

Evaluation modellgestützter *Design of Experiments*-Methoden zur Auslegung biopharmazeutischer Prozesse

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Kim Beatrice Kuchemüller, M.Sc.
aus
Soltau (Deutschland)

2022

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael M. Morlock

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Juni 2022

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.4655>

Der Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden.

Abstract

The growing demand for biopharmaceuticals and the need to reduce manufacturing costs are increasing the pressure to develop productive and efficient bioprocesses. Conventional Design of Experiments (DoE) methods are mostly used in process development and optimization. Being an exploratory approach, DoE requires extensive expert knowledge of the investigated factors and their limits, and often results in several time-consuming and costly series of experiments. In contrast to conventional DoE, in model-assisted DoE (mDoE) the recommended experiments are simulated using mathematical process models to evaluate the experimental space. This enables a well-defined experimental space, since changes can be made without additional experimental effort. Recommended experiments are thus implemented in a significantly reduced number. In addition to the significant reduction in the number of experiments, the use of mathematical process models is now seen as a sustainable part of a knowledge-driven bioprocess development strategy.

However, mDoE methods have so far only been applied in the biopharmaceutical field for process design in the presence of broad available data. These processes are classified to late-stage process development, although it is currently unclear to what extent mDoE concepts can be applied to the early-stage of process development. Nevertheless, especially in early-stage processes there is a need for suitable methods for knowledge-driven process design. Therefore, the basic hypothesis of this dissertation is that mDoE methods are applicable to these very processes. For this purpose, early-stage processes for different cell lines were investigated and evaluated.

Based on a broad data set for CHO DP12 cells, the components for the successful implementation of an mDoE were defined and integrated into an mDoE workflow. For this purpose, experimental designs were programmed and implemented in an mDoE toolbox. Using adherent-growing cells (mesenchymal stem cells, hMSC-TERT and mouse fibroblasts, L929), the utility of the mDoE workflow was investigated using different developmental stages. The cell behavior of adherent-growing cells was model-assisted as well as uncertainty-based analyzed, and a mathematical process model was established. Thereby, the cultivation conditions of L929 cells and hMSC-TERT were successfully adapted for cultivation in shake flasks. Thus, cultivations as well as bead-to-bead transfer in shake flasks were successfully implemented for the first time. For L929 cells, an 8-fold increase in cell yield was achieved by reducing the initial microcarrier concentration. When adjusting the bead-to-bead transfer of hMSC-TERTs, a 6.3-fold increase in cell concentration was achieved. Finally, correlations were detected at different scales, allowing scale transfer. Overall, the mDoE workflow was successfully applied to the expansion of various cell lines, analyzing cell behavior, increasing cell yields, and optimizing boundary conditions for mDoE-methods. The knowledge-based application of mDoE methods thus offers also in early-stage processes the possibility to design expansion processes and produce clinically relevant cell numbers.

Der Text steht, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass er vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o. g. Lizenz genannt werden.

Kurzfassung

Die steigende Nachfrage nach Biopharmazeutika und die Notwendigkeit, die Herstellungskosten zu reduzieren, erhöhen den Druck, produktive und effiziente Bioprozesse zu entwickeln. Bei der Prozessentwicklung und -optimierung werden meist konventionelle *Design of Experiments*- (DoE) Methoden verwendet. Da es sich hierbei um einen explorativen Ansatz handelt, erfordert DoE umfangreiches Expertenwissen über die untersuchten Faktoren und deren Grenzwerte, und führt oft zu mehreren zeit- und kostenintensiven Versuchsreihen. Im Gegensatz zum konventionellen DoE, werden im modellgestützten DoE (mDoE) die empfohlenen Experimente mit Hilfe von mathematischen Prozessmodellen simuliert und zur Bewertung des Versuchsraumes herangezogen. Dadurch wird die Erstellung eines wohldefinierten Versuchsraums ermöglicht, da Änderungen ohne experimentellen Mehraufwand durchgeführt werden können. Empfohlene Experimente werden so in deutlich reduzierter Anzahl umgesetzt. Neben der signifikanten Reduktion der Anzahl von Experimenten wird der Einsatz von mathematischen Prozessmodellen heute als nachhaltiger Teil einer wissensgetriebenen Bioprozessentwicklungsstrategie gesehen.

mDoE-Methoden werden allerdings im biopharmazeutischen Bereich bisher nur für die Prozessauslegung bei breiter vorliegender Datenlage angewendet. Diese Prozesse sind der Late-Stage-Prozessentwicklung zuzuordnen, wobei aktuell ungeklärt ist, inwiefern mDoE-Konzepte im Early-Stage-Bereich anwendbar sind. Jedoch ist gerade in der Early-Stage-Prozessentwicklung der Bedarf nach geeigneten Methoden zur wissensgetriebenen Prozessauslegung gegeben. Daher ist die zugrundeliegende These dieser Dissertation, dass die mDoE-Methoden für eben diese Prozesse im Early-Stage-Bereich anwendbar sind. Hierzu wurden Early-Stage-Prozesse für verschiedene Zelllinien untersucht und evaluiert.

Anhand einer breiten Datenlage für CHO DP12-Zellen wurden die Bausteine zur erfolgreichen Umsetzung eines mDoE definiert und in einen mDoE-Workflow integriert. Mittels adhärent-wachsender Zellen (mesenchymale Stammzellen (hMSC-TERT) und Mausfibroblasten (L929-Zellen)) wurde der Nutzen des mDoE-Workflows anhand verschiedener Entwicklungsstadien untersucht. Es wurde das Zellverhalten der adhärent-wachsenden Zellen modellgestützt sowie unsicherheitsbasiert analysiert und ein mathematisches Prozessmodell etabliert. Durch Anpassen der Kultivierungsbedingungen wurden erfolgreich Kultivierungen im Schüttelkolben sowie erstmals ein *Bead-to-Bead*-Transfer im Schüttelkolben umgesetzt. Für L929-Zellen wurde durch eine Reduzierung der initialen *Microcarrier*-Konzentration eine 8-fache Steigerung der Zellausbeute erzielt. Beim Anpassen des *Bead-to-Bead*-Transfers der hMSC-TERTs wurde eine 6,3-fache Steigerung der Zellkonzentration erreicht. Schlussendlich wurden Zusammenhänge in unterschiedlichen Maßstäben detektiert, sodass eine Maßstabsübertragung möglich ist. Insgesamt wurde der mDoE-Workflow erfolgreich für die Expansion verschiedener Zelllinien angewandt, wobei das Zellverhalten analysiert, die Zellausbeuten erhöht und die Randbedingungen der mDoE-Methoden optimiert wurden. Die wissensbasierte Anwendung von mDoE-Methoden bietet somit die Möglichkeit ebenfalls in der Early-Stage-Entwicklung Expansionsprozesse auszulegen und klinisch relevante Zellzahlen zu produzieren.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungen, Konstanten und Symbole	XV
1 Einleitung und Motivation	1
2 Zielsetzung und Strategie	5
3 Stand des Wissens	7
3.1 Zelllinien in der Biopharmazeutikaproduktion	7
3.1.1 CHO-Zelllinien und ihre Position in der Biopharmazeutikaherstellung . . .	7
3.1.2 Verwendungsgebiete von Fibroblasten	8
3.1.3 Stammzellen, Immunzellen und ihr Einsatz in der Zelltherapie	8
3.2 Etablierte Kultivierungssysteme für die <i>in-vitro</i> Expansion	12
3.2.1 Besonderheiten der Expansion von adhären-wachsenden Zellen	13
3.2.2 Techniken zur Subkultivierung von adhären-wachsenden Zellen	13
3.2.3 Spezifische Eigenschaften von MCs in dynamischen Systemen	14
3.2.4 Prozessanforderungen an das Wachstumsmedium	15
3.3 <i>Design of Experiments</i> -Methoden	16
3.3.1 Screening-Designs	17
3.3.2 Optimierungsversuchspläne	19
3.3.3 Beispiele und Herausforderungen der konventionellen DoE	20
3.4 Modellgestützte <i>Design of Experiments</i> -Methoden	22
3.5 Mathematische Modellstrukturen	24
3.5.1 Metabolismus tierischer und humaner Zellen	26
4 Experimentelle Methoden	29
4.1 Zelllinien	29
4.2 Kultivierungsbedingungen und Prozessführung	29
4.2.1 Statische Vorkultivierung und Passagieren adhärenter Zellen	30
4.2.2 Gefäßsilikonisierung zur Zellkultivierung auf MCs	31
4.2.3 Vorbereitung der MCs	31
4.2.4 Methoden zur Zellernte	31

4.3	Kultivierungsprotokoll im Schüttelkolben	32
4.4	Kultivierungsprotokoll im Bioreaktor	33
4.5	Generelle Probenanalytik	34
4.5.1	Zellzählung	34
4.5.2	Viabilitätsmessung	35
4.5.3	Bestimmung der Verteilung der Zellen auf den Trägern	35
4.5.4	Analyse von Ammonium	35
4.5.5	Analyse von D-Glukose, L-Glutamin und L-Laktat	35
4.6	Differenzierung und Charakterisierung der hMSC-TERT	35
5	<i>In silico</i>-Methoden	37
5.1	Modellgestützte DoE-Software	37
5.1.1	Mathematische Modelle	38
5.1.2	Anpassen der Modellparameter als Basis der Unsicherheitsquantifizierung	40
5.1.3	Definition von Versuchsplänen	42
5.1.4	Darstellung des Erwünschtheitsmaßes zur computergestützten Evaluation	44
5.2	Sensitivitätsanalyse	45
6	Ergebnisse und Diskussion	47
6.1	Entwicklung eines mDoE-Workflows mittels CHO-DP12-Zellen	47
6.1.1	Erweiterung der mDoE-Toolbox	48
6.1.2	Bewertung des Einflusses des mathematischen Modells	50
6.1.3	Anwendungsbezogene Bewertung der Einflüsse auf die Parameteranpassung	50
6.1.4	Anwendungsbezogene Bewertung von Versuchsplänen	54
6.1.5	Evaluation verschiedener Randbedingungen	56
6.1.6	mDoE-Workflow	60
6.1.7	Diskussion zur Anwendung des mDoE bei CHO DP12-Zellen	62
6.2	Modellgestützte Auslegung eines L929-Kultivierungsprozesses	62
6.2.1	Anwendungsbezogene Bewertung der Zellzähl- und Erntemethoden	63
6.2.2	Systematisches MC-Screening in Bezug zur Wachstums- und Metaboliten- kinetik	66
6.2.3	Expansion mittels <i>Bead-to-Bead</i> -Transfer	68
6.2.4	Modellgestützte Analyse des Zellverhaltens	69
6.2.5	Mathematisches Modell zur Beschreibung adhärenenten Wachstums im Batch- Prozess	73
6.2.6	Modellgestützte Evaluation verschiedener Versuchspläne	78
6.2.7	Erweiterung des mathematischen Modells	80
6.2.8	Modellgestützter Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme	81

6.2.9	Anwendungsbezogene Beurteilung der mDoE-Methoden bei der modellgestützten Auslegung eines L929-Kultivierungsprozesses	82
6.3	Modellgestützte Prozessauslegung der hMSC-TERT	83
6.3.1	Systematisches MC-Screening in Bezug zur Wachstums- und Metabolitenkinetik	84
6.3.2	Differenzierung und Phänotypisierung	85
6.3.3	Modellgestützte Methoden zur Analyse des Zellverhaltens	86
6.3.4	Evaluation der modellgestützten Auslegung des Kultivierungsprozesses von hMSC-TERTs	97
7	Schlussfolgerung und Ausblick	99
7.1	Anwendungspotential der mDoE-Methoden	100
7.2	mDoE als Basis eines <i>Digital Twins</i>	101
	Literatur	104
	A Anhang	127
	Publikationsliste	XVII

Abbildungsverzeichnis

1.1	Gesamtzahlen der Produktzulassungen von Biopharmazeutika in Europa, unterteilt in Wirkstoffarten (Stand 31.12.2019). Die Daten wurden von [2, 3] übernommen.	1
2.1	Strategie und Zielsetzung der umgesetzten Studien dieser Thesis.	5
3.1	Differenzier- und Potenzierbarkeit der Stammzellen. Mit steigender Differenzierung vermindert sich die Potenz der Stammzellen - aus einigen entwickelt sich der Mensch (embryonale Stammzellen), andere bilden nur einzelne Organe und Gewebetypen aus (adulte Stammzellen).	9
3.2	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten (A), Adipozyten (B) und Chondrozyten (C). Die Differenzierung erfolgte in T-Flaschen (A, B) sowie konischen Zentrifugationsröhrchen (C) in Differenzierungsmedium. Eine Alizarinrot-Färbung verdeutlicht die Kalziumanreicherung der Osteoblasten (A), während bei den Adipozyten durch eine Ölrot-O-Färbung die Lipide gefärbt sind (B). Das Aggrecan der extrazellulären Matrix ist durch Alcianblau und die Zellkerne mit einer Kernechtrotfärbung angefärbt (C).	12
3.3	MC-Konzentrationen im Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis. Der obere und untere Whisker schließen einen Bereich von $1,3 - 22,5 \text{ cm}^2 \text{ ml}^{-1}$ ein, wobei der Median bei $8,5 \text{ cm}^2 \text{ ml}^{-1}$ liegt. Die Ergebnisse basieren auf verschiedenen Studienauswertungen [13, 63, 70, 74, 92, 100, 106–111].	14
3.4	Geometrische Darstellung von Screening- (A, B) und Optimierungsversuchsplänen (C - H) mit drei Faktoren (Faktor A, Faktor B und Faktor C). Die Punkte stellen die empfohlenen Experimente dar, wobei die grauen Punkte die Sternpunkte und die schwarzen Punkte die zentralen Punkte sind. Alle Versuchspläne werden auf zwei Ebenen (+ und -) untersucht.	18
3.5	Struktur des modellgestützten <i>Design of Experiments</i> -Konzepts [16, 19].	23
3.6	Klassifizierung von mathematischen Prozessmodellen in unstrukturiert, strukturiert, unsegregiert und segregiert. Modifiziert nach [160]	25
3.7	Metabolismus von tierischen und humanen Zellen. Die modifizierte und vereinfachte Grafik basiert auf [173].	27
4.1	Schematische Darstellung des Medorex Vario 1000.	33
5.1	Workflow der mDoE-Toolbox, basierend auf mathematischen Prozessmodellen und statistischen DoE-Methoden. Eine detaillierte Beschreibung der mDoE-Toolbox ist [19] zu entnehmen.	37

6.1	Schematische Darstellung des Konzepts zur Erstellung eines I-Optimalen Versuchsplans.	48
6.2	RSM-Grafiken eines I-Optimalen Versuchsplans, erstellt in DesignExpert (A) und mit der mDoE-Toolbox (B). Es wurden die Faktoren Zufütterungsrate (F_{rate}), der Startpunkt des Zustroms ($t_{Zustrom}$), die L-Glutaminkonzentration ($c_{F,Gln}$) im Zulauf und die D-Glukosekonzentration ($c_{F,Glc}$) im Zulauf untersucht. Als variabel sind die Zufütterungsrate und die L-Glutaminkonzentration im Zulauf in Abhängigkeit zur Erwünschtheit dargestellt, während die D-Glukosekonzentration im Zulauf auf 222 mmol l ⁻¹ und der Startpunkt des Zustroms auf 96 h fixiert wurden. Die Erwünschtheit ergibt sich aus der maximalen Zellzahl.	49
6.3	Funktionswerte der vier Gütefunktionale, dargestellt über die Iterationsanzahl. Die Berechnung erfolgt nach Kapitel 5.1.2. G1 (A) entspricht Gleichung 5.23, G2 (B) entspricht Gleichung 5.24, G3 (C) entspricht Gleichung 5.25 und G4 (D) entspricht Gleichung 5.25.	51
6.4	Vergleich der berechneten Bestimmtheitsmaße für X_v und des Gesamt-Bestimmtheitsmaßes aller Datenreihen in Abhängigkeit zur Iterationsanzahl der verschiedenen Gütefunktionale. Die Berechnung erfolgt nach Kapitel 5.1.2. G1 entspricht Gleichung 5.23, G2 entspricht Gleichung 5.24, G3 entspricht Gleichung 5.25 und G4 entspricht Gleichung 5.25.	51
6.5	Box-Plot des Bestimmtheitsmaßes für X_v für unterschiedliche Kombinationen an Datensätzen (Batch-Prozess). Es wurden n = 100 Durchläufe iteriert und der Median sowie erstes und drittes Quartil, Minimum und Maximum bestimmt. Die Ausreißer sind durch + gekennzeichnet.	52
6.6	Bestimmtheitsmaß für X_v für unterschiedliche Kombinationen an Datensätzen (Fed-Batch-Verfahren). Es wurden n = 100 Durchläufe iteriert und der Median sowie erstes und drittes Quartil, Minimum und Maximum bestimmt. Die Ausreißer sind durch + gekennzeichnet.	53
6.7	Konzept zur Auswahl eines Versuchsplans. Diese sind eingeteilt in die Faktoranzahl, dem Regressionsmodell, die Anzahl der Versuchsläufe und die Anzahl der Faktorstufen. Zusätzlich sind die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Versuchspläne dargestellt.	55
6.8	Vergleich gemittelter Evaluationskriterien (siehe Kapitel 5.1.3) für D-Optimale, I-Optimale und LHSD + D-Optimale Versuchspläne bei 2 Faktoren (Batch-Prozess). Bei 4 Faktoren (Fed-Batch-Prozess) wurden der CCD und BBD ergänzt. Durchführung von jeweils 10 Durchläufen.	57

6.9	Vergleich des D-Optimalen, I-Optimalen, LHSD + D-Optimalen Versuchsplans, des CCDs und des BBDs im Fed-Batch-Prozess (30 Faktorkombinationen bei maximaler erwünschter Antikörperkonzentration). Der Startzeitpunkt und die D-Glukosekonzentration des Zustroms wurden ebenfalls variiert, aber hier beispielhaft fixiert. Der Startzeitpunkt des Zustroms wird auf 96 h und die D-Glukosekonzentration im Zustrom auf 222 mmol l ⁻¹ festgelegt. Die Erwünschtheit wird in Abhängigkeit zur maximalen Zellzahl und Antikörperkonzentration sowie zur minimalen Ammoniumkonzentration berechnet.	58
6.10	Workflow zur Beschreibung des Ablaufes eines mDoE.	61
6.11	Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur Zellzählung. Dargestellt sind zwei enzymatische Methoden (A), eine Methode zur Zelllyse (B, IGEPAL) sowie eine photometrische Methode, die ohne eine Ablösung der Zellen von den MCs funktioniert (B, SG). Zusätzlich sind die gemittelten Substrat- und Metabolitenverläufe (C, D) zu den Zellverläufen dargestellt.	64
6.12	Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der MCs nach Anwendung der enzymatischen (C-Trypsin, D-Trypsin/EDTA) und IGEPAL-Methoden (B) mit einer unbehandelten Microcarrier-Probe (A). Die Proben wurden nach 72 h Kultivierung entnommen. Zusätzlich wurde eine weitere Methode zur Lysierung der Zellen untersucht. Dargestellt sind die behandelten MC mit Kristallviolett (E) und der daraus gewonnene Überstand (F).	65
6.13	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der verschiedenen MCs (A-Collagen Coated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Hillex, E-Plastic, F-PlasticPlus, G-StarPlus und H-Hillex mit Durchlicht) nach 72 h Kultivierung.	66
6.14	Darstellung der maximalen Zellzahlen der einzelnen MCs (1-Collagen Coated, 2-Cytodex 3, 3-FACT, 4-Plastic, 5-PlasticPlus, 6-StarPlus) in Bezug zum Volumen (A) sowie zur Wachstumsfläche (B). Der Gesamtkultivierungszeitraum betrug 264 h.	67
6.15	Darstellung der Aufnahme- und Produktionsraten während die exponentiellen Phase der einzelnen MCs (1-Collagen Coated, 2-Cytodex 3, 3-FACT, 4-Plastic, 5-PlasticPlus, 6-StarPlus) in Bezug zum Volumen (A) sowie zur Wachstumsfläche (B). Der Gesamtkultivierungszeitraum betrug 192 h.	68
6.16	<i>Bead-to-Bead</i> -Transfer bei der L929-Kultivierung. A zeigt die bewachsenen Cytodex 3 MCs vor dem <i>Bead-to-Bead</i> -Transfer, während B direkt nach dem <i>Bead-to-Bead</i> -Transfer und C 96 h später aufgenommen wurde.	69
6.17	Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben (○) im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve (-). Dargestellt sind die Zellzahlen, Substrate und Metaboliten gegen die Kultivierungszeit. Die MC-Konzentration betrug 20 g l ⁻¹ . Die Daten der Grafiken A, B und C entstammen Versuch 1, während D, E und F Versuch 2 zuzuordnen sind.	71

- 6.18 Dargestellt sind 4 von 15 Aminosäuren von Versuch 1, um zu verdeutlichen, dass diese keinen limitierenden Effekt auf das Zellwachstum haben. Die anderen Aminosäuren sind im Anhang dargestellt. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase. 72
- 6.19 Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve. Dargestellt sind die Zellzahlen gegen die Messzeit. Die MC-Konzentration betrug 10 g l^{-1} (A, B, C) und 5 g l^{-1} (D, E, F). Die Daten der Grafiken A, B und C entstammen Versuch 3, während D, E und F Versuch 6 zuzuordnen sind. 73
- 6.20 Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Zellzahlen sowie der zeitliche Verlauf der Substrat- und Metabolitenkonzentrationen (Glc, Gln, Lac, Amm). 77
- 6.21 Unsicherheitsquantifizierung der Lebendzellzahl für Versuch 3. Die Startwerte wurden um $\pm 15 \%$ 1000-fach variiert und aus den gestreuten Parametern mittels Monte-Carlo *Sampling* 20 Parametersätze gezogen. Diese wurden simuliert und die Mittelwerte (-) sowie 90/10 %-Quantile (-.-) bestimmt. Zusätzlich sind die Datenpunkte (■) in die Grafik eingetragen. 78
- 6.22 RSM-Grafiken der Erwünschtheitsfunktion (Berechnet über die maximale Zellzahl) für die Optimierung der D-Glukose- und L-Glutaminkonzentration eines Kultivierungsprozesses im Batch-Prozess. Es wurden ein D-Optimaler, I-Optimaler, LHSD+D-Optimaler Versuchsplan, BBD und CCD miteinander verglichen. Die blauen Kugeln sind Faktorkombinationen. Bei 3 Faktoren wurde bei den RSM-Grafiken einer der Faktoren bei seinem Optimum fixiert, der eingestellte Wert ist über der RSM-Grafik notiert. 79
- 6.23 RSM-Grafiken der Erwünschtheitsfunktion (Berechnet über die maximale Zellzahl) für die Optimierung der D-Glukose-, L-Glutamin- und MC-Konzentration eines Kultivierungsprozesses im Batch-Prozess. Es wurde ein D-Optimaler Versuchsplan mathematisch ausgewertet. Die blauen Kugeln sind Faktorkombinationen. Bei 3 Faktoren wurde bei den RSM-Grafiken einer der Faktoren bei seinem Optimum fixiert, der eingestellte Wert ist über der RSM-Grafik notiert. 80
- 6.24 Box-Plots der sensitiven Modellparameter. Die Modellparameter wurden 1000-fach variiert und der Einfluss auf die Zellzahl bestimmt. 82
- 6.25 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SoloHill und des Cytodex 3 MCs (A-CollagenCoated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Plastic, E-PlasticPlus, F-StarPlus). Es wurden hMSC-TERT der Passage P92 für 72 h kultiviert. 84
- 6.26 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SoloHill und des Cytodex 3 MCs (A-CollagenCoated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Plastic, E-PlasticPlus, F-StarPlus) vor (1) und nach (2) der Ernte. Es wurden hMSC-TERT der Passage P92 kultiviert. . . 85

6.27	Oberflächenmarker-Analyse von hMSC-TERT, die auf Cytodex 3-MCs im DMEM expandiert wurden. Positive Marker CD90, CD105 und CD73 (A-C) und der Negativcocktail mit CD45, CD34, CD14, CD19 (D) sowie HLA-DR (E). Isotyp-Kontrollen sind in grau dargestellt. Es wurden hMSC-TERT der Passage 90 charakterisiert.	86
6.28	Konzentrationsverläufe der hMSC-TERT-Kultivierung. Die hMSC-TERT wurden auf Cytodex 3-MCs in DMEM für 216 h kultiviert.	87
6.29	Lebend-Tod-Färbung der kultivierten hMSC-TERT auf den MC einen Tag nach dem <i>Bead-to-Bead</i> -Transfer und 3 Tage nach dem <i>Bead-to-Bead</i> -Transfer. Eine rote Färbung verdeutlicht die toten Zellen, während eine grüne Färbung die lebenden Zellen hervorhebt.	89
6.30	Entwicklung der Anhaftung der hMSC-TERT an die MCs. Dargestellt ist eine DAPI-Färbung von Start der Inokulations bis 24 h.	89
6.31	Lebend-Tod-Färbung von MC-Zell-Agglomeraten. Dargestellt sind Versuch 3 (A) und Versuch 4 (B) nach 18 und 14 Tagen Kultivierung. Angefärbt wurde mittels einer Calcein-PI-Färbung.	90
6.32	Experimentelle Verläufe des Zellwachstums sowie der Substrate und Metabolite der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zu den simulierten Verläufen. Simuliert wurden die 6 Schüttelkolbenexperimente.	93
6.33	RSM eines D-Optimalen Versuchsplans der Faktoren Startzeitpunkt des Zustroms t_{Zustrom} und MC-Konzentration im Zustrom $c_{F, MC}$ in Abhängigkeit zur Erwünschtheit. Die Erwünschtheit wird berechnet, indem die Zellzahl pro Fläche maximiert wurde.	95
6.34	Lebend-Tod-Färbung von MC-Zell-Agglomeraten. Dargestellt sind Versuch 5 vor dem (A) und nach dem <i>Bead-to-Bead</i> -Transfers (B). A wurde nach 168 h aufgenommen - b nach 216 h. Angefärbt wurde mittels einer Calcein-PI-Färbung.	96
6.35	Oberflächenmarker-Analyse von hMSC-TERT nach 408 h Kultivierung (Versuch 2), die auf Cytodex 3-MCs im DMEM expandiert wurden. Positive Marker CD90, CD105 und CD73 (A-C) und der Negativcocktail mit CD45, CD34, CD14, CD19 (D) sowie HLA-DR (E). Isotyp-Kontrollen sind in grau dargestellt.	97
7.1	Verwendung des mDoE-Konzepts im Bioprozessdesign und der -optimierung sowie der Entwicklung eines digitalen Zwilling aus einem mathematischen Modell	102
A.1	Verläufe der 15 ausgewerteten Aminosäuren von Versuch 1. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase.	127
A.2	Verläufe der 15 ausgewerteten Aminosäuren von Versuch 2. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase.	128

Tabellenverzeichnis

3.1	Vergleich verschiedener MC-Spezifikationen. Basierend auf [88, 100, 102, 104, 105]	14
3.2	Verschiedene Screening- und Optimierungsversuchspläne von CHO-Kultivierungsprozessen.	20
3.3	Inhibierende Werte der Ammonium- und L-Laktatkonzentration in Abhängigkeit zur Zelllinie. Basierend auf [106, 178, 180–183].	27
4.1	Spezifikationen der verwendeten nicht-porösen Microcarrier (Cytodex 3 und alle SoloHill MCs). Cytodex 3, Collagen Coated und FACT III enthalten tierische Komponenten, während die übrigen MCs xeno-frei sind.	30
4.2	Kultur- und Trypsinvolumina verschiedener planarer Kultivierungssysteme.	30
4.3	Angepasste Methoden zum Ablösen der Zellen von den MCs. Die Methoden basieren teilweise auf internem Wissen sowie [184, 185].	32
5.1	Modifiziertes mathematisches Modell für CHO DP12-Zellen im Batch-Prozess [16]	39
6.1	Faktorgrenzen bei 2 (Batch Prozess) beziehungsweise 4 Faktoren (Fed-Batch Prozess) zur Prozessauslegung der CHO DP12-Zellen. Als Zielgrößen wurde die maximale Zellzahl und Antikörperkonzentration sowie eine minimale Ammoniumkonzentration ausgewählt.	56
6.2	Empfohlene Prozessmaxima der verschiedenen Versuchspläne. Dargestellt ist die Erwünschtheit in Abhängigkeit zur Zufütterungsrate, zu der L-Glutamin- und D-Glukosekonzentration im Zustrom und zu dem Startzeitpunkt der Zufütterung für den D-Optimalen, I-Optimalen, LHSD + D-Optimalen Versuchsplan sowie den CCD und BBD.	59
6.3	Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells. Die Experimente wurden in 3-fach Bestimmung durchgeführt.	70
6.4	Vergleich spezifischer Kennwerte in Abhängigkeit zur MC-Konzentration.	71
6.5	Modifiziertes mathematisches Modell für L929-Zellen im Batch-Prozess	74
6.6	Implementierte Begrenzungen des mathematischen Prozessmodells zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.	75
6.7	Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die zugehörigen Startwerte und resultierenden Werte.	76
6.8	Implementierte Begrenzungen zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.	80

6.9	Sensitive Modellparameter. Die Sensitivitätsanalyse wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben umgesetzt. Die Signifikanz wurde bestimmt durch die direkte Verknüpfung mit der maximalen Zellzahl.	81
6.10	Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells.	88
6.11	Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells.	88
6.12	Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die zugehörigen Startwerte und resultierenden Werte.	91
6.13	Implementierte Begrenzungen zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.	92
6.14	Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die gemittelten Werte nach 1000 Iterationen bei 5 % Variation in den Startwerten.	94
6.15	Empfohlene Experimente zur Evaluation des mDoE und die resultierenden maximalen Zellzahlen.	95

Abkürzungen, Konstanten und Symbole

Abkürzungen

Ad-MSC	MSC aus dem Fettgewebe (engl. <i>Adipose-derived</i> MSC) [-]
Amm	Ammonium [-]
ATMP	Arzneimittel für neuartige Therapien (engl. <i>Advanced Therapy Medicinal Product</i>) [-]
ATP	Adenosintriphosphat [-]
BBD	Box-Behnken-Versuchsplan [-]
BM-MSC	MSC aus dem Knochenmark (engl. <i>Bone marrow-derived</i> MSC) [-]
CCD	Zentral zusammengesetzter Versuchsplan (engl. <i>Central Composite Design</i>) [-]
CD	Unterscheidungsgruppen (engl. <i>Cluster of Differentiation</i>) [-]
CHO	Immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamster (engl. <i>Chinese hamster ovary</i>) [-]
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle</i> Medium [-]
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol [-]
DoE	<i>Design of Experiments</i> [-]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure [-]
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. <i>European Medicines Agency</i>) [-]
FBS	Fetales Rinderserum (engl. <i>Fetal bovine serum</i>) [-]
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>) [-]
Glc	D-Glucose [-]
Gln	L-Glutamin [-]
GMP	Gute Herstellungspraxis (engl. <i>Good Manufacturing Practice</i>) [-]
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen (engl. <i>Human mesenchymal stem cells</i>) [-]
hMSC-TERT	Humane immortalisierte MSC (engl. <i>Human immortalized</i> MSC) [-]
hTERT	Humane Telomerase [-]
ISCT	<i>International Society for Cell & Gene Therapy</i> [-]
Lac	L-Lactat [-]
LHSD	Lateinischer Hypercube-Stichproben Versuchsplan (engl. <i>Latin Hypercube Sample Design</i>) [-]
mAb	Monoklonaler Antikörper [-]
mBDoE	Modellbasiertes DoE [-]
MC	Mikroträger (engl. <i>Microcarrier</i>) [-]

mDoE	Modellgestütztes DoE [-]
MSC	Mesenchymale Stammzelle (engl. <i>Mesenchymal stem cells</i>) [-]
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid [-]
OFAT	Ein-Faktor-Nach-Dem-Anderen (engl. <i>One-Factor-at-a-Time</i>) [-]
PD	Populationsverdopplungen [-]
PS	Polystyrol [-]
PI	Propidiumiodid [-]
QbD	<i>Quality-by-Design</i> [-]
RSM	Antwortoberflächenmethode (engl. <i>Response-Surface-Method</i>) [-]
SG	SYBR Green I [-]
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>Stirred tank reactor</i>) [-]
T-Flasche	Gewebe-Flasche (engl. <i>Tissue-Flasche</i>) [-]
TCA-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus [-]
THF-Zyklus	Tetrahydrofolsäure-Zyklus [-]
TMA	Trimethylammonium [-]
UCB-MSC	MSC aus dem Nabelschnurblut[-]
VF	Vermehrungsfaktor [-]
VPA	Valproinsäure [-]

Nomenklatur

α	Antikörperproduktionskonstante [$\text{mg Zelle}^{-1} \text{h}^{-1}$]
β_i	Unbekannte Koeffizienten i [-]
$\Delta_{X_{v,\max}}$	Relative Breite X_v [%]
$\Delta_{\Theta(k)}$	Relative Breite $\Theta(k)$ [%]
ϵ	Zufälliger Fehler [-]
$\Theta(k)$	Parametervariation [-]
μ_d	Spezifische Absterberate [h^{-1}]
$\mu_{d,\max}$	Maximale spezifische Absterberate [h^{-1}]
$\mu_{d,\min}$	Minimale spezifische Absterberate [h^{-1}]
μ	Spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_{\max}	Maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
$\hat{\sigma}_{\max}^2$	Maximum der relativen Vorhersagevarianz [-]
c_i	Konzentration der Komponente i [mmol l^{-1}]
$\frac{c_i}{dt}$	Konzentrationsveränderung der Komponente i [$\text{mmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$]
d_i	Erwünschtheitsfunktion i [-]
D	Gesamterwünschtheitsfunktion [-]
F_{rate}	Zufütterungsrate [l d^{-1}]

i	Index [-]
J	Gütefunktional [-]
k	Index [-]
K_{Lys}	Zelllysekonstante [h^{-1}]
$K_{S,i}$	Monod-kinetische Konstante der Komponente i [$mmol\ l^{-1}$]
L_i	Untere akzeptable Zielgröße i [-]
n	Faktor [-]
$N_{j,S}$	Suspensionskriterium [rpm]
q_i	Aufnahme-/Produktionsrate der Komponente i [$mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$]
$q_{Lac,up}$	Aufnahmerate von L-Laktat [$mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$]
$q_{Lac,up,max}$	Maximale Aufnahmerate von L-Laktat [$mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$]
R^2	Bestimmtheitsmaß [-]
r_i	Zielgröße i [-]

1 Einleitung und Motivation

Biopharmazeutika werden zur innovativen und effektiven Therapie von Krankheiten eingesetzt, wobei die Nachfrage in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen ist [1, 2]. Im Jahr 2019 setzten Biopharmazeutika beispielsweise mit 12,7 Mrd. Euro und einem Marktanteil von 29 % neue Bestmarken im deutschen Markt (Stand 2018: 11,2 Mrd. Euro und 27 % Marktanteil). Hergestellt werden vor allem Antikörper (27 %), Hormone (12 %) und Impfstoffe (21 %), dargestellt in Abbildung 1.1 [2]. Allerdings erlangten auch Arzneimittel für neuartige Therapien (engl. *Advanced Therapy Medicinal Products*, ATMPs) in den letzten Jahren vermehrt an Aufmerksamkeit. Im Mai 2020 hatten in der EU und damit auch in Deutschland zehn ATMPs eine zentrale Zulassung. Allerdings gehen mit der Neuartigkeit auch Besonderheiten bei ihrer Entwicklung, Produktion und der Zulassung einher [3].

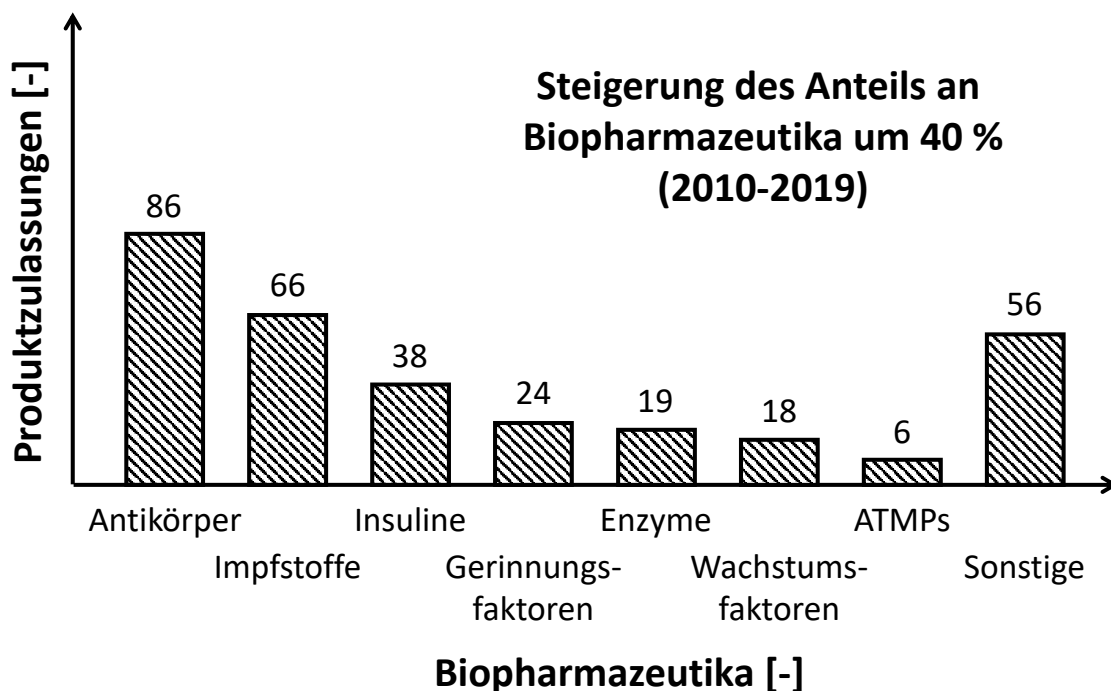


Abbildung 1.1: Gesamtzahlen der Produktzulassungen von Biopharmazeutika in Europa, unterteilt in Wirkstoffarten (Stand 31.12.2019). Die Daten wurden von [2, 3] übernommen.

ATMPs, die in Gen- und Zelltherapeutika sowie biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte unterteilt werden, sind in vielerlei Hinsicht neuartig. Während klassische Arzneimittel bei der Behandlung von Krankheiten zumeist ein Leben lang angewendet werden müssen, könnten ATMPs bei einmaliger Anwendung eine lang anhaltende therapeutische Wirksamkeit, möglicherweise sogar eine Heilung erzielen [3]. Insbesondere Gen- und Zelltherapeutika werden bereits in zahlreichen klinischen Studien für eine Reihe von Krankheiten, wie beispielsweise für verschiedene Krebsarten, Hirninsult oder chronische Infektionen, untersucht. Hauptobjekte dieser bisher unzureichend oder

nicht behandelbaren Krankheiten sind T-Lymphozyten, tumorinfiltrierende Lymphozyten, chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen, natürliche Killerzellen und Stammzellen [4–6]. Jedoch werden etliche ATMPs patientenindividuell hergestellt, mit dem entsprechenden Aufwand in der Produktion [3]. Bei der Behandlung müssen die Zellen in ausreichender Anzahl und geeigneter Qualität gemäß *Good Manufacturing Practice* (GMP) bereitgestellt werden. Bei mesenchymalen Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC) werden beispielsweise abhängig von der Krankheitsindikation $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^9$ Zellen pro kg Körpergewicht [7] benötigt, wobei lediglich eine begrenzte Anzahl der MSCs in derzeit identifizierten Quellen von 100 bis 5000 Zellen pro Biopsie vorliegt [8]. Weiterhin wird die Identität und Reinheit der isolierten Zellen nur durch wenige stabil exprimierte Rezeptoren definiert. Das Rezeptor-Repertoire, die Attribute und das Verhalten der Zellen kann sich jedoch verändern, da die Zellen mit anderen Zellen, Signalstoffen und Oberflächen kommunizieren und reagieren. Zusätzlich können die Zellen über viele Passagen genetische und epigenetische Instabilität entwickeln und an Funktionalität verlieren [9–11]. Schlussendlich sind jedoch die Zellen das Endprodukt, wodurch die ATMPs speziellen Anforderungen, einschließlich den Produktspezifikationen nach GMP oder der Richtlinie EMEA/CHMP/600280/2010, genügen müssen. Zudem werden Qualitätsstandards von Regulierungsbehörden wie der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) oder der Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl. *European Medicines Agency*, EMA) vorgegeben [12–14]. Dies impliziert strenge Vorschriften in Bezug auf die Qualitätskontrolle. Allerdings besteht ein essentieller Bedarf an Technologien, die eine maximale Expansion jeder Zelllinie für Anwendungen im größerem Maßstab ermöglichen [9–11]. Folglich ist aktuelles Wissen über die Anwendungspotentiale von Zellen bisher kaum in praktische, technische Lösungen und breit angelegte Methoden umgesetzt [4, 6]. Der Herstellungsprozess muss standardisiert und skalierbar sein. [13]. Ebenfalls wäre eine schnelle und markierungsfreie Analyse von Zellen und Zellsubtypen eine wichtige Hilfe, um den Weg für den klinischen Einsatz zu ebnen [15]. All das bedingt jedoch kostenintensive Entwicklungsverfahren, die Innovationshürden darstellen. Zusätzlich erhöhen notwendige präklinische und klinische Studien sowie zunehmende regulatorische Beschränkungen den Druck auf die Entwicklung von produktiven und effizienten Herstellungsprozessen von Biopharmazeutika, einschließlich der ATMPs [16].

Traditionellerweise werden *Trial-and-Error*- und *One-Factor-at-a-Time*-(OFAT-) Methoden in der biopharmazeutischen Prozessentwicklung verwendet. Diese erfordern jedoch zwangsläufig eine große Anzahl von Experimenten, die durchgeführt und analytisch ausgewertet werden müssen [17, 18]. Die alternative Verwendung statistischer *Design of Experiments*- (DoE)-Methoden bietet zwar die Möglichkeit, Zusammenhänge zwischen Prozessparametern und deren Einfluss auf die Endproduktivität zu identifizieren, dennoch wird der komplexe Bioprozess auf wenige Kennzahlen (z. B. Endproduktkonzentration) reduziert und die Dynamik von Wachstum und Stoffwechsel nicht ausreichend berücksichtigt [16, 19, 20]. Gleichzeitig besteht das Risiko, dass Experimente durch die heuristische Konzeption eines DoE falsch gewählt werden und nur eine unzureichende Aussagekraft haben. Dies erhöht zusätzlich die Kosten und führt zu Zeitverzögerungen [16, 21].

