

**Entwicklung und Erprobung eines  
membranbasierten Perfusionsbioreaktors für  
die industrielle Produktion fragiler  
biopharmazeutischer Wirkstoffe in Zellkulturen**

Vom Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg-Harburg  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieurin  
genehmigte Dissertation

von  
Silke Rieck  
(geb. Langhammer)

aus Greiz

2011

Vorsitzender des

Prüfungsausschusses:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich

Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

Prof. Dr.Dr.h.c. Frerich Keil

Dr. med. Uwe Marx

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Oktober 2011

---

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2003 bis 2011 in Kooperation der ProBioGen AG Berlin mit der TU Hamburg-Harburg und der Charité Universitätsmedizin Berlin. Die Arbeit wurde finanziert von der ProBioGen AG Berlin und dem BMBF im Rahmen des InnoProfile Projektes „Glykodesign und Glykoanalytik“.

Mein erster Dank gilt Dr. Uwe Marx, damals Forschungsvorstand der ProBioGen AG, für die Möglichkeit im Rahmen des Bioreaktorprojektes zu promovieren. Weiterhin danke ich Uwe Marx für die interessanten Gespräche und wertvollen Anregungen während des Projektes und für die Übernahme einer Gutachtertätigkeit für meine Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner für die Betreuung meiner Arbeit danken, für sein Engagement und die interessanten Diskussionsbeiträge in den Projektmeetings sowie für die positiven Anregungen zur Finalisierung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Frerich Keil danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr.-Ing. Stefan Heinrich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein spezieller Dank geht an Herrn Richard Ammer für die manuelle Fertigung unzähliger Bioreaktorprototypen. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern im Labor, Konstanze Bergner, Dorothee Riewaldt, Henry Woischnig und Michael Sacharjat sowie den Praktikantinnen Anke Wellmann und Sylvia Förster. Sie alle haben geholfen, Prozessdaten zu erheben und somit ihren Teil zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich Susann Koch, Dr. Marco Riedel und Dr. René Brecht für die interessanten Gespräche und Anregungen danken.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Mann Michael Rieck für das Korrekturlesen der Arbeit sowie ihm, meinen Eltern und Schwiegereltern für die Unterstützung und die Betreuung unseres Kindes, die mir ausreichend Zeit gaben, diese Arbeit zu beenden.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>9</b>
1.1	Der biopharmazeutische Markt und seine Anforderungen an die Reaktortechnik . . . . .	9
1.2	Einwegsysteme in der biopharmazeutischen Industrie . . . . .	11
1.2.1	Entwicklung von Einwegsystemen für die Zellkultur bis 2003 . . . . .	12
1.2.2	Der konventionelle Hohlfaserbioreaktor (HFBR) . . . . .	13
1.3	Grundidee des membranbasierten Bioreaktors (MBB) . . . . .	16
1.4	Zielsetzung . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Membrancharakterisierung . . . . .	19
2.2	Modulbau . . . . .	19
2.2.1	Materialien im Modulbau . . . . .	19
2.2.2	Zytotoxizitätstest . . . . .	20
2.3	Zellkultur . . . . .	20
2.3.1	Zelllinien und Medien . . . . .	20
2.3.2	Kultursysteme für die Anzucht der Zellen . . . . .	21
2.4	Konzentrationsmessung und Verbrauchsberechnung . . . . .	22
2.4.1	Messung von Glukose und Laktat . . . . .	22
2.4.2	Produktquantifizierung . . . . .	22
2.4.3	Berechnung der Verbrauchs- und Produktivitätsraten . . . . .	23
2.4.4	Fehlerbetrachtung . . . . .	24
2.5	pH-, CO <sub>2</sub> - und Gelöstsauerstoff-Messung . . . . .	25
2.6	Zellzahlbestimmung . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Erarbeitung eines Reaktorkonzeptes</b>	<b>27</b>
3.1	Begriffsdefinitionen . . . . .	27

3.2	Auswahl der Membran . . . . .	28
3.2.1	Design der Membrankammern . . . . .	28
3.2.2	Technische Anforderungen an die Membran . . . . .	29
3.2.3	Ergebnisse der Membrantestung . . . . .	32
3.3	Moduldesign . . . . .	36
3.4	Grundfunktionen der stationären Steuereinheit . . . . .	37
3.4.1	Rotation . . . . .	37
3.4.2	Perfusion . . . . .	38
3.4.3	Begasung . . . . .	40
3.4.4	Temperierung . . . . .	40
3.4.5	Zusammenfassung, allgemeines Fließschema des MBB .	41
3.5	Versorgung der Zellen . . . . .	42
3.6	Modell zur Abschätzung der mit Sauerstoff versorgbaren Zellzahl	44
3.7	Maßstäbe der MBB-Familie . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Prototypenbau und Konzeptprüfung („proof of concept“)</b>	<b>49</b>
4.1	Vorversuche in Testmodulen zur praktischen Anwendbarkeit der Membranfasern . . . . .	49
4.1.1	Modul, Antriebseinheit und Betrieb der 12Hohlfaser(HF)- Reaktoren . . . . .	50
4.1.2	Versuchsanordnungen und Ergebnisse der Experimente mit 12HF-Modulen . . . . .	51
4.1.3	Fazit der Vorversuche in 12HF-Modulen . . . . .	53
4.2	Funktionstestung im Labormaßstab . . . . .	54
4.2.1	Einwegmodul im Labormaßstab . . . . .	54
4.2.2	Stationäre Betriebseinheit . . . . .	57
4.2.3	Technische Funktionalität . . . . .	58
4.2.4	Biologische Funktionalität im Labormaßstab . . . . .	60
4.2.5	Fazit der Erprobung des MBB im Labormaßstab . . . . .	63
4.3	Lösungsansatz für den Gasaustrag . . . . .	63
<b>5</b>	<b>Maßstabsverkleinerung: MBB im Prozessentwicklungsmaßstab</b>	<b>67</b>
5.1	Konzept der Maßstabsverkleinerung . . . . .	67
5.2	Technische Umsetzung der Prozessentwicklungseinheit . . . . .	68

5.2.1	Einwegmodule im Prozessentwicklungsmaßstab . . . . .	68
5.2.2	Stationäre Steuereinheit der Prozessentwicklungseinheit (PEE) . . . . .	70
5.2.3	Fazit der technischen Umsetzung . . . . .	74
5.3	Erstbetrieb und biologische Funktionalität . . . . .	74
5.3.1	Handhabung der Module . . . . .	74
5.3.2	Experimente im Prozessentwicklungsmaßstab . . . . .	76
5.3.3	Ergebnisse der 1. Testphase im Prozessentwicklungsmaß- stab mit der Zelllinie AGE1.hn . . . . .	77
5.3.4	Zusammenfassung der 1. Testphase . . . . .	81
5.3.5	Ergebnisse der 2. Testphase mit CHO-Zellen . . . . .	81
5.3.6	Zusammenfassung der 2. Testphase . . . . .	89
5.4	Einsatzzweck, Eignung für die Prozessentwicklung . . . . .	89
5.5	Fazit der Maßstabsverkleinerung . . . . .	90
<b>6</b>	<b>MBB im Pilotmaßstab</b>	<b>91</b>
6.1	Technische Umsetzung . . . . .	91
6.1.1	Einwegmodule im Pilotmaßstab . . . . .	91
6.1.2	Stationäre Steuereinheit im Pilotmaßstab . . . . .	91
6.1.3	Fazit der technischen Machbarkeit . . . . .	94
6.2	Inbetriebnahme und Handhabung . . . . .	94
6.2.1	Inokulum . . . . .	94
6.2.2	Probenahme im Pilotmaßstab . . . . .	96
6.3	Biologische Funktionalität im Pilotmaßstab . . . . .	97
6.3.1	Ergebnisse der Zellkultivierung im Pilotmaßstab . . . . .	97
6.3.2	Fazit . . . . .	98
6.4	Sauerstoff und pH im Prozess . . . . .	99
6.4.1	Gelöstsauerstoff im Pilotmaßstab . . . . .	99
6.4.2	pH-Wert im Pilotmaßstab . . . . .	100
6.4.3	Verteilung der Zellen im MBB . . . . .	103
6.5	Fazit Pilotmaßstab . . . . .	104
<b>7</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>105</b>
7.1	Umsetzung der grundlegenden Forderungen . . . . .	105

7.2	Technische Funktionalität des MBB . . . . .	105
7.2.1	Mess- und Regeltechnik für pH und Gelöstsauerstoff . .	105
7.2.2	Moduldesign und -fertigung . . . . .	108
7.2.3	Probenahme und Prozessüberwachung . . . . .	108
7.2.4	Realisierbarkeit der technischen Weiterentwicklung . . .	109
7.3	Biologische Funktionalität des MBB . . . . .	110
7.4	Vergleich MBB und HFBR . . . . .	110
7.4.1	Glukoseverbrauch als Maß der biologischen Aktivität . .	110
7.4.2	Gelöstsauerstoff (DO) . . . . .	112
7.4.3	pH-Wert . . . . .	113
7.4.4	Fazit des Vergleiches MBB und ASX . . . . .	115
7.5	Inhomogene Verteilung der Zellen im MBB . . . . .	115
7.6	Marktentwicklung und Chancen des MBB . . . . .	117
7.6.1	Entwicklung von Einwegreaktoren 2003 bis 2009 . . . .	117
7.6.2	Vergleich MBB und Rührkessel + CentriTech . . . . .	119
7.7	Anwendbarkeit des MBB . . . . .	121
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>127</b>
9.1	Abkürzungen . . . . .	127
9.2	Formelzeichen . . . . .	128
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Der biopharmazeutische Markt und seine Anforderungen an die Reaktortechnik

Als Teilgebiet der roten Biotechnologie umfasst die in dieser Arbeit betrachtete biopharmazeutische Produktion die industrielle Herstellung von Wirkstoffen in Zellkulturen, z.B. Antikörpern und rekombinanten Proteinen. In den letzten Jahren zeichnete sich im Bereich der biopharmazeutischen Industrie ein Trend zur Herstellung kleinerer Produktmengen ab. Dies gründet sich zum einen auf die Herstellung generischer biopharmazeutischer Wirkstoffe und zum anderen auf eine größer werdende Produktvielfalt.

Wie schon in den 1980er Jahren auslaufende Patente in der klassischen chemischen Pharmabranche eine größere Vielfalt an Medikamenten eines Wirkstoffes auf dem Markt zur Folge hatten (Higgins, 2004), erreicht diese Entwicklung nun den biopharmazeutischen Markt. Im Jahr 2007 erteilte die Europäische Zulassungsbehörde EMEA fünf EPO-Produkten (rekombinantes Erythropoetin) die Zulassung, die alle das selbe Originalprodukt (Eprex/Erypo von Janssen-Cilag) als Referenzprodukt angaben, dessen Patentschutz 2007 auslief (Nachtmann, 2008; Walsh, 2008). Das Marktvolumen für EPO betrug 2006/2007 weltweit 12 Mrd. US\$ (Ledford, 2007). Dieser vormals von Janssen-Cilag allein belieferte Markt teilt sich nun auf den Originalhersteller sowie die fünf Nachahmerproduzenten auf, so dass jeder einzelne Hersteller nur einen Teil des Marktes beliefert und damit jeweils eine kleinere Produktmenge als vormals der Monopolist herstellt. Weitere Biopharmazeutika mit großem Marktvolumen und ausgelaufenem bzw. bald auslaufendem Patentschutz sind Interferone und Insulin (Ainsworth, 2005; Ledford, 2007).

Der zweite Punkt, die größere Produktvielfalt, gründet sich auf dem in Zukunftsbetrachtungen und Marktanalysen immer häufiger auftauchenden Trend zu personalisierter oder zielgerichteter (targeted) Medizin (Burrill, 2006; Fer-

rara, 2007; BusinessInsight, 2008; Rettberg, 2010). Aufgrund der Verschiedenheit der Menschen und ihrer verschiedenen Reaktionen auf Medikamente sind 90 % der auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe nur zu 50 % effektiv (DePalma, 2005). Eine Steigerung der Effektivität würde durch ein Zuschneiden der Wirkstoffe auf kleinere, dafür homogenere Patientengruppen erreicht werden. Neben zielgerichteten Wirkstoffen sind hier auch Diagnostika notwendig, die im Vorfeld klären können, ob ein Patient für einen entsprechenden Wirkstoff empfänglich ist. Das weltweit tätige Pharmaunternehmen Eli Lilly korreliert schon heute 90 % seiner klinischen Prüfkandidaten mit entsprechenden Biomarkern (Parsons, 2008). Diese Art der personalisierten Medizin führt zu größerer Produktvielfalt für mehr, aber kleinere Patientenkreise und demnach zu kleineren Produktmengen in der Herstellung (DePalma, 2005).

Um den oben genannten Markttrends gerecht zu werden, sind im Bereich der biopharmazeutischen Wirkstoffproduktion flexible Anlagen, in denen man verschiedene Wirkstoffe in kleineren Mengen zeitgleich produzieren kann, notwendig. Die klassischen Antikörperproduktionsanlagen, z.B. zwei parallele Rührkesselstraßen bis 10.000 L in einer Anlage, die nur zur Herstellung eines einzigen Antikörpers verwendet werden, können für die neuen Produktionsprozesse nicht genutzt werden. Gebraucht werden Produktionssysteme zur Herstellung kleinerer und mittlerer Produktmengen, die sehr flexibel für verschiedene Produkte einsetzbar sind. Sowohl hinsichtlich der biologischen Sicherheit (Verhinderung von Kreuzkontamination bei der Herstellung verschiedener Wirkstoffe) als auch der Schnelligkeit beim Wechsel von Produkt A zu Produkt B in einem Produktionsreaktor (change-over-Zeiten), empfehlen sich Einwegsysteme. Eine detaillierte Einführung in dieses Thema folgt in Kapitel 1.2.

Eine weitere Entwicklung im biopharmazeutischen Markt geht dahin, dass neben zahlreichen robusten Antikörpern auch fragile rekombinante Proteine als Wirkstoffe identifiziert und zu Pharmazeutika entwickelt werden, z.B. rekombinanter Gerinnungsfaktor VIII (ReFacto, Wyeth Europe Ltd. oder Kogenate, Bayer HealthCare AG) oder rekombinantes FSH (follikelstimulierendes Hormon)(Puregon, NV Organon oder GONAL-f, Serono Europe Ltd.) (Quelle: EMEA, siehe Literaturverzeichnis). Aus der Fragilität rekombinanter Proteine ergeben sich spezielle Anforderungen an die Produktionsverfahren. In einem

klassischen batch- oder fed-batch-Verfahren kann die Qualität fragiler Proteine durch die lange Verweildauer in der Kulturbrühe negativ beeinflusst werden (Kadouri *et al.*, 1997; Dalm *et al.*, 2004; Dalm *et al.*, 2007). Perfusionsprozesse sind die Antwort auf diese Problemstellung. Für konventionelle Rührkesselstraßen wurden verschiedene Systeme (Übersicht Voisard *et al.*, 2003) – von Spinfiltern (Lim *et al.*, 2006; Yabannavar *et al.*, 1994; Himmelfarb *et al.*, 1969) über Mediumabtrennung mittels externer Cross-flow-Filtration (Kompala *et al.*, 2006), Durchlaufzentrifugen (Johnson *et al.*, 1996; Lüllau *et al.*, 2003) oder Separatoren (Mercille *et al.*, 2000) bis hin zu Sedimentationsfeldern (Kompala *et al.*, 2006) und akustischen Filtern (Trampler *et al.*, 1994; Ryll *et al.*, 2000) – entwickelt und angewendet. Zum Beispiel werden die monoklonalen Antikörper Simulect (Novartis Pharma AG) und Remicade (Centocor B.V.) mit Hilfe des Einsatzes von Spinfiltern produziert (Chu *et al.*, 2001). Im Bereich der flexibleren und biologisch sichereren Einwegreaktoren ist an erster Stelle der konventionelle Hohlfaserbioreaktor als Perfusionssystem zu nennen, eine genauere Beschreibung folgt in Kapitel 1.2.2.

## 1.2 Einwegsysteme in der biopharmazeutischen Industrie

Einwegsysteme im Bereich der Medizin und Pharmazie zeichnen sich dadurch aus, dass sie steril geliefert und nur für einen Prozess genutzt werden. Im Labormaßstab, z.B. T-Flaschen, Rollerflaschen, CellLines oder Schüttelkolben, haben Einwegsysteme eine Vormachtstellung errungen. Im Bereich der Bioreaktoren konkurrieren sie v.a. mit konventionellen Edelstahlreaktoren, haben sich aber im kleinen bis mittleren Maßstab (bis zu 2.000 L Kulturvolumen, z.B. *XDR<sup>TM</sup>* von XCellerex Inc.) in den letzten Jahren einen festen Platz in der biopharmazeutischen Produktion erobert.

Die Vorteile von Einwegsystemen liegen neben dem Wegfall aufwändiger Reinigungsprozeduren und deren Validierung in kürzeren change-over-Zeiten. Ein für den weltweiten Erfolg von Einwegsystemen wesentlicher Punkt ist die biologische Sicherheit, die sich in einer Minimierung des Risikos einer Kreuzkontamination mit Fremdprodukt ausdrückt (Ravise *et al.*, 2009). Weiterhin

verfügen Einwegreaktoren über eine hohe Mobilität (keine feste Verrohrung wie bei Stahlkesseln), was gerade in Anlagen, in denen mehrere Produkte parallel in verschiedenen Mengen produziert werden, eine hohe Flexibilität für den Einsatz mehrerer Reaktoren erlaubt.

Der Kostenvorteil (Investitionskosten und Reinigungskosten) von Einwegreaktoren gegenüber Edelstahlssystemen wurde kontrovers diskutiert (Farid *et al.*, 2005; Monge, 2007; Barnoon *et al.*, 2008), aber die Vorteile im Bereich change-over-Zeit und Flexibilität in Multiproduktanlagen sind ein starkes Argument für den Einsatz von Einwegreaktoren (Suske, 2005; Langer *et al.*, 2007). Eine aktuelle Studie von Ravise *et al.* beschreibt einen direkten Vergleich einer konventionellen Rührkesselanlage aus Edelstahl und einer auf Einwegsystemen beruhenden Anlage im Pilotmaßstab. Die Studie zeigt eine deutliche Ersparnis von Zeit und Energie allein durch den Wegfall von Reinigung und Sterilisation der Reaktoren (Ravise *et al.*, 2009).

Der größte Vorteil von Einwegreaktoren aus Sicht eines Herstellers von biopharmazeutischen Wirkstoffen für die Humananwendung liegt aber in der biologischen Sicherheit, im Ausschluss von Kreuzkontaminationen (Fox, 2005). Aus dem Bedürfnis nach biologischer Sicherheit heraus begann in den 1950er Jahren die Entwicklung von Einwegsystemen.

### 1.2.1 Entwicklung von Einwegsystemen für die Zellkultur bis 2003

Der Trend zu Einwegsystemen kommt aus der Medizintechnik, wo Kreuzkontaminationen z.B. bei der Mehrfachverwendung von Kanülen oder unzureichender Reinigung von Spritzen, katastrophale Folgen haben können. 1956 erfand der neuseeländische Tierarzt Colin Murdoch die Einwegspritze. In den 1980er Jahren folgten Flaschen, Filter, Schläuche, Bags u.ä. für die Anwendung im Laborbereich (Brecht *et al.*, 2009). Zur Produktion biopharmazeutischer Proteine wurden hier schon Rollerflaschen bzw. Rollerflaschenbatterien eingesetzt. Die FDA erteilte 1989 erstmals die Zulassung für ein in einem Einwegsystem produziertes Arzneimittel, das von Amgen Inc. in Rollerflaschen hergestellte Erythropoetin (Epogen). Rollerflaschenbatterien und Wannenstapel waren lange Zeit der größte Maßstab im Bereich der Einwegsysteme. Beide verfügen über keinerlei Mess- und Regeltechnik, weshalb sie nicht als Bioreaktoren im

engeren Sinne betrachtet werden sollen.

Die Entwicklung von Einwegbioreaktoren hatte ihren Ursprung im Bereich der Hochzelldichte- und Gewebekultur. Hier wurden schon in den frühen 70er Jahren Dialysemembrankartuschen für die perfundierte Kultivierung von Zellen eingesetzt. Mit der Zeit wurden auf Membrankartuschen basierende Hohlfaserbireaktoren (HFBR) mit bis zu 20 Kartuschen entwickelt (AcuSyst-Reihe von BioVest), die über Mess- und Regeltechnik der wesentlichen Parameter Gelöstsauerstoff (DO), pH und Temperatur verfügen. Ein in diesem Einwegbioreaktor produzierter diagnostischer Antikörper, Postascint von Cytogen Corp., erhielt 1996 die Zulassung der FDA (Jain *et al.*, 2008; Brecht *et al.*, 2009).

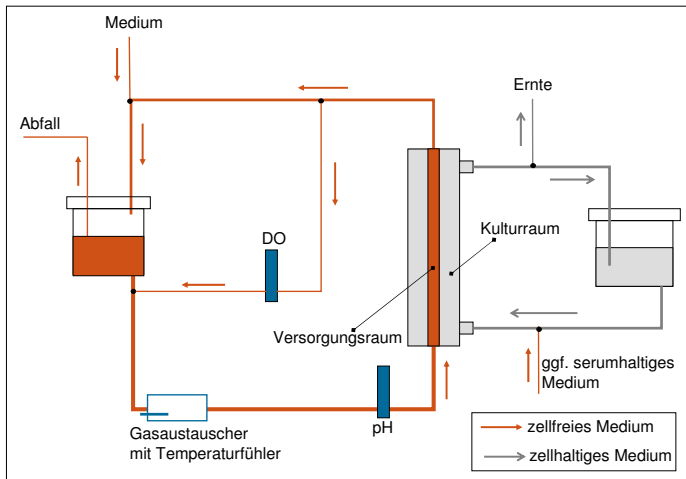
In den 90er Jahren wurde mit den Wave-Reaktoren ein weiterer Einwegbioreaktor entwickelt, der sich im Vergleich zum HFBR durch seine einfache Handhabung auszeichnete (Singh, 1999; Wave-Story). Der Einwegpart eines Wave-Reaktors ist ein mit Zellsuspension gefüllter Kunststoffbeutel (Bag), der begast, temperiert und geschüttelt wird. Dieser Reaktor eignet sich für batch- und fed-batch-Prozesse.

Im Jahr 2003, zu Beginn der hier beschriebenen Reaktorentwicklung, waren zwei Einwegbioreaktoren am Markt verfügbar, der HFBR und der Wave-Reaktor. Beide sind für die Herstellung kleiner Produktmengen z.B. für klinische Studien geeignet. Ein Perfusionsprozess konnte nur im HFBR gefahren werden.

### 1.2.2 Der konventionelle Hohlfaserbireaktor (HFBR)

Als konventioneller Hohlfaserbireaktor (HFBR) soll im Folgenden der „Mercedes“ unter den HFBR betrachtet werden: Die AcuSyst-Reihe von Biovest (Biovest International Inc., USA), die sich durch das Vorhandensein von Mess- und Regeltechnik (DO, pH, Temperatur) und einen durch alternierende Druckbeaufschlagung getriebenen, verbesserten Stofftransport zwischen dem Versorgungsraum (VR) und dem Kulturraum (KR) auszeichnet (Gramer *et al.*, 1999). Das Herzstück konventioneller HFBR sind die mit Hohlfaserbündeln gefüllten Kartuschen, in denen ein Versorgungsraum (das Innere der Hohlfasermembranen) von einem Kulturraum (die Membranen umgebender Raum)

separiert ist. Im KR wachsen die Zellen. Der VR wird kontinuierlich mit Medium durchströmt. Die Versorgung der Zellen erfolgt per Diffusion von Nährstoffen über die Membran vom VR in den KR. Auf gleichem Wege werden Metabolite ausgetragen. Die Membran hat einen cutoff von 10-30 kDa und ist somit nicht durchlässig für Proteine. Dies bringt den (in den '80er und '90er Jahren wesentlichen) Vorteil, dass Serum oder Serumbestandteile nur im nicht oder gering perfundierten KR zugesetzt werden mussten. Das Produkt verbleibt im KR und kann dort in hoher Konzentration abgezogen werden. In Abbildung 1.1 ist ein Fließschema eines HFBR abgebildet.



**Abb. 1.1:** Fließschema im HFBR der Acusyst-Reihe von Biovest; dargestellt mit einer Hohlfaser(HF)-Kartusche; VR durch eine HF symbolisiert (real Bündel von mediumdurchströmten HFmembranen); Darstellung ohne Pumpen.

Der größte Nachteil der HFBR ist, dass sie im Maßstab nur begrenzt vergrößerbar sind. Vor allem im Hinblick auf eine Marktbedienung offenbaren sich ihre Grenzen. Die Länge einer Hohlfaserkartusche ist aufgrund der Versorgung der Zellen über Diffusion begrenzt. Sauerstoff z.B. hat in Medium im Gleichge-

wicht mit Luft eine maximale Löslichkeit von  $\sim 7 \text{ mg/l}$ . Bei voll bewachsenen Kartuschen sind diese  $\sim 7 \text{ mg/l}$  nach einer entsprechenden Weglänge (je nach Zelldichte und Perfusionsrate  $5 \text{ cm}$  (Piret *et al.*, 1991) bis  $> 12 \text{ cm}$  (Sullivan *et al.*, 2005)) verbraucht. Zellen nach dieser Weglänge würden nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden. Eine Vergrößerung des Kartuschendurchmessers wäre eine weitere Möglichkeit der Maßstabsvergrößerung. Dieser Weg wurde allerdings bisher von keinem Kartuschenhersteller beschritten. Ein Grund ist ein erhöhter Fertigungsaufwand. Die aktuell verwendeten Membrankartuschen sind Dialysekartuschen, die in großen Mengen hergestellt werden und deren Herstellung optimiert und etabliert wurde. Eine Kartusche mit größerem Durchmesser wäre eine Sonderanfertigung in relativ kleinen Stückzahlen. Damit erfolgt eine Maßstabsvergrößerung eines HFBR nur über die Parallelisierung der Membrankartuschen. Das größte am Markt erhältliche System XCellerator von Biovest fährt mit 20 Kartuschen parallel. Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite zeigt den AcuSyst XCell (ASX) mit zwölf Kartuschen. Es werden zwei Einwegeinsätze mit je sechs Kartuschen unabhängig voneinander betrieben, d.h. eine Mediumpumpe versorgt sechs Kartuschen. Der Mediumstrom wird über ein Verteilerstück auf die sechs Kartuschenzugänge aufgespaltet. Bei einer größeren Kartuschenanzahl ist zu bezweifeln, dass der Mediumstrom gleichmäßig auf alle Kartuschen verteilt würde.

Die in Kapitel 1 genannten Anforderungen des biopharmazeutischen Marktes an Bioreaktoren werden vom beschriebenen 12- oder 20-Kartuschen-HFBR im Prinzip erfüllt. Allerdings bewegt sich das System an der Untergrenze des notwendigen Produktionsvolumens (ausreichend zur Produktion von Material für Toxizitätsstudien und klinische Phase I) und ist kaum noch vergrößerbar. Weiterhin ist zu bemerken, dass sich das Produkt im zellhaltigen Kulturraum anreichert, was trotz kontinuierlicher Ernte ein Risiko für fragile Produkte oder eine produktinhibierte Proteinbildung darstellt. In der Literatur sind Ansätze, den konventionellen HFBR zu verbessern, beschrieben (Patankar *et al.*, 1989; Kessler *et al.*, 1997), allerdings hat sich keine dieser Lösungen durchgesetzt.



**Abb. 1.2:** Einwegeinsatz des konventionellen HFBR; links: einzelner Einsatz mit sechs Kartuschen, DO- und pH- Elektrode (vorn links) sowie Gastauscher (vorn rechts); rechts: volle Ausnutzung des Systems mit zwei Einsätzen zu je sechs Kartuschen. (Quelle: ProBioGen AG)

### 1.3 Grundidee des membranbasierten Bioreaktors (MBB)

Eine Antwort auf die in Kapitel 1.1 genannten Anforderungen des Marktes wäre ein Bioreaktor mit folgenden Eigenschaften:

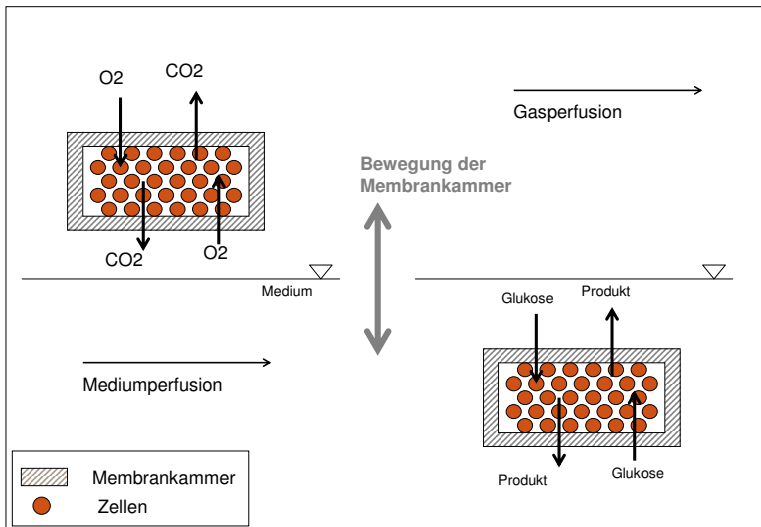
- Einwegsystem,
- Perfusionsreaktor,
- zellfreie Ernte (frühe Trennung von Produkt und Kulturbrühe),
- skalierbar von Prozessentwicklung bis Marktbedienung,
- geschlossenes, portables System.

Ein Einwegperforationsreaktor ist mit den konventionellen HFBR vorhanden, allerdings mit einer langen Verweilzeit des Produktes im Zellkontakt, was bei der Produktion fragiler Proteine einen Nachteil darstellt. Würde der Zellrückhalt über die Membran wie im HFBR beibehalten, aber die Membran mit ausreichend großen Poren versehen, dass Proteine sie passieren können, wäre eine schnelle zellfreie Ernte über den Mediumperforationsstrom möglich.

Ein weiteres Problem stellt die begrenzte Skalierbarkeit, u.a. aufgrund der begrenzten Löslichkeit von Sauerstoff im Medium dar (vgl. Kapitel 1.2.2 auf Seite 13). Eine Sauerstoffversorgung direkt aus der Luft ist Zellen nicht zuträglich, v.a. wegen der toxischen Wirkung von Sauerstoffradikalen (Lin *et al.*,

1992). Eine Membrankammer, in deren Inneren eine Zellsuspension kultiviert wird und deren poröse Wand mit Medium gefüllt ist, sollte einen direkten Kontakt von Zellen und Sauerstoff verhindern, gleichzeitig aber den Einfluss der Sauerstofflöslichkeit auf die Versorgungseffizienz minimieren. Der Diffusionsweg des Sauerstoffes von der Luft zu den Zellen, über das schützende Medium in den Membranporen, ist dann sehr gering.

Um neben der optimierten Sauerstoffversorgung auch Glukose und andere im Medium gelöste Nährstoffe ausreichend verfügbar zu machen, sollte sich die mit Zellsuspension gefüllte Membrankammer abwechselnd in Medium und Gas befinden. Die Wechselfrequenz gälte es zu testen. In Abbildung 1.3 ist das aus diesen Überlegungen entstandene Konzept schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3:** Skizze des Reaktorkonzeptes; mit Zellen gefüllte Membrankammern befinden sich abwechselnd in Gas (links) und Medium (rechts).

Eine Maßstabsvergrößerung des Systems soll über eine parallele Anordnung einer steigenden Anzahl der Membrankammern erfolgen. Der Bioreaktor stellt

dann eine Summe vieler Membrankammern dar, die mit den gleichen Zellen gefüllt wurden und in der gleichen Umgebung vorliegen.

Die beschriebene Grundidee eines Reaktors, in dem die Zellen wechselweise in Gas und Medium vorliegen, stammt von Dr. Uwe Marx, Dr. Marco Riedel und Hikmat Bushnaq-Josting (Patent Nr. WO 2005/121311 A1).

## 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in Kapitel 1.3 beschriebene Grundidee in ein Reaktorkonzept umzusetzen und dieses auf seine Anwendbarkeit hin zu prüfen. Im Rahmen der Arbeit sollten Prototypen in verschiedenen Maßstäben entworfen, gebaut und getestet werden. Hierbei sollte jeweils zwischen technischer und biologischer Funktionalität unterschieden werden. Als biologische Funktionalität sollten v.a. der Glukoseverbrauch durch die Zellen, Wachstum bzw. Vitalerhaltung produktionsfähiger Zellen sowie die Produktbildung gelten. Weiterhin sollte die Anwendbarkeit des Reaktorkonzeptes bzgl. ökonomischer und qualitativer Aspekte beurteilt werden.

Die Arbeit entstand bei der ProBioGen AG Berlin, in zeitweiser Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Glykodesign & Glykoanalytik“ der Charité Universitätsmedizin Berlin.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Membrancharakterisierung**

Um eine für den Bioreaktor geeignete Membran auszuwählen (siehe Kapitel 3.2) wurden charakteristische Parameter von Membranen bestimmt. Die Porengröße der Membran wurde mittels einer „Bubble-Point“-Messung bestimmt. Die Porosität wurde aus der Wasserpermeabilität berechnet und die Wasserpermeabilität wurde gemessen indem die Membran unter einer definierten Druckdifferenz mit Wasser überströmt wurde. Die Membrancharakterisierung wurde von Dr. Marco Riedel, ProBioGen AG und seinen Mitarbeitern geplant, durchgeführt und ausgewertet.

### **2.2 Modulbau**

Der Bau der zylindrischen Einwegmodule erfolgte nach eigenen Vorgaben entweder durch einen Facharbeiter der ProBioGen AG (12HF-Module, Labormaßstab, Prozessentwicklungsmaßstab) oder durch die Saxonia BioTec GmbH (Radeberg, Deutschland), eine Firma mit Erfahrung im Bau von Membrankartuschen (Pilotmaßstab).

#### **2.2.1 Materialien im Modulbau**

Das Gehäuse inklusive Kopfplatten bestand aus Polycarbonat, einem spanend gut verarbeitbaren Kunststoff. Polycarbonat ist für die Einmalanwendung autoklavierbar und gammasterilisierbar. Bei der Gammasterilisation verfärbt sich das Modul gelb, was die Transparenz beeinflusst, aber sonst keine negativen Auswirkungen hat. Die Membranen bestanden aus Polyethersulfon; sie sind mit beiden genannten Verfahren sterilisierbar. Zur Verpottung der

Membranen und damit der Abdichtung zwischen Kulturraum und Versorgungsraum wurde Polyurethankleber verwendet, ein in der Medizintechnik häufig eingesetztes Verpottungsmaterial.

### 2.2.2 Zytotoxizitätstest

Säugerzellen reagieren sehr empfindlich auf kleinste Mengen zytotoxische Stoffe in ihrer Umgebung. Es musste sichergestellt werden, dass die Modulmaterialien keine zytotoxischen Komponenten freisetzen. Die verwendeten Materialien wurden einzeln und als montiertes Modul über eine gewisse Zeit (mindestens 24 h) mit Zellkulturmedium bei 37°C bewegt. Die Einzelmaterialien wurden sowohl „frisch“ als auch sterilisiert verwendet. Das potenziell mit gelösten Schadstoffen (Leachables) angereicherte Medium wurde mit CHO-Zellen kultiviert. Eine Parallelkultur mit Zellen gleichen Ursprungs in Frischmedium diente als Kontrolle. War kein signifikanter Unterschied in Wachstum und Produktivität der Zellen erkennbar, galt das getestete Material als unbedenklich für die Verwendung im Modulbau.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zelllinien und Medien

Für die Erprobung der Reaktorprototypen kamen zwei verschiedene Zelllinien zum Einsatz. Zum einen eine klassische CHO-Linie und zum anderen eine humane neuronale Zelllinie.

