Induktion in Schüttelkolbenkulturen zeigte, dass mit drei verschiedenen CPT Konzentrationen (5 μM , 10 μM und 15 μM) in der Zellkultur und zwei Inkubationszeiten (6 und 24 Stunden) insgesamt fünf Apoptose-Stärken (von unter 10% bis über 40% Anteil apoptotischer Zellen) in den Zellkulturen erzielt wurden. Diese Methode bietet die notwendige Basis für die Evaluierung der Beobachtung von Apoptose am Standardprozess im 15 L – Edelstahlbioreaktor mit 2Df- und UV/VIS-Spektroskopie.

Daher wurde die Überwachung des Zellkultivierungsprozesses auf die Zellenzustände ausgedehnt. Modelle wurden für die Vorhersage von Zellzahlen und Apoptose erstellt. Auch bei dieser Untersuchung wurde abschließend ein unabhängiger Kultivierungsprozess zur Validierung und Bewertung der Modelle verwendet.

Die vertiefte Prozessüberwachung auf Zellenzustände bestand aus zwei Teilen. Der erste Teil befasste sich mit dem Vergleich der 2DF- und UV/VIS-spektroskopischen Methoden zur Überwachung der Gesamtzellzahl (TCC) und Lebendzellzahl (VCC). Anhand der Apoptose-induzierten Kultivierungsprozesse behandelte der zweite Teil den Versuch zur Beobachtung der Apoptose-Entwicklung mit UV/VIS-Spektroskopie. Die Multimodalität der verwendeten Methoden wurde somit auf insgesamt drei verschiedenen spektroskopischen Methoden erprobt.

Das Ergebnis des Methoden-Vergleichs zwischen 2DF- und UV/VIS-Spektroskopie zur Überwachung der Zellzahl zeigt, dass die Modelle mit 2DF-Spektren eine bessere Vorhersage als UV/VIS-Modelle bieten. Bis zum Eintritt in die stationäre Phase konnte die Gesamtzellzahl TCC mit hoher Genauigkeit vorhergesagt werden. In der stationären Phase lagen die Vorhersagewerte an TCC höher als die Referenzwerte. Auch mit einer Datenlücke von ca. 13 Stunden in der stationären Phase funktionierte das Vorhersagemodell stabil und konnte die Vorhersage nach der Datenlücke fortsetzen. Hier zeigte sich deutlich die Stärke der spektroskopischen Methode zur Prozessüberwachung. Die RMSEP spielte hier keine große Rolle, da sich nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase die *off-line* Messwerte als offensichtliches Artefakt erwiesen haben. Die Vorhersagewerte an TCC würden besser zum Fortschreiten des Prozesses passen. Mit einem stabilen und zuverlässigen Modell können die den offline Messungen immanenten Messfehler kompensiert werden. Das 2DF-VCC Modell zeigte ein schlechteres Ergebnis durch einen höheren Vorhersagefehler. Das

VCC Modell ist in der Lage, die Sterbephase sehr genau zu beobachten. Dass die 2DF-Spektroskopie sich zur präzisen Zellzahlen-Vorhersage eignet, wurde bereits im Rahmen der ganzheitlichen Prozessüberwachung bewiesen. Hier diene die Vorhersage mit 2DF-Spektraldaten als Referenz zu der UV/VIS-spektroskopischen Methode. Hierbei wird der Vorteil mit mehreren Methoden zur Prozessüberwachung deutlich gezeigt. Die Limitierung einer Methode kann durch Einsatz einer anderen Methode kompensiert werden.

Die Vorhersagewerte von TCC und VCC bei den beiden UV/VIS-Modellen sind niedriger als die Referenzwerte. Der typische Verlauf von TCC konnte gut prognostiziert werden, während die Sterbephase durch die Vorhersage von UV/VIS-VCC Modell nicht zu erkennen war. Die Apoptose-Entwicklung hingegen korreliert gut mit dem Absterben der Zellen. Dadurch dass die UV/VIS-spektroskopische Methode die Sterbephase der Zellen nicht ausreichend beobachtete, wurde die Korrelation zwischen dem Sinken der Lebendzellzahl und der steigenden Apoptose gebrochen.

Die Beobachtung der Apoptose bzw. des Anteils apoptotischer Zellen im Kultivierungsprozess war ein Machbarkeitsversuch, da UV/VIS-Spektren aus nur zwei Apoptose-induzierten Prozessen vorhanden waren. Das Ergebnis der PCA (Engl. *principal component analysis*: Hauptkomponentenanalyse) zeigte, dass die Entwicklung der Apoptose in den Prozessen K10 und K12 einen sehr ähnlichen Verlauf in den ersten zwei Hauptkomponenten aufweist. Durch das Kalibrationsmodell aus K10 konnte die Entwicklung der Apoptose in K12 sehr gut beschrieben werden. Der Versuch der Apoptose-Beobachtung mittels UV/VIS-Spektroskopie war erfolgreich. Somit wurde die ganzheitliche Prozessüberwachung am Standardprozess im 15 L Edelstahlbioreaktor zur Beobachtung von insgesamt sechs Prozessparametern als erfolgreich erwiesen.

Für eine zukünftige Evaluierung der Apoptose-Beobachtung werden jedoch mehr Datensätze benötigt. Des Weiteren können die apoptotischen Zellen aus der gezielten Induktion ebenfalls als Beobachtungsobjekt mit 2DF-Spektroskopie und UV/VIS untersucht werden. Mit Blick auf die Produktivität des Säugetierzelleneinsatzes in der biopharmazeutischen Industrie sollte zudem untersucht werden, in wieweit Apoptose im Bioprozess die Produktivität hindert. Für die zukünftige Forschung kann die Fragestellung zur Regelung der Apoptose-Entwicklung im Bioprozess ebenfalls von Bedeutung sein.

Für die zukünftigen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten könnten die entwickelten Methoden sowohl für „*Scale-up*“ als auch für „*Scale-down*“ Prozesse erprobt werden. Für das „*Scale-up*“ können die Methoden auf größeren industriellen Maßstab überprüft werden, um den Weg der Einsatzmöglichkeit in der Industrie zu ebnen. Des Weiteren ist eine Adaption der Methoden für Single-Use Bioreaktoren interessant, da Single-Use Technologien in der biopharmazeutischen Industrie immer bedeutender werden und die Marktanteile in der Industrie wachsen. Um die Methoden auf Single-Use Technologien zu übertragen, müssen noch einige Herausforderungen gemeistert werden, z.B. die Notwendigkeit eines neuen Anbindungsstrukts und die generelle Limitierung an Sterilisationsmethoden in den Single-Use Technologien etc.