Die Entwicklungsdauer und Entwicklungskosten von Zellvermehrungsprozessen können jedoch drastisch reduziert werden durch die neuartige Verknüpfung von Wachstumsmodellen mit statistischen Optimierungsverfahren (mDoE). Zugleich kann die Produktqualität und -quantität besser gewährleistet werden [22, 23]. Im Gegensatz zum statistischen DoE, werden im mDoE die empfohlenen Experimente mit Hilfe von mathematischen Prozessmodellen simuliert und zur Bewertung des Versuchsraumes herangezogen. Dadurch wird die Definition eines wohldefinierten Versuchsraums ermöglicht, da Änderungen ohne experimentellen Mehraufwand durchgeführt werden können. Empfohlene Experimente werden so in deutlich reduzierter Anzahl umgesetzt. Neben der signifikanten Reduktion der Anzahl von Experimenten wird der Einsatz von mathematischen Prozessmodellen heute als nachhaltiger Teil einer wissensgetriebenen Bioprozessentwicklungsstrategie gesehen [19, 24, 25]. Bislang ist die Anwendung des mDoE auf dem Gebiet der Optimierung der Medium- und Fütterungsstrategien bereits für eine antikörperproduzierende *Chinese Hamster Ovary* (CHO-) Zelllinie und für *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich gezeigt worden [16, 19]. Insgesamt sind mDoE-Methoden somit essentieller Bestandteil bei der Entwicklung von wissensbasiertem Prozessstrategien [19, 24, 25].

2 Zielsetzung und Strategie

Zur Produktion von Biopharmazeutika in ausreichender Menge und Qualität, müssen produktive und effiziente Bioprozesse entwickelt werden. Hierfür müssen jedoch die zuvor vorgestellten Herausforderungen in biopharmazeutischen Herstellungsprozessen mit tierischen und humanen Zellkulturen gelöst und das Verständnis über die Zelldynamiken erhöht werden [19]. Als neuartiges Werkzeug in der wissensbasierten Bioprozessentwicklung werden mDoE-Methoden gesehen, deren Anwendung bereits erfolgreich unter anderem durch Möller et al. (2019) und Moser et al. (2021) gezeigt wurden [16, 19]. Die genannten Studien beschäftigten sich jedoch nur mit bereits etablierten und tiefgehend erforschten Prozessen, sodass das Ziel dieser Thesis die Bewertung der Verwendbarkeit der mDoE-Methoden innerhalb verschiedener biopharmazeutischer Prozessstadien ist.

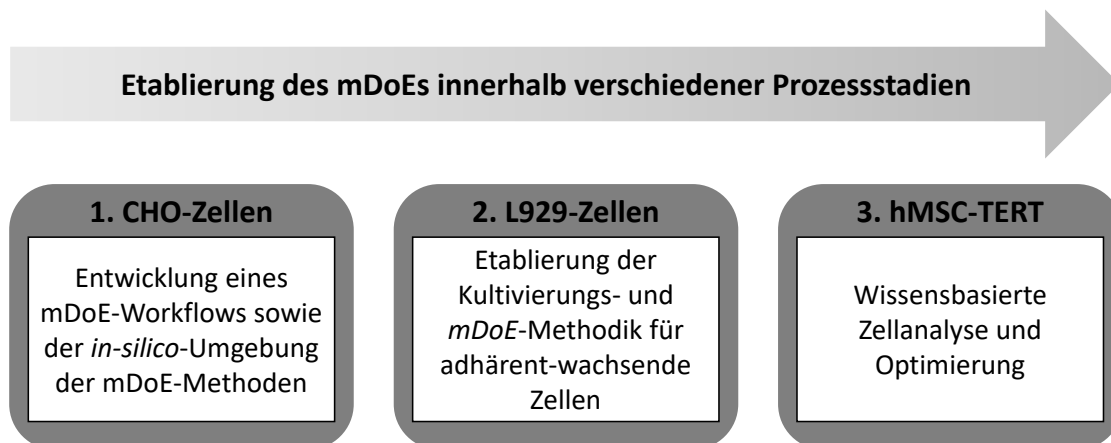


Abbildung 2.1: Strategie und Zielsetzung der umgesetzten Studien dieser Thesis.

Als Ausgangspunkt hierfür wurde die Studie von Möller et al. (2019), in der die Optimierung der Medium- und Fütterungsstrategien für eine antikörperproduzierende CHO-Zelllinie im Schüttelkolben gezeigt wurde, verwendet [16]. Basierend auf einer Analyse zur Einschätzung des Ist-Zustandes soll ein Workflow zur erfolgreichen Umsetzung einer modellgestützten Prozessauslegung entwickelt und getestet werden. Die Bausteine der mDoE-Methoden sollen herausgearbeitet werden, wobei anzumerken sei, dass die Bausteine des mDoE im Laufe der Jahre stets verfeinert wurden und auch in dieser Thesis im Fokus der Entwicklung stehen. Im Anschluss soll überprüft werden, inwiefern der mDoE-Workflow auf frühe Entwicklungsstadien anwendbar ist. Zur Testung werden Mausfibroblasten (L929-Zellen) und humane, immortalisierte, mesenchymale Stammzellen (hMSC-TERT) verwendet. Insgesamt sollen dabei die modellgestützten und experimentellen Methoden entwickelt, evaluiert und implementiert werden. Entgegen den gängigen Kultivierung in STRs und Spinnerflaschen wird in dieser Thesis bewusst der Fokus auf die Kultivierung in Schüttelkolben gelegt. Schüttelkolben stellen eine erfolgsversprechende, leicht zu handhabende Alternative zu

gängigen Kultivierungssystemen dar. Grundlage für die aussagekräftige Validierung einer erfolgreichen Anwendung des mDoEs ist eine Erhöhung der Zellausbeute, die auf einer Steigerung des Prozessverständnisses basiert. Zusammengefasst sind die Studien in Abbildung 2.1.

In den nachfolgenden Kapiteln dieser Thesis wird der aktuelle Stand der verwendeten Zelllinien in der Biopharmazeutikaproduktion, insbesondere der Produktion von ATMPs, erarbeitet. Als große Hoffnungsträger bei der Behandlung bisher nicht therapierbarer Krankheiten werden hMSCs angesehen, sodass deren Kultivierungsschritte und die Besonderheiten dargestellt werden. Weiterhin werden CHO-Zellen, als die bei weitem am häufigsten verwendeten Säugetierzelllinien in der Biopharmazeutikaherstellung, und L929-Zellen vorgestellt. Es werden die Herausforderungen der statistischen Versuchsplanung und die neuartigen mDoE-Methoden definiert. Dank der breiten Anzahl an Daten für die CHO DP12-Zellen werden auf einer tiefergehenden Ebene verschiedene Einstellungen und Spezifikationen des mDoEs untersucht. Basierend darauf wird ein mDoE-Workflow entwickelt und die Vorteile und Herausforderungen der modellgestützten DoE-Methoden herausgearbeitet und für die genannten Zelllinien umgesetzt, wodurch der Nutzen des mDoE auf unterschiedlichen Ebenen verdeutlicht werden kann.

3 Stand des Wissens

Im folgenden Kapitel wird der Stand des Wissens dieser Arbeit thematisiert, wobei der Fokus auf den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen zu spezifischen tierischen sowie humanen suspendierbaren und adhärent-wachsenden Zellen liegt. Darüber hinaus werden mathematische Modelle für die Zellkultivierung und die statistische Versuchsplanung vorgestellt, die in Kombination die Grundlage des mDoE darstellen.

3.1 Zelllinien in der Biopharmazeutikaproduktion

Die Nachfrage nach hochwirksamen Arzneimitteln ist in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen [1, 26]. Besonderes Augenmerk liegt auf Biopharmazeutika, die mit Mitteln der Biotechnologie und gentechnisch veränderten Organismen hergestellt werden [27]. Von 2015 bis 2018 wurden 129 verschiedene Biopharmazeutika von der EU und der US-Regierung zugelassen. Dies stellt die höchste Anzahl an Zulassungen in einem Vierjahreszeitraum seit der Einführung der ersten Biopharmazeutika Ende des 20. Jahrhunderts dar [28]. Im Jahr 2018 gab es insgesamt 374 zugelassene Biopharmazeutika, davon 316 mit unterschiedlichen Einzelwirkstoffen und aktuellen Wirkstoffzulassungen [2]. Die Trends für die Zukunft deuten sogar darauf hin, dass ein wachsender Marktanteil von bis zu 50 % der Top-100-Arzneimittel biobasiert sein wird [29].

Für die Herstellung zugelassener Biopharmazeutika liegt der anhaltende Trend bei einer zunehmenden Bedeutung von suspendierbaren tierischen und humanen Expressionssystemen. Hergestellt werden vor allem Antikörper (Abs), gefolgt von Hormonen, Gerinnungsfaktoren und Enzymen [2]. Jedoch steigt auch der Einfluss der Zell- und Genterapie, in der wiederum überwiegend adhärent-wachsende Zellen verwendet werden [2]. Diese sogenannten ATMPs sind Arzneimittel für die Anwendung beim Menschen, die auf Zellen, Gentransfer oder Geweben basieren. Das Ziel ist es, unter anderem neuartige Ansätze zur Geweberegeneration und -reparatur zu entwickeln. Zusätzlich bieten ATMPs Alternativen zu den derzeitigen traditionellen und kostspieligen Behandlungsmethoden diverser Krankheiten [30]. Weiterhin werden adhärent-wachsende Zellen (meist körpereigene Primärzellen) auch als *in vitro*-Modell für das Wirkstoffscreening oder die Modellierung von Krankheiten verwendet. [31].

3.1.1 CHO-Zelllinien und ihre Position in der Biopharmazeutikaherstellung

CHO-Zellen sind die bei weitem am häufigsten verwendeten Säugetierzelllinien in der Herstellung von Biopharmazeutika: 84 % (52 der 68 von Walsh et al. (2018) in seiner Studie vorgestellten zugelassenen therapeutischen Ab-Produkte [2]) werden in CHO-Systemen hergestellt. Die übrigen zugelassenen Antikörper werden entweder in NS0-Zellen (neun Produkte) oder Sp2/0-Zellen (zwei Produkte) produziert [2].

CHO-Zellen wurden erstmals 1957 durch Puck et al. aus den Ovarienzellen eines chinesischen Zwerghamsters isoliert [32]. Ihre essentielle Bedeutung erhielten sie aufgrund ihrer geringen Chromosomenzahl sowie ihrem robusten und schnellen Wachstum [32]. Daher wurde bereits im Jahre 1986 das erste, in CHO-Zellen produzierte, therapeutische Protein (gewebespezifischer Plasminogenaktivator) zugelassen [33]. Seitdem ist eine hundertfache Verbesserung der Produktausbeute zu verzeichnen [34]. Die signifikante Verbesserung kann auf die Modifizierung von hochflexiblen und stabilen Zelllinien zurückgeführt werden. Zusätzlich hat die Entwicklung von chemisch definierten, serumfreien Kulturmedien, Hochzelldichte- und zulaufbetriebenen Kultivierungen sowie von erfolgreichen *Scale-Ups* profitiert [35]. Außerdem sind ein fortgeschrittenes Verständnis des CHO-Zellstoffwechsels und die Interaktion mit den Prozessparametern etabliert [36].

Die Zelllinie CHO DP-12 (clone #1934, ATCC, CRL-12445), die auch in dieser Thesis Anwendung findet, exprimiert einen humanisierten Anti-Interleukin-8-Antikörper in prozessrelevanten Mengen von bis zu 450 mg l^{-1} (Fed-Batch-Prozess) [37, 38]. Humanisierte Anti-IL-8-Antikörper und Varianten davon werden in der Diagnostik und bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen verwendet [39].

3.1.2 Verwendungsgebiete von Fibroblasten

Fibroblasten finden ihre Verwendung in Biokompatibilitätstests [40, 41], Zytotoxizitätstests [42] und zellbiologischen Studien [43]. Lokalisiert sind sie in Geweben wie der Haut und den Gelenkbändern und sie besitzen die Fähigkeit zur Produktion von Kollagenen und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix. Fibroblasten sind in der Lage, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren und ermöglichen somit die Wundkontraktion während des Wundheilungsprozesses [44].

Basierend auf den derzeit akzeptierten Definitionen für Fibroblasten und MSCs ist eine charakteristische Unterscheidung hinsichtlich ihrer phänotypischen Eigenschaften kaum möglich. Ähnlich zu den MSCs tragen Fibroblasten zur Wundheilung bei und repräsentieren eine heterogene Zellpopulation. Sie weisen eine ähnliche Morphologie wie MSCs auf, exprimieren die gleichen Zelloberflächenmarker und können sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren [45–47].

3.1.3 Stammzellen, Immunzellen und ihr Einsatz in der Zelltherapie

Vor dem Hintergrund einer steigenden Lebenserwartung gewinnt die Entwicklung von neuen Therapien für degenerative Erkrankungen, für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und für Krebs zunehmende Bedeutung [48, 49]. Stammzellen und Immunzellen gelten als neue Hoffnungsträger, mit denen Therapieansätze für diese bislang nicht behandelbaren Krankheiten erstmals ermöglicht oder bisherige Therapien durch bessere ersetzt werden können [50]. Dabei sind besonders die Selbsterneuerungseigenschaften dieser Zellen sowie ihr multilineares Differenzierungspotenzial reizvoll [51]. In diesem Sinne wurden bereits mehrere Studien, z. B. zu Morbus Parkinson [52], Krebs [53], Osteoarthritis [54] sowie Diabetes mellitus Typ 1 und 2 [55], durchgeführt.

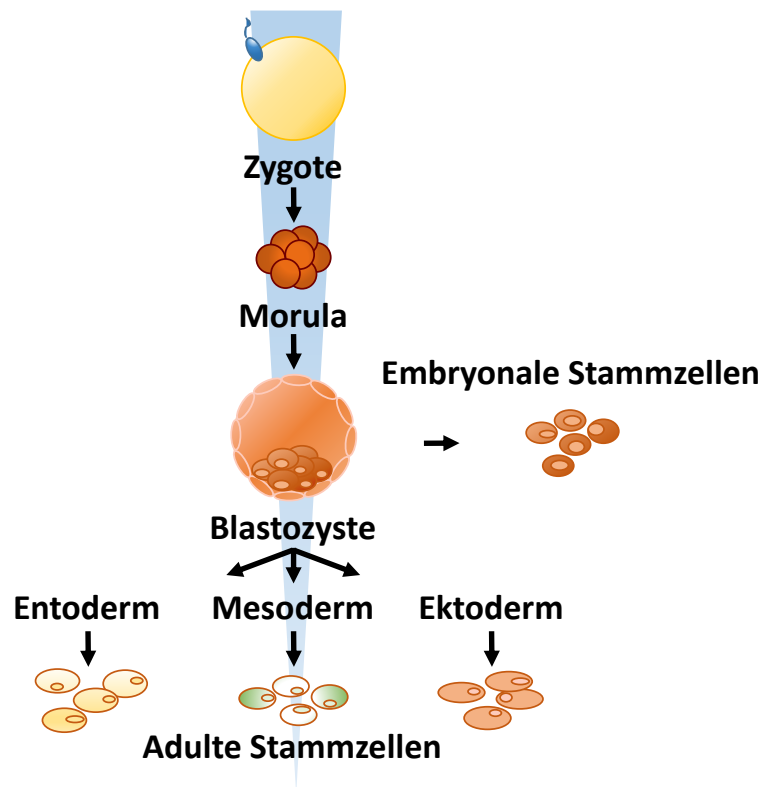


Abbildung 3.1: Differenzier- und Potenzierbarkeit der Stammzellen. Mit steigender Differenzierung vermindert sich die Potenz der Stammzellen - aus einigen entwickelt sich der Mensch (embryonale Stammzellen), andere bilden nur einzelne Organe und Gewebetypen aus (adulte Stammzellen).

Generell ist der Begriff „Stammzelle“ ein Synonym für unspzialisierte Zellen, die über lange Zeiträume die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, ohne dass sich ihre allgemeinen Eigenschaften wesentlich verändern [56]. Zeitgleich besitzen Stammzellen die Fähigkeit, sich unter geeigneten Bedingungen zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung zu entwickeln (zusammengefasst in Abbildung 3.1) [57]. Wenn sich eine Stammzelle teilt, gibt es zwei Möglichkeiten für die Tochterzelle: (I) die Tochterzelle bleibt eine Stammzelle und trägt somit zur Selbsterneuerung bei (symmetrische Zellteilung) oder (II) die Tochterzelle beginnt sich zu differenzieren und reift zu einer spezialisierten Zelle und verliert ihre Stammzeleigenschaften (asymmetrische Zellteilung) [58]. Dabei werden die verschiedenen Stammzelltypen üblicherweise zu den embryonalen Stammzellen einerseits und den adulten Stammzellen andererseits zusammengefasst [50]. Embryonale Stammzellen, die sämtliche Zelltypen hervorbringen können aus denen ein Organismus besteht, werden als pluripotent bezeichnet. Stammzellen, die sich nur zu bestimmten Zelltypen differenzieren, wie die adulten Stammzellen, werden als multipotent bezeichnet [57, 59]. Die Zygote bzw. die Zellen der Morula stehen in der hierarchischen Struktur an oberster Stelle, da diese Zellen totipotent sind und somit das Ektoderm des Chorions (wichtig für die Entwicklung des Plazentagewebes) bilden [60].

Mesenchymale Stammzellen in der Zelltherapie

Die Verwendung embryonaler Stammzellen ist aufgrund ethischer Bedenken limitiert, da sie aus der inneren Zellmasse von frühen Embryonen isoliert werden [56, 61]. Adulte Stammzellen, insbesondere MSCs, scheinen durch ein großes Spektrum an trophischen Aktivitäten eine erfolgsversprechende Alternative darzustellen. Nach aktuellem Stand der Forschung scheint die Sekretion eines breiten Spektrums bioaktiver Moleküle (z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine) der Hauptmechanismus zu sein, durch den MSC ihre therapeutischen Effekte erzielen. Eben diese trophischen Aktivitäten lassen sich in sechs Kategorien einteilen: Immunmodulation, Anti-Apoptose, Angiogenese, Unterstützung des Wachstums und der Differenzierung lokaler Stammvorläuferzellen, Anti-Narbung und Chemotaxis [62, 63]. So ist es nicht verwunderlich, dass dieser Zelltyp für die Behandlung verschiedener degenerativer Erkrankungen untersucht wird.

Für die Bereitstellung der erforderlichen therapeutischen Zellzahlen ($1 \cdot 10^6$ - $10 \cdot 10^9$ Zellen pro kg Körpergewicht [7]) wird eine extensive *in vitro*-Expansion mesenchymaler Stammzellen benötigt. Die langfristige Kultivierung von MSCs erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation und führt zu einem Rückgang in ihrer Multipotenz [64, 65]. Pan et al. (2014) beschrieben, dass langfristig kultivierte MSCs nach der Transplantation in immundefiziente Mäuse sarkomartige Tumore produzierten [66]. Wang et al. (2013) zeigten jedoch in ihrer Studie gegensätzliche Ergebnisse. Bei der Untersuchung von UCB-MSCs in Langzeitkultur wurden diese über viele Passagen kultiviert, ohne maligne Transformationen zu durchlaufen. Allerdings entwickelten die meisten der kultivierten UCB-MSCs genomische Veränderungen [67]. Infolgedessen ist das Thema in wissenschaftlichen Kreisen umstritten, sodass es weiterer Studien bedarf, um diese Herausforderung zu klären. Dennoch ist bekannt, dass sich mit jeder Zellteilung die Enden linearer Chromosomen, der sogenannten Telomere, verkürzen. Bei Erreichen einer kritischen Länge wird zelluläre Seneszenz und Wachstumsstillstand eingeleitet [68, 69]. Eine Strategie, um diese Limitierungen zu umgehen, ist die Immortalisierung. Durch Transfektion mit der humanen Telomerase (hTERT) können die Zellen durch eine Stabilisierung der Telomerlänge fast unbegrenzt kultiviert werden. Die Zellen können das Differenzierungspotenzial während der kontinuierlichen Subkultivierung aufrechterhalten, bilden keine Tumore und haben einen normalen Karyotyp [64, 68, 69]. In klinischen Studien werden diese Zellen bereits für allogene Zelltherapieansätze verwendet [70].

Herkunft und Isolation mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen haben ihren Ursprung im Keimblatt des Mesoderms und können sich in mesenchymale Zelllinien wie Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren [71]. Erstmals wurden fibroblastische MSCs 1968 von Friedenstein et al. (1970) aus dem Knochenmark (BM-MSCs) von Nagetieren isoliert [72]. Noch heute werden in der Mehrheit der klinischen Studien und Anwendungen überwiegend BM-MSCs verwendet [5, 73, 74]. MSCs wurden allerdings auch in anderen Geweben des Körpers, wie dem Fettgewebe (Ad-MSCs), im Nabelschnurblut (UCB-MSCs),

im Wharton-Gelee der Nabelschnur, in der Lunge, im Pankreas und im Muskel nachgewiesen [73, 75]. Ad-MSCs, die erstmals 2001 aus dem Material von Fettabsaugungen gewonnen wurden, scheinen eine Alternative zu den mehrheitlich verwendeten BM-MSCs darzustellen [8, 75]. Der Anstieg der Fettleibigkeit führt dazu, dass chirurgische Bauchdeckenstraffungen und Lipoaspiraten vermehrt durchgeführt werden. Dadurch ist eine reichhaltige und sehr geeignete Quelle an Zellen für die regenerativen, medizinisch therapeutischen Anwendungen vorhanden [75]. Zudem können die Zellen in großer Menge und unabhängig vom Alter des Spenders mit einer geringen Spender-Morbidität gewonnen werden. 1 g adipöses Gewebe enthält etwa 5000 Zellen, während 1 ml Knochenmark zu einer Ausbeute von 100 - 1000 Zellen führt [8, 76].

Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen

MSCs sind eine heterogene Population von fibroblastenähnlichen, multipotenten Zellen, sodass ihre biologische Wirksamkeit je nach Gewebequelle oder Subpopulation variiert [71]. Dennoch wurden MSCs verschiedenen Ursprungs für dieselbe Indikation verwendet, ohne einen Nachweis dafür, welche Quelle oder Population von MSCs klinisch effektiver ist (siehe [77]). Die funktionelle Vielfalt von MSC hat jedoch direkte Auswirkungen auf die Grundlagenforschung und die therapeutischen Anwendungen, die eine vorhersagbare Funktion und Wirksamkeit erfordern [15, 71, 78]. Daher sollten etablierte Methoden zur Charakterisierung von MSC zur Verfügung stehen.

Um diese Herausforderung anzugehen, schlägt das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cell and Gene Therapy* (ISCT) minimale Kriterien zur Definition humaner MSC vor. Charakterisiert werden MSCs demnach durch ihre Fähigkeit, an Kunststoff anzuhaften, spezifische Oberflächenmarker zu exprimieren (positive Expression (> 95 %) von Proteinen, wie den Unterscheidungsgruppen (engl. *Cluster of Differentiation*, CD) CD73, CD90 und CD105 sowie der negativen Expression (< 2 %) von CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA Klasse II) und ein multilineares Differenzierungspotenzial in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten aufzuweisen (siehe Abbildung 3.2) [79].

Verschiedene Studien deuten jedoch auf eine Unberechenbarkeit in der Entfaltung des Differenzierungspotenzials hin. In der Studie von Okamoto et al. (2002) wurden beispielsweise aus parentalen immortalisierten hMSCs 100 von Einzelzellen abgeleitete Klone etabliert, deren Differenzierungseigenschaften erheblich variierten. Unter den 34 Klonen, die Differenzierungspotenzial (< 60 %) zeigten, wurde osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung bei lediglich 19, 18 bzw. 11 Klonen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass MSCs aus einer Gruppe von Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotenzial bestehen [80]. Dieses Verhalten könnte mit der Zellteilung zusammenhängen, da eine asymmetrische Zellteilung zu einer weiteren mesenchymalen Stammzelle und einer Progenitorzelle führt. Progenitorzellen weisen im Vergleich zu MSC eine geringere Potenz auf und können gleichzeitig Vorläuferzellen hervorbringen, die gewebespezifisch und somit stärker auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt sind [58]. Eine genaue Detektion der stimulierenden bzw. hemmenden Faktoren ist noch immer Stand der aktuellen Forschung [81]. Die Forschung ist sich

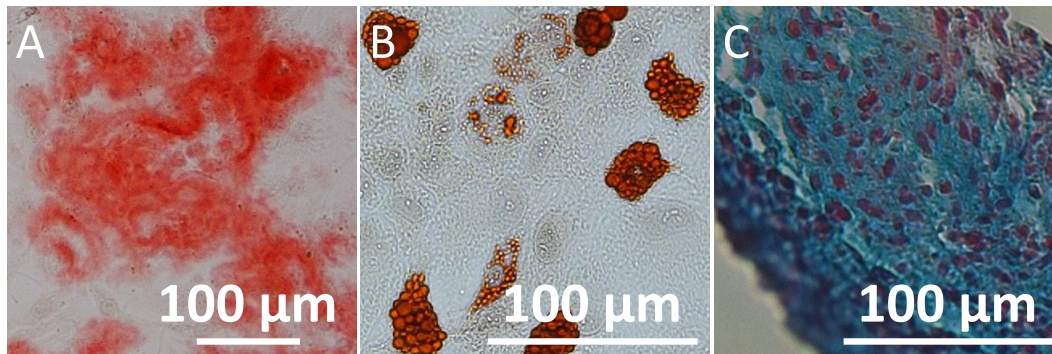


Abbildung 3.2: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten (A), Adipozyten (B) und Chondrozyten (C). Die Differenzierung erfolgte in T-Flaschen (A, B) sowie konischen Zentrifugationsröhrchen (C) in Differenzierungsmedium. Eine Alizarinrot-Färbung verdeutlicht die Kalziumanreicherung der Osteoblasten (A), während bei den Adipozyten durch eine Ölrot-O-Färbung die Lipide gefärbt sind (B). Das Aggrecan der extrazellulären Matrix ist durch Alcianblau und die Zellkerne mit einer Kernechtrotfärbung angefärbt (C).

jedoch einig, dass die Passagenzahl, das Alter sowie der Zustand des Spenders [82, 83] und die Mikroumgebung bzw. die ursprüngliche Herkunft der Zellen [84] das Ergebnis stark beeinflussen. Sacchetti et al. (2016) wiesen durch den Vergleich von verschiedenen MSC-Populationen aus dem fetalen Nabelschnurblut, dem adulten Knochenmark und dem Muskel individuelle Unterschiede in der transkriptomischen Signatur und dem *in vivo*-Differenzierungspotenzial nach. UCB-MSCs differenzieren *in vivo* vorrangig in Knorpel, wohingegen BM-MSC bevorzugt Knochen bilden und die Blutbildung unterstützen, jedoch nicht spontan Knorpel ausbilden [85].

3.2 Etablierte Kultivierungssysteme für die *in-vitro* Expansion

Für Kultivierungsprozesse tierischer und humaner Zellen gibt es unterschiedliche Arten und Betriebsweisen von Bioreaktoren. So können die Zellen mithilfe statischer Kultivierungssysteme z. B. Zellkulturflaschen oder mittels dynamischer Systeme wie Schüttelkolben, Rollerflaschen oder Spinnerflaschen in Brutschränken expandiert werden. Um Limitierungen hinsichtlich der Handhabbarkeit und der Zellausbeute zu umgehen, werden Kultivierungen im großen Maßstab z. B. in dynamischen Rührkessel- (STR) oder Festbettreaktoren umgesetzt. Zur Kultivierung adhärent-wachsender Zellen in STRs wird eine Wachstumsfläche (z. B. *Microcarrier*, MC) bereitgestellt.

In dynamischen Reaktoren können durch den begünstigten Stofftransport und somit der Nährstoffversorgung höhere Zellkonzentrationen als in statischen Systemen erreicht werden. Zusätzlich wird durch die vollständige Kontrolle die Produktqualität und durch die Reduzierung manueller Eingriffe die Prozessreproduzierbarkeit erhöht [86]. Jedoch können in dynamischen Kultivierungssystemen Stressbedingungen für Zellen, wie z.B. Substratmangel, zu hohe Konzentrationen an toxischen Metaboliten oder auch Scherkräfte und hydrodynamische Spannungen dazu führen, dass es zu einer Schädigung der Zellen kommt [87–89].

3.2.1 Besonderheiten der Expansion von adhären-wachsenden Zellen

Adhären-wachsende Zellen sind für verschiedene biotechnologische Anwendungen von großem Interesse. (i) Sie werden zur Produktion von Viren für Impfzwecke in sehr großem Maßstab (in 1 - 6 m³-Reaktoren [90, 91]) unter Verwendung von MCs eingesetzt. (ii) Mit dem Aufkommen von Stammzellen und ihrem potenziellen Einsatz in der Zelltherapie sowie der regenerativen Medizin hat sich die Entwicklung neuartiger Kultivierungstechnologien für diese Zellen im großen Maßstab stark beschleunigt [31]. Nach aktuellem Stand der Forschung stecken die wirklich skalierbaren Systeme - MC-Kulturen unter Verwendung von STRs für die Expansion von Stammzellen - noch in den Anfängen [31, 92]. Dies basiert auf dem Fehlen eines grundlegenden Verständnisses der kritischen Fragen in Bezug auf die Zellexpansion unter Beibehaltung der Multipotenz und des Differenzierungspotenzials sowie des Einflusses der Kulturmgebung auf das Verhalten der Stammzellen [4, 31]. Die Abhängigkeit der Anzahl an benötigten Zellen von den Krankheitsindikationen (1 - 1000 · 10⁶ Zellen pro kg Körpergewicht [7]) und die begrenzte Anzahl der MSCs in derzeit identifizierten Quellen (100 - 5000 Zellen pro Biopsie [8]) macht eine skalierbare *in vitro*-Kultivierung zwingend erforderlich.

STRs und Spinnerflaschen sind die bekanntesten und am besten charakterisierten Suspensions-Expansionsplattformen, in denen MSCs auf MCs gezüchtet werden [93]. In wenigen Fällen wurde die hMSC-Expansion auf MCs in STRs mit einer Kapazität von bis zu 50 l erreicht [7, 94]. Neben akademischen Gruppen haben auch einige industrielle Unternehmen, wie beispielsweise Pall [95], über die Produktion von hMSCs im 50 l-Maßstab berichtet.

3.2.2 Techniken zur Subkultivierung von adhären-wachsenden Zellen

Um adhären-wachsende Zellen zu passagieren, werden diese von ihrer Kulturoberfläche abgelöst, verdünnt und in ein anderes Kulturgefäß überführt. Dies sollte durchgeführt werden bevor die vollständige Konfluenz erreicht wurde. Ein häufig verwendetes Ablösemittel stellt dabei Trypsin + Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dar, wobei auch rekombinante und nicht-tierische Proteasen und Trypsin-ähnliche proteolytische Enzyme für den industriellen Einsatz zur Verfügung stehen [96]. Ein effizienter Ersatz der proteolytischen Zellablösung steht für den Routineeinsatz im großen Maßstab bisher noch nicht zur Verfügung, wobei biodegradierbare MCs eine Möglichkeit bieten [93]. Weiterhin besteht die Möglichkeit eines *Bead-to-Bead*-Transfers, dessen Funktionalität bereits erfolgreich für Vero-Zellen [97], verschiedene CHO-Klone [98, 99] und sogar für MSCs [13, 100] gezeigt wurde. Im Hinblick auf Hochzelldichte-Kulturprozesse ist der *Bead-to-Bead*-Transfer besonders geeignet, da er die Trägerkonzentration und damit die verfügbare Wachstumsoberfläche erhöht. Eine generelle Herausforderung bei dieser Art des Zelltransfers ist, dass ein hoher Prozentsatz an Zell-MC-Aggregaten und eine Mehrschichtigkeit der Zellen auftreten kann. Aufgrund der Bildung von Konzentrationsgradienten können diese Aggregate (4 - 5 mm [101]) den optimalen Sauerstoff- und Nährstofftransfer zu den Zellen innerhalb der Zell-MC-Komplexe limitieren [102].

3.2.3 Spezifische Eigenschaften von MCs in dynamischen Systemen

Die Größe von Trägern variiert abhängig vom verwendeten Kultursystem im Bereich von 10 μm - 5 mm, wobei MCs eine Größe von 150 - 500 μm aufweisen [88, 103]. Aufgrund des erschwerten Ablösens der Zellen von der Oberfläche werden nicht-poröse MCs für die Proliferation von adhärennten Zellen empfohlen [13]. Dagegen gewährleisten poröse MCs einen Schutz vor Scherstress [104]. Es muss daher ein MC gewählt werden, der nicht nur die Anhaftung und das Wachstum unterstützt, sondern auch eine effiziente Ablösung ermöglicht. Weitere Eigenschaften von MCs sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener MC-Spezifikationen. Basierend auf [88, 100, 102, 104, 105]

Eigenschaften	MC		
	glatt	mikroporös	makroporös
Poren	keine	kleine	intern
Mikroumgebung	homogen	homogen	heterogen
Zelladhäsion	minimiert	verbessert	maximiert
Scherschutz	minimal	-	maximal
Ernte	einfach	-	erschwert

Grundsätzlich kann jeder MC etwa 100 - 200 Zellen aufnehmen. Für ein optimales Wachstum auf allen einzelnen MCs ist eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erforderlich. Dafür werden für die meisten Zelllinien während der Inokulation mehr als 7 Zellen pro Träger benötigt. Dadurch wird sichergestellt, dass die Population der unbesetzten MC $< 5\%$ beträgt und die Nutzung der verfügbaren Fläche maximiert wird [88].

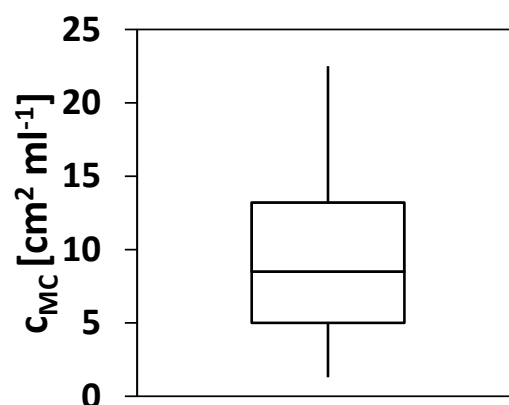


Abbildung 3.3: MC-Konzentrationen im Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis. Der obere und untere Whisker schließen einen Bereich von 1,3 - 22,5 $\text{cm}^2 \text{ ml}^{-1}$ ein, wobei der Median bei 8,5 $\text{cm}^2 \text{ ml}^{-1}$ liegt. Die Ergebnisse basieren auf verschiedenen Studienauswertungen [13, 63, 70, 74, 92, 100, 106–111].

GE Healthcare gibt in seinen Richtlinien und Methoden für die MC-Kultivierung in STRs (Batch-Verfahren) eine MC-Konzentration von 2 - 3 g l⁻¹ vor [105]. Jedoch unterscheidet sich die Dichte sowie das Oberfläche zu Volumen-Verhältnis der MCs maßgeblich. So weisen beispielsweise ProNectin F MCs (Pall Corporation, USA) eine Oberfläche von 360 cm² g⁻¹ und CultiSpher S MCs (PerCell Biolytica, Schweden) bereits eine Oberfläche von 7500 cm² g⁻¹ auf. Daher variieren die MC-Konzentrationen in einem Bereich von 5 - 13,2 cm² ml⁻¹ (Abbildung 3.3), wie die Ergebnisse verschiedener Studien [13, 63, 70, 74, 92, 100, 106–111] zeigen.

Prozessanforderungen an die Wachstumsfläche für MSCs

Trägerbasierte Kultivierungen von MSCs haben vielversprechende Ergebnisse gezeigt und gelten als bevorzugtes Kultivierungsmittel [101]. Alternativ können diese auch in 3D-Aggregaten, -Spheroïden oder verkapselt in z. B. Alginat oder in Hydrogelen kultiviert werden. Eine Verwendung erfolgt oftmals zur Induzierung linienspezifischer Differenzierung. Jedoch wurde von nachteiligen Auswirkungen, wie einer veränderten Proliferation, Stammzellmarkerexpression, Zellform und modifiziertem Differenzierungspotenzial, berichtet [7]. Zudem ist ein allgemeines Problem bei 3D-Aggregaten in der inhomogenen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sehen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die trägerfreie Kultivierung von MSCs ein geeigneter Ansatz für die standardisierte Produktion großer Zellmengen bei gleichbleibender Produktqualität ist [7].

Entgegen einer üblichen Inokulationsdichte von mehr als 7 Zellen pro Träger, haben die Ergebnisse verschiedener Studien gezeigt, dass bei der MSC-Kultivierung etwa 5 Zellen pro Träger ausreichend sind [9, 92, 101]. Zusätzlich verringert sich die Tendenz von Zellaggregaten bei geringen Inokulationsdichten (z. B. 5 · 10⁴ Zellen ml⁻¹), wobei hohe Inokulationsdichten (z. B. 5 · 10⁵ Zellen ml⁻¹) zu reproduzierbaren und vorhersehbaren Aggregatverbindungen führen [112]. Zu hohe Zelldichten können allerdings in einem Verlust der typischen Zelleigenschaften resultieren [113].

3.2.4 Prozessanforderungen an das Wachstumsmedium

Das verwendete Zellkulturmedium spielt eine substanzielle Rolle bei der Expansion von Stammzellen, da dieses die Zellproliferation, die Differenzierung und den Zeitpunkt der zellulären Seneszenz beeinflusst [110]. Mit steigender Nachfrage für Produkte der Zelltherapie entsteht jedoch auch ein Bedarf an *Scale-up*-Technologien sowie Prozessvalidierungs- und Qualitätssicherungsstrategien von Rohstoffen, die wiederum einen Einfluss auf die Kultivierungstechnologien und die Methoden der Rohstoffbeschaffung haben können [114]. Da Zellen empfindlich auf ihre Mikroumgebung reagieren, kann sich jede Änderung der Kulturbedingungen auf die Zellproliferation, die Differenzierung und den Zeitpunkt der zellulären Seneszenz auswirken. Dadurch können sich die physikalischen und leistungsbezogenen Eigenschaften und kritischen Qualitätsmerkmale verändern [110].

Ein unkontrolliertes *Scale-up* kann die Aktivität oder die Eigenschaften des Endprodukts beeinträchtigen und verhindern, dass es mit dem ursprünglichen Produkt im kleineren Maßstab vergleichbar ist.

Weitere Herausforderungen beim *Scale-up* von Herstellungsverfahren betreffen die Verfügbarkeit von Rohstoffen in der erforderlichen Qualität und Menge. Schwierigkeiten bei der Versorgung mit Rohstoffen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung ihrer Qualität und Minimierung der Variabilität können die Weiterentwicklung der Produktion in großem Maßstab verhindern [114]. Einer der aktuell wichtigsten und zugleich kritischsten Rohstoffe in der Zelltherapie sind tierische Seren [115, 116]. Tierische Seren versorgen die Zellen mit nährstoffhaltigen und nicht-nährstoffhaltigen Komponenten, die für das Zellwachstum, den Metabolismus und die Proliferation benötigt werden. Darüber hinaus erleichtern tierische Seren durch die Bereitstellung von Proteinen, wie Kollagen, Fibronectin und Vitronectin, die Zellanhaftung an der Wachstumsoberfläche [115, 116]. Allerdings gibt es wissenschaftliche und ethische Bedenken gegen die Verwendung von tierischen Seren, die sich auf die Ernte und Herstellung beziehen [117]. Es besteht ein Kontaminationsrisiko und die tierischen Seren können eine xenogene Immunantwort auslösen [118, 119].

Prozessanforderungen an das Wachstumsmedium für MSCs

Die FDA stellte kürzlich fest, dass in mehr als 80 % der 66 untersuchten Zulassungsanträge für Produkte aus MSCs die Verwendung von fetalem Rinderserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) bei der Herstellung beschrieben wurde. Die Konzentration von FBS in den Zellkulturmedien reichte von etwa 2 bis 20 %, wobei 10 % FBS die häufigste Konzentration war [8, 114, 117].

Als Ersatz könnten Zusätze aus humanen Quellen, wie humanes Serum, Plasma- und Thrombozytenlysate, verwendet werden. Dennoch ist die Verwendung von humanem Serum umstritten, da ebenfalls ein Mangel an Verfügbarkeit vorliegt und es ein uneinheitliches wachstumsförderndes Potenzial besitzt [120]. Eine weitere Alternative stellen serumfreie, proteinfreie, xeno-freie und chemisch definierte Medien dar [116]. Das Fehlen von wachstums- und anhaftungsfördernden Proteinen in chemisch definierten Medien erfordert allerdings den Einsatz von Proteinbeschichtungen auf der Oberfläche [116]. Insgesamt reduziert sich die Anhaftungseffizienz der Zellen auf MCs auf 22 - 23 % in serum- und xenofreiem Medium [121, 122]. Moreira et al. (2020) zeigen jedoch, dass hMSC trotz der geringen Anhaftungseffizienz in einem xenofreiem Serum im Vergleich zu einer serumhaltigen Kultur schnell wachsen und gleiche Zelldichten erreichen können [123].