Die CHO-Zelle war eine K1-DG44, die Produkt X, ein Kundenprodukt, das nicht näher bezeichnet und beschrieben werden darf, produzierte. Diese Zelle war für die Kultivierung in hohen Zelldichten etabliert und wurde für Produktionsprozesse im konventionellen Hohlfaserbioreaktor eingesetzt.

Die humane neuronale Zelllinie AGE1.hn war eine für die biopharmazeutische Produktion entwickelte Designerzelllinie, die alpha-1-Antitrypsin produziert. Diese Zelle wurde aufgrund ihrer humanen Glykosylierungsstrukturen im BMBF-geförderten Projekt „Glykodesign & Glykoanalytik“ eingesetzt, in

dessen Rahmen ein Teil der beschriebenen Reaktorentwicklung stattfand. Die CHO-Zelle wurde in einem carbonatgepuffertem Basismedium PBG1.0, eine Rezeptur der ProBioGen AG, unter Zusatz von 2 mM Glutamin und 0,02 % HSA kultiviert. Die AGE1.hn wurde in einem reichhaltigeren Medium, ExCell VPRO von SAFC (SAFC Biosciences, Andover, UK), unter Zusatz von 2 mM Glutamin kultiviert.

### **2.3.2 Kultursysteme für die Anzucht der Zellen**

Für die Anzucht der Zellen wurden neben klassischen T-Flaschen auch CL 1000 und SuperSpinner verwendet. Alle Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten.

#### **CL 1000**

Die CL 1000 (Integra Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland) ist ein membranbasiertes Einweg-Kultursystem für Hochzelldichtekultivierung. Ein großer (1000 ml) Versorgungsraum (VR) und ein kleiner (30 ml) Kulturraum (KR) sind über eine Ultrafiltrationsmembran voneinander getrennt. Das Medium im VR wurde 2-3 mal pro Woche gewechselt, Nährstoffe diffundieren über die Membran in den KR, niedermolekulare Metabolite umgekehrt vom KR in den VR. Im Kulturraum wachsen Zellen in sehr hoher Dichte (bis 2E7/ml). Die Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgt über eine am Boden des Kulturraumes befindliche Silikonmembran, die den KR gegen die Umgebung abdichtet. Die CL 1000 wurde hauptsächlich für die Anzucht der CHO-Zelle eingesetzt.

#### **SuperSpinner**

Im SuperSpinner (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) wachsen die Zellen in Suspension, aber in weniger hoher Dichte als in einer CL. Der SuperSpinner ist eine gerührte Kultur in Glas- oder Kunststoffgefäßen; der Sauerstoffeintrag erfolgt über Membranbegasung. Eine luftdurchströmte Hohlfasermembran ist in mehreren Wicklungen durch die Kulturbrühe gelegt. Der Sauerstoff gelangt per Diffusion von der Gasphase im Inneren der Membran ins umgebende Medium. Der SuperSpinner wurde im batch- oder

fedbatch-Modus betrieben. Im verwendeten Glassystem wurden Zellen in einem Kulturvolumen von 200 bis 800 ml kultiviert. Der SuperSpinner wurde v.a. für die Anzucht der Zelllinie AGE1.hn verwendet.

## **2.4 Konzentrationsmessung und Verbrauchsberechnung**

Ein wesentliches Element der Prozessüberwachung waren die Verbrauchs- und Produktionsraten von Glukose und Produkt. Die Berechnung der spezifischen Verbrauchs- und Produktionsraten basierte auf im Medium gemessenen Konzentrationen. Die genaue Stelle der Probenahme zur Konzentrationsbestimmung ist bei den einzelnen Reaktorprototypen verschieden und in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

### **2.4.1 Messung von Glukose und Laktat**

Glukose und Laktat wurden im ersten Projektabschnitt (bis einschließlich Labormaßstab) am Ektachem DT61 (Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) gemessen.

Während des Testens von Prozessentwicklungs- und Pilotmaßstab erfolgte die Messung von Glukose und Laktat mit einem BioProfile 100 (Nova Biomedical Cor., Waltham, USA).

### **2.4.2 Produktquantifizierung**

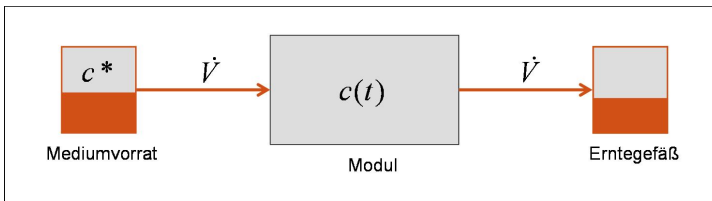
Für die Produktquantifizierung von Protein X wurden im Verlauf des Projektes verschiedene Methoden angewendet:

Labormaßstab:	UV-Messung nach Aufreinigung der Ernte
Prozessentwicklungsmaßstab:	ELISA
Pilotmaßstab:	HPLC

Aufgrund der Vertraulichkeit der Details zum Kundenprotein X können die Messmethoden nicht näher beschrieben werden.

### 2.4.3 Berechnung der Verbrauchs- und Produktivitätsraten

Da eine regelmäßige Messung von Zellzahl und Vitalität im System nicht möglich war, wurde der Glukoseverbrauch als Leitparameter zur Prozessüberwachung gewählt. Auch andere Wissenschaftler haben den Glukoseverbrauch als Instrument zur Prozessüberwachung in HFBR eingesetzt (Dowd *et al.*, 1999; Lamers *et al.*, 1999; Gramer *et al.*, 2000b; Tsao *et al.*, 2005). Weiterhin wurde die Produktivität (Produktbildung) als Parameter zur Beurteilung der biologischen Aktivität genutzt.



**Abb. 2.1:** Bilanzierung über das Modul.

Die Verbrauchs- bzw. Produktivitätsraten  $q$  wurden auf Basis einer allgemeinen Bilanzierung berechnet, die das Einwegmodul, in dem die Zellen kultiviert wurden, als „black-box“ betrachtete. Stoffströme im Inneren des Moduls zwischen Versorgungs- und Kulturraum wurden nicht separat betrachtet.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{\dot{V} \cdot c^*}{V_{KR}} - \frac{\dot{V} \cdot c(t)}{V_{KR}} \pm q \quad (2.1)$$

$\dot{V}$	Mediumstrom, Perfusionsrate	l/d
$c$	Konzentration (Glukose, Produkt)	g/l, mg/l
$c^*$	Konzentration im Ausgangsmedium	g/l, mg/l
$V_{KR}$	Kulturraumvolumen	l
$q$	Verbrauch (Glukose), Produktivität (Produkt)	$g/(l \cdot d), mg/(l \cdot d)$

Als Konzentration im Modul  $c(t)$  wurde die im Ausgang bzw. im Erntegefäß gemessene Konzentration (Glukose oder Produkt) verwendet. Bei Verwendung

der Erntegefäßkonzentration wurde das Erntegefäß nach dem betrachteten Zeitabschnitt komplett geleert. Da die Konzentration im Modul in Perfusionsprozessen i.A. relativ konstant ist, wurde diese Vereinfachung als zulässig erachtet. Der Volumenstrom  $\dot{V}$  wurde aus dem Mediumvolumen im Erntegefäß und der entsprechenden Zeitdifferenz berechnet.

#### 2.4.4 Fehlerbetrachtung

Der Mess- und Berechnungsfehler für die spezifischen Verbrauchs- und Produktivitätsraten wurde einmal als relativer Fehler bestimmt und für alle Messungen übernommen. Im Folgenden soll die Berechnung des Fehlers am Beispiel des Glukoseverbrauches hergeleitet werden.

Vereinfacht kann man die Berechnung des Glukoseverbrauches wie folgt darstellen:

$$q_{Gluc} = \Delta c_{Gluc} \cdot \frac{\dot{V}}{V_{KR}} = \Delta c_{Gluc} \cdot \frac{V_{Ernte}}{V_{KR} \Delta t} \quad (2.2)$$

Der Fehler bei Summen und Differenzen ( $\Delta c$  und  $\Delta t$ ) ergab sich aus dem Bezug der Summe der absoluten Messfehler auf den Mittelwert. Bei  $n=10$  Messungen einer Mediumprobe wurden eine Standardabweichung von 0,06 g/l und ein Mittelwert von 5,12 g/l gemessen. Damit ergab sich der relative Fehler  $Re$  für  $\Delta c_{Gluc}$  wie folgt:

$$Re(\Delta c_{Gluc}) = \frac{0,06 + 0,06}{5,12} = 2,3\% \quad (2.3)$$

Analog wurde der Fehler für  $\Delta t$  berechnet. Die Probenahmezeit wurde viertelstundengenau dokumentiert, die Probenahme erfolgte i.A. werktäglich.

$$Re(\Delta t) = \frac{0,25h + 0,25h}{24h} = 2,1\% \quad (2.4)$$

Der Volumenfehler für die Bestimmung des Perfusions- bzw. Erntevolumens  $V_{Ernte}$  wurde auf 5 % geschätzt. Das Volumen des Kulturraum  $V_{KR}$  wird für jedes Modul als konstant angenommen und nicht in die Fehlerrechnung

einbezogen.

Für die Berechnung des Gesamtfehlers von Produkten oder Quotienten wurden die relativen Fehler summiert. Für die spezifische Glukoseverbrauchsrate ergab sich folgender Fehler:

$$Re(q_{Gluc}) = 2,3\% + 2,1\% + 5\% = 9,4\% \quad (2.5)$$

Für die Produktivität erhielt man durch analoge Berechnung einen Fehler von 30 %.

## 2.5 pH-, CO<sub>2</sub>- und Gelöstsauerstoff-Messung

Der pH-Wert wurde standardmäßig bei der BioProfile-100-Messung (vgl. Glukose, Laktat) mit gemessen. Der Gelöstsauerstoff (DO) und gelöstes CO<sub>2</sub> konnten nur während einiger weniger Prozesse vermessen werden, als ein BioProfile pH<sub>OX</sub> (NovaBiomedical Corp., Waltham, USA) als Leihgerät zur Verfügung stand.

Zur Messung des DO und der CO<sub>2</sub>-Konzentration wurden die Proben am Reaktor in eine Spritze gezogen, in der Spritze zum Messgerät transportiert und dort direkt aus der Spritze ins Gerät gesaugt und gemessen. Zur Prüfung der Vorgehensweise wurden aus Rührkesseln (Kulturvolumen ca. 500 ml), die über eine online-DO-Messung verfügten, ebenso Proben direkt in eine Spritze genommen und am externen Messgerät vermessen. Die Ergebnisse der online-DO-Messung und der Messung am BioProfile pH<sub>OX</sub> stimmten überein.

## 2.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlproben wurden mit dem ViCell (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) vermessen. Das Gerät liefert die Konzentration vitaler Zellen sowie die Vitalität der Probe. Daraus ließ sich die Konzentration toter Zellen sowie die Gesamtzellkonzentration (Summe vitaler und toter Zellen) errechnen.

Die Zellzahl im MBB wird i.A. als absolute Zellzahl pro Modul angegeben. Die Absolutzellzahl ist das Produkt aus Zellkonzentration und Volumen der Zell-

suspension und kann ebenfalls als Vital-, Tot- oder Gesamtzellzahl angegeben werden.

## 3 Erarbeitung eines Reaktorkonzeptes

Die in Kapitel 1.3 genannten Anforderungen an einen Bioreaktor mussten praktisch umgesetzt werden. Bei der Entwicklung einer Lösung war zwischen zell-, produkt- und medienberührenden Komponenten auf der einen und technischem Equipment auf der anderen Seite zu unterscheiden. Erstere Komponenten sollten für eine einmalige Nutzung konzipiert werden, das technische Equipment für die Wiederverwendbarkeit.

Die Auswahl der Membran stellte einen entscheidenden Meilenstein dar und wird, ebenso wie die Gestaltung der einzelnen Komponenten (Einwegpart und technisches Equipment) im Folgenden näher betrachtet. Neben einer detaillierten Erläuterung des Versorgungsprinzips der Zellen wird in diesem Kapitel ein Modell zur Sauerstoffversorgung der Zellen im Reaktor aufgestellt, um eine theoretische Abschätzung der Machbarkeit, d.h. ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, durchführen zu können.

Abschließend wird auf die Notwendigkeit und Umsetzbarkeit verschiedener Maßstäbe des Reaktors eingegangen.

### 3.1 Begriffsdefinitionen

Die Bezeichnungen für einzelne Reaktorkomponenten wurden teilweise an die Begrifflichkeiten des konventionellen HFBR angelehnt. Schon an dieser Stelle sollen einzelne Begriffe und Abkürzungen definiert werden, auch wenn detaillierte Erläuterungen teilweise erst in späteren Kapiteln folgen. Als MBB (Membranbasierter Bioreaktor) wird im Folgenden das Reaktorkonzept bezeichnet bzw. der entwickelte Bioreaktor benannt.

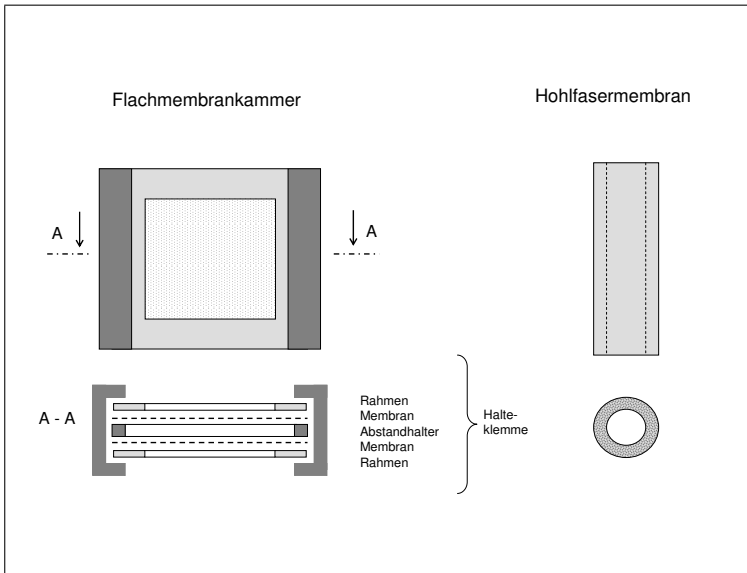
Bioreaktor	Der Bioreaktor umfasst die stationäre Geräteeinheit sowie den Einwegpart.
stationäre Geräteeinheit	umfasst das technische Equipment für Antrieb, Versorgung sowie Mess- und Regeltechnik; die stationäre Geräteeinheit ist wiederverwendbar.
Modul	Der komplette Zylinder inklusive der Membranfasern; das Modul ist komplett ein Einwegartikel.
Kulturraum (KR)	Der Raum im Modul, in dem die Zellen kultiviert werden, beim MBB das innere Volumen aller Hohlfasermembranen.
Versorgungsraum (VR)	Der Raum, durch den Medium und Gas zur Versorgung der Zellen perfundieren, beim MBB das die Membranfasern umgebende Volumen im Modul.

## 3.2 Auswahl der Membran

Wie in Kapitel 1.3 vorgestellt, sollten membranumschlossene Kammern als Kultivierungsraum für die Zellen verwendet werden. Es war notwendig, Entscheidungen bzgl. der Form der Membran und ihrer charakteristischen Parameter zu treffen. Letztere sind v.a. technische Größen wie Porendurchmesser und Wandstärke, die jeweils den Zellrückhalt und die Versorgung der Zellen entscheidend beeinflussen.

### 3.2.1 Design der Membrankammern

Als Ausgangsmaterial für Membrankammern waren sowohl Flachmembranen als auch Hohlfasermembranen denkbar. Aus Flachmembranen wurden quaderförmige Kammern gefertigt, die an zwei Seiten durch Membranflächen begrenzt sind. Hierbei bedurfte es einer Konstruktion zur dichten und stabilen Verbindung der zwei Membranen sowie eines Abstandhalters zwischen den Membranen zur Schaffung einer Kammer (Langhammer, 2002). Hohlfasermembranen konnten bei ausreichend großem Innendurchmesser direkt als Kammer eingesetzt werden (siehe Abbildung 3.1).



**Abb. 3.1:** Membrankammer aus Flachmembranen (links) und Hohlfasermembran (rechts).

Da die Versorgung der Zellen im beschriebenen Konzept auf einem diffusiven Transport über die Wand der Membrankammer basiert, war ein möglichst großes Verhältnis von Membranfläche zu eingeschlossenem Volumen wünschenswert. Bei der Wahl zwischen Flachmembrankammern und Hohlfasermembranen haben letztere mit dem kreisförmigen Querschnitt das größere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis und damit das bessere Diffusionsfläche-zu-Kulturvolumen-Verhältnis. Die Entwicklung des Bioreaktors wurde mit Hohlfasermembranen fortgesetzt.

### 3.2.2 Technische Anforderungen an die Membran

Wie in Kapitel 1.3 dargestellt, sollten die Zellen innerhalb des membranumschlossenen Kulturraumes zurückgehalten und kultiviert werden, der Mediumstrom aber außerhalb der Membrankammern entlang fließen. Dies hat zur Folge, dass Nährstoffe, Metabolite und das Produkt diffusiv über die Membran

transportiert werden müssen. Tabelle 3.1 fasst die daraus folgenden Anforderungen an charakteristische Membrangrößen zusammen.

**Tabelle 3.1:** Technische Anforderungen an die Membran.

Anforderung vom Prozess	Eigenschaft der Membran
Zellrückhalt	möglichst kleine Poren
Diffusion über die Membran (Nährstoffe, Produkt, Metabolite)	große Poren, hohe Porosität, geringe Wandstärke
Stabilität	geringe Porosität, große Wandstärke
Biokompatibilität	biokompatibles Membranmaterial

Die ersten drei Anforderungen in Tabelle 3.1 widersprechen sich hinsichtlich Porengröße, Porosität und Wandstärke. Es galt einen Kompromiss zu finden. Die Effektivität des Zellrückhaltes war allein von der Porengröße, nicht aber von Porosität oder Wandstärke abhängig. Der Durchmesser der Zellen und damit der zurückzuhaltenden Partikel lag im Bereich  $5 - 15 \mu m$ . Unter Berücksichtigung einer Sicherheit wurde der maximale Porendurchmesser aus Sicht des Zellrückhaltes auf  $1 \mu m$  festgelegt. Die Produkte (Proteine), die die Membran passieren sollten, haben ein Molekulargewicht von *ca.*  $100 kDa$ , was etwa einer Größe von  $0,01 - 0,02 \mu m$  entspricht (Quelle: Universität Bremen, siehe Literaturverzeichnis). Da Proteine nicht als kugelförmige Gebilde vereinfacht betrachtet werden können und die Produkte zuverlässig und in großen Mengen die Membran passieren müssen, wurde der minimale Porendurchmesser der Membran auf  $0,1 \mu m$  festgelegt. Es ergab sich der Sollbereich der Porengröße zu  $0,1 \dots 1 \mu m$ .

Die Effektivität und Effizienz der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und des Abtransportes von Metaboliten und Produkt über die Membran, im Folgenden als Versorgung zusammengefasst, wird von allen drei genannten Membranparametern, der Porengröße, der Wandstärke und der Porosität, beeinflusst. Die Porengröße war durch den Zellrückhalt festgelegt; Wandstärke und Porosität waren in einem großen, nur durch produktionstechnische Parameter begrenzten Feld variabel. Eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten war

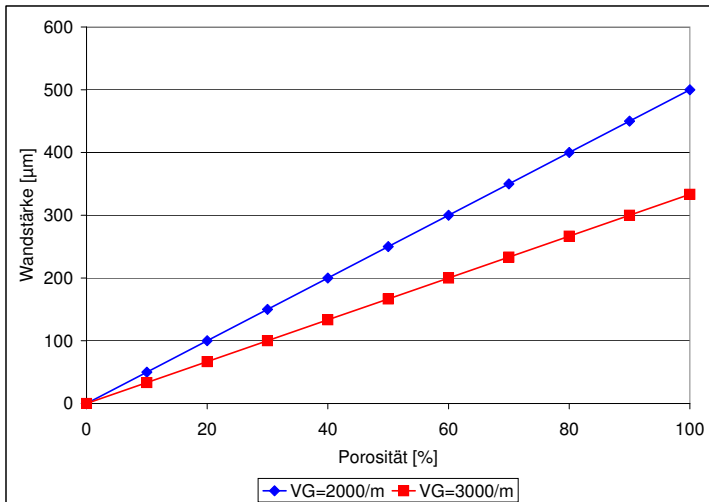
denkbar. Um das Kriterium der Versorgung einfacher abschätzen zu können, wurde die „Versorgungsgüte“  $VG$  als Quotient aus Porosität und Wandstärke definiert (Dr. Marco Riedel, ProBioGen AG).

$$VG = \frac{\text{Porosität}}{\text{Wandstärke}} = \frac{\epsilon}{\Delta x} \quad (3.1)$$

Die in den Dialysekartuschen konventioneller HFBR verwendeten Hohlfasermembranen wiesen eine Versorgungsgüte von  $2.000\ m^{-1}$  auf. Die Membran des zu entwickelnden Reaktors sollte mindestens die gleiche Versorgungsgüte aufweisen. Es war nicht möglich, die Membran konventioneller HFBR direkt zu übernehmen. Sie sind als Ultrafiltrationsmembranen mit einem cutoff von  $10 - 30\ kDa$  nicht produktdurchlässig. In Abbildung 3.2 sind die Kombinationen von Porosität und Wandstärke für die Mindestversorgungsgüte  $2.000\ m^{-1}$  dargestellt, und, um ein Gefühl für das Optimierungspotenzial zu vermitteln, für eine bessere Versorgungsgüte von  $3.000\ m^{-1}$ . Eine Versorgungsgüte von  $3.000\ m^{-1}$  würde eine bessere Versorgung erlauben, wäre aber konstruktionsbedingt schwieriger zu erreichen. Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, hieße eine solche Versorgungsgüte bei einer gut realisierbaren Wandstärke von  $300\ \mu m$  eine Porosität von 90 %. Diese Porosität wäre technisch kaum zu erreichen und widerspräche der Forderung nach mechanischer Stabilität der Membran.

Zwei weitere Anforderungen an die Membran waren zu definieren. Um Zellkultivierung zu ermöglichen und kein Risiko für das als pharmazeutischen Wirkstoff einzusetzende Produkt zu generieren, musste das Membranmaterial biokompatibel sein. Weiterhin galt es, die Membranen im Reaktorbau zu verarbeiten und in einem Modul robust zu befestigen. Hierfür mussten die Membranen gut klebbar sein und eine gewisse mechanische Stabilität aufweisen.

Zusammenfassend wurde eine Hohlfasermembran gesucht, die eine Porengröße von  $0,1 \dots 1\ \mu m$  und eine Versorgungsgüte von mindestens  $2.000\ m^{-1}$  aufweist, biokompatibel, mechanisch stabil und gut klebbar ist.



**Abb. 3.2:** Versorgungsgüte VG (Quotient aus Porosität und Wandstärke) in Abhängigkeit beider Variablen. Es sind unendlich viele Kombinationen möglich, die nicht vollständig getestet werden können.

#### 3.2.3 Ergebnisse der Membrantestung

Es standen drei Hohlfasermembranen zur Verfügung, die in verschiedenen Tests auf ihre Eignung hin untersucht wurden. Als Testkriterien wurden die im vorigen Kapitel erörterten Punkte genutzt. Die Membran A wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes zur Entwicklung einer lösemittelfreien Fertigungsmethode für Hohlfasermembranen entsprechend der genannten Anforderungen von der GKSS (GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, heute Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Deutschland) entwickelt und produziert. Die Membran B wurden entsprechend der genannten Anforderungen von der Becit GmbH (Bitterfeld-Wolfen, Deutschland) entwickelt und in geringer Stückzahl produziert. Die Fertigung erfolgte im klassischen Nassspinnverfahren, bei dem Lösemittel zum Einsatz kommen. Reste dieser Lösemittel, die in der Membran verbleiben, könnten später inhibierende oder toxische Wirkung auf die kultivierten Zellen ausüben. Die Membran C entstammte einer Mustercharge der Membrana GmbH (Wuppertal, Deutschland), sie wurde ebenfalls im Nassspinnverfahren gefertigt.

Die Sollwerte sowie die Testergebnisse der drei Membranen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Alle drei Membranen bestanden aus Polyethersulfon (PES), einem allgemein als biokompatibel bekannten Material. Da aus Erfahrung bekannt war, dass auch biokompatible Materialien Zellwachstum und Produktivität inhibieren können, z.B. aufgrund des für die Herstellung der Membran verwendeten und ggf. nicht vollständig ausgespülten Lösemittels, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.2).

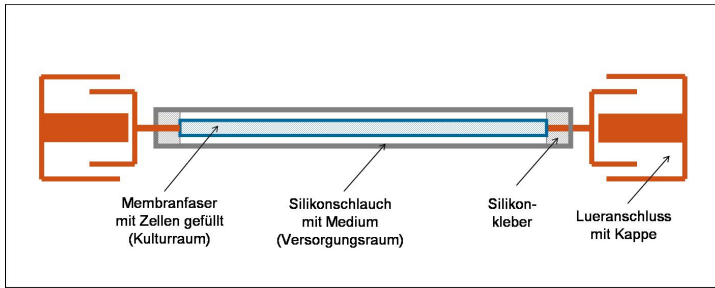
**Tabelle 3.2:** Vergleich der drei zur Verfügung stehenden Membranen bzgl. der kritischen Membranparameter.

	Porendurchmesser	Versorgungsgüte	Verarbeitbarkeit
Sollvorgabe	0,1 – 1 $\mu\text{m}$	2.000 $\text{m}^{-1}$	<i>klebbar, biegsam</i>
Membran A	1 – 2 $\text{mm}$	<i>max.</i> 400 $\text{m}^{-1}$	<i>spröd, brüchig</i>
Membran B	7,3 $\mu\text{m}$	6 $\text{m}^{-1}$	<i>brüchig</i>
Membran C	0,6 $\mu\text{m}$	3.000 $\text{m}^{-1}$	<i>klebbar, biegsam</i>

Die Membran C erreichte als einzige die geforderte Versorgungsgüte. Ihr Porendurchmesser sicherte einen Zellrückhalt, die Verarbeitbarkeit war gegeben und der Toxizitätstest zeigte keine Inhibierung der Zellaktivität.

Zwei weitere wichtige Fragen waren im Rahmen der Membranauswahl zu beantworten. Zum einen, ob Zellen im Inneren der Membranen grundsätzlich am Leben gehalten werden können, und zum anderen, ob die Membran ausreichend produktdurchlässig ist. Die Produktdurchlässigkeit war eine wesentliche Anforderung an die Membran, um eine zellfreie und kontinuierliche Ernte zu ermöglichen (vgl. Kapitel 1.3). Hierfür wurde die favorisierte Membran C als Einzelhohlfaser (EHF) getestet. Das Experiment mit EHF wurde so aufgebaut, wie von Gramer *et al.* beschrieben (Gramer *et al.*, 1998).

In Abbildung 3.3 ist eine schematische Darstellung der EHF zu sehen. Die Zellen wurden im Inneren der Membranfaser, im Kulturraum (KR), kultiviert.



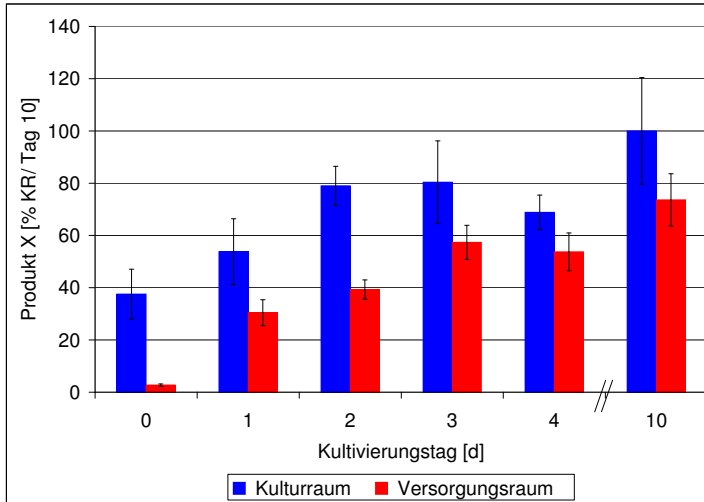
**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung einer Einzelhohlfaser (EHF).

Der Versorgungsraum (VR) wurde durch einen Silikonschlauch gebildet, der die Membranfaser komplett umgibt. Die Befüllung bzw. Entleerung des VR erfolgte mittels Spritze und Kanüle, die Kanüle wurde durch die Schlauchwand gestochen. Eine zweite Kanüle wurde für den Druckausgleich verwendet.

Einen Phasenwechsel zwischen Medium und Gas gab es in diesem Testsystem nicht. Die EHF wurden statisch im Brutschrank kultiviert. Sauerstoff konnte durch die Silikonwand, durch das Medium und über die Membran zu den Zellen diffundieren. Die Diffusionsstrecke war hier deutlich länger als in dem allgemein für den MBB geplanten Versorgungsprinzip (zeitweise im Gas hängende Membranen), stellte aber den „worst case“ dar. Würden hier Zellen erfolgreich kultiviert, so sollte dies auch im MBB möglich sein.

Es wurde die CHO-Zelle kultiviert und eine gleichbleibende oder leicht steigende Vitalzellzahl über vier Tage gemessen (nicht dargestellt). In Abbildung 3.4 sind die Produktkonzentrationen sowohl im KR, als auch im VR dargestellt. Alle Messwerte wurden auf die Produktkonzentration an Tag 10 im KR normiert. Die Membran C wies an Tag 10 im VR 80 % des KR-Wertes auf. Das bedeutet, dass ein Produkttransport per Diffusion stattgefunden hatte.

Die Membran C, die als einzige die geforderten Spezifikationen in den technischen Daten erreicht hatte, zeigte in den EHF-Tests eine Vitalerhaltung der Zellen und eine gute Produktdurchlässigkeit. Für die Fortsetzung der Reaktorentwicklung wurde die Membran C verwendet. In Tabelle 3.3 sind die charakteristischen Membranwerte in einer Übersicht dargestellt.



**Abb. 3.4:** Produktkonzentration in KR und VR aus der Kultivierung von CHO in Einzelhohlfasern (EHF); Mittelwert aus sechs EHF pro Tag (an Tag 10 n=4), normiert auf Produktmenge im Kulturraum an Tag 10; Membran C.

**Tabelle 3.3:** Membran C, charakteristische Größen.

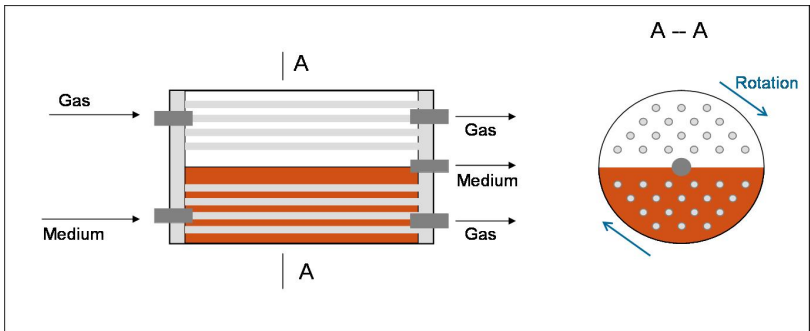
Größe	ermittelter Wert
Membrandicke (Wandstärke)	$237 \pm 6 \mu m$
Wasserpermeabilität	$10,9 \pm 0,7 m^3/(m^2 hbar)$
Porendurchmesser	$0,61 \pm 0,04 \mu m$
Porosität	60 %
Innendurchmesser	$1,45 \pm 0,01 mm$

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden Diffusionskoeffizienten der Membran für Glukose und Protein (HSA) bestimmt (nicht dargestellt). Es wurde ein gutes Diffusionsverhalten beobachtet (Wellmann, 2007; Langhammer *et al.*, 2007b).

### 3.3 Moduldesign

Für die Verarbeitung von Hohlfasermembranen zu Modulen mit großer Membranfläche hat sich die parallele Anordnung vieler Membranfasern bewährt. Diese Bauweise ist sowohl bei Dialysekartuschen und damit im konventionellen HFBR zu finden, als auch bei auf Hohlfasermembranen basierenden Filtrationsmodulen. Eine Skalierbarkeit ist v.a. in radialer Richtung durch Erhöhung der Faseranzahl realisierbar.

Der Raum außerhalb der Hohlfasermembranen musste umhüllt werden und bildete dann den Versorgungsraum. Wie in Kapitel 1.3 dargelegt, sollten sich die zellgefüllten Hohlfasermembranen abwechselnd in Medium und Gas befinden. Realisiert werden sollte dies, indem ein zylindrischer Versorgungsraum zu 50 % mit Medium gefüllt wird und das Modul mit den fixierten Hohlfasermembranen um seine Längsachse rotiert (Abbildung 3.5). Auf diese Weise befände sich jede zellgefüllte Membranfaser abwechselnd in Medium und Gas. Um die 50 %ige Füllung des Moduls mit Medium dauerhaft und unkompliziert sicher zu stellen, sollte der Mediumausgang wie eine Art Überlauf mittig in der Kopfplatte positioniert werden.



**Abb. 3.5:** Längsschnitt und Querschnitt eines MBB-Moduls, Membranfasern in beispielhafter Anzahl dargestellt (real größere Anzahl Membranfasern im Modul); Modul rotiert um die Längsachse.

Für die Anordnung der Hohlfasermembranen im zylindrischen Modul waren geometrisch verschiedene Möglichkeiten denkbar. In Hohlfasermodulen für

Zellkultur, Dialyse oder Filtration liegen die Membranfasern als ungeordnete Bündel vor. Für die Anwendung im MBB mussten die Membranfasern in einem definierten Mindestabstand zueinander angeordnet werden. Die höchste Raueffizienz wies hier eine hexagonale Anordnung der Hohlfasermembranen auf.

Bauliche Details werden bei der Betrachtung der einzelnen Prototypen näher erläutert.

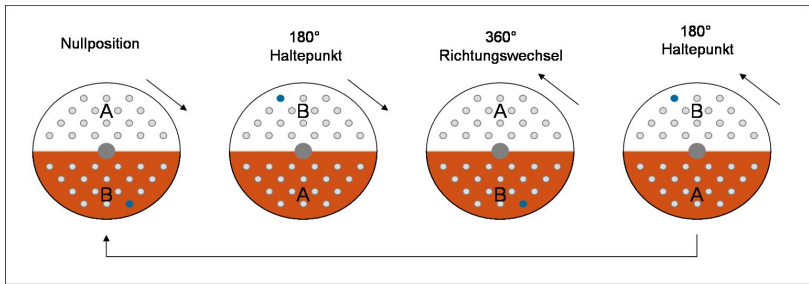
### **3.4 Grundfunktionen der stationären Steuereinheit**

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, sollte das mit Membranfasern gefüllte Modul rotieren, um den wechselnden Aufenthalt der Zellen in Medium und Gas zu ermöglichen. Das technische Equipment hierfür war als wieder verwendbare Einheit auszulegen. Weitere für den Betrieb eines Perfusionsreaktors notwendige technische Grundfunktionen sind die Mediumperfusion und die Begasung. Für die Zellkultivierung essentiell ist auch eine Temperierung des Kulturraumes. Diese technischen Grundfunktionen sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

#### **3.4.1 Rotation**

In Kapitel 3.3 wurde dargelegt, dass sich bei Unterbringung der parallelen Membranfasern in einem runden Modul und Rotation desselben, jede Faser abwechselnd im Medium und im Gas befindet. Aufgrund der Proportionalität von Radius und Winkelgeschwindigkeit ist auch sichergestellt, dass jede Faser und damit jede Zelle exakt dieselbe Zeit in Medium und Gas verbringt, sofern das Modul genau zu 50 % mit Medium gefüllt ist. Aus technischer Sicht war zu bemerken, dass aufgrund der für Perfusion und Begasung notwendigen Schläuche eine Rotation in nur eine Richtung nicht möglich ist; die Schläuche würden verdrillt werden und abreißen.