Spannender für die Weiterentwicklung ist die „*Scale-down*“ Variante. Personalisierte Medizin ist ein wichtiges und zukunftsweisendes Thema. Für die individuelle Medizin wird oft eine vollautomatisierte Prozessminiaturisierung verwendet und die gezeigten spektroskopischen Methoden zur Prozessüberwachung können weiterentwickelt werden, damit ein vollautomatisierter Bioprozess möglich ist. Hierbei ist die Multimodalität der spektroskopischen Sensoren gefragt, da mehr Prozessparameter dadurch überwacht werden können. Für den miniaturisierten Bioprozess ist es sinnvoll, sowohl kleine und kompakte als auch multimodal-kombinierte Sensoren für den Einsatz zu entwickeln. Die *Software*-Seite der Entwicklung ist genauso wichtig, da ohne passende Modellerstellung die Methode nicht brauchbar ist. Robuste und übertragbare Modelle, die möglichst validierbar sind, können die Nutzung der Prozessüberwachungsmethode mit Hilfe von Spektroskopie fördern. Die Verallgemeinerbarkeit der Modelle ist ebenfalls von großem Interesse. Ferner könnte eine Sensoren-Plattform von Bedeutung sein, da sie sich selbst überwachen könnte.

Zusammenfassend konnte in Rahmen dieser Arbeit alle drei spektroskopischen Methoden am Zellkulturprozess mit CHO-K1 Zellen für die Überwachung des Prozesses erfolgreich evaluiert werden. Es wurde deutlich, dass die Methoden sowohl Stärken als auch Limitierungen haben, und durch ein Kombinieren der Methoden das Ziel einer ganzheitlichen Prozessüberwachung erreicht werden kann. Eine vertiefte Betrachtung der zellphysiologischen und -morphologischen Zustände bietet Anregung für weitere Fragestellung über die Apoptose. Die evaluierte Methode zur Überwachung des Zellkulturprozesses mittels multimodaler spektroskopischer Sonden kann dazu beitragen,

dass ein weiterer Schritt zum Ziel der *real-time* Prozessüberwachung und Prozessregelung in der FDA PAT-Initiative getätigt ist.

7. Literatur

1. AMGEN (2014) Data From Phase 3 Pivotal Studies Show Amgen's Novel Investigational Cholesterol-Lowering Medication Evolocumab Significantly Reduced LDL Cholesterol In Statin Intolerant Patients And In Patients On Statins. <https://investors.amgen.com/node/12651/pdf>. Accessed 17 May 2021
2. Nejadmoghadam M, Minai-Tehrani A, Ghahremanzadeh R et al. (2019) Antibody-Drug Conjugates: Possibilities and Challenges. *Avicenna J Med Biotechnol* 11(1):3–23
3. Bondi RW, Drennen JK (2011) 5 - Quality by Design and the Importance of PAT in QbD. In: Ahuja S, Scypinski S (eds) *Separation Science and Technology : Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, vol 10. Academic Press, pp 195–224
4. Holm P, Allesø M, Bryder MC et al. (2017) Q8(R2). Wiley Online Books
5. Patil AS, Pethe A (2013) Quality by Design (QbD): A new concept for development of quality pharmaceuticals. *Int J Qual Assur* 4:13–19
6. Roberts J, Power A, Chapman J et al. (2018) The Use of UV-Vis Spectroscopy in Bioprocess and Fermentation Monitoring. *Fermentation*, vol 4
7. Claßen J, Aupert F, Reardon K et al. (2016) Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409. doi: 10.1007/s00216-016-0068-x
8. Werner RG, Noé W, Kopp K et al. (1998) Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung* 48(8):870–880
9. Zhu J (2011) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances* 30:1158–1170. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
10. Dumont J, Eewart D, Mei B et al. (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36(6):1110–1122. doi: 10.3109/07388551.2015.1084266
11. Kim JY, Kim Y, Lee GM (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(3):917–930. doi: 10.1007/s00253-011-3758-5
12. Lalonde M, Durocher Y (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* 251:128–140. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028
13. Xiao Z, Sabourin M, Piras G et al. (2014) Screening and optimization of chemically defined media and feeds with integrated and statistical approaches. *Methods Mol Biol* 1104:117–135. doi: 10.1007/978-1-62703-733-4_9
14. Zhu MM, Mollet M, Hubert RS et al. (2017) Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*:1639–1669. doi: 10.1007/978-3-319-52287-6_29
15. Lai T, Yang Y, Ng SK (2013) Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)* 6(5):579–603. doi: 10.3390/ph6050579

16. Bluma A, Höpfner T, Lindner P et al. (2010) In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(6):2429–2438. doi: 10.1007/s00216-010-4181-y
17. Zhuangrong H, Lee D, Yoon S (2017) Quantitative intracellular flux modeling and applications in biotherapeutic development and production using CHO cell cultures: constraint-based metabolic models in CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 114. doi: 10.1002/bit.26384
18. Pereira S, Kildegaard HF, Andersen MR (2018) Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnol J* 13(3):e1700499. doi: 10.1002/biot.201700499
19. Zamani L, Lundqvist M, Zhang Y et al. (2018) High Cell Density Perfusion Culture has a Maintained Exoproteome and Metabolome. *Biotechnol J* 13(10):e1800036. doi: 10.1002/biot.201800036
20. Warikoo V, Godawat R, Brower K et al. (2012) Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. *Biotechnol Bioeng* 109(12):3018–3029. doi: 10.1002/bit.24584
21. Bielser J, Wolf M, Souquet J et al. (2018) Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. *Biotechnology Advances* 36(4):1328–1340. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.04.011
22. Biechele P, Busse C, Solle D et al. (2015) Sensor systems for bioprocess monitoring. *Engineering in Life Sciences* 15. doi: 10.1002/elsc.201500014
23. Metze S, Ruhl S, Greller G et al. (2020) Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 43(2):193–205. doi: 10.1007/s00449-019-02216-4
24. Faassen SM, Hitzmann B (2015) Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. *Sensors (Basel)* 15(5):10271–10291. doi: 10.3390/s150510271
25. Hesse M, Meier H, Zeeh B (2005) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme
26. Peter R. Griffiths (ed) (2010) *Introduction to the Theory and Instrumentation for Vibrational Spectroscopy: Applications in Life, Pharmaceutical and Natural Sciences*
27. Landgrebe D, Haake C, Höpfner T et al. (2010) On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(1):11–22. doi: 10.1007/s00253-010-2743-8
28. F. O. P. Rosa, B. Cunha, J. G. Carmelo et al. (eds) (2017) Mid-infrared spectroscopy: A groundbreaking tool for monitoring mammalian cells processes. 2017 IEEE 5th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG)
29. Nicholas R Abu-Absi, Richard P Martel, Amanda M Lanza, Stacey J Clements, Michael CBorys, Zheng Jian Li (2014) Application of spectroscopic methods for monitoring of bioprocesses and the implications for the manufacture of biologics