3.3 Design of Experiments-Methoden

Auch wenn in der biopharmazeutischen Prozessentwicklung traditionelle *Trial-and-Error*- und OFAT-Methoden nach wie vor verwendet werden, werden statistische DoE-Methoden immer häufiger eingesetzt [18, 124, 125]. Sie können zur statistischen und systematischen Planung von Experimenten, zur Hypothesentestung und/oder zur Optimierung von Prozessvariablen (nachfolgend Faktoren genannt) im Hinblick auf die gewünschte Zielgröße (z. B. Produkttiter, Produktqualität) eingesetzt werden [24, 126, 127]. Im Allgemeinen führt die auf DoE-Methoden basierende Prozessentwicklung im Vergleich zu OFAT-Methoden zu einer Reduktion der Anzahl an durchzuführenden

Experimenten. Daher wurden im Rahmen der Auslegung biopharmazeutischer Produktionsprozesse eben diese sowohl im *Upstream*- als auch im *Downstream*-Prozess eingesetzt. Als Beispiel für die Auslegung eines Bioprozesses implementierten Zhang et al. (2013) ein Screening-Design, um aktive Parameter für die Entwicklung eines serumfreien Mediums für die Kultivierung einer rekombinanten CHO-Zelllinie zu identifizieren. Anschließend wurden die Prozessparameter optimiert und eine Fed-Batch-Strategie entworfen [128]. Als Beispiel für die Produktaufreinigung verwendeten Horvath et al. (2010) ein Screening-Design mit 8 Experimenten, um den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf den isoelektrischen Punkt eines in CHO-Zellkultur exprimierten therapeutischen Antikörpers zu bestimmen. Signifikant waren der pH-Wert, die Temperatur und der Zeitpunkt der Temperaturverschiebung, die abschließend mit der *Response Surface*-Methode (RSM) zur Optimierung des isoelektrischen Punktes ausgewertet wurden [129].

Statistische DoE-Methoden beruhen ausschließlich auf der benutzerdefinierten Auswahl des Versuchsplans und der Definition von Faktorgrenzen, einschließlich der Definition der Versuchsvariablen und ihrer zu bewertenden Stufen [17, 22, 130]. Dies kann zu fehleranfälligen Entscheidungen, iterativen Neuanpassungen des Experimentierraums mit mehreren Runden kosten- und zeitintensiver Experimente und sogar zu einem nicht umsetzbaren Design führen [24]. Zur Auswahl geeigneter Grenzwerte für die Prozessentwicklung und -optimierung mittels DoE ist Expertenwissen erforderlich [24, 131, 132]. Daher bietet die Kombination von mathematischen Modellen mit DoE in mDoE ein neuartiges Werkzeug für die wissensbasierte Entwicklung von Bioprocessen.

3.3.1 Screening-Designs

Screening-Designs dienen dazu, aus einer Liste von vielen möglichen Faktoren die signifikanten Einflussfaktoren zu identifizieren [17, 133]. Dazu können verschiedene Versuchspläne verwendet werden. Die am häufigsten verwendeten Versuchspläne, genannt vollfaktorielle, faktorielle fraktionale sowie Plackett-Burman-Versuchspläne, werden diskutiert.

Vollfaktorielle Versuchspläne

Ein vollfaktorieller Versuchsplan kann verwendet werden, um die Haupteffekte und Interaktionen eines oder mehrerer Faktoren auf die jeweilige Zielgröße zu untersuchen. Da der Versuchsplan aus zwei oder mehr Faktorstufen und k -Faktoren besteht, ergibt sich mindestens ein 2^k -Versuchsplan [134, 135]. Beispielhaft ist der vollfaktorielle Versuchsplan für drei Faktoren durch einen 2^3 -Versuchsplan in Abbildung 3.4, A dargestellt.

Reduzierte vollfaktorielle Versuchspläne

Um zeit- und kostenintensive Experimente bei einer großen Anzahl an Faktoren einzusparen, können reduzierte vollfaktorielle Versuchspläne, wie fraktional-faktorielle und Plackett-Burman-Versuchspläne, gewählt werden. Die fraktional-faktoriellen Versuchspläne, die eine reduzierte Form

des zweistufigen faktoriellen Versuchsplans darstellen, basieren auf der Annahme, dass höherwertige Wechselwirkungen irrelevant sind. Dies führt zu einem 2^{k-n} -Design, wobei das 2^k -Design um n Stufen reduziert wird [23, 134, 136]. Eine reduzierte Form des zuvor erwähnten 2^3 -Designs, ein fraktionales-faktorielles 2^{3-1} -Design, ist in Abbildung 3.4, B dargestellt. Plackett-Burman-Designs, eine Sonderform der zweistufigen fraktionales-faktoriellen Designs, sind geeignet, wenn der Fokus auf der Untersuchung der Haupteffekte liegt und Wechselwirkungen vernachlässigt werden können [136]. Es kann jedoch zu einer Vermischung der Effekte kommen [23, 134]

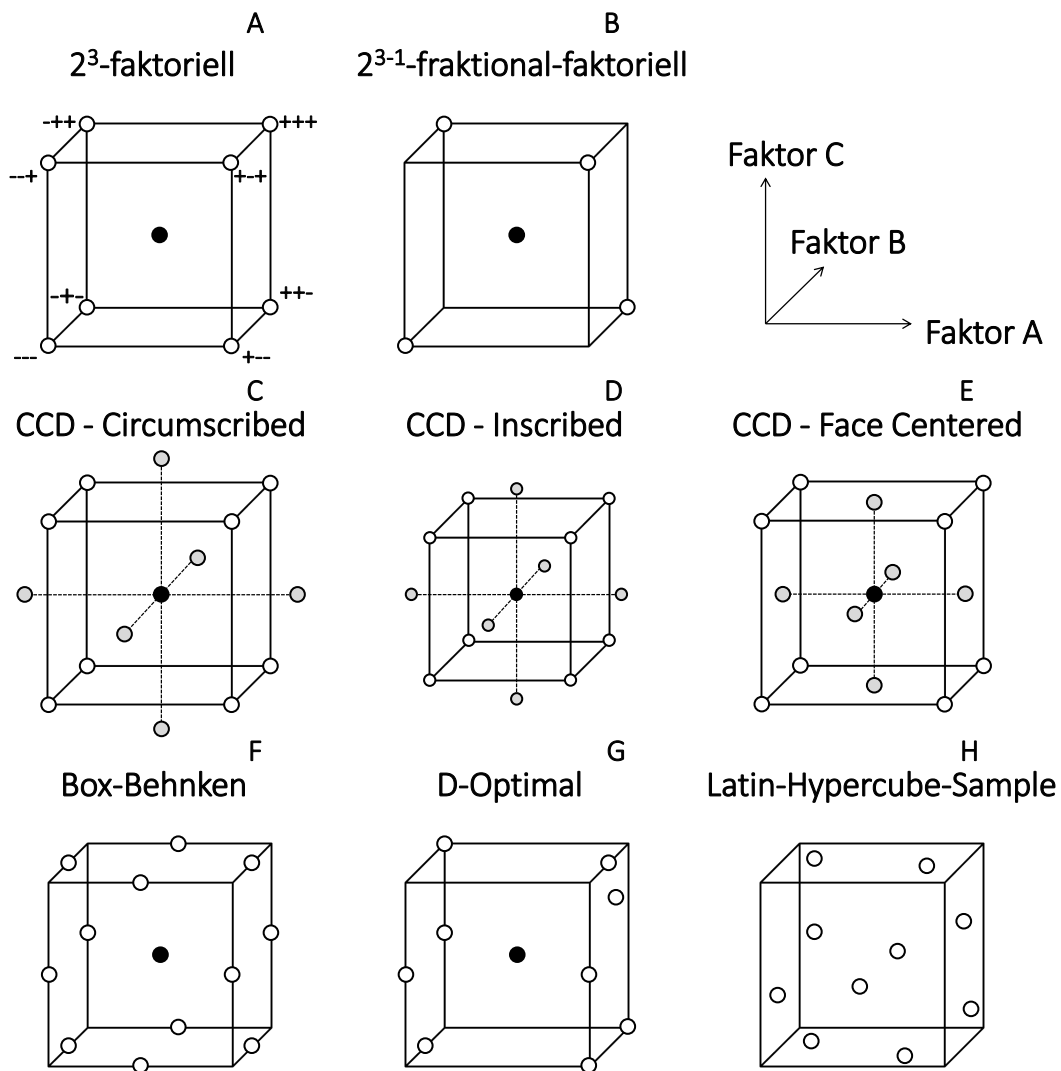


Abbildung 3.4: Geometrische Darstellung von Screening- (A, B) und Optimierungsversuchsplänen (C - H) mit drei Faktoren (Faktor A, Faktor B und Faktor C). Die Punkte stellen die empfohlenen Experimente dar, wobei die grauen Punkte die Sternpunkte und die schwarzen Punkte die zentralen Punkte sind. Alle Versuchspläne werden auf zwei Ebenen (+ und -) untersucht.

3.3.2 Optimierungsversuchspläne

Um Zielgrößen zu maximieren, werden in so genannten „Optimierungsdesigns“ die Stufen der jeweiligen Faktoren optimiert. Deshalb werden im Folgenden die bekanntesten Versuchspläne, wie der zentral zusammengesetzte, Box-Behnken, optimale und raumfüllende Versuchspläne vorgestellt.

Zentrale zusammengesetzte Versuchspläne

Zentrale zusammengesetzte Versuchspläne (engl.: *Central Composite Designs*, CCD) werden aus faktoriellen 2^k - oder fraktionell-faktoriellen 2^{k-n} -Versuchsplänen gebildet. Zusätzlich werden Mittel- und Sternpunkte (Abbildung 3.4, grau markiert) ergänzt, sodass die Schätzung der Krümmung in der Wirkungsfläche ermöglicht wird. Generell gibt es drei Varianten von CCD, die sich in der Einstellung des Wertebereichs ihrer Faktoren unterscheiden. Abbildung 3.4, C-E veranschaulicht die Beziehungen zwischen diesen Varianten. Je nach Variante ist das Design sphärisch, orthogonal, drehbar oder flächenzentriert [126, 134, 137].

Box-Behnken-Designs

Box-Behnken-Designs (BBD, siehe Abbildung 3.4, F) basieren auf der Kombination eines zweistufigen faktoriellen Designs mit einem balancierten unvollständigen oder partiellen Blockdesign [138]. Sie sind nahezu drehbar und erfordern für jeden Faktor eine Untersuchung auf drei Stufen, wodurch ein Feld mit sauberer Auflösung der Interaktionen und quadratischen Effekten entsteht [139]. Bei diesen Designs werden gleichzeitig nur wenige Faktoren verändert. Dies führt bei einer großen Anzahl von Faktoren zu einer schlechten Schätzung der Interaktionen zwischen zwei Faktoren [138].

Optimale Versuchspläne

Bei optimalen Versuchsplänen kann der Versuchsraum eingeschränkt werden, sodass benutzerspezifische Einstellungen vorgenommen werden können. Dafür gibt es eine Vielzahl von Optimierungskriterien, um Punkte im Versuchsraum zu verteilen. Die häufigsten Vertreter sind *Average* (A)-, *Determinant* (D)- (in Abbildung 3.4, G), *Eigenvalue* (E)-, *Global* (G)- und *Variance* (I)-Optimalitäten. Wenn die Koeffizienten des Regressionsmodells von Interesse sind, dann werden A-, D- und E-optimale Versuchspläne verwendet. G- und I-Optimalität beziehen sich dagegen auf das angepasste Regressionsmodell [134].

Raumfüllende Versuchspläne

Traditionelle Versuchspläne, wie CCDs, BBDs und optimale Versuchspläne, legen oft Experimente nahe an den Faktorgrenzen an. Dadurch können Bereiche mit freiem Raum entstehen, die nicht untersucht werden und nur das Rauschen minimieren [140]. Um jedoch Verzerrungen zu minimieren, können raumfüllende Versuchspläne verwendet werden. Die dabei möglichen Experimente werden

zufällig auf die einzelnen Räume verteilt. Ein Beispiel für einen solchen Versuchsplan ist das *Latin Hypercube Sample Design* (LHSD), bei dem der Raum gleichmäßig gefüllt wird, sodass eine große Anzahl an Faktoren und Stufen verwendet werden kann. Der Versuchsraum wird so gefüllt, dass eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Faktorraum vorliegt bzw. der maximale Abstand zwischen den Versuchsplanpunkten minimiert wird. Die Ecken des Faktorraums werden jedoch ausgelassen, die Gewinnung dieser Information ist nur durch Extrapolation möglich (Abbildung 3.4, H) [23, 141].

3.3.3 Beispiele und Herausforderungen der konventionellen DoE

In diesem Teil werden die Herausforderungen des konventionellen DoE anhand von konkreten Studien diskutiert. Eine Reihe von möglichen Anwendungen von Screening- und Optimierungsdesigns sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Verschiedene Screening- und Optimierungsversuchspläne von CHO-Kultivierungsprozessen.

Design	Ziel	Herausforderungen	Ref.
Plackett-Burman	Entwicklung eines serum-freien Mediums für die Produktion von Erythropoietin	Unbekannte signifikante Faktoren, 80 %-Konfidenzniveau	[142]
Faktoriell	Identifikation des Bedarfs an Wachstumsfaktoren im initialen Mediendesign, serumfreie Adaption, Stabilitätsanalyse und <i>Scale-up</i>	Keine Untersuchung von Zentralpunkten	[143]
Fraktional-faktoriell	Untersuchung des Effekts von Medien- und Zustromkomponenten auf die Qualitätscharakteristiken eines Antikörpers	Variation in der statistischen Varianz, unterschiedliche Regressionsmodelle	[144]
D-Optimal	Entwicklung eines Zufütterungsprotokolls (Volumen, Startzeitpunkt, Zeitpunkt des Shifts von Temperatur und Osmolalität)		[131]
CCD	Optimierung der Konzentration und der zeitlichen Zugabe von Valproinsäure bei drei verschiedenen CHO-Zelllinien	Hohe Anzahl an experimentell umzusetzenden Experimenten	[145]
BBD	Optimierung der Aminosäurenkombination zur Bestimmung der einflussreichsten Konzentration im Zustrom		[146]

Plackett-Burman-Designs sind gängige Designs für Screening-Experimente. Sie werden z. B. verwendet, um die Auswirkungen von Aminosäuren und anderen Komponenten in herkömmlichen Zellkulturmedien zu identifizieren. Lee et al. (1999) entwickelten ein serumfreies Medium für die Produktion von Erythropoietin durch die Suspensionskultur von rekombinanten CHO-Zellen und identifizierten sechs aktive Faktoren (Glutamat, Serin, Methionin, Phosphatidycholin, Hydrocortison und Pluronic F68) für das Zellwachstum. Im serumfreien Medium wurden 79 % des Erythropoietin-Titers erreicht, der in dem mit 5 % dialysiertem fetalem Rinderserum supplementierten Medium

erzielt wurde. Allerdings wurden 80 % Konfidenzniveaus verwendet, um brauchbare Aussagen zu erhalten, und einige der signifikanten Variablen sind unklar (z. B. Pluronic F68) [142]. Chun et al. (2003) verwendeten ein vollfaktorielles Design, um effektive Wachstumsfaktoren im Kulturmedium zu identifizieren. Vier Wachstumsfaktoren wurden auf zwei Ebenen untersucht, sodass 16 Experimente durchgeführt werden mussten. Es wurden wichtige Wachstumsfaktoren identifiziert, allerdings wurden keine Mittelpunkte untersucht. Dadurch wurden keine Krümmungen in der Wirkungsfläche erkannt [143]. Rouiller et al. (2014) untersuchten sechs CHO-Zelllinien in zwei verschiedenen Kultivierungsmedien, denen sechs Komponenten in drei verschiedenen Stufen zugesetzt wurden. Es wurde ein zweistufiges fraktioniertes faktorielles Design implementiert und verschiedene Regressionsmodelle zur Identifizierung der aktiven Variablen verwendet [144]. Insgesamt wurden 384 Experimente durchgeführt, deren Umsetzung nur durch *High-Throughput*-Screenings mittels *Deep Well*-Plattensystemen möglich war. Dennoch gab es Schwankungen in der statistischen Signifikanz und mögliche aktive Variablen müssen in einem größeren Maßstab getestet werden [144].

Die Menge der durchzuführenden Experimente wird auch als die größte Herausforderung bei der Verwendung von Optimierungsdesigns gesehen. Das am häufigsten verwendete Optimierungsdesign ist das CCD. Yang et al. (2014) verwendeten ein CCD, um die Konzentration und den Zeitpunkt der Zugabe von Valproinsäure (VPA) bei der Kultivierung von drei verschiedenen CHO-Zelllinien zu optimieren. Schon die Untersuchung von zwei Faktoren für eine Zelllinie ergibt 8 Experimente, sodass insgesamt 24 Experimente durchgeführt werden mussten [145]. Torkashvand et al. (2015) optimierten die Konzentrationen von vier Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin und Glycin) im Zuström unter Verwendung eines BBDs. Die Faktoren wurden in drei Stufen untersucht, sodass 29 Experimente durchgeführt werden mussten [146]. Duvar et al. (2013) entwickelten ein Zufütterungsprotokoll für eine CHO-Kultur im Fed-Batch-Verfahren. Die Wahl eines D-optimalen Versuchsplans führte zu 18 Experimenten mit vier Faktoren (Zufütterungsmenge, Startpunkt, Zeitpunkt der Temperaturverschiebung und Osmolalität) [131].

Bei den zuvor genannten Studien führen die geplanten Experimente in der statistischen DoE zur Identifizierung aktiver Parameter und zur Optimierung des Bioprozesses. Allerdings kann die Implementierung von statistischer DoE zu zeit- und kostenintensiven Experimentierunden führen, insbesondere wenn sie im Fed-Batch-Prozess implementiert werden. Weiterhin wird die heuristische Auswahl von z. B. den Parametereinstellungen oder der Designauswahl kritisch gesehen. Diese beruhen auf benutzerdefinierten Einstellungen und erfordern meist einen hohen zeitlichen und experimentellen Aufwand. Wie die Untersuchung verschiedener Studien gezeigt hat, wird in den meisten Fällen keine ausreichende Begründung für die Wahl eines Versuchsplans geliefert. Darüber hinaus wird in der konventionellen DoE nur der Endpunkt von Experimenten untersucht und damit nur das Integral davon beurteilt. Der gesamte zeitliche Verlauf, mit z. B. Metabolitbildung oder Substrataufnahme, wird kaum reflektiert. Um die genannten Limitationen zu überwinden, verknüpfen modernere Ansätze mathematische Modelle mit DoE, dem mDoE, wodurch eine wissensbasierte Entwicklung von Kultivierungsprozessen ermöglicht wird.

3.4 Modellgestützte *Design of Experiments*-Methoden

Die Kombination von statistischer DoE mit mathematischen Prozessmodellen ist ein neuartiges Werkzeug - es ermöglicht eine wissensgetriebene Bioprozessentwicklung im Kontext von *Quality-by-Design* (QbD). Mit dieser Methode können die oben genannten Einschränkungen der alleinigen Anwendung von DoE-Methoden vermieden und sowohl das Design als auch die Optimierung von Bioprozessen verbessert werden. Im Gegensatz zur chemischen Industrie ist das Bioprozessdesign auf der Basis mathematischer Modelle in biopharmazeutischen Herstellungsprozessen mit tierischen und humanen Zellen jedoch wenig etabliert [147]. Nach Erfahrungen der Autoren aus Diskussionen und Projekten scheitert der Einsatz modellgestützter innovativer Methoden für die Prozessentwicklung bisher aus verschiedenen Gründen:

- Sie beruht auf dem fehlenden Wissen um die Möglichkeiten und Grenzen modellgestützter Methoden. Zusätzlich können „schlechten Erfahrungen“ mit modellgestützten Methoden, z. B. aufgrund unrealistischer Erwartungen, vorliegen.
- Es fehlt eine Methodenintegration für eine konsistente Entwicklungsstrategie, die an bestehende Arbeitsprozesse angepasst werden kann sowie ein vermuteter hoher (Modellierungs-) Aufwand und der Zweifel an der Übertragbarkeit von Methoden und Modellen auf andere Prozesse.
- Das Qualifikationsprofil des beteiligten Personals passt oft nicht (erforderlich: Biotechnologie, Verfahrenstechnik, Modellierung und Statistik).

Eine weitere Herausforderung ist die Anwendung von mathematischen Modellen auf die komplexen Stoffwechselwege hinsichtlich Zellwachstum und Produktbildung. Auch wenn mathematische Modelle ein vielversprechendes Werkzeug für die Entwicklung von stabilen Prozessen sind, die den Prinzipien von QbD entsprechen, wurden bisher nur Beispiele im Bereich der Produktaufbereitung und -reinigung veröffentlicht [22]. Unter anderem haben Möller et al. (2019) gezeigt, dass modellgestützte und -basierte DoE-Methoden großes Potenzial für die Entwicklung von Prozessstrategien haben und die Prozessentwicklung wissensbasierter machen [16]. Weiterführende Informationen finden sich bei Abt et al. (2018) und Kuchemüller et al. (2020) [24, 148].

Allgemeine Unterschiede zwischen modellbasierten und modellgestützten DoE-Methoden ergeben sich aus dem Ziel der empfohlenen Experimente. Die modellbasierte DoE (MBDoE) [149, 150] wird eingesetzt, um valide experimentelle Daten für eine präzise Modellstruktur und Modellparameteridentifikation zu liefern, wo die konventionelle statistische DoE versagen kann [151]. Unsicherheiten sind Schlüsselmessungen im MBDoE, da Modell- und Datenunvollkommenheiten unerwünschte Variationen der Modellparameter und Simulationsergebnisse verursachen [152]. Dies ist kritisch, da diese Unsicherheiten eine Diskrepanz zwischen berechneten und experimentellen Ergebnissen verursachen, was zu suboptimalen oder sogar sinnlosen Versuchsplänen für die Anpassung der

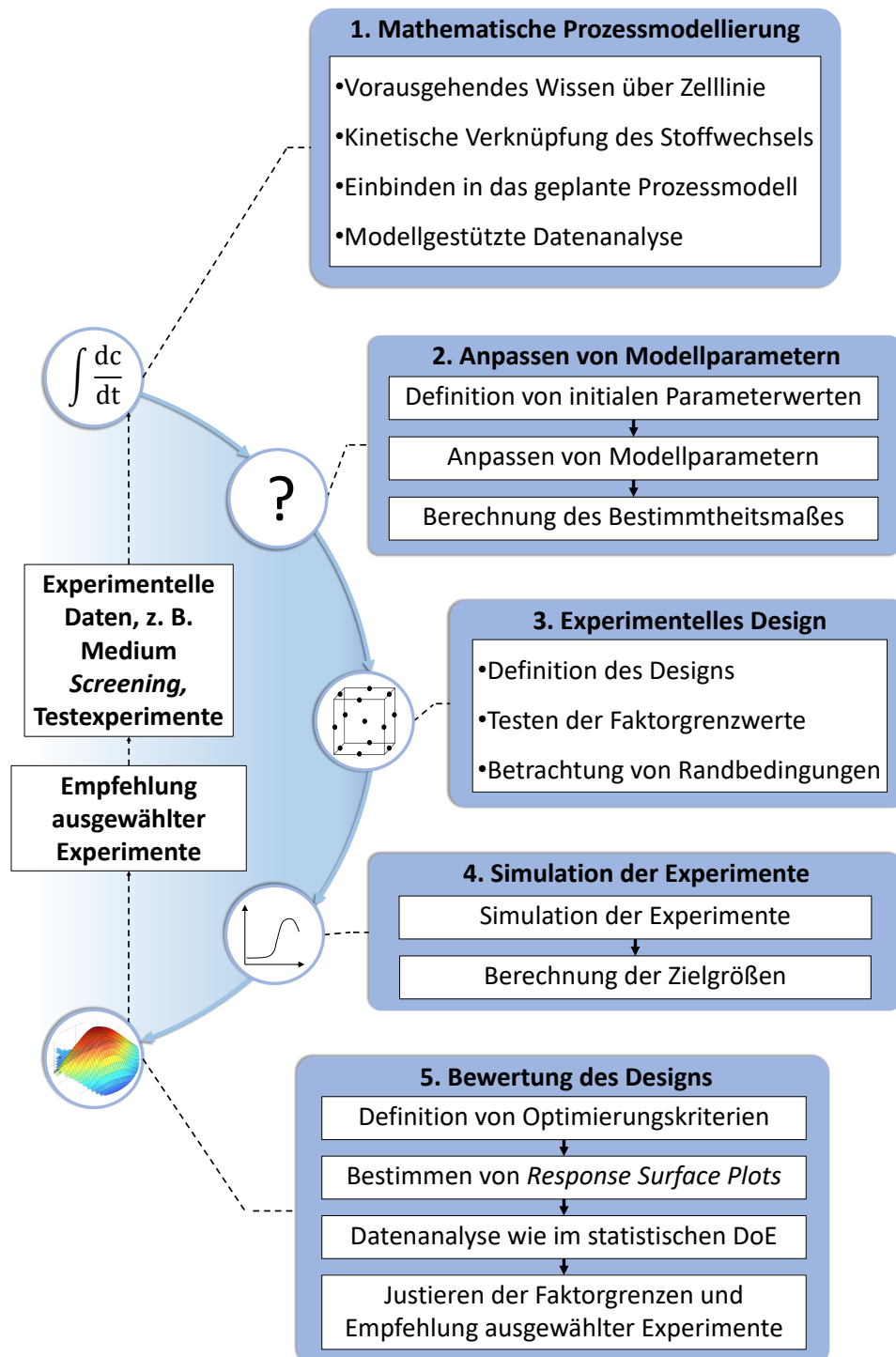


Abbildung 3.5: Struktur des modellgestützten *Design of Experiments*-Konzepts [16, 19].

Modellparameter führt. Um diese Probleme zu überwinden, hat sich ein sequenzieller Ansatz, wie in [24] gezeigt, als sehr effektiv erwiesen, indem er die Robustheit des MBDoe gegenüber parametrischen Unsicherheiten erhöht [153–155].

Beim mDoE wird ein prozessbezogenes Ziel, z. B. der Produkttiter, optimiert und das Modell unterstützt bei der Bewertung und Empfehlung von Versuchsplänen. Eine Struktur für ein modellgestütztes DoE-Konzept ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Zunächst wird ein mathematisches

Prozessmodell verwendet, um z. B. das Wachstum, die Substrat- und Metabolitkonzentrationen sowie die Produktivität einer bestimmten Zelllinie zu beschreiben. Dazu wird das Modell an erste Kultivierungsdaten (Abbildung 3.5, Kasten 1) angepasst, z. B. basierend auf Literatur und/oder vorhandenem Wissen. Mit den ausgewerteten Daten sollen typische Effekte, z. B. Inhibierungen oder Limitierungen, abgedeckt werden. Sicherlich ist die Anzahl der Experimente, die in diesem Stadium durchgeführt werden können, vorzugsweise in kleinem Maßstab, z. B. in Schüttelkolben oder *Deep-Well*-Plattensystemen [16, 20, 156], begrenzt. Für die Erstellung des mathematischen Modells sind jedoch nur wenige Experimente erforderlich [19, 156]. Dementsprechend ist die Anzahl der Experimente immer noch geringer als die Anzahl der Experimente, die in der statistischen DoE durchgeführt werden müssen. Basierend auf diesen Daten werden die Modellparameter angepasst (Abbildung 3.5, Kasten 2). Anschließend wird ein statistischer DoE-Versuchsplan (siehe Kapitel 3.3) gewählt (Abbildung 3.5, Kasten 3).

Ein Schema zur Auswahl eines Designs wird in den Ergebnissen erläutert (siehe Kapitel 6.1.4). Das Modell wird verwendet, um die Zielgrößen für jedes zuvor geplante Experiment zu simulieren (Abbildung 3.5, Kasten 4). Anschließend wird die anfängliche DoE in Bezug auf die definierten Faktorgrenzen sowie den Versuchsplan bewertet (siehe Abbildung 3.5, Kasten 5). Dies ermöglicht das Testen verschiedener Designs, Randbedingungen, Optimierungskriterien und Faktor- sowie Zielgrößen-Kombinationen *in silico*, bevor die Experimente experimentell durchgeführt werden. Dadurch können sowohl die mDoE-Methode als auch die Randbedingungen evaluiert und die Anzahl der Experimente deutlich reduziert werden. Zusätzlich können mit den Modellsimulationen verschiedene Designs ausgewählt und rechnerisch bewertet werden.

3.5 Mathematische Modellstrukturen

Obwohl die Anwendung von mathematischen Modellen für die Entwicklung anspruchsvoller Prozesse viele Vorteile bietet, wird sie in der Bioprozessentwicklung kaum eingesetzt. Gründe dafür sind u. a. die Vielfalt und Komplexität der mathematischen Modelle, z. B. unterschiedliche Mechanistik und Qualität der Vorhersagen (kürzlich in [157] besprochen). Aufgrund der Komplexität biologischer Prozesse können einfache Modelle ungeeignet sein, um reale Phänomene darzustellen. Es wurde dennoch vorgeschlagen, dass das Wachstum einer Zelllinie unabhängig von der Kultivierungsmethode, wie z. B. Batch- und Fed-Batch-Prozesse, der gleichen Kinetik folgt [158]. Auch bei komplexen Modellen kann sich das Verhalten der Zellen ändern und die Vorhersagen können vom beobachteten Verhalten abweichen. Gründe dafür sind die unzureichende Genauigkeit der approximierten Modellkoeffizienten und die Komplexität bei der Bestimmung der Modellparameter. Daher muss für jede Anwendung ein Kompromiss zwischen der Genauigkeit des Modells und dem erforderlichen experimentellen Aufwand zur Bestimmung der Parameter gefunden werden [159].

Bioprozessbezogene mathematische Modelle werden entweder nach der Beschreibung des Zellmetabolismus klassifiziert (ingenieurmäßiger Ansatz) oder nach der implementierten Modellstruktur

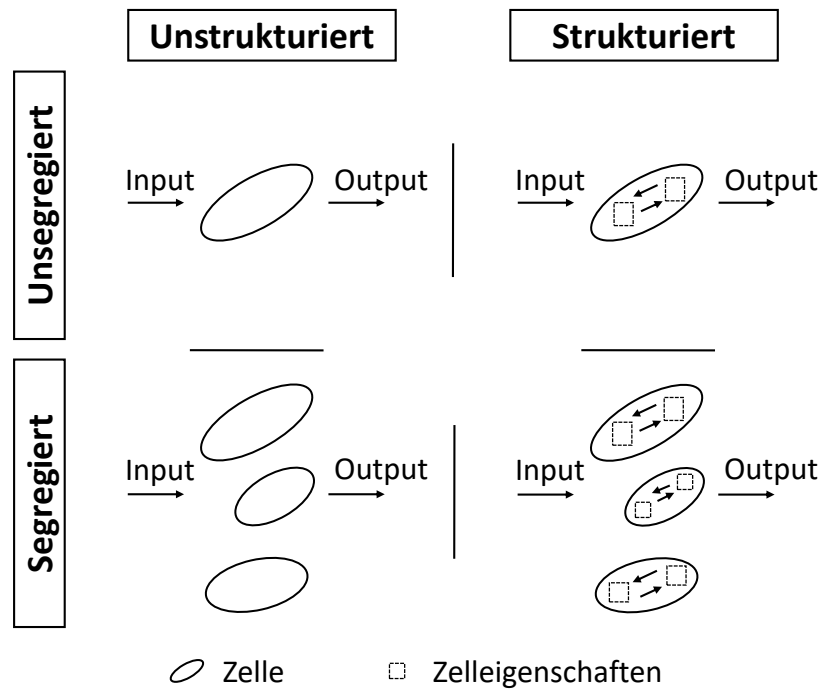


Abbildung 3.6: Klassifizierung von mathematischen Prozessmodellen in unstrukturiert, strukturiert, unsegregiert und segregiert. Modifiziert nach [160]

(z. B. neuronale Netze, Fuzzy-Logik). Dieses Kapitel konzentriert sich auf biophasenklassifizierte Modelle, die historisch nach ihrer strukturellen Komplexität geordnet sind, wie in Abbildung 3.6 dargestellt. Auch wenn diese Klassifizierung in den 1990er Jahren vorgenommen wurde, ist sie für die hier behandelte Klasse von Modellen immer noch gültig.

Unstrukturierte und unsegregierte Modelle beschreiben die Biophase als eine Komponente und verwenden kinetische Gleichungen, um deren Interaktion und Reaktion auf die Umgebung zu beschreiben, z. B. die Auswirkung der D-Glukosekonzentration auf das Zellwachstum. Sie sind für industrielle Anwendungen weit verbreitet und gehören zum Stand der Technik [161]. Vorteilhaft ist, dass die Schätzung der Modellparameter auf nur wenigen gemessenen Konzentrationen basiert [162]. Zudem wurde kürzlich eine Methode zur wissensbasierten Entwicklung von Kroll et al. (2017) entwickelt [163]. Mit der Entwicklung neuartiger analytischer Methoden wurden **strukturierte und unsegregierte** Modelle entwickelt. Die zellulären Eigenschaften werden durch "Durchschnittszellen" repräsentiert, die gleiche physiologische, morphologische und genetische Identitäten aufweisen [87, 164]. Sie zielen darauf ab, intrazelluläre Stoffwechselforgänge in ansonsten durchschnittlichen Zellen zu beschreiben. Die meisten Beispiele versuchen, die intrinsische Komplexität des Zellstoffwechsels zu untersuchen. Die Flussbilanzanalyse, die meist in der Systembiologie eingesetzt wird, wird zusätzlich der strukturierten Modellklasse zugeordnet [165, 166].

In **unstrukturierten und segregierten** Modellen werden verschiedene getrennte Zellpopulationen mit der Beschreibung des Stoffwechsels durch kinetische Massengleichungen modelliert [167]. Der Anwendungsbereich ist breiter und führt zur Bestimmung der Zellkulturqualität und zum Verständnis

des Zellkultivierungsprozesses. Exemplarisch wurden zellzyklusabhängige Populationsbilanzmodelle vorgestellt [167–169]. Dabei werden verschiedene zellzyklusabhängige Wachstumsraten, Stoffwechselaktivitäten und DNA-Replikationsraten modelliert und Stoffwechselregulationen untersucht, wobei der Komplexitätsgrad und die Rechenleistung von wenigen Sekunden bis zu mehreren Stunden deutlich variieren. Daher erfordern sie ein umfassendes Wissen über die Mechanismen und viele Daten zur Schätzung der Modellparameter. **Segregierte und strukturierte** Modelle beschreiben die Natur von Zellkulturen mit individuellem Einzelzellstoffwechsel und deren Interaktion mit dem Medium. Sanderson et al. (1999) stellten ein Einzelzellmodell vor, das die Interaktion von 50 Komponenten im Medium, Zytoplasma und Mitochondrien für eine antikörperproduzierende CHO-Zelllinie beschreibt [170]. Weitere Beispiele wurden für Baculovirus-infizierte Insektenzellkulturen [171] und den Aminosäurestoffwechsel von HEK293- und CHO-Zellen [172] gefunden. Allerdings sind die Rechenleistung und die Datenmenge, die zur Schätzung der Modellparameter benötigt werden, immer noch beträchtlich, was ihre industrielle Anwendung einschränken kann.

3.5.1 Metabolismus tierischer und humaner Zellen

Für die hier verwendeten mathematischen Modelle wird der Zellmetabolismus auf makroskopischer Ebene betrachtet. Es werden nur die extrazellulär beobachtbaren Effekte beschrieben, die auf den essentiellen Energielieferanten *in vitro*, D-Glukose und L-Glutamin, basieren [173]. Als Quellen für den Metabolismus der Zellen werden diese Komponenten unter anderem in der Glykolyse und Glutaminolyse und anschließend im Tricarbonsäure- (TCA-) Zyklus (Abbildung 3.7) verwendet. In der Glykolyse wird D-Glukose zu Pyruvat metabolisiert, sodass pro 1 Mol D-Glukose 2 Mol Pyruvat, 2 Mol Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und 2 Mol Adenosintriphosphat (ATP) entstehen. Das Pyruvat kann anschließend vollständig im TCA-Zyklus zu CO₂ und H₂O umgewandelt werden, wobei maximal 36 Mol ATP pro 1 Mol D-Glukose entstehen. Bei einer ineffektiven Reduktion des Pyruvats zu L-Laktat (1,1 - 1,7 Mol L-Laktat pro 1 Mol D-Glukose [88]) werden 2 Mol ATP pro 1 Mol D-Glukose gebildet. L-Glutamin kann vollständig zu CO₂ und H₂O oder unvollständig zu Aspartat bzw. L-Laktat oxidiert werden, sodass maximal 21 Mol, 12 Mol oder 6 Mol ATP pro 1 Mol L-Glutamin entstehen. Während der Glutaminolyse werden zusätzlich 2 Mol Ammonium pro 1 Mol L-Glutamin bei der Umwandlung zu L-Glutamat abgespalten. Das L-Glutamat wird zu α -Ketoglutarat verstoffwechselt und im TCA-Zyklus verbraucht [174].

Allerdings verändert sich das Stoffwechsellmuster *in vitro* und wird stark dereguliert. Der hohe und ineffiziente Verbrauch der beiden Substrate führt zur Akkumulation der Metaboliten L-Laktat und Ammonium [89]. Eine mögliche Erklärung bietet die ineffiziente Nutzung der zwei Hauptkomponenten zur schnellen Bereitstellung von Energie (Warburg Effekt) [175, 176], ist aktuell jedoch noch Stand der Forschung. Durch die Akkumulation von L-Laktat tritt eine Erhöhung der Osmolalität ein, die vor allem in Kombination mit einem geringen pH-Wert zu einer Inhibierung des Zellwachstums führen kann [177, 178]. Gleichzeitig kann eine zu hohe Ammoniumkonzentration den Zelltod einleiten [69]. Jedoch wiesen Lüdemann et. al. (1994) nach, dass eine Konzentrationserhöhung von

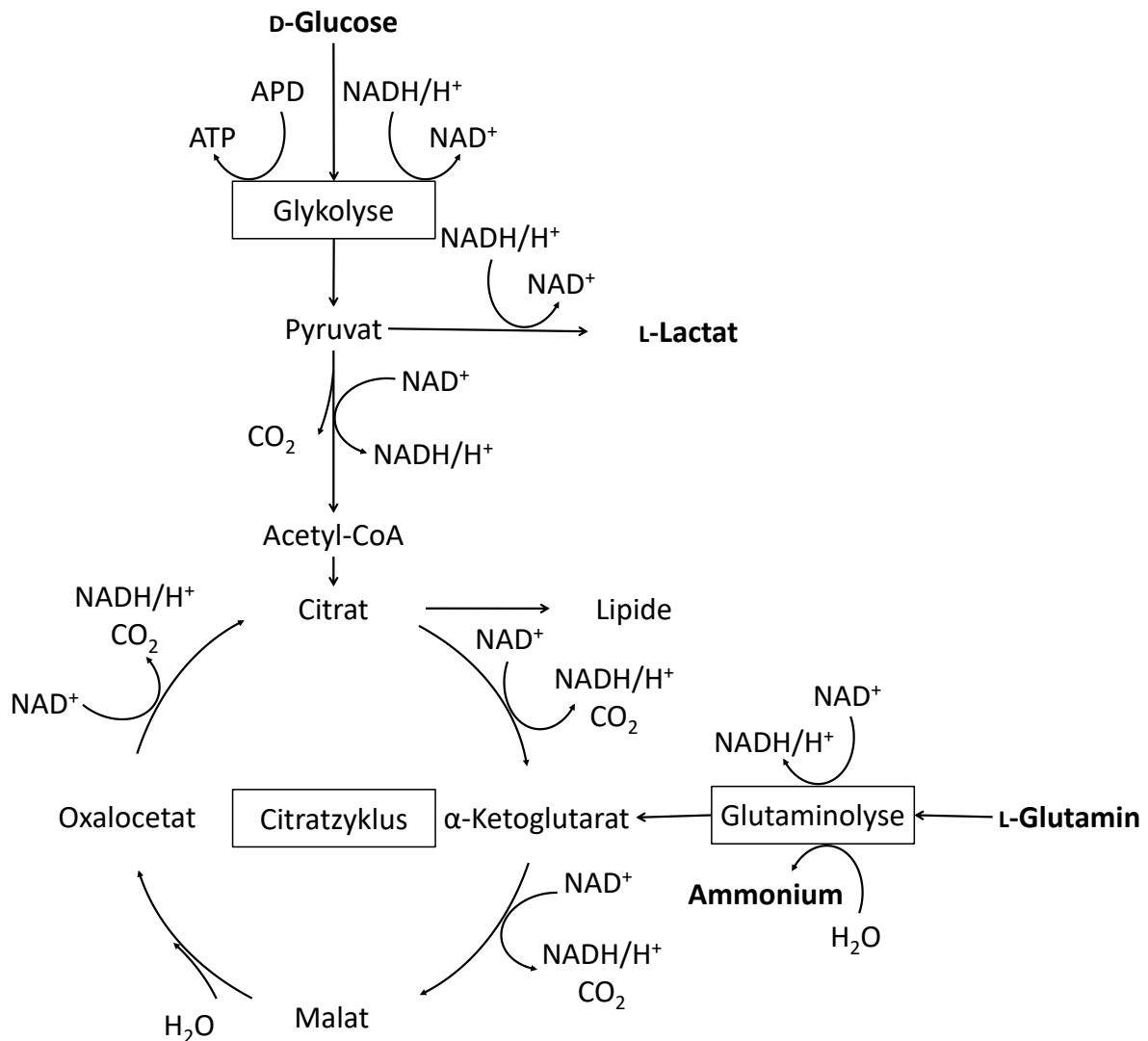


Abbildung 3.7: Metabolismus von tierischen und humanen Zellen. Die modifizierte und vereinfachte Grafik basiert auf [173].

Ammonium von $3,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ das Zellwachstum erst bei Erhöhung des pH-Wertes inhibierte, da dies einen starken Anstieg der undissoziierten Ammoniakkonzentration initiierte [179]. Daher ist die Akkumulation von L-Laktat und Ammonium sowie der pH-Wert bei der Kultivierung zwingend zu überwachen. Diese Effekte stehen in Abhängigkeit zur verwendeten Zelllinie [174] (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Inhibierende Werte der Ammonium- und L-Laktatkonzentration in Abhängigkeit zur Zelllinie. Basierend auf [106, 178, 180–183].