Die Lösung sollte in einem Rotationsmodus liegen, der nach einer 360°-Drehung des Moduls (eine komplette Umdrehung) die Richtung wechselt. In Abbildung 3.6 ist schematisch dargestellt, wie sich die Membranfasern während einer



**Abb. 3.6:** Rotationsschema eines MBB-Moduls (Modul im Querschnitt dargestellt); das Modul rotiert eine Umdrehung und wechselt dann die Richtung, um eine Verdrillung der Schläuche zu vermeiden; Haltepausen nach 180° stellen sicher, dass jede Faser exakt gleich lang in Medium und Gas weilt.

solchen Rotation bewegen. Da beim Richtungswechsel ( $0^\circ$ ,  $360^\circ$ ) mit einer zeitlichen Verzögerung bzw. einer kurzen Pause zu rechnen ist, wäre das Faserbündel B in Summe deutlich länger im Medium als Faserbündel A. Dies widerspräche dem Grundgedanken, dass jede Membranfaser einen Kulturraum darstellt, der mit jeder anderen Faser vergleichbar ist und genau gleich behandelt wird. Um diese Gleichbehandlung zu erreichen, wurde eine definierte Haltezeit nach  $180^\circ$  und beim Richtungswechsel eingeführt. Die Länge dieser Haltezeit sollte frei einstellbar sein und sich an der für den Richtungswechsel notwendigen Pausenzeit orientieren.

Die Rotation wurde über Motoren, Getriebe und Antriebswellen realisiert. Die Steuerung des Richtungswechsels und der  $180^\circ$ -Pause wird bei den einzelnen Prototypen näher betrachtet.

#### 3.4.2 Perfusion

Die Mediumperfusion sollte zum einen die Zufuhr von Nährstoffen in den Reaktor und zum anderen die Abfuhr von Metaboliten und des Produktes sicherstellen. In Tabelle 3.4 ist dargestellt, dass die jeweiligen Funktionalitäten unterschiedliche Anforderungen an die Perfusionsgeschwindigkeit stellen.

**Tabelle 3.4:** Ansprüche an Perfusionsgeschwindigkeit und Verweilzeit des Mediums, basierend auf verschiedenen Grundfunktionen des Mediums.

	<b>Verweilzeit</b>	<b>Perfusionsgeschwindigkeit</b>
Nährstoffzufuhr	niedrig	hoch
Mediumausnutzung	hoch	niedrig
Metabolitaustrag	niedrig	hoch
Produktstabilität (fragile Produkte)	niedrig	hoch
Produktkonzentration in der Ernte	hoch	niedrig

Nährstoffzufuhr und Metabolitaustrag sollten hoch sein, um zum einen genügend Nährstoffe zuzuführen und zum anderen ggf. inhibierend oder toxisch wirkende Metabolite aus dem System zu entfernen. Auch die geringe Stabilität fragiler Proteine sprach dafür, das Produkt möglichst schnell aus der Kulturumgebung zu entfernen, um es gekühlt zu lagern oder direkt aufzureinigen. Mediumausnutzung und Produktkonzentrationen sind Parameter, die man nicht auf den ersten Blick berücksichtigt, die aber große Auswirkungen auf die Produktionskosten haben. Die Mediumperfusion sollte so langsam vonstatten gehen, dass die Nährstoffe dem Medium möglichst vollständig bzw. zu großen Teilen entzogen und von den Zellen verbraucht werden. Eine zu hohe Perfusionsgeschwindigkeit bedeutet hier, dass Medium in den Abfall kommt, das noch viele wertvolle und teure Komponenten enthält. Die Produktkonzentration droht bei hoher Perfusionsrate sehr gering auszufallen, was einen zusätzlichen Aufkonzentrierungsschritt in der Proteinreinigung erfordert. Beide Effekte waren aus ökonomischer Sicht nicht gewünscht, da sie die Produktionskosten erhöhen.

Aus den oben dargelegten Sachverhalten ergab sich, dass die Perfusionsgeschwindigkeit ein Optimierungsparameter ist, der nicht nur von der Nährstoffkonzentration des Mediums, sondern auch von Produktivitätsraten und Effizienzdenken beeinflusst wird.

Die Mediumperfusion erfolgte mit Hilfe von Schlauchpumpen. Die Schläuche gehörten zum Einwegpart des Reaktors, die Pumpen zur stationären Geräteeinheit.

#### 3.4.3 Begasung

Die Begasung des Moduls spielt für die Sauerstoffversorgung der Zellen eine elementare Rolle. Um eine möglichst effektive Sauerstoffdiffusion über die Membran hin zu den Zellen zu erreichen, sollte die Konzentrationsdifferenz des Sauerstoffs über die Membran, und damit die Triebkraft der Diffusion, möglichst groß, das heißt die Sauerstoffkonzentration im Gas maximal sein. Dies kann einerseits durch ein Gasgemisch mit möglichst hohem Sauerstoffanteil bis hin zu einer Begasung mit reinem Sauerstoff realisiert werden und andererseits durch eine möglichst große Perfusionsrate von Luft. Bei einer Begasung mit mehr als 21 % Sauerstoff müsste eine Sauerstoffentnahmestelle am Reaktor vorhanden sein. Der MBB wurde entwickelt, um den konventionellen HFBR zu ersetzen, der mit CO<sub>2</sub> und Raumluft begast wird. Das System sollte nicht komplexer werden. Es wurde entschieden, die Reaktorentwicklung zunächst auf Luftbegasung auszurichten.

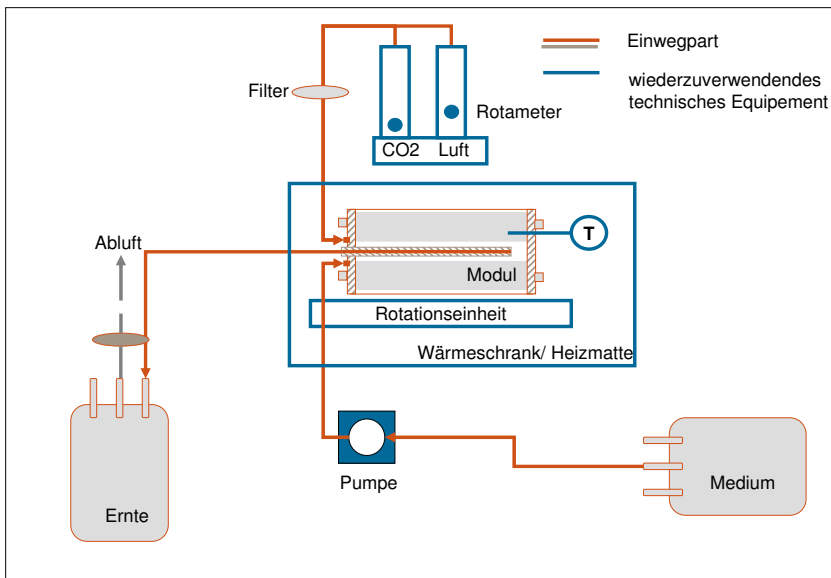
#### 3.4.4 Temperierung

Ein letzter, für die Zellkultur unabwendbar wichtiger technischer Parameter ist die Temperierung des Systems. Gerade durch die ständige Zufuhr (kalten) Mediums und Gases muss ein besonderes Augenmerk auf die Aufrechterhaltung der Temperatur gelegt werden. Die kleineren Prototypenreaktoren wurden direkt im Wärmeschrank betrieben, der Pilotmaßstab wurde mit einer Heizmatte um das Modul ausgestattet.

Notwendige Voraussetzung für eine Temperaturregelung ist eine Temperaturmessung im Modul. Das Modul ist ein Einwegartikel; ein PT100 o.ä. wäre als Einwegartikel zu teuer. Die Entwicklung wurde darauf ausgerichtet, in das Einwegmodul eine Hülse einzubauen, in die dann, ohne direkte Mediumberührung, ein Temperaturfühler gesteckt werden konnte.

### 3.4.5 Zusammenfassung, allgemeines Fließschema des MBB

In Abbildung 3.7 ist das erarbeitete Bioreaktordesign zusammengefasst dargestellt. Einerseits sind die Einwegkomponenten – das membrangefüllte Modul, die Schläuche, Medium- und Erntegefäße – in rot/ grau dargestellt, andererseits die stationären technischen Geräte – Rotationseinheit, Temperiereinheit, Pumpe und Begasungsstation – in blau.

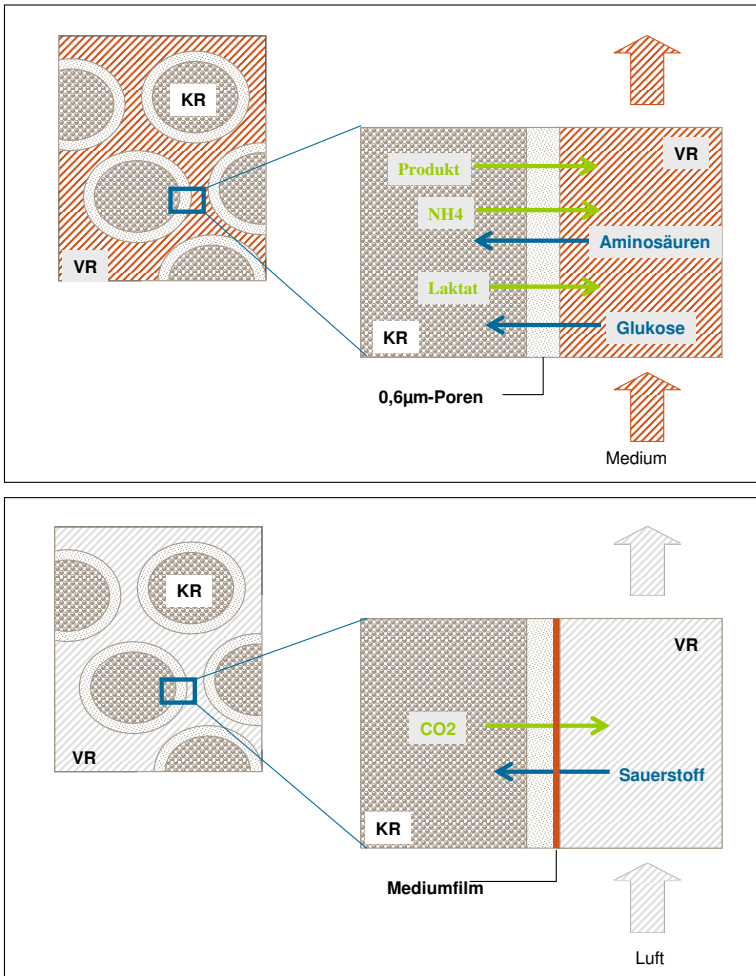


**Abb. 3.7:** Fließschema des MBB, der Einwegpart ist rot/ grau dargestellt, die stationäre Geräteeinheit blau.

### 3.5 Versorgung der Zellen

In diesem Abschnitt soll das Versorgungsprinzip des MBB kurz zusammengefasst werden. Frischmedium und Gas sollen kontinuierlich in den Versorgungsraum (VR) des Moduls strömen. Der VR ist immer zu 50 % mit Medium gefüllt. Die Membranen befinden sich abwechselnd in Medium und Gas. Hängt eine Membranfaser im Medium, können Nährstoffe über die zu 60 % offene Membran ins Innere der Hohlfasermembranen, in den Kulturraum (KR), diffundieren (vgl. Abbildung 3.8). Umgekehrt verlassen Metabolite und das Proteinprodukt den KR mittels Diffusion über die Membranwand und werden vom Perfusionsstrom des VR aus dem Modul getragen.

Hängt eine Membran in der Gasphase des Reaktors, bleiben ihre Poren aufgrund von Kapillarkräften mit Medium gefüllt. Nach dem Auftauchen aus dem Medium ist jede Hohlfasermembran von einem dünnen Mediumfilm umgeben. Diese Mediumschicht schützt die Zellen vor direktem Kontakt mit toxischen Sauerstoffradikalen und ermöglicht den Sauerstofftransport zu den Zellen per Diffusion im Medium. Es wird postuliert, dass die Sauerstoffdiffusion aufgrund des kurzen Diffusionsweges (ca. 1 mm + Mediumfilmdicke bis zum Zentrum der Hohlfasermembran) und der maximalen Konzentrationsdifferenz (am äußeren Rand des Mediumfilmes kann jeweils Luftsättigung angenommen werden) sehr effektiv verlaufen würde.



**Abb. 3.8:** Versorgungsströme an der Membranfaser (Querschnitt); oben: Faser im Medium eingetaucht; unten: Faser im Gas.

### 3.6 Modell zur Abschätzung der mit Sauerstoff versorgbaren Zellzahl

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, erfolgt der Nährstofftransport vom perfundierenden Medium- und Gasstrom zu den Zellen diffusiv über die Membran. Am Beispiel des kritischen (und ggf. zuerst limitierenden) Sauerstoffes soll mit Hilfe eines theoretischen Modells abgeschätzt werden, ob über die gewählte Membran eine ausreichende Versorgung der Zellen gewährleistet werden kann.

Das aufgestellte Modell beschreibt einen rein diffusiven Transport durch die Poren der Membran. Es erfolgte keine Betrachtung des weiteren Stofftransportes im Inneren der Membranfaser, also im zellgefüllten Kulturraum.

Der Stoffstrom  $n$  eines diffusiven Transportes ergibt sich gemäß dem 1. Fick'schen Gesetz wie folgt:

$$n = D_e \cdot A \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (3.2)$$

$D_e$  - Diffusionskoeffizient

$A$  - Diffusionsfläche

$\Delta c$  - Konzentrationsdifferenz

$\Delta x$  - Diffusionsweg (Wandstärke)

Die Fläche  $A$  ergibt sich aus dem Produkt der Membranoberfläche  $A_M$  und der Porosität  $\epsilon$ . Hierdurch wird sichergestellt, dass nur vollständig durchlässige Poren als Diffusionsfläche eingerechnet werden. Als Membranfläche  $A_M$  wurde die Innenfläche der Membran genutzt, also die minimale Fläche und damit der „worst case“.

$$A = \epsilon \cdot A_M \quad (3.3)$$

Weiterhin wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen, das Produkt aus spezifischer Sauerstoffverbrauchsrate  $q_{O_2}$ , Zellkonzentration  $X$  und Volumen des Kulturraums  $V_{KR}$ , in das Modell aufgenommen. Dieser stellt den Mindeststoffstrom  $n_{O_2}$  dar, der notwendig ist, um die Zellen ausreichend zu versorgen.

$$n_{O_2} = q_{O_2} \cdot X \cdot V_{KR} \quad (3.4)$$

Der diffusive Stoffstrom  $n$  und der zelluläre Sauerstoffverbrauch  $n_{O_2}$  werden gleichgesetzt. Durch Einsetzen der Berechnungsformel für die Mantelfläche und das Innenvolumen ergibt sich eine vereinfachte Darstellung der Formel.

$$D_e \cdot \epsilon \cdot A_M \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} = q_{O_2} \cdot X \cdot V_{KR} \quad (3.5)$$

$$D_e \cdot \epsilon \cdot \Pi \cdot d_i \cdot l \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} = q_{O_2} \cdot X \cdot \frac{\Pi}{4} \cdot d_i^2 \cdot l \quad (3.6)$$

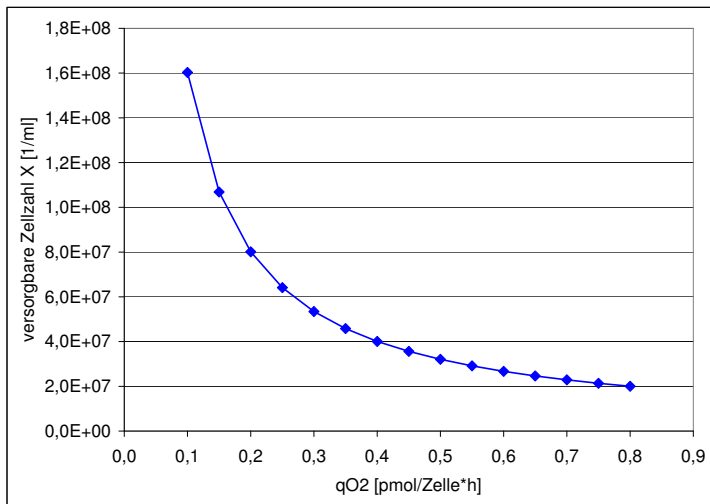
$$D_e \cdot \epsilon \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} = q_{O_2} \cdot X \cdot \frac{d_i}{4} \quad (3.7)$$

$d_i$  - Innendurchmesser der Membranfaser     $l$  - Länge der Membranfaser

Als Zielwert sollte die erreichbare Zelldichte  $X$  im Kulturraum betrachtet werden. Es wurden die charakteristischen Größen ( $\epsilon$ ,  $\Delta x$ ) der gewählten Membran C verwendet (vgl. Tabelle 3.3 auf Seite 35). Einzig die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen wurde variabel gehalten. Für die Sauerstoffdifferenz über die Membran wurde angenommen, dass der Sauerstoff im KR vollständig von den Zellen verbraucht wurde und somit die Sauerstoffdifferenz über die Membran maximal sei.

**Tabelle 3.5:** Parameter für das Modell.

Parameter	Erläuterung	Formelzeichen	Wert
Diffusionskoeffizient	Sauerstoffdiffusion in Wasser	$D_e$	$0,108 \text{ cm}^2/h$
Porosität	aus Wasserpermeabilität berechnet	$\epsilon$	60 %
Konzentrationsdifferenz	Luftbegasung, 37°C	$\Delta c$	$6,7 \text{ mg/l}$
Wandstärke		$\Delta x$	$237 \text{ }\mu\text{m}$
Innendurchmesser		$d_i$	$1,45 \text{ mm}$



**Abb. 3.9:** Im Inneren der Membranfasern versorgbare Zelldichte in Abhängigkeit des spezifischen Sauerstoffverbrauches der Zellen.

Um die versorgbare Zellkonzentration  $X$  in Abhängigkeit der variablen spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate zu bestimmen, wurde Gleichung 3.7 nach  $X$  umgestellt:

$$X = \frac{D_e \cdot \epsilon \cdot 4 \cdot \Delta c}{\Delta x \cdot q_{O_2} \cdot d_i} \quad (3.8)$$

Die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate  $q_{O_2}$  für Säugerzellen liegt i.A. im Bereich  $0,15 - 0,80 \text{ pmol}/(\text{Zelle} \cdot \text{h})$  (Zeng *et al.*, 2006). In Abbildung 3.9 ist die erreichbare Zellkonzentration in Abhängigkeit der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate dargestellt. Es zeigte sich, dass nur bei sehr geringen Verbrauchsrate bis  $0,16 \text{ pmol}/(\text{Zelle} \cdot \text{h})$  die angestrebte Hochzelldichte von mindestens  $1E8/\text{ml}$  erreicht werden kann. Bei höheren Sauerstoffverbrauchsrate können  $2-8E7/\text{ml}$  ausreichend versorgt werden. Während der Reaktortestung sollte geprüft werden, ob diese Zelldichten auch praktisch zu erreichen sind.

### 3.7 Maßstäbe der MBB-Familie

Das Ziel der beschriebenen Reaktorentwicklung ist ein Bioreaktor zur Produktion rekombinanter Proteine und Antikörper in Zellkulturen für den biopharmazeutischen Markt. Um eine effiziente Entwicklung von Produkten und Prozessen zu ermöglichen, ist es erforderlich, den Bioreaktortyp in verschiedenen Maßstäben verfügbar zu haben. Für das Screening von Produktkandidaten und die Prozessentwicklung braucht man Bioreaktoren im kleinen Maßstab (Gramer *et al.*, 2000a). Für die Produktion von Material für klinische Studien und den Bereich der personalisierten Medizin (Hirschel, 2007) bedarf es einer mittleren Reaktorgröße. Um final den Markt mit einem biopharmazeutischen Wirkstoff beliefern zu können, ist ein Produktionsreaktor im großen Maßstab notwendig. Für die beschriebene MBB-Entwicklung wurde das Konzept einer Reaktorfamilie in drei Maßstäben erdnen (Langhammer *et al.*, 2005a):

Prozessentwicklungsmaßstab:	Kleiner Maßstab für Produktscreening und Prozessentwicklung; Parallelisierung kleiner Reaktoren.
Pilotmaßstab:	Mittlerer Maßstab für Prozessevaluierung sowie Materialproduktion für klinische Studien und personalisierte Medizin.
Produktionsmaßstab:	Großer Maßstab für die Marktproduktion des biopharmazeutischen Wirkstoffes.

Für die in der konventionellen Biotechnologie eingesetzten Rührkesselreaktoren gibt es ähnliche Maßstabsabstufungen. Im Bereich der Rührkessel haben sich Kennzahlen, wie Durchmesser-Höhe-Verhältnis und Energieeintrag, etabliert, um trotz Maßstabsveränderung möglichst gleiche Umgebungsbedingungen für die Zellen zu erhalten. Diese Kennzahlen sind für den MBB, aufgrund des völlig anderen Reaktorkonzeptes, nicht anwendbar. Die Grundlage für die Maßstabsveränderung am MBB ist die Gleichhaltung des kleinsten Elementes des Reaktors. Eine einzelne Membranfaser bildet einen Kulturraum für die Zellen. Durch die Parallelisierung vieler Membranfasern wird der gleiche Kulturraum vervielfacht und die Summe der Kulturräume damit vergrößert. Eine Maßstabsänderung am MBB sollte hauptsächlich über die Variation der Anzahl der Membranfasern erfolgen. Weiterhin sollte das Verhältnis Kulturraum zu Versorgungsraum ähnlich gehalten werden.

Für die Entwicklung des Reaktorkonzeptes wurden zwei weitere Maßstäbe verwendet, die später keinen Eingang in die Reaktorfamilie finden sollen:

12HF-Modul:	Testung wesentlicher Membranparameter.
Labormaßstab:	Testung der grundsätzlichen Funktionalität des Reaktorkonzeptes („proof of concept“).

## **4 Prototypenbau und Konzeptprüfung („proof of concept“)**

Nach der Erarbeitung eines allgemeinen Reaktordesigns galt es nun, in einem „proof of concept“, die technische und biologische Funktionalität des Reaktorsystems zu zeigen. Letzteres bedeutet v.a. den Nachweis, dass Zellen innerhalb einer Hohlfasermembran unter dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Versorgungsprinzip kultiviert werden können und das Zielprotein produzieren. Auch soll geprüft werden, ob eine kontinuierliche und zellfreie Ernte, wie angestrebt, erfolgreich zu realisieren ist.

Die Herstellung der Prototypen für die Funktionsprüfung unterlag in dieser frühen Projektphase zwei einschränkenden Faktoren. Auf der einen Seite waren die finanziellen Mittel begrenzt, auf der anderen Seite die Verfügbarkeit der Membran limitiert. Die gewählte Membran C entstammte einer Mustercharge, war aber bis dato noch nicht in die Marktproduktion übergegangen. Aufgrund der geringen Menge verfügbarer Membranfasern sollten zunächst Voruntersuchungen zu wesentlichen Entscheidungen für die Reaktorentwicklung in kleinen, einfachen Testmodulen mit 12 Fasern á 20 cm Länge durchgeführt werden. Dem sollte der eigentliche „proof of concept“ im Labormaßstab folgen.

### **4.1 Vorversuche in Testmodulen zur praktischen Anwendbarkeit der Membranfasern**

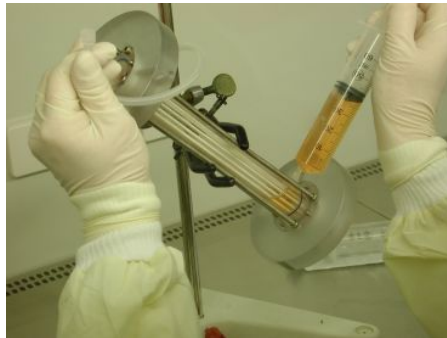
Aus verfahrenstechnischer Sicht gab es neben den im Kapitel 3.2.3 behandelten Parametern Zellrückhalt und Produktdurchlässigkeit zwei weitere, die Membranfasern betreffende, Fragestellungen. Zum einen wird das Verblocken der Membran, und damit eine massive Behinderung des Stoffaustausches über

die Membran, allgemein als großes Risiko von Membranreaktoren betrachtet (Ozturk, 1996). Hier galt es zu prüfen, in wie weit die Membran bei einer Langzeitkultivierung von Zellen verblockt und sich in ihrer Stoffdurchlässigkeit verschlechtert. Zum anderen sollte möglichst frühzeitig ein optimaler Abstand der Membranfasern ermittelt und festgelegt werden. Hier ist vor allem wichtig, dass alle Fasern auch in der Gasphase frei hängen und von allen Seiten von Luft umströmt werden können.

Beide Fragen sollten mit Hilfe eines zwölf Hohlfasermembranen enthaltenden Testmoduls (12HF-Modul) experimentell beantwortet werden. Die Versuche wurden mit CHO-Zellen durchgeführt.

#### 4.1.1 Modul, Antriebseinheit und Betrieb der 12Hohlfaser(HF)-Reaktoren

Um die oben genannten Punkte zu testen, wurde ein kleines Modul mit zwölf parallel angeordneten Membranfasern entwickelt. Der Kulturraum (KR) des Moduls umfasste  $\sim 4\text{ ml}$  in den Fasern. Der Versorgungsraum (VR) umfasste  $100\text{ ml}$ , wovon  $50\text{ ml}$  mit Medium gefüllt wurden.



**Abb. 4.1:** Mediumwechsel an einem 12-HF-Modul: mit einer Spritze wird verbrauchtes Medium abgezogen bzw. Frischmedium zugegeben; Schlauchöffnung am linken Modulende ermöglicht Gasaustausch.

In diesem Stadium der Reaktorentwicklung waren Investitionen in Antriebs- und Steuereinheiten noch nicht möglich. Die Module rotierten auf einer vor-

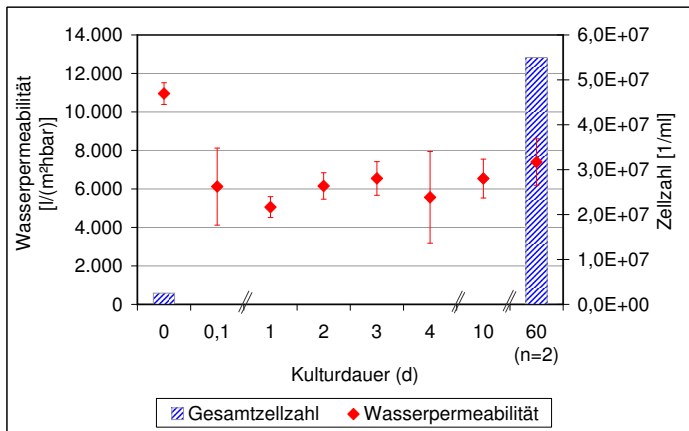
handenen Antriebseinheit für Rollerflaschen. Da hier ein Richtungswechsel nicht vorgesehen und nicht möglich war, konnten die Module nicht mit Perfusionschläuchen versehen werden (Verdrillung und Abreißen der Schläuche). Das Modul war halb mit Medium und halb mit Gas gefüllt, so dass ein wechselnder Aufenthalt der Zellen in Medium und Gas gesichert war. Da aber keine Perfusion möglich war, wurden die Module in gewissen Abständen (bis 3x tgl.) unter die Laminar-Flow-Werkbank genommen, um einen Gaswechsel durchzuführen. In Abhängigkeit der Glukosekonzentration im VR wurde das Medium im VR teilweise oder komplett ausgetauscht.

#### **4.1.2 Versuchsanordnungen und Ergebnisse der Experimente mit 12HF-Modulen**

Um Aussagen über die Langzeitdurchlässigkeit der Membran bzw. das Risiko des Verblockens der Membran durch Proteine treffen zu können, wurden 12HF-Module über verschiedene Prozesslaufzeiten mit Zellen kultiviert. Nach Entnahme der Zellen am Prozessende wurde jeweils eine Messung der Wasserpermeabilität über die gesamte Membranfläche des Moduls vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 zusammen gefasst.

In den ersten Stunden nach der Befüllung der Hohlfasermembranen mit Zellen (0,1 d in Abbildung 4.2) sank die Wasserpermeabilität von  $11.000 \text{ l}/(\text{m}^2\text{hbar})$  der unbenutzten Membran auf  $6.000 \text{ l}/(\text{m}^2\text{hbar})$  ab. Solch ein Absinken der Permeabilität auf ca. 50 % des Wertes nach Zellbesiedelung wurde auch in anderen HFBR beobachtet (Patankar *et al.*, 1990). Die erreichte Wasserpermeabilität von  $6.000 \text{ l}/(\text{m}^2\text{hbar})$  blieb über 60 Tage Zellkultivierung konstant. Wie die zwei Balken erkennen lassen, war über die 60 Tage Kulturdauer eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu beobachten, die nachweislich Proteine bildete (nicht dargestellt). Die Zunahme der Zell- und Proteinlast beeinflusste die Durchlässigkeit der Membran für Wasser nicht.

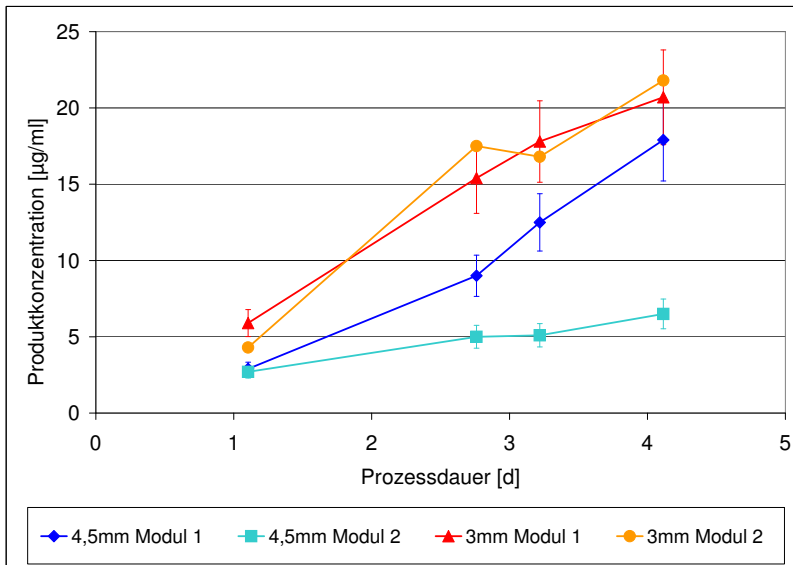
Der zweite mit diesem Modul zu testende Parameter war der Faserabstand. Er sollte einerseits so klein wie möglich sein, um viel Kulturraum pro Modulvolumen unterzubringen (Raumeffizienz). Andererseits durften keine Me-



**Abb. 4.2:** Wasserpermeabilität über die Membranen eines 12HF-Moduls, zum Zeitpunkt Null wurden unbenutzte Module vermessen, zu späteren Zeitpunkten mit Zellen kultivierte Module nach Entnahme der Zellen; bei allen Messungen wurden  $n=3$  Module vermessen (außer 60d).

diumbrücken zwischen den Fasern verbleiben, wenn diese sich in der Gasphase befinden, da eine Gaszugängigkeit von allen Seiten einer Membran Grundlage des kurzen Diffusionsweges für Sauerstoff und damit für eine effektive Versorgung ist. Hier war ein möglichst großer Faserabstand wünschenswert.

Um den optimalen Abstand zu ermitteln, wurden Module mit einem Faserabstand (Zentrum zu Zentrum) von  $3\text{ mm}$  und Module mit einem Abstand von  $4,5\text{ mm}$  miteinander verglichen. Durch tägliche Beobachtung wurde festgestellt, dass sich auch zwischen den Fasern mit dem geringeren Abstand keine Mediumbrücken bilden, wenn die Fasern aus der Flüssigkeit auftauchen. Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen, wirkt sich der geringere Faserabstand nicht negativ auf die Zielgröße, die Produktkonzentration im VR, aus.



**Abb. 4.3:** Produktkonzentration im 12HF-Modul nach Zellkultivierung; 3mm-Faserabstand zeigt keine geringere Produktbildung als 4,5mm-Faserabstand.

#### 4.1.3 Fazit der Vorversuche in 12HF-Modulen

Die bei Membranen oft vorhandene Gefahr, dass Proteine oder Zelltrümmer die Membranporen über die Zeit verblocken, war hier nicht gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Wasserpermeabilität der Membran zwar mit dem Inokulum von Zellen auf 50 % ihres ursprünglichen Wertes abfiel, die dann erreichte Permeabilität von  $6.000 \text{ l}/(\text{m}^2 \text{ hbar})$  aber über 60 Prozesstage konstant blieb (Langhammer *et al.*, 2005b).

Ein Faserabstand von 3 mm beeinträchtigte die Produktbildung der Zellen, verglichen mit einem Faserabstand von 4,5 mm, nicht, verbesserte aber die Raumeffizienz der Faseranordnung im Modul. Alle zukünftigen Module werden mit einem Faserabstand von 3 mm gebaut.

## 4.2 Funktionstestung im Labormaßstab

Nach den notwendigen Vor- und Entscheidungsversuchen in EHF- und 12HF-Modulen sollte nun das Reaktorprinzip in voller Funktionalität erprobt werden, mit Mediumperfusion und kontinuierlicher Ernte. Weiterhin sollten die Fasern in ihrer geplanten Länge getestet werden, 50 *cm* statt 20 *cm* wie im 12HF-Modul. Da aber zunächst nur eine geringe Anzahl Membranfasern verfügbar war, wurde nicht direkt der Pilotmaßstab gebaut, sondern eine abgewandelte Variante mit geringerer Faserzahl zu Testzwecken, im Folgenden als „Labormaßstab“ bezeichnet. In Tabelle 4.1 sind beide Module einander verglichen.

**Tabelle 4.1:** Vergleich Labor- und Pilotmaßstab bzgl. baulicher Parameter.

Parameter	Labormaßstab	Pilotmaßstab
Länge x Durchmesser	50 x 20 <i>cm</i>	50 x 20 <i>cm</i>
Faseranzahl	144	1.500
Kulturraum (KR)	110 <i>ml</i>	1, 1 <i>l</i>
Versorgungsraum (VR)	16 <i>l</i>	16 <i>l</i>

### 4.2.1 Einwegmodul im Labormaßstab

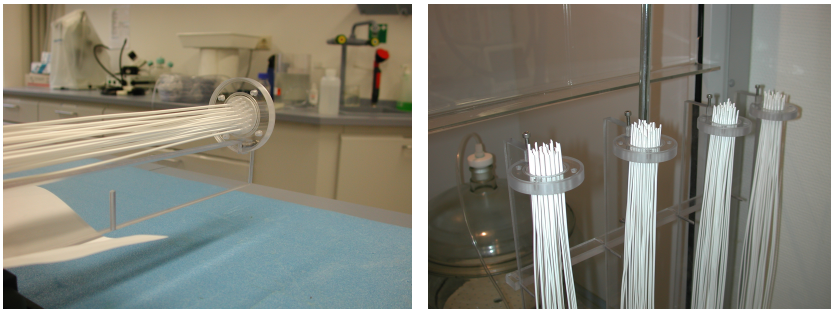
Wie in Tabelle 4.1 beschrieben, hat das Modul des Labormaßstabes zwar die gleichen äußeren Abmessungen wie das des Pilotmaßstabes, aber deutlich weniger Membranfasern. Die Membranen wurden in vier Bündeln mit dem definierten Faserabstand von 3 *mm* verbaut. Die Anordnung der vier Bündel im Modul ist in Abbildung 4.5 erkennbar.