-
30. Paul A, Carl P, Westad F et al. (2016) Towards Process Spectroscopy in Complex Fermentation Samples and Mixtures. *Chemie Ingenieur Technik* 88(6):756–763. doi: 10.1002/cite.201500118
 31. Beutel S, Henkel S (2011) In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(6):1493–1505. doi: 10.1007/s00253-011-3470-5
 32. Esfandiary R, Middaugh CR (2012) *Ultraviolet Absorption Spectroscopy*. Wiley Online Books
 33. Lourenço ND, Lopes JA, Almeida CF et al. (2012) Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404(4):1211–1237. doi: 10.1007/s00216-012-6073-9
 34. Royer CA (1995) Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophys J* 68(3):1191–1195. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80295-X
 35. DUYSENS LN, AMESZ J (1957) Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and visible region. *Biochim Biophys Acta* 24(1):19–26. doi: 10.1016/0006-3002(57)90141-5
 36. Herbert Schneckenburger, Karsten Koenig (1992) Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Optical Engineering* 31(7):1447–1451. doi: 10.1117/12.57704
 37. Marose S, Lindemann C, Scheper T (1998) Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring. *Biotechnol Prog* 14(1):63–74. doi: 10.1021/bp970124o
 38. Eliasson Lantz A, Jørgensen P, Poulsen E et al. (2006) Determination of cell mass and polymyxin using multi-wavelength fluorescence. *J Biotechnol* 121(4):544–554. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.007
 39. Grote B, Zense T, Hitzmann B (2014) 2D-fluorescence and multivariate data analysis for monitoring of sourdough fermentation process. *Food Control* 38:8–18. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.039
 40. Savitzky A, Golay MJE (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36(8):1627–1639. doi: 10.1021/ac60214a047
 41. W. Kessler (2006) *Datenvorverarbeitung bei Spektren*. Wiley Online Books
 42. Bailey LA, Hatton D, Field R et al. (2012) Determination of Chinese hamster ovary cell line stability and recombinant antibody expression during long-term culture. *Biotechnol Bioeng* 109(8):2093–2103. doi: 10.1002/bit.24485
 43. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE et al. (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol* 29(8):735–741. doi: 10.1038/nbt.1932
 44. Mondello C, Scovassi AI (2010) Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. *Subcell Biochem* 50:307–323. doi: 10.1007/978-90-481-3471-7_16
 45. Renehan AG, Bach SP, Potten CS (2001) The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol* 15(3):166–176. doi: 10.1155/2001/164727

-
46. Maślińska D (2003) Apoptosis: physiological cell death and its role in pathogenesis of diseases (Apoptoza--fizjologiczna śmierć komórki oraz jej udział w patogenezie chorób). *Neurol Neurochir Pol* 37(2):315–326
 47. Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3):347–354. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81873-5
 48. White E (1996) Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10(1):1–15. doi: 10.1101/gad.10.1.1
 49. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC et al. (1991) Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112(2):279–288. doi: 10.1083/jcb.112.2.279
 50. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
 51. Zangemeister-Wittke U, Simon H (2001) Apoptosis - Regulation and clinical implications. *Cell Death & Differentiation* 8(5):537–544. doi: 10.1038/sj.cdd.4400844
 52. Battistelli M, Falcieri E (2020) Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)* 9(1):21. doi: 10.3390/biology9010021
 53. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM (2017) Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol* 27(3):172–188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003
 54. Zhang J (2010) *Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production*. Wiley Online Books
 55. Goswami J, Sinskey AJ, Steller H et al. (1999) Apoptosis in batch cultures of Chinese Hamster Ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 62(6):632–640. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990320)62:6<632:AID-BIT2>3.0.CO;2-I
 56. Grilo AL, Mantalaris A (2019) Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances* 37(3):459–475. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.012
 57. Mastrangelo AJ, Betenbaugh MJ (1998) Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *Trends Biotechnol* 16(2):88–95. doi: 10.1016/s0167-7799(97)01159-1
 58. Arden N, Betenbaugh MJ (2006) Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 50:77–92. doi: 10.1007/s10616-006-9008-5
 59. REN Y, XIONG L, WU JR (2003) Induction of mitochondrion-mediated apoptosis of CHO cells by tripchlorolide. *Cell Research* 13(4):295–300. doi: 10.1038/sj.cr.7290174
 60. Pardini C, Vaglini F, Galimberti S et al. (2003) Dose-dependent induction of apoptosis by R-apomorphine in CHO-K1 cell line in culture. *Neuropharmacology* 45(2):182–189. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00152-7
 61. Lu Zhaohong, Zhao Jingyong, Zhu Mingqing et al. (2004) The apoptosis of CHO cells induced by X-rays. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing* 22(5):307–310

-
62. Zhang J, Wang L, Chen H et al. (2014) Effect of Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Artesunate. *AIMS Bioengineering* 1:13–24. doi: 10.3934/bioeng.2014.1.13
 63. Aroui S, Mili D, Brahim S et al. (2010) Doxorubicin coupled to penetratin promotes apoptosis in CHO cells by a mechanism involving c-Jun NH2-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 396(4):908–914. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.020
 64. Miyato Y, Ibuki Y, Ohyama H et al. (2001) Phosphatidylserine induces apoptosis in CHO cells without mitochondrial dysfunction in a manner dependent on caspases other than caspases-1, -3, -8 and -9. *FEBS Lett* 504(1-2):73–77. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02771-5
 65. Wall ME, Wani MC (1996) Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *The American Society of Pharmacognosy Interim Annual Meeting Intellectual Property Rights, Naturally Derived Bioactive Compounds and Resource Conservation* 51(1):239–254. doi: 10.1016/0378-8741(95)01367-9
 66. Sen N, Das BB, Ganguly A et al. (2004) Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death & Differentiation* 11(8):924–936. doi: 10.1038/sj.cdd.4401435
 67. Zagari F, Jordan M, Stettler M et al. (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology* 30(2):238–245. doi: 10.1016/j.nbt.2012.05.021
 68. Lu S, Sun X, Zhang Y (2005) Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. *Process Biochemistry - PROCESS BIOCHEM* 40:1917–1921. doi: 10.1016/j.procbio.2004.07.004
 69. Vergara M, Torres M, Müller A et al. (2018) 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(8):e0202098. doi: 10.1371/journal.pone.0202098
 70. Sandor M, Rüdinger F, Solle D et al. (2013) NIR-spectroscopy for bioprocess monitoring & control. *BMC Proceedings* 7:P29. doi: 10.1186/1753-6561-7-S6-P29
 71. Mulukutla BC, Gramer M, Hu W (2012) On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metab Eng* 14(2):138–149. doi: 10.1016/j.ymben.2011.12.006
 72. Wahrheit J, Nicolae A, Heinzle E (2013) Investigation of glutamine metabolism in CHO cells by dynamic metabolic flux analysis. *BMC Proc* 7(Suppl 6):P44-P44. doi: 10.1186/1753-6561-7-S6-P44
 73. Sun X, Zhang Y (2004) Glutamine cannot support recombinant CHO cell growth and maintenance in the absence of glucose. *Process Biochemistry - PROCESS BIOCHEM* 39:719–722. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00182-1
 74. Dyring C, Hansen HA, Emborg C (1994) Observations on the influence of glutamine, asparagine and peptone on growth and t-PA production of Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Cytotechnology* 16(1):37–42. doi: 10.1007/BF00761777