Zelllinie	$c_{I, \text{Amm}}$ [mmol l ⁻¹]	$c_{I, \text{Lac}}$ [mmol l ⁻¹]
CHO	$\tilde{x} = 6,5$	$\tilde{x} = 53$
MSC	> 2	> 25

Ergebnisse verschiedener Studien [178, 180–182] zeigen, dass inhibierende Effekte bei CHO-Zelllinien im Bereich von 2 - 20 mmol l⁻¹ auftreten können (geregelter pH-Wert). Die Konzentrationen von L-Laktat hingegen führen bei geregelter pH-Wert erst bei hohen Konzentrationen im Bereich von 25 - 110 mmol l⁻¹ zu inhibierenden Effekten. Die Ergebnisse sind allerdings nur ein Indiz für die inhibierenden Effekte, da in allen Studien verschiedene pH Regulationen durchgeführt wurden. Nach [106, 183] liegen inhibierende Werte für L-Laktat und Ammonium bei > 25 mmol l⁻¹ und > 2 mmol l⁻¹ bei MSC-Kultivierungen vor. Ein ausführlicher Vergleich verschiedener Literaturergebnisse für MSC-Kultivierungen ist aufgrund der Datenlage nicht möglich. Des Weiteren sind keine Werte für die L929-Zellen in der Literatur genannt.

4 Experimentelle Methoden

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten grundlegenden Zellkulturtechniken, aufgeteilt in die statische Kultivierung in Kunststoffzellkulturflaschen und die dynamische Kultivierung auf MCs, erläutert. Es werden die jeweiligen Vorbereitungsschritte genannt und im Anschluss die Probenanalytik beschrieben. Dabei basieren die Materialien und Methoden zum Teil auf etablierten Methoden des Instituts für Bioprocess- und Biosystemtechnik (Technische Universität Hamburg). Diese Methoden wurden für die Kultivierung von adhärent-wachsenden Zellen angepasst. Der Fokus lag dabei auf dem anwendungsbezogenen Vergleich spezifischer Methoden.

4.1 Zelllinien

Suspensions-adaptierte CHO DP12-Zellen (bereitgestellt von Prof. T. Noll, Universität Bielefeld, Deutschland) sowie adhärent-wachsende L929-Zellen (NCTC clone 929, ATCC, USA) und hMSC-TERT (bereitgestellt von Prof. M. Kassem, Süddänische Universität, Dänemark und Dr.-Ing. D. Salzig, Technische Hochschule Mittelhessen, Deutschland) wurden in allen nachfolgenden Studien verwendet. Die Zellen wurden jeweils in flüssigem Stickstoff im Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik (Technische Universität Hamburg) gelagert. Die Zellkonzentration betrug $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen.

4.2 Kultivierungsbedingungen und Prozessführung

Die adhärent-wachsenden Zellen wurden in DMEM (PAN-Biotech GmbH, Deutschland) mit 10 vol-% FBS ((FBS Superior, Biochron GmbH, Deutschland) - L929 sowie (PAN-Biotech GmbH, Deutschland) - hMSC-TERT) kultiviert. In Abhängigkeit vom Versuchsaufbau wurden spezifische Substratkonzentrationen an D-Glukose (Sigma-Aldrich, USA) und L-Glutamin (Lonza Group AG, Schweiz) supplementiert. Dem Kultivierungsmedium der L929-Zellen wurde zusätzlich 1 vol-% Penicilin/Streptomycin (Corning, USA) hinzugefügt und es wurden insgesamt zwei Inkubatoren zur Kultivierung verwendet. In Inkubator 1 (HeraCell 150i, Thermo Fischer, USA) wurden die statischen Kultivierungen und in Inkubator 2 (Heraeus HeraCell, Thermo Fischer, USA) die dynamischen Kultivierungen bei einer Schüttelfrequenz von 60 rpm (Orbitalschüttler, Auslenkung 10 mm, GFL 3005, GFL, Deutschland) durchgeführt. In beiden Inkubatoren wurde die Temperatur auf 37 °C und 5 vol-% CO₂ eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit wurde nicht kontrolliert.

Statische Kultivierungen wurden in Kunststoffzellkulturflaschen (T-Flaschen, Greiner Bio-One, Österreich) und dynamische Kultivierungen im Schüttelkolben (Schott AG, USA) und einem STR (Medorex Vario 1000, MDX Biotechnik, Deutschland) durchgeführt. Für die dynamischen Kultivierungen wurden verschiedene MCs in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Es standen

Cytodex 3 (GE HealthCare, USA) und SoloHill (Sartorius, Deutschland) MCs zur Verfügung. Zu den SoloHill MCs zählten Hillex II, Plastic, PlasticPlus, StarPlus, FACT III und CollagenCoated. Die Spezifikationen der einzelnen MCs sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Spezifikationen der verwendeten nicht-porösen Microcarrier (Cytodex 3 und alle SoloHill MCs). Cytodex 3, Collagen Coated und FACT III enthalten tierische Komponenten, während die übrigen MCs xeno-frei sind.

MC	Matrix	Dichte [g ml ⁻¹]	Oberfläche [cm ² g ⁻¹]	Beschichtung	Ladung
Cytodex 3	Dextran	1,04	2700	Kollagen	keine
Collagen Coated	PS	1,02	360	Kollagen	keine
FACT III	PS	1,02	360	Kollagen	+
Hillex II	Dextran	1,11	515	TMA	+
Plastic	PS	1,02	360	keine	keine
PlasticPlus	PS	1,02	360	keine	+
StarPlus	PS	1,03	360	keine	+

PS: Polystyrol, TMA: Trimethylammonium

4.2.1 Statische Vorkultivierung und Passagieren adhärenter Zellen

Um die lag-Phase in den Kultivierungsexperimenten zu verkürzen, wurden die Zellen mit einer Ansäuferte von 5000 Zellen cm⁻² vorab in T-Flaschen kultiviert. Dafür wurden die Zellen aufgetaut und in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Carl Roth, Deutschland) überführt, um eine Beschädigung der Zellen durch die Dimethylsulfoxid (DMSO)-Einfrierlösung (Carl Roth, Deutschland) zu vermeiden. Die erhaltene Suspension wurde 4 min bei 200 xg zentrifugiert (Avanti J-26SXP, Beckmann Coulter, USA) und der Überstand entfernt. Das Zellpelett wurde in vorgewärmtem DMEM resuspendiert und in eine T-Flasche überführt. Kulturvolumina verschiedener planarer Systeme sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Kultur- und Trypsinvolumina verschiedener planarer Kultivierungssysteme.

System [-]	V _{Medium} [ml]	V _{Trypsin} [ml]
T-25	5	1
T-75	10	3
T-175	20	5

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % wurden die Zellen proteolytisch mit 1 vol-% Trypsin (Lonza Group AG, Schweiz) in PBS von der Wachstumsfläche gelöst. Dafür wurde das Medium abgenommen und die T-Flasche zweifach mit PBS ($V_{\text{PBS}} = V_{\text{Medium}}$) gewaschen. Anschließend wurde die Trypsinlösung (siehe Tabelle 4.2) aufgetragen und für 5 - 7 min inkubiert. Die enzymatische Proteolyse wurde durch die Zugabe von Medium ($V_{\text{Trypsin}} = V_{\text{Medium}}$) gestoppt, sodass im Anschluss mit der erhaltenen Zelllösung neue Kultivierungssysteme angeimpft wurden.

4.2.2 Gefäßsilikonisierung zur Zellkultivierung auf MCs

Eine Silikonisierung der Kulturgefäße war notwendig, um eine Anhaftung der MCs an den Gefäßwänden zu vermeiden. Hierzu wurden unter einem Abzug einige ml Sigmacote (Sigma-Aldrich, USA) in das jeweilige Gefäß überführt und zur Verteilung der Lösung in regelmäßigen Abständen rotiert und geschwenkt. Anschließend wurde das jeweilige Gefäß mit Reinstwasser gespült und in einem 60 °C Wärmeschrank (Thermo Scientific Heratherm, ThermoFisher Scientific, USA) über Nacht getrocknet.

4.2.3 Vorbereitung der MCs

Da die Cytodex 3 im Gegensatz zu den anderen MCs quellen müssen, wurden die Cytodex 3 in ein silikonisiertes Gefäß überführt und mit 100 ml PBS pro g MC über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein zweifacher Waschschrift mit 50 ml PBS durchgeführt. Die Vorbereitung der übrigen MCs begann zeitgleich mit den Waschschriften. Anschließend wurden die MCs für 20 min bei 121 °C autoklaviert (Varioklav, Thermo Fisher Scientific). Der PBS-Überstand wurde entfernt und nach einem Waschschrift mit Medium durch dieses ersetzt. Die Suspension wurde anschließend für einige Stunden zur Equilibrierung inkubiert.

4.2.4 Methoden zur Zellernte

Für die Trennung der Zellen von den MCs standen verschiedene enzymatische sowie zelllyisierende Methoden zur Verfügung. Bei allen Methoden wurde jeweils 1 ml Probe entnommen und die MCs sedimentiert (1 - 3min, abhängig vom jeweiligen MC). Der Überstand wurde entnommen und für die Bestimmung der Suspensionszellzahl aufbewahrt. Im Anschluss wurde das jeweilige MC-Zellpelett 2-fach mit PBS bzw. mit PBS+2 mmol l⁻¹ EDTA gewaschen. Wichtig war hierbei, zwischen den Waschschriften die MCs erneut zu sedimentieren. Im Anschluss wurden die Proben, wie in Tabelle 4.3 dargestellt, behandelt.

Tabelle 4.3: Angepasste Methoden zum Ablösen der Zellen von den MCs. Die Methoden basieren teilweise auf internem Wissen sowie [184, 185].

Methode	Vorgehen
1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 0,5 ml Zellyse 1-Lösung 2. Vortexen der Probe (1 min) 3. Sedimentation (1 - 3min*) 4. Entnahme von 50 % des Überstands 5. Wiederholung 1 - 4
2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 0,5 ml Trypsin-Lösung 2. Inkubation für 7 min im Inkubator 1 (regelmäßiges klopfen) 3. Zugabe von 0,5 ml Medium 4. Sedimentation (1 - 3min*) 5. Entnahme des Überstands
3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung 2. Inkubation für 7 min im Inkubator 2 bei $5 \cdot N_{js}$ (regelmäßiges klopfen) 3. Zugabe von 0,5 ml Medium 4. Sedimentation (1 - 3min*) 5. Entnahme des Überstands
4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 1 ml Zellyse 2-Lösung (gut mischen) 2. Inkubation für 1 h im Inkubator 1 3. Erneut durchmischen und Sedimentation (1 - 3min*) 4. Entnahme des Überstands

* abhängig vom jeweiligen MC

Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich der Vorgehensweise und der verwendeten Materialien. Zellyse 1 besteht aus $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ Zitronensäure mit 1 % v/v IGEPAL, während Zellyse 2 aus $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ Zitronensäure mit 0,1 % Kristallviolett besteht. Die Enzymlösung basiert auf einem 1 vol-% Trypsin-Gemisch in PBS, während die Trypsin/EDTA-Lösung aus einer 1:1-Mischung von 0,25 vol-% Trypsin in PBS und 0,02 vol-% EDTA in PBS zusammengesetzt ist.

4.3 Kultivierungsprotokoll im Schüttelkolben

Zur Beurteilung der Methoden wurden verschiedene Kultivierungen in Glas-Schüttelkolben mit Arbeitsvolumen von 25 ml, 40 ml und 60 ml durchgeführt. Entgegen den gängigen STRs und Spinnerflaschen wurde hier bewusst der Fokus auf die Kultivierung in Schüttelkolben als Alternative zu den gängigen STRs und Spinnerflaschen gelegt. Schüttelkolben stellen eine erfolgsversprechende, leicht zu handhabende Alternative zu den üblichen Kultivierungssystemen dar. Die Zellansäichte betrug für die L929-Zellen jeweils $6000 \text{ Zellen cm}^{-2}$. Im Vergleich zu den statischen Systemen wurde die Zellzahl erhöht, um mögliche Zellverluste, die durch nicht-Anhaften an den MCs entstehen, auszugleichen [186]. Bei den hMSC-TERT verblieb die Zellansäichte bei $5000 \text{ Zellen cm}^{-2}$, da geringe Ansäichten empfohlen werden [9, 92, 101].

Santos et al. (2011) und Schop et al. (2010) setzten verschiedene intermittierende Rührstrategien während der Aussaat erfolgreich ein [121, 187]. Des Weiteren zeigte Rafiq et al (2013), dass eine anfängliche Verzögerung des Rührers keine signifikante Auswirkung auf die Zellanhaftung oder -proliferation hatte und sich ähnliche lebensfähige Zellzahlen und Metabolitenprofile ergaben [11]. Daher wurden die Schüttelkolben zu Beginn eine Nacht ohne Bewegung inkubiert und im Anschluss die Schüttlergeschwindigkeit (GFL 3005, GFL, Deutschland) auf 60 rpm (Auslenkung 10 mm) eingestellt. Zur Bestimmung der Zellzahl und der Analyse des Mediums, wurden alle 24 h/48 h Proben entnommen. Beim *Bead-to-Bead*-Transfer wurde nach 3, 5 oder 7 Tagen 100 % frisches Medium und 25 %, 50 %, 75 % oder 100 % frische MC hinzugegeben.

4.4 Kultivierungsprotokoll im Bioreaktor

Die adhärent-wachsenden Zellen wurden im Bioreaktor Medorex Vario 1000 kultiviert. Schematisch ist der Aufbau des Bioreaktors in Abbildung 4.1 dargestellt. Der Reaktor ist mit einem Rührer und Sonden für Temperatur, pH-Wert und pO_2 ausgestattet. Es sind ein Begasungsrohr, zwei Steigrohre, ein Abluftkühler und ein Heizmantel verbaut.

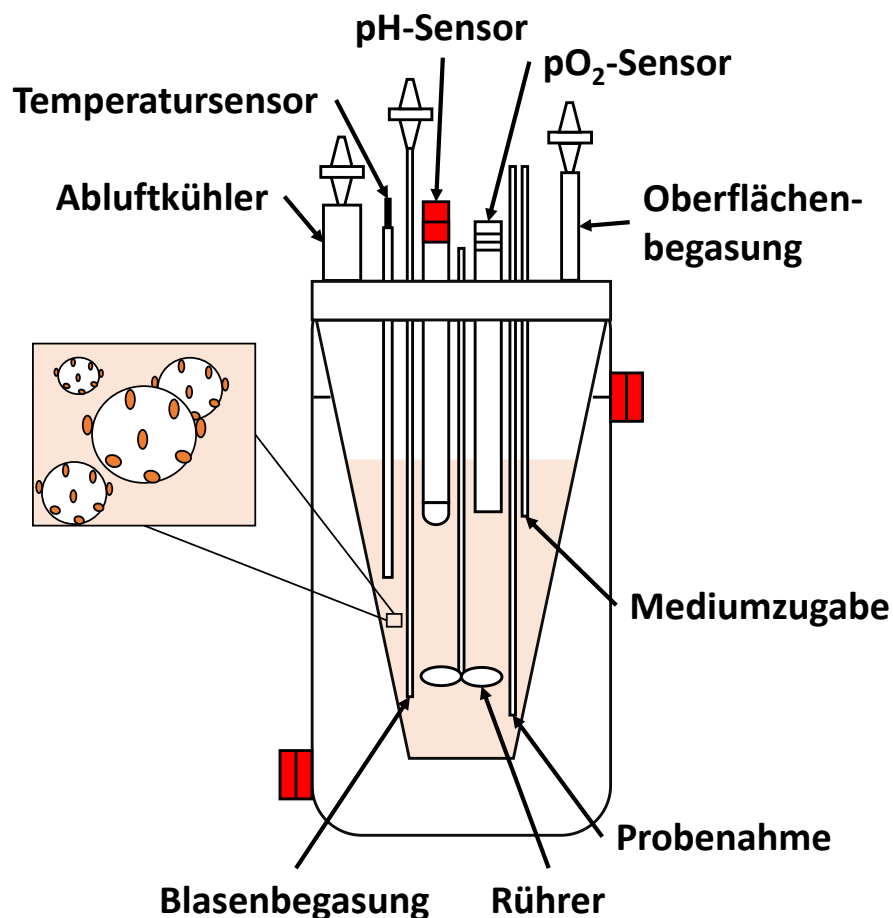


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Medorex Vario 1000.

Der Bioreaktor wurde nach dem Zusammenbau mit 150 mL PBS befüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das PBS über ein Steigrohr abgezogen und durch DMEM mit der gewünschten MC-Konzentration ersetzt (Arbeitsvolumen 100 ml). Mittels einer Spritze wurde mit 5000 Zellen cm^{-2} (L929) oder 6000 Zellen cm^{-2} (hMSC-TERT) angeimpft. Die Temperatur im Reaktor wurde über den Heizmantel mit angeschlossenem Wasserbad in allen Kultivierungen auf 37 °C gehalten. Über die gelöste CO_2 -Konzentration wurde der pH-Wert auf 7 geregelt. Die Begasung des Kulturmediums erfolgte über die Grenzfläche von Gas- zu Flüssigphase (Oberflächenbegasung). Der Sollwert für den pO_2 lag bei 40 %. Als Regelgröße wurde die Begasungsrate verwendet, wobei als letzter Schritt eine Blasenbegasung angeschlossen wurde. Über ein Probenahmeventil wurde alle 24 h/48 h eine Probe von 1 mL entnommen. Vor jeder Probe wurde dem Bioreaktor zusätzlich je 1 mL Totvolumen entnommen und verworfen.

4.5 Generelle Probenanalytik

Im Nachfolgenden wird die allgemeine Analytik zur Vermessung der Proben vorgestellt. Dabei werden verschiedene Methoden zur Zählung der Zellzahl beschrieben. Für die Zählung mit dem Durchflusszytometer und dem Partikelzähler wurden die Zellen vorab, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, von den MCs getrennt.

4.5.1 Zellzählung

Mit dem CytoFLEX (Beckman Coulter, USA) wurden mittels dem 585/42 Filter bei 488 nm Zellkerne quantifiziert. Dafür wurden die Zellkerne vorab mit Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich, USA) gefärbt und mit SSC-A gegen FSC-A gegatet. Dadurch konnten Zelltrümmer und Doubletten von nicht gefärbten lebensfähigen Zellen ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde ein Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter, USA) zur Zellzählung verwendet. Für die Messung wurde ein Gesamtvolumen von 10 ml eingesetzt und entsprechend der zu erwartenden Zellkonzentration mit PBS und 2 mmol l^{-1} EDTA verdünnt. Bei der Fluoreszenzfärbung mit SYBR Green I (SG) (Sigma-Aldrich, USA) kann die Zellzählung ohne eine vorherige Trennung der Zellen von den MCs durchgeführt werden. SG dringt in tote und lebende Zellen ein, die Intensität ist bei gelösten und anhaftenden Zellen gleich [188].

Für die Quantifizierung der Fluoreszenz mit der SG-Methode (Tabelle 4.3, Methode 1) wurde 1 ml Probe für 4 min bei 200 $\times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und durch PBS ersetzt. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzmessungen in einer schwarzen 96-Well-Platte (Corning, Deutschland) in Dreifachbestimmung mittels eines Mikrotiterplattenlesegeräts (Tecan Infinite Nano +, Tecan, Schweiz) durchgeführt. Pro Well wurden 50 μl Probe, 50 μl SG-Reaktionslösung und 100 μl PBS verwendet. Die 20x SG-Reaktionslösung wurde aus einer 400x Stocklösung in DMSO mit TE-Puffer (Carl Roth, Deutschland) angesetzt. Nach Zugabe der SG-Reaktionslösung wurde die Platte für 3 min inkubiert.

4.5.2 Viabilitätsmessung

Zur Bestimmung der Viabilität wurde eine 1 ml Probe für 3 min bei 400 xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach einem einmaligen Waschschrift mit PBS wurden 0,8 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein und 0,5 µl PI zur Probe hinzugegeben. Mittels des Eclipse 80i Fluoreszenzmikroskops (Nikon, Japan) wurden im Anschluss sowohl lebende Zellen bei einer Wellenlänge von 517 nm als auch toten Zellen bei 590 nm auf den MCs erfasst.

4.5.3 Bestimmung der Verteilung der Zellen auf den Trägern

Zur Beurteilung des Zellwachstums auf den MCs wurden Fluoreszenzfärbungen mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) (Carl Roth, Deutschland) vorgenommen. Die Proben wurden bei 200 xg für 3 min zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und die Proben in 70 vol-% Ethanol resuspendiert. Die Zwischenlagerung erfolgte in einem -20 °C Gefrierschrank (Bauknecht, Deutschland). Zum Mikroskopieren wurde der Ethanolüberstand der Proben abgenommen und mit PBS + 1 vol-% Triton X-100 + 0,1 vol-% DAPI ersetzt. Die Inkubation des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln über einen Zeitraum von 5 min. Im Anschluss wurden 50 µl Probe auf einen Objektträger mit Deckgläschen pipettiert. Mikroskopiert wurde bei 358 nm mit einem violetten Filter am Eclipse 80i Fluoreszenzmikroskop.

4.5.4 Analyse von Ammonium

Zur Messung von Ammonium wurde ein Ammonium-Kit (Nzytech, Portugal) verwendet. Die Vorbereitung der Messung wurde nach der im Kit enthaltenen Anleitung [189] in Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.5.5 Analyse von D-Glukose, L-Glutamin und L-Laktat

Zur Messung der D-Glucose-, L-Laktat- und L-Glutaminkonzentration wurde der biochemische Analysator YSI 2900 (YSI Life Science, USA) verwendet. Vorbereitend wurden die Proben mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt, in die YSI-Probenkammer eingesetzt und in Dreifachbestimmung gemessen.

4.6 Differenzierung und Charakterisierung der hMSC-TERT

Für die Differenzierung und Charakterisierung wurden hMSC-TERT verschiedener Passagen (40+ und 88+) verwendet. Die Spezialisierungsfähigkeit der Zellen wurde nach statischer sowie dynamischer Kultivierung überprüft. Für die Differenzierungsstudien wurden Differenzierungskits der Firma Miltenyi Biotec (Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden, wie im Handbuch beschrieben, vorbereitet und behandelt, wobei Abweichungen nachfolgend aufgeführt werden.

Um die Adipogenese zu initiieren, wurden Zellen in einem ClipMax (Faust, Schweiz) mit einer Animpfkonzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen ml^{-1} in Standard-Zellkulturmedium ausgesät und nach einer Inkubationsphase von 48 h durch Adipogenese-Differenzierungsmedium ersetzt. Nach einer Kultivierungszeit von 13 - 28 Tagen, wobei alle 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel erfolgte, wurden die Adipozyten gefärbt. Die Lipidanreicherung in den Adipozyten wurde mit einer Ölrot O-Färbung nach einer Fixierung mit Methanol bestätigt. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Hämalaun-Lösung angefärbt.

Bei der osteogenen Differenzierung wurden $3 \cdot 10^4$ Zellen ml^{-1} in einem ClipMax ausgesät und für 14 - 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage. Die Bildung einer Knochenmatrix als Folge der Kalziumanreicherung wurde durch Alizarinrot-Färbung nach einer Ethanol-Fixierung bestätigt.

Die Chondrogenese wurde in 15 ml konischen Zentrifugationsröhrchen eingeleitet, indem die inokulierten Zellen mit einer Aussaatdichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1} als Zellpelett in Chondrogenese-Differenzierungsmedium überführt wurden. Nach Mediumwechsel alle 2 - 3 Tage und einer Kultivierungszeit von 20 - 24 Tagen wurde das Proteoglykan Aggrecan der extrazellulären Matrix mittels einer Alcianblau und Kernechtrotfärbung angefärbt. Zur besseren Visualisierung der Knorpel wurden vorab Schnitten der Noduli erstellt.

Um die Oberflächenmarker der hMSC-TERT nachzuweisen, wurde ein MSC Phenotyping Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Das integrierte CD73-APC-Konjugat wurde gegen ein CD73-PE-Konjugat ausgetauscht. Die jeweilige Probe wurde mit dem Phänotypisierungscocktail markiert und im CytoFLEX mittels 585/42, PB450, FITC und KOS525 Filter bei 488 nm vermessen. Gleichzeitig wurde jeweils eine Probe als Isotypekontrolle vorbereitet und zur Bestimmung unspezifischer Bindungen vermessen.

5 *In silico*-Methoden

Die modellgestützten Methoden, die in dieser Arbeit Anwendung finden, werden im nachfolgenden Kapitel vorgestellt. Des Weiteren fungieren die modellgestützten Methoden unter anderem als Bausteine des mDoE-Workflows.

5.1 Modellgestützte DoE-Software

In einer universitätsübergreifenden Arbeitsgruppe um Prof. R. Pörtner und Dr.-Ing. J. Möller (Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik, Technische Universität Hamburg) wurde unter Mitarbeit der Autorin eine Toolbox auf Basis des mDoE-Konzepts (mDoE-Toolbox) entwickelt [19]. Diese wurde in Matlab R2018b (The MathWorks Inc., USA) und RStudio (RStudio Inc., USA) implementiert und dient der Verknüpfung von mathematischen Modellen der Zellkultivierung mit statistischen DoE-Methoden. Grafisch ist das Vorgehen zur Verwendung der mDoE-Toolbox in Abbildung 5.1 dargestellt.

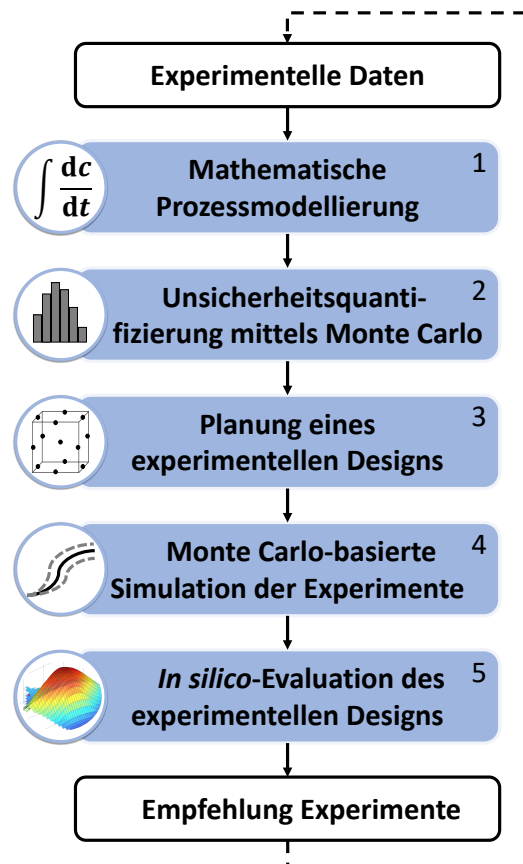


Abbildung 5.1: Workflow der mDoE-Toolbox, basierend auf mathematischen Prozessmodellen und statistischen DoE-Methoden. Eine detaillierte Beschreibung der mDoE-Toolbox ist [19] zu entnehmen.

Zur Modellierung des biotechnologischen Systems wird basierend auf der Datenanalyse zu Ursache-Wirkungsbeziehungen ein mathematisches Prozessmodell an erste Kultivierungsdaten (z. B. Literatur und/oder vorhandenes Wissen) angepasst (Abbildung 5.1, Kasten 1). Basierend auf den zugrundeliegenden Daten werden ebenfalls die Modellparameter angepasst und modellparametrische Unsicherheiten zur Darstellung experimenteller Unsicherheiten (z. B. Messfehler) mittels des Monte Carlo-Samplings bestimmt (Abbildung 5.1, Kasten 2). Anschließend wird ein Versuchsplan gewählt und die Randbedingungen definiert (Abbildung 5.1, Kasten 3). Die empfohlenen Experimente werden unter Berücksichtigung der zuvor bestimmten Prozessvariabilität mehrmals simuliert (Monte Carlo-Simulationen), mittels RSM zur Erstellung von Grafiken verwendet und Empfehlungen für Experimente ausgegeben (Abbildung 5.1, Kasten 4-5). Zusätzlich können verschiedene Versuchspläne, Randbedingungen, Optimierungskriterien und Faktor- sowie Zielgrößen-Kombinationen *in silico* getestet werden, bevor schlussendlich die Experimente durchgeführt werden. Eine detaillierte Beschreibung ist in [19] zu finden.

5.1.1 Mathematische Modelle

Mathematische Prozessmodelle für die Beschreibung des Wachstumsverhaltens von CHO DP12-Zellen wurden bereits erfolgreich für Batch- sowie Fed-Batch-Prozesse verwendet [16]. Daher werden die mathematischen Modelle der CHO DP12-Zellen nachfolgend vorgestellt. Da für die Beschreibung von adhären-wachsenden Zellen zu Beginn der Arbeit keine mathematischen Prozessmodelle zur Verfügung standen, werden diese in den Ergebnissen aufgeführt.

Mathematisches Batch-Modell für CHO DP12-Zellen

Das mathematische Prozessmodell [16] der CHO DP12-Zellen ist für das Batch-Verfahren in Tabelle 6.5 dargestellt. Es basiert auf der Verknüpfung der Hauptsubstrate D-Glukose (c_{Glc}) und L-Glutamin (c_{Gln}) sowie der Hauptmetaboliten L-Laktat (c_{Lac}) und Ammonium (c_{Amm}). Dadurch kann das Verhalten der Zellen (X_t - Gesamtzelldichte, und X_v - lebensfähige Zelldichte) beschrieben werden.

Das Zellwachstum wird mit den kinetischen Parametern $K_{S,i}$ ($i = \text{Glc}, \text{Gln}$), einer maximalen Wachstumsrate (μ_{max}), einer Zellysekonstante (K_{Lys}) sowie einer minimalen ($\mu_{\text{d, min}}$) und einer maximalen Absterberate ($\mu_{\text{d, max}}$) modelliert (Gleichung 5.1, 5.3, 5.2, 5.4). Da im Batchbetrieb keine Hemmung des Zellwachstums festgestellt wurde, sind hemmende Komponenten im Modell nicht berücksichtigt. Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ (Gleichung 5.2) und der spezifischen Sterberate μ_{d} (Gleichung 5.4) basiert daher auf einer Monod-ähnlichen Struktur der Substrate D-Glukose und L-Glutamin. Die zellspezifischen Aufnahmeraten von D-Glukose und L-Glutamin hängen im Gegensatz zum Wachstum nur von der jeweils aktuellen D-Glukose- oder L-Glutaminkonzentration ab (Gleichung 5.6, 5.8, 5.7, 5.9). Allerdings ist die Aufnahmerate von D-Glukose bei niedrigen Konzentrationen reduziert. Die Konzentrationen von L-Laktat und Ammonium sind proportional zu den

Tabelle 5.1: Modifiziertes mathematisches Modell für CHO DP12-Zellen im Batch-Prozess [16]

Differentialgleichungen	Kinetische Verknüpfungen
Zellzahlen	
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X_v$ (5.1)	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{\text{Glc}}}{K_{s,\text{Glc}} + c_{\text{Glc}}} \cdot \frac{c_{\text{Gln}}}{K_{s,\text{Gln}} + c_{\text{Gln}}}$ (5.2)
$\frac{dX_t}{dt} = \mu \cdot X_v - k_{\text{Lys}} \cdot (X_t - X_v)$ (5.3)	$\mu_d = \mu_{d,\min} + \mu_{d,\max} \cdot \frac{K_{s,\text{Glc}}}{K_{s,\text{Glc}} + c_{\text{Glc}}}$ (5.4)
$\frac{dV_i}{dt} = \frac{\frac{dX_v}{dt} \cdot X_t - \frac{dX_t}{dt} \cdot X_v}{X_t^2}$ (5.5)	
Substrate und Metaboliten	
$\frac{dc_{\text{Glc}}}{dt} = -q_{\text{Glc}} \cdot X_v$ (5.6)	$q_{\text{Glc}} = q_{\text{Glc},\max} \cdot \frac{c_{\text{Glc}}}{k_{\text{Glc}} + c_{\text{Glc}}} \cdot \left(\frac{\mu}{\mu + \mu_{\max}} + 0,5\right)$ (5.7)
$\frac{dc_{\text{Gln}}}{dt} = -q_{\text{Gln}} \cdot X_v$ (5.8)	$q_{\text{Gln}} = -q_{\text{Gln},\max} \cdot \frac{c_{\text{Gln}}}{k_{\text{Gln}} + c_{\text{Gln}}}$ (5.9)
$\frac{dc_{\text{Lac}}}{dt} = q_{\text{Lac}} \cdot X_v$ (5.10)	$q_{\text{Lac}} = Y_{\text{Lac}/\text{Glc}} \cdot q_{\text{Glc}} \cdot \frac{c_{\text{Glc}}}{c_{\text{Lac}}} - q_{\text{Lac},\text{up}}$ (5.11)
	$c_{\text{Glc}} < 0,5 \text{ mmol l}^{-1} : q_{\text{Lac},\text{up}} = q_{\text{Lac},\text{up},\max}$ (5.12)
$\frac{dc_{\text{Amm}}}{dt} = q_{\text{Amm}} \cdot X_v$ (5.13)	$q_{\text{Amm}} = Y_{\text{Amm}/\text{Gln}} \cdot q_{\text{Gln}}$ (5.14)
Produkt	
$\frac{dc_{\text{Ab}}}{dt} = q_{\text{Ab}} \cdot X_v$ (5.15)	$q_{\text{Ab}} = \alpha$ (5.16)
	$c_{\text{Glc}} < 1 \text{ mmol l}^{-1} : \frac{dc_{\text{Ab}}}{dt} = 0$ (5.17)

Aufnahmeraten von D-Glukose (L-Laktat) beziehungsweise L-Glutamin (Ammonium) (Gleichung 5.10, 5.13, 5.11, 5.14) und sind mit den Ausbeutekoeffizienten ($Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ und $Y_{\text{Lac}/\text{Glc}}$) verknüpft. Bei D-Glukosekonzentrationen unter $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ist eine Verschiebung der L-Laktatproduktion zur L-Laktataufnahme berücksichtigt (Gleichung 5.12). Die Antikörperproduktion (Gleichung 5.15, 5.16) beschreibt nach Frahm et al. (2002) die Produktion proportional zur lebensfähigen Zelldichte [181]. Glukosekonzentrationen unter 1 mmol l^{-1} stoppen die Antikörperproduktion (Gleichung 5.17).

Mathematisches Fed-Batch-Modell für CHO DP12-Zellen

Im Vergleich zum Batch-Modell ist beim mathematischen Modell im Fed-Batch-Verfahren die inhibierende Wirkung von Ammonium ($K_{i,\text{Amm}}, K_{S,\text{Amm}}$) in die Modellstruktur von μ und μ_d integriert (Gleichung 5.18, 5.19).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{\text{Glc}}}{K_{s,\text{Glc}} + c_{\text{Glc}}} \cdot \frac{c_{\text{Gln}}}{K_{s,\text{Gln}} + c_{\text{Gln}}} \cdot \frac{K_{i,\text{Amm}}}{K_{i,\text{Amm}} + c_{\text{Amm}}} \quad (5.18)$$

$$\mu_d = \mu_{d,\min} + \mu_{d,\max} \cdot \frac{K_{s,\text{Glc}}}{K_{s,\text{Glc}} + c_{\text{Glc}}} \cdot \frac{K_{s,\text{Gln}}}{K_{s,\text{Gln}} + c_{\text{Gln}}} \cdot \frac{c_{\text{Amm}}}{K_{s,\text{Amm}} + c_{\text{Amm}}} \quad (5.19)$$

Bei inhibiertem Wachstum wird gleichzeitig die Antikörperproduktion eingestellt, sodass das Modell um eine Begrenzung erweitert wurde. Bei Unterschreiten einer Glutaminkonzentration von $0,05 \text{ mmol l}^{-1}$ und bei Überschreiten der Ammoniumkonzentration von $K_{i,\text{Amm}}$ wird die Antikörperproduktion gestoppt (Gleichung 5.20, 5.21).

$$c_{\text{Amm}} \geq K_{i,\text{Amm}} : \frac{dc_{\text{Ab}}}{dt} = 0 \quad (5.20)$$

$$c_{\text{Gln}} < 0,05 \text{ mmol l}^{-1} : \frac{dc_{\text{Ab}}}{dt} = 0 \quad (5.21)$$

Insgesamt wird das Fed-Batch-Verfahren simuliert, indem eine Zufütterungsrate (F), das aktuelle Volumen (V) und die aktuelle Konzentration der Komponente i im Zustrom ($c_{F,i}$) zu den Gleichungen im Batch-Verfahren ergänzt wurden (Gleichung 5.22).

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F}{V} \cdot (c_{F,i} - c_i) + \frac{dc_{i,\text{batch}}}{dt} \quad (5.22)$$

5.1.2 Anpassen der Modellparameter als Basis der Unsicherheitsquantifizierung

Weighted non-linear least square-Methoden sind weit verbreitete Schätzverfahren für statische Optimierungsprobleme [190]. Ziel ist die Minimierung der quadratischen Abweichung zwischen n gemessenen $y_{k,i}$ und simulierten Datenpunkten $\hat{y}_{k,i}$ für l Variablen multipliziert mit einem Gewichtungsfaktor $w_{k,i}$ für $k = 1, \dots, l$ und $i = 1, \dots, n$ für einen festen Zeitraum $t = (t_1, \dots, t_n)$. Der Gewichtungsfaktor ermöglicht es, Größen eine höhere Bedeutung zuzuweisen, da beispielsweise einige Messwerte oder Datenpunkte im Vergleich zu anderen zuverlässiger sind. Gleichzeitig können Messabweichungen berücksichtigt oder die Vergleichbarkeit von Größen unterschiedlicher Dimension durch Standardisierung gewährleistet werden, wobei hier der Unterschied bei den nachfolgenden Gütefunktionalen liegt.

$$J = \sum_{k=1}^l \sum_{i=1}^n w_{k,i} \frac{(y_{k,i} - \hat{y}_{k,i})^2}{y_{k,i,\max}^2} \quad (5.23)$$

In Gleichung 5.23 wird die Standardisierung durch Division mit dem jeweiligen maximalen Messwert $y_{k,i,max}$ erreicht, wohingegen in Gleichung 5.24 zusätzlich ein normalverteilter Beobachtungsfehler von 5 % relativer Standardabweichung angenommen wurde. Dies basiert auf den typischen Messstandardabweichungen von analytischen Methoden in der Bioprozessbewertung (d. h. Expertenwissen) [191].

$$J = \sum_{k=1}^l \sum_{i=1}^n w_{k,i} \frac{(y_{k,i} - \hat{y}_{k,i})^2}{0,05 \cdot y_{k,i,max}^2} \quad (5.24)$$

Gleichung 5.25 berücksichtigt hingegen die Differenz von maximalem zu minimalem Messwert $y_{k,i}$. Durch Hinzunahme der Stichprobengröße n und dem Ziehen der Wurzel folgt die Standardabweichung des Prognosefehlers [192].

$$J = \sum_{k=1}^l \sum_{i=1}^n w_{k,i} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_{k,i} - \hat{y}_{k,i})^2} \cdot \frac{1}{y_{k,i,max} - y_{k,i,min}} \quad (5.25)$$

Niedrige Werte des jeweiligen Gütefunktionalen sprechen für einen geringen Vorhersagefehler des Modells. Zusätzlich wird das Bestimmtheitsmaß zur weiteren Beurteilung der Anpassung herangezogen (Gleichung 5.26). Das R^2 ergibt sich aus der Differenz der simulierten \hat{y}_i zu den gemessenen Daten y_i im Vergleich zum Mittelwert der gemessenen Daten \bar{y}_i [193].

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (5.26)$$

R^2 ist eins, wenn das Modell die Daten korrekt vorhersagt. Wenn R^2 gegen Null geht oder sogar negativ wird, wird keine gute Vorhersage prognostiziert. In Verwendung als Gütefunktional wird $-R^2$ minimiert (Gleichung 5.27).

$$J = -\frac{1}{l} \sum_{k=1}^l R^2 \quad (5.27)$$

In Verwendung innerhalb der mDoE-Methoden wurden die Gütefunktionale zur Bestimmung der spezifischen Modellparameter verwendet. Mithilfe der Modellparameter kann das Zellverhaltens beschrieben werden. Dabei wurden die Modellparameter je nach Zelllinie auf Grundlage verschiedener Datenmengen angepasst, indem das Gütefunktional minimiert wurde. Die CHO DP-12-Zellen wurden aufgrund ihrer großen Datenmenge zum Vergleich verschiedener Gütefunktionale herangezogen, während die L929-Zellen und hMSC-TERT mittels Gleichung 5.23 angepasst wurden. Nach

Anpassen der Modellparameter wurden diese als Startwerte zur Bestimmung der zu erwartenden Prozessvariabilität herangezogen. Hierfür wurden auf Basis der experimentellen Unsicherheit (z. B. Messfehler) die Modellparameter 1000-fach variiert und somit die Messfehler simuliert.

5.1.3 Definition von Versuchsplänen

Die Auswahl eines geeigneten Versuchsplans trägt essentiell zum Gelingen von Optimierungsproblematiken bei. Allerdings werden Versuchspläne oft nicht wissenschaftlich ausgewählt. Aufgrund präziser Vorhersagen ohne die Verwendung von dreistufigen faktoriellen Experimenten zur Erstellung eines quadratischen Modells zweiter Ordnung kann die Verwendung von BBD und CCD sinnvoll sein [135, 194]. Wenn Einstellungen benutzerspezifisch vorgenommen werden sollen, dann stehen optimale Versuchspläne zur Verfügung. Diesbezüglich gibt es Pläne, die sich auf präzise Schätzungen der Koeffizienten konzentrieren und Pläne, bei denen das primäre Ziel die Vorhersage ist. Für Optimierungsprozesse sind letztere von Bedeutung [126]. Nach Jones et al. [195] werden demnach I-optimale Designs empfohlen, wohingegen D-optimale Designs, die sich nicht auf die Vorhersage beziehen, am häufigsten eingesetzt werden [135]. Goel et al. [140] zeigten außerdem, dass durch die Verwendung einzelner Versuchspläne oft große Bereiche des Faktorraumes nicht abgedeckt werden. Die Kombination von beispielsweise LHS mit dem D-optimalem Design führt zu einer besseren Punkteverteilung über den Raum, wodurch gleichzeitig das Bias und das Rauschen reduziert werden.

Die wissenschaftliche Analyse mittels des mDoE-Konzepts bietet nun ein neuartiges Werkzeug zur fundierten Auswahl eines geeigneten Versuchsplans. Dafür wurden Optimalitätskriterien zur Evaluation implementiert. Da die Optimalitätskriterien einen Bezug zu Regressionsmodellen haben, werden diese und ausgewählte Optimalitätskriterien nachfolgend aufgeführt.