An dieser Stelle soll detaillierter auf die baulichen Herausforderungen des Hohlfasermoduls eingegangen werden. Vier wesentliche Punkte mussten beim Modulbau gesichert werden:

- Befestigung der Fasern und Sicherung des definierten Abstandes (3 *mm* von Faserzentrum zu Faserzentrum),
- Abdichtung von Kulturraum und Versorgungsraum gegeneinander,

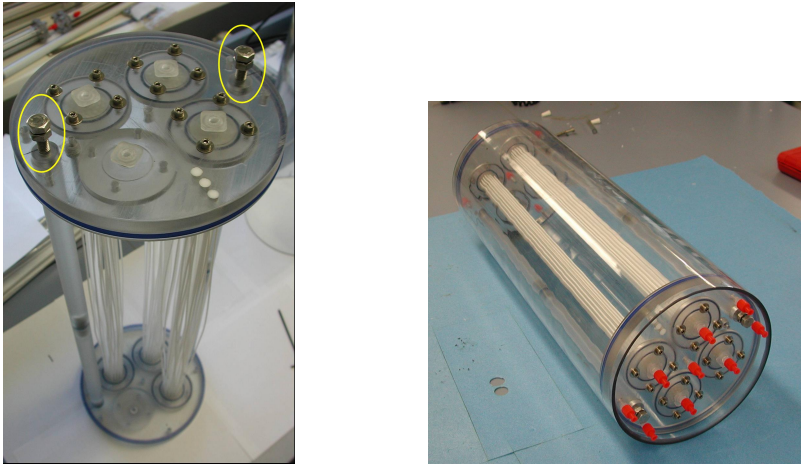
- Zugang zum KR und VR,
- Abdichtung des KR nach außen.

Bei der Herstellung konventioneller Hohlfasermodule, z.B. für Dialysekartuschen, werden die Fasern in Bündel gefasst, in Verpottungsmaterial getaucht, aushärten gelassen und dann abgeschnitten. Das Ergebnis sind in Kunststoff eingebettete Fasern mit offenem Ende. Diese relativ einfache Methode konnte hier nicht ohne weiteres angewendet werden, da auf diese Weise eingebettete Fasern ungeordnet im Bündel vorliegen, die MBB-Fasern aber hexagonal mit einem Zentrum-Zentrum-Abstand von  $3\text{ mm}$  angeordnet werden sollten. Es wurden zwei Schablonen mit hexagonalem Lochmuster pro Faserbündel vorbereitet. Die Membranfasern wurden manuell in die Lochplatten gesteckt und dann verpottet. Das Verpotten der Fasern in den Schablonen geschah mit senkrecht gestelltem Faserbündel (siehe Abbildung 4.4).



**Abb. 4.4:** Fertigung der Membranbündel für den Labormaßstab: links werden die Fasern einzeln in die Schablone mit hexagonalem Lochmuster gesteckt, rechts werden die Faserbündel zum verpotten senkrecht fixiert.

Wenn das Verpotten mit Polyurethan-Kleber vollständig und blasenfrei erfolgte, war an dieser Stelle gleichzeitig die Abdichtung zwischen KR und VR gesichert. Weiterhin galt es, die Faserbündel so einzubauen, dass sie von außen zugänglich, aber gegenüber dem Versorgungsraum abgedichtet sind. In Abbildung 4.5 (links) ist der Einbau der Membranbündel dargestellt, der die Abgrenzung zwischen KR und VR verdeutlichen soll. In die Kopfplatte waren



**Abb. 4.5:** links: Einbau der Membranbündel in das Labormaßstabsmodul; rechts: Einwegmodul im Labormaßstab: Membranfasern sind in vier Bündeln zu je 36 Fasern angeordnet; in jedem Bündel liegt eine hexagonale Anordnung der Fasern mit einem Faserabstand von 3 mm vor.

vier Senkungen gefräst, in die die vier Faserbündel eingepasst und mit Schrauben befestigt wurden. Zur Abdichtung der Auflagefläche wurden jeweils zwei O-Ringe eingesetzt. Das Konstrukt aus Membranbündeln und Kopfplatten wurde in einen Polycarbonat-Zylinder geschoben, der die Hülle des VR bildete. Jede Kopfplatte hatte weiterhin einen O-Ring auf dem Umfang, um die Dichtigkeit des VR gegenüber der Umwelt sicherzustellen (siehe auch Abbildung 4.5 rechts, O-Ringe blau).

Eine erste Befüllung des Moduls mit Wasser zeigte, dass sich die in diesem Maßstab erstmals 50 cm langen Membranfasern im feuchten Zustand dehnen und durchhängen. Damit war auch der definierte Abstand der Fasern von 3 mm zumindest in der Mitte des Moduls nicht mehr gewährleistet. Da die Membranen aber nur im trockenen Zustand eingebaut und verpottet werden können, war es nicht möglich, das Modul von vornherein auf die Maximalspannung der Fasern hin auszulegen. Es musste eine Möglichkeit geschaffen werden, die Fasern zu spannen, nachdem das Modul mit Medium befüllt und

die Fasern befeuchtet wurden.

Zwei Stangen, die der Stabilisierung des Konstruktes aus Kopfplatten und Membranfasern dienten (siehe Abbildung 4.5 links), wurden in einer Senkung in der Kopfplatte lose gelagert. Eine Durchgangsbohrung mit kleinerem Durchmesser wurde am Boden der Senkung ausgeführt und mit einem Gewinde versehen. Von außen eingeschraubte Schrauben (gelbe Markierung in Abb. 4.5 links) drückten die Stangen mit der fest mit ihnen verbundenen zweiten Kopfplatte von der ersten Kopfplatte weg, so dass sich der Abstand beider Kopfplatten vergrößerte. Auf diese Weise wurden die in den Kopfplatten fixierten Fasern gespannt. Wenige Millimeter waren ausreichend, um die feuchten Fasern zu spannen und den definierten Abstand sicherzustellen.

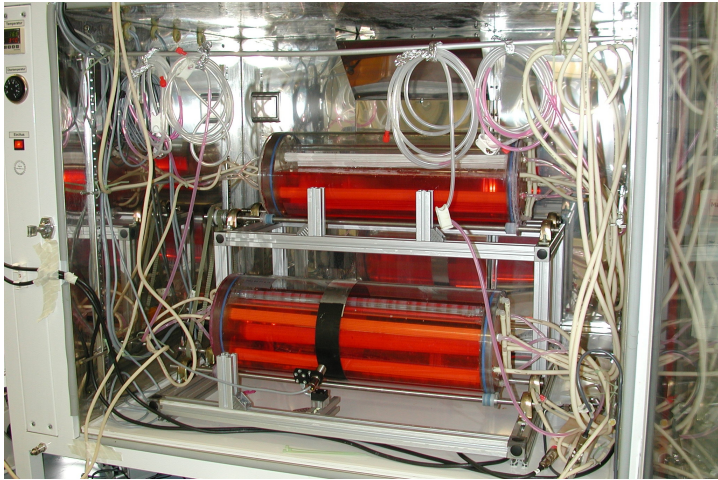
#### 4.2.2 Stationäre Betriebseinheit

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, muss die stationäre Betriebseinheit die Funktionalität von Rotation, Perfusion, Begasung und Temperierung sicherstellen. Für den Labormaßstab wurde die stationäre Betriebseinheit aus diversen Einzelgeräten kombiniert.

Für die Lagerung des Moduls wurde ein Gestell aus Aluminiumprofilen montiert. Am Gestell wurde ein Motor befestigt und die Motorkraft über Zahnriemen und Zahnräder auf die Antriebswelle übertragen. Die Kraftübertragung von der Welle auf das Modul erfolgte kraftschlüssig durch Reibung. Eine zweite, losgelagerte Welle diente der stabilen Lagerung des Moduls. Das Modul lag nicht direkt auf den beiden Wellen, sondern auf vier Lagerbuchsen, die auf den Wellen befestigt waren. Die Steuerung der Rotation erfolgte über ein Lichtschrankensystem.

Die Perfusion wurde mit Peristaltikpumpen verwirklicht. Um Zufuhr- und Abfuhrvolumenströme möglichst gleich groß zu halten, wurden 2-Kanal-Pumpen eingesetzt, bei denen Mediumzufuhrschlauch und Ernteschlauch in entgegengesetzter Richtung über denselben Pumpkopf liefen.

Für die Begasung wurde ein einfacher Kompressor eingesetzt, dessen Luftansaugschlauch i.A. in einen Brutschrank gelegt wurde, um das Modul mit



**Abb. 4.6:** Lagerung der Module auf zwei Wellen; am unteren Modul ist die Hell-Dunkel-Banderole für die Steuerung der Rotation erkennbar, die Lichtschranke ist mittig vor dem unteren Modul befestigt.

feuchter, CO<sub>2</sub>-haltiger Luft zu begasen.

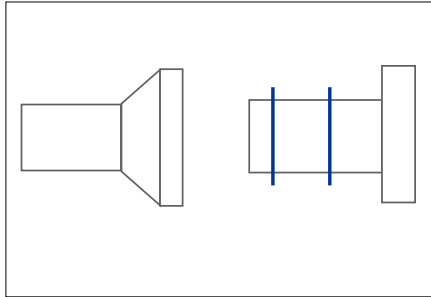
Für die Temperierung des Reaktors auf Prozesstemperatur (i.A. 37°C) wurde das Aluminiumgestell mit dem Modul in einen Wärmeschrank gestellt. Die Regelung der Schranktemperatur erfolgte über den Temperatursensor des Wärmeschrankes.

### 4.2.3 Technische Funktionalität

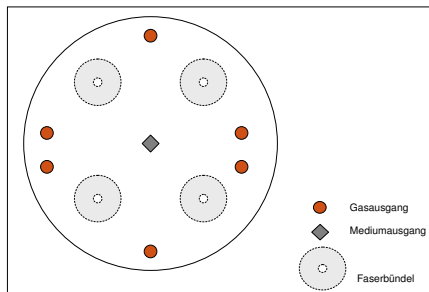
Während der ersten Testläufe zum Zusammenspiel von Modul und technischem Equipment traten noch einige Probleme auf, die es zu lösen galt.

Als ein Risiko stellte sich eine horizontale Verschiebung des Moduls heraus. Die Steuerung des Drehregimes erfolgte über Lichtschranken und eine hell-dunkel-Banderole am Modul. Es wurde beobachtet, dass sich das Modul auf den Lagerbuchsen horizontal verschob, die Banderole so aus dem Lichtstrahl heraus lief und der Motor keinerlei Steuersignale mehr bekam. Das Modul drehte sich nur noch in eine Richtung, die Schläuche verdrillten und rissen. Hierauf wurde in zweierlei Weise reagiert. Zum einen wurde die Steuerung so umprogrammiert, dass der Motor stoppt und ein Alarm aufleuchtet, wenn über einen Zeitraum von zwei Modulumdrehungen kein Signal von den Licht-

schränken aufgefangen werden konnte. Zum anderen wurden die Lagerbuchsen mit einem steilen Absatz ohne Fase versehen, so dass eine Horizontalbewegung des Moduls nahezu ausgeschlossen werden konnte, verdeutlicht in Abbildung 4.7. Außerdem wurden die Lagerbuchsen mit O-Ringen bestückt, um das Risiko von Schlupf in der Reibung Kunststoff auf Kunststoff zu minimieren.



**Abb. 4.7:** Lagerbuchsen für Module im Labormaßstab, links: flache Fase; rechts: verbesserte Version mit steiler Fase, mit Silikon-O-Ringen.



**Abb. 4.8:** Kopfplatte der Ausgangsseite des Labormaßstabs.

Ein weiteres Problem lag in der Begasung bzw. der Entgasung des Moduls. Um einen Mediumfüllstand von 50 % sicherzustellen, war der Mediumauslass zentral im Querschnitt angeordnet. Die Gasausgänge konnten damit nur dezentral

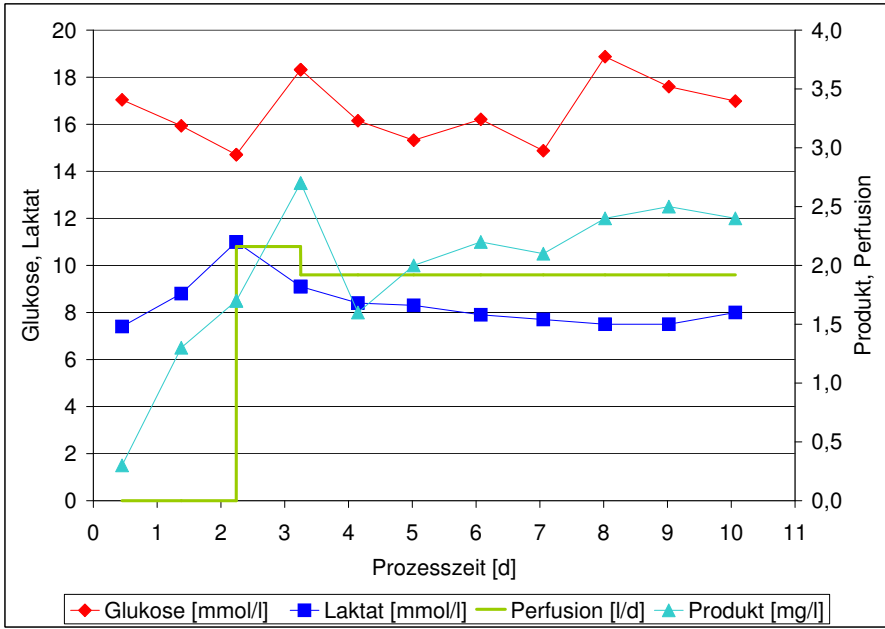
angeordnet werden (siehe Abbildung 4.8). Dies hatte aber zur Folge, dass Medium über die Gasstrecke aus dem Reaktor getragen wurde, wenn sich die Gasausgänge unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befanden. Überlegungen bzgl. lagegesteuerter Kugelventile oder an das Rotationsregime gekoppelte on/off-Ventile wurden aus Kosten- und Komplexitätsgründen verworfen. Es wurde in Kauf genommen, dass Medium über die Gasstrecke ausgetragen wird. Oberhalb des Moduls wurde eine Mediauffangflasche in die Gasstrecke integriert, in der sich das ausgetragene Medium sammelte und die Luft über einen Filter entwich. Ein Schlauch wurde von der Mediauffangflasche zum Modul gelegt, um das Medium zurückfließen zu lassen. Für den Labormaßstab war das eine annehmbare Lösung, für einen marktfähigen Reaktor musste noch eine vollständig auf Einweg basierende und weniger komplexe Lösung gefunden werden (siehe Kapitel 4.3).

#### 4.2.4 Biologische Funktionalität im Labormaßstab

Neben der technischen Funktionalität des Reaktorsystemes sollte in einem „proof of concept“ nachgewiesen werden, dass im MBB, in dem Zellen periodisch mit Sauerstoff und im Medium gelösten Nährstoffen versorgt werden, Zellen wachsen und über einen längeren Zeitraum kultiviert werden können. Weiterhin galt es zu beurteilen, ob die Zellen produzieren und ob das Produkt kontinuierlich zellfrei geerntet werden kann.

Es wurden 14 Prozesse mit der CHO-Zelle im Labormaßstab durchgeführt. Acht Prozesse endeten ohne Erfolg aufgrund von Defekten – am Modul oder an der stationären Geräteeinheit (vgl. Kapitel 4.2.3) – oder Kontaminationen. Solche Ausfälle sind in der Entwicklung einer neuen Technologie nicht ungewöhnlich, sondern Teil des Entwicklungsprozesses. Sechs Prozesse liefen erfolgreich mit Prozesszeiten zwischen zehn und 29 Tagen.

In Abbildung 4.9 ist ein Prozessverlauf beispielhaft dargestellt. Die gemessenen Konzentrationen für Glukose, Laktat und Produkt im Erntestrom verlaufen mit gleichbleibender Perfusionsrate relativ konstant. Das lässt darauf schließen, dass während der zehn Prozesstage metabolische Aktivität in einem

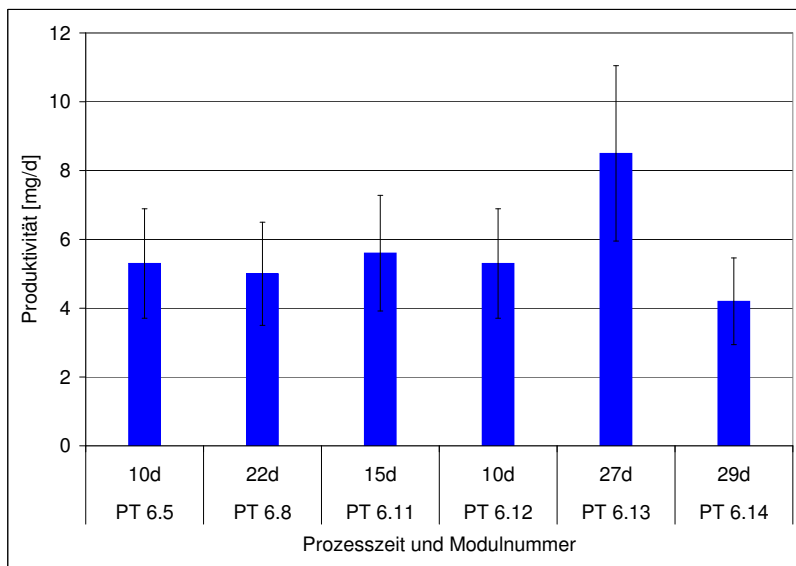


**Abb. 4.9:** Verlauf eines Prozesses im Labormaßstab, dargestellt sind Konzentrationen am Modulausgang und die Perfusionsrate.

konstanten Maße statt fand. Produkt wurde über den gesamten Prozesszeitraum im Erntestrom nachgewiesen, womit die biologische Funktionalität des Reaktors in diesem Falle positiv zu bewerten ist (Langhammer *et al.*, 2005a; Langhammer *et al.*, 2005b).

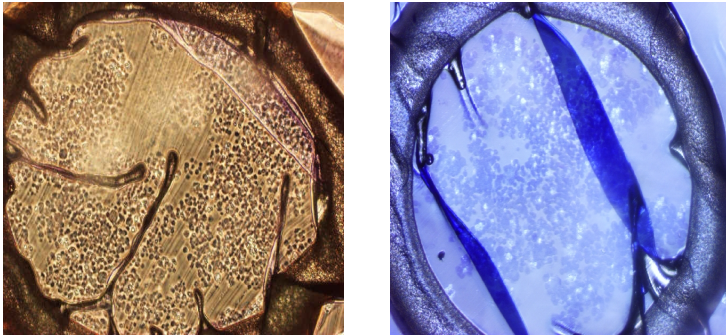
In allen sechs erfolgreichen Prozessen war eine Produktbildung zu beobachten (Abbildung 4.10). Die aus der Gesamtmenge des über den Prozess geernteten Produktes und der Laufzeit berechnete durchschnittliche Tagesproduktivität aller Zellen im Reaktor lag für alle sechs Läufe im gleichen Bereich um  $5 \text{ mg/d}$ . Der Prozess mit Modul PT 6.13 wies eine Tendenz zu einer höheren durchschnittlichen Tagesproduktivität auf, wobei aufgrund des relativ großen Fehlers keine valide Aussage getroffen werden konnte.

Am Ende der Prozesse wurde die Zellsuspension aus dem KR abgezogen und



**Abb. 4.10:** Durchschnittliche Produktivität pro Tag und Modul in den erfolgreichen Prozessen des Labormaßstabes.

vermessen. Die gemessenen Vitalitäten lagen zwischen 10 und 40 %. Letzterer Wert ist für Hochzelllichtprozesse nicht ungewöhnlich (Erfahrungswerte aus dem Produktionsbereich der ProBioGen AG). Aus dem Modul PT 6.5 wurden die Fasern einzeln entnommen, um histologische Schnitte anzufertigen. In Abbildung 4.11 sind zwei mikroskopische Aufnahmen der Schnitte zu sehen. Die Färbung diente hier primär der Sichtbarmachung der Zellen, nicht der Differenzierung von Zellbestandteilen. Die Membranquerschnitte sind zu über 50 % mit Zellen gefüllt. Es sind keine extremen Inhomogenitäten, wie z.B. nur Belegung der Membranwand und freier Innenraum, zu erkennen. Die Zellen scheinen sich zwar in Clustern zusammenzuballen, sind aber über den gesamten Membranquerschnitt verteilt. Eine Clusterballung wurde für diese CHO-Zelllinie auch in anderen Kultursystemen beobachtet und kann als zelllinientypisch gelten.



**Abb. 4.11:** Histologische Schnitte einzelner Membranfasern aus einem Modul im Labormaßstab (PT 6.5); links: 40x, Phasenkontrast, Hämosin-Eosin; rechts: 40x, Hellfeld, May-Grünwald-Giemsa

#### 4.2.5 Fazit der Erprobung des MBB im Labormaßstab

Es gelang, einen funktionsfähigen Reaktor zu konstruieren und zu betreiben. Auf technischer Seite zeigten sich einige Punkte, die im Labormaßstab eher provisorisch gelöst wurden und die in künftigen Maßstäben zu beachten sind, wie z.B. die Steuerung der Rotation sowie der Gasaustrag. Weiterhin konnten Zellen in zehn- bis 29-tägigen Prozessen kultiviert werden. Das Produkt konnte jeweils kontinuierlich und zellfrei geerntet werden. Mit Hilfe der Versuche im Labormaßstab wurde die prinzipielle Funktionalität des MBB-Konzeptes gezeigt.

### 4.3 Lösungsansatz für den Gasaustrag

Der Gasaustrag erwies sich beim Betrieb des Labormaßstabes als grundsätzliches Problem. Über die sechs dezentral angeordneten Gasausgangsports (siehe Abbildung 4.8) wurde je nach Rotationsstand Medium mit dem Gas ausgetragen. Dieses Medium musste vor dem Endfilter aus dem Gasstrom abgetrennt werden. Weiterhin wurde versucht, das Medium in das Modul zurückzuführen. Insgesamt war dies keine befriedigende Lösung.

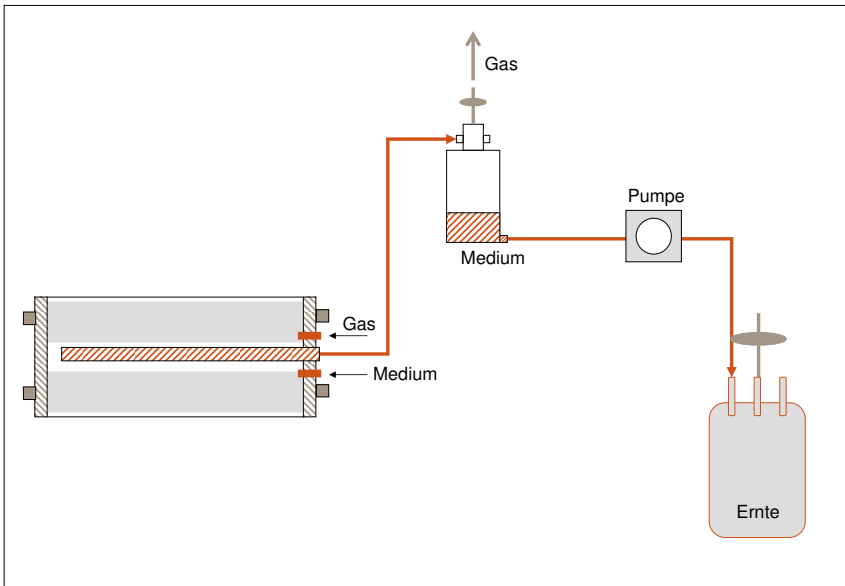
Grundsätzlich lässt es sich nicht vermeiden, dass bei einem rotierenden, zu

50 % mit Medium gefüllten Modul Medium mit dem Gasstrom mitgerissen wird. Einzige Möglichkeit, dies zu verhindern, wäre eine komplexe Anordnung und Steuerung von Ventilen, die die Gasausgangsports je nach Rotationslage öffnen oder schließen. Solch eine Lösung würde aber den technischen Rahmen des Bioreaktors sprengen und wurde daher nicht weiterverfolgt.

Stattdessen wurde versucht, dem Problem des Mediumaustrages einen Nutzen abzugewinnen, indem Gas- und Mediumausgang in einem zentralen Port vereinigt werden sollten. Durch die zentrale Lage des Ports würde genau so viel Medium vom Gasstrom mitgerissen, wie als Ernte vorgesehen bzw. notwendig wäre, um die 50 % Füllung im Modul zu erhalten. Der Medium-Gas-Strom würde über ein Trennelement geleitet in der das Medium nach unten abfließen und das Gas nach oben über einen Filter entweichen kann. Das Medium würde direkt ins Erntegefäß geleitet werden (siehe Abbildung 4.12).

Zunächst wurde eine Flasche mit Bodenausgang als Trennelement genutzt. Um das Einwegprinzip für die gesamte Mediumstrecke umzusetzen muss auch hier eine Einweglösung gefunden werden. Eine praktikable Lösung wäre eine sogenannte Blasenfalle aus der Medizintechnik, die bei Infusionen zum Einsatz kommt (z.B. Qosina Artikel Nr. 43100 und 43101).

Überlegungen zur praktischen Anwendung des Moduls führten dahin, dass es von Vorteil wäre, wenn alle Schlauchanschlüsse (Medium und Gas, Zu- und Abfuhr) an eine Seite des Moduls angeschlossen würden. Dies aber birgt das Risiko von Kurzschlussströmungen, z.B. vom Mediumein- zum Mediumausgang entlang der Kopfplatte. Um dieses Risiko zu vermeiden wurde angestrebt, entweder die Zufuhr- oder die Abfuhrports mittels eines Rohres im Inneren des Moduls auf die andere Seite zu leiten (siehe Abbildung 4.12).



**Abb. 4.12:** Zentraler und gemeinsamer Gas- und Medianausgangsport, alle Schlauchanschlüsse zu einer Seite, Innenrohr zur Vermeidung von Kurzschlussströmen.



# 5 Maßstabsverkleinerung: MBB im Prozessentwicklungsmaßstab

## 5.1 Konzept der Maßstabsverkleinerung

Ein Prozessentwicklungssystem, das die gleiche Funktionsweise wie der Produktionsreaktor aufweist, ermöglicht eine effektive Entwicklung und Optimierung von Produktionsprozessen (vgl. Kapitel 3.7). Die Prozessentwicklungseinheit (PEE) des MBB sollte den Pilotreaktor im Maßstab 1:100 abbilden. Weiterhin sollte ein Prozessentwicklungsmodul handlich sein. Die Beibehaltung der Faserlänge von 50 *cm* für Pilot- und Produktionsmaßstab ergab in der Maßstabsverkleinerung ein Modul von 50 *cm* Länge, 2 *cm* Durchmesser und 13 Fasermembranen. Mit nur 13 Membranen, die weniger als zwei hexagonale Ringe füllen, kann der Faserabstand, der eine wesentliche Rolle für die Funktionalität des Systems spielt (vgl. Kapitel 4.1.2), nicht ausreichend gut simuliert werden. Es wurde entschieden, die Faserlänge auf 1/10 zu kürzen und das Modul 5 *cm* lang zu bauen. Mit den verwendeten 134 Membranen konnten fünf hexagonale Ringe bestückt werden.

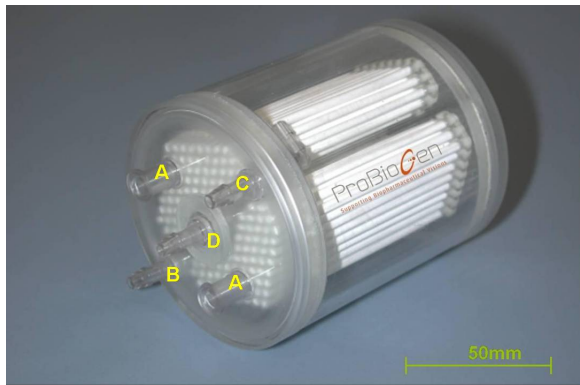
Eine wesentliche Anforderung an ein Prozessentwicklungssystem ist der parallele Betrieb mehrerer Module mit verschiedenen Prozessparametern. In Anlehnung an miniaturisierte Prozessentwicklungssysteme aus dem Bereich der Rührkessel sollten in einer MBB-Prozessentwicklungseinheit (MBB-PEE) acht Module unabhängig voneinander parallel betrieben werden können.

Im Rahmen der Reaktorentwicklung galt es zunächst, die technische Seite einer Maßstabsverkleinerung zu realisieren und zu testen. Im Anschluss folgte die Prüfung der biologischen Funktionalität, d.h. die Frage, ob Zellen sich im System kultivieren lassen. Abschließend sollte beurteilt werden, ob das System für seinen Einsatzzweck, die Prozessentwicklung, geeignet ist.

## 5.2 Technische Umsetzung der Prozessentwicklungseinheit

Für die technische Umsetzung der Maßstabsverkleinerung mussten miniaturisierte Module entworfen und gefertigt sowie eine stationäre Geräteeinheit für den parallelen Betrieb von acht miniaturisierten Modulen geschaffen werden.

### 5.2.1 Einwegmodule im Prozessentwicklungsmaßstab



**Abb. 5.1:** Einwegmodul im Prozessentwicklungsmaßstab; A-Inokulumsports, B-Mediumeingang, C-Gaseingang, D-gemeinsamer Ausgang Medium und Gas.

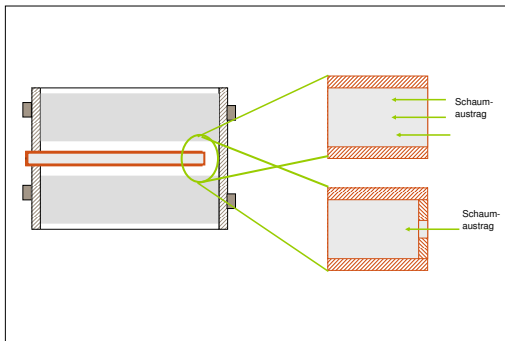
In Abbildung 5.1 ist ein Prozessentwicklungsmodul dargestellt. Die Anschlüsse A sind in beiden Kopfplatten doppelt vorhanden und bilden einen Zugang zum Kulturraum. Der Anschluss B dient der Mediumzufuhr, C der Luftzufuhr. Der zentrale Anschluss D stellt den gemeinsamen Ausgang für Gas und Medium dar und wurde über ein Innenrohr zur anderen Modulseite geführt (vgl. Kapitel 4.3).

Die Dimensionen des Innenrohres am Anschluss D wurden entsprechend des verfügbaren Kunststoffhalbzeuges gewählt. Der Innendurchmesser betrug  $6\text{ mm}$ . Während des Betriebes mit Zellkulturen führte die Begasung des Moduls zeitweise zu Schaumbildung im VR. Der Schaum wurde in großen Mengen durch das Innenrohr und den Gas-Medium-Ausgang ausgetragen. Dadurch sank der Mediumspiegel im Modul trotz kontinuierlicher Mediumzufuhr (Per-

fusion) deutlich unter 50 %, so dass einige Fasern keinen Mediumkontakt mehr hatten (siehe Abbildung 5.2). Um die ausgetragene Schaummenge zu minimieren, wurde die Öffnung des Innenrohres verkleinert (Abbildung 5.3). Hierzu wurde eine Polycarbonatscheibe gedreht, mit einer 1 mm-Bohrung versehen und eingeklebt. Die Durchgangsfläche für den Schaum wurde damit verkleinert, was zu einer Verringerung der ausgetragenen Schaummenge führte. Der Mediumspegel im VR konnte nun bei 50 % gehalten werden.



**Abb. 5.2:** Modul mit starker Schaumbildung (links), Schaum wird ständig durch zentralen Ausgangsport ausgetragen, dadurch sinkt der Mediumspegel deutlich unter 50 % Füllhöhe und mittig platzierte Fasern (rechts, mit Kreuz markiert) tauchen nicht mehr in Medium ein.



**Abb. 5.3:** Verringerung des Schaumausstrages durch Verkleinerung des Ausgangsportes; oben: hoher Schaumausstrag durch großen Querschnitt; unten: geringerer Schaumausstrag nach Querschnittsreduktion durch eingesetzte Scheibe mit 1 mm-Bohrung.

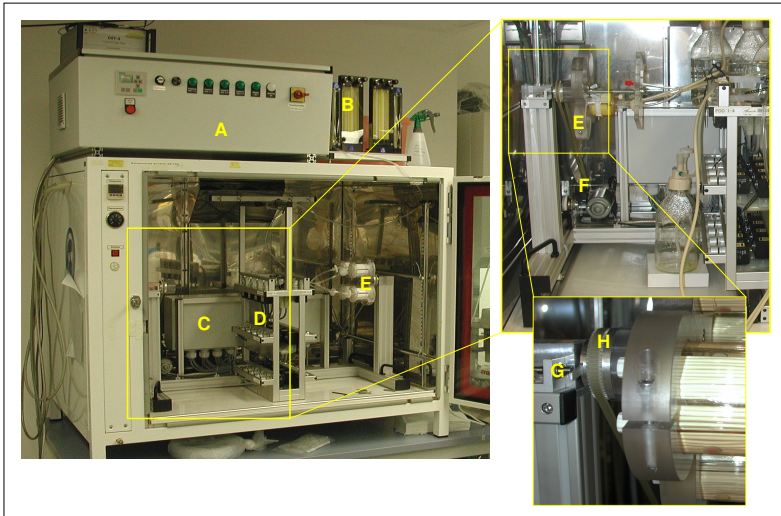
Einen weiteren Problempunkt am Modul stellte der Begasungsfilter dar. Um das System vor mikrobieller Kontamination zu schützen, wurde die Zuluft direkt vor dem Eingang in das Modul über einen Sterilfilter geführt. Der Zuluftport in der Kopfplatte befand sich, wie jede einzelne Faser, eine Zeit in Gas und eine Zeit unterhalb des Mediumpegels. Es wurde beobachtet, dass Medium in den Luftzufuhrport hinein bis zum Sterilfilter lief. Der Gasdruck der Zuluft hielt das Medium nicht vom Filter fern. Ein benetzter Sterilfilter ist aber keine sichere Barriere zur Kontaminationsvermeidung und verblockt bei großflächiger Befeuchtung, so dass die Gaszufuhr zum Modul stoppt. Um das Fließen des Mediums bis zum Filter zu verhindern, wurde ein Richtungsventil (Check Valve VPS5401068N, Value Plastics Inc., Fort Collins (CO), USA) zwischen Filter und Modul gebaut, das nur in der Richtung des Begasungsstromes, d.h. vom Filter zum Modul öffnete.

### 5.2.2 Stationäre Steuereinheit der Prozessentwicklungseinheit (PEE)

Die stationäre Geräteeinheit der PEE musste die vier technischen Grundfunktionen – Rotation, Perfusion, Begasung und Temperierung – realisieren können. Für den ersten Prototypen der stationären Geräteeinheit waren Einschränkungen in der Unabhängigkeit der acht Prozessmodule notwendig, um den technischen Aufwand für die Entwicklung eines Prototyps zeitlich und ökonomisch realisierbar zu halten:

- keine unabhängige Rotation, sondern alle Module mit derselben Rotationsgeschwindigkeit,
- jeweils vier Module über eine Gasmischstation versorgen,
- keine unabhängige Temperierung, gesamte Konstruktion in einem Wärmeschrank installieren.