-
75. Kambayashi T, Noguchi T, Nojima A et al. (2020) Glucose Monitoring in Cell Culture with Online Ultrasound-Assisted Near-Infrared Spectroscopy. *Anal. Chem.* 92(4):2946–2952. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03354
 76. Rowland-Jones RC, van den Berg F, Racher AJ et al. (2017) Comparison of spectroscopy technologies for improved monitoring of cell culture processes in miniature bioreactors. *Biotechnol Prog* 33(2):337–346. doi: 10.1002/btpr.2459
 77. Aehle M, Schaepe S, Kuprijanov A et al. (2011) Simple and efficient control of CHO cell cultures. *J Biotechnol* 153(1-2):56–61. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.006
 78. Khattak SF, Xing Z, Kenty B et al. (2010) Feed development for fed-batch CHO production process by semisteady state analysis. *Biotechnol Prog* 26(3):797–804. doi: 10.1002/btpr.362
 79. Butler M, Spearman M, Braasch K (2014) Monitoring cell growth, viability, and apoptosis. *Methods Mol Biol* 1104:169–192. doi: 10.1007/978-1-62703-733-4_12
 80. Krampe B, Al-Rubeai M (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology* 62(3):175–188. doi: 10.1007/s10616-010-9274-0
 81. Moore A, Donahue CJ, Hooley J et al. (1995) Apoptosis in CHO cell batch cultures: examination by flow cytometry. *Cytotechnology* 17(1):1–11. doi: 10.1007/BF00749215
 82. BD BioSciences Annexin V Staining Protocol: General Annexin V Staining Procedure. <https://www.bdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/multicolor-flow-cytometry/annexin>. Accessed 08 May 2021
 83. Ishaque A, Al-Rubeai M (2007) Measurement of Apoptosis in Cell Culture. In: Pörtner R (ed) *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 285–299
 84. Galvao J, Davis B, Tilley M et al. (2013) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28. doi: 10.1096/fj.13-235440
 85. Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45(3):528–537. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00384-3
 86. Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K et al. (2002) The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal* 8(5):375–391. doi: 10.1017/S1431927602010346
 87. Luthria DL, Mukhopadhyay S, Lin L et al. (2011) A comparison of analytical and data preprocessing methods for spectral fingerprinting. *Appl Spectrosc* 65(3):250–259. doi: 10.1366/10-06109
 88. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S et al. (2013) Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 8:983–993. doi: 10.2147/IJN.S42028
 89. Jawaid P, Rehman MU, Zhao Q et al. (2020) Small size gold nanoparticles enhance apoptosis-induced by cold atmospheric plasma via depletion of intracellular GSH and modification of oxidative stress. *Cell Death Discovery* 6(1):83. doi: 10.1038/s41420-020-00314-x

90. Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S et al. (2019) Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy* 15(1):4–33. doi: 10.1080/15548627.2018.1509171
91. Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H et al. (2013) Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner. *PLOS ONE* 8(6):e65704-e65704. doi: 10.1371/journal.pone.0065704
92. Lücking T (2015) Entwicklung einer universellen Bypass-Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen. Dissertation, Leibniz Universität Hannover
93. Khan K, Elia M (1991) Factors affecting the stability of L-glutamine in solution. *Clinical Nutrition* 10(4):186–192. doi: 10.1016/0261-5614(91)90037-D
94. P.B. Raghavendra, Chapter 3 - Camptothecin and analogs: role in anticancer activities, Editor(s): T. Pullaiah, P.B. Raghavendra, S. Karuppusamy, V. Raveendran, M. Anuradha, *Camptothecin and Camptothecin Producing Plants*, 2020
95. Nelson EM, Tewey KM and Liu LF (1984) Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1361 – 1365
96. John M. Hinz, Thomas Helleday, Mark Meuth, Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3, *Carcinogenesis*, Volume 24, Issue 2, February 2003, Pages 249–253
97. Werner Schmidt, *Optische Spektroskopie*, 2. Auflage Januar 2000, ISBN: 978-3-527-29828-0, Wiley-VCH, Weinheim
98. Schmid, F.-X. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. In eLS, (Ed.).
99. Illarionova, E.A., Illarionov, A.I. & Nikonovich, O.L. UV absorption spectra and the physical nature of the optical properties of pyridoxine hydrochloride. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 81, 1269–1272 (2017).
100. Schulmann, S. G. (1985): *Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications*, Chemical Analysis Vol. 77. S. 170-177.
101. Dursun Delen & Sudha Ram (2018) Research challenges and opportunities in business analytics, *Journal of Business Analytics*, 1:1, 2-12
102. Deshpande P.S., Sharma S.C., Peddoju S.K. (2019) Predictive and Prescriptive Analytics in Big-data Era. In: *Security and Data Storage Aspect in Cloud Computing. Studies in Big Data*, vol 52. Springer, Singapore.
103. Shi-Nash, A. and Hardoon, D.R. (2017). DATA ANALYTICS AND PREDICTIVE ANALYTICS IN THE ERA OF BIG DATA. In *Internet of Things and Data Analytics Handbook*, H. Geng (Ed.).