Beschreibung von Regressionsmodellen

Das einfachste Regressionsmodell ist das lineare Regressionsmodell, das den Einfluss der Anzahl n unabhängiger Faktoren x_i auf die zu analysierende Zielgröße y_i wie folgt darstellt [23, 196]:

$$y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \cdot x_i + \epsilon \quad (5.28)$$

Dabei sind β_i unbekannte Koeffizienten, die beispielsweise mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt werden können [138]. ϵ ist ein zufälliger Fehler mit einem Erwartungswert von 0 und einer homogenen Varianz von σ^2 . Für Versuchspläne in der Optimierung werden standardmäßig quadratische Modelle eingesetzt. Eine Erweiterung um zusätzliche Polynome führt zu einer Erhöhung der Anforderungen und die Zahl der Unbekannten steigt [23, 196] Dafür erfolgt, wie in Gleichung 5.29 dargestellt, eine Ergänzung des linearen Modells um zusätzliche Terme:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \epsilon \quad (5.29)$$

Durch die Aufnahme von Interaktionstermen $\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j$ werden zudem Krümmungen modelliert und Erkenntnisse darüber gewonnen, inwiefern Faktoren bestimmte Zielgrößen beeinflussen [23, 135, 196]. In Matrixschreibweise lässt sich das Regressionsmodell wie folgt formulieren:

$$\mathbf{y} = \beta \mathbf{X} + \epsilon \quad (5.30)$$

Die Modellmatrix X ist durch $n \times k$ aufgestellt, wobei n den experimentellen Versuchspunkten und k der Anzahl an Faktoren entspricht [197].

Definition der Optimalitätskriterien

Optimalitätskriterien werden generell als Kriterien zur Bewertung von Versuchsplänen verwendet, wohingegen optimale Versuchspläne einzelne Optimalitätskriterien minimieren bzw. maximieren, um Versuchspläne zu erstellen [198]. Historisch betrachtet, war die D-Optimalität von [199] das erste entwickelte Optimalitätskriterium. Es ist das am besten untersuchte Optimalitätskriterium und gehört durch seine einfache Berechenbarkeit noch immer zu den Standardalgorithmen [198]. Bei der D-Optimalität wird die Determinante der Informationsmatrix $X^T X$ maximiert bzw. die Inverse der Informationsmatrix minimiert, wobei X die Modellmatrix des Regressionsmodells darstellt [197]:

$$D_{\text{eff}} = 100 \frac{|X^T X|^{\frac{1}{p}}}{n} \quad (5.31)$$

Dabei dient n (Anzahl der Läufe) als Strafterm für große Designs und p steht für die Anzahl der Modellparameter. Ein weiteres Kriterium ist die G-Effizienz. Bei diesem Kriterium wird die maximale skalierte Vorhersagevarianz über den Versuchsplanbereich minimiert [198].

$$G_{\text{eff}} = 100 \frac{p}{n \hat{\sigma}_{\text{max}}^2} \quad (5.32)$$

$\hat{\sigma}_{\text{max}}^2$ entspricht dem Maximum der relativen Vorhersagevarianz, die sich aus Informationsmatrix und Kandidatenset x_{cand} , das auf dem Versuchsplan basiert, ergibt. Die IV-Optimalität, in der Literatur auch I-Optimalität und V-Optimalität genannt, basiert auf den Eigenschaften der skalierten Vorhersagevarianz. Anstatt die maximale Vorhersagevarianz im Interessensbereich zu finden, wird der Durchschnitt der Vorhersagevarianz im gesamten interessierenden Bereich verwendet. Dies ergibt

somit ein Maß für die Gesamtverteilung der Vorhersagevarianz. Ein Entwurf wird als IV-optimal bezeichnet, wenn er die normalisierte durchschnittliche integrierte Vorhersagevarianz minimiert [198]. M entspricht der Produktsummenmatrix $\frac{X^T X}{n}$.

$$IV_{\text{eff}} = \text{trace} \left[M(X^T X)^{-1} n \right] \quad (5.33)$$

5.1.4 Darstellung des Erwünschtheitsmaßes zur computergestützten Evaluation

Um verschiedene Versuchspläne, Faktorkombinationen und DoE-Einstellungen wissenschaftlich zu testen, auszuwerten und somit die Anzahl real durchzuführender Experimente zu reduzieren, müssen Optimierungsfunktionen zur Verfügung stehen. Die Versuchspläne wurden mit der mDoE-Toolbox sowie verfügbarer DoE-Software (DesignExpert 9, Statcon, USA) erstellt, die experimentellen Faktorkombinationen n -Mal unter Berücksichtigung der Parameterverteilungsfunktion simuliert (Monte Carlo-basiert) und die gemittelten Zielgrößen sowie deren Variabilität (Differenz der 90 %- und 10 %-Quantile) berechnet. Im Anschluss wurden die gemittelten Zielgrößen und die Variabilität in einer Erwünschtheitsfunktion zusammengefasst. Berücksichtigt wurde zudem, ob eine Zielgröße maximiert/minimiert werden sollte. Der Hauptvorteil der Erwünschtheitsfunktion ist die Standardisierung des multidimensionalen Optimierungsproblems zu einer Erwünschtheitsfunktion $d_i(r_i)$ zwischen 0 und 1. $d_i(r_i)$ ist 0, wenn das Optimierungskriterium nicht erfüllt ist. $d_i(r_i)$ tendiert zu 1, wenn die Optimierung erwünscht ist [200, 201].

$$d_i(r_i) = \begin{cases} 0 & r_i < L_i \\ \frac{r_i - L_i}{U_i - L_i} & L_i < r_i < U_i \\ 1 & r_i > U_i \end{cases} \quad (5.34)$$

L_i entspricht der unteren akzeptablen Grenze und U_i der oberen akzeptablen Grenze. Die Gesamt-Erwünschtheit D ergibt sich durch Multiplikation der verschiedenen Erwünschtheitsfunktionen $d_i(r_i)$.

$$D = \prod_{i=1}^n d_i(r_i) \quad (5.35)$$

Schlussendlich wurden nach einer Varianzanalyse (ANOVA, quadratische Prozessordnung) mit einem Signifikanzwert von $\alpha \leq 0,05$ (nachträglich ergänzt durch Autorin in R) RSM-Grafiken erstellt und optimale Prozessparameter ausgegeben.

5.2 Sensitivitätsanalyse

Die Sensitivität der Modellparameter innerhalb der Modellsimulationen wurde bestimmt, um eine Vergleichbarkeit verschiedener Kultivierungssysteme zu ermöglichen. Dafür wurde nacheinander jeweils ein Modellparameter k innerhalb der zuvor bestimmten Parameterverteilung variiert und der Einfluss der Parametervariation $\Theta(k)$ auf die maximale Zellzahl $X_{v, \max}$ untersucht (Gleichung 5.36) [202].

$$S = \frac{\Delta_{X_{v, \max}}}{\Delta_{\Theta(k)}} \quad (5.36)$$

6 Ergebnisse und Diskussion

Bisher wurde das mDoE-Konzept im biopharmazeutischen Bereich nur für die Prozessauslegung bei breiter vorliegender Datenlage angewendet. So wurden die mDoE-Methoden zur Optimierung von Medium- und Fütterungsstrategien erfolgreich umgesetzt [16, 19]. Diese Prozesse waren jedoch im Entwicklungsstadium weit vorangeschritten und somit das Zellverhalten bereits weitgehend analysiert. Obwohl ungeklärt ist, inwiefern die mDoE-Konzepte auf Prozesse des frühen Entwicklungsstadiums anwendbar sind, ist gerade in Early-Stage-Prozessen der Bedarf nach geeigneten Methoden zur wissensgetriebenen Prozessauslegung hoch. Daher wurde in dieser Thesis überprüft, inwiefern mDoE-Methoden für unterschiedliche Prozessstadien anwendbar sind. Hierfür wurden die Bausteine eines mDoEs definiert und zu einem mDoE-Workflow zusammengefasst. Dadurch wurde eine geordnete, wissensgetriebene Prozessauslegung ermöglicht.

Grundsätzlich wurden die mDoE-Methoden für verschiedene Stadien der Prozessauslegung bei suspendierbaren und adhärent-wachsenden Zellen untersucht und bewertet. Anhand der CHO DP12-Zellen wurde der mDoE-Workflow erstellt und während der Prozessauslegung der adhärent-wachsenden Zellen kontinuierlich angepasst. Mithilfe des mDoE-Workflows wurden die Prozesse der adhärent-wachsenden Zellen hinsichtlich der Zellausbeute ausgelegt. Dabei wurden bewusst zwei Prozesse ausgewählt, deren Entwicklungsstand sich beim Zeitpunkt Null befand.

Insgesamt lag ein besonderer Fokus auf der wissensbasierten Datenanalyse. Durch die kontinuierliche Steigerung des Prozessverständnisses wurden wissensgetriebenen Strategien sowie Methoden entwickelt und die modellgestützte Auslegung der Prozesse ermöglicht es, fundierte Annahmen zu treffen. Dadurch wird letztendlich die Anzahl an real durchzuführenden Experimenten reduziert. Somit wird durch wenige Experimente das Wissen über einen Kultivierungsprozess gesteigert und begründete Entscheidungen ohne heuristische und iterative Durchläufe getroffen.

6.1 Entwicklung eines mDoE-Workflows mittels CHO-DP12-Zellen

Um den mDoE-Workflow zu entwickeln, wurden zu Beginn alle benötigten Bausteine eines mDoE definiert und hinsichtlich ihrer Grenzen untersucht. Dabei lag der Fokus auf einer tiefgehenden Bewertung spezifischer statistischer Methoden (wie beispielsweise die Auswahl eines geeigneten Versuchsplans oder Gütefunktionalen), um die Umsetzung eines mDoE noch wissensbasierter zu gestalten. Durch den fortgeschrittenen Entwicklungsstand der antikörperproduzierenden CHO DP12-Zellen standen zur Beschreibung des spezifischen Wachstumsverhaltens Datensätze von Batch- sowie Fed-Batch-Prozessen zur Verfügung. Zusätzlich lagen statistisch bewertete mathematische Prozessmodelle im Batch- sowie Fed-Batch-Verfahren vor.

6.1.1 Erweiterung der mDoE-Toolbox

Wie in Kapitel 5 beschrieben, lag bereits eine mDoE-Toolbox vor. Um jedoch einen Vergleich verschiedener Faktorkombinationen und Versuchspläne zu ermöglichen, wurde die Struktur der mDoE-Toolbox unter anderem um verschiedene Versuchspläne erweitert. Nach Stand der Autorin wird in der Literatur bei der Anwendung von DoE-Methoden kaum bis keine Begründung für eine Versuchsplanauswahl angegeben. Mithilfe des mDoE-Workflows und den zugrundeliegenden Methoden soll nun jedoch ein Werkzeug geschaffen werden, mit dem begründete Entscheidungen bezüglich eines geeigneten Versuchsplans getroffen werden können. Daher wurden der CCD, BBD, LHSD + D-Optimale und I-Optimale Versuchsplan programmiert und in die mDoE-Toolbox implementiert. Für den CCD, BBD und LHSD + D-Optimalen Versuchsplan (umsetzbar als Kombination aus D-Optimalem Versuchsplan und LHSD) standen verschiedene Funktionen in MATLAB zur Verfügung, wohingegen das I-optimalen Design anhand des Optimalitätskriteriums programmiert wurde (Abbildung 6.1).

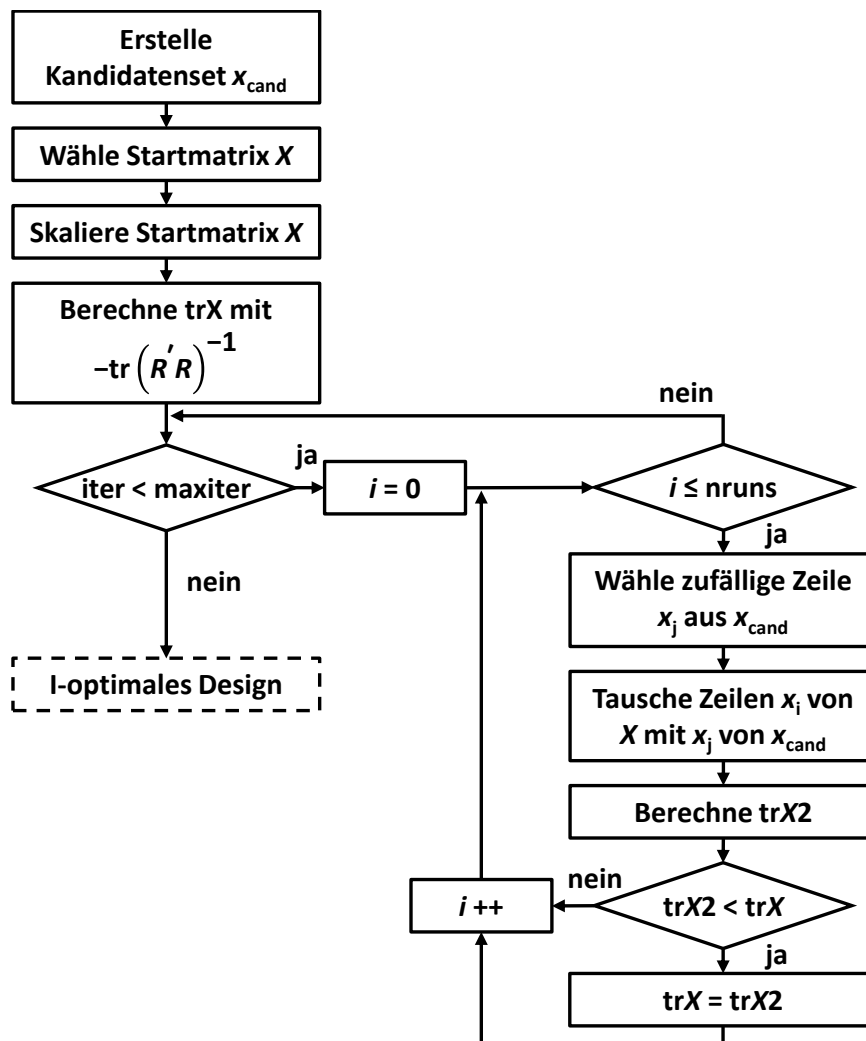


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Konzepts zur Erstellung eines I-Optimalen Versuchsplans.

Zur Erstellung des I-Optimalen Versuchsplans wurde zunächst eine Kandidatenmatrix (x_{cand}) erstellt, aus der zufällig eine Startmatrix X abhängig von der Anzahl der Versuchspunkte entnommen wurde. Durch die orthogonale Skalierung der Matrix X war das I-Optimalitätskriterium äquivalent zum A-Optimalitätskriterium, sodass die Berechnung der Optimalität vereinfacht mit dem A-Optimalitätskriterium erfolgte. Zusätzlich wurde eine QR-Zerlegung der Matrix X vorgenommen [203]. Dadurch wurde die Matrix X durch die obere Dreiecksmatrix ersetzt und die Spur berechnet. Basierend auf Harman et al. [204] wurden anschließend die Zeilen bis zur maximalen Anzahl an Iterationen unter Betrachtung des A-Optimalitätskriteriums getauscht. Somit wurde ein I-Optimaler Versuchsplan entwickelt und in die mDoE-Toolbox implementiert. Abbildung 6.2 zeigt die erfolgreiche Implementierung des I-Optimalen Versuchsplans in die mDoE-Toolbox, da dieselben Empfehlungen für Experimente sowie RSM-Grafiken ausgegeben werden wie bei herkömmlicher DoE-Software (z. B. Design Expert, Stat Ease, USA). Es wurden maximale Erwünschtheiten von 1 jeweils bei minimaler Zulauftrate und mittlerer L-Glutaminkonzentration im Zulauf ausgegeben. Überprüft wurde dies für CHO-DP12-Daten zur Beschreibung eines Fed-Batch-Prozesses, wobei vier Faktoren (Zulauftrate (F_{rate}), L-Glutaminkonzentration im Zulauf ($c_{\text{F,Gln}}$), D-Glucosekonzentration im Zulauf ($c_{\text{F,Glc}}$) und Startzeitpunkt des Zustroms (t_{Zustrom})) ausgewertet wurden. Die Erwünschtheit wurde über die maximale Zellzahl berechnet.

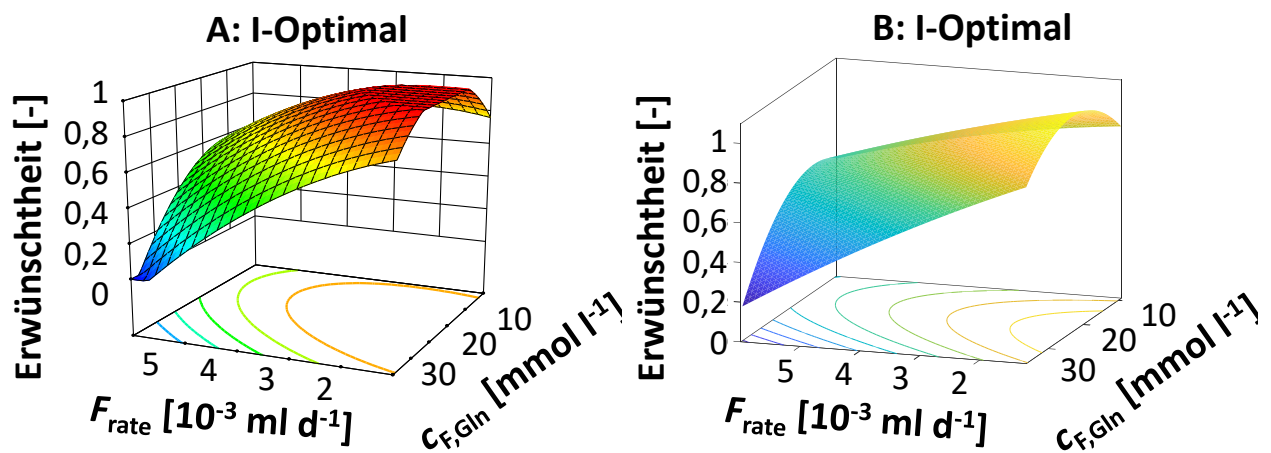


Abbildung 6.2: RSM-Grafiken eines I-Optimalen Versuchsplans, erstellt in DesignExpert (A) und mit der mDoE-Toolbox (B). Es wurden die Faktoren Zufütterungsrate (F_{rate}), der Startpunkt des Zustroms (t_{Zustrom}), die L-Glutaminkonzentration ($c_{\text{F,Gln}}$) im Zulauf und die D-Glucosekonzentration ($c_{\text{F,Glc}}$) im Zulauf untersucht. Als variabel sind die Zufütterungsrate und die L-Glutaminkonzentration im Zulauf in Abhängigkeit zur Erwünschtheit dargestellt, während die D-Glucosekonzentration im Zulauf auf 222 mmol l^{-1} und der Startpunkt des Zustroms auf 96 h fixiert wurden. Die Erwünschtheit ergibt sich aus der maximalen Zellzahl.

Des Weiteren wurde die Gewichtungsfunktion durch einen Optimierungsalgorithmus *fmincon* ergänzt (Gleichung 6.2). Dadurch wurde die zuvor händische und somit zeitaufwendige Suche optimaler Gewichtungsparmeter durch einen lokalen Optimierungsalgorithmus ersetzt.

$$\text{Min. } -wR^2(\text{par}_{opt}) \quad (6.1)$$

$$\text{s.t. } 1 \leq w \leq 150 \quad (6.2)$$

Für die Optimierung der Gewichtungparameter w wurde das Skalarprodukt von w mit den zugehörigen Bestimmtheitsmaßen R^2 minimiert. Daraus ergab sich ein skalares Optimierungsproblem, bei dem der Einfluss der einzelnen Bestimmtheitsmaße durch w beschrieben und priorisiert wurde.

6.1.2 Bewertung des Einflusses des mathematischen Modells

Durch die Umstrukturierung und Erweiterung der mDoE-Toolbox, um verschiedene Versuchspläne, konnte erst die Grundlage geschaffen werden weitere Bausteine zu identifizieren und verschiedene statistische Randbedingungen zu evaluieren. Jedoch besteht die mDoE-Toolbox aus der Kombination von mathematischen Modellen mit DoE-Methoden, sodass auch die Struktur eines mathematischen Modells nachfolgend betrachtet wurde.

Die mathematische Modellierung wurde in den letzten Jahren bereits kontrovers diskutiert und es wurden in der Literatur mehrere Modelle unterschiedlicher Komplexität beschrieben [157, 158]. In den frühen Phasen der Bioprozessentwicklung sollten die in mDoE verwendeten mathematischen Modelle überwiegend aus einfachen Modellstrukturen bestehen und dann schrittweise erweitert werden. Die berücksichtigten Modellparameter sollen dabei durch einfache Experimente bestimmbar sein, da diese bekannte Mechanismen beinhalten (z. B. Ammoniumbildung auf Basis der L-Glutaminaufnahme). Es ist zudem vorteilhaft, wenn Modelle, die zur Prozessoptimierung eingesetzt werden, auf einen breiten Bereich von Bioreaktorskalen anwendbar sind [156, 157, 205].

6.1.3 Anwendungsbezogene Bewertung der Einflüsse auf die Parameteranpassung

Das verwendete Gütefunktional und die Anzahl vorliegender Datensätze beeinflusst die Güte der Parameteranpassung. Daher werden diese Einflussfaktoren im nachfolgenden näher erläutert.

Vergleich verschiedener Gütefunktionale

Alle in Kapitel 5.1.3 vorgestellten Gütefunktionale, dargestellt in Abbildung 6.3, erreichen nach einer bestimmten Iterationsanzahl einen stationären Wert, wobei die Anzahl an Iterationen als maßgeblicher Faktor bei der Wahl eines Gütefunktional berücksichtigt wird. Gütefunktional 4 (Gleichung 5.27) erreicht bereits nach 220 Iterationen einen stationären Wert, während Gütefunktional 3 (Gleichung 5.25) 570 Iterationen, Gütefunktional 1 (Gleichung 5.23) 400 Iterationen und Gütefunktional 2 (Gleichung 5.24) 450 Iterationen benötigen. Unter Berücksichtigung möglicher zeitlicher Begrenzungen ist daher Gütefunktional 4 zu empfehlen. Jedoch kann eine alleinige Betrachtung der Verläufe der Gütefunktionale in Abhängigkeit zur Anzahl der Iterationen nicht ausreichend

sein, da nicht sichergestellt ist, dass die Anpassung mit hoher Güte umgesetzt wird. Daher sind in Abbildung 6.4 das Bestimmtheitsmaß für X_v sowie ein Gesamt-Bestimmtheitsmaß aller Datenreihen in Abhängigkeit zur Iterationsanzahl dargestellt.

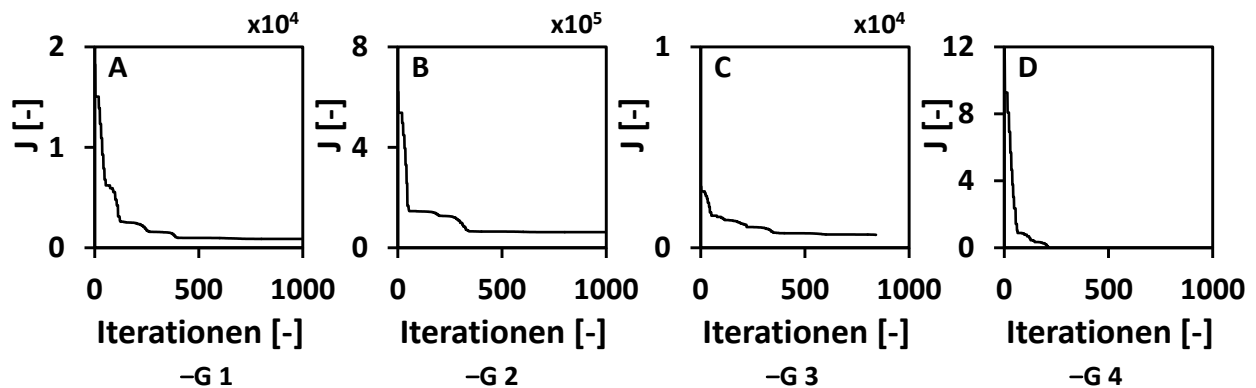


Abbildung 6.3: Funktionswerte der vier Gütefunktionale, dargestellt über die Iterationsanzahl. Die Berechnung erfolgt nach Kapitel 5.1.2. G1 (A) entspricht Gleichung 5.23, G2 (B) entspricht Gleichung 5.24, G3 (C) entspricht Gleichung 5.25 und G4 (D) entspricht Gleichung 5.25.

In Abbildung 6.4, B ist zu erkennen, dass das Gesamt-Bestimmtheitsmaß bei allen Gütefunktionalen gegen 1 strebt. Bei Gütefunktional 2 wurde im Vergleich die höchste Anzahl an Iterationen benötigt (400 Iterationen), während bei Gütefunktional 2 und 3 bereits nach 290 Iterationen ein maximales R^2 erreicht wurde. Gütefunktional 1 erzielte bereits nach 120 Iterationen ein maximales R^2 , fällt dann jedoch ab, um erst nach 700 Iterationen wieder das maximale R^2 zu erreichen.

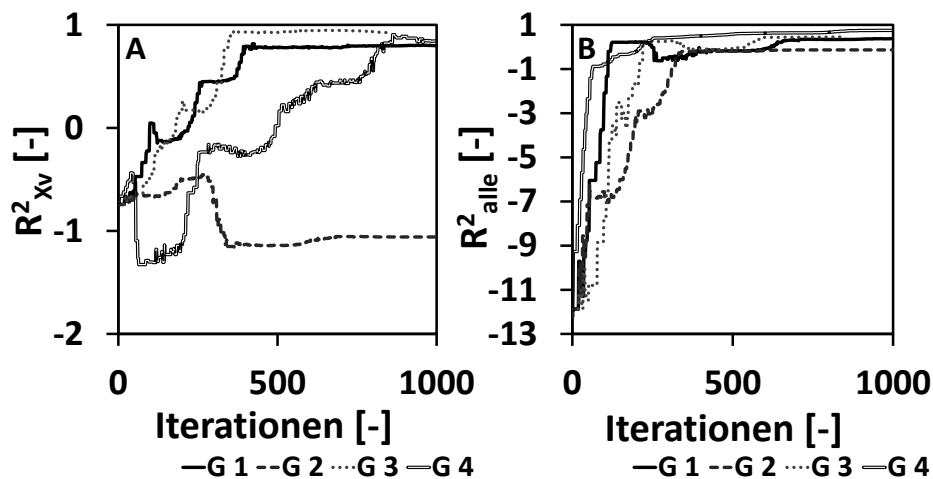


Abbildung 6.4: Vergleich der berechneten Bestimmtheitsmaße für X_v und des Gesamt-Bestimmtheitsmaßes aller Datenreihen in Abhängigkeit zur Iterationsanzahl der verschiedenen Gütefunktionale. Die Berechnung erfolgt nach Kapitel 5.1.2. G1 entspricht Gleichung 5.23, G2 entspricht Gleichung 5.24, G3 entspricht Gleichung 5.25 und G4 entspricht Gleichung 5.25.

Unter Berücksichtigung der dargestellten Verläufe des Bestimmtheitsmaßes für X_v (Abbildung 6.4, A) wird Gütefunktional 4 nicht mehr zur weiteren Verwendung empfohlen. Die Simulation

der Lebendzellzahl mit hoher Güte ist durch die Gewichtung in die Gütefunktionale integriert. Dennoch fiel das Bestimmtheitsmaß für X_v zu Beginn und erreichte erst nach 890 Iterationen einen maximalen Wert. In Gütefunktional 2 wurde eine hohe Anpassung für X_v ebenfalls nicht umgesetzt. Insgesamt ist somit Gütefunktional 3 mit einer Iterationszahl von 570 zu empfehlen, wobei ebenfalls Gütefunktional 1 zu einem hohen Bestimmtheitsmaß für X_v führt. Der zeitliche Effekt spielte in dieser Anwendung keine ausschlaggebende Rolle, da sich dieser durch die simplen Modellstrukturen nur auf einige Sekunden bezog.

Batch-Prozess: Evaluation des Einflusses des Vorwissens auf die Parameteranpassung

Aufgrund der großen Datenmenge wurde überprüft, inwiefern die Anzahl an Datensätzen die Parameteranpassung beeinflusst. In Early-Stage Versuchen stehen üblicherweise nur eine begrenzte Anzahl an Datensätzen zur Verfügung, sodass sich die Frage stellt, inwiefern die Menge an Vorwissen die Ergebnisse beeinflusst. Es wurden unter Verwendung des Gütefunktionals 3 je 100 Parameteranpassungen für $x = 1, \dots, 15$ aus 16 Datensätzen durchgeführt. Die verbleibenden Datensätze wurden zur Kreuzvalidierung verwendet. Nach 570 Iterationen wurden die Bestimmtheitsmaße berechnet und als Box-Plot in Abbildung 6.5 aufgetragen.

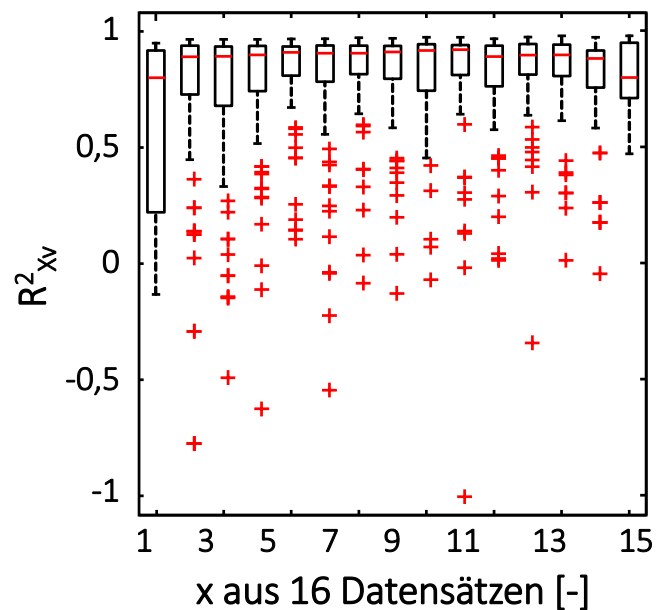


Abbildung 6.5: Box-Plot des Bestimmtheitsmaßes für X_v für unterschiedliche Kombinationen an Datensätzen (Batch-Prozess). Es wurden $n = 100$ Durchläufe iteriert und der Median sowie erstes und drittes Quartil, Minimum und Maximum bestimmt. Die Ausreißer sind durch + gekennzeichnet.

Der Median aller R^2 beträgt $\geq 0,8$. Allerdings veranschaulichen die Box-Plots schiefe Daten. Die Daten sind überwiegend rechtsschief (Ausnahme $x = 15$). Dies bedeutet, dass nur wenige Anpassungen zu einem geringen Bestimmtheitsmaß führten. Mit steigender Anzahl x steigt jedoch auch die Anzahl an Ausreißern. Kombinationen an bestimmten Datenreihen erzeugen numerische Herausforderungen, da spezifische ode-Einstellungen vorgenommen werden müssten. Es ist daher

ratsam bei Parametern, deren Anpassung nur auf einem Durchlauf beruht, genaustens die Güte der Anpassung zu kontrollieren. Bei einer Unsicherheitsbetrachtung, wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, ist eine Betrachtung aller Verläufe allerdings nicht möglich. Ausreißer werden jedoch durch die Menge an Durchläufen ausgeglichen. Bei $x = 15$ zeigt der Box-Plot linksschiefe Daten. Nur wenige Anpassungen erreichen ein $R^2 \geq 0,8$, während viel mehr Daten niedrigere Werte aufweisen. Zum einen könnten die numerischen Herausforderungen stärker ins Gewicht fallen, zum anderen kann es zu einer Art *Overfitting* kommen.

Generell zeigen die Box-Plots, dass bei der Verwendung eines mathematischen Prozessmodells bereits ein Datensatz ausreichend sein kann, um spezifische Parameter anzupassen und somit das Zellverhalten zu beschreiben. Hervorzuheben ist hierbei, dass die Zellen im Batch-Prozess nicht inhibiert werden und somit mit den simplen Differentialgleichungen bereits ein breites Spektrum des Zellverhaltens abgedeckt war.

Fed-Batch-Prozess: Evaluation des Einflusses des Vorwissens auf die Parameteranpassung

Um den Einfluss der Komplexität mathematischer Prozessmodelle auf den Einfluss der Kolbenanzahl zu berücksichtigen, wurde die Kolbenanzahl in einer Kreuzvalidierung zur Bewertung des mathematischen Prozessmodells im Fed-Batch-Verfahren herangezogen. Unter Verwendung des Gütefunktional 3 wurden je 100 Parameteranpassungen für $x = 1, 10, 20$ und 28 Datensätze aus 29 Datensätzen durchgeführt. Die verbleibenden Datensätze wurden zur Kreuzvalidierung verwendet. Nach 570 Iterationen wurden die Bestimmtheitsmaße berechnet und als Box-Plot in Abbildung 6.6 aufgetragen.

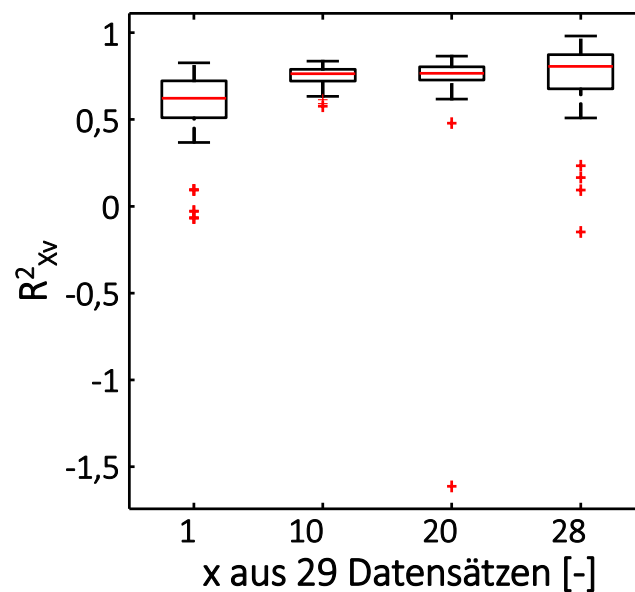


Abbildung 6.6: Bestimmtheitsmaß für X_v für unterschiedliche Kombinationen an Datensätzen (Fed-Batch-Verfahren). Es wurden $n = 100$ Durchläufe iteriert und der Median sowie erstes und drittes Quartil, Minimum und Maximum bestimmt. Die Ausreißer sind durch $+$ gekennzeichnet.

Mit steigender Anzahl an Datensätzen, die zur Anpassung der Parameter herangezogen werden, erhöht sich das Bestimmtheitsmaß. Bei $x = 1$ wird ein Median von 0,6 erreicht, während bei 28 Datensätzen bereits ein R^2 von 0,8 erzielt wird. Bei $x = 10$ und $x = 20$ wird ein R^2 von 0,7 berechnet. Mit Erhöhung der Anzahl der Datensätze in der Parameteranpassung sind die Daten rechtsschief. Diese Auswertung zeigt, dass bei steigender Komplexität des mathematischen Prozessmodells die Anzahl an eingehenden Datensätzen einen erheblichen Einfluss auf die Güte der Anpassung hat. In dem mathematischen Modell wird beispielsweise eine Inhibierung durch Ammonium berücksichtigt, sodass dieser Effekt erst durch eine erhöhte Anzahl an Datensätzen in der Parameteranpassung aufgenommen wird. Bei steigender Komplexität des mathematischen Prozessmodells ist somit ein starker Fokus auf die Güte der Daten zu legen. Bei hoher Qualität der Datensätze kann dennoch die Anzahl an Daten gering gehalten werden. Hier greift der Vorteil der mDoE-Methoden, da durch die iterative modellgestützte Auswertung nur Daten mit hohem Erkenntnisgewinn erzeugt werden.

6.1.4 Anwendungsbezogene Bewertung von Versuchsplänen

Um die Wahl eines geeigneten Versuchsplans für die jeweilige Zielsetzung zu ermöglichen, wurden verschiedene Kriterien untersucht. Die Auswahl eines Versuchsplans sollte auf grundlegenden Einstellungen (Faktoranzahl, Anzahl der Faktorstufen, dem Regressionsmodell und der Anzahl der Versuchsläufe) sowie auf versuchsplanspezifischen Eigenschaften (Blockbildung, Orthogonalität und Drehbarkeit) basieren. Daher wurde im Rahmen dieser Thesis ein Schema, dargestellt in Abbildung 6.7, entwickelt, dass die Vor-Auswahl eines Versuchsplans erleichtert. Des Weiteren wurden Evaluationskriterien implementiert und modellgestützte Auswertungen durchgeführt. Die Auswahlkriterien sind in den nachfolgenden Unterkapiteln erläutert.

Entwicklung eines Schemas zur Auswahl von Versuchsplänen

Bevor DoE-Methoden im Optimierungsbereich eingesetzt werden, kann der Einfluss verschiedener Faktoren in *Screening*-Versuchsplänen im Vorhinein identifiziert werden [17]. Im Anschluss wird empfohlen, mit dem Schema in Abbildung 6.7 fortzufahren.

In der ersten Entscheidungsebene sind die Anzahl an Faktoren ausschlaggebend. Dabei kann abgesehen von BBD und CCD, die mindestens drei Faktoren benötigen, die Anzahl an Faktoren beliebig gewählt werden [23, 134, 206]. Typischerweise werden bei Optimierungsvorgängen drei bis sechs Faktoren verwendet [134]. Bei einer sehr hohen Anzahl an Faktoren und einer Berücksichtigung insignifikanter Faktoren sollten LHSDs verwendet werden [23].

Auf der nächsten Ebene ist das Regressionsmodell entscheidend. Empfohlen wird ein quadratisches Regressionsmodell, da Regressionsmodelle höherer Ordnung zu einer steigenden Anzahl an Unbekannten führen können [23, 134]. CCDs und BBDs verwenden ein quadratisches Regressionsmodell, während bei optimalen Versuchsplänen die Regressionsmodelle benutzerspezifisch definiert werden. Bei unbestimmbarem Regressionsmodell werden die LHSDs herangezogen [135].

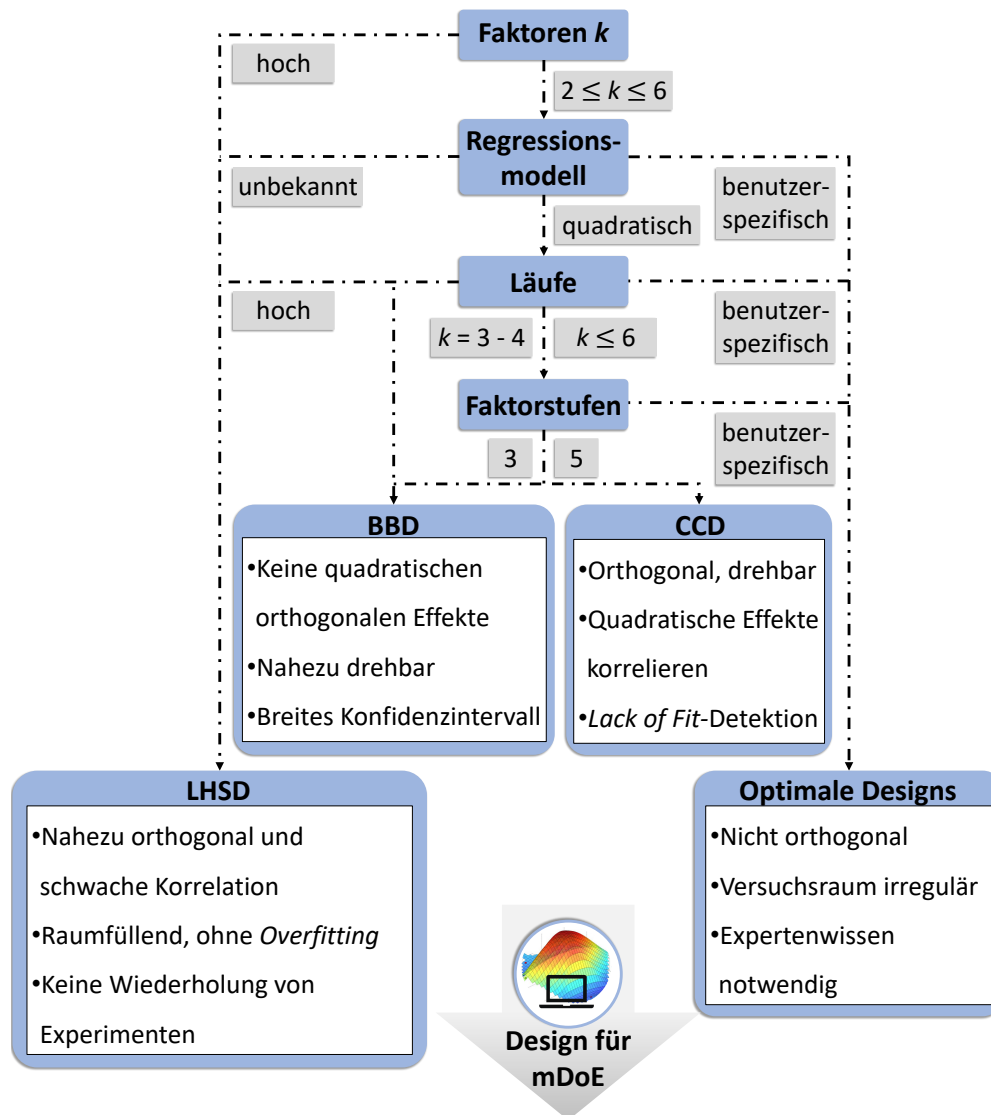


Abbildung 6.7: Konzept zur Auswahl eines Versuchsplans. Diese sind eingeteilt in die Faktoranzahl, dem Regressionsmodell, die Anzahl der Versuchsläufe und die Anzahl der Faktorstufen. Zusätzlich sind die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Versuchspläne dargestellt.