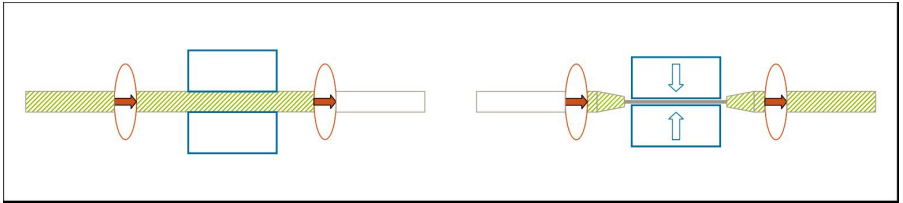
Die stationäre Steuereinheit der Prozessentwicklungseinheit wurde nach eigenen Rahmenvorgaben von der Saxonia BioTech GmbH (Radeberg) designt und gebaut und ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Von einer separaten Steuereinheit außerhalb des Wärmeschrankes (A) werden Energie und Steuersignale auf eine Einheit innerhalb des Wärmeschrankes (C) übertragen. Der daneben befindliche Motor (F) treibt über verschiedene Zahnräder und Getriebe die zwei



**Abb. 5.4:** Stationäre Geräteeinheit des Prozessentwicklungsmaßstabes, A-Steuer- und Energiezentrale, B-Gasmischstation, C-Unterverteilung, D-Pumpenblock, E-Halterung für 4 Module, F-Antriebsmotor, G-Lichtschanke zur Rotationssteuerung, H-Zahnrad und Zahnriemen an Antriebswelle.

gegenüberliegenden Antriebswellen (H) an, an denen Aufnahmeeinheiten für je vier Module (E) befestigt sind. Die Module werden mit Madenschrauben in den Halterungen befestigt. Eine Lichtschranke (G) steuert den Zwischenstopp nach  $180^\circ$  und den Richtungswechsel nach  $360^\circ$ . Der große Block in der Mitte (D) beinhaltet Quetschventile, die als Pumpe dienen sollten. Die zwei Gasmischstationen (B) bestehen jeweils aus zwei Rotametern (Luft und  $\text{CO}_2$ ), die manuell bedient werden.

Die Quetschventile wurden vom Hersteller der Steuereinheit als optimale Variante zur Förderung kleiner Mediumströme empfohlen. Wird ein Pumpschlauch, an beiden Seiten mit Richtungsventilen versehen, in das Quetschventil gespannt, so fördert jedes Öffnen und Schließen des Quetschventils eine bestimmte Menge Medium im Schlauch in die durch die Richtungsventile vorgegebene Richtung (Schema in Abbildung 5.5).



**Abb. 5.5:** Arbeitsprinzip einer Quetschpumpe: Medium (grün) strömt in Schlauch, Strömungsrichtung durch Richtungsventile (rot) vorgegeben; Pumpe quetscht Schlauch, Medium wird verdrängt, wegen Richtungsventilen nur eine Richtung möglich.

Bei der Testung der Quetschventile als Perfusionspumpen zeigten sich zwei Probleme:

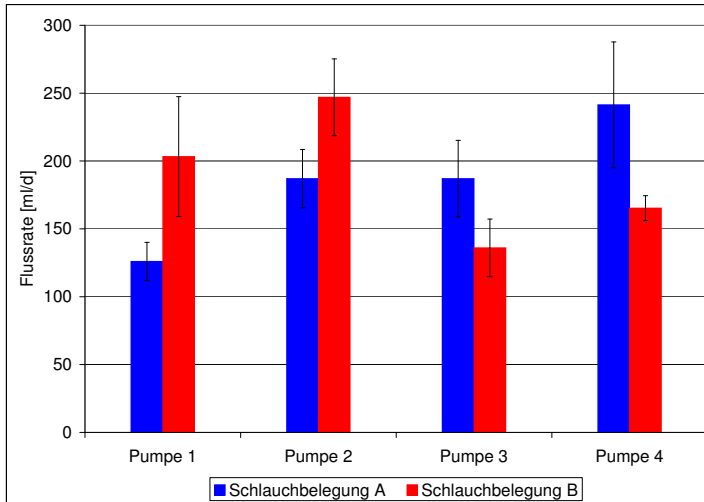
- „Blindströme“ und
- Luftblasen.

Die „Blindströme“ wurden dadurch verursacht, dass die Quetschventile nicht 100 %-ig schlossen. Wurden die Mediumbags, wie ursprünglich geplant, oberhalb der Quetschpumpen gelagert, so flossen nicht quantifizierbare Mediummengen in die Module, während die Quetschventile geschlossen waren. Die einzige Möglichkeit, dieses Problem im zeitlichen und finanziellen Projektrahmen zu lösen, war, die Mediumbags unterhalb der Quetschventile zu lagern. Eine Quantifizierung der Flussraten ergab große Schwankungen bis zu 25 % der mittleren Flussrate bei Wiederholungsmessungen eines Schlauches in einem Pumpenkopf. Bei einem Wechsel von Schläuchen und Pumpen wurden die Abweichungen noch größer (siehe Abbildung 5.6).

Als großes Problem erwies sich, dass die Quetschventile ihre Funktionalität vollständig einbüßten, sobald sich Luftblasen im Schlauch befanden. Selbst bei Befüllung der Mediumschläuche vor dem Prozess und Verwendung gasundurchlässiger Schläuche konnten Luftblasen in der Mediumzufuhrstrecke nicht ausgeschlossen werden.

Vor allem die Intoleranz der Pumpen gegenüber Luftblasen war ausschlaggebend, die Quetschventile nicht als Perfusionspumpen für die Reaktortestung einzusetzen. Es wurde eine 8-Kanal-Schlauchpumpe (IPC8, Ismatec SA, Glatt-

brugg, Schweiz) angeschafft. Hier betrug die Standardabweichung der Pumprate bei  $n=3$  Wiederholungen nur 6 %.



**Abb. 5.6:** Flussraten in der Quetschpumpe: vier Pumpköpfe (1-4), zwei verschiedene Schlauchstücke vom selben Originalschlauch abgeschnitten, alle Messungen bei selber Quetschfrequenz; Fehlerbalken=Stabw von  $n=5$  Messungen.

Ein weiterer wesentlicher Teil der stationären Geräteeinheit ist die Gasmischstation. Wegen der eingangs genannten Einschränkungen der Unabhängigkeit eines jeden Moduls, stand eine Gasmischstation für jeweils vier Module zur Verfügung. Die Verteilung des Gasgemisches auf die vier Module (in den meisten Prozessen nur ein bis zwei Module pro Gasmischstation) erfolgte über ein System aus Schläuchen und Y-Verbindern. Bei vielen Prozessen musste beobachtet werden, dass die Gasverteilung auf zwei bzw. vier Module nicht nur ungleich im Volumenstrom war, sondern teilweise ein Modul gar nicht begast wurde, während es in dem anderen aufgrund der hohen Gasflussraten zu Schaumbildung kam. Es wurde versucht, mit Hilfe von Schlauchklemmen die Luftströme zu regulieren. Bei zukünftigen Gereäteeinheiten ist darauf zu achten, dass jedes Modul eine eigene, unabhängige Gaszufuhr erhält.

### 5.2.3 Fazit der technischen Umsetzung

Es konnten miniaturisierte Module entwickelt und gebaut werden, die das Versorgungsprinzip und Design der großen Module abbilden. Kleinere Anpassungen (Einsatz von Richtungsventilen in der Gaszufuhr) waren notwendig, um die Funktionalität zu erhalten. Für die stationäre Steuereinheit konnte, unter Einschränkung der Unabhängigkeit im Parallelbetrieb, ein Prototyp entwickelt und gebaut werden. Die Probleme in der Funktionalität der Quetschpumpen wurden durch den Einsatz von Peristaltikpumpen gelöst.

Ungleichmäßigkeiten in der Begasung der parallel betriebenen Module konnten mit diesem Prototypen nicht verhindert werden. Für die Weiterentwicklung des Systems ist eine separate Begasungseinheit für jedes Modul unumgänglich.

## 5.3 Erstbetrieb und biologische Funktionalität

Die ersten Prozesse mit der PEE dienten nicht nur der Prüfung der biologischen Funktionalität, sondern vorrangig auch dem Entwickeln von Verfahren für Inokulum, Probenahme und Ernte am Modul.

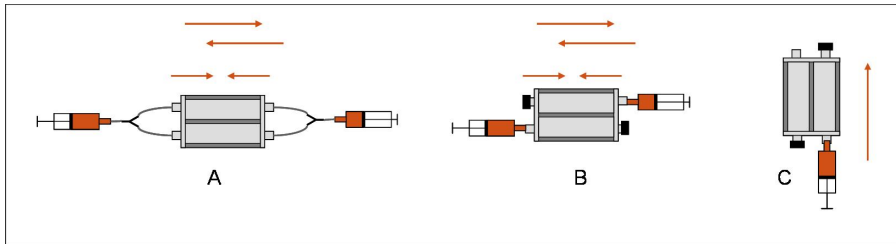
### 5.3.1 Handhabung der Module

#### Inokulum

Bei der Planung des Moduls wurden auf jeder Seite zwei Inokulumports vorgesehen, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellsuspension im KR zu gewährleisten. Geplant war, die zwei Ports pro Seite in einem Y-Stück zusammenzufassen und dort die Spritze mit der zu inokulierenden Zellsuspension anzusetzen (A in Abbildung 5.7). Praktisch erwies sich das im aseptischen Aufbau als zu riskant: Zum einen bestand die Gefahr einer Kontamination bei der Schlauch- und Spritzenmontage, zum anderen konnten Zellen fest gegen die Membranporen gedrückt werden, was zu einem Verblocken der Membran hätte führen können. Auch die Variante, die volle Inokulumspritze an einem Port des waagrecht gelagerten Moduls anzusetzen, auf der anderen Seite eine leere Spritze anzusetzen und die Zellsuspension mehrmals hin und her zu

drücken, um sie gleichmäßig in alle Fasern zu verteilen, bevor sie von beiden Seite gleichzeitig hinein gedrückt würde, hätte die Zellen gegen die Poren pressen können (B in Abbildung 5.7).

Als optimale Inokulumprozedur stellte sich die folgende dar: Das Modul wird senkrecht gehalten und die Spritze mit der Zellsuspension wird an einen der unteren Inokulumports angeschlossen. Der schräg gegenüberliegende obere Port wird geöffnet. Die Zellsuspension wird langsam von unten nach oben in das Modul gedrückt. Von oben sieht man, dass aus allen Fasern Zellsuspension austritt. Der obere offene Port dient der verdrängten Luft als Ausgang (C in Abbildung 5.7).



**Abb. 5.7:** Inokulumprozeduren am MBB im Prozessentwicklungsmaßstab.

### Probenahme

Die Proben für die Glukose-, Laktat und Produktkonzentrationsmessung wurden aus dem Erntegefäß genommen. Das Erntegefäß wurde bei jeder Probenahme komplett geleert, so dass der gemessene Wert die mittlere Konzentration im Modul im betrachteten Zeitabschnitt abbildete.

### Entnahme der Zellen am Prozessende

Bei der Entnahme der Zellen wurde analog dem Inokulum verfahren. An einen Port wurde eine leere Spritze geschraubt, das Modul wurde senkrecht gehalten, der schräg gegenüberliegende Port wurde geöffnet. Die Zellsuspension wurde in die Spritze gesaugt. Weiterhin wurde der Kulturraum nach der Entnahme der Zellen mit Medium gespült. In dem Gemisch aus entnommener Zellsuspension und Spülmedium, in dem ebenfalls Zellen enthalten waren, wurde die Zellkonzentration bestimmt. Mittels des Gemischvolumens wurde

die absolute Zellzahl im Modul berechnet. Die Entnahme der Zellen diene während der Reaktorentwicklung der Erhebung von Daten (Zellzahl, Vitalität) zur Beurteilung der biologischen Funktionalität.

### 5.3.2 Experimente im Prozessentwicklungsmaßstab

In Tabelle 5.1 ist eine Übersicht aller in dieser Entwicklungsphase durchgeführten Versuche zusammengefasst. In den folgenden Ergebniskapiteln werden Details der Durchführung, die Ergebnisse und ggf. Gründe für Folgeversuche erläutert.

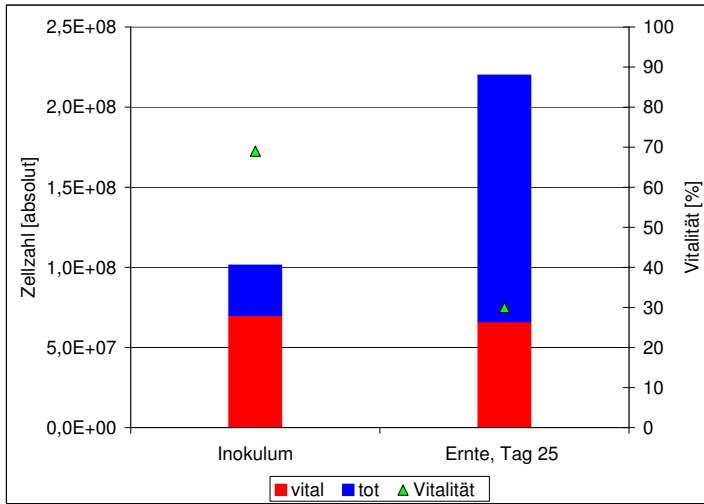
**Tabelle 5.1:** Übersicht der Versuche in der Prozessentwicklungseinheit (PEE).

Versuchsnr.	Zelle	Modulanzahl	Ziel
PEE 01	AGE1.hn	n=2	Handhabung
PEE 02	AGE1.hn	n=2	Verlauf zwischen Start- und Endpunkt
PEE 03	AGE1.hn	n=4	max. versorgbare Zellzahl
PEE 04	AGE1.hn	n=4	Wiederholung PEE 03
PEE 05	AGE1.hn	n=4	Reproduzierbarkeit
PEE 06	CHO	n=2	Zelleinfluss
PEE 07	CHO	n=4	Datengewinnung
PEE 08	CHO	n=4	Prüfung pH-These
PEE 09	AGE1.hn	n=2	Prüfung DO-These

Alle Module wurden vor der Inokulation mit Zellen mindestens 24 h mit Medium bei 37°C gespült, um ggf. bei der Sterilisation aus Kunststoff oder Kleber ausgetretene „Leachables“ auszuspülen.

Alle Module wurden bei ihrer Herstellung fortlaufend nummeriert, nach dem Muster PT 8.i (*PT = Prototyp*). Diese Nummern dienen im Folgenden der Kennzeichnung der Module.

### 5.3.3 Ergebnisse der 1. Testphase im Prozessentwicklungsmaßstab mit der Zelllinie AGE1.hn



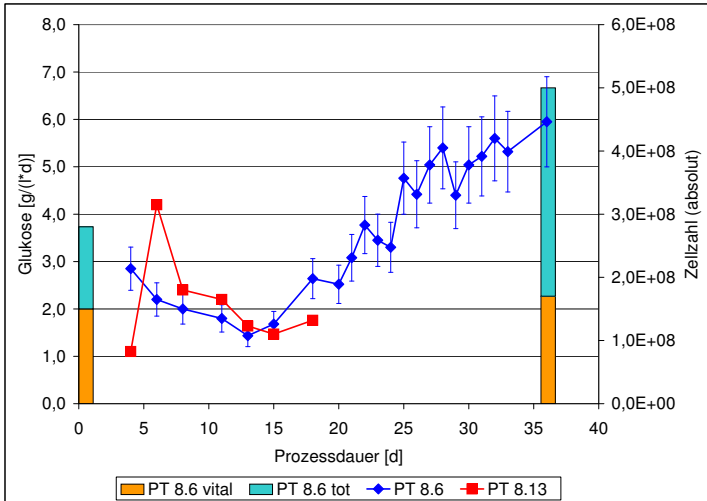
**Abb. 5.8:** PEE-Läufe mit AGE1.hn: Zellzahlen pro Modul und Vitalität in PT 8.18 nach 25 Tagen Kultivierung; (PEE 01).

Der erste Versuch PEE 01 diente primär der Entwicklung von Handhabungsverfahren, wie oben beschrieben. Probenahme und Ernte erfolgten noch nicht ausreichend präzise, um den Glukoseverbrauch, wie in Kapitel 2.4.3 dargestellt, als Leitparameter zu nutzen. Die Zellen aus einem Modul wurden nach 25 Prozesstagen entnommen und gezählt, die Daten sind in Abbildung 5.8 dargestellt. Die geerntete Vitalzellzahl entsprach nahezu der inokulierten Zellmenge, wogegen sich die Gesamtzellzahl etwas mehr als verdoppelt hatte. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich daraus eine Antwort und zwei Fragen ableiten:

- Zellen können auch im miniaturisierten Modul am Leben gehalten werden.
- Ist die Vitalzellzahl von  $7E7$  pro Modul über die 25 Tage konstant gewesen oder gab es im Prozess eine Wachstums- und eine Sterbephase mit einer höheren Vitalzellzahl an Tag  $x$ ?
- Gab es nur eine Verdopplung der Zellen oder wurden kontinuierlich tote

Zellen abgebaut, während sich vitale verdoppelten?

Im zweiten Prozess PEE 02 konnte der Glukoseverbrauch pro Kulturraumvolumen und Tag als Leitparameter genutzt werden, die Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 graphisch dargestellt.

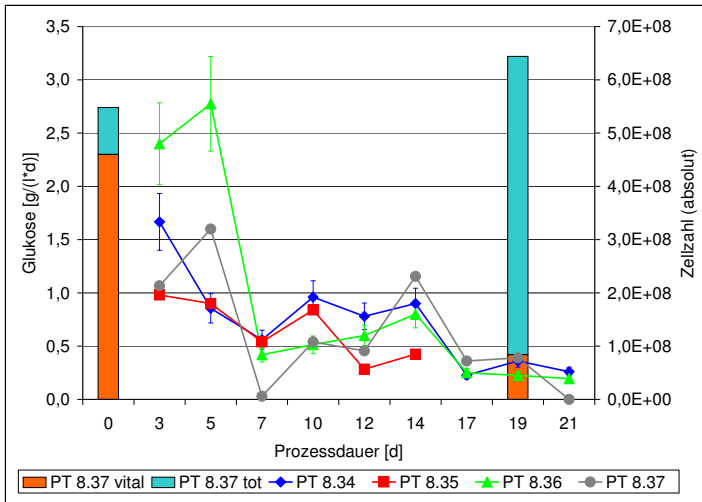


**Abb. 5.9:** PEE-Läufe mit AGE1.hn: Glukoseverbrauch (Linien) und Zellzahl (Balken, in PT 8.6); PT 8.13 wegen Schaumbildung und Mediums-austrag abgebrochen (PEE 02).

Beide Module zeigten in den ersten 13 Tagen einen langsamen Rückgang des Glukoseverbrauches auf unter  $2 \text{ g}/(\text{l} \cdot \text{d})$ . Modul PT 8.13 wurde abgebrochen, da starke Schaumbildung immer wieder zum Leerlaufen des Moduls führte (vgl. Kapitel 5.2.1). Der Glukoseverbrauch im verbliebenen Modul PT 8.6 stieg ab Tag 13 kontinuierlich an. Im Bereich Tag 25 bis 35 konnte man eine stationäre Phase mit einem Glukoseverbrauch um  $5 \text{ g}/(\text{l} \cdot \text{d})$  erkennen (Langhammer *et al.*, 2007a).

Es wurde angenommen, dass sich der Glukoseverbrauch und die vitale Zellzahl direkt proportional verhalten. Damit konnte die Frage nach einem möglichen Maximum im Vitalzellverlauf mit Hinblick auf den stetig steigenden bzw. konstanten Glukoseverbrauch hypothetisch dahingehend beantwortet werden, dass zumindest in diesem Versuch mit PT 8.6 die am Ende gefundenen  $1,7\text{E}8$

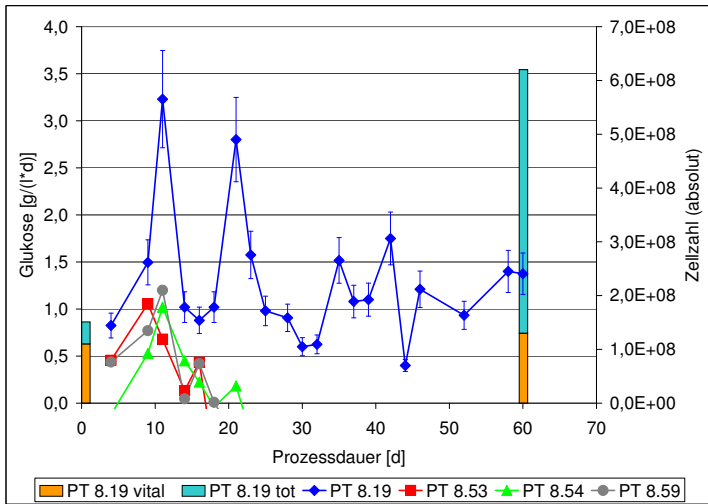
Zellen die maximale Vitalzellzahl waren. Auffällig blieb die große Gesamtzellzahl, die in beiden Versuchen auftrat. Es wurde vermutet, dass sich die Zellen im MBB zwar teilten, aber nicht in verdoppelter Anzahl überleben konnten, weshalb die Totzellzahl stieg, während die Vitalzellzahl konstant blieb. Es stellte sich die Frage, ob es eine maximal versorgbare Zellzahl gibt. Dies sollte in einem dritten Prozess PEE 03 eruiert werden, indem vier Module mit einer Vitalzellzahl deutlich größer als  $1E8$  inokuliert wurden.



**Abb. 5.10:** PEE-Läufe mit AGE1.hn: Glukoseverbrauch (Linien) und Zellzahl (Balken, PT 8.37); Inokulum  $>1E8$  pro Modul (PEE 03).

In Abbildung 5.10 sind die Glukoseverbräuche des Prozesses PEE 03 dargestellt. In allen vier Modulen sank der Glukoseverbrauch kontinuierlich. Es ist anzunehmen, dass die Zellen nur starben. Die Zellzahlen (beispielhaft für ein Modul dargestellt) bestätigten diese Annahme. Die inokulierte vitale Zellzahl von  $\sim 4E8$  Zellen pro Modul konnte nicht vital erhalten werden. Die These einer maximal versorgbaren Zellzahl wurde erhärtet. Fraglich blieb, wo das Maximum der Vitalzellzahl für die Zelllinie AGE1.hn liegt. Entsprechend den in Kapitel 3.6 vorgestellten Modellberechnungen können bei hohen Sauerstoffverbrauchsrate  $2\text{-}3E7/\text{ml}$ , also  $2\text{-}3E8$  Zellen pro Modul versorgt werden. Das bisher erreichte Maximum liegt mit  $1,7E8/\text{Modul}$  (PT 8.6 in PEE 02) un-

ter dem theoretischen Maximum. Der Versuch sollte wiederholt werden, um Daten für eine Ursachenforschung zu generieren.



**Abb. 5.11:** PEE-Läufen mit AGE1.hn: Glukoseverbrauch (Linien) und Zellzahl (Balken, PT 8.19); in drei Modulen Sterben der Zellen, in einem Modul (PT 8.19) über 60 d messbarer Glukoseverbrauch (PEE 04).

Um die These einer maximal versorgbaren Zellzahl von ca.  $1,7E8$  vitalen Zellen pro Modul zu prüfen, wurden vier Module mit  $1,1E8$  Zellen inokuliert. In Abbildung 5.11 sind die Glukoseverbräuche der vier Module dargestellt. Sie lagen zunächst in der gleichen Größenordnung wie die Glukoseverbräuche in den Prozessen PEE 02 und 03. In drei Modulen ist ein Zellsterben analog dem in PEE 03 (Abbildung 5.10) zu erkennen. Nur ein Modul (PT 8.19) zeigte einen Glukoseverbrauch über 20 Prozesstage hinaus. Allerdings war hier, anders als bei Modul PT 8.6 aus PEE 02, kein Anstieg des Glukoseverbrauches zu erkennen. Der Leitparameter stagnierte um  $0,5 - 1,5 \text{ g}/(\text{l} \cdot \text{d})$ , dies konstant über 60 Tage. Nach 60 Tagen wurden im Modul PT 8.19  $1,3E8$  vitale Zellen sowie  $4,9E8$  tote Zellen gefunden (siehe Abbildung 5.11). Die Vitalzellzahl war vom Inokulum ( $1,1E8$ ) bis zur Zellernte nahezu konstant geblieben. Da in diesem Prozess keine Steigerung des Glukoseverbrauches gemessen wurde,

wurde die These genährt, dass die Vitalzellzahl über den gesamten Prozess konstant war und dass etwa  $1E8$  Zellen pro Modul (entspricht ca.  $1E7/ml$ ) die maximal versorgbare Zellzahl darstellen. Auffällig war, dass nur eines der vier Module Zellwachstum bzw. konstante Vitalzellzahl zeigte, während in drei Modulen die Zellen nur starben. Die Ursache hierfür lag möglicherweise an der ungleichmäßigen Begasung der Module, die auftrat, wenn mehr als ein Modul pro Gasmischstationen versorgt wurde.

### 5.3.4 Zusammenfassung der 1. Testphase

Im Rahmen der ersten Versuche mit der PEE konnte eine Inokulum-, Probe-, Ernte- und Analytikstrategie entwickelt werden, die es erlaubte, einen Prozess über den Glukoseverbrauch zu beobachten. Weiterhin war die Bestimmung der Zellzahl pro Modul am Ende eines Prozesses möglich.

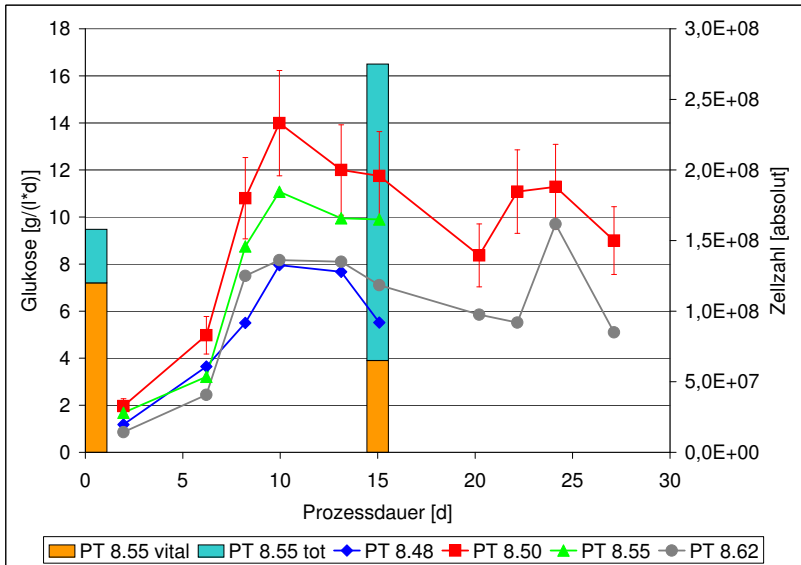
Die biologische Funktionalität konnte prinzipiell an einem 36-Tage-Prozess mit Modul PT 8.6 und einem 60-Tage-Prozess mit Modul PT 8.19 gezeigt werden. Die Reproduzierbarkeit der Zellkultivierung konnte nicht erfolgreich gezeigt werden. Die Ursache für die mangelnde Reproduzierbarkeit wurde in der ungleichmäßigen Gasverteilung vermutet.

Für die AGE1.hn wurde ferner vermutet, dass maximal  $\sim 1E8$  Zellen pro Modul versorgt werden können. Ob die Ursache ein extrem hoher spezifischer Sauerstoffverbrauch war oder eine andere Limitierung, konnte bis hier nicht geklärt werden. Schon in gerührten Kultursystemen erwiesen sich Prozesse mit der AGE1.hn-Zelle nur als bedingt reproduzierbar. Um die Unsicherheit, ob hier Zelle oder Reaktor die Reproduzierbarkeit verhinderten, auszuschalten, sollte die PEE mit der hochzelldichtestabilisierten CHO-Zelllinie getestet werden, die schon in den EHF, 12HF-Modulen und Labormaßstab-Versuchen (siehe Kapitel 4) genutzt wurde.

### 5.3.5 Ergebnisse der 2. Testphase mit CHO-Zellen

Die hochzelldichtestabilisierte CHO-Zelllinie, die erfolgreich in dem konventionellen HFBR kultiviert wurde und in der Anzucht in CL1000 Dichten bis

2E7/ml erreichte, wurde mit 2E8 vitalen Zellen pro Modul (entspricht 1,2E7/ml Kulturvolumen) in vier Module inokuliert.



**Abb. 5.12:** PEE-Läufe mit CHO: Glukoseverbrauch (Linien), Zellzahlen im Modul PT 8.55 (Balken) (PEE 07).

Über die ersten Tage war ein stetiger Anstieg des Glukoseverbrauches in allen Modulen zu erkennen (siehe Abbildung 5.12). Dies ließ auf ein Wachstum der Zellen schließen. Zwischen Tag 8 und 13 stabilisierte sich der Glukoseverbrauch in allen Modulen. Die Versuche mit PT 8.48 und 8.55 wurden an Tag 15 abgebrochen, um Daten aus dem Modulinneren vor einer möglichen Absterbephase zu gewinnen. Die Module PT 8.50 und 8.62 liefen mit einem relativ stabilen Glukoseverbrauch bis Tag 27.

Die Zellzahlen (beispielhaft dargestellt PT 8.55 in Abbildung 5.12) zeigten zwar ein Ansteigen der Gesamtzellzahl in allen Modulen, aber auch eine Verringerung der Vitalzellzahl von 1,2E8 auf 6,5E7. Die nach dem Modell (siehe Kapitel 3.6) zu erwartenden vitalen Zellzahlen wurden auch mit der hochzell-dichteetablierten CHO-Zelle nicht erreicht. Es stellte sich die Frage, ob ein zellunabhängiger Parameter das Zellwachstum negativ beeinflusst hatte:

- Sauerstoffmangel,
- pH-Wert oder
- Diffusionsbehinderung der Nährstoffe.

In den früher abgebrochenen Modulen PT 8.48 und 8.55 war die Glukosekonzentration im KR und im VR gemessen worden (nicht dargestellt). Es ergaben sich nur minimale Differenzen, was eine Diffusionsbehinderung als unwahrscheinlich erscheinen lässt. Weiterhin war es gelungen in den Modulen PT 8.50 und 8.55 die pH-Werte im KR und im VR beim Abbruch des Prozesses zu bestimmen. Im KR bei den Zellen wurde ein pH von 6,8 bzw. 6,9 gemessen. Im VR lag der pH-Wert in beiden Modulen bei 7,6. Das heißt, es lag eine sehr große pH-Differenz zwischen KR und VR vor.

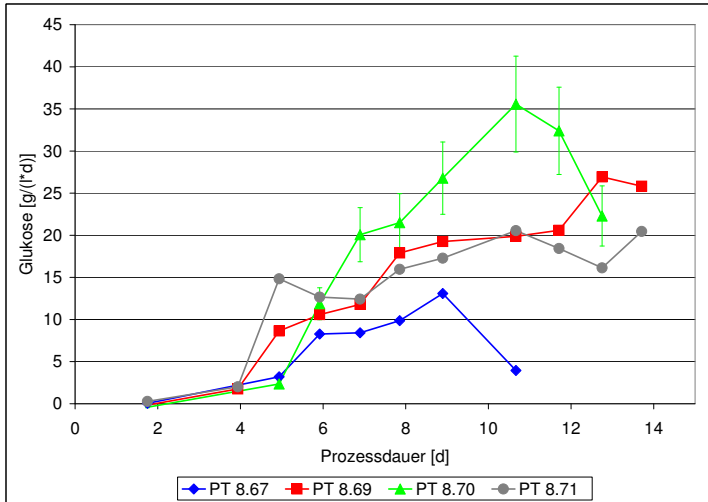
In einem weiteren Versuch sollte der Einflusses des pH-Wertes geprüft werden. Folgende Änderungen wurden gegenüber den bisherigen Versuchen vorgenommen:

**Tabelle 5.2:** Versuchsübersicht PEE 08, Prüfung des pH-Wert-Einflusses.

Module	Parameter, Prozessbesonderheit
PT 8.67	Kontrolle, lief wie PEE01 bis PEE07, Begasung mit Prüfgas (Luft + 5 % CO <sub>2</sub> )
PT 8.69	Begasung mit Luft und variabel CO <sub>2</sub>
PT 8.70	Zusatz 20 mM Carbonatpuffer zum Medium, Begasung mit Prüfgas
PT 8.71	Begasung mit Luft und variabel CO <sub>2</sub>

Das Kulturmedium wurde mit Phenolrot versetzt, um den pH-Wert optisch überwachen zu können. Eine im Reaktorkonzept geplante, auf optischer Messtechnik basierende online-pH-Messung konnte bis dato im MBB nicht etabliert werden.

Betrachtet man zunächst den Glukoseverbrauch der Module in Abbildung 5.13, zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen. PT 8.67, die Kontrolle ohne Pufferzusatz und mit standardisiertem Gasegemisch (Luft und 5 % CO<sub>2</sub>), zeigte einen steigenden Glukoseverbrauch bis Tag 9 und fiel dann ab. Der erreichte maximale Glukoseverbrauch von 14 g/(l · d) war vergleich-

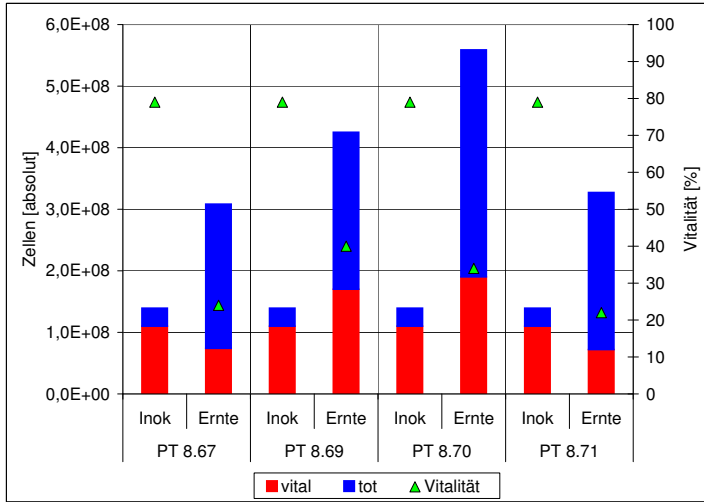


**Abb. 5.13:** PEE-Läufe mit CHO: Glukoseverbrauch; PT 8.67 (blau) wie vorige Versuche, die drei übrigen Module liefen mit zusätzlichem Puffer oder variablem  $\text{CO}_2$ , um pH-Wert im neutralen Bereich zu halten (vgl. Tabelle 5.2)(PEE08).

bar mit dem des vorigen Versuches (PEE 07) mit CHO-Zellen. Das stärker gepufferte Modul PT 8.70 zeigte einen steileren Anstieg im Glukoseverbrauch bis auf  $35 \text{ g}/(\text{l} \cdot \text{d})$  und damit fast das Dreifache des Kontrollmoduls. Die beiden Module mit variabler  $\text{CO}_2$ -Dosierung PT 8.69 und 8.71, deren pH-Wert anhand der Farbe des mit Phenolrot versetzten Mediums neutral zu halten versucht wurde, zeigten einen stetigen Anstieg des Glukoseverbrauches pro Modul über 14 Tage bis auf  $20 - 25 \text{ g}/(\text{l} \cdot \text{d})$ . Beide Module zeigten nahezu gleiche Verläufe im Glukoseverbrauch, womit eine intraserielle Reproduzierbarkeit des Prozesses erreicht wurde.