8. Anhang

8.1 Material und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sind in den untenstehenden Tabellen aufgelistet.

Bezeichnung	Produkt	Firma/Bezugsquelle
15 L Edelstahlbioreaktor	BIOSTAT [®] Cplus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
2D Fluoreszenzspektrometer	BioView [®]	DELTA, Horsholm, Dänemark
Annexin V		Roche, Basel, Schweiz
Arium [®] 661 Ultrapure water system		Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Aseptische Konnektor	BioWelder [®]	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
ATR-Sonde Diamant 2x Reflexion		art photonics GmbH, Berlin
Autoklav	Systec V-150	Systec GmbH, Wettbergen
Bovine Serum Albumin		Sigma Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma Aldrich, München
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Flow Cytometry EPICS XL-MCL	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Feed-Medium	CHOMACS Feed Supplement	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Feinwaage	MC1	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Filter (DMSO beständig)	Minisart [®] RC15 Syringe Filter 17761	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Hypoxanthin/Thymidin für Medium	Gibco [®] HAT Supplement 100x	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ingold-Probenahme-Ventil	SVC25	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Bezeichnung	Produkt	Firma/Bezugsquelle
Inkubator	HERACell 240, CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
L-Glutamin	L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin
MATRIX-MF MIR Spektrometer mit Cryocooler		Bruker Optik GmbH, Ettlingen
MVDA Software	Unscrambler® v.10.1	CAMO Software, Oslo, Norwegen
Natriumhydrogencarbonat		Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid		Merck, Darmstadt
pH-Elektrode	EASYFERM Plus	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Plastikschüttelkolben	250 mL / 500 mL	Corning, Tewksbury, USA
pO ₂ -Sonde	OXYFERM FDA	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Präzisionswaage Extend		Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Propidium iodide (PI)		Sigma Aldrich, München
Sacova-Ventil	Safe Coupling Valve	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Silikonschlauch	ID 4 mm & OD 8 mm	VWR
Software Bioprocess Datenbank	SIPAT	Simens Inc., Brussels, Belgien
TPE Schlauch	C-Flex Clear 082, 3/16“ x 5/16“	Saint-Gobain, Courbevoie, France
UV/VIS Spektrometer		J & M Analytik AG, Essingen
Vortex-Mixer	VM-300	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
YSI Biochemischer Analysator	2950	KREIENBAUM Wissenschaftliche Messsysteme e.K., Langenfeld
Zellkulturmedium	CHOMACS CD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zelllinie	CHO-K1-HP	AG Zellkulturtechnik, Uni Bielefeld
Zellzähler	Cedex	Roche, Penzberg

8.2 Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden vorgestellt.

8.2.1 Bioreaktorkultivierungen

Hier werden die Durchführungsmethoden der Vorkultur und des Hauptkultivierungsprozesses vorgestellt. Die Vorkulturen werden in Schüttelkolben im Inkubator aufgezogen. Der Hauptkultivierungsprozess findet im Edelstahlbioreaktor statt.

8.2.1.1 Ansetzen der Vorkultur

Aus der vorbereiteten working cell bank wird eine CHO-K1-HP Kultur aufgetaut. In einen Schüttelkolben wird die aufgetaute Kultur in CHOMACS CD-Medium mit 8 mM L-Glutamin und 1% HAT kultiviert. Bei einer Zellkonzentration von ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL erfolgt das Passagieren mit frischem Medium. Nach dem Passagieren hat die neue Kultur eine Zelldichte von $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen/mL. Zwei Passagen sind notwendig vor der Inokulation in den Bioreaktor.

8.2.1.2 15 Liter Bioreaktorkultivierung

Am Tag vor der Inokulation wird der 15 L Edelstahlbioreaktor autoklaviert und vorbereitet. Alle benötigten Gefäße und Schläuche werden ebenfalls autoklaviert und vorbereitet werden. Das Sterilisationsprogramm am Bioreaktor verläuft automatisiert.

Sechs Liter CHOMACS CD-Medium, 300 mL aufgetautes L-Glutamin und 75 mL HT werden steril in den autoklavierten Bioreaktor gegeben. Der Bioreaktorinhalt wird auf die Temperatur von 37 °C aufgeheizt. Bevor die Vorkultur in den Bioreaktor gegeben wird, werden Spektrum von MIR-, 2DF- und UV/VIS-Spektrometer aufgezeichnet für die Analyse und Modellerstellung. Durch Berechnung wird das Volumen der benötigten Vorkultur bestimmt. Die Zellzahl des Bioreaktor soll zum Zeitpunkt der Innokulation ca. $4 - 5 \cdot 10^5$ sein. Die Differenz an Medium wird dem Bioreaktor zugeführt. Die Zugabe von Vorkultur und auch Feed-Medium während des Kultivierungsprozesses erfolgt über das Sacova-Ventil.

In der Tabelle 4 zeigt Informationen über die Kultivierungsbedingungen im 15 L – Edelstahlbioreaktor.

Tabelle 4: Kultivierungsbedingungen im 15 L - Edelstahlbioreaktor

Parameter	Eigenschaft
Kultivierungsmedium	CHOMACS CD und 8 mM L-Glutamin und 1 % HT
Rührerdrehzahl	100 – 200 rpm (pO ₂ -Regelung)
Rührwerk	Schrägblatt-Rührer, Rushton Tubine
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7,1
pH-Regelung	Säure: CO ₂ / Base: 1 M Na ₂ CO ₃
Begasung	40% Luftsättigung; Gemisch aus Luft und reinem Sauerstoff
Überdruck	0 bar

8.2.2 Analyse der offline Proben aus 15 L – Edelstahlbioreaktor

Hier wird die offline Analytik von den Proben zur Bestimmung der Analytenkonzentration und Zellzahlen vorgestellt.

8.2.2.1 Manuelle Probenahme (Tagesüber)

Die manuelle Probenahme erfolgt über ein Probenahmeventil, das dampfsterilisierbar ist. Nach jeder Probenahme wird es für 15 Minuten dampfsterilisiert. Die erste 15 mL Probe aus dem Bioreaktor wird verworfen, damit keine Reste des Kondensats von der Dampfsterilisation die Probe verwässert. Danach werden 15 mL aufgefangen und für unterschiedliche offline Analyse verwendet. Nach der Probenahme wird das Ventil verschlossen und dampfsterilisiert. Die manuelle Probenahme wird tagesüber von Experimentatoren durchgeführt. In der Nacht werden die Proben über ein automatisches System entnommen [92].

8.2.2.2 Vorbereitung der Nachtsproben am Tag danach

Es wurde ein automatisiertes Probenahmesystem mit einem gekühlten Autosampler als Ablagerungsort von Dr. Tim Lücking für die über Nacht entnommenen Proben entwickelt [92]. Jede Probe befindet sich in einem 15 mL Probenröhrchen, die mit ein Stück Parafilm bedeckt ist. Die Nadel am Autosampler durchsticht den Parafilm bevor die Probe ins Röhrchen gegeben wird. Für die offline Analyse werden alle Nachtsproben durch hoch und runter pipettieren am Tag danach sanft suspendiert. Die absedimentierten Zellen werden resuspendiert und es wird sichergestellt, dass keine Reste der Zellen an der Innenwand des Röhrchens haften bleiben.

8.2.2.3 Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen

Die Konzentrationsmessung der Glucose, des Laktats, des Glutamins und des Glutamats wird durch einen Biochemischen Analysator YSI 2950 realisiert. Das YSI 2950 kann zwei Analyten-Paare detektieren. Die Proben für Glutamin und Glutamat werden eingefroren und

nach dem Kultivierungsprozess gesammelt vermessen. Die Instabilität des Glutamins ist ein weiterer Grund für die Lagerung in gefrorenem Zustand [93].

Für die Glucose- und Laktatbestimmung sind die Proben unverdünnt. Dadurch dass bei Glutamin eine maximale Detektierbarkeit existiert, werden die Glutaminproben verdünnt gemessen. Die maximale Detektierbarkeit für Glutamin beträgt ca. 1,1 g/L. Der ideale Messbereich für Glucose liegt bei ca. 1,8 g/L und für Laktat bei ca. 1,5 g/L.