In der vorletzten Ebene wird die Anzahl der Versuchsläufe berücksichtigt. BBDs sind mit drei beziehungsweise vier Faktoren am effizientesten und benötigen im Vergleich zu anderen Versuchsplänen am wenigsten Versuchsdurchläufe [139]. Die Anzahl an Versuchsdurchläufen wird allerdings bei optimalen Versuchsplänen benutzerspezifisch festgelegt und kann somit minimiert werden. Es muss lediglich eine modellabhängige Mindestanzahl miteinbezogen werden. Bei einem quadratischen Regressionsmodell mit vier Faktoren beträgt die Mindestanzahl beispielsweise 15. Es müssen ein Term für den Achsenabschnitt, vier lineare Terme, vier rein quadratische- und sechs Kreuzproduktterme berücksichtigt werden. Beim BBD oder CCD beläuft sich die Anzahl an Versuchsläufen abhängig von der Anzahl an *Center Points* auf einen Wert zwischen 25 und 30 [207]. Bei LHSDs hingegen werden eine hohe Anzahl an Experimenten benötigt, um den Raum auszufüllen, wodurch diese überwiegend für Computersimulationen verwendet werden [208–210].

Zuletzt ist die Wahl der Faktorstufen entscheidend. Um Versuchspläne optimal auswerten zu können, müssen diese mindestens drei Stufen pro Faktor aufweisen [138]. Beim BBD werden die Faktoren auf drei Stufen untersucht, wobei keine Faktorstufenkombinationen an den Eckpunkten untersucht werden und somit eine geringe Vorhersagequalität für Extrema folgt [211]. Bei der Untersuchung von Extrema sind ebenfalls LHSDs ungeeignet [23]. Die CCDs hingegen enthalten fünf Stufen pro Faktor [126]. Bei den optimalen Designs können darüber hinaus die Faktorstufen benutzerspezifisch eingestellt und beliebig kombiniert werden [134]. Allerdings kann es vorkommen, dass zu wenig Versuchspunkte in der Mitte des Versuchsraumes erzeugt werden, sodass in diesem Bereich keine Aussagen getätigt werden können [134].

6.1.5 Evaluation verschiedener Randbedingungen

Durch die breite Verfügbarkeit an Daten wurden die einzelnen Bausteine des mDoE-Workflows untersucht und hinsichtlich ihrer Begrenzungen evaluiert. Es wurde überprüft, inwiefern Limitierungen auftreten und inwiefern diese in die Anwendbarkeit des mDoE integriert werden können.

Evaluation von Versuchsplänen mittels Evaluationskriterien

Durch die Verwendung eines mathematischen Modells im mDoE wurde die Möglichkeit geschaffen verschiedene Versuchspläne zu simulieren und mittels Evaluationskriterien zu evaluieren. Eine experimentelle Umsetzung ist hingegen nur unter einem erheblichen Zeit- und Kostenaufwand möglich. Zur Evaluation verschiedener Versuchspläne wurden die D- und G-Effizienz (beschrieben in Kapitel 5.1.3) für den D-Optimalen, I-Optimalen, LHSD + D-Optimalen Versuchsplan bei 2 Faktoren untersucht. Bei 4 Faktoren wurden der CCD und BBD hinzugenommen. Die Grenzen der Faktoren sowie die jeweiligen Zielgrößen sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Faktorgrenzen bei 2 (Batch Prozess) beziehungsweise 4 Faktoren (Fed-Batch Prozess) zur Prozessauslegung der CHO DP12-Zellen. Als Zielgrößen wurde die maximale Zellzahl und Antikörperkonzentration sowie eine minimale Ammoniumkonzentration ausgewählt.

Faktor	Einheit	Werte
Batch-Prozess		
c_{Gln}	mmol l ⁻¹	6 - 10
c_{Glc}	mmol l ⁻¹	32,5 - 52,5
Fed-Batch-Prozess		
$c_{\text{F, Gln}}$	mmol l ⁻¹	9 - 38
$c_{\text{F, Glc}}$	mmol l ⁻¹	111 - 222
F_{rate}	ml d ⁻¹	3 - 6
t_{Zustrom}	h ⁻¹	48 - 96

Die D-Effizienz wurde gewählt, da das Hauptaugenmerk auf der Minimierung der Parameter-Varianzen liegt. Die G-Effizienz wurde gewählt, um sicherzustellen, dass keine einzelnen Elemente der Informationsmatrix die Hutmatrix sprengen und somit einen Parameter mit viel Varianz erzeugen. Generell wird mit Optimalitätskriterien überprüft, inwiefern der gewählte Versuchsplan einem orthogonalen Design entspricht. Bei einer hohen Effizienz der Optimalitätskriterien (nahe an 100 %) tritt nur eine sehr geringe Varianz bei den geschätzten Parametern auf [212]. Dabei messen diese Effizienzen die Güte eines Designs im Verhältnis zu hypothetischen orthogonalen Designs, die möglicherweise nicht existieren, und sind daher als absolute Maßzahlen für die Designleistung ungeeignet. Stattdessen sollten sie relativ verwendet werden, um ein Design mit einem anderen für dieselbe Situation zu vergleichen. Effizienzen, die nicht annähernd 100 % betragen, können durchaus zufriedenstellend sein. Wenn beispielsweise die D-Effizienz 100 % ist, dann ist der Entwurf ausgewogen und orthogonal. Werte dazwischen bedeuten, dass alle Parameter geschätzt werden können, aber mit weniger als optimaler Genauigkeit [212].

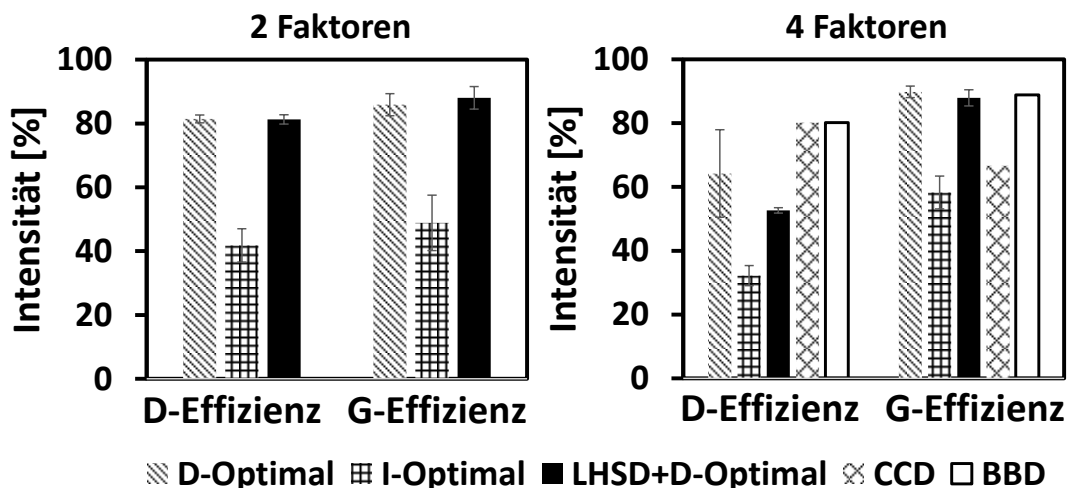


Abbildung 6.8: Vergleich gemittelter Evaluationskriterien (siehe Kapitel 5.1.3) für D-Optimale, I-Optimale und LHSD + D-Optimale Versuchspläne bei 2 Faktoren (Batch-Prozess). Bei 4 Faktoren (Fed-Batch-Prozess) wurden der CCD und BBD ergänzt. Durchführung von jeweils 10 Durchläufen.

In Abbildung 6.8 sind die Intensitäten der Evaluationskriterien für verschiedene Versuchspläne dargestellt. Der I-Optimale Versuchsplan weist bei 2 sowie bei 4 Faktoren im Vergleich zum D-Optimalen und LHSD + D-Optimalen Versuchsplan die geringsten Effizienzen auf. Im Batch-Verfahren werden D- und G-Effizienzen zwischen 40 - 50 % erreicht, wohingegen die D- und G-Effizienz bei D-Optimalen und LHSD + D-Optimalen Versuchsplänen Werte zwischen 80 - 90 % erreicht. Die maximale Effizienz wird beim LHSD + D-Optimale Versuchsplan mit einer G-Effizienz von 90 % erreicht. Bei 4 Faktoren schneidet hingegen der D-Optimale Versuchsplan bei der D-Effizienz um 10 % besser ab und erzielt auch bei der G-Effizienz einen 2 % höheren Wert. Mit ca. 80 % bei der D-Effizienz sind der CCD und BBD die zu empfehlenden Versuchspläne, wohingegen bei der G-Effizienz die höchste Intensität beim D-Optimalen Versuchsplan mit ca. 90 % erreicht wird.

Evaluationskriterien, wie die D- und G-Effizienz spiegeln die Vorhersagevarianz-Eigenschaften des betreffenden Designs nicht vollständig wider. Ein Design, das durch ein Optimalitätskriterium überlegen ist, kann bei der Bewertung durch ein anderes Optimalitätskriterium schlecht abschneiden. Nach Oyejola et al. (2015) geht durch die Verdichtung der Eigenschaften eines Designs auf einen einzigen Wert viel Information bezüglich der potenziellen Leistung des Designs verloren [198]. Eine alleinige Beurteilung der Versuchspläne durch die Optimalitätskriterien ist daher nicht zielführend. Die zusätzliche Auswertung der verschiedenen Versuchspläne durch die mDoE-Simulationen bietet allerdings eine zusätzliche Hilfestellung und ist nachfolgend dargestellt.

Modellgestützte Evaluation von Versuchsplänen

mDoE-Methoden bieten den Vorteil, dass sie eine Kombination statistischer Methoden mit einem mathematischen Modell darstellen. Daher kann das mathematische Modell zur Auswertung verschiedener Methoden und auch Randbedingungen herangezogen werden, ohne zeitaufwendige und kostenintensive Experimente im Labor durchführen zu müssen. Dementsprechend wurden zusätzlich zu der Betrachtung der Evaluationskriterien verschiedene Versuchspläne im Fed-Batch-Prozess (Einstellungen siehe Tabelle 6.1) miteinander verglichen.

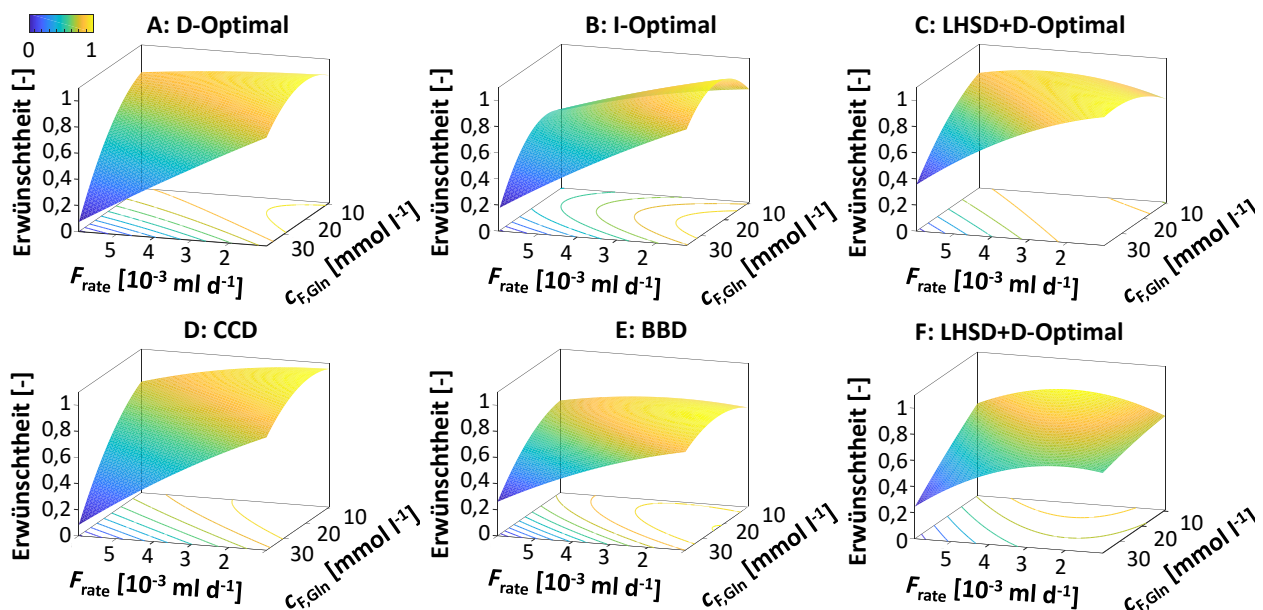


Abbildung 6.9: Vergleich des D-Optimalen, I-Optimalen, LHSD + D-Optimalen Versuchsplans, des CCDs und des BBDs im Fed-Batch-Prozess (30 Faktorkombinationen bei maximaler erwünschter Antikörperkonzentration). Der Startzeitpunkt und die D-Glukosekonzentration des Zustroms wurden ebenfalls variiert, aber hier beispielhaft fixiert. Der Startzeitpunkt des Zustroms wird auf 96 h und die D-Glukosekonzentration im Zustrom auf 222 mmol l^{-1} festgelegt. Die Erwünschtheit wird in Abhängigkeit zur maximalen Zellzahl und Antikörperkonzentration sowie zur minimalen Ammoniumkonzentration berechnet.

Bei jedem Versuchsplan wurden 30 Faktorkombinationen für die vier Faktoren F_{rate} , $c_{\text{F,Gln}}$, $c_{\text{F,Glc}}$ und t_{Zustrom} gewählt, mit dem Ziel, die Zellzahl und Antikörperkonzentration zu maximieren sowie die Ammoniumkonzentration zu minimieren (siehe Abbildung 6.9). Diese 30 Faktorkombinationen wurden anstatt im Labor experimentell durchgeführt für jeden der 6 Versuchspläne mittels des mathematischen Modells (siehe Kapitel 5.1.1) simuliert.

In Abbildung 6.9, A - E sind die Oberflächenplots der empfohlenen Versuchsbedingungen (höchste Erwünschtheit) jedes Versuchsplans dargestellt. Die D-Glukosekonzentration und der Startzeitpunkt des Zustroms sind fixiert, während die Zufütterungsrate und die L-Glutaminkonzentrationen in Abhängigkeit zur Erwünschtheit betrachtet werden. Generell tritt die höchste Erwünschtheit bei geringer bis mittlerer L-Glutaminkonzentrationen im Zustrom sowie geringer Zufütterungsrate auf. Dennoch decken L-Glutaminkonzentrationen im Zustrom bei maximaler Erwünschtheit, wie in Tabelle 6.2 zusammengefasst, einen Bereich von 15 - 32,9 mmol l⁻¹ ab. Die Zufütterungsrate liegt im Bereich von 1,3 - 3,5 · 10⁻³ ml d⁻¹. Übereinstimmend wurden allerdings hohe D-Glukosekonzentrationen und ein Startzeitpunkt des Zustroms bei 96 h empfohlen.

Mittels des mDoE wurden unterschiedliche Maxima in Abhängigkeit zum jeweiligen Versuchsplan detektiert. Obwohl ähnliche Tendenzen (geringe bis mittlere L-Glutaminkonzentrationen im Zustrom bei geringer Zufütterungsrate und hoher D-Glukosekonzentrationen im Zustrom und spätem Startzeitpunkt der Zufütterung) empfohlen wurden, treten Unterschiede auf. Die Wahl des Versuchsplans hat somit einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Optimierung.

Tabelle 6.2: Empfohlene Prozessmaxima der verschiedenen Versuchspläne. Dargestellt ist die Erwünschtheit in Abhängigkeit zur Zufütterungsrate, zu der L-Glutamin- und D-Glukosekonzentration im Zustrom und zu dem Startzeitpunkt der Zufütterung für den D-Optimalen, I-Optimalen, LHSD + D-Optimalen Versuchsplan sowie den CCD und BBD.

Versuchsplan	Erwünschtheit [-]	$c_{\text{F,Gln}}$ [mmol l ⁻¹]	F_{rate} [10 ⁻³ ml d ⁻¹]	$c_{\text{F,Glc}}$ [ml d ⁻¹]	t_{Zustrom} [h]
A	1	15	2,2	222	96
B	1	32,9	1,4	218	96
C	0,97	18,6	1,3	215	96
D	1	16,3	2,3	194	96
E	1	23,5	3	222	96
F	1	19,5	3,5	217	72

Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass selbst Versuchspläne derselben Art zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Die Versuchspläne in Abbildung 6.9, C und F weisen beispielsweise unterschiedliche Maxima bei gleichen Faktoreinstellungen auf. Eine deutlich höhere Zufütterungsrate bei früherem Startzeitpunkt des Zustroms wird laut dem Versuchsplan in Abbildung 6.9, F empfohlen. Ein Vergleich der zugehörigen Optimalitätskriterien zeigt jedoch, dass der LHSD + D-Optimale

Versuchsplan in Abbildung 6.9, C mit einer G-Effizienz von 86,3 % eine höhere Effizienz aufweist als der LHS + D-Optimale Versuchsplan in Abbildung 6.9, F mit 77,5 %. Unter Berücksichtigung der Evaluationskriterien wäre bereits der Versuchsplan mit den höheren Effizienzen gewählt worden. Dennoch bestätigt sich, dass die Evaluationskriterien als Kriterien nur für den relativen Vergleich der gleichen Versuchsplanart hilfreich, jedoch bereits bei dem Vergleich verschiedener Versuchspläne zu vernachlässigen sind. Beispielsweise zeigt sich, dass die Werte der Evaluationskriterien des I-Optimalen Versuchsplans vergleichsweise gering sind. Bei der Auswertung mittels des mDoE weist der I-Optimale Versuchsplan jedoch ähnliche Tendenzen in Maximalrichtungen mit hohen Erwünschtheiten wie die anderen Versuchspläne auf.

Insgesamt können die Evaluationskriterien somit zur Erstellung von Versuchsplänen herangezogen werden, um mögliche Ausreißer zu detektieren. Als alleiniges Kriterium ist eine Verwendung jedoch nicht zielführend. Erst mit der zusätzlichen Betrachtung mittels der mDoE-Simulationen werden zielführende Rückschlüsse getroffen. Zusätzlich kann mit dieser Auswertung der Versuchsraum verkleinert und neue Versuchspläne mit hoher Erwünschtheit erstellt werden. Dadurch werden nur Experimente mit hoher Erwünschtheit empfohlen und das generierte Wissen in das mathematische Modell implementiert. Gleichzeitig werden die unterschiedlichen Maxima der Versuchspläne erneut untersucht.

6.1.6 mDoE-Workflow

Anhand der breiten Datenlage der CHO DP12-Zellen und der zuvor durchgeführten Analyse sowie Definition der Bausteine wurde der Workflow gemäß Abbildung 6.10 entwickelt. Es wurde der Ist-Zustand der aktuell verwendeten mDoE-Methoden definiert sowie die benötigten Bausteine konkretisiert. Des Weiteren wurden die Randbedingungen (z. B. Grenzen der Gütefunktionale, Einfluss des Vorwissens) eines mDoE bestimmt, sodass die wissensbasierte Anwendung von mDoE-Methoden nun die Möglichkeit bietet Expansionsprozesse auszulegen und somit beispielsweise klinisch relevante Zellzahlen zu produzieren. Der mDoE-Workflow dient dabei als Werkzeug zur qualitativen Bewertung sowie Auswertung der Prozesse.

Zu Beginn jedes mDoE werden die allgemeinen Bedingungen formuliert (Abbildung 6.10, Kasten 1). Dabei muss definiert werden, welches Produkt (z. B. Antikörper, Zellzahl) gebildet wird, welcher Prozess (z. B. Stamm, Medium, Prozessführung) untersucht werden soll und welches Optimierungsziel (z. B. Produktivität, Prozesslaufzeit, statistische Randbedingungen) erwünscht ist.

Im Anschluss muss die grundsätzliche Fragestellung festgelegt werden (Abbildung 6.10, Kasten 2), wobei genau definiert werden muss, welche Faktoren und Zielgrößen untersucht werden sollen. Bei Definition der Fragestellung ist zu beachten, dass neben Prozessoptimierungen auch Randbedingungen oder verschiedene DoE's untersucht werden können. Durch die gesteigerte Anwendung und schnelle Auswertung mittels des mDoE kann somit auch eine Steigerung des Prozessverständnisses als mögliches Ziel definiert werden.

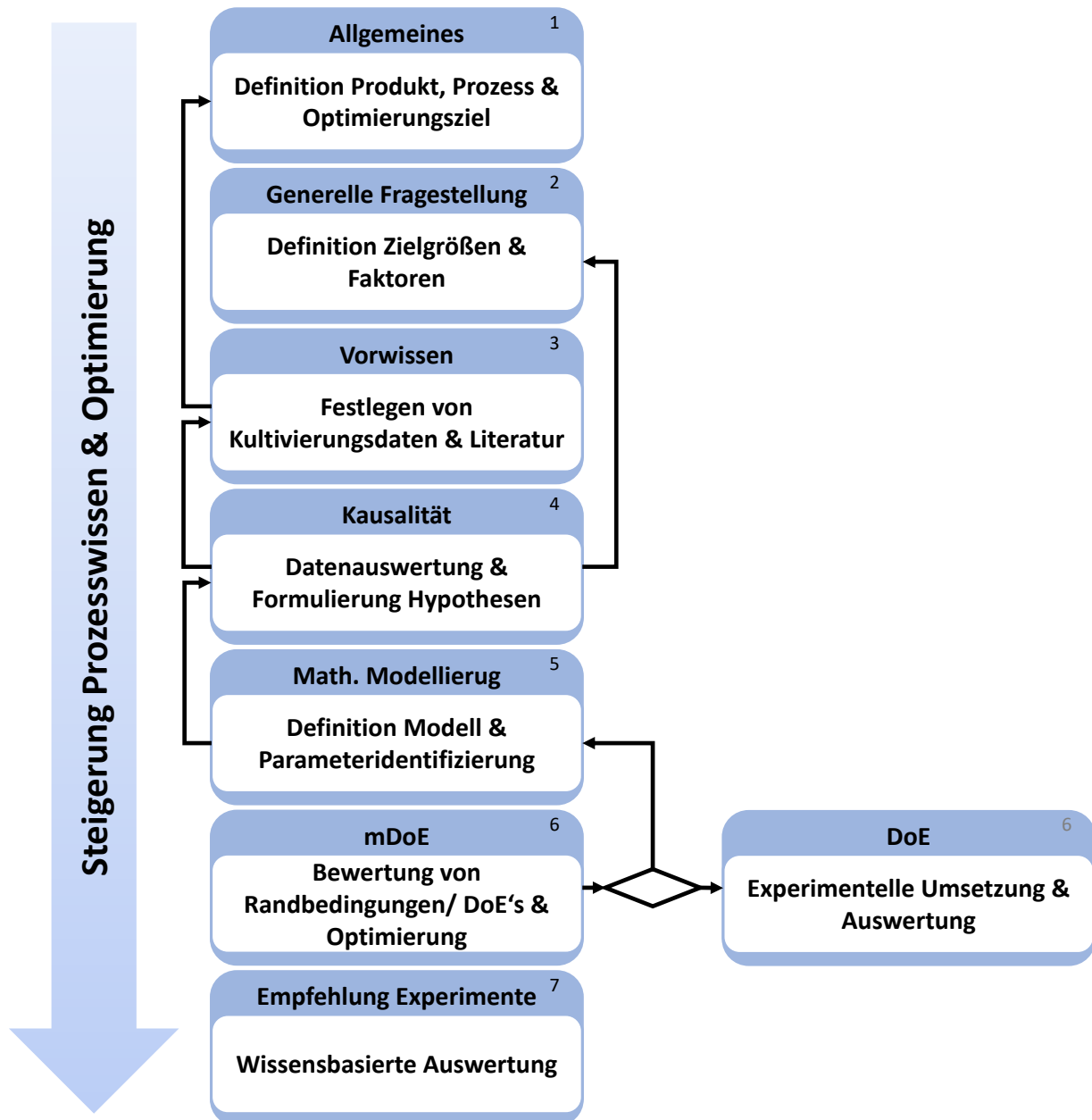


Abbildung 6.10: Workflow zur Beschreibung des Ablaufes eines mDoE.

Nach der Offenlegung des Vorwissens (z. B. basierend auf Literatur und/oder Expertenwissen und/oder Kultivierungsdaten) wird geprüft, ob die Datenmenge hinsichtlich Plausibilität und Qualität zur Beantwortung der Fragestellung geeignet ist (Abbildung 6.10, Kasten 3). Gegebenenfalls muss die Fragestellung angepasst oder weiteres Vorwissen generiert werden. Obwohl an dieser Stelle Vorwissen generiert werden muss, ist die Menge an zu generierenden Daten dennoch gering im Vergleich zur experimentellen Umsetzung eines sowie teils mehrerer Versuchspläne. Der Vorteil ist, dass nur Daten generiert werden, die den Mehrwert/Wissensstand erhöhen.

Aufbauend auf dem Vorwissen werden iterativ Annahmen zur Beschreibung des Zellverhaltens formuliert (Abbildung 6.10, Kasten 4) und ein mathematisches Modell (Abbildung 6.10, Kasten 5) entwickelt. Wichtig ist, eine geeignete Modellstruktur auszuwählen. Die Verwendung simpler und

einfacher Modellstrukturen hat sich als vorteilhaft für die mDoE-Anwendung herausgestellt. Diese kann zudem je nach Zweck sowie im Verlauf erweitert werden. Hier ist der besondere Nutzen des mDoE zu sehen, da iterativ Wissen generiert wird. Mit jedem erneuten Durchlauf des mDoE wird somit das Prozessverständnis gesteigert. Generell muss jedoch überprüft werden, ob die Ursachen-Wirkungs-Beziehungen geeignet zur Beantwortung der Fragestellung und als Grundlage für die Modellentwicklung sind.

Statistische Kriterien (z. B. Bestimmtheitsmaß) werden zur Beurteilung des mathematischen Modells verwendet. Beim mDoE werden Versuchspläne erstellt und mittels des mathematischen Modells ausgewertet (Abbildung 6.10, Kasten 6). Der Fokus kann auf der Optimierung von Prozessparametern, wie beispielsweise Mediumkomponenten, oder dem Vergleich verschiedener Versuchspläne oder Randbedingungen (z. B. Gütefunktionale, Einfluss Vorwissen) liegen. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung und/oder dem vorhandenen Wissen können einzelne Arbeitsschritte des Workflows ausgespart werden. Ebenfalls können iterativ Erkenntnisse/ Annahmen hinzugefügt werden, da mit Umsetzung des Workflows neues Wissen generiert wird. Eine experimentelle Umsetzung des Versuchsplans als statistischer DoE bietet zusätzlich eine Alternative. Dennoch ist hervorzuheben, dass die vergleichsweise intensive Auswertung der Prozessdaten mittels der mDoE-Methoden, teils in iterativen Verfahren, das Prozessverständnis fördert. Dies führt zu wissensgetriebenen Entscheidungen und somit zur Prozessoptimierung (Abbildung 6.10, Kasten 7).

6.1.7 Diskussion zur Anwendung des mDoE bei CHO DP12-Zellen

Mittels der breiten Datenlage der CHO DP12-Zelllinie wurden die jeweiligen Bausteine der mDoE-Methoden definiert und hinsichtlich ihres Einflusses sowie der Limitierungen untersucht. Basierend darauf wurde ein mDoE-Workflow erstellt. Durch das tiefe Verständnis über das Zellverhalten führten bereits wenige Datensätze zu einer hohen Güte der Anpassung, sodass numerische Problematiken detektiert wurden. Zudem wurde verdeutlicht, dass es ressourcenschonend ist, wenn vor Beginn eines mDoE verschiedene Randbedingungen getestet und die optimale Strategie entwickelt wurden. Insbesondere hier zeigt sich der Vorteil des mDoE, da die Entwicklung und Testung verschiedener Strategien mit dem statistischen DoE nicht möglich ist. Zusätzlich wurde herausgearbeitet, dass bei Zelllinien, deren Wachstumsverhalten noch nicht bekannt ist, eine iterative Analyse und Anpassung empfohlen wird. So werden mit reduzierten Ressourcen die unbekannt Bereiche detektiert und stetig durch Wissen ergänzt, sodass das Zellverhalten entschlüsselt wird. Der mDoE-Workflow bietet daher nun die Möglichkeit, wissensbasiert Prozesse verschiedener Prozessstadien zu untersuchen.

6.2 Modellgestützte Auslegung eines L929-Kultivierungsprozesses

Um den Vorteil des mDoE-Workflows in verschiedenen Entwicklungsstadien herauszuarbeiten, wurde dieser für die modellgestützte Auslegung eines L929-Kultivierungsprozesses angewendet. Die L929-Zelllinie diente dabei als Testsystem, um einen Kultivierungsprozess im Early-Stage

Prozessstadium zu untersuchen. Zu Beginn dieser Auslegung befand sich der Wissensstand über diese Zelllinie bei Null. Sogar die Kultivierungsmethoden für die Schüttelkolben- und Bioreaktorkultivierungen mussten zunächst etabliert werden, wodurch jedoch der Nutzen des mDoE-Workflows besonders hervorgehoben wurde.

Dem mDoE-Workflow folgend wurde neben der Definition des Testsystems als Produkt die Zellzahl und als Optimierungsziel eine maximale Ausbeute festgelegt (Abbildung 6.10, Kasten 1). Dafür sollten die Substrate D-Glukose, L-Glutamin und die MC-Konzentration angepasst werden (Abbildung 6.10, Kasten 2). Obwohl ein Wissensstand vergleichbar mit einem Early-Stage Prozess vorlag, sollten innerhalb kürzester Zeit die methodischen Voraussetzungen geschaffen werden, um die Zellausbeute zu steigern. Dafür wurden Kultivierungen im Batch- und Fed-Batch-Prozess durchgeführt (Abbildung 6.10, Kasten 3). Die Kultivierungsbedingungen basierten dabei auf Literaturdaten sowie der iterativen modellgestützten Auswertung der generierten Kultivierungsdaten. Um jedoch die Kultivierungen umzusetzen, wurden vorab verschiedene Kultivierungsmethoden bewertet und etabliert. Mit der iterativen Datenauswertung und der einhergehenden Steigerung des Prozessverständnisses wurde ein mathematisches Modell entwickelt (Abbildung 6.10, Kasten 4 und 5) und zur wissensbasierten Auswertung angewandt (Abbildung 6.10, Kasten 7).

6.2.1 Anwendungsbezogene Bewertung der Zellzähl- und Erntemethoden

Für die Expansion von Zellen ist die Überwachung der Zellkonzentration einer der Schlüsselparameter [14]. Insbesondere für die Verwendung des mDoE-Konzepts ist eine korrekte Aufnahme der Kultivierungsparameter zur Beschreibung des Prozesses unerlässlich. Dennoch sind die Methoden nicht ausreichend diskutiert. Bei der offline-Überwachung müssen die Zellen vorab enzymatisch von der Oberfläche gelöst werden. Dies erzeugt eine zeitliche Diskrepanz und sorgt für eine hohe Fehlerrate. Wird die Zellzahl über die Kernanzahl bestimmt, können Fehlzählungen entstehen, da Zellen zweikernig sein können, die Zellen nicht komplett gelöst werden und teilweise schwierig von Zellbruchstücken zu unterscheiden sind. Alternativ können indirekte Methoden verwendet werden. Dies beinhaltet die chemische Analyse von Metaboliten, Proteinen oder DNA. Bei der DNA-Bestimmung ist eine Möglichkeit die Verwendung von SYBR GREEN I (SG). Das Assay erlaubt die lineare Korrelation der Fluoreszenzintensität zur Zellkonzentration und ist sowohl auf fixierte als auch auf unfixierte Zellen anwendbar [14, 188].

Gängige Methoden weisen Vorteile auf, stellen jedoch auch spezifische Herausforderungen bereit. Um eine Vergleichbarkeit der Methoden zu gewährleisten, wurden vier Methoden zur Bestimmung der Zellzahlen bei gleichen Kultivierungsbedingungen untersucht. Es wurde die indirekte Messung mittels SG, eine Kernzählung und zwei enzymatische Ablöseverfahren mit anschließender Zählung im Partikelzähler ausgewertet (siehe Abbildung 6.11). Die experimentellen Daten wurden mittels Kultivierungen im Schüttelkolben erstellt. Durch tägliche Probenahme wurden die Zellzahlen sowie Substrat- und Metabolitenkonzentrationen bestimmt. Dem Medium wurden 4 mmol l^{-1} L-Glutamin und 25 mmol l^{-1} D-Glukose hinzugegeben.

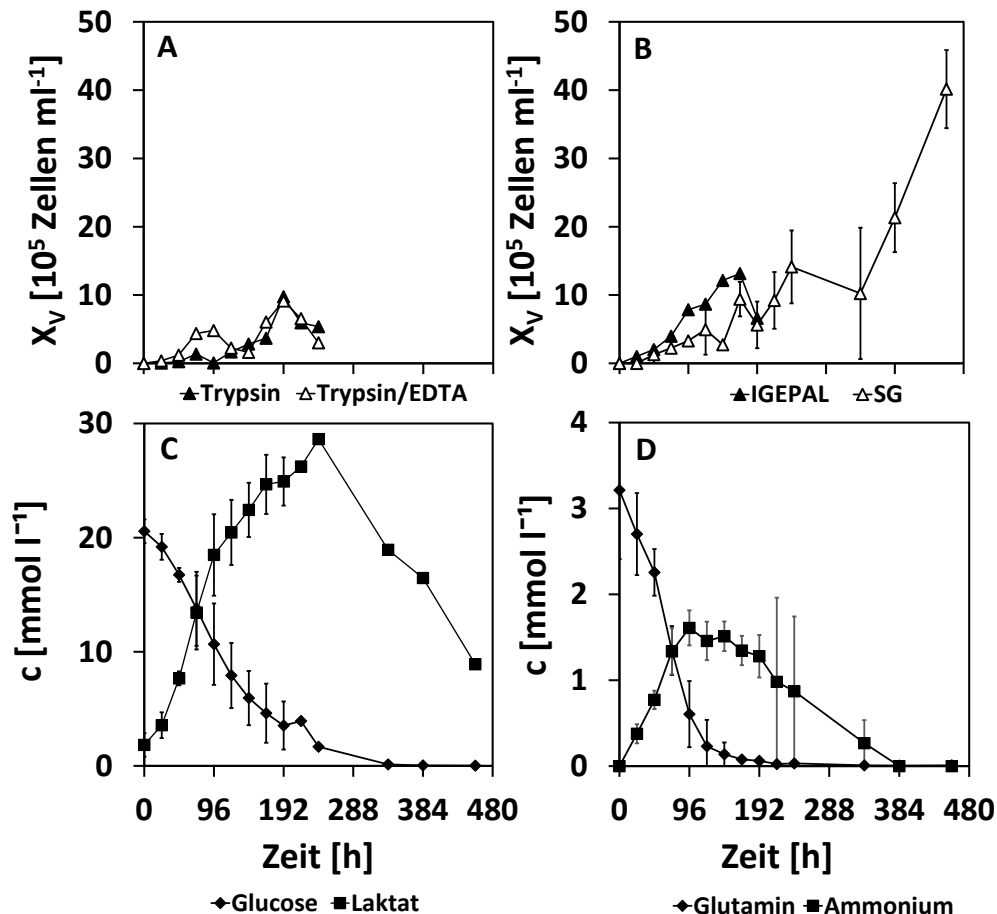


Abbildung 6.11: Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur Zellzählung. Dargestellt sind zwei enzymatische Methoden (A), eine Methode zur Zellyse (B, IGEPAL) sowie eine photometrische Methode, die ohne eine Ablösung der Zellen von den MCs funktioniert (B, SG). Zusätzlich sind die gemittelten Substrat- und Metabolitenverläufe (C, D) zu den Zellverläufen dargestellt.

Es konnte erfolgreich eine Kultivierung der L929-Zellen im Schüttelkolben nachgewiesen werden (Abbildung 6.11). Dennoch unterscheiden sich die Kurvenverläufe aller vier Methoden. Bei der SG-Methode sind die Verläufe des Zellwachstums unter Berücksichtigung der Substrate sowie Metaboliten auffällig. Das verfügbare L-Glutamin wird nach 8 Tagen und die D-Glukose nach 14 Tagen verbraucht. Dennoch wird noch bis Tag 20 ein Zellwachstum mit der SG-Methode (Abbildung 6.11: B) dokumentiert. Zwar wird bei einigen Zelllinien (z. B. CHO-Zellen) ein Verbrauch von L-Laktat nach Unterschreiten bestimmter Substratkonzentration beobachtet, allerdings wurde solch ein L-Laktat-*Shift* bisher nur in der stationären Phase dokumentiert [213] und sollte nicht ausreichend für ein erneutes Zellwachstum sein. Das unstimmige Verhalten der Wachstumskurve könnte auf die Agglomeration von MC-Zell-Komplexen zurückzuführen sein. Diese Agglomerate erzeugen ein Rauschen, wodurch eine angebliche Konzentrierung der Zellzahl auftritt. Im Vergleich sind die Zellzahlen, die mit dem Partikelzähler bestimmt wurden, besonders zu Beginn der Kultivierung sehr gering (Abbildung 6.11: A, Trypsin). Eine lange *lag*-Phase ist jedoch unüblich, da diese durch die Vorkultivierung in einer T-Flasche vermieden wird. Durch die Trypsinierungsmethode induziert,

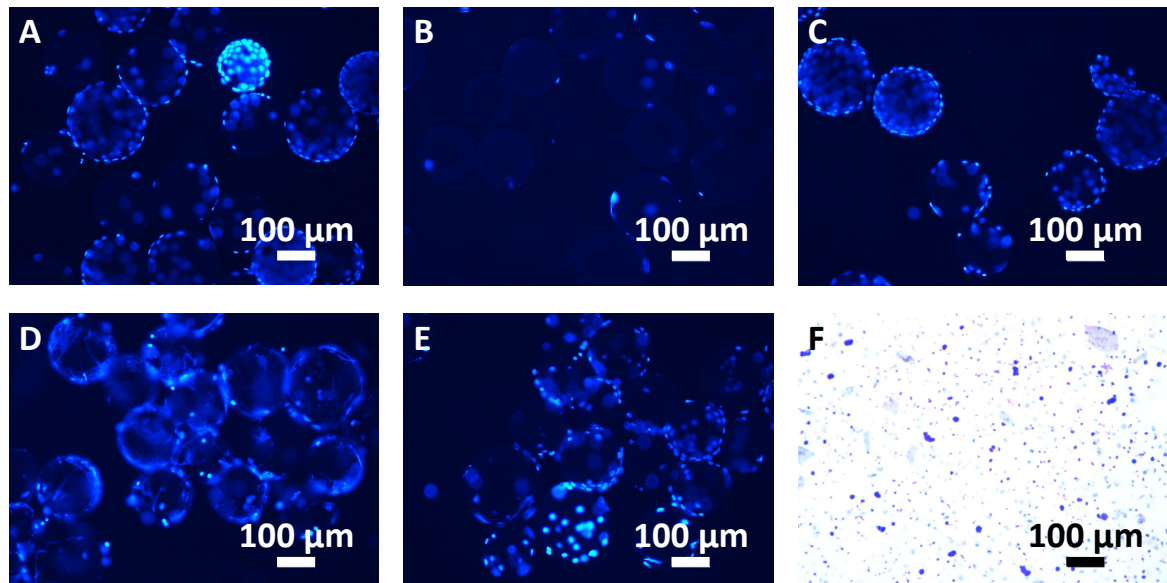


Abbildung 6.12: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der MCs nach Anwendung der enzymatischen (C-Trypsin, D-Trypsin/EDTA) und IGEPAL-Methoden (B) mit einer unbehandelten Microcarrier-Probe (A). Die Proben wurden nach 72 h Kultivierung entnommen. Zusätzlich wurde eine weitere Methode zur Lysierung der Zellen untersucht. Dargestellt sind die behandelten MC mit Kristallviolett (E) und der daraus gewonnene Überstand (F).

scheinen die Zellzahlen außerhalb des detektierbaren Bereichs des Partikelzählers zu liegen. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der behandelten MCs bestätigte, dass kein vollständiges Ablösen der Zellen von den MCs stattfand (Abbildung 6.12: A, C). Um die Zählung im Partikelzähler zu ermöglichen, wurde daher die Ablösemethode angepasst (Abbildung 6.11: A, Trypsin/EDTA). Dabei wurde durch steigende Zellzahlen die Ausbeute erhöht. Dennoch wurden die Zellen nicht vollends von den MCs gelöst (Abbildung 6.12: D). Bei Lysierung der Zellen (IGEPAL-Methode) verblieben hingegen nur noch vereinzelt Zellen auf den MCs (Abbildung 6.12: B) und auch die Wachstumskurve weist geringere Messabweichungen auf (Abbildung 6.11: B). Als Alternative zur Kernlyse-Methode (IGEPAL) wurde eine Kernzählung mit Zitronensäure und Kristallviolett durchgeführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei dieser Methode verblieben jedoch erneut Zellen auf den MCs (Abbildung 6.11: E) und die Zählung der Zellen ist durch die Ähnlichkeit von Zellschrott und Zellkernen erschwert (Abbildung 6.11: F). Im weiteren Verlauf wird daher die IGEPAL-Methode zur Zählung der Zellen verwendet. Zur Ernte der Zellen wird die Trypsin/EDTA-Methode verwendet, da eine vergleichsweise hohe Ausbeute erzielt werden kann. Dennoch muss beachtet werden, dass eine 100 % Ablösung mit enzymatischen Methoden nicht zu erzielen ist. Durch den anwendungsbezogenen Vergleich der verschiedenen Zellzählmethoden wurden die spezifischen Vorteile sowie die Herausforderungen detektiert, sodass auf dieser Grundlage geeignete Methoden für die weitere Verwendung ausgewählt wurden. Eine frühzeitige Detektion verschiedener Einflüsse verhindert eine spätere Fehlersuche, die zu teils kostenintensiven Iterationen führen.

6.2.2 Systematisches MC-Screening in Bezug zur Wachstums- und Metabolitenkinetik

Zur Produktion adhären-wachsender Zellen mittels skalierbarer, kostengünstiger Herstellungsprozesse, ist die Auswahl eines geeigneten MCs mit einer robusten und übertragbaren Methode entscheidend. Einige wenige Studien konzentrieren sich auf die Etablierung von Methoden zur Auswahl von MCs und werden daher im folgenden kritisch betrachtet.