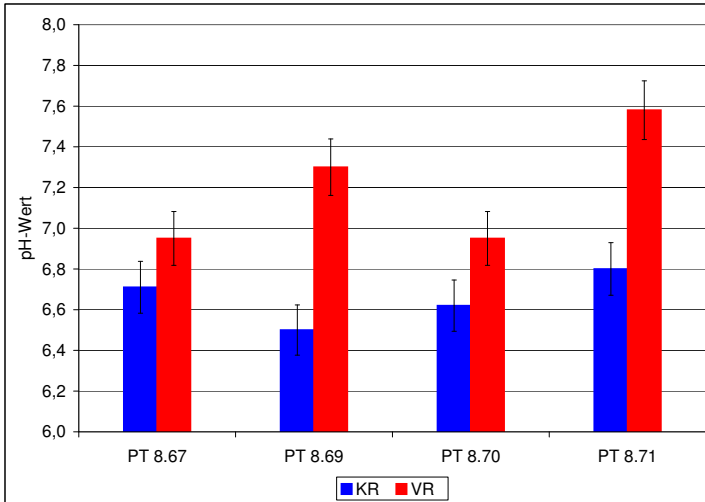
Die Zellzahlen bei der Kontrolle PT 8.67 (Abbildung 5.14) zeigten ein Ansteigen der Gesamtzellzahl und eine Verringerung der Vitalzellzahl, wie im vorigen Versuch (PEE 07). Die Module PT 8.69 und 8.70, die mit Maßnahmen zur Stabilisierung des pH-Wertes liefen, zeigten einen Anstieg der Vitalzellzahl im Modul auf ca.  $1,9\text{E}8$ . In keinem Modul wurde die laut Modell (Kapitel 3.6) selbst bei sehr hohen Sauerstoffverbrauchsdaten mögliche Vitalzellzahl

von  $2,0E8$  pro Modul ( $2,0E7/ml$ ) erreicht. Es galt zu klären, was ein höheres Zellwachstum hemmt.



**Abb. 5.14:** PE-Läufe mit CHO: Zellzahl pro Modul bei Inokulum und Ernte; PT 8.67 wie vorige Versuche, die drei übrigen Module laufen mit zusätzlichem Puffer oder variablem  $CO_2$ , um den pH-Wert im neutralen Bereich zu halten (vgl. Tabelle 5.2).

In allen vier Modulen wurden beim Abbruch die pH-Werte im KR und im VR gemessen (Abbildung 5.15). Bei der Betrachtung der pH-Werte fielen zwei Dinge ins Auge. Zum einen waren die pH-Differenzen zwischen KR und VR wieder sehr groß, zum anderen waren die pH-Werte im KR sehr niedrig. In den Modulen PT 8.67 und 8.70 wurde im VR der angestrebte neutrale pH-Wert um pH 7 erreicht. In den anderen beiden Modulen lag der gemessene pH-Wert im VR deutlich im basischen Bereich. Trotzdem waren die pH-Werte im KR ausnahmslos kleiner oder gleich pH 6,8. Aus anderen Versuchen ist bekannt, dass die Zellen bei pH-Werten  $\leq 6,8$  ihr Wachstum verringern bzw. einstellen (Trummer *et al.*, 2006). Bei zu geringen pH-Werten beginnen die Zellen zu sterben. Ein deutliches Augenmerk ist auf die großen pH-Differenzen zwischen KR und VR zu legen (bis 0,8 pH-Einheiten). Sowohl die Beobachtung

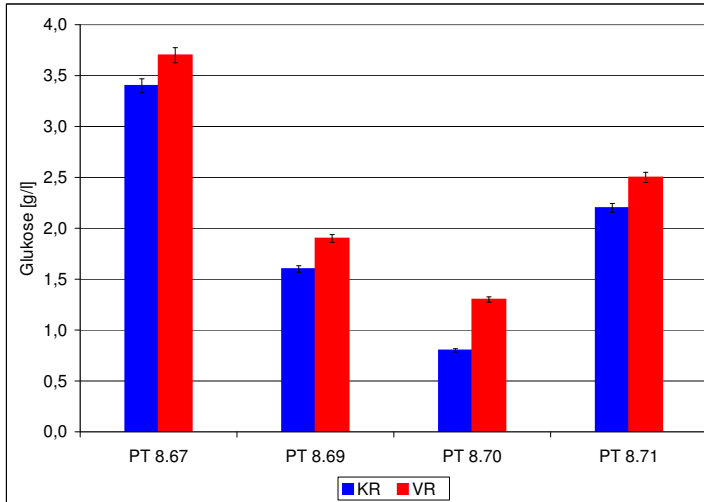


**Abb. 5.15:** PE-Läufe mit CHO: pH-Werte bei Prozessende im Kulturraum (KR) und im Versorgungsraum (VR)(PEE08).

des pH-Indikators Phenolrot als auch die geplante online-Messtechnik für den pH-Wert zielten auf eine Messung des pH-Wertes im VR ab. Solch große Differenzen zwischen KR und VR erschweren eine pH-Regelung im KR bei den Zellen. Im Kapitel 7 soll näher darauf eingegangen werden.

Bisher deutete vieles darauf hin, dass sehr niedrige pH-Werte im KR das Zellwachstum hemmen. Die beiden anderen möglichen Ursachen, Behinderung der Nährstoffdiffusion und Sauerstoffmangel, sollten aber nicht unbetrachtet bleiben. Die Gelöstsauerstoffkonzentration konnte im Prototypen des Prozessentwicklungsreaktors nicht gemessen werden, im Kapitel 7.4.2 wird der Gelöstsauerstoff im Pilotmaßstab mit dem eines konventionellen HFBR verglichen.

Um die Nährstoffversorgung zu bewerten, wurden die am Prozessende in KR und VR gemessenen Glukosekonzentrationen aus dem oben beschriebenen Versuch in Abbildung 5.16 dargestellt. In allen vier Modulen waren kleine Differenzen ( $\leq 0,5 \text{ g/l}$ ) zwischen KR und VR vorhanden, die bei einem diffusionsgetriebenen Nährstofftransport normal und zu erwarten sind. Nimmt man an, dass auch während der Prozesse die Glukosedifferenz um  $0,5 \text{ g/l}$  lag,



**Abb. 5.16:** Glukosekonzentration am Prozessende im KR und im VR (PEE08).

könnte für Modul 8.70 ab Tag 6 eine Glukoselimitierung angenommen werden (siehe Abbildung 5.17). Bei den anderen drei Modulen ist keine Limitierung erkennbar. Da das Modul PT 8.70 am Prozessende die höchste Vitalzellzahl aufwies, scheint die potenzielle Glukoselimitierung nicht die Ursache für das mangelnde Zellwachstum zu sein.

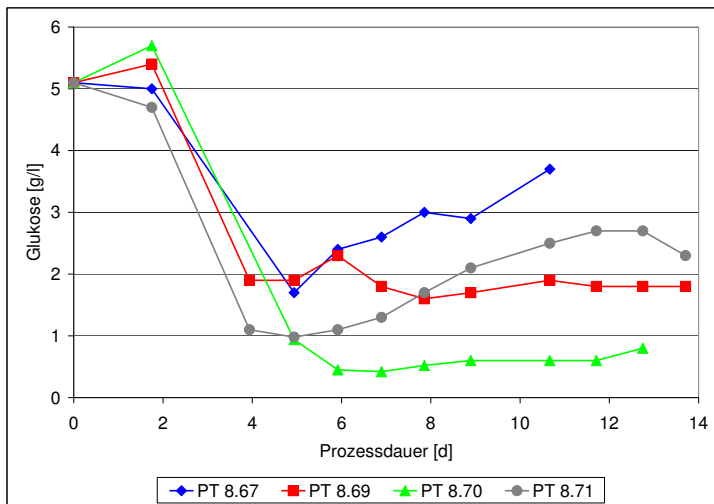


Abb. 5.17: Glukosekonzentration im Mediumausgang des VR (PEE08).

### 5.3.6 Zusammenfassung der 2. Testphase

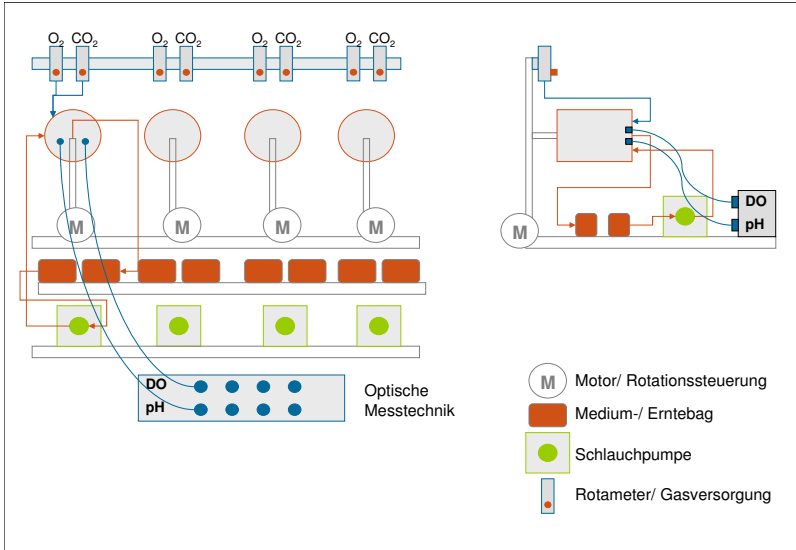
In der Testreihe mit CHO-Zellen wurde überwiegend eine Stabilisierung des Glukoseverbrauches im Prozess beobachtet. Zwei mit den gleichen Prozessparametern laufende Module zeigten einen nahezu identischen Verlauf des Glukoseverbrauches über 14 Tage. Damit konnte eine intraserielle Reproduzierbarkeit des Prozesses gezeigt werden. Weiterhin konnte in zwei Modulen ein Ansteigen der Vitalzellzahl im Prozess nachgewiesen werden.

Anhand des Vergleiches von KR- und VR-Daten konnte eine Behinderung der Nährstoffdiffusion ausgeschlossen werden. Der pH-Wert erwies sich als kritischer Parameter; zum einen da im KR sehr niedrige pH-Werte gemessen wurden, zum anderen aufgrund großer Differenzen zwischen KR und VR. Es ist zu vermuten, dass der, bisher nicht regelbare, pH-Wert im KR (direkte Zellumgebung) zu niedrig ist und das Zellwachstum hemmt. Diese These soll im Kapitel 7.4.3 näher beleuchtet werden.

## 5.4 Einsatzzweck, Eignung für die Prozessentwicklung

Es konnten alle notwendigen technischen Grundfunktionen im kleinen Maßstab umgesetzt werden, allerdings nicht in allen Fällen voll zufriedenstellend. Für eine Anwendung des Systems in der Prozessentwicklung müssten die Kompromisse bei der Unabhängigkeit des Betriebes der Module aufgehoben werden. Jedes Modul muss mindestens eine eigene Gasmischstation haben, da die Gasverteilung von einer Zuleitung auf verschiedene Module Ursache vieler Fehlschläge war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Prozessentwicklungseinheit (PEE) erst dann wirklich für ihren Zweck einsetzbar ist, wenn mindestens eine Messung wesentlicher Prozessparameter (pH, DO) und auch eine Regelung derselben möglich ist. Dies und den unabhängigen Betrieb der Module technisch zu realisieren, ist vorstellbar, aber sehr aufwändig. Abbildung 5.18 zeigt einen Entwurf, der einige Verbesserungen berücksichtigt. Es ist erkennbar, dass dann ein höherer Platzbedarf besteht und mehr technische Bauteile notwendig sind.



**Abb. 5.18:** Entwurf PEE mit  $n=4$  Modulen im Parallelbetrieb (Schlauchverbindungen und technische Anschlüsse nur für ein Modul eingezeichnet).

## 5.5 Fazit der Maßstabsverkleinerung

Die Module, und damit der Einwegpart des Reaktors, konnten erfolgreich im Maßstab verkleinert werden. Die Maßstabsverkleinerung der stationären Steuereinheit erwies sich als problematisch. Trotz der Einschränkung der Unabhängigkeit einzelner Module konnte die stationäre Geräteeinheit nicht erfolgreich den Anforderungen eines kleineren Prozesses angepasst werden. Vor allem die Prozessüberwachung in Form von Mess- und Regeltechnik konnte bisher nicht umgesetzt werden. Anhand von offline-pH-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Ursache für das mangelnde Zellwachstum in einem zu niedrigen KR-pH-Wert zu liegen scheint.

## 6 MBB im Pilotmaßstab

Der Pilotmaßstab sollte ein Zehntel der Kapazität des Produktionsmaßstabes aufweisen. Die Faserlänge sollte hier der des Produktionsmaßstabes entsprechen und 50 cm betragen.

### 6.1 Technische Umsetzung

#### 6.1.1 Einwegmodule im Pilotmaßstab

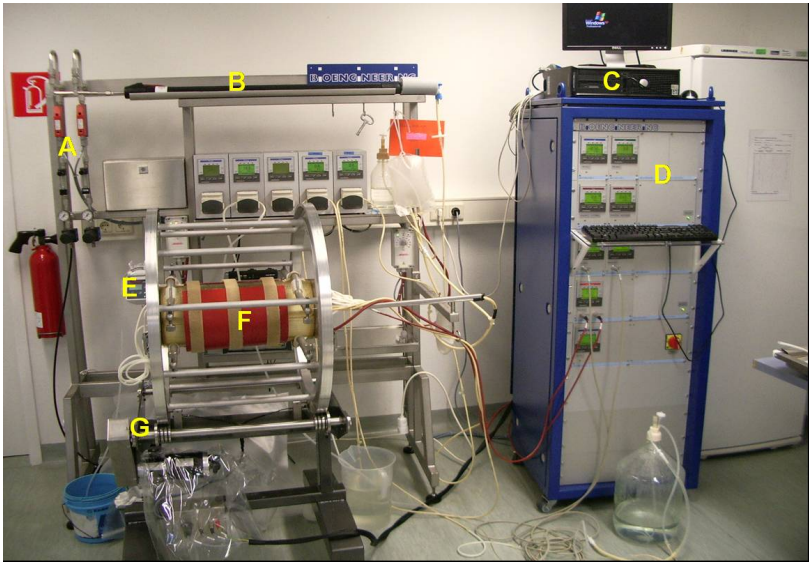
Der Modulbau im Pilotmaßstab war ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung des MBB-Reaktorsystems. Sehr viele einzelne Membranfasern ( $\sim 1.500$  Stück) mussten mit einem definierten Abstand von 3 mm (Zentrum-Zentrum) zueinander fixiert werden. Weiterhin war eine zuverlässige Abdichtung zwischen KR und VR (außerhalb der durchlässigen Membranflächen) unabdingbare Voraussetzung für die Funktionalität eines Moduls.

Die Bauweise wurde eng an die des Labormaßstabes angelehnt (detailliert beschrieben in Kapitel 4.2.1), berücksichtigte aber die schon im Prozessentwicklungsmaßstab umgesetzten Verbesserungen, wie z.B. das Lokalisieren aller Ein- und Ausgänge auf einer Seite. Anstelle der vier kleinen Faserbündel des Labormaßstabes wurden zwei große gefertigt, die jeweils eine Hälfte des Moduls komplett mit Membranfasern ausfüllten. Beide Faserbündel bildeten zwei voneinander getrennte Kulturräume, die sich in einem gemeinsamen Versorgungsraum befanden.

#### 6.1.2 Stationäre Steuereinheit im Pilotmaßstab

Die stationäre Einheit wurde nach eigenen Rahmenvorgaben von der Bioengineering AG (Wald, Schweiz) entworfen und gebaut. Der erste Prototyp ist ein Funktionsmodell, bei dem weniger auf Design denn auf Funktionalität geachtet

wurde. In Abbildung 6.1 ist die gesamte stationäre Geräteeinheit abgebildet. Links im Hintergrund steht ein Gestell mit Gasmischstation (A), Mediumwärmer (E) und Gaswärmer (B). Rechts im Bild befinden sich ein Schaltschrank (D) sowie der Steuer-PC (C). Links im Vordergrund steht die Rotationseinheit (G) mit einem Modul, um das die Heizmatte (F) gelegt ist.



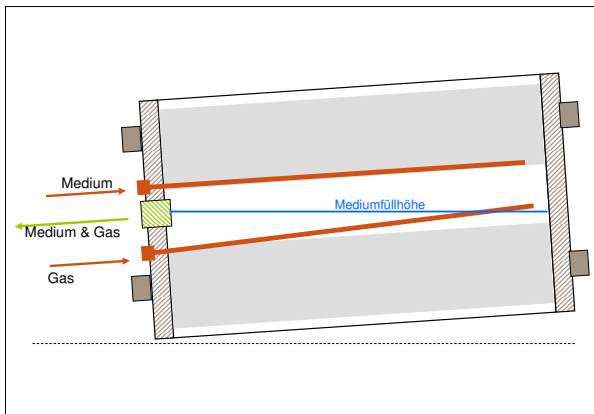
**Abb. 6.1:** Anlage im Pilotmaßstab, Übersicht.

Auch diese stationäre Steuereinheit musste wieder die Grundfunktionen Rotation, Perfusion, Begasung und Temperierung realisieren können, wobei sie im Folgenden in umgekehrter Reihenfolge betrachtet werden.

Der Regelkreis der Temperierung bestand im Messglied aus einem PT 100, das in einer Kunststoffhülse im Modul steckte. Das Stellglied war eine Heizmatte, die um das Modul gewickelt wurde. Medium- und Gaswärmer (E und B in Abb. 6.1) schienen in der Planung notwendig, da kontinuierlich Medium und Luft mit Raumtemperatur in das Modul strömen und die Temperaturregelung nicht mit großen Störeinflüssen belegt werden sollte. In Testungen erwies sich, dass sich das erwärmte Gasmisch in der 1 m langen Schlauch-

strecke von der Gasheizung zum Modul, die aufgrund der Modulrotation auch nicht wesentlich verkürzt werden konnte, wieder auf Raumtemperatur abkühlte. Weiterhin war der Mediumwärmer an einer strategisch sehr ungünstigen Stelle angebracht, da die Schlauchstrecke vom Mediumwärmer zum Modul so lang war, dass auch das vorgewärmte Medium stark abgekühlt den Reaktor erreichte (Förster, 2008). Der Mediumwärmer muss künftig näher am Mediummeingang des Moduls platziert werden.

Die Begasung lief im Pilotmaßstab über Massflowcontroller. Luft und  $\text{CO}_2$  konnten präzise als Volumenstrom eingestellt werden. Das Innenrohr für die Begasung leitete die Luft zentral in den Reaktor ein. Durch eine leichte Schrägstellung des Moduls (siehe Abbildung 6.2) wurde erreicht, dass der Gaseingang nie unterhalb des Mediumspiegels lag. Dadurch wurde eine mögliche Schaumbildung, wie im Prozessentwicklungsmaßstab als Prozessrisiko erkannt, verhindert (Idee der Schrägstellung: Dr. Sann, Saxonia Biotec GmbH, Radeberg).



**Abb. 6.2:** Skizze Schrägstellung des Moduls und Innenrohr.

Die Mediumzufuhr (Perfusion) wurde mittels Peristaltikpumpen realisiert. Auf der Ausgangsseite gab es einen zentralen Ausgangsport im Modul. Medium

und Gas strömten beide hier heraus, getrieben durch den Überdruck, den v.a. die Gaszufuhr aufrecht erhielt. In einer nachgeschalteten Trennflasche wurden Medium und Gas getrennt. Das Medium wurde mittels Pumpe oder Schwerkraft in den Erntebag befördert (siehe Abbildung 4.12 auf Seite 65).

Die Rotation inklusive des induktionsgesteuerten Richtungswechsels funktionierten gut, allerdings wurden sehr große Mengen Abrieb von den O-Ringen auf den Lagerbuchsen produziert, was den Reaktor in dieser Bauweise als untauglich für die Nutzung in einem Reinraum erscheinen lässt. Hier muss mindestens eine Einhausung der Lagerung erfolgen, wobei dieser rasche Verschleiß der O-Ringe dem Ziel „Langzeitprozesse“ entgegen steht.

### **6.1.3 Fazit der technischen Machbarkeit**

Der Prototyp eines MBB-Reaktors im Pilotmaßstab konnte erfolgreich gefertigt werden. Es ist zu bemerken, dass das Modul manuell gefertigt wurde, was für eine Serienproduktion ökonomisch undenkbar ist. Die stationäre Geräteeinheit ist funktional und kann gut für den „proof of concept“ eingesetzt werden. Für den Einsatz des Reaktors im Reinraum muss das Design dahingehend überarbeitet werden, dass es während der Rotation weniger Partikel freisetzt.

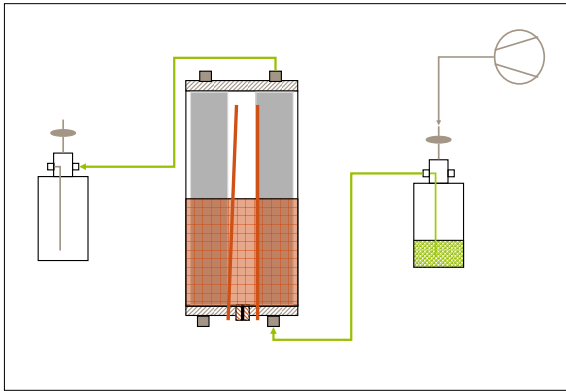
## **6.2 Inbetriebnahme und Handhabung**

### **6.2.1 Inokulum**

Der Kulturraum des Systems besteht aus 1.470 parallel angeordneten Membranfasern mit einer Länge von je 50 cm. Eine wesentliche Voraussetzung für einen reproduzierbaren und GMP-konformen Prozess ist eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sowohl über die Länge des Moduls als auch über den Modulquerschnitt. Die Membranfasern sind in zwei Bündeln zu je 735 Stück im Modul eingebaut, die KR beider Bündel sind voneinander getrennt und wurden im ersten Prozess um eine Woche versetzt mit Zellen inokuliert. Das

erste Bündel wurde, wie die Module im Prozessentwicklungsmaßstab, bei vertikaler Lagerung des Moduls inokuliert, das zweite bei horizontaler Lagerung.

### (A) Vertikale Modullagerung

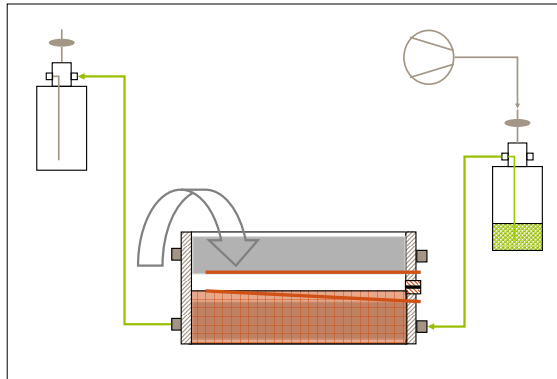


**Abb. 6.3:** Inokulation bei vertikaler Modullagerung: VR zur Hälfte mit Medium gefüllt, Zellsuspension wird mit Luftdruck aus der Flasche in Bündel 1 transferiert.

Die vertikale Lagerung des Moduls und die Inokulation der Zellsuspension von unten hatte sich bei den Modulen der Prozessentwicklungseinheit (PEE) bewährt (siehe Kapitel 5.3.1) und sollte auch hier Anwendung finden. Das halb mit Medium gefüllte Modul wurde senkrecht gehalten. Wie in Abbildung 6.3 zu erkennen, wurde die Zellsuspension in eine Flasche gefüllt und an den unteren Inokulumport angeschlossen. Der obere Port wurde wie bei den PEE-Modulen offen gelassen und lief über einen Schlauch in eine leere Flasche, die nur über einen Luftfilter aseptisch von der Umgebung getrennt war. Die Zellsuspension wurde mittels Luftdruck aus der Inokulumflasche in die Fasern gedrückt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 200 ml/min. Es wurde ein Volumen von 900 ml Zellsuspension ins Modul gegeben (theoretisches KR-Volumen pro Faserbündel 500 ml). Am oberen Ausgangsport trat keine Zellsuspension aus; dies bedeutete, dass es keine gleichmäßige Verteilung der

Zellsuspension über die Länge des Moduls gab. Allerdings wurde ein Anstieg des Mediumspiegels im VR beobachtet, so dass anzunehmen war, dass zwar die Zellen in der Membran zurückgehalten wurden, die Flüssigkeit aber in den VR übertrat.

### (B) Horizontale Inokulation



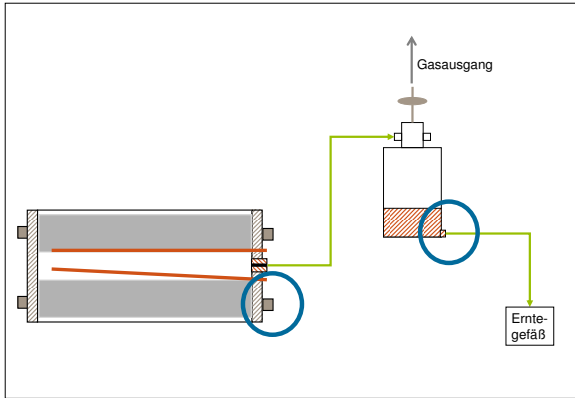
**Abb. 6.4:** Inokulation bei horizontaler Modullagerung: VR zur Hälfte mit Medium gefüllt, Zellsuspension wird mit Luftdruck aus der Flasche in Bündel 2 transferiert, während das Modul rotiert.

Die horizontale Inokulation ähnelte im Aufbau der vertikalen (Inokulumflasche, offenes KR-Ende, siehe Abb.6.4) mit dem Unterschied, dass das Modul hier horizontal gelagert war und wie im Normalbetrieb rotierte. Bei dieser Methode wurde ein Austreten von Zellsuspension am Modulende beobachtet, so dass angenommen werden konnte, dass die Zellen im KR über die gesamte Modullänge verteilt worden sind.

### 6.2.2 Probenahme im Pilotmaßstab

Die Probenahme in der Perfusionstrecke erfolgte am Ausgang der Gas-Medium-Trennflasche. In dieser Probe wurde der pH-Wert sowie die Nährstoff- und Metabolitkonzentration gemessen. Weiterhin wurden an die Inokulumports auf

der Eingangsseite Sterilsepten montiert, so dass regelmäßig Proben direkt aus den beiden Kulturräumen (Membranbündel 1 und Membranbündel 2) gezogen werden konnten.

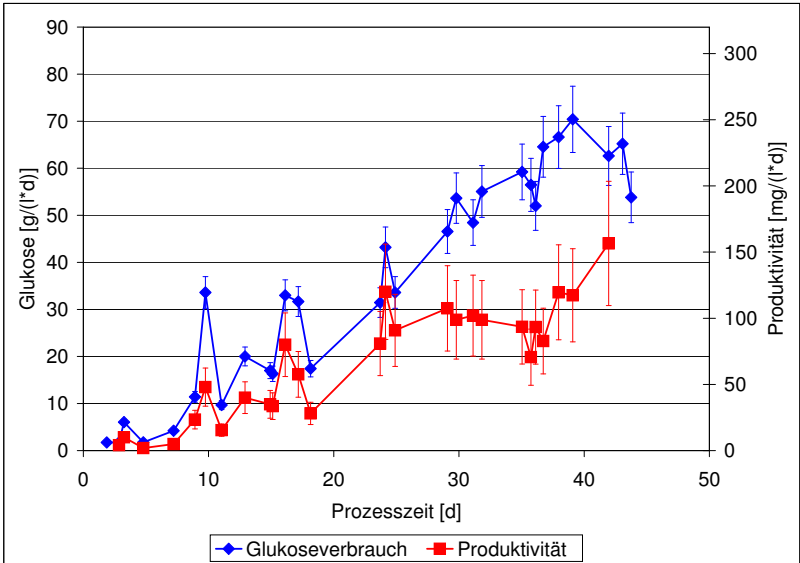


**Abb. 6.5:** Probenahmeorte am MBB-Pilotmaßstab, Markierung mit blauen Ringen.

## 6.3 Biologische Funktionalität im Pilotmaßstab

### 6.3.1 Ergebnisse der Zellkultivierung im Pilotmaßstab

Wie oben beschrieben, lag der Kulturraum getrennt in zwei Membranbündeln vor, die aber in einem gemeinsamen Versorgungsraum hingen. Alle Verbrauchs- und Produktionsberechnungen basierten auf den im Perfusionstrom am Modulausgang gemessenen Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen, so dass Glukoseverbrauch und Produktivität für das gesamte Modul berechnet wurden. Mit der hochzelldichtee tablierten CHO-Zelle wurde ein Prozess im Pilotmaßstab gefahren. Da eine Anzucht der für das Inokulum notwendigen Zellen mit den verfügbaren Ressourcen nicht in einem Zug möglich war, wurden die beiden separaten Membranbündel um eine Woche versetzt inokuliert. Die Prozesszeit in den Diagrammen beginnt mit dem Inokulum des ersten Membranbündels (Tag 0), während das zweite Bündel an Tag 8 inokuliert wurde.



**Abb. 6.6:** Pilotmaßstab mit CHO: Glukoseverbrauch und Produktbildung pro Modul.

Glukoseverbrauch und Produktbildung sind in Abbildung 6.6 dargestellt. Bis Tag 25 gab es in beiden Kurven Schwankungen und einen Anstieg. Zwischen Tag 25 und 40 lag die Produktivität konstant im Bereich um  $100 \text{ mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$  während der Glukoseverbrauch weiter anstieg, von  $30 \text{ mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$  am Tag 25 auf  $70 \text{ mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$  am Tag 40. Dies bedeutet, dass die Effizienz des Reaktors in Form des Verhältnisses Glukoseverbrauch pro Produktbildung über die Zeit sank.

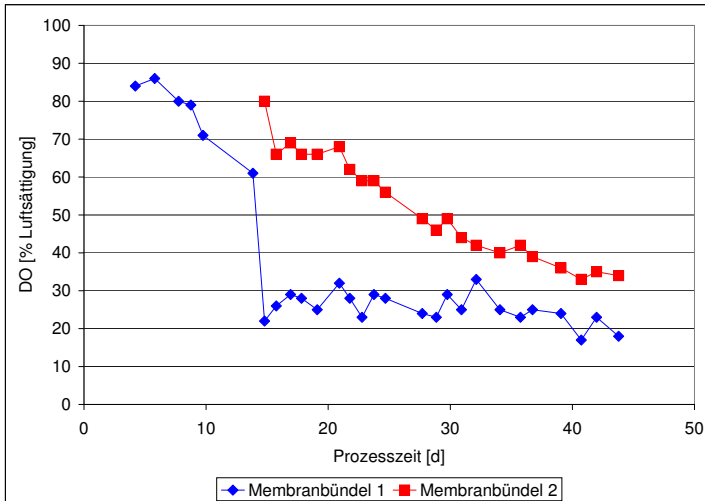
### 6.3.2 Fazit

Im Pilotmaßstab konnten über 43 Tage Zellen kultiviert und Produkt zellfrei geerntet werden. Die biologische Funktionalität war gegeben.

## 6.4 Sauerstoff und pH im Prozess

Im Pilotmaßstab war es zum einen möglich, große Probevolumina für analytische Zwecke zu entnehmen. Zum anderen stand zum Zeitpunkt des Pilotprozesses Messtechnik für externe Sauerstoffmessung zur Verfügung.

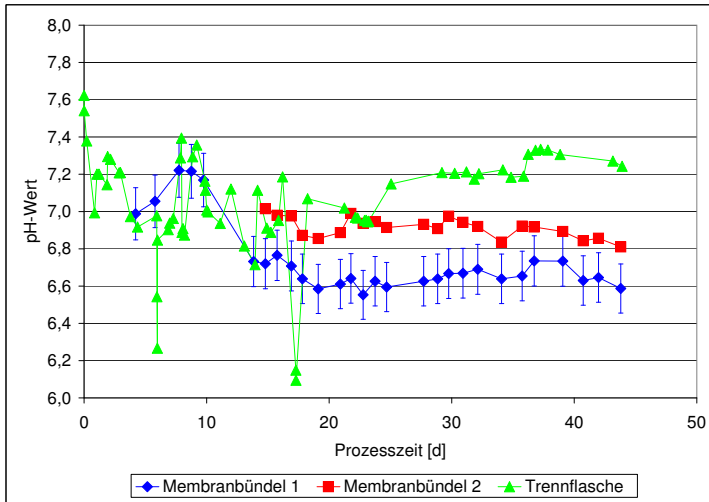
### 6.4.1 Gelöstsauerstoff im Pilotmaßstab



**Abb. 6.7:** Pilotmaßstab mit CHO: Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) in den beiden Faserbündeln; gemessen extern in KR-Proben.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) konnte in diesem Prozess offline in Proben aus dem KR gemessen werden. Abbildung 6.7 zeigt die Ergebnisse. Auffällig war der unterschiedliche Konzentrationsverlauf in beiden Membranbündeln. Das zuerst inokulierte Bündel 1 zeigte einen steilen Abfall in der DO-Konzentration an Tag 10 bis 15 und verbleibt dann konstant bei 20-30 %. Das an Tag 8 inokulierte, aber erst ab Tag 15 beprobte Bündel 2 zeigte über 25 Tage einen langsamen, stetigen Abfall der DO-Konzentration, sank aber nicht unter 30 %. Aus diesen Ergebnissen kann, zumindest für diesen Prozess im Pilotmaßstab, postuliert werden, dass keine Sauerstofflimitierung vorlag.

## 6.4.2 pH-Wert im Pilotmaßstab



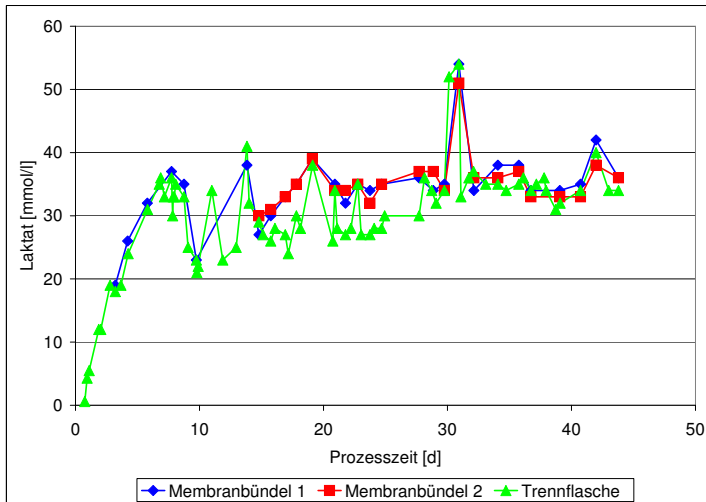
**Abb. 6.8:** Pilotmaßstab mit CHO: pH-Werte in den beiden Faserbündeln sowie in der Trennflasche am Modulausgang.

Die Betrachtung der pH-Werte in Abbildung 6.8 zeigte große Schwankungen zu Prozessbeginn, aber ab Tag 20 relativ stabile Verläufe. Die Trennflasche befand sich im Prozess hinter dem Modul und sammelte dort den gemeinsamen Gas-Medium-Strom (vgl. Abbildung 6.5). Man kann annehmen, dass der dort gemessene pH-Wert höher als der im Modul vorliegende war und dem, bei den eingestellten Parametern Begasungsrate,  $\text{CO}_2$ -Anteil in der Begasung und aktuellen Medienzusammensetzung (z.B. Laktatkonzentration), maximal erreichbaren pH-Wert entsprach. Da das Medium carbonatgepuffert war, gaste das  $\text{CO}_2$  in der gemeinsamen Medium-Gas-Strecke aus, was den pH-Wert im Medium ansteigen ließ.