Der biochemische Analysator YSI 2950 führt eine automatische Kalibrierung des Systems alle fünf Messungen durch. Jede Probe wird dreifach bestimmt.

8.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Messung am automatischen Zellzähler Cedex basiert auf Bildanalyse durch Mikroskop-Aufnahmen. Die Zellen werden mit Trypanblau angefärbt. Die Lebendzellen werden nicht angefärbt während der toten Zellen angefärbt sind. Die aufgenommenen Bilder von den Zellen werden ausgewertet. Die Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl, Viabilität werden so ermittelt.

Insgesamt werden 30 Bilder pro Messung aufgenommen. Des Weiteren erfolgte bei den Proben eine Dreifachbestimmung, um statistisch abgesicherte Ergebnisse zu bekommen. Die Proben zur Zellzahlbestimmung werden mit 1 x PBS verdünnt, sobald die Zellzahl 10 Millionen Zellen/mL erreicht, damit die Bildanalyse zuverlässig funktioniert.

8.2.3 Anbindung und Messung mit spektroskopischen Sensoren

Hier wird die Anbindung der drei spektroskopischen Sensoren am Standardprozess beschrieben.

8.2.3.1 MIR-spektroskopischer Sensor

Für die Überwachung des CHO-Kultivierungsprozesses werden MIR-Spektren im Wellenzahlbereich von 3000 cm^{-1} bis 650 cm^{-1} mit einem Matrix-MF (Brunker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) aufgenommen. Jedes Spektrum hat 1193 Datenpunkten. Die Aufnahme der Spektren erfolgt mit der Software Opus (Ver. 6.5, Brunker Optik GmbH). Eine Subtraktion des Single Beam-Spektrums vom Medienspektrum bildet die Absorptionsspektren. Die Berechnung erfolgt durch Gleichung 5.

$$AB = \log \left(\frac{I_M}{I_P} \right) = \log(I_M) - \log(I_P) \quad \text{(Gleichung 5)}$$

$$\begin{aligned} AB &= \text{Absorptionsspektrum} \\ I_M &= \text{Medienspektrum} \\ I_P &= \text{Probenspektrum} \end{aligned}$$

Medienspektren werden vor der Inokulation und vor der Zugabe des L-Glutamins durchgeführt. Durch die Vorverarbeitung werden die Eigenabsorption des Spektrometers und des Mediums abgezogen. Pro Spektrum werden 1000 Einzelaufnahmen über etwa 2 min mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Geschwindigkeit von 80 kHz getätigt. Aus deren Durchschnitt wird das Single Beam-Spektrum ermittelt. Eine ATR-Sonde (artphotonics GmbH, Berlin, Deutschland) ist an das Spektrometer gekoppelt. Diese ist über einen Ingold-Port am Bioreaktor angebracht. Der Lichtleiter misst ca. 1,2 m und besteht aus Silberhalogenid. Diamant wird für das ATR-Element verwendet, das eine Eigenabsorption bei 2000 cm^{-1} hat. Ein MCT-Detektor ist außerdem im Einsatz, der mit einem Peltier-Element gekühlt wird. Das MIR-Spektrometer wird dauerhaft mit Stickstoff gespült. Dieses entfernt Wasserdampf und Kohlenstoffdioxid aus dem Spektrometer, das sonst starke Störsignale bei 2350 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} liefern würde. Die Spülung ist mit einer Geschwindigkeit von 10 mL/min durchgeführt.

8.2.3.2 2DF-spektroskopischer Sensor

Ein BioView-Fluoreszenzspektrometer (DELTA Light & Optics, Hørsholm, Dänemark) wird für die Prozessüberwachung am Standardprozess eingesetzt. Für die Exzitation werden die Wellenlängen 270 - 550 nm mit einer Bandweite von 20 nm genutzt. Bei jeder Anregungswellenlänge wird das Fluoreszenz-Emissions-Spektrum aufgenommen, wodurch eine zweidimensionale Matrix entsteht. Für die Emission wird ebenfalls eine Bandweite von 20 nm im Wellenlängenbereich von 310 nm - 590 nm verwendet. Außerdem wird für jede Anregungs- und Emissionswellenlänge eine Messung über einen Neutraldichte-Filter durchgeführt. Diese dienen zur Messung der Transmission oberhalb von 450 nm zur Anregung (*exnd*) bzw. des wellenlängenunabhängigen Streulichts (*emnd*). Somit werden zweimal 16 Filter benötigt, die sich auf zwei voneinander unabhängigen rotierenden Filterrädern befinden. Dadurch entstehen 150 Filterkombinationen, aus denen sich ein 2D-Spektrum zusammensetzt. Als Lichtquelle wurde eine hoch-stabile Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan) benutzt. Ein Photomultiplier wurde für die Detektion eingesetzt. Der BioView-Sensor ist mit einem Flüssiglichtleiter direkt an den Bioreaktor gekoppelt. Die Sensoreinstellung und die Datenerfassung erfolgt über das Programm BioView5 (DELTA Light & Optics, Hørsholm, Dänemark). Für die Datenaufnahme wird die Sensitivität auf „High“ und der Gain auf 850 eingestellt. Eine Dreifachbestimmung wird für jedes Spektrum durchgeführt, die innerhalb von 1,5 min vermessen werden. Alle 3 min wird während des Zellkultivierungsprozesses ein 2DF-Spektrum aufgenommen. Ein Medienspektrum wird zusätzlich vor der Inokulation aufgenommen.

8.2.3.3 UV/VIS-spektroskopischer Sensor

Der UV/VIS Spektrometer (J & M Analytik AG, Essingen) hat einen Detektionsbereich von 190 – 720 nm. Die spektrale Auflösung ist unter 7 nm. Als Anregung wird eine D₂/Halogen Breitbandanregungsquelle verwendet.

Der Spektrometer wird über eine Transmissionssonde (Excalibur XP 25, Hellma Analytics GmbH, Mülheim), der einen Messspalt von 1 mm hat, an den Bioreaktor angebunden. Das

Software TidasDAQ3 (J & M Analytik AG, Essingen) wird verwendet, um das UV/VIS-Spektrometer anzusteuern.

8.2.4 Untersuchung auf Zellschaden mit 0,5 % V/V DMSO

Vier Schüttelkolbenkulturen (je 23 mL) wurden frisch aus einer gleichen Vorkultur angesetzt. Nach ca. einem Tag hatten alle vier Kulturen eine Zelldichte von 12 – 14 Millionen Zellen/mL. Bei 23 h nach Kulturstart wurde 115 µL DMSO (0,5 % V/V) in die Kultur 1 gegeben. 115 µL einer 0,1 M CPT Stammlösung (gelöst in DMSO) wurde in die Kultur 3 und 4 gegeben. Als negative Kontrolle wurde 115 µL ddH₂O in die Kultur 2 gegeben.