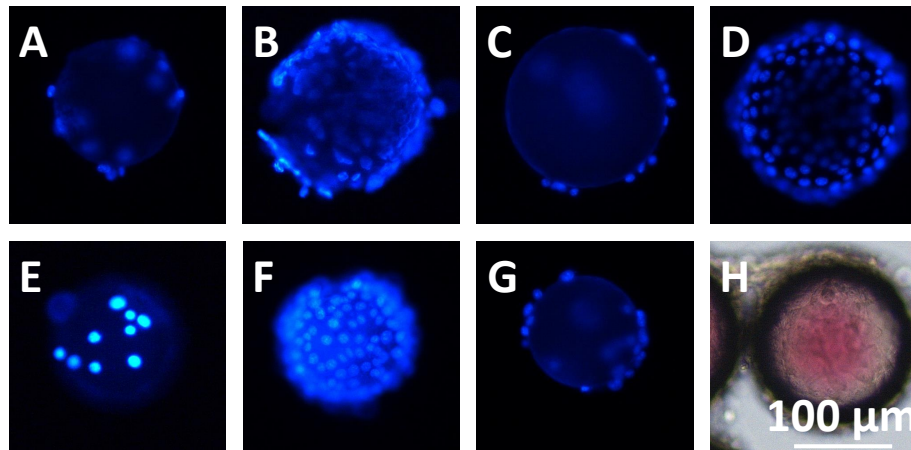


Abbildung 6.13: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der verschiedenen MCs (A-Collagen Coated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Hillex, E-Plastic, F-PlasticPlus, G-StarPlus und H-Hillex mit Durchlicht) nach 72 h Kultivierung.

Schop et al. (2010) führten ein MC-Screening durch, bei dem neun verschiedene kommerziell erhältliche MCs (Cytodex 1 und 3, sowie alle SoloHill MCs) verglichen wurden. Die Studie beschränkte sich vorerst auf die Bestimmung der Zellanhaftung über einen Zeitraum von 18 h. Da sie feststellten, dass Cytodex 1 die größte Aussaat-Effizienz ermöglichte, wurden weitere Untersuchungen nur mit diesem MC durchgeführt. Daher untersuchten sie weder die Wachstumskinetik nach 18 h, noch berücksichtigten sie andere wichtige Aspekte wie die Ernte der Zellen von den MCs [214]. Rafiq et al. (2016) untersuchten 13 MCs für die BM-hMSC-Expansion und etablierten eine reproduzierbare und übertragbare Methodik für die MC-Auswahl. Sie führten zunächst ein Screening der MCs in einer Mikrotiterplatte durch und untersuchten im Anschluss ausgewählte MCs in größerem Maßstab (Spinnerflaschen). Schwerpunkte waren die Bestimmung der Metabolitenkonzentration und der Stoffwechselaktivität, Durchflusszytometrie zur Charakterisierung, Differenzierung und Ernte. Obwohl sie einen optimalen MC detektierten, stellten sie gleichzeitig hohe Variabilitäten innerhalb der Eingangszellen fest [186]. Dies bestätigt die Dringlichkeit eines MC-Screenings vor Kultivierungsbeginn und macht ein MC-Screening für jeden Zelltyp erforderlich.

Im Rahmen dieser Studie wurden L929-Zellen auf einer Reihe kommerziell auf dem Markt verfügbarer MCs (Cytodex 3 sowie alle SoloHill MCs) als Triplikate in einer Mikrotiterplatte für 72 h kultiviert. Im Anschluss wurden die MCs quantitativ mittels einer DAPI-Färbung untersucht (Abbildung 6.13). Die Kontrollprobe in der Mikrotiterplatte zeigte, dass die Zellen nicht an dieser anhaften und proliferierten (nicht dargestellt). Bei allen übrigen MCs wurde ein Wachstum nach

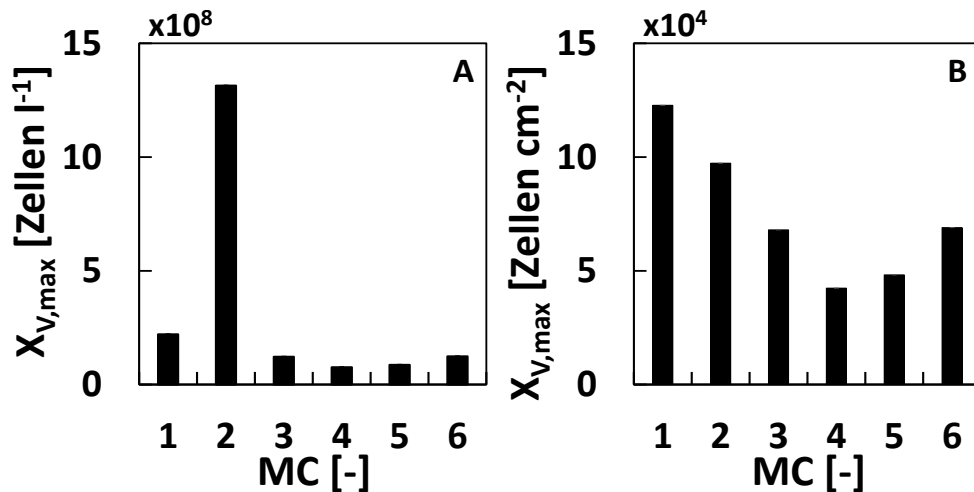


Abbildung 6.14: Darstellung der maximalen Zellzahlen der einzelnen MCs (1-Collagen Coated, 2-Cytodex 3, 3-FACT, 4-Plastic, 5-PlasticPlus, 6-StarPlus) in Bezug zum Volumen (A) sowie zur Wachstumsfläche (B). Der Gesamtkultivierungszeitraum betrug 264 h.

72 h detektiert. Jedoch wiesen die MCs sehr starke Unterschiede im Status der Konfluenz auf. Die Cytodex 3 (Abbildung 6.13, B), Hillex (Abbildung 6.13, D) und PlasticPlus MCs (Abbildung 6.13, F) waren fast vollständig bewachsen, während sich auf den übrigen MCs kaum Zellen angeheftet hatten. Die Hillex-Microcarrier absorbierten jedoch den im DMEM vorhandenen Phenolrot-Indikator (Abbildung 6.13: H). Im Anschluss wurden die MCs mit Ausnahme des Hillex-MCs im Schüttelkolben kultiviert, um die Wachstums- und Metabolitenkinetik für jeden MC zu bestimmen. Es ist hervorzuheben, dass eine Kultivierung im Schüttelkolben bisher kaum umgesetzt wurde und STRs oder Spinnerflaschen bevorzugt werden. Die einfache Handhabbarkeit und positive Vorversuche überzeugten jedoch von dem großen Potential von Kultivierungen im Schüttelkolben. Zusätzlich wurde die Handhabung dokumentiert und die Erntemethode überprüft. Die Mikrotiterplatte diente als robustes *Scale-Down*-Modell für die Vorauswahl von MCs. Dennoch war es wichtig einmalig die zuvor gewonnenen Tendenzen durch lang angelegte Versuche zu überprüfen.

Die höchste Zellzahl im Bezug zum Volumen wurde nach 144 h bei dem Cytodex 3 MC mit $1,3 \cdot 10^6$ Zellen ml⁻¹ erreicht (Abbildung 6.14: A: 2). Im Vergleich zu Rafiq et al. (2016) wurde sogar eine 3,75-fach höhere Ausbeute in der Schüttelkolbenkultivierung als in der Spinnerflasche erzielt [186]. Jedoch ist zu beachten, dass hier L929-Zellen und keine MSCs kultiviert wurden. Die MCs in Abbildung 6.14: A: 1,3 - 6 wiesen im Vergleich zum Cytodex 3 deutlich geringere maximale Zellzahlen auf. Dennoch wurde eine ähnliche spezifische maximale Wachstumsrate in der exponentiellen Phase ($\mu \approx 0,03$ h⁻¹) erreicht. Lediglich der Plastik-MC wies eine spezifische maximale Wachstumsrate von $\mu \approx 0,016$ h⁻¹ auf (Abbildung 6.14: A: 4). Durch die unterschiedlichen Oberflächen der MCs muss allerdings die Ausbeute in Bezug zur Wachstumsfläche betrachtet werden (Abbildung 6.14: B). Mit $1,2 \cdot 10^4$ Zellen cm⁻² erreicht der Collagen Coated MC mit $0,2 \cdot 10^4$ Zellen cm⁻² eine höhere Zellzahl als der Cytodex 3 MC. Allerdings erreicht der Collagen Coated MC diese maximale Zellzahl erst nach 192 h statt 144 h.

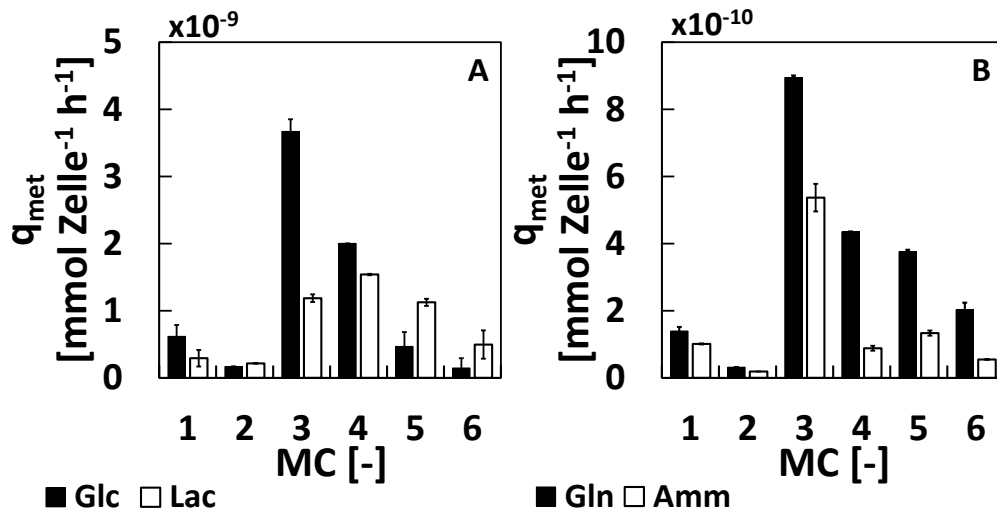


Abbildung 6.15: Darstellung der Aufnahme- und Produktionsraten während der exponentiellen Phase der einzelnen MCs (1-Collagen Coated, 2-Cytodex 3, 3-FACT, 4-Plastic, 5-PlasticPlus, 6-StarPlus) in Bezug zum Volumen (A) sowie zur Wachstumsfläche (B). Der Gesamtkultivierungszeitraum betrug 192 h.

Die Werte der Aufnahme- und Produktionsraten (Abbildung 6.15) befinden sich in einem vergleichbaren Bereich zu Literaturdaten [186]. Beim Collagen Coated MC sowie beim Cytodex 3 MC wurden vergleichsweise hohe Aufnahme- und Produktionsraten erreicht, die das Zellwachstum bestätigten. Die Zellen auf den übrigen MCs hatten deutlich geringere Stoffwechselraten. Insgesamt ist erstaunlich, welchen starken Einfluss die Wahl des MCs auf den Zellmetabolismus hat. Bei geringerer Anhaftung ergeben sich verminderte Aufnahme- und Produktionsraten, dennoch unterscheiden sich diese auch bei erfolgreicher Anhaftung und Wachstum erheblich. Zusätzlich wurde durch die Handhabung festgestellt, dass ein Absetzen der MCs am Boden des Probengefäßes ($t \geq 3$ Min) bei den SoloHill MCs zeitaufwendig war und somit Zellverluste eintraten. Die Ernte wurde durch den langen Sedimentationsprozess zusätzlich erschwert, sodass der Cytodex 3 MC zur weiteren Verwendung ausgewählt wurde.

6.2.3 Expansion mittels *Bead-to-Bead-Transfer*

Um adhären-wachsende Zellen im großen Maßstab kultivieren zu können, müssen geeignete Expansionstechniken zur Verfügung stehen. Der *Bead-to-Bead-Transfer* ist grundsätzlich durch die Erhöhung der Trägerkonzentration und somit der verfügbaren Wachstumsfläche besonders geeignet. Im Gegensatz zur Anhaftungsphase können sich die Zellen während der Proliferation von den MCs lösen und von MC zu MC wandern [9]. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für MSC-Kultivierungen eingesetzt [13, 100]. Dennoch ist hervorzuheben, dass eine erfolgreiche Umsetzung eines *Bead-to-Bead-Transfer* nicht immer gelingt und bisher noch kein erfolgreicher *Bead-to-Bead-Transfer* im Schüttelkolben dokumentiert wurde.

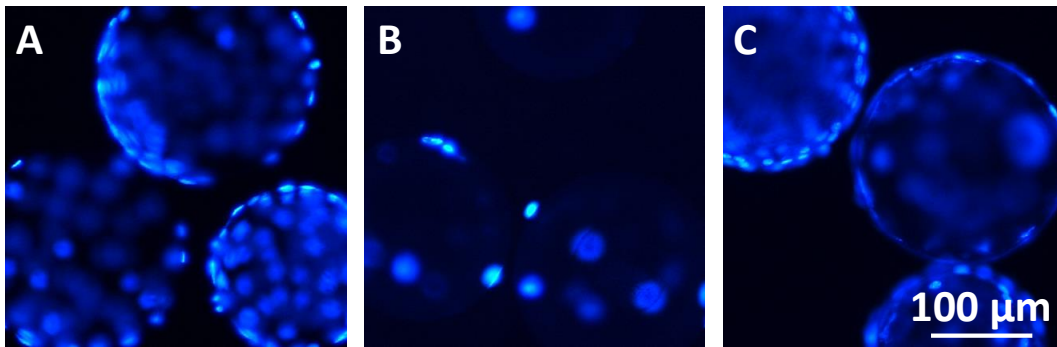


Abbildung 6.16: *Bead-to-Bead*-Transfer bei der L929-Kultivierung. A zeigt die bewachsenen Cytodex 3 MCs vor dem *Bead-to-Bead*-Transfer, während B direkt nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer und C 96 h später aufgenommen wurde.

Wie in Abbildung 6.16 dargestellt, ist jedoch auch für L929-Zellen ein *Bead-to-Bead*-Transfer im Schüttelkolben erfolgreich möglich. Die Cytodex 3-MCs sind bereits konfluent bewachsen (Abbildung 6.16, A), sodass nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer die frischen MCs direkt detektierbar waren. Gleichzeitig zeigte sich, dass die frischen MCs sehr schnell besiedelt wurden (Abbildung 6.16, B) und nach 96 h erneut Konfluenz erreichten (Abbildung 6.16, C). Insgesamt wurden durch die vorangegangene Analyse Methoden entwickelt, mit denen eine Detektion zellspezifischer Parameter ermöglicht wurde. Basierend auf diesen Methoden konnte das mDoE-Konzept weiter umgesetzt werden.

6.2.4 Modellgestützte Analyse des Zellverhaltens

Zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens der L929-Zellen wurde dem Workflow folgend das Vorwissen definiert (Abbildung 6.10, Kasten 3), sodass die Ursachen-Wirkungs-Beziehungen herausgearbeitet werden konnten (Abbildung 6.10, Kasten 4). Allerdings lagen zu Beginn keine Daten vor und auch mit einer Literaturrecherche wurden nur die Rahmenbedingungen abgesteckt. Daher wurden iterativ Experimente durchgeführt (siehe Tabelle 6.3), anhand derer das Zellverhalten analysiert wurde. Insgesamt wurden 8 Experimente durchgeführt.

Basierend auf den ersten 6 Experimenten im Schüttelkolben wurde das Verhalten der L929-Zellen analysiert und das mathematische Modell erstellt. Die übrigen 2 Versuche dienten der Evaluation der Ergebnisse. Bei Betrachtung von lediglich zwei Faktoren (Glc und Gln), wobei die MC auf 20 g l^{-1} festgesetzt wurde, wurde durch eine Veränderung dieser beiden Faktoren keine Steigerung der Zellzahl erzielt (siehe Abbildung 6.17).

Die Substrate lagen stets im Exzess vor, sodass keine Limitierung hervorgerufen werden konnte. Dabei wurde auch kein Einfluss der unterschiedlichen Substratkonzentrationen detektiert. In beiden Kultivierungen wurde eine Zellzahl von $2,7 \cdot 10^9 \text{ Zellen l}^{-1}$ erreicht (Maximum bei 192 h), wobei keines der Substrate zum Zeitpunkt des Übergangs verbraucht war. Es wurden zwar hohe Konzentrationen an L-Laktat von 20 mmol l^{-1} und Ammonium von 8 mmol l^{-1} erreicht, eine Inhibierung

Tabelle 6.3: Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells. Die Experimente wurden in 3-fach Bestimmung durchgeführt.

Versuch	c_{MC} [g l ⁻¹]	c_{Glc} [mmol l ⁻¹]	c_{Gln} [mmol l ⁻¹]	$X_{Inokulum}$ [Zellen cm ⁻²]
1	20	30	12	
2	20	60	12	
3	10	5,6	2	6000
4	10	25	12	
5	10	60	12	
6	5	60	12	
7	3	25	4	6000
8	1	25	4	

verringert jedoch stetig das Wachstum, sodass zuerst ein Übergang in die stationäre Phase zu beobachten wäre und kein direkter Übergang in die Sterbephase erfolgen würde. Daher wurde eine Metaboliteninhibierung ausgeschlossen.

Dennoch wurde nach 192 h das Zellwachstum eingestellt. Um mögliche Limitierungsfaktoren zu identifizieren, wurden gängige Aminosäuren untersucht. Aminosäuren sind die Grundbausteine der Proteine und bilden das gesamte proteinhaltige Material der Zelle, einschließlich des Zytoskeletts, des Proteinanteils der Enzyme, der Rezeptoren und der Signalmoleküle. Darüber hinaus werden Aminosäuren für das Wachstum und die Erhaltung von Zellen verwendet. Die genetische Zusammensetzung von Zellen, ihre Genexpressionsprofile, der Zellzyklus und die Umgebung, in der sich die Zellen befinden, beeinflussen die Verbrauchsraten und den Stoffwechselfluss von Aminosäuren [215, 216]. Die Zugabe von Aminosäuren, die im Allgemeinen verbraucht werden, führt nicht immer zur Verbesserung des Zellkulturprozesses. Beispielsweise sind L-Serin und Glycin am Metabolismus von Nukleinsäurevorläufern im Tetrahydrofolsäure- (THF)-Zyklus beteiligt [217]. Unter L-Serin-armen Bedingungen führt die Supplementierung mit Glycin jedoch zur L-Serin-Produktion. Dadurch werden Metaboliten aus dem THF-Zyklus abgezogen. Ein verlangsamter THF-Zyklus führt zu einer Hemmung der Zellproliferation [218]. Vier (Glutaminsäure, Serin, Methionin und Histidin) der 15 ausgewerteten Aminosäuren sind in Abbildung 6.18 für Versuch 1 dargestellt. Die Verläufe der anderen Aminosäuren sind in Anhang A, Abbildungen A.1 und A.2 aufgeführt.

Serin, Methionin und Histidin werden während des Kultivierungszeitraums verbraucht, während Glutaminsäure produziert wird. Mit Übergang des Zellwachstums in die Sterbephase ist jedoch keine limitierende oder inhibierende Konzentration der Aminosäuren erreicht. Der Arbeitsbereich des Hochdruckflüssigkeitschromatographen liegt im $\mu\text{g l}^{-1}$ - mg l^{-1} , sodass keine Nachweisgrenze

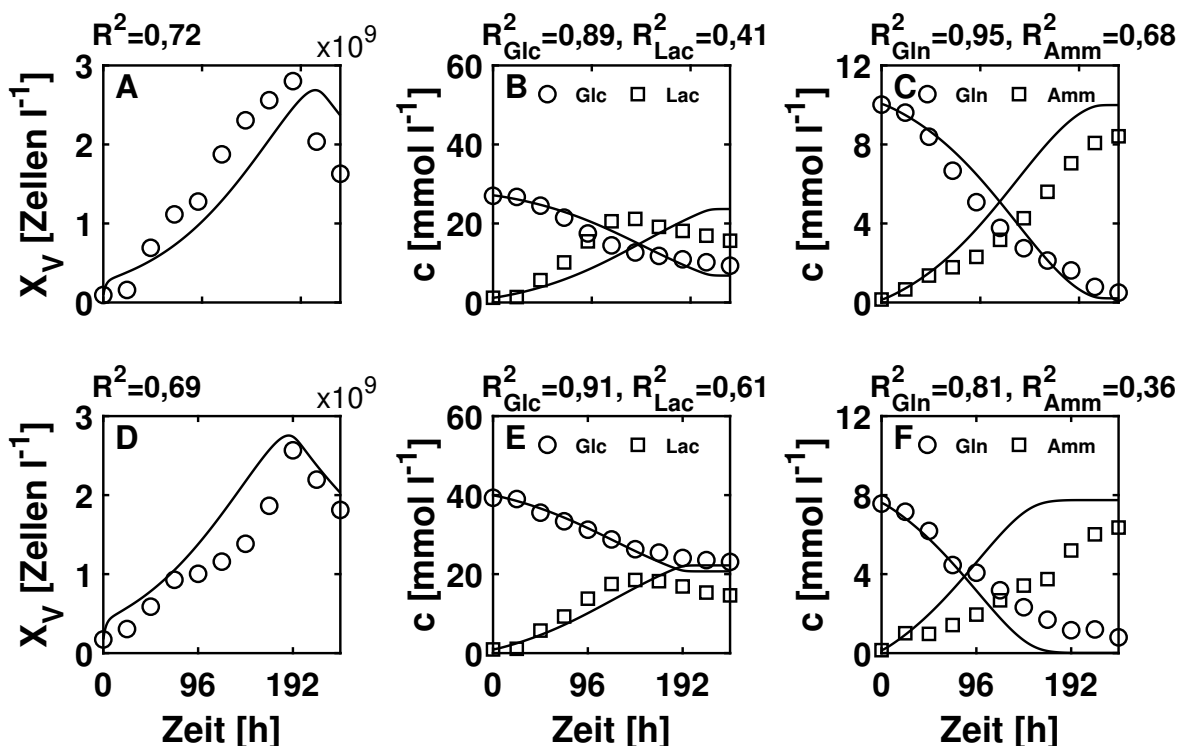


Abbildung 6.17: Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben (○) im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve (-). Dargestellt sind die Zellzahlen, Substrate und Metaboliten gegen die Kultivierungszeit. Die MC-Konzentration betrug 20 g l^{-1} . Die Daten der Grafiken A, B und C entstammen Versuch 1, während D, E und F Versuch 2 zuzuordnen sind.

unter- oder überschritten wird. Insgesamt ist anhand der Verläufe der Aminosäuren kein limitierende Einfluss zu detektieren, sodass ein anderes bisher unbekanntes limitierendes Substrat vorliegen muss. Daher wurde die Annahme formuliert, dass ein unbekanntes limitierendes Substrat vorliegt, welches in das mathematische Modell implementiert wurde (siehe Kapitel 6.2.5).

Tabelle 6.4: Vergleich spezifischer Kennwerte in Abhängigkeit zur MC-Konzentration.

c_{MC} [g l^{-1}]	$X_{V, max}$ [Zel- len cm^{-2}]	$t_{X_{V, max}}$ [h]	PD [-]	VF [-]
20	$5 \cdot 10^4$	192	$3 \pm 0,13$	$8,3 \pm 0,5$
10	$5,2 \cdot 10^4$	144	$3 \pm 0,15$	$8,3 \pm 0,9$
5	$6,7 \cdot 10^4$	144	3,8	14
3	$22,5 \cdot 10^4 \pm 10$	216	5,2	37,5
1	$39,8 \cdot 10^4 \pm 39$	216	6,1	66,3

PD: Populationsverdopplung, VF: Vermehrungsfaktor

Mit Berücksichtigung von zwei weiteren Experimenten, dargestellt in Abbildung 6.19, wurden die zuvor getroffenen Annahmen überprüft. Es wurden bewusst niedrige Substratkonzentrationen

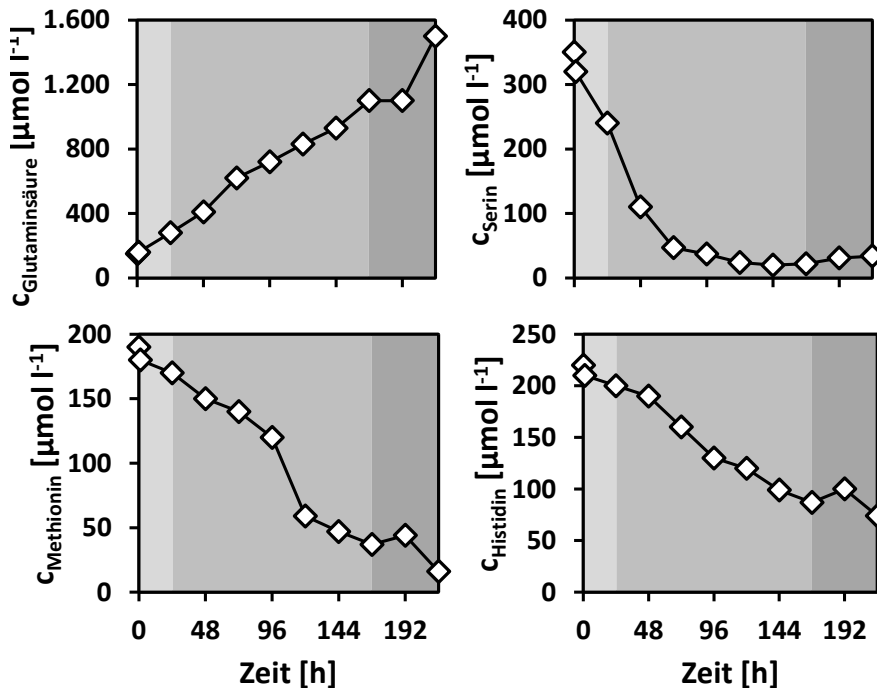


Abbildung 6.18: Dargestellt sind 4 von 15 Aminosäuren von Versuch 1, um zu verdeutlichen, dass diese keinen limitierenden Effekt auf das Zellwachstum haben. Die anderen Aminosäuren sind im Anhang dargestellt. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase.

gewählt, um den Einfluss dieser zu untersuchen. Bei den Experimenten wurden die D-Glukose-, L-Glutamin und nun zusätzlich die MC-Konzentration variiert. Auch in diesem Fall wurde kein Effekt von der D-Glukose- und L-Glutaminkonzentration auf die Wachstumsrate detektiert (Abbildung 6.19, A-C). Bei einer MC-Konzentration von 10 g l^{-1} sind die D-Glukose- und die L-Glutaminkonzentration bereits nach 96 h aufgebraucht (Abbildung 6.19, B, C), während die Zellen noch bis 120 h wachsen (Abbildung 6.19, A). Solange beide Substrate vorhanden sind, scheint kein limitierender Effekt aufzutreten. Da im weiteren Verlauf jedoch Versuche mit geringen Konzentrationen gefahren werden, wurden die beiden Substrate nicht in der Wachstumskinetik berücksichtigt. Die MC-Konzentration beeinflusst jedoch das Wachstum. Dies wird bei Betrachtung der Populationsverdopplungen (PD), des Vermehrungsfaktor (VF), der maximalen Zellzahl und dem Zeitpunkt des Erreichens der maximalen Zellzahl $t_{XV, \max}$ in Abhängigkeit zur MC-Konzentration deutlich (siehe Tabelle 6.4).

In Bezug zur Oberfläche wurde bei dem Versuch mit der geringsten MC-Konzentration die höchste Zellausbeute mit $6,7 \cdot 10^4 \text{ Zellen cm}^{-2}$ erzielt. Bei der höchsten MC-Konzentration hingegen wurde die geringste Zellkonzentration mit $5 \cdot 10^4 \text{ Zellen cm}^{-2}$ erreicht. Zudem erhöhte sich der Zeitpunkt des Erreichens der maximalen Zellzahl von 144 h auf 192 h. Möglicherweise wurden die Zellen bei hoher MC-Konzentration durch Aneinanderstoßen der MCs am Anhaften gehindert, sodass diese einen längeren Zeitraum zur Expansion benötigten. Diese formulierten Annahmen zur Beschreibung des spezifischen Zellverhaltens wurden im Anschluss zur Modifikation eines mathematischen Prozessmodells verwendet.

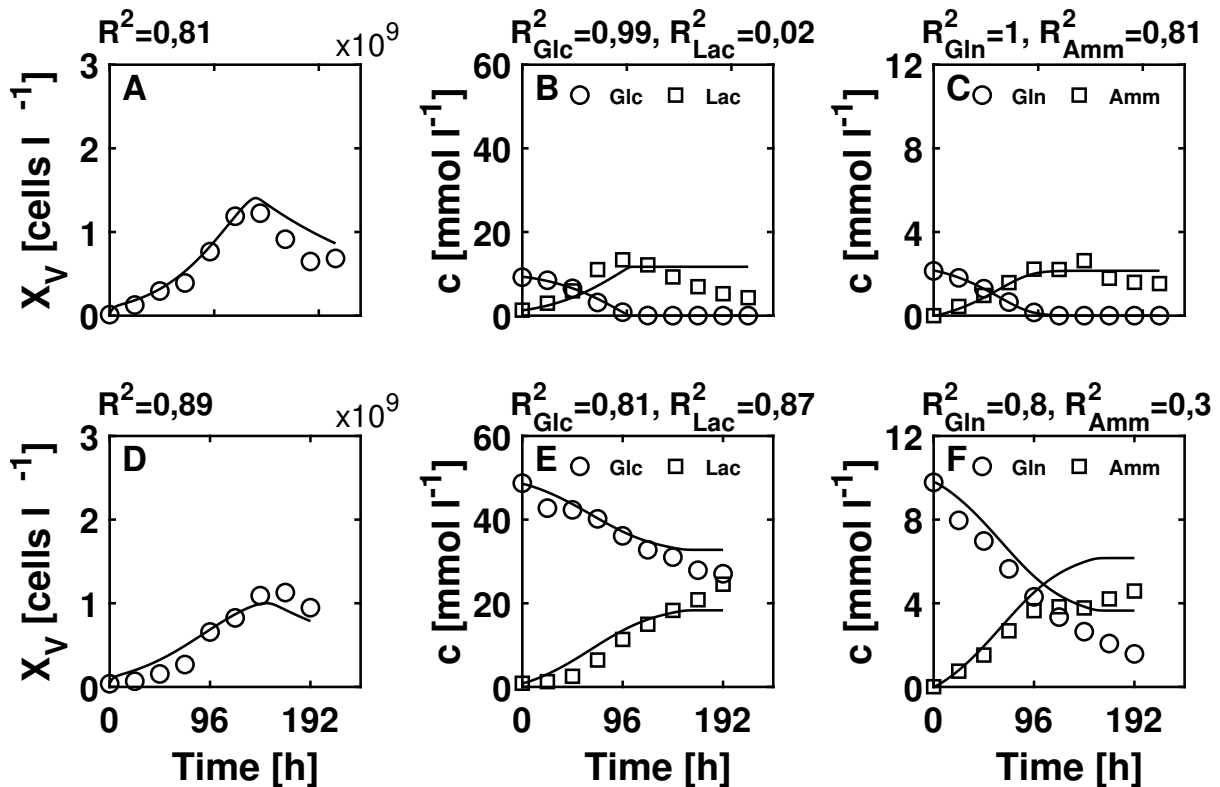


Abbildung 6.19: Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve. Dargestellt sind die Zellzahlen gegen die Messzeit. Die MC-Konzentration betrug 10 g l^{-1} (A, B, C) und 5 g l^{-1} (D, E, F). Die Daten der Grafiken A, B und C entstammen Versuch 3, während D, E und F Versuch 6 zuzuordnen sind.

6.2.5 Mathematisches Modell zur Beschreibung adhärenen Wachstums im Batch-Prozess

Zur Beschreibung des Wachstumsverhaltens von adhären-wachsenden Zellen auf MCs wurden bisher verschiedene deterministische und stochastische Ansätze in der Literatur diskutiert [219–221]. Allerdings wurde die Wachstumsbegrenzung dieser oft kontakthinhibierten Zellen durch räumliche Effekte auf Ebenen unterschiedlicher Komplexität beschrieben, wobei der Metabolismus weitgehend unberücksichtigt blieb. Dabei ist bei der Beschreibung der Kultivierung von adhären-wachsenden Zellen die anfängliche Anhaftungsphase von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Kultivierungen [222]. Daher wurde ein mathematisches Prozessmodell auf Basis der in der Literatur existierenden Modelle [16, 222, 223] zur Beschreibung adhären-wachsender Zellen modifiziert. Die Modellstruktur wurde aufgrund seiner einfachen Gestaltung und der Möglichkeit, alle Modellparameter aus wenigen Schüttelkolbenkultivierungen zu schätzen, gewählt. Die Modifizierung erfolgte iterativ mit der modellgestützten Datenanalyse.

Das mathematische Modell basiert auf der Verknüpfung der Hauptsubstrate D-Glukose (c_{Glc}) und L-Glutamin (c_{Gln}) sowie einem unbekanntem limitierenden Substrat (c_{LS}) (siehe Kapitel 6.2.4) mit den Hauptmetaboliten L-Laktat (c_{Lac}) und Ammonium (c_{Amm}). Durch die Verknüpfung der Substrate und Metabolite wird das Verhalten der Zellen beschrieben (X_{Sus} - Zelldichte in Suspension, und X_V

Tabelle 6.5: Modifiziertes mathematisches Modell für L929-Zellen im Batch-Prozess

Differentialgleichungen	Kinetische Verknüpfungen
Zellzahlen	
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X_v + k_{att} \cdot \frac{(X_{v,max} - X_v)}{X_{v,max}} \cdot X_{Sus}$ (6.3)	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_{LS}}{K_{s,LS} + c_{LS}} \cdot \frac{X_{v,max} - X_v}{X_{v,max}}$ (6.4)
$t < 20 \text{ h}: k_{att} = k_{att,max}$ (6.5)	$\mu_d = \mu_{d,min} + \mu_{d,max} \cdot \frac{c_{LS}}{K_{d,LS} + c_{LS}}$ (6.6)
$t \geq 20 \text{ h}: k_{att} = 0$ (6.7)	
$\frac{dX_{Sus}}{dt} = \mu_d \cdot X_v - k_{att} \cdot \frac{(X_{v,max} - X_v)}{X_{v,max}} \cdot X_{Sus}$ (6.8)	
Substrate und Metaboliten	
$\frac{dc_{Glc}}{dt} = -q_{Glc} \cdot X_v$ (6.9)	$q_{Glc} = \frac{\mu}{Y_{X/Glc}} \cdot \frac{c_{Glc}}{k_{Glc} + c_{Glc}} \cdot \frac{X_{v,max} - X_v}{X_{v,max}}$ (6.10)
$\frac{dc_{Gln}}{dt} = -q_{Gln} \cdot X_v$ (6.11)	$q_{Gln} = \frac{\mu}{Y_{X/Gln}} \cdot \frac{c_{Gln}}{k_{Gln} + c_{Gln}} \cdot \frac{X_{v,max} - X_v}{X_{v,max}}$ (6.12)
$\frac{dc_{LS}}{dt} = -q_{LS} \cdot X_v$ (6.13)	$q_{LS} = q_{LS,max} \cdot \frac{c_{LS}}{k_{LS} + c_{LS}}$ (6.14)
$\frac{dc_{Lac}}{dt} = q_{Lac} \cdot X_v$ (6.15)	$q_{Lac} = Y_{Lac/Glc} \cdot q_{Glc}$ (6.16)
$\frac{dc_{Amm}}{dt} = q_{Amm} \cdot X_v$ (6.17)	$q_{Amm} = Y_{Amm/Gln} \cdot q_{Gln}$ (6.18)

- Zelldichte auf den MCs). Mit dem nicht näher spezifizierten limitierenden Substrat wurden alle Komponenten berücksichtigt, die zu einer Limitierung führen, jedoch nicht messtechnisch erfasst werden (z. B. Serumkomponenten). Dieses Vorgehen wurde bereits erfolgreich bei Frahm et al. (2002) zur modellbasierten Steuerung eines Fed-Batch-Kultivierungsprozesses von Hybridoma-Zellen mittels eines *Open-Loop-Feedback-Optimal-Controller* umgesetzt [181].

Das Zellwachstum wird mit den kinetischen Parametern $k_{s,i}$ und $k_{d,i}$ ($i = \text{Glc, Gln, LS}$), einer maximalen Wachstumsrate (μ_{max}), einer Anhaftungskonstante (k_{att}) sowie einer minimalen ($\mu_{d,min}$) und einer maximalen Absterberate ($\mu_{d,max}$) modelliert. Die Implementierung einer Anhaftungskonstante ist für die Beschreibung adhären-wachsender Zellen unerlässlich. Im Intervall 0 - 24 h nimmt k_{att} den Wert $k_{att,max}$ an. Da Zellen, die sich in der Anfangsphase ablösen, apoptotisch sind und somit ihre adhären Funktionen verlieren, können sich diese nicht erneut anhaften [222]. Daher wird die Annahme getroffen, dass sich nach der initialen Anhaftungsphase keine Zellen mehr anhaften können und somit wird k_{att} nach 24 h auf 0 gesetzt. Zellen, die sich nach der initialen Anhaftungsphase von 24 h noch in der Flüssigphase befinden, werden als Suspensionszellen X_{Sus} definiert.

Da kein limitierender Einfluss der Substrate D-Glukose und L-Glutamin detektiert wurde, wurden diese nicht als limitierende Komponenten in der Wachstumskinetik berücksichtigt. Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ (Gleichung 6.4) und der spezifischen Sterberate μ_d (Gleichung 5.4) basiert daher auf einer Monod-ähnlichen Struktur des limitierenden Substrates (Gleichung 6.13).

Die Aufnahme rate des unbekannt limitierenden Substrats basiert im Gegensatz zum Wachstum nur auf der aktuellen unbekannt limitierenden Substratkonzentration (Gleichung 6.14). Die zellspezifischen Aufnahme rates von D-Glukose und L-Glutamin hängen von dem Verhältnis von Wachstum zur Zellausbeute ab (Gleichung 6.9, 6.10, 6.11, 6.12). Die Konzentrationen von L-Laktat und Ammonium sind proportional zu den Aufnahme rates von D-Glukose (L-Laktat) beziehungsweise L-Glutamin (Ammonium) (Gleichung 6.15, 6.16, 6.17, 6.18) und sind mit den Ausbeutekoeffizienten ($Y_{\text{Amm}/\text{Gln}}$ und $Y_{\text{Lac}/\text{Glc}}$) verknüpft. Für Wachstumsraten \leq Null ist das mathematische Modell nicht definiert und somit stoppt die Aufnahme beziehungsweise die Produktion der Substrate und Metaboliten. Jedoch wird die Güte der Anpassung nicht beeinflusst. Eine weitere Einschränkung wurde ins Modell aufgenommen, da der maximal verfügbare Platz auf den MCs $\left(\frac{X_{V,\text{max}} - X_V}{X_{V,\text{max}}}\right)$ berücksichtigt wurde.

Tabelle 6.6: Implementierte Begrenzungen des mathematischen Prozessmodells zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.

c_{MC} [g l ⁻¹]	Randbedingung [-]
20	$\mu = 0,6 \cdot \mu_{\text{max}}$
	$q_{\text{ls,max}} = 0,3 \cdot q_{\text{ls,max}}$
	$Y_{\text{X,Glc}} = 1,4 \cdot Y_{\text{X,Glc}}$
5	$Y_{\text{X,Glc}} = 0,5 \cdot Y_{\text{X,Glc}}$
	$Y_{\text{X,Gln}} = 0,5 \cdot Y_{\text{X,Gln}}$

Die Simulationen (siehe Abbildungen 6.17 und 6.19) ergaben, dass die MC-Konzentration das Verhältnis der Zellzahl zur Substratkonzentration beeinflusst, sodass dies als Begrenzung in das Modell implementiert wurde. Zusätzlich ist die in Kapitel 6.2.4 getroffene Annahme des Einflusses der MC-Konzentration als Randbedingungen in das Modell integriert und in der Tabelle 6.6 dargestellt. Schlussendlich wurden durch die Analyse der Datensätze erhebliche Erkenntnisse über das Verhalten der Zellen erarbeitet und als Annahmen in das mathematische Modell implementiert (Abbildung 6.10, Kasten 5). Dadurch stand nun ein mathematisches Modell zur Beschreibung des Wachstumsverhalten der Zellen zur Verfügung.

Anpassen von Modellparametern

Nach Formulierung des mathematischen Prozessmodells wurden die Parameter an alle Datensätze gleichzeitig angepasst. Zusätzlich wurden die Anfangswerte der einzelnen Datenreihen zur Anpassung freigegeben. Die resultierenden Werte sowie die Startwerte sind in Tabelle 6.7 dargestellt. Die Startwerte basierten sowohl auf Abschätzungen (z. B. maximale spezifische Wachstumsrate, Ausbeutekoeffizienten) als auch auf Expertenwissen.

Auf Basis der Modellgleichungen des angepassten mathematischen Modells wurden die Kurven

Tabelle 6.7: Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die zugehörigen Startwerte und resultierenden Werte.

Parameter	Einheit	Startwert	Angepasste Werte
$\mu_{d,max}$	h^{-1}	0,02	0,0064
$\mu_{d,min}$	h^{-1}	0,003	0,0002
μ_{max}	h^{-1}	0,02	0,026
$K_{att,max}$	h^{-1}	0,03	0,4
$K_{d,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	0,005	0,065
K_{Glc}	$mmol\ l^{-1}$	0,19	0,03
K_{Gln}	$mmol\ l^{-1}$	2,5	0,61
$k_{s,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	0,01	0,002
k_{LS}	$mmol\ l^{-1}$	0,1	0,035
$Y_{X/Glc}$	$10^7\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	7,2	7,2
$Y_{X/Gln}$	$10^8\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	1,7	1,7
$q_{LS,max}$	$10^{-11}\ mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$	1,4	1,4
$Y_{Lac/Glc}$	-	1,5	1,1
$Y_{Amm/Gln}$	-	0,6	1

der Lebendzell-, D-Glukose-, L-Glutamin-, L-Laktat- und Ammoniumkonzentrationen bestimmt. Diese sind in Abbildung 6.20 dargestellt. Zusätzlich sind die Kurvenverläufe und die resultierenden Bestimmtheitsmaße bereits bei den Grafiken der einzelnen Versuche eingetragen (siehe Abbildungen 6.17 und 6.19).