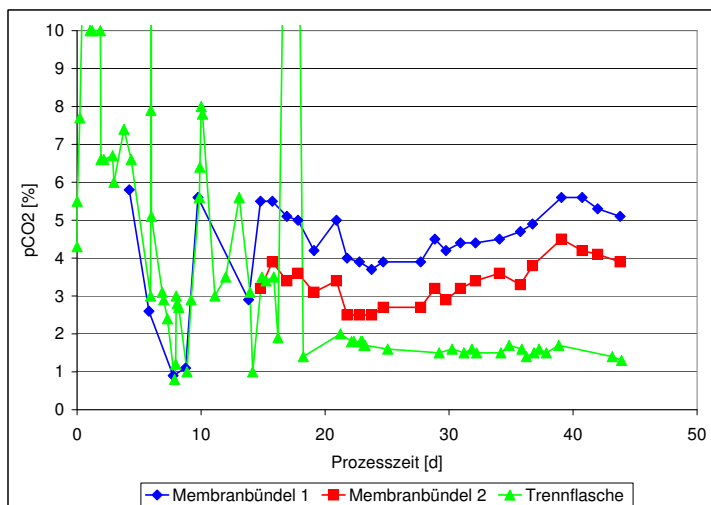
Es zeigte sich, dass der pH-Wert innerhalb der Membranbündel deutlich niedriger war als in der Gastrennflasche und dass auch in Bündel 1 ein um durchschnittlich 0,2 bis 0,4 pH-Einheiten niedrigerer pH-Wert vorlag als in Bündel 2. Da beide im Versorgungsraum die gleichen Umgebungsbedingungen hatten, konnte die Differenz zwischen den zwei Bündeln nur damit erklärt werden,

dass innerhalb der Bündel verschiedene Mengen saurer Metabolite (z.B. Laktat,  $\text{CO}_2$ ) gebildet worden sind. Dies müsste sich in einer höheren Laktat- oder  $\text{CO}_2$ -Konzentration in Bündel 1 widerspiegeln. Die entsprechenden Konzentrationen sind in den Abbildungen 6.9 und 6.10 dargestellt.

Die Laktatkonzentrationen verliefen in beiden Bündeln sehr ähnlich, die  $\text{CO}_2$ -Konzentration war in Bündel 1 ab Tag 10 durchgängig höher als in Bündel 2. Hierin kann eine Ursache für den niedrigeren pH-Wert in Bündel 1 vermutet werden.



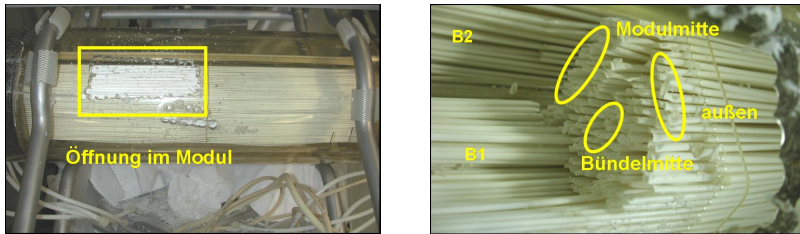
**Abb. 6.9:** Laktatkonzentration in beiden Membranbündeln sowie am Modulausgang.



**Abb. 6.10:** CO<sub>2</sub>-Konzentration (gelöst CO<sub>2</sub>) in beiden Membranbündeln sowie am Modulausgang in der Gastrennflasche.

### 6.4.3 Verteilung der Zellen im MBB

Im Pilotmaßstab konnte am Ende des Prozesses keine absolute Zellzahl pro Modul bestimmt werden. Nach Abschluss des 43-tägigen Prozesses wurde das Modul an einer Stelle aufgesägt und einzelne Faserstücke wurden herausgeschnitten (siehe Abbildung 6.11). Die Fasern wurden dahingehend beurteilt, ob sie mit Zellen gefüllt oder leer waren. Weiterhin wurde die Zellsuspension aus den Faserstücken mit 1 ml PBS in ein Gefäß gespült und auf ihre Zellzahl vermessen. Aus den geometrischen Abmessungen der Faserstücke konnte die an dieser Stelle vorhandene Zellkonzentration in der Faser berechnet werden. Alle Angaben erfolgen als Gesamtzellzahl, da zwischen Medium- und Faserentnahme zwei Tage vergangen waren und die Vitalität somit keine glaubhafte Aussage mehr lieferte.



**Abb. 6.11:** Entnahmeorte der Faserstücke aus dem Pilotmodul für Untersuchungen zur Verteilung der Zellen im Modul.

**Tabelle 6.1:** Anzahl der dem Pilotprozess abschließend entnommenen und auf Zellfüllung untersuchten Faserstücke.

Bündel	Lage im Modul	komplett gefüllt	teilweise gefüllt	leer
B1	Modulmitte	1	2	1
B1	Bündelmitte	1	2	2
B1	außen	0	5	0
B1	außen, Kopfplatte	0	2	1
B2	Modulmitte	4	1	1
B2	außen	2	1	1

Von 27 untersuchten Faserstücken erwiesen sich acht (30 %) als komplett mit

Zellen gefüllt, 13 Faserstücke (48 %) als teilweise mit Zellen gefüllt und sechs (22 %) als leer. In den komplett gefüllten wurde eine durchschnittliche Zellkonzentration von 4E8/ml gemessen; das entspricht dem geometrischen Maximalwert, bei dem der KR vollständig mit 12 $\mu$ m großen Zellen gefüllt wäre.

Mit den Erkenntnissen aus der Zellverteilung im Pilotmaßstab musste angenommen werden, dass der in den KR-Proben (Mischprobe aus mehreren Fasern) gemessene DO zwar einen Mittelwert aus vielen Fasern darstellte, nicht aber in allen Fasern dieser DO vorlag (vgl. Kapitel 6.4.1). Denkbar wäre, dass in leeren Fasern Medium mit 100 % Sauerstoffsättigung vorlag und dass die DO-Konzentration in komplett gefüllten Fasern 0 % betrug. Dies würde erklären, warum der minimale DO im KR trotz Zellwachstums nicht bei 0 % lag. Ähnliches gilt für den im KR des Pilotmaßstabs gemessenen pH-Wert (vgl. Kapitel 6.4.2). In komplett zellgefüllten Fasern könnte der pH-Wert noch niedriger gewesen sein als der in einer Mischprobe aus leeren und gefüllten Fasern gemessene pH von 6,6.

## 6.5 Fazit Pilotmaßstab

In einem ersten Prozess mit einem Pilotmaßstabsprototypen konnten die technische und biologische Funktionalität des Reaktors nachgewiesen werden. Der „proof of concept“ im Pilotmaßstab ist damit als erfolgreich zu betrachten. Eine Diskussion der Auffälligkeiten, v.a. des pH-Wertes und der inhomogenen Zellverteilung, folgt im nächsten Kapitel.

Auf eine Überprüfung der Skalierbarkeit, der Reproduzierbarkeit von spezifischen Verbrauchs- und Produktivitätsraten, von Prozessentwicklungs- und Pilotmaßstab wurde verzichtet. Im Pilotmaßstab wurde nur ein Prozess durchgeführt. In der PEE konnte der pH-Wert im Prozessverlauf nicht gemessen werden, so dass schon die Prozessbedingungen beider Maßstäbe nicht vergleichbar gewesen wären.

## **7 Diskussion und Ausblick**

Das Ziel der Arbeit war es, das den Anforderungen in Kapitel 1.3 entsprechende Reaktorkonzept umzusetzen und auf seine Anwendbarkeit hin zu prüfen. Im Folgenden sollen die Umsetzung des Reaktorkonzeptes sowie die technische und biologische Funktionalität des Reaktors abschließend diskutiert werden. Weiterhin wird die Entwicklung der Einwegbioreaktoren nach 2003, parallel zur MBB-Entwicklung, betrachtet und eine finale Einschätzung der Anwendbarkeit des MBB gegeben.

### **7.1 Umsetzung der grundlegenden Forderungen**

Es konnte ein Reaktorkonzept entwickelt und umgesetzt werden, dass im Wesentlichen auf einem perfundierbaren Einwegsystem basiert. Eine zellfreie Ernte des Produktes konnte erfolgreich gezeigt werden. Damit wurde den Anforderungen an Bioreaktoren aus den Trends im biopharmazeutischen Markt entsprochen (vgl. Kapitel 1).

Das entwickelte Reaktorkonzept wurde im Prozessentwicklungsmaßstab und im Pilotmaßstab praktisch umgesetzt. Die Maßstabsvergrößerung zum Produktionsmaßstab wurde aufgrund der mangelnden Reife der beiden kleineren Maßstäbe zurück gestellt. Die Geschlossenheit und Portabilität der Systeme wurde schon für die Prototypen umgesetzt.

### **7.2 Technische Funktionalität des MBB**

#### **7.2.1 Mess- und Regeltechnik für pH und Gelöstsauerstoff**

Der wichtigste Schritt in der Fortsetzung der MBB-Entwicklung ist die Etablierung einer zuverlässigen Mess- und Regeltechnik für den pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration (DO). Die Probenahme und Messung an einem

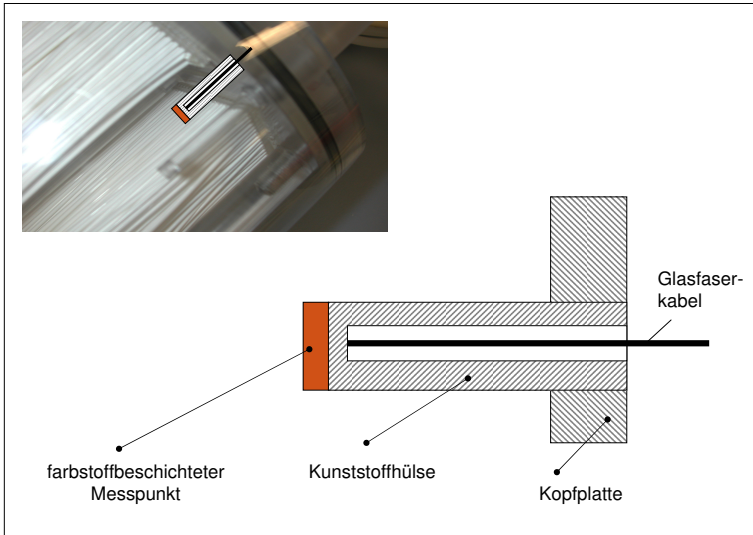
externen Gerät, wie sie bei der Testung des Pilotmaßstabes erfolgte, stellte zwar einen Kompromiss für den „proof of concept“ dar, ist aber keine Methode für die Routineanwendung des Systems. Für eine solche muss eine online-Messung direkt im Reaktor etabliert werden.

Eine Messmethode, die das Potenzial einer zuverlässigen pH- und DO-Messung auf Einwegbasis birgt, ist die optische Messtechnik der Firma Presens (Presens GmbH, Regensburg, Deutschland). Ähnlich wie der MBB basiert auch diese Messtechnik auf dem Zusammenwirken einer Einwegkomponente mit einer stationären Messeinheit. Die Einwegkomponente besteht aus einem farbstoffbeschichteten Messpunkt, der auf eine plane, transparente Fläche aufzukleben ist, z.B. auf die sterile Seite eines Einwegmoduls. Von der unsterilen Seite wird ein mit dem Messinstrument verbundenes Glasfaserkabel auf die plane, transparente Fläche aufgesetzt. Das Messprinzip basiert auf einer Anregung des Farbstoffes mittels Lichtenergie und der Messung des Energieverlustes im zurückkehrenden Licht, der mit dem Gehalt an Sauerstoff im Medium bzw. dem pH-Wert korreliert.

Im VR ist die Installation eines Messpunktes möglich. Die gebogene Fläche des Außenzylinders eignet sich nur bedingt, v.a. da mit der ständigen Rotation eine Befestigung des Glasfaserkabels auf dem Umfang des Modulzylinders nicht möglich ist. Die zu favorisierende Möglichkeit, ein Glasfaserkabel sicher mitrotieren zu lassen, besteht in einer Befestigung in der Kopfplatte. Denkbar wäre das Einbringen einer Hülse, ähnlich der für den Temperatursensor, an deren steriler Seite der Messpunkt befestigt wird und in deren unsterile Seite das Glasfaserkabel geschoben und z.B. mit einer Kabelverschraubung befestigt werden kann (siehe Abbildung 7.1).

In den stationären Geräteeinheiten, die die jeweilige Messplatine enthalten würden, müssten geschützte Führungen geschaffen werden, in denen die mitrotierenden Glasfaserkabel bruchsicher vom Modul zum Messinstrument geführt werden.

Neben der Messung ist die Regelung von DO und pH eine weitere essentielle Voraussetzung für reproduzierbare biopharmazeutische Produktionsprozesse. Ob eine Begasung mit Luft ausreichend ist, um die Zellen mit Sauerstoff zu



**Abb. 7.1:** Entwurf einer Einsteckhülse für optische DO- oder pH-Messung.

versorgen, oder ob eine geregelte Zugabe von Sauerstoff notwendig ist, bleibt nach der Installation der online-Messtechnik zu klären.

Die pH-Regelung sollte mittels  $\text{CO}_2$ -Zugabe im Gasstrom und der Zugabe von Carbonatpuffer in den Mediumstrom umgesetzt werden. Hierfür ist es notwendig, weitere Daten über die pH-Differenz zwischen VR und KR zu erheben. Die Messsonde kann nur im VR positioniert werden, prozessrelevant ist aber der pH-Wert im KR, in unmittelbarer Nähe der Zellen. Die Abweichung zwischen VR- und KR-pH-Wert muss in die Regelung einfließen. Dies ist ein kritischer Punkt im Bezug auf die Fertigungsentwicklung des Reaktors. Um die pH-Differenz zwischen KR und VR zu bestimmen, müssen in einem Versuchsaufbau die pH-Werte in beiden Räumen gemessen werden. Denkbar wäre hier der Einsatz eines pH-Mikrosensors der Presens GmbH (Durchmesser  $150 \mu\text{m}$ ), der durch einen Inokulumport in eine einzelne Faser eingeführt würde.

### 7.2.2 Moduldesign und -fertigung

Das Moduldesign hat sich sowohl für das Prozessentwicklungsmodul als auch den Pilotmaßstab als funktional erwiesen.

Generell wurde die fertigungstechnische Seite der Module bisher nicht ökonomisch betrachtet. Alle bisher verwendeten Module waren Prototypen oder Kleinserien, die in manueller Handarbeit gefertigt wurden. Für einen kommerziellen Vertrieb des Reaktors wäre es notwendig, die Modulherstellung zu automatisieren. Zwei Membran- und Modulhersteller (Membrana GmbH und Saxonia BioTec GmbH) bestätigten, dass es möglich wäre, eine automatische Fertigungsstrecke für Module der Größe eines Pilotmoduls zu bauen. Die Entwicklungs- und Baukosten einer solchen Anlage rentierten sich aber nur, wenn ein Absatz von mehreren Tausend Modulen pro Jahr sicher wäre. Ob derartige Stückzahlen bei der aktuellen Marktlage (siehe Kapitel 7.6) zu erreichen wären, bleibt zu evaluieren.

### 7.2.3 Probenahme und Prozessüberwachung

Neben der online-Messung von DO und pH dienen i.A. auch Nährstoff- und Produktkonzentration sowie die Zellzahl zur Überwachung eines Produktionsprozesses. Die Nährstoff- und Produktkonzentrationen wurden schon in den beschriebenen Prototypenprozessen in Proben gemessen, die dem Perfusionstrom am VR-Ausgang entnommen wurden. Dieses Vorgehen hat sich bewährt und sollte beibehalten werden. Weiterhin wäre es wünschenswert, einen Probenahmeport zu installieren, der eine Probenahme direkt aus dem VR ermöglicht. Solch ein Port kann analog der Bauweise der Zu- und Abfuhrports in dem Randbereich der Kopfplatte installiert werden.

Eine Zellzahlbestimmung aus dem KR ist bisher nicht möglich. Selbst wenn man über die Inokulumports eine Probe direkt aus dem KR zöge (vgl. Kapitel 6.2.2), so wäre diese nicht repräsentativ. Stattdessen wäre der Einsatz eines peripheren Venenkatheters (z.B. Flexüle, Braunüle), der über einen Inokulumport oder separaten Zugangsport in eine einzelne Membranfaser eingeführt würde, denkbar. Da die einzelnen Membranfasern parallelisierte, identische Kulturräume darstellen, sollte eine Probe aus einer Membranfaser repräsen-

tativ für den Querschnitt des Moduls sein. Solch eine Probe direkt aus dem KR kann wertvolle Anhaltspunkte v.a. zur weiteren Charakterisierung des Reaktorsystems geben, wäre aber für eine industrielle Prozessüberwachung idealerweise zu umgehen.

Für eine Prozessüberwachung sollen Anzahl und Aktivität der Zellen indirekt über den Glukose- und Sauerstoffverbrauch im Reaktor ermittelt werden. Ähnliche Wege wurden schon für den konventionellen HFBR beschrieben (vgl. Kapitel 2.4.3).

Weitere Versuche, die Zellzahl im Hochzelldichte-System zu bestimmen, führten zu einer Perfusion mit Alamar Blue (Gloekner *et al.*, 2001), die aber aufgrund des Produktschutzes bei der Produktion biopharmazeutischer Wirkstoffe nicht angewendet werden kann. Für den MBB wurde getestet, mittels der Messung der LDH-Aktivität im Perfusionsstrom eine Aussage zur Totzellzahl bzw. Vitalität zu treffen (Förster, 2008). Dieser Weg erwies sich als nicht gangbar. Das indirekte Vorgehen über den Glukoseverbrauch erscheint effizient und ausreichend. Mit den pharmazeutischen Zulassungsbehörden (EMEA, FDA) sollte die Akzeptanz dieses indirekten Vorgehens abgesprochen werden.

## 7.2.4 Realisierbarkeit der technischen Weiterentwicklung

Als Schlüsselschritt in der technischen Weiterentwicklung wird die Etablierung einer online-Mess- und Regeltechnik für pH und DO gesehen. Dieses Vorhaben wird als technisch realisierbar eingeschätzt, vorausgesetzt die pH-Differenz zwischen KR und VR erweist sich als konstant. Für die Glasfaserkabel der optischen Messtechnik müssen entsprechende Führungsschienen in der Geräteeinheit vorgesehen werden.

Der vorgeschlagene Probenahmeport am VR sowie Einzelproben aus dem KR sind technisch realisierbar. Eine direkte online-Messung der Zellzahl ist nicht umsetzbar. Es wurde eine indirekte Prozessüberwachung über den Glukoseverbrauch realisiert.

Für die Automatisierung der Modulfertigung ist die Realisierbarkeit nicht sicher gegeben, v.a. da es sich um einen Einwegartikel handelt, dessen Produktionskosten möglichst gering gehalten werden sollen. Eine Automatisierung der Modulfertigung in Angriff zu nehmen ist nur mit Unterstützung externer

Industriebetriebe im Bereich Membran- und Modulfertigung möglich, die wiederum nur dann gegeben sein wird, wenn eine sichere Marktchance für den Reaktor vorhanden ist.

### **7.3 Biologische Funktionalität des MBB**

In allen getesteten Maßstäben konnte in einzelnen Versuchen die biologische Funktionalität des MBB anhand eines steigenden und sich stabilisierenden Glukoseverbrauches gezeigt werden. Ein deutlicher Anstieg der Vitalzellzahl im Modul konnte allerdings kaum nachgewiesen werden. Damit erwies sich die indirekte Prozessüberwachung über den Glukoseverbrauch momentan nur als bedingt geeignet. Mit einem technisch optimierten MBB müssten dann detaillierte Versuche durchgeführt werden, um den Glukoseverbrauch als Instrument zur indirekten Prozessüberwachung zu etablieren.

Als Ursache des mangelnden Zellwachstums im MBB gilt ein sehr niedriger pH-Wert im KR, der im Prozessentwicklungsmaßstab und im Pilotmaßstab nachgewiesen werden konnte.

### **7.4 Vergleich MBB und HFBR**

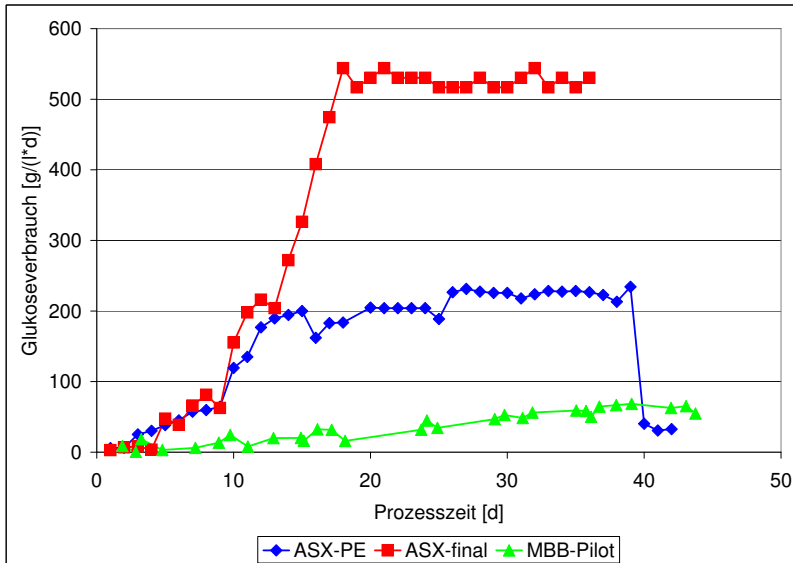
Die Leistung des MBB-Pilotmaßstabes soll mit dem ebenfalls membranbasierten, konventionellen Hohlfaserbioreaktor ASX (vgl. Kapitel 1.2.2) verglichen werden. Aus dem Produktionsbereich der ProBioGen AG sind Daten aus der Prozessentwicklung und von einem finalen Produktionsprozess der CHO-Zelle mit Produkt X im ASX verfügbar.

Bei diesem Vergleich ist zu berücksichtigen, dass auf Seiten des MBB der erste Prototyp im Pilotmaßstab verwendet wurde, während auf Seiten des ASX ein optimiertes, am Markt etabliertes Gerät zur Verfügung stand.

#### **7.4.1 Glukoseverbrauch als Maß der biologischen Aktivität**

In Abbildung 7.2 ist der Glukoseverbrauch der Zellen pro 1 l KR-Volumen und Tag vergleichend im konventionellen HFBR (ASX) und im MBB-Pilotmaßstab dargestellt. Im ASX waren Daten aus einer frühen Phase der Prozessentwick-

lung (ASX-PE) und einem optimierten Produktionsprozess (ASX-final) verfügbar.



**Abb. 7.2:** Normierter Glukoseverbrauch (g Glukose pro Tag und L Kulturvolumen), MBB und HFBR (ASX) im Vergleich.

Im finalen ASX-Prozess sieht man einen lehrbuchhaften Verlauf eines Perfu-sionsprozesses. In den ersten 20 Tagen stieg der Glukoseverbrauch an, ver-ursacht hauptsächlich durch Zunahme der Zellmasse, bis zum einen der KR hochdicht bewachsen war und zum anderen die Mediumperfusionspumpe ih-re Maximalleistung erreicht hatte. Es folgte eine stationäre Phase, in der der Glukoseverbrauch über weitere 20 Tage konstant bei über 500  $g/(l \cdot d)$  lag. Im Vergleich dazu zeigte der Prozessentwicklungslauf im ASX ein stufenweises Ansteigen des Glukoseverbrauches über den gesamten Prozesszeitrahmen. Maximal wurde ein Verbrauch von 300  $g/(l \cdot d)$  erreicht. Im MBB, bei dem nicht nur der Prozess, sondern der gesamte Reaktor noch in der Entwicklung war, stieg der Glukoseverbrauch zwar langsam, aber stetig über 40 Tage bis auf 70  $g/(l \cdot d)$  an.

Der deutlich höhere Glukoseverbrauch im ASX lässt auf eine höhere Zelldichte

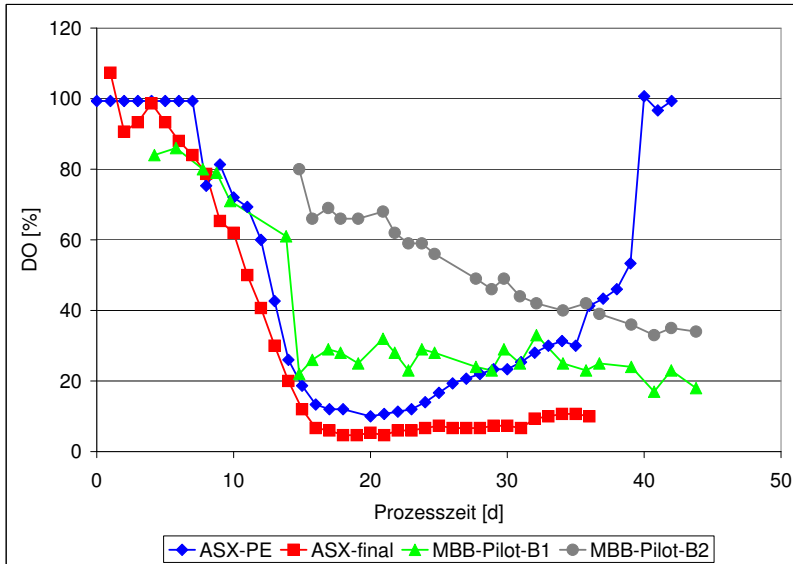
schließen. In Kapitel 6.4.3 wurde festgestellt, dass im MBB nur ca. 30 % aller Fasern komplett mit Zellen gefüllt waren während 20 % der Probefasern am Ende des Prozesses leer waren. Nimmt man an, dass es gelänge, alle Fasern zu 100 % mit Zellen zu füllen, könnte sich der maximale Glukoseverbrauch im Prototypen des MBB deutlich steigern und damit dem Leistungsbereich des ASX während der Prozessentwicklung annähern oder diesen übertreffen.

#### 7.4.2 Gelöstsauerstoff (DO)

Ein kritischer Parameter bei Hochzelldichtekulturen ist die Sauerstoffversorgung (Piret *et al.*, 1991). In Abbildung 7.3 ist der DO in beiden Systemen dargestellt. Im ASX wurde der DO im Versorgungsraum online gemessen, im MBB offline in KR-Proben (vgl. Kapitel 2.5). Der Verlauf des DO im Bündel 1 des MBB verlief sehr ähnlich dem der beiden ASX-Prozesse. Einem Absinken innerhalb der ersten 15 Prozesstage folgte ein Verharren auf einem - vermutlich reaktorspezifischen - Minimum, das bei den ASX-Prozessen unter 10 % lag, bei dem Bündel 1 des MBB bei 20 – 30 %. Während Bündel 1 und der finale ASX-Lauf über lange Zeit auf diesem stationären Minimum verharrten, stieg der DO im ASX-PE-Prozess ab Tag 25 steil an, was erfahrungsgemäß ein Zeichen für eine sterbende Kultur ist.

Der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bündel 2 des MBB wich deutlich von den anderen ab und passte im Verlauf (bis Tag 25) eher zu dem schleichend, aber stetig, ansteigenden Glukoseverbrauch des MBB.

Das DO-Minimum des ASX von  $\sim 10\%$  hat diffusionsbedingte Ursachen. Die DO-Messung im ASX geschieht im VR-Strom, der Diffusionsweg des Sauerstoffs ist vom Versorgungsstrom über die Membran in den KR zu den Zellen. Selbst wenn die Zellen allen Sauerstoff im KR aufgebraucht haben, dort also 0 % vorlägen, wäre im VR ein minimaler Anteil zu messen, da über die Membran ein gewisser Sauerstoffgradient vorhanden sein muss, um den Transport aufrecht zu erhalten. Im MBB-Pilotmaßstab wurde der DO direkt in Proben aus dem KR gemessen. Dass hier trotz Zellaktivität keine 0 % Sauerstoff erreicht wurden, ist auf die inhomogene Verteilung der Zellen (vgl. Kapitel 6.4.3) zurück zu führen. Mit den vorhandenen Daten kann daher nicht geklärt



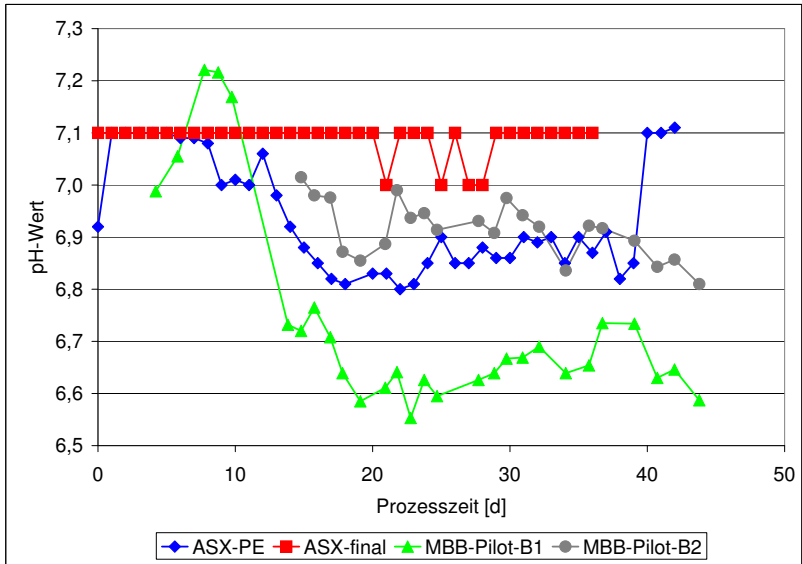
**Abb. 7.3:** Gelöstsauerstoff im HFBR (Versorgungsraum) und MBB (Kulturraum).

werden, ob in den zellgefüllten Membranfasern des MBB eine Sauerstoffimittierung vorlag.

### 7.4.3 pH-Wert

Schon in früheren Kapiteln wurde erarbeitet, dass der pH-Wert im System eine wesentliche Rolle spielt. In Abbildung 7.4 sind die pH-Werte der beiden ASX-Prozesse sowie der beiden Membranbündel im MBB-Pilotmaßstab dargestellt. Während im MBB die pH-Messung mit KR-Proben offline erfolgte, wurde im ASX im VR online gemessen.

Der finale ASX-Prozess wurde beidseitig über Carbonatpuffer und  $\text{CO}_2$  geregelt und konnte als einziger Prozess einen konstanten pH-Wert im Sollbereich 7,0–7,1 zeigen. Der ASX-PE-Prozess wurde nur einseitig über  $\text{CO}_2$  geregelt, Base oder Carbonatpuffer für die Korrektur saurer pH-Werte waren nicht an-



**Abb. 7.4:** pH-Werte im HFBR (Versorgungsraum) und MBB (Kulturraum).

geschlossen. Hier sank der pH-Wert im Prozessverlauf auf  $\sim 6,8$  ab, in diesem Bereich bewegte sich auch Bündel 2 des MBB. Im Bündel 1 des MBB lagen noch niedrigere pH-Werte vor, bis hinab zu pH 6,6.

Zu beachten ist, dass die pH-Messung im ASX im VR, im MBB dagegen in Proben aus dem KR erfolgte. Es liegen leider keine KR-Messwerte aus dem ASX vor, es ist aber anzunehmen, dass bei Säugerzellkulturen in membranbasierten Systemen allgemein der pH-Wert im KR etwas niedriger ist als im VR.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die KR-Proben im MBB Mischproben aus leeren und zellgefüllten Fasern waren (vgl. Kapitel 6.4.3). Es kann angenommen werden, dass der pH-Wert direkt innerhalb der zellgefüllten Membranfasern noch niedriger als der in der Mischprobe gemessene pH 6,6 war.

Aus der pH-Betrachtung folgt, dass der niedrige pH-Wert im KR des MBB das Zellwachstum hemmte und dass eine pH-Regelung Voraussetzung für eine weitere Testung des MBB ist.

#### 7.4.4 Fazit des Vergleiches MBB und ASX

Der MBB weist in der Zellumgebung einen deutlich geringeren pH-Wert auf als der ASX. Es kann ein negativer Einfluss des niedrigen pH-Wertes im MBB auf die Zellen angenommen werden. Eine Sauerstofflimitierung konnte in keinem der Systeme ausgeschlossen werden. Der Kulturraum im MBB war nur zu einem Teil mit Zellen gefüllt und erreichte etwa ein Drittel des Glukoseverbrauches des ASX-PE. Mit einem optimierten MBB, in dem alle Membranfasern gleichmäßig mit Zellen gefüllt wären und eine pH- und DO-Regelung vorläge, könnte eine gleiche oder höhere biologische Aktivität erreicht werden als im ASX-PE. Eine Prozessoptimierung in einem fertig entwickelten MBB würde weiteres Potenzial zur Verbesserung der biologischen Aktivität bergen.

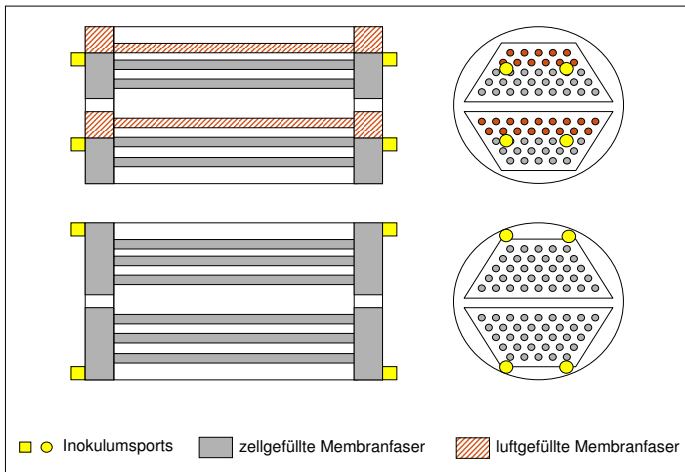
#### 7.5 Inhomogene Verteilung der Zellen im MBB

Die Inhomogenität der Verteilung der Zellsuspension in den Fasern (vgl. Kapitel 6.4.3) kann zum einen über die Länge, zum anderen über den Querschnitt vorliegen. Eine zu Beginn des Prozesses vorliegende ungleiche Verteilung über die Faserlänge kann sich durch Zellwachstum innerhalb der Membranfaser ausgleichen. Anders steht es um eine ungleiche Verteilung über den Querschnitt eines Membranbündels, wie sie durch die Stichprobe (siehe Tabelle 6.1 auf Seite 103) nachgewiesen wurde. Zwar sind alle Fasern über den Totraum in den Kopfplatten miteinander verbunden, aber eine Zellwanderung von Faser A in Faser B über den Kopfraum scheint sehr unwahrscheinlich.

Von Anfang an wurde eine gleichmäßige Inokulation der Zellsuspension in alle Fasern als entscheidender Schritt und als wesentlicher Punkt der Reaktorentwicklung betrachtet. Mit der vertikalen Lagerung des Moduls während der Inokulation sollte eine homogene Verteilung der Zellen über den Bündelquerschnitt erreicht werden. Diese Methode konnte im Prozessentwicklungsmaßstab als optimal nachgewiesen werden, erwies sich aber im Pilotmaßstab als nicht praktikabel.

Bei einer horizontalen Lagerung des Moduls während der Inokulation verblieb immer eine Luftblase im Kopfraum. Rotierte das Modul, wanderte die Luftblase am äußeren Rand des Kopfraumes entlang. Theoretisch war zwar

jede Faser eine gewisse Zeit frei zugänglich, aber es ist durchaus vorstellbar, dass in die mittig im Bündel gelegenen Fasern mehr Zellsuspension eindringen konnte, als in die außen gelegenen, die regelmäßig von der Luftblase verdeckt wurden. Auch konnte eingedrungene Luft aus einer vertikal gelagerten Faser schwer bis gar nicht entfernt werden, wohingegen die Luft bei horizontaler Lagerung des Moduls durch die von unten eingepresste Zellsuspension verdrängt wird und durch den oberen, offenen Port entweichen kann. Um in horizontaler Modullagerung eine gleichmäßigere Verteilung der Zellsuspension über den Querschnitt zu erreichen, sollten die Inokulumports in den Kopfplatten versetzt werden (Förster, 2008; Abbildung 7.5).