Alle vier Schüttelkolbenkulturen wurden weiter in CO₂ Inkubator kultiviert. Zu Zeitpunkten 25h und 68h nach der Zugabe wurde jeweils eine Probe aus den Kulturen genommen und analysiert. Die TCC und VCC wurden bestimmt. Das Ergebnis ist im Kapitel 4.2 dargestellt.

8.2.5 Mittelwertkorrektur (Vorverarbeitung MIR- und UV/VIS-Spektren)

Eine Mittelwertkorrektur wurde bei den Rohdaten von MIR- und UV/VIS Spektren durchgeführt (Kapitel 3.3 und Kapitel 5.4). Das Rohspektrum wird wie unten vereinfacht dargestellt. Der Index n steht für Anzahl der gesamten Spektren und der Index i steht für Anzahl der Werte innerhalb eines Spektrums (Anzahl Wellenzahlen oder Wellenlänge).

$$X_n = (x_{n1}, x_{n2}, x_{n3} \dots x_{ni}) \quad (\text{vereinfachtes Rohspektrum})$$

Die Mittelwertkorrektur erfolgt nach der Gleichung 6.

$$x'_{ni} = x_{ni} - \bar{x}_n \quad (\text{Gleichung 6})$$

Innerhalb eines Spektrums wird der Mittelwert \bar{x} bei allen Werten x_{ni} abgezogen da mit das verarbeitete Spektrum X'_n für die weitere Auswertung entsteht.

8.2.6 Berechnung der RMSE

Die Fehlerangabe in der multivariaten Datenanalyse wird mit dem mittleren Fehler (RMSE – Engl. *root mean square error*) realisiert. Die Berechnung erfolgt durch die Gleichung 7:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (\text{Gleichung 7})$$

In der Ergebnisauswertung dieser Arbeit wurden RMSEC (Fehler der Kalibration) und RMSEP (Fehler der Vorhersage) berechnet. Der mittlere Fehler wird aus den Referenzwerten y , den aus Modellen berechneten Vorhersagewerten \hat{y} und Anzahl der Proben n berechnet.

8.3 Assay „Gezielte Apoptose-Induktion in Schüttelkolbenkultur von CHO-K1 Zellen“

Ziel

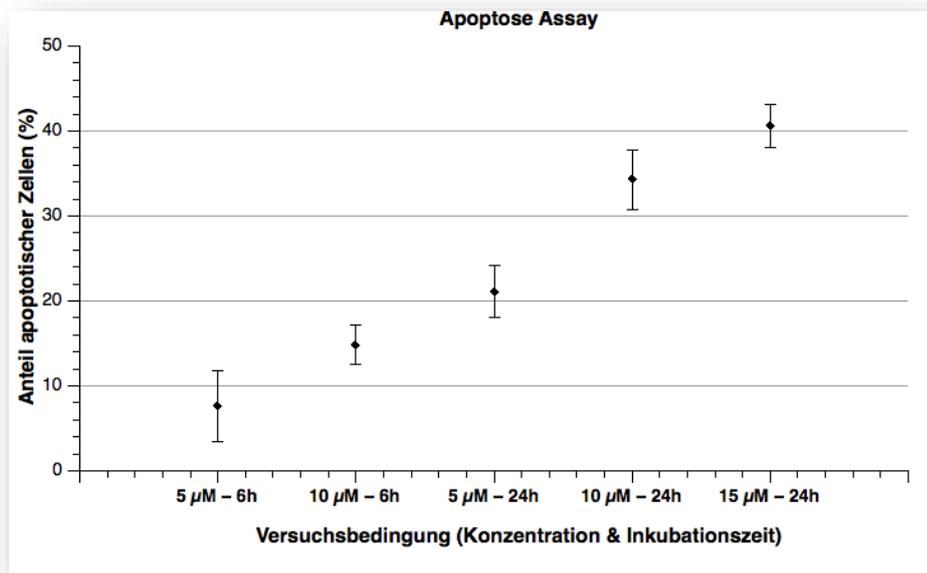
Durch den Apoptose-Assay soll es ermöglicht werden, dass ein definierter Anteil der CHO-Zellen in Schüttelkolbenkulturen in den apoptotischen Zustand übergeht.

Vorbereitungen

- 1) CHO Zellen als Schüttelkolbenkultur
- 2) Camptothecin (CPT) Stammlösung 16mM (27.8mg CPT gelöst in 5mL DMSO, danach steril filtrieren – Sartorius Minisart® RC15 Syringe Filter 17761 oder ähnliche Filter, die DMSO beständig sind.)
- 3) Färbelösung: 1mL 1xAnnexin Bindepuffer + 20µL Annexin + 5µL PI

Durchführung (Induktion mit Camptothecin)

- 1) Je 30mL CHO Zellsuspensionskultur der gewünschten Zellzahl (beispielsweise $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL oder $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL) werden aus der Mutterkultur in zwei Schüttelkolben gegeben.
- 2) In einen Kolben wird eine 16mM Camptothecin Stammlösung bis zur gewünschten Konzentration dazugegeben. (z.B. Endkonzentration: 16µM - 30µL von der Stammlösung in die 30mL Kultur).
- 3) Verschiedene Apoptose-Stärken werden mit folgenden Ergebnis (Kapitel 4.2 und Abbildung 23) erreicht.



Unter 10% apoptotische Zellen bei 5µM CPT nach 6h

Um die 15% apoptotische Zellen bei 10µM CPT nach 6h

Knapp über 20% apoptotische Zellen bei 5µM CPT nach 24h

Um die 35% apoptotische Zellen bei 10µM CPT nach 24h

Knapp über 40% apoptotische Zellen bei 15µM CPT nach 24h

- 4) Der zweite Kolben dient als Negativkontrolle und wird nicht mit Camptothecin behandelt.
- 5) Die Kolben werden bei 37°C, 5% CO₂ in Zellkultur Brutschrank inkubiert.

Durchführung (Vorbereitung für die Durchflusszytometer-Analyse)

- 1) Nach 6 oder 24h wird 1mL Zellsuspension aus der Kultur zur Analyse entnommen.
- 2) Die Zellen werden zweimal jeweils mit 1mL kalten 1x PBS Puffer gewaschen und pelletiert.

- 3) Das Zellpellet mit 100 μ L Färbelösung wird sanft resuspendieren (leicht hoch und runter pipettieren, Scherstress soll vermieden werden). Die Röhrchen werden mit Alufolie abgedunkelt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubieren.

- 4) Nach der Inkubation wird 400 μ L 1x Annexin Bindepuffer dazugeben und die Proben für die Durchflusszytometrie bereitgestellt.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze eines CHO-Kultivierungsprozesses im Bioreaktor mit Taxonomie von Prozess-sensoren: inline, atline, offline und durch Bypass-System [17]	6
Abbildung 2: Spektralbereich für Bioprozessüberwachung mit detektierbaren Prozessvariablen [22]	10
Abbildung 3: IR-Spektroskopie Messmethoden Transmission und ATR.....	12
Abbildung 4: Strukturformel (S)-(+)-Camptothecin, Summenformel $C_{20}H_{16}N_2O_4$	21
Abbildung 5: Verlauf der Glucosekonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)	24
Abbildung 6: Verlauf der Laktatkonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08).	24
Abbildung 7: Verlauf der L-Glutaminkonzentration der Kultivierungsprozesse (K01 – K08).....	24
Abbildung 8: Verlauf der Gesamtzellzahl TCC der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)	25
Abbildung 9: Verlauf der Lebendzellzahl VCC der Kultivierungsprozesse (K01 – K08)	25
Abbildung 10: Beispiel einer Mittelwertkorrektur anhand von drei MIR Spektren (vorher und nachher), durch die Mittelwertzentrierung bleiben die Peakhöhe-Information ohne Verlust für weitere Evaluierung.	28
Abbildung 11: MIR-Spektren von drei niedermolekularen CPPs (Glucose, Laktat und Glutamin) am Standardprozess (zur Verfügung gestellt von Dr. Marko Sandor).....	30
Abbildung 12: PLS-Kalibrationsmodelle von Glucose, Laktat und L-Glutamin (Referenz- und Vorhersage-Konzentration)	31
Abbildung 13: Glucose-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Glucose-Reinstoffspektrum (MIR)	33
Abbildung 14: Laktat-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Laktat-Reinstoffspektrum (MIR).....	34
Abbildung 15: Glutamin-Regressionskoeffizienten im Vergleich zu Glutamin-Reinstoffspektrum (MIR)	34
Abbildung 16: PLS-Kalibrationsmodelle von TCC und VCC (Referenz und Vorhersage)	37
Abbildung 17: Vergleich der Regressionskoeffizienten von TCC- und VCC-Modell.	37
Abbildung 18: Vorhersagen aller fünf CPPs während des Kultivierungsprozesses K08...	39

Abbildung 19: Automatisierte Glucose-Zugabe beim Kultivierungsprozess K08.....	42
Abbildung 20: Morphologie der CHO-K1 Zellen nach Zugabe von CPT in einer Schüttelkolben-Kultur (links oben.: gesund; links unten: früh apoptotisch; rechts: fortgeschritten apoptotisch)	46
Abbildung 21: Ergebnis der Analyse nach Messung an einem Durchflusszytometer (CHO-K1 Zellen mit Annexin V und PI Färbung).....	47
Abbildung 22: Ergebnis der Untersuchung auf Zellschaden mit 0,5 % V/V DMSO.	49
Abbildung 23: Ergebnis – gezielte Induktion von Apoptose in Schüttelkolbenkulturen...	50
Abbildung 24: Verlauf der Gesamtzellzahl TCC der Kultivierungsprozesse (K09 – K13)	53
Abbildung 25: Verlauf der Lebendzellzahl VCC der Kultivierungsprozesse (K09 – K13)	53
Abbildung 26: Verlauf der Viabilität (zusammengesetzt aus VCC und TCC) der Kultivierungsprozesse (K09 – K13).....	53
Abbildung 27: Verlauf der apoptotische Anteil der Zellen in Prozess K10 und K12.....	55
Abbildung 28: PLS Modelle für TCC (links: Modell basiert auf 2DF Spektren; rechts: Modell basiert auf UV/VIS Spektren).....	59
Abbildung 29: Vorhersage der TCC am K13 mit 2DF- und UV/VIS-Modell.....	60
Abbildung 30: PLS Modelle für VCC (l.: Modell basiert auf 2DF Spektren; r.: Modell basiert auf UV/VUS Spektren).....	61
Abbildung 31: Vorhersage der TCC am K13 mit 2DF- und UV/VIS-Modell.....	62
Abbildung 32: Rohdaten der 2DF- und UV/VIS-Spektren vor und nach Zugabe von CPT (Camptothecin) – (oben: 2DF Spektren, CPT hinterlässt große Footprints; unten: UV/VIS Spektren, CPT im Bioprozess hat keinen deutlichen Einfluss auf die Spektren.).....	64
Abbildung 33: Hauptkomponentenanalyse von UV/VIS Spektren aus K10 und K12. A) Alle Spektren wurden berücksichtigt. B) Nur Spektren nach der Apoptose-Induktion wurden berücksichtigt.	67
Abbildung 34: Kalibrationsmodelle aus UV/VIS – Induzierte Apoptose (l.: Daten aus K10 & K12; r.: Daten aus K10)	68
Abbildung 35: Vorhersage von Anteil apoptotischer Zellen im Prozess K12. Der Verlauf der Apoptose-Entwicklung konnte mit dem Modell aus Apoptose-Entwicklung von K10 vorhergesagt werden.....	69

Abbildung 36: Regressionskoeffizienten bei PLS-Modell Apoptose (A) (basiert auf apoptotische Spektren von K10) und PLS-Modellen TCC & VCC (B) (basiert auf K09, K10 – nicht apoptotisch, K11 und K12 – nicht apoptotisch). 70

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Shaobin Mike Lu
Geburtstag und -ort: 01.12.1984 / Shenzhen, Guangdong (CHINA)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische und akademische Ausbildung

01/2016 – 07/2016 Sprachstudent, Persisch (Mittelstufe)
Dehkhoda Institute, University of Tehran, Teheran, IRAN

01/2013 – 12/2015 Promotionsstudent/ Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Technische Chemie
Leibniz Universität Hannover, Hannover, DEUTSCHLAND

04/2012 – 11/2012 *Erasmus*-Programm – Masterarbeit im Ausland
Università degli Studi di Milano, Mailand, ITALIEN

02/2011 – 04/2011 Forschungspraktikum im Ausland
TECHNION, Haifa, ISRAEL

10/2010 – 11/2012 Masterstudium *Life Science, M.Sc.*
Leibniz Universität Hannover, Hannover, DEUTSCHLAND

08/2019 – 06/2010 Auslandssemester/ *Chemical Engineering*
Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA

10/2006 – 08/2019 Bachelorstudium *Life Science, B.Sc.*
Leibniz Universität Hannover, Hannover, DEUTSCHLAND

08/2005 – 06/2006 Fachgebundene Hochschulreife
Studienkolleg Hannover, Hannover, DEUTSCHLAND

Publikation

Lüder C., Lindner P., Bulnes-Abundis D., **Lu S. M.**, Lücking T. H., Solle D. & Scheper T. (2014). In situ microscopy and MIR-spectroscopy as non-invasive optical sensors for cell cultivation process monitoring. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(2), 157 – 166. Doi: 10.2217/PBP.14.13