**Abb. 7.5:** Umsetzung der Inokulumports; oben: aktuelle Version, einzelne Fasern bleiben mit Luft gefüllt; unten: optimierte Anordnung, Luftblasen können vollständig aus KR entweichen.

Die in der Grundidee des Reaktors verankerte parallele Anordnung einer beliebigen Anzahl gleicher Kulturräume (Membrankammern) war im Testlauf des Pilotmaßstabes, aufgrund der inhomogenen Füllung der Membranfasern, nicht gegeben. Eine Charakterisierung des Prozesses wurde durch die inho-

mogene Zellverteilung erschwert bzw. unmöglich, da für die Auswertung über das Modul summierte Werte genutzt wurden.

## 7.6 Marktentwicklung und Chancen des MBB

Die bisher beschriebene Reaktorenwicklung erstreckte sich, mit Unterbrechungen, über einen Zeitraum von sechs Jahren. Während dieser Zeit gab es v.a. im Bereich der Einwegbioreaktoren spannende Neuentwicklungen, so dass im folgenden betrachtet werden soll, wie sich der MBB heute, nach prinzipiell erwiesener Funktionalität, am biopharmazeutischen Markt positionieren ließe.

### 7.6.1 Entwicklung von Einwegreaktoren 2003 bis 2009

Die im Kapitel 1 beschriebenen Anforderungen an einen Bioreaktor im biopharmazeutischen Markt sind im Wesentlichen gleich geblieben. Im Folgenden sollen Neuentwicklungen im Bereich der Einwegbioreaktoren näher betrachtet werden. Es wurden sehr viele Innovationen vorgestellt, aber zwei Reaktorsysteme etablierten sich hauptsächlich im biopharmazeutischen Markt. Auf der einen Seite das Wave-Prinzip (Herrmann *et al.*, 2009), auf der anderen Seite das Rührkesselprinzip auf Einwegsystemen basierend (Ozturk, 2007; Galliher, 2007; D'Avino *et al.*, 2009; Gerben *et al.*, 2009). Vor allem die Einwegrührkessel finden Eingang in den eher konservativen pharmazeutischen Markt, da sie durch ihre Ähnlichkeit mit konventionellen Edelstahlrührkesseln überzeugen (Sinclair, 2008).

Tabelle 7.1 fasst die am Markt befindlichen Reaktoren dieser beiden Prinzipien zusammen. Auffällig ist, dass der Vertrieb v.a. des Wave-Reaktors in kaum einem Fall durch die Entwicklerfirma vorgenommen wird, was darauf verweist, dass ein Einstieg in den Markt nur einer großen Firma mit engem Vertriebsnetz gelingen kann.

Weitere Einwegsysteme sind z.B. der Cellmaker von Cellexus Limited (Vertrieb IUL Instruments GmbH), der auf dem Prinzip einer Blasensäule basiert sowie der bio-t-bag der Zeta Holding GmbH, der mittels eines Vibromischers gemischt wird.

**Tabelle 7.1:** Neuentwicklungen im Bereich der Einwegbioreaktoren 2003 - 2009.

Reaktor	Volumen	Entwickler
<b>Rührkessel</b>		
SUB	1.000 L	Hyclone Ltd.
<i>XDR<sup>TM</sup></i>	2.000 L	Xcellerex Inc.
Cultibag STR	200 L	Sartorius Stedim Systems GmbH
<b>Wave</b>		
Cultibag RM	600 L/ 300 L*	Wave Biotech AG (Schweiz)
Wave Bioreactor	1.000 L/ 500 L*	Wave Biotech LLC (USA)
AppliFlex	50 L/ 25 L*	Applikon Biotechnology B.V.
cell-tainer	50 L/ 25 L*	Cellution Biotech B.V.

\*Bagvolumen/ Kulturvolumen

Allen aufgeführten Einwegreaktoren ist gemeinsam, dass sie für Suspensionskulturen ausgelegt sind. Alle Systeme sind in kleinen und mittleren Größen verfügbar und portabel, was eine gewisse Flexibilität in den Produktionsstätten erlaubt. Keines der Systeme ist ursprünglich auf Perfusion ausgelegt, auch eine zellfreie Ernte ist bei keinem der Systeme direkt möglich.

Eine weitere Entwicklung auf dem Gebiet der Einwegtechnologien ist eine Durchlaufzentrifuge mit Einwegeinsatz (CentriTech von PneumaticScale Corp.). Diese Durchlaufzentrifuge in Verbindung mit einem der oben genannten Reaktoren ergäbe ein Einwegperfusionssystem. Die Ernte wäre zellfrei (Ciesla, 2003). Die Firma Xcellerex hat eine Anwendungsbeschreibung der Centritech-Technologie in Verbindung mit seinem Einweg-Rührkessel *XDR<sup>TM</sup>* veröffentlicht (Niloff, 2008), verschiedene Forscher nutzten die Technologie für die Entwicklung von Perfusionsprozessen (Johnson *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007). Wie Tabelle 7.2 zeigt, erfüllt die Kombination aus Einwegrührkessel und der Einwegzentrifuge CentriTech die an ein biopharmazeutisches

Produktionssystem gestellten Anforderungen. Ein Vergleich mit dem MBB folgt im nächsten Kapitel.

Auffällig ist, dass innerhalb der letzten sechs Jahre neben dem gut etablierten HFBR kein neues membranbasiertes Bioreaktorsystem die Marktreife erlangte. Dies kann darin begründet sein, dass membranbasierte Systeme vom Aufbau her deutlich komplexer sind als einfache „Gefäßreaktoren“.

**Tabelle 7.2:** Erfüllung der Anforderungen aus Kapitel 1.3, verschiedene Neuentwicklungen im Vergleich.

Anforderung	MBB	Wave	Rührkessel (Einweg)	Rührkessel + Centritech
Skalierbarkeit	+	+	+	+
Einweg	+	+	+	+
Perfusion	+	-	-	+
zellfreie Ernte	+	-	-	+
portabel	+	+	+	+

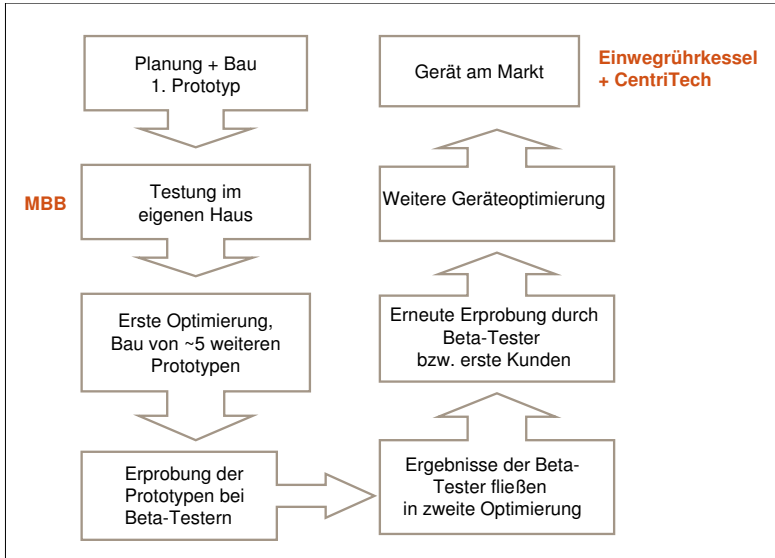
### 7.6.2 Vergleich MBB und Rührkessel + CentriTech

Beim Vergleich des MBB mit der Kombination Einwegrührkessel + CentriTech-Zentrifuge gilt es zu berücksichtigen, dass der MBB als Prototyp in den ersten Testungen erprobt wurde, während Einwegrührkessel und CentriTech als marktreife Geräte vorliegen. In Abbildung 7.6 ist dargestellt, an welcher Stelle der Geräteentwicklung sich beide Vergleichskandidaten befinden.

Sowohl der MBB als auch die Kopplung eines Einwegrührkessels mit einer CentriTech-Zentrifuge ermöglichen einen Perfusionsprozess mit einer zellfreien Ernte. Beide Systeme sind skalierbar, wobei die Kombination Rührkessel und Zentrifuge im miniaturisierten Prozessentwicklungsmaßstab noch nicht als Einwegversion verfügbar ist.

Ein fertig entwickelter, marktreifer MBB wäre mit einer optischen Messtechnik für pH und DO ausgerüstet (vgl. Kapitel 7.2.1). Mit dieser Messtechnik lässt sich das Einwegprinzip des Moduls aufrecht erhalten.

Der Einwegrührkessel SUB von Hyclone läuft mit konventionellen wieder ver-



**Abb. 7.6:** Beispiel eines Weges von der Idee zum marktreifen Gerät und Einordnung der zu vergleichende Geräte.

wendbaren DO- und pH-Elektroden. Die Sonden werden in einer Kleenpak-Kupplung (Pall Corp.) autoklaviert, über diese Kupplung steril mit dem Reaktor verbunden und in den Bag geschoben. Diese Lösung soll das Kontaminationsrisiko minimieren, kann es aber nicht komplett ausschließen.

Der BioStat STR von Sartorius BBI nutzt optische Messtechnik, wie sie auch für den MBB geplant ist. Die Messtechnik ist auf der sterilen Seite des Reaktors komplett zur Einmalnutzung ausgelegt, so dass der sterile Bag zur Installation der Messsonden nicht geöffnet werden muss.

Der Einsatz der optischen Messtechnik auf Einwegbasis ist für alle genannten Einwegbioreaktoren (Rührkessel, Wave und MBB) möglich. Diese optische Messtechnik kann als die Messtechnik der Zukunft im Sektor der Einwegbioreaktoren betrachtet werden (Rao *et al.*, 2009).

Ein oft diskutierter Punkt des MBB ist, dass die Zellen im Kulturraum nicht

direkt überwacht werden können. Eine Prozessüberwachung erfolgt indirekt, v.a. über den Glukoseverbrauch. Bei der Kombination Rührkessel und Zentrifuge ist eine direkte Überwachung der Zellen mittels Probenahme aus dem Rührkessel oder online-Messtechnik für die Zellzahl im Rührkessel möglich. Während die Zellen im MBB nur indirekt überwacht werden können, sind sie keinen großen Änderungen ihrer Umgebungsbedingungen ausgesetzt. In der Kombination Rührkessel und CentriTech werden die Zellen durch Zentrifugation vom zu erntenden Medium abgetrennt und in den Rührkessel zurück geführt. Damit sind sie nicht nur Belastungen in der Pumpe und in der Zentrifuge, sondern auch wechselnden Umgebungsbedingungen (z.B. niedrigere Temperatur, Sauerstofflimitierung in der Zentrifuge) ausgesetzt. Dies kann negative Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Produktivität haben (Kim *et al.*, 2008).

## 7.7 Anwendbarkeit des MBB

Die biologische Funktionalität des MBB-Systems konnte bewiesen und teilweise reproduziert werden. Als größte Probleme stellten sich der pH-Wert und, im Pilotmaßstab, die inhomogene Verteilung der Zellen im KR heraus.

Eine Betrachtung neuer Reaktorentwicklungen zeigte, dass mit einer Koppung eines Einwegrührkessels mit der ebenfalls auf Einwegnutzung basierenden Zentrifuge CentriTech ein alternatives Reaktorsystem entsteht, das alle im Kapitel 1.3 gestellten Anforderungen an einen Bioreaktor im pharmazeutischen Produktionsbetrieb erfüllt.

Der MBB bietet den Zellen stabilere Umgebungsbedingungen als die Kombination aus Rührkessel und Zentrifuge. Allerdings sind die Einwegrührkessel und die CentriTech-Zentrifuge optimierte und am Markt eingeführte Geräte. Eine Fertigentwicklung des MBB würde mindestens fünf weitere Jahre dauern, ein Zeitraum in dem sich die Kombination aus Rührkessel und Zentrifuge bei den Herstellern biopharmazeutischer Wirkstoffe etablieren kann.

Die Fertigentwicklung des MBB wird als möglich, aber technisch und finanziell sehr aufwändig eingeschätzt. Für die Etablierung der pH-Mess- und Re-

geltechnik muss die pH-Differenz zwischen KR und VR bestimmt werden. Die indirekte Prozessüberwachung muss validiert und behördlicherseits akzeptiert werden. Die Herstellung der Module für den MBB muss aus ökonomischer Sicht als unrentabel eingestuft werden.

## 8 Zusammenfassung

Fortschrittliche Trends in der biopharmazeutischen Forschung, wie personalisierte Medizin oder fragile Proteine als Wirkstoffe, stellen neue Anforderungen an Bioreaktoren, in denen die biopharmazeutischen Wirkstoffe mit Hilfe von Zellkulturen im industriellen Maßstab produziert werden. Gefragt sind biologische Sicherheit für den Wirkstoff sowie eine möglichst schnelle und zellfreie Ernte des Produktes aus dem Reaktor. Hierfür geeignet ist ein Perfusionsreaktor auf Einwegbasis. Diese Anforderungen erfüllte zu Beginn der Arbeiten nur der Hohlfaserbioreaktor (HFBR). In diesem Reaktor wird das Produkt allerdings im Kontakt mit den Zellen angereichert, ehe es den Reaktor verlässt und hat damit relativ langen Kontakt zu Zellen und destruktiven Enzymen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung und Erprobung eines membranbasierten Bioreaktors (MBB) beschrieben, der als Einwegartikel ausgelegt ist, Perfusionsprozesse erlaubt, bei denen das Produkt zellfrei und zügig aus dem System abgezogen wird, skalierbar von der Prozessentwicklung bis zur Marktbedienung ist und als geschlossenes, portables System vorliegt.

Als erster Schritt wurde ein Design- und Funktionsmodell des Bioreaktors erarbeitet. Die Abtrennung des Produktes von der Zellsuspension sollte membranbasiert erfolgen. Es wurde eine Hohlfasermembran gewählt, die produktgängig ist, Zellen aber zurückhält und die mechanisch ausreichend stabil ist, um in einen Bioreaktor eingebaut zu werden.

Der Reaktor wurde so konzipiert, dass alle zell-, produkt- und medienberührenden Komponenten als Einwegartikel ausgelegt sind und alle technischen Komponenten zum Betrieb des Reaktors als stationäre Einheit. Der Einwegpart wurde als zylindrisches Modul entwickelt, in dem die Hohlfasern horizontal fixiert sind. Das Innere der Fasermembranen bildet den Kulturraum, in dem die Zellen kultiviert werden. Der Zylinderraum außerhalb der Membranen bildet den Versorgungsraum. Dieser ist zu 50 % mit Medium gefüllt

und wird sowohl mit Medium als auch mit Gas (Luft) perfundiert. Das Modul rotiert um seine Längsachse, so dass sich die zellgefüllten Membranfasern abwechselnd in Medium und Gas befinden. Die Zellen werden versorgt, indem Nährstoffe und Sauerstoff in den Kulturraum diffundieren, das Produkt gelangt auf dem umgekehrten Weg in den Mediumperfusionsstrom.

Die stationäre Steuereinheit umfasst technische Lösungen zur Rotation des Moduls, zur Perfusion von Medium und Gas und zur Temperierung des Systems.

Als zweiter Schritt folgte eine Konzeptprüfung in zwei Maßstäben, einem Modul mit zwölf Fasermembranen (12HF-Modul) und einem Labormaßstab. In den 12HF-Modulen wurde nachgewiesen, dass die Membran auch über einen 60-Tage Prozess nicht durch Proteine oder Zellschrott verblockt, sondern ihren Permeabilitätswert beibehält.

Im Labormaßstab wurden technische Probleme erkannt und die biologische Funktionalität grundsätzlich bewiesen. Es gelang, Zellen über zehn bis 29 Tage zu kultivieren. Während dieser Zeit erfolgte eine kontinuierliche, zellfreie Produkternte. Auf der technischen Seite wurde vor allem der Gasaustrag aus dem rotierenden, halb mit Medium gefüllten Modul als Herausforderung für weitere Module angesehen. Als Lösung wurde ein zentraler Ausgangsport für Medium und Gas vorgesehen. Dieser würde gleichzeitig die Mediumfüllhöhe von 50 % mechanisch sicherstellen.

Im nächsten Schritt wurde ein Prototyp für ein Reaktorsystem im Prozessentwicklungsmaßstab mit acht miniaturisierten, parallel betriebenen Modulen entwickelt und getestet. In einem ersten Testlauf wurden die Handhabung der Module, v.a. während des Inokulums, sowie eine Strategie zur Prozessüberwachung und Analytik erarbeitet. In mehreren Testläufen mit der Zelllinie AGE1.hn wurden Zellen in einem Modul jeweils 36 Tage bzw. 60 Tage kultiviert. Diese positiven Ergebnisse konnten nicht reproduziert werden. Es stand die Frage, ob die Ursache der mangelnden Reproduzierbarkeit in der Zelllinie oder im Reaktor zu suchen ist. Daher folgte eine zweite Testphase mit einer hochzelldichtee tablierten CHO-Zelle. Hierbei wurden in fast allen Prozessen

steigende und sich stabilisierende Verläufe des Glukoseverbrauches beobachtet. Eine Zunahme der Vitalzellzahl wurde in Einzelfällen in geringem Maße erreicht. Der pH-Wert erwies sich als kritischer Parameter. Im KR lagen sehr niedrige pH-Werte vor und die pH-Differenzen zwischen KR und VR waren sehr groß.

Im letzten Schritt wurde ein Prototyp des Pilotmaßstabes entworfen und erprobt. Die in den ersten Schritten erkannten technischen Probleme wurden hierbei berücksichtigt. Für die Inokulation wurde eine neue Strategie getestet, da sich die im kleinen Maßstab bewährte nicht direkt übertragen ließ.

Es wurde ein Prozess mit der CHO-Zelle gefahren. Die Zellen konnten 43 Tage erfolgreich kultiviert werden. Während dieser Zeit wurde kontinuierlich und zellfrei Produkt geerntet. Damit konnte die prinzipielle Funktionalität des Reaktors auch im Pilotmaßstab nachgewiesen werden. Die Überwachung von DO und pH war punktuell möglich. Es erwies sich, dass der pH-Wert im Kulturraum sehr niedrig war, was die Ergebnisse aus dem Prozessentwicklungsmaßstab bestätigte. Eine Untersuchung der Membranfasern nach Abschluss des Prozesses ergab, dass die Zellen im KR inhomogen verteilt waren und dass der KR nur zu einem Teil mit Zellen gefüllt war.

Ein Vergleich mit dem konventionellen HFBR zeigte, dass im MBB ein geringerer Glukoseverbrauch vorlag. Die DO-Werte in beiden Reaktoren waren vergleichbar, der pH-Wert im MBB niedriger als im HFBR. Berücksichtigte man, dass der MBB als Prototyp getestet wurde, während der HFBR als marktreifes Gerät vorlag und dass der KR des MBB aufgrund der inhomogenen Zellverteilung nur teilweise mit Zellen gefüllt war, so konnte angenommen werden, dass ein optimierter MBB mindestens das gleiche Leistungspotenzial aufweisen würde, wie der HFBR.

Die Diskussion der Ergebnisse und die Betrachtung des heutigen Reaktormarktes ergaben, dass eine Weiterentwicklung des MBB aus technischer Sicht möglich und interessant wäre, aus ökonomischer Sicht aber nicht lohnenswert. Der wesentliche Schlüssel für die Weiterentwicklung des Bioreaktors ist die Etablierung einer online pH- und Sauerstoffmesstechnik. Favorisiert wird die

optische Messtechnik, weil diese gut in das Einwegsystem integrierbar ist. Im Rahmen der Arbeit war es gelungen, ein neuartiges Reaktorkonzept in Prototypen umzusetzen sowie Daten zu erheben und Bewertungskriterien zu erarbeiten, anhand derer es möglich war, eine Aussage zu treffen, ob eine Weiterführung der MBB-Entwicklung möglich und sinnvoll wäre.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### 9.1 Abkürzungen

ASX	AcuSyst Xcell (ein HFBR)
CHO	Chinese Hamster Ovary Cells
DO	Gelöstsauerstoff (dissolved oxygen)
EHF	Einzelhohlfaser
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelbehörde)
FDA	Food and Drug Administration
Glc	Glukose
GMP	Good Manufacturing Practice (Gute Herstellungspraxis)
gZZ	Gesamtzellzahl
HF	Hohlfaser
HFBR	Hohlfaserbioreaktor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Human Serum Albumin
KR	Kulturraum
MBB	Membranbasierter Bioreaktor
PC	Polycarbonat
PEE	Prozessentwicklungseinheit
PEM	Prozessentwicklungsmodul
PBS	Phosphat Buffered Solution
PT	Prototyp
SUB	Single Use Bioreactor
VG	Versorgungsgüte
VR	Versorgungsraum
vZZ	Vitalzellzahl

## 9.2 Formelzeichen

Symbol	Bezeichnung	Dimension
A	Fläche	$m^2$
c	Konzentration	$g/l, mg/l$
c*	Sättigungskonzentration, Ausgangskonzentration	$g/l$
De	Diffusionskoeffizient	$cm^2/h$
$d_i$	Innendurchmesser	$\mu m$
$\Delta c$	Konzentrationsdifferenz	$g/l$
$\Delta x$	Diffusionsweg, Wandstärke	$mm, \mu m$
$\epsilon$	Porosität	
l	Länge	$cm, mm$
n	Stoffstrom	$g/h$
q	Verbrauchs- o. Produktivitätsrate	$g/(l \cdot d), mg/(l \cdot d)$
t	Zeit	$d$
V	Volumen	$ml, l$
$\dot{V}$	Mediumstrom, Perfusionsrate	$l/d$
$V_{KR}$	Kulturraumvolumen	$ml, l$
X	Zellzahl	$1/ml$

## 10 Literaturverzeichnis

Ainsworth, S. (2005): Biopharmaceuticals patent expirations are beckoning generic drug companies, but numerous hurdles remain to a profitable business. *Biopharmaceuticals*, 83 (23): 21-29.

Barnoon, B.I., Bader, B. (2008): Lifecycle cost analysis for single-use systems. [www.BioPharmInternational.com](http://www.BioPharmInternational.com), Nov.

Becht, R. (2009): Disposable bioreactors - Maturation into pharmaceutical glycoprotein manufacturing. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 115: 1-31.

Burrill, S. (2006): Life Sciences: a changing prescription. Präsentation auf der ABLE Conference India, 17.11.2006.

BusinessInsight (2008): Beyond blockbuster drug. *Healthcare Management Report* (Auszüge).

Chu, L., Robinson, D.K. (2001): Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 180-187.

Ciesla, J. (2003): Auswahl eines Zellseparationssystems für eine kontinuierliche Fermentation von tierischen Zellen im Produktionsmaßstab. Diplomarbeit TFH Berlin.

Cruz, H.J., Conradt, H.S., Dunker, R., Peixoto, C.M., Cunha, A.E., Thomaz, M., Burger, C., Dias, E.M., Clemente, J., Moreira, J.L., Rieke, E., Carrondo, M.J.E. (2002): Process development of a recombinant antibody/Interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. *Journal of Biotechnology*, 96: 169-183.

Dalm, M., Cuijten, S.M.R., van Grunsven, W.M.J., Tramper, J., Martens, D.E. (2004): Effect on feed and bleed rate of hybridoma cells in an acoustic perfusion bioreactor: Part 1. Cell density, viability, and cell-cycle distribution. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 547-557.

Dalm, M.C.F., van Grunsven, W.M.J., Tramper, J., Martens, D.E. (2007): Fed batch or perfusion process - What determines choice? aus „Acoustic perfusion processes for hybridoma cultures“. Dissertation Universität Wageningen.

D'Avino, A., Zijlstra, G., Douwenga, R., Nieboer, M. (2009): The XDR Process: Scale-up of an extremely intensified process for PER.C6® and CHO Cells in Single Use Bioreactors. Poster zum ESACT, 2009, Dublin.

DePalma, A. (2005): Personalized medicine: next big hope or next big hype? [www.Pharmamanufacturing.com](http://www.Pharmamanufacturing.com).

Dowd, J.E., Weber, I., Rodriguez, B., Piret, J.M., Kwok, K.E. (1999): Predictive control of hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 484-492.

Eibl, R., Werner, S., Eibl, D. (2009): Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 115: 55-87.

Farid, S.S., Washbrook, J., Titchener-Hooker, N.J. (2005): Decision-support tool for assessing biomanufacturing strategies under uncertainty: stainless steel versus disposable equipment for clinical trial material preparation. *Biotechnology Progress*, 21: 486-497.

Ferrara, J. (2007): Personalized medicine: challenging pharmaceutical and diagnostic company business models. *McGill Journal of Medicine*, 10: 59-61.

Förster, S. (2008): Entwicklung und Etablierung eine Methode zur Charakterisierung des Zellzustandes im MBB nach Funktionstestung und Überprüfung des Reaktorprototypen. Interdisziplinäre Projektarbeit TU Dresden.

Fox, S. ((2005): Disposable bioprocessing the impact of disposable bioreactors on the CMO industry. [www.ContractPharma.com](http://www.ContractPharma.com), June: 62-74.

Galliher, P.M. (2007): Case study: scale-up to a 1.000L perfusion in a disposable stirred tank bioreactor. Präsentation auf der Bioproduction, 30.10.07, Berlin.

Gloeckner, H., Jonuleit, T., Lemke, H.D. (2000): Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. *Journal of Immunological Methods*, 252: 131-138.

Gramer, M.J., Britton, T.L. (2000a): Selection and isolation of cells for optimal growth in hollow fiber bioreactors. *Hybridoma*, 19: 407-412.

Gramer, M.J., Poeschl, D.M. ((2000b): Comparison of cell growth in T-flasks, in micro hollow fiber bioreactors, and in an industrial hollow fiber bioreactor system. *Cytotechnology*, 34: 111-119.

Gramer, M.J., Poeschl, D.M. (1998): Screening tool for hollow fiber bioreactor process development. *Biotechnology Progress*, 14: 203-209.

Gramer, M.J., Poeschl, D.M., Conoy, M.J., Hammer, B.E. (1999): Effect of harvesting protocol on performance of a hollow fiber bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65: 334-340.

Herrmann, S., Egli, S., Rohner, M., Unutmaz, C., Winkelhorst, M., Herrmann, A. (2009): Transfer of a fed-batch process for the production of a fusion protein from spinner flask to 1000L Wave bioreactor. Poster zum ESACT, 2009,

Dublin.

Higgins, P.H. (2004): Current prospect for a generic biopharmaceutical industry. The Metropolitan Corporate Counsel, Dec: 21.

Himmelfarb, P., Thayer, P.S., Martin, H.E. (1969): Spin filter culture: the propagation of mammalian cells in suspension. *Science*, 164: 555-557.

Hirschel, M. (2007): Vendor notes: the biovest AutovaxID: enabling the promise of personalized medicine. [www.BioPharmInternational.com](http://www.BioPharmInternational.com), July.

Jain, E., Kumar, A. (2008): Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnology Advances*, 26: 46-72.

Johnson, M., Lanthier, S., Massie, B., Lefebvre, G., Kamen, A.A. (1996): Use of the CentriTech lab centrifuge for perfusion culture of hybridoma cells in protein-free medium. *Biotechnology Progress*, 12: 855-864.

Kadouri, A., Spier, R.E. (1997): Some myths and messages concerning the batch and continuous culture of animal cells. *Cytotechnology*, 24: 89-98.

Kessler, N., Thomas, G., Gerentes, L., Delfosse, G., Aymard, M. (1997): Hybridoma growth in a new generation hollow fiber bioreactor: antibody productivity and consistency. *Cytotechnology*, 24: 109-119.

Kim, B.J., Chang, H.N., Oh, D.J. (2007): Application of a cell-once-trough perfusion strategy for production of recombinant antibody from rCHO cells in a Centritech Lab II centrifuge system. *Biotechnology Progress*, 23: 1186-1197.

Kim, B.J., Oh, D.J., Chang, H.N. (2008): Limited Use of Centritech Lab II Centrifuge in Perfusion Culture of rCHO Cells for the Production of Recombinant Antibody.

Kompala, D.S., Ozturk, S.S. (2006): Optimization of High Cell Density Perfusion Bioreactors. in Ozturk/ Hu, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, Taylor & Francis Group, S. 387ff.

Lamers, C.H.J., Gratama, J.W., Luider-Vrieling, B., Bolhuis, R.L.H., Bast, E.J.E.G. (1999): Large-scale production of natural cytokines during activation and expansion of human T lymphocytes in hollow fiber bioreactor cultures. *Journal of Immunotherapy*, 22: 299-307.

Langer, E.S., Price, B.J. (2007): Disposables: biopharmaceutical disposables as a disruptive future technology. [www.BioPharm International.com](http://www.BioPharm International.com), June.

Langhammer, S. (2002): Charakterisierung eines neuen Versorgungssystems für Hochzell-dichte-Bioreaktoren. Interdisziplinäre Projektarbeit TU Dresden.

Langhammer, S., Riedel, M., Bushnaq-Josting, H., Brecht, R., Pörtner, R., Marx, U. (2005a): Evaluation of a scalable disposable bioreactor system for

manufacturing of mammalian cell based biopharmaceuticals. Cell Technology for Cell Products: Proceedings of the 19th ESACT Meeting. Springer 2007: 623-628.

Langhammer, S., Ammer, R., Woischnig, H., Sacharjat, M., Kasyan, A., Pörtner, R., Marx, U. (2005b): Proof of concept for a novel disposable scalable glycoprotein manufacturing technology. Poster auf der BioPerspective 2005.

Langhammer, S., Berger, M., Blanchard, V., Kaup, M., Sandig, V., Koch, S., Brecht, R., Suchich, G., Tonevitzky, S., Pörtner, R., Marx, U. (2007a): Human A1AT production - propagating a newly developed human cell line in a novel disposable perfusion bioreactor. Cells and Culture: Proceedings of the 20th ESACT Meeting. Springer 2010: 743-748.

Langhammer, S., Wellmann, A., Ammer, R., Linz, T., Berger, M., Pörtner, R., Marx, U. (2007b): Characterisation of Diffusion and Flow Relations in the Novel Membrane Based Perfusion Bioreactor. Cells and Culture: Proceedings of the 20th ESACT Meeting. Springer 2010: 749-755.

Ledford, H. (2007): The same but different. Nature, 449: 274-276.

Lim, A.C., Washbrook, J., Titchener-Hooker, N.J., Farid, S.S. (2006): A computer-aided approach to compare the production economics of fed-batch and perfusion culture under uncertainty. Biotechnology and Bioengineering, 93: 687-697.

Lüllau, E., Kanttinen, A., Hassel, J., Berg, M., Haag-Alvarsson, A., Cederbrant, K., Geenberg, B., Fenge, C., Schweikart, F. (2003): Comparison of batch and perfusion culture in combination with pilot-scale expanded bed purification for the production of soluble recombinant beta-secretase. Biotechnology Progress, 19: 37-44.

Mercille, S., Johnson, M., Lanthier, S., Kamen, A.A., Massie, B. (2000): Understanding factors that limit the productivity of suspension based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. Biotechnology and Bioengineering, 67: 435-449.

Monge, M. (2007): A project management guide for single-use systems selection and implementation. Präsentation aus der BioProduction 2007, Berlin 30th October.

Nachtmann F. (2008): Sandoz - Pioneering global development of biosimilars. Präsentation auf der BIO Super Session, June 17, 2008.

Niloff, M. (2008): Scale-up to 1000L perfusion cell culture in a disposable stirred-tank bioreactor. Applikation Brief Xcelleres, [www.xcellerex.com](http://www.xcellerex.com).

Ozturk, S.S. (1996): Engineering challenges in high density cell culture. Cytotechnology, 22: 3-16.

Ozturk, S.S. (2007): Comparison of Product Quality: Disposable and Stainless Steel Bioreactor. Präsentation auf der Bioproduction, 30.10.07, Berlin.

- Parsons, H. (2008): Personalized medicine: the future is (almost) now. [www.Pharmamanufacturing.com](http://www.Pharmamanufacturing.com).
- Patankar, D., Oolman, T. (1990): Wall-growth hollow-fiber reactor for tissue culture: I. preliminary experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, 36: 97-103.
- Piret, J.M., Cooney, C.L. (1991): Model of oxygen transport limitations in hollow fiber bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 37: 80-92.
- Rao, G., Moreira, A., Borson, K. (2009): Disposable bioprocessing: the future has arrived. *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (2): 348-356.
- Ravise, A., Cameau, E., De Abreu, G., Pralong, A. (2009): Hybrid and Disposable Facilities for Manufacturing of Biopharmaceuticals: Pros and Cons. in: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 115: 185-219.
- Rettberg, F. (2010): Auf Spurensuche. *Die ZEIT*, 38: 87.
- Ryll, T., Dutina, G., Reyes, A., Gunson, J., Kummel, L., Etcheverry, T. (2000): Performance of small-scale CHO perfusion cultures using an acoustic cell filtration device for cell retention: characterization of separation efficiency and impact of perfusion on product quality. *Biotechnology and Bioengineering*, 69: 440-449.
- Sinclair, A. (2008): Disposable bioreactors: the next generation. [www.BioPharmInternational.com](http://www.BioPharmInternational.com), April.
- Singh, V. (1999): Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 30: 149-158.
- Sullivan, J.P., Gordon, J.E., Palmer, A.F. (2005): Simulation of oxygen carrier mediated oxygen transport to C3A hepatoma cells housed within a hollow fiber bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 93:306-317.
- Suske, W. (2005): Einwegsysteme verhelfen zu anspruchsvollen Verfahrenslösungen (Umfrage). *Chemische Rundschau*, 8: 27-34.
- Trampller, F., Sonderhoff, S.A., Pui, P.W.S., Kilburn, D.G., Piret, J.M. (1994): Acoustic cell filter for high-density perfusion culture of hybridoma cells. *Nature Biotechnology*, 12: 281-284.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schiebl, K., Lattenmeyer, C., Kurnert, R., Vorauer-Uhl, K., Weik, R., Borth, N., Kättinger, H., Müller, D. (2006): Process parameter shifting: part I. effect of DO, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (6): 1033-1044.
- Tsao, Y.S., Cardoso, A.G., Condon, R.G.G., Voloch, M., Lio, P., Lagos, J.C., Kearns, B.G., Liu, Z. (2005): Monitoring Chinese hamster ovary cell culture

by the analysis of glucose and lactate metabolism. *Journal of Biotechnology*, 118: 316-327.

Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P.A., Baer, G., Kadouri, A. (2003): Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 751-765.

Walsh, G. (2008): Bioharmaceuticals: approval trends in 2007. [www.BioPharm International.com](http://www.BioPharmInternational.com), 21: 52-65.

Welmann, A. (2007): Charakterisierung des Wachstums- und Produktivitätsverhaltens verschiedener Zelllinien in einem membranbasierten Bioreaktor. Diplomarbeit TFH Berlin.

Yabannavar, V.M., Singh, V., Connelly, N.V. (1994): Scaleup of spinfilter perfusion bioreactor for mammalian cell retention. *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 159-164.

Zeng, A.P., Bi, J.S. (2006): Cell Culture Kinetics and Modeling. in Ozturk/Hu, *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, Taylor & Francis Group, S. 299ff.

Zijlstra, G., D'Avino, A., Swaving, J., Sathasivam, S., Chon, J., Nieboer, M. (2009): Scale-up and tech transfer to cGMP of a High Yielding (>7g/L) Fed-batch Process for PER.C6 Cells on Chemically Defined Medium. Poster zum ESACT, 2009, Dublin.

### Internetquellen:

EMEA:	<a href="http://www.emea.europa.eu/htms/human/epar/a.htm">www.emea.europa.eu/htms/human/epar/a.htm</a>
Universität Bremen:	<a href="http://www.geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html">www.geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html</a>
Wave-Story:	<a href="http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E1614193D543876C1257628001D5AB9/\$file/28950270AA.pdf">http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/E1614193D543876C1257628001D5AB9/\$file/28950270AA.pdf</a>

.

.