Der Verlauf der Lebendzellzahl wird mit einer Genauigkeit von $R^2 = 0,80$ dargestellt. Damit kann die Anhaftung, die exponentielle Phase sowie die Sterbephase dargestellt werden. Die Simulationen für die Substrate können mit einer Genauigkeit von $R^2 > 0,9$ dargestellt werden, wobei die Simulationen der Metaboliten nur eine Genauigkeit von $R^2 > 0,4$ erreichen. Bei den experimentellen Datensätzen von L-Laktat ist ein *Shift* von L-Laktatproduktion zu L-Laktataufnahme zu verzeichnen (Abbildungen 6.19, B & E und 6.17, B & E). Allerdings ist der *Shift* weder an den Übergang der exponentiellen Phase in die stationäre Phase noch an bestimmte Substratkonzentrationen gekoppelt. Es wurden somit keine Annahmen zur Implementierung in das mathematische Prozessmodell formuliert. Dementsprechend wird der zeitliche Verlauf der L-Laktatkonzentration ungenau abgebildet. Ein ähnliches Verhalten folgt für den Verlauf der Ammoniumkonzentration. Es kommt zu einer Überschätzung der experimentellen Daten durch die Simulation. Da jedoch die Metaboliten keine Inhibierung verursachen und die Verläufe abgebildet werden, wird das geringe Bestimmtheitsmaß als ausreichend erachtet und das mathematische Modell wurde für den mDoE verwendet (Abbildung

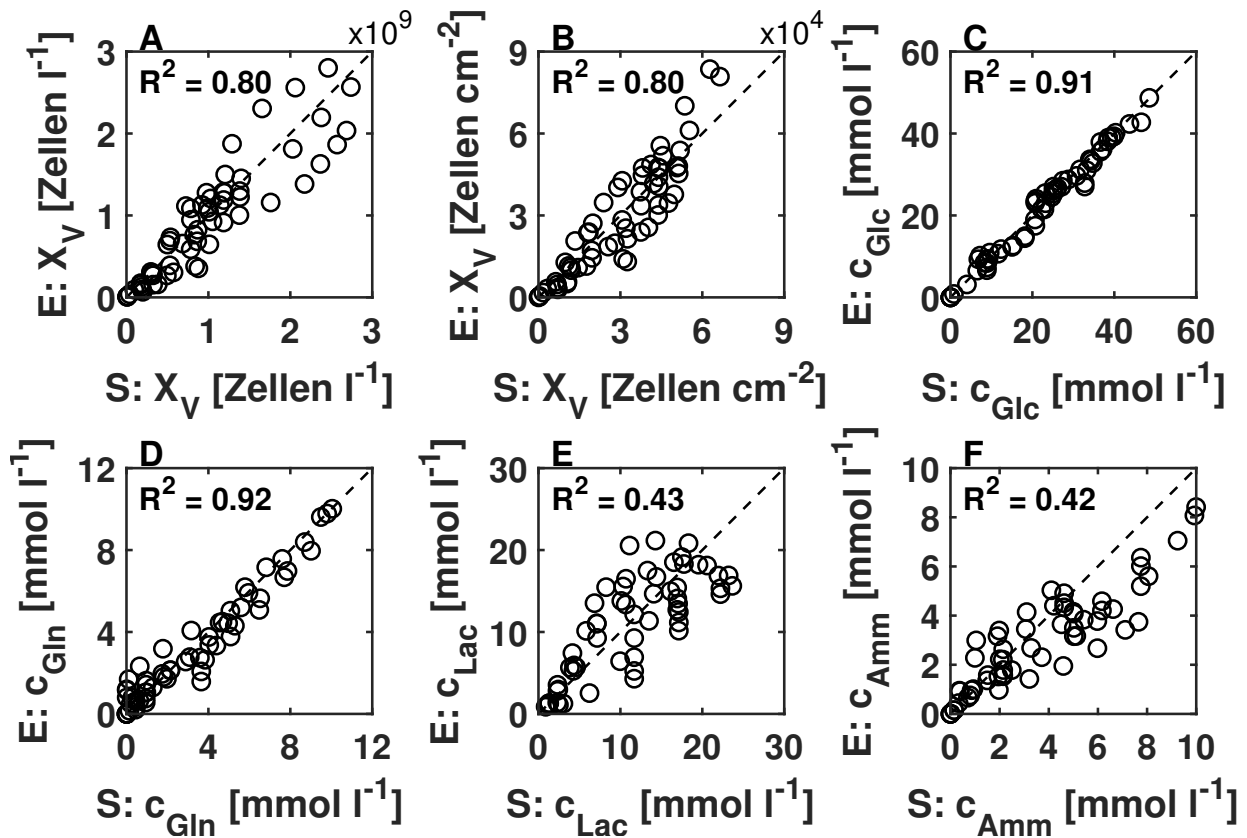


Abbildung 6.20: Wachstumskurven der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zur simulierten Wachstumskurve. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Zellzahlen sowie der zeitliche Verlauf der Substrat- und Metabolitenkonzentrationen (Glc, Gln, Lac, Amm).

6.10, Kasten 6). Möller et al. (2019) beobachteten ein ähnliches Verhalten. Die Laktatkonzentration der dort verwendeten CHO DP12-Zellen stieg in den ersten 48 Stunden schneller an als die vom Modell vorhergesagten Konzentrationen. Die sekundäre Laktat- und Ammoniumanreicherung nach 120 Stunden entsprach dem Zelltod, der Apoptose, Nekrose und Zellyse, umfasst. Die Modellierung solcher Effekte wurde mit dem vorgeschlagenen einfachen Modell und den verfügbaren Daten nicht angestrebt, sodass geringe Bestimmtheitsmaße dennoch akzeptiert wurden [224]

Quantifizierung der Messunsicherheiten

Basierend auf den 6 Experimenten aus Tabelle 6.3 wurden die Modellparameter erfolgreich angepasst, sodass diese zur Unsicherheitsquantifizierung verwendet wurden. Es wurde eine $\pm 15\%$ -Abweichung als Unsicherheit bei den Startwerten der Kultivierungsdaten angenommen.

In Abbildung 6.21 ist exemplarisch der gemittelte Verlauf der Lebenszellzahl von Versuch 3 dargestellt. Die Startwerte wurden 1000-fach um 15 % variiert. Basierend auf Monte-Carlo-Sampling wurden im Anschluss 20 Parametersätze gezogen und die Kurvenverläufe simuliert. Zusätzlich wurden die 90/10 %-Quantile bestimmt und mit den experimentellen Datenpunkten grafisch dargestellt. Die Unsicherheitsquantifizierung bestätigt, dass das mathematische Modell bei gestreuten Startwerten das experimentelle Verhalten widerspiegelt. Mit dem mathematischen Modell ist es

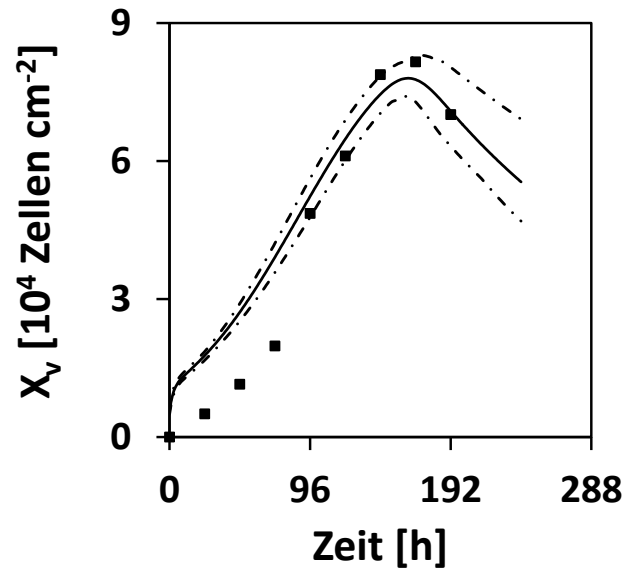


Abbildung 6.21: Unsicherheitsquantifizierung der Lebendzellzahl für Versuch 3. Die Startwerte wurden um $\pm 15\%$ 1000-fach variiert und aus den gestreuten Parametern mittels Monte-Carlo *Sampling* 20 Parametersätze gezogen. Diese wurden simuliert und die Mittelwerte (-) sowie 90/10 %-Quantile (-.-) bestimmt. Zusätzlich sind die Datenpunkte (■) in die Grafik eingetragen.

somit möglich die maximale Zellzahl sowie den Übergang in die Sterbephase zu simulieren. Der Beginn der Kultivierung kann nicht dargestellt werden, ist durch die hohe Güte der Endphase jedoch zu vernachlässigen. Zudem wird mit der Unsicherheitsquantifizierung gezeigt, dass Unsicherheiten in den Startwerten, wie Messfehler, Auswirkungen auf die Endphasen der Kultivierung haben. Eine Variation von 15 % in den Startwerten wird beispielsweise erst mit Übergang in die Sterbephase deutlich. Durch die Unsicherheitsquantifizierung wird diese real auftretende Variation jedoch mathematisch berücksichtigt.

6.2.6 Modellgestützte Evaluation verschiedener Versuchspläne

Ein D-Optimaler, I-Optimaler, LHS + D-Optimaler Versuchsplan sowie CCD und BBD wurden verwendet, um die Faktorkombinationen zu planen und den Batch-Prozess zu simulieren. Die Anfangskonzentration der D-Glukose wurde im Bereich von 5 - 60 mmol l^{-1} variiert. Gewählt wurde dieser Bereich basierend auf [224], wobei die untere Grenze um 75 % nach unten gesetzt wurde, um den geringen Einfluss der D-Glukosekonzentration bestmöglich zu überprüfen. L-Glutaminkonzentrationen variieren typischerweise in einem weiten Bereich von 2 - 12 mmol l^{-1} , sodass dieser nicht mehr verändert wurde. Der Konzentrationsbereich der MCs wurde im Bereich von 1 - 20 g l^{-1} variiert. Als Zielgröße wurde die Zellzahl gewählt. Die Erwünschtheitsfunktion wurde berechnet (siehe Kapitel 5.1.4), indem die Zellzahl maximiert wurde, und für alle Versuchspläne in Abbildung 6.22 dargestellt. Obwohl der geringe Einfluss der D-Glukose- und L-Glutamin in die Zellkinetik vorhersagbar war, wurden diese beiden Faktoren untersucht, um Unterschiede beim Vergleich verschiedener Versuchspläne aufzuzeigen.

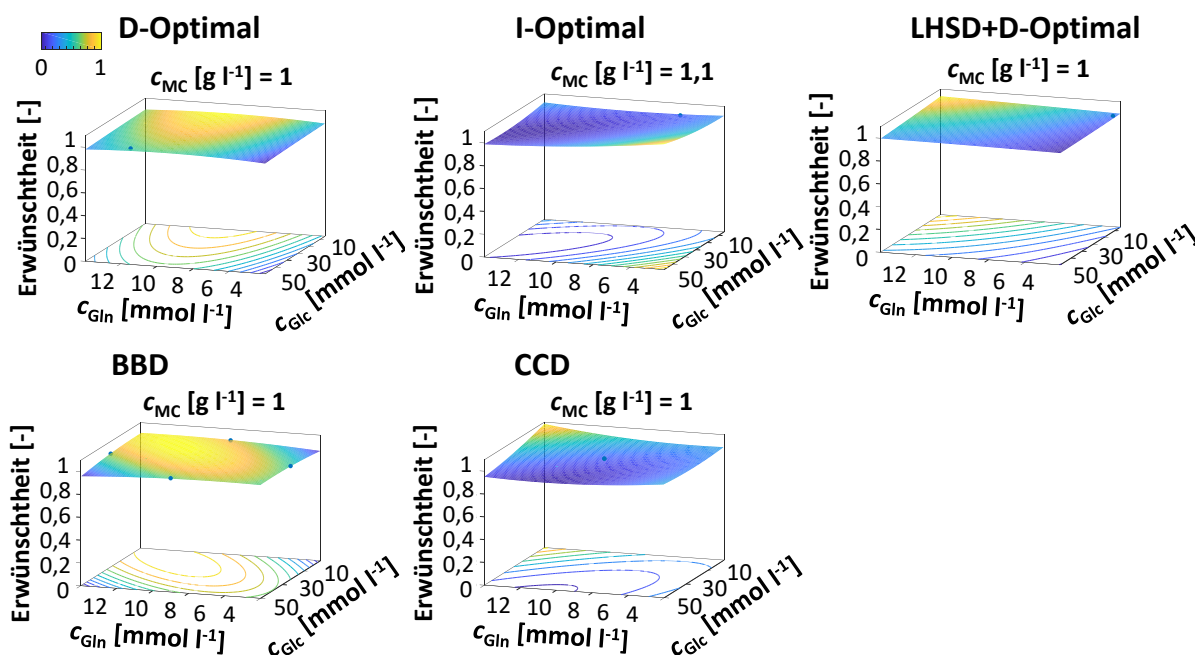


Abbildung 6.22: RSM-Grafiken der Erwünschtheitsfunktion (Berechnet über die maximale Zellzahl) für die Optimierung der D-Glukose- und L-Glutaminkonzentration eines Kultivierungsprozesses im Batch-Prozess. Es wurden ein D-Optimaler, I-Optimaler, LHSD+D-Optimaler Versuchsplan, BBD und CCD miteinander verglichen. Die blauen Kugeln sind Faktorkombinationen. Bei 3 Faktoren wurde bei den RSM-Grafiken einer der Faktoren bei seinem Optimum fixiert, der eingestellte Wert ist über der RSM-Grafik notiert.

Bei den fünf Versuchsplänen, dargestellt in Abbildung 6.22 und Abbildung 6.23, wurde eine maximale Zellausbeute pro Fläche bei einer MC-Konzentration von 1 g l^{-1} und variabler D-Glukose- und L-Glutaminkonzentrationen erreicht. Die Maxima der D-Glukose- und L-Glutaminkonzentration in Abhängigkeit der Erwünschtheit variieren zwischen den Versuchsplänen im 5 %-Bereich. Beim CCD und BBD wurden im Vergleich zu den Optimalen und LHSD + D-Optimalen Versuchsplan 20 und 24 statt 16 Faktorkombinationen zur Erstellung der Versuchspläne benötigt. Bei einer experimentellen Umsetzung wären somit die Optimalen und der LHSD + D-Optimale Versuchsplan zu empfehlen, wobei der D-Optimale Versuchsplan zusätzlich kaum Variationen bei der Erstgüte aufweist, wodurch ein D-Optimaler Versuchsplan zu bevorzugen ist. Zur Evaluation der empfohlenen Faktorkombinationen (minimale MC-Konzentration, mittlere D-Glukose- und L-Glutaminkonzentrationen) wurden Versuch 7 und 8 aus Tabelle 6.3 experimentell umgesetzt.

Mit Reduzieren der MC-Konzentration auf 1 g l^{-1} wurde eine 6-fache Steigerung der Zellausbeute im Vergleich zu den Zellausbeuten bei einer MC-Konzentration von 5 g l^{-1} erreicht (Tabelle 6.4). Im Vergleich zu der Zellausbeute bei einer MC-Konzentration von 20 g l^{-1} wurde sogar eine 8-fache Steigerung erzielt. Der Zeitpunkt des Erreichens der maximalen Zellzahl erhöhte sich jedoch um 72 h, wobei bereits nach 144 h eine Zellzahl von $20,3 \cdot 10^4 \text{ Zellen cm}^{-2}$ dokumentiert wurde. Die Anwendung der mDoE-Methoden, einschließlich der Analyse des Zellverhaltens wurde somit

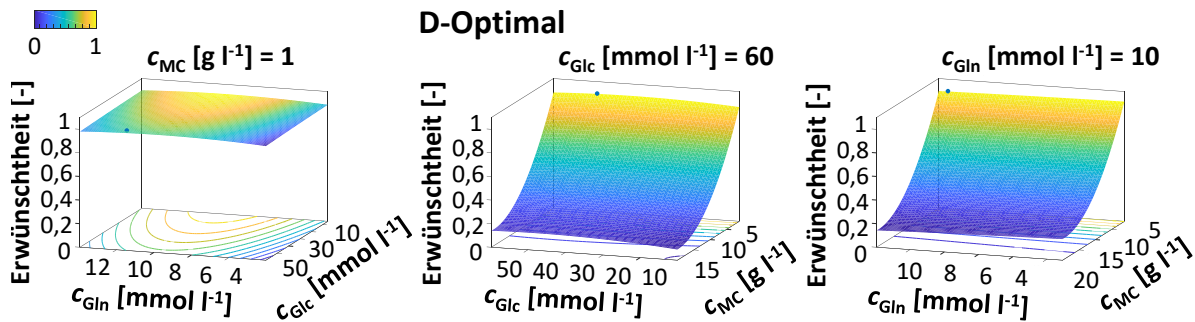


Abbildung 6.23: RSM-Grafiken der Erwünschtheitsfunktion (Berechnet über die maximale Zellzahl) für die Optimierung der D-Glukose-, L-Glutamin- und MC-Konzentration eines Kultivierungsprozesses im Batch-Prozess. Es wurde ein D-Optimaler Versuchsplan mathematisch ausgewertet. Die blauen Kugeln sind Faktorkombinationen. Bei 3 Faktoren wurde bei den RSM-Grafiken einer der Faktoren bei seinem Optimum fixiert, der eingestellte Wert ist über der RSM-Grafik notiert.

genutzt, um Verständnis über das Verhalten der L929-Zellen zu generieren und die Ausbeute der Zellzahl während des Kultivierungsprozesses zu steigern, wobei lediglich 6 Experimente benötigt wurden.

6.2.7 Erweiterung des mathematischen Modells

Die Ergebnisse der Versuche 7 und 8 aus Tabelle 6.3 zeigten zusätzlich, dass das mathematische Modell die maximale Zellzahl bei den geringen MC-Konzentrationen unterschätzte. Daher wurde das mathematische Modell um weitere Begrenzungen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens erweitert (Tabelle 6.8). Es wurden die spezifische maximale Wachstumsrate sowie die Ausbeutekoeffizienten der Zellzahlen bezogen auf die Substrate angepasst.

Tabelle 6.8: Implementierte Begrenzungen zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.

c_{MC} [g l ⁻¹]	Randbedingung [-]
3	$q_{ls,max} = 0,5 \cdot q_{ls,max}$
	$Y_{X,Glc} = 0,5 \cdot Y_{X,Glc}$
	$Y_{X,Gln} = 0,5 \cdot Y_{X,Gln}$
1	$\mu_{max} = 1,2 \cdot \mu_{max}$
	$Y_{X,Glc} = 0,5 \cdot Y_{X,Glc}$
	$Y_{X,Gln} = 0,5 \cdot Y_{X,Gln}$

6.2.8 Modellgestützter Vergleich verschiedener Kultivierungssysteme

Das mDoE-Konzept bietet den Vorteil, dass ebenfalls verschiedene Kultivierungssysteme miteinander verglichen werden können, ohne zeitaufwendige und kostenintensive Experimente durchführen zu müssen. Beispielhaft werden im nachfolgenden Kapitel die Unterschiede einer Kultivierung im Schüttelkolben und im Bioreaktor dargestellt.

Statistischer Vergleich der Schüttelkolbenkultivierungen mit einer Bioreaktorkultivierung

Eine Sensitivitätsanalyse wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Zellkinetik in Abhängigkeit zum Kultivierungssystem auftreten. Durch Detektion systemspezifischer Unterschiede ist eine mathematische Berücksichtigung möglich, sodass fortan Experimente im „leichteren“ System umzusetzen sind. Es stellt sich somit die Frage, ob auch in diesem Fall das mDoE eine Erleichterung bietet. Die Sensitivitätsanalyse wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben umgesetzt und die Signifikanz wurde durch die direkte Verknüpfung mit der maximalen Zellzahl bestimmt. Dabei wurden Modellparameter als sensitiv detektiert (Tabelle 6.9).

Tabelle 6.9: Sensitive Modellparameter. Die Sensitivitätsanalyse wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben umgesetzt. Die Signifikanz wurde bestimmt durch die direkte Verknüpfung mit der maximalen Zellzahl.

Parameter	Sensitivität [%]
μ_{\max}	68
$q_{\text{ls,max}}$	24

μ_{\max} wurde als sensitivster Parameter identifiziert. Dies ist typisch, da dieser der Hauptparameter zur Berechnung von X_v und somit mit allen Differentialgleichungen verlinkt ist. Zusätzlich wurde der Parameter, der mit dem Metabolismus des unbekannt limitierenden Substrats ($q_{\text{ls,max}}$) verbunden ist, als sensitiv detektiert. Dieses Substrat ist ebenfalls direkt mit dem Zellwachstum verbunden. Abbildung 6.24 zeigt zudem die relativen Funktionswerte der sensitiven Modellparameter im Vergleich zum Schüttelkolben und zum STR. Die Unterschiede wurden als signifikant detektiert. Im STR treten größere maximale spezifische Wachstumsraten auf. Das Wachstum wird jedoch bedingt durch das limitierende unbekannte Substrat früher gestoppt und die stationäre Phase wird eingeleitet. Bei der lokalen Sensitivitätsanalyse wird die Veränderung der Ausgangsgröße in Abhängigkeit zur Veränderung des jeweiligen Modellparameters berechnet und die spezifische Sensitivität bestimmt. Die Umsetzung ist recheneffizient und schnell, jedoch bleiben Modellparameterinteraktionen unberücksichtigt [34, 35]. Ein weiterer Nachteil ist, dass dieses Verfahren ineffizient im Hinblick auf die Zeit des Benutzers ist, da *ad-hoc* in das Computerprogramm eingegriffen werden muss. Grenzen müssen festgelegt und angepasst sowie die zu variierenden Eingangsgrößen und Modellparameter bestimmt werden [225]. Dennoch bietet die modellgestützte Analyse die Möglichkeit,

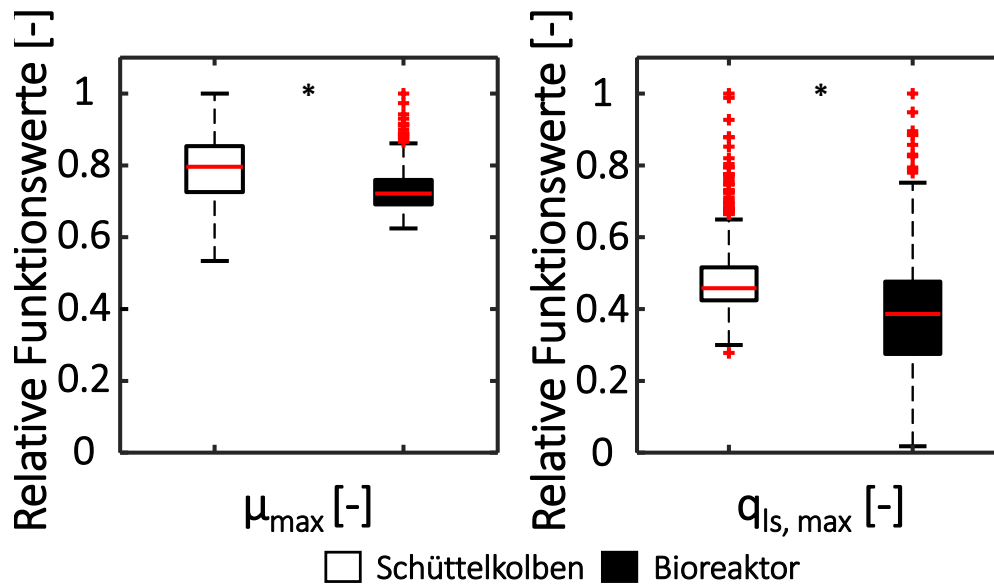


Abbildung 6.24: Box-Plots der sensitiven Modellparameter. Die Modellparameter wurden 1000-fach variiert und der Einfluss auf die Zellzahl bestimmt.

durch simple Anwendung Unterschiede zwischen Kultivierungssystemen zu detektieren. Zudem ist es nun möglich Experimente für L929-Zellen im Schüttelkolben umzusetzen und mittels des mathematischen Prozessmodells das Zellverhalten im STR zu simulieren. Dadurch können die aufwendigen Kultivierungen im STR durch Kultivierungen im Schüttelkolben ersetzt und erneut Zeit und Kosten eingespart werden.

6.2.9 Anwendungsbezogene Beurteilung der mDoE-Methoden bei der modellgestützten Auslegung eines L929-Kultivierungsprozesses

Die einzelnen Bausteine des mDoE-Konzeptes wurden anhand der CHO DP12-Zellen definiert und in einem mDoE-Workflow zusammengefasst. Dadurch wurden die gesamten Anwendungsmöglichkeiten der mDoE-Konzepte offenbart und ein hilfreiches und transparentes Werkzeug zur Umsetzung eines mDoE geschaffen. Jedoch befand sich die Prozessentwicklung der CHO DP12-Zellen in einem späten Entwicklungsstadium, da der Zellmetabolismus bereits im Batch- und Fed-Batch-Prozess in spezifische Modellkinetiken übersetzt worden war und die Beschreibung des zellspezifischen Wachstumsverhaltens ermöglichte. Daher musste überprüft werden, inwiefern die mDoE-Konzepte und der entwickelte mDoE-Workflow für die Early-Stage-Prozessentwicklung anwendbar war.

Gerade zu Beginn einer Prozessentwicklung ist der Anspruch an die Sicherheit der Vorhersage gegeben. Der mDoE-Workflow bietet den Vorteil, dass iterativ Wissen erschlossen werden kann, sodass nur Experimente mit hohem Erkenntnisgewinn umgesetzt werden. Zeitgleich kann die Anzahl an Versuchsläufen reduziert werden. Dies führt letztendlich zu einer schnelleren Umsetzung der klinischen Entwicklungsphasen und somit zu einem früheren Markteintritt des Biopharmazeutikums. Der mDoE-Workflow bietet hier einen Leitfaden und gewährleistet die Fokussierung zu bewahren.

Durch den mDoE-Workflow wurde bei der Prozessetablierung der L929-Zellen eine tiefgehende Analyse des Zellverhaltens ermöglicht. Es wurden in kürzester Zeit die erforderlichen Methoden zur Kultivierung im Schüttelkolben und Bioreaktor etabliert und Wissen über das Zellverhalten generiert. Zudem wurden durch die iterative Ergänzung der Kultivierungsdaten nur wissensbasierte ressourcenschonende Experimente durchgeführt. Modellgestützte Vorhersagemethoden erleichtern die Prozessauslegung, wobei die Leistung von der Vorhersagegenauigkeit abhängt. Wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben, wurden verschiedene Gütefunktionale miteinander verglichen. Dies bietet den Vorteil in Abhängigkeit zur jeweiligen Zielsetzung ein geeignetes Gütefunktional zu wählen.

In der Studie von Hernández Rodríguez et al. (2019) wurde die Anwendung der Bayes'schen Parameterschätzung und der Bayes'schen Aktualisierung für die Vorhersage von *Seedtrains* auf einen industriellen Zellkulturprozess von CHO-Zellen, gekoppelt mit einem mechanistischen Modell, beschrieben. Dadurch wurde gezeigt, wie Vorwissen sowie Eingangsunsicherheiten (z. B. in Bezug auf Messungen) in die mathematische Modellierung einbezogen und auf die Vorhersageunsicherheit übertragen werden können [226]. Grundsätzlich ist es sinnvoll Vorwissen einzubeziehen, jedoch befand sich der von Hernández Rodríguez et al. (2019) beschriebene Prozess in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium. Für die L929-Zellen lag kein Vorwissen vor, sodass die genannten Methoden nicht anwendbar waren. Dennoch ist es wichtig festzuhalten, dass es eine weite Bandbreite an Methoden zur Prozessentwicklung gibt, die in Abhängigkeit zum jeweiligen Entwicklungsstand des Prozesses in den mDoE-Workflow ergänzt und angewendet werden können. Generell bietet der mDoE-Workflow kein unveränderliches Werkzeug, sondern kann je nach Optimierungsziel um weitere Bausteine ergänzt werden.

Zusammenfassend wurde mithilfe der mDoE-Methoden erstmalig eine L929-Kultivierung im Schüttelkolben erfolgreich umgesetzt. Durch die Ergebnisse von 6 Schüttelkolbenversuchen wurde eine 8-fache Steigerung der Zellausbeute erzielt. Zusätzlich wurde erfolgreich ein *Bead-to-Bead*-Transfer für L929-Zellen im Schüttelkolben durchgeführt.

6.3 Modellgestützte Prozessauslegung der hMSC-TERT

Als weiteres Testsystem zur Evaluation des mDoE-Workflows wurden hMSC-TERT untersucht. Wie bei den L929-Zellen wurde als Produkt die Zellzahl pro Fläche und als Optimierungsziel eine maximale Zellausbeute definiert (Abbildung 6.10, Kasten 1), allerdings wurde ein *Bead-to-Bead*-Transfers modellgestützt ausgelegt. Hierbei lag der Fokus auf der Optimierung des Startzeitpunktes des *Bead-to-Bead*-Transfers und der Konzentration an MCs während des *Bead-to-Bead*-Transfers (Abbildung 6.10, Kasten 2).

Der hMSC-TERT-Prozess befand sich ebenfalls in einem frühen Entwicklungsstadium, allerdings konnte in diesem Fall auf die Erkenntnisse der vorangegangenen Studien zurückgegriffen und auf die modellgestützte Prozessauslegung der hMSC-TERT angewandt werden. Zusätzlich wurden Kultivierungen zur Analyse des Zellverhaltens durchgeführt (Abbildung 6.10, Kasten 3). Anhand

der generierten Daten wurde Vorwissen generiert und durch die Formulierung der Kausalitäten (Abbildung 6.10, Kasten 4) das entwickelte mathematische Prozessmodell angepasst (Kapitel 6.2.5 und Abbildung 6.10, Kasten 5).

6.3.1 Systematisches MC-Screening in Bezug zur Wachstums- und Metabolitenkinetik

Die Verwendung von hMSCs in der allogenen Zelltherapie erfordert einen skalierbaren, kostengünstigen Herstellungsprozess und somit auch die Auswahl eines geeigneten MCs. Aufgrund der Ergebnisse des MC-Screenings in Kapitel 6.2.2 wurden bei den hMSC-TERT Kultivierungen lediglich Experimente in der Mikrotiterplatte durchgeführt. Dies bot den Vorteil, dass keine zeitintensiven Schüttelkolbenexperimente umgesetzt werden mussten.

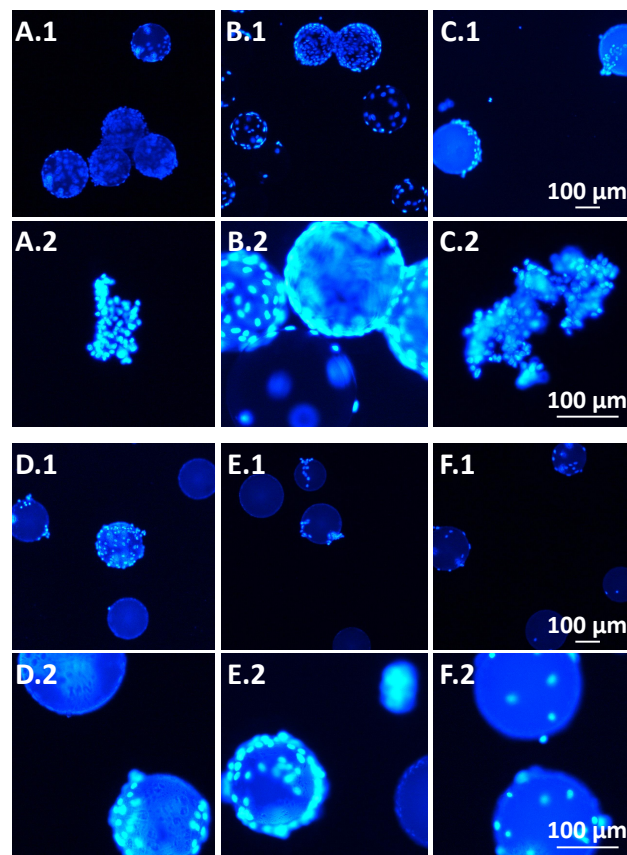


Abbildung 6.25: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SoloHill und des Cytodex 3 MCs (A-CollagenCoated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Plastic, E-PlasticPlus, F-StarPlus). Es wurden hMSC-TERT der Passage P92 für 72 h kultiviert.

Wie in Abbildung 6.25, C-F dargestellt, sind die FACT, Plastic, PlasticPlus und StarPlus MCs im Vergleich zum Collagen Coated und Cytodex 3 MC nur gering bewachsen. Interessanterweise sind die FACT MC kaum bewachsen, stattdessen werden Zell-Zell-Agglomerate mit einer Größe von bis zu 260 µm ausgebildet. Kleinere Zell-Zell-Agglomerate wurden ebenfalls bei den Collagen Coated MCs detektiert. Zusätzlich wurden jedoch ebenfalls MC-Zell-Agglomerate mit einer Größe

von bis zu 600 μm gebildet. Bei den Cytodex 3 MCs wurden hingegen nur MC-Zell-Agglomerate detektiert. MC-Zell-Agglomerate sind ein typisches Phänomen, wie unter anderem Jossen et al. (2018) und Abraham et al. (2017) in ihren Studien dokumentierten [101, 102]. Allerdings wurde dort betont, dass aufgrund der Bildung von Konzentrationsgradienten innerhalb der MC-Zell-Agglomerate Limitierungen auftreten. Nach Abraham et al. (2017) sollten diese somit vermieden werden [102]. Dennoch scheinen die hMSC-TERTs gerade bei Agglomeratbildung vermehrt und mit hoher Viabilität zu wachsen. Daher wurde dieser Effekt in den nachfolgenden Studien kritisch betrachtet.

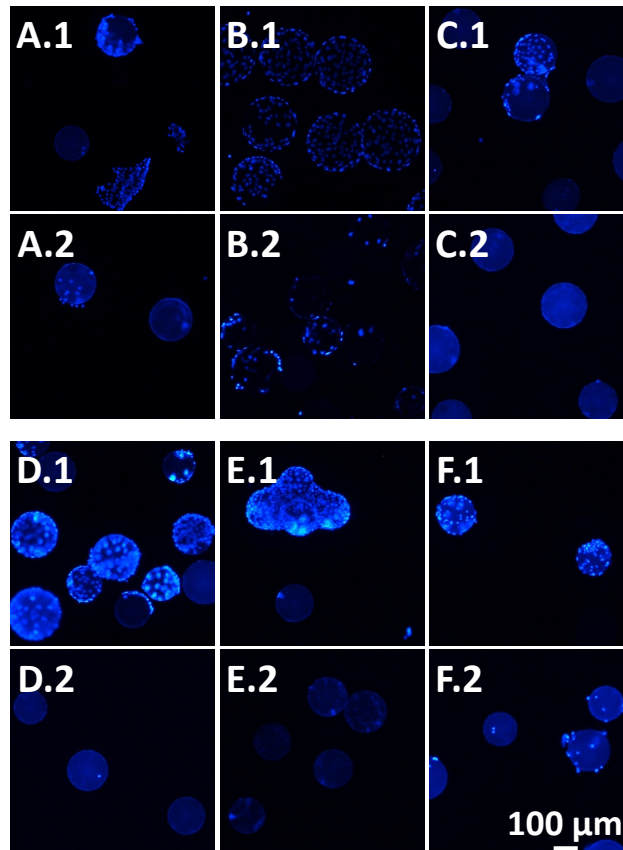


Abbildung 6.26: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SoloHill und des Cytodex 3 MCs (A-CollagenCoated, B-Cytodex 3, C-FACT, D-Plastic, E-PlasticPlus, F-StarPlus) vor (1) und nach (2) der Ernte. Es wurden hMSC-TERT der Passage P92 kultiviert.

In Abbildung 6.26 sind die MCs vor und nach der Ernteprozedur dargestellt. Es ist ersichtlich, dass bei keinem MC ein vollständiges Ablösen der Zellen von den MCs möglich war. Dennoch war bei der Verwendung der Cytodex 3 MCs die Handhabung sowie die Ernte durch die schnelle Sedimentation der MCs vorteilhaft, sodass diese in den weiteren Versuchen verwendet wurden.

6.3.2 Differenzierung und Phänotypisierung

Nach den ISCT-Richtlinien [79] müssen für MSCs eine Plastikadhärenz, eine Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteblasten sowie die Expression bestimmter Oberflächenmarker

nachgewiesen werden. Eine Plastikadhärenz wurde durch die Kultivierung in T-Flaschen bestätigt. Die Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten sowie die Charakterisierung wurde in verschiedenen Passagen und nach unterschiedlichen Kultivierungsstadien nachgewiesen. Abbildung 3.2 zeigt die erfolgreiche Differenzierung in Osteoblasten, in Adipozyten und in Chondrozyten (P90). Die ausdifferenzierten Adipozyten wurde durch eine Ölrot-O Färbung der Lipidvakuolen bestätigt. Mittels der Alcianblau-Färbung der Proteoglykane wurde die chondrogene Differenzierung und mittels einer Alizarinrot-Färbung der intrazellulären Kalziumablagerungen eine Differenzierung in Osteozyten erfolgreich nachgewiesen.

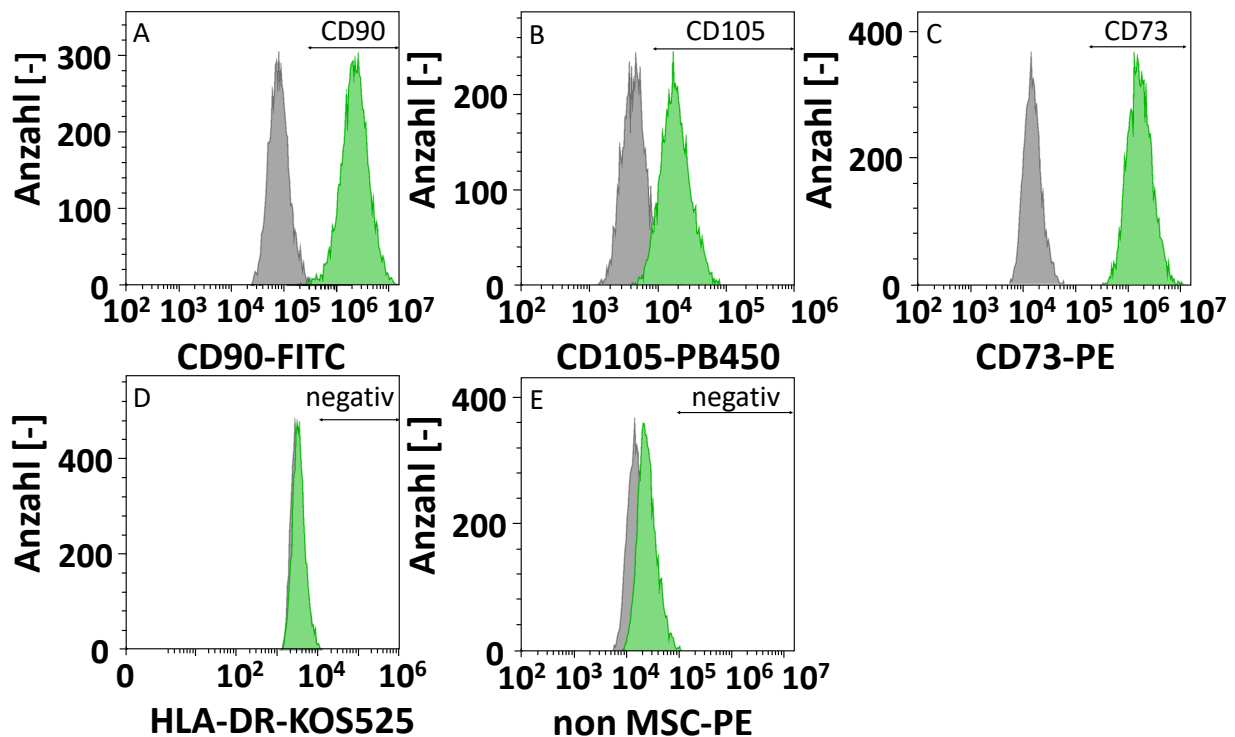


Abbildung 6.27: Oberflächenmarker-Analyse von hMSC-TERT, die auf Cytodex 3-MCs im DMEM expandiert wurden. Positive Marker CD90, CD105 und CD73 (A-C) und der Negativcocktail mit CD45, CD34, CD14, CD19 (D) sowie HLA-DR (E). Isotyp-Kontrollen sind in grau dargestellt. Es wurden hMSC-TERT der Passage 90 charakterisiert.

In Abbildung 6.27 ist die Oberflächenmarker-Analyse der hMSC-TERT (P90), die auf Cytodex 3 MCs expandiert wurden, dargestellt. Die hMSC-TERT waren negativ (<2 %) für hämatopoetische Marker wie CD45, CD34, CD14, CD19 sowie HLA-DR und positiv (>90 %) für stromale Marker wie CD73, CD105 und CD90. Insgesamt wurden somit erfolgreich hMSC-TERT nach den ISCT-Richtlinien nachgewiesen.

6.3.3 Modellgestützte Methoden zur Analyse des Zellverhaltens

Um die mDoE-Methoden bei der Prozessauslegung der hMSC-TERT anzuwenden, wurden zwei Arbeitsschritte definiert:

1. Anpassen des mathematischen Modells und Festlegen der optimalen MC- sowie Medienkonzentrationen.
2. Festlegen eines Startzeitpunktes des *Bead-to-Bead*-Transfers und der Konzentration der MC im *Bead-to-Bead*-Transfer mit Fokus auf einer maximalen Zellkonzentration.

Dafür wurden Experimente im Labor umgesetzt, um iterativ das Verhalten der Zellen zu entschlüsseln (Abbildung 6.10, Kasten 3). Das genaue Vorgehen ist nachfolgend aufgeführt.

Generieren von Vorwissen und Bestimmen der Ursache-Wirkungs-Beziehungen

Um Wissen über das Kultivierungsverhalten von hMSC-TERT zu generieren, wurde eine Schüttelkolbenkultivierung mit typischen Kultivierungsbedingungen gestartet (2 mmol l⁻¹ L-Glutamin, 5,6 mmol l⁻¹ D-Glukose und 5 g l⁻¹ MC). Kultiviert wurde in Schüttelkolben, obwohl MSC-Kultivierungen typischerweise in STRs oder Spinnerflaschen umgesetzt werden. Wie in der Abbildung 6.28 dargestellt, wurde das Wachstumsverhalten der hMSC-TERT erfolgreich dokumentiert und simuliert. Dies wurde durch die Bestimmtheitsmaße von $R^2 > 0,9$ bestätigt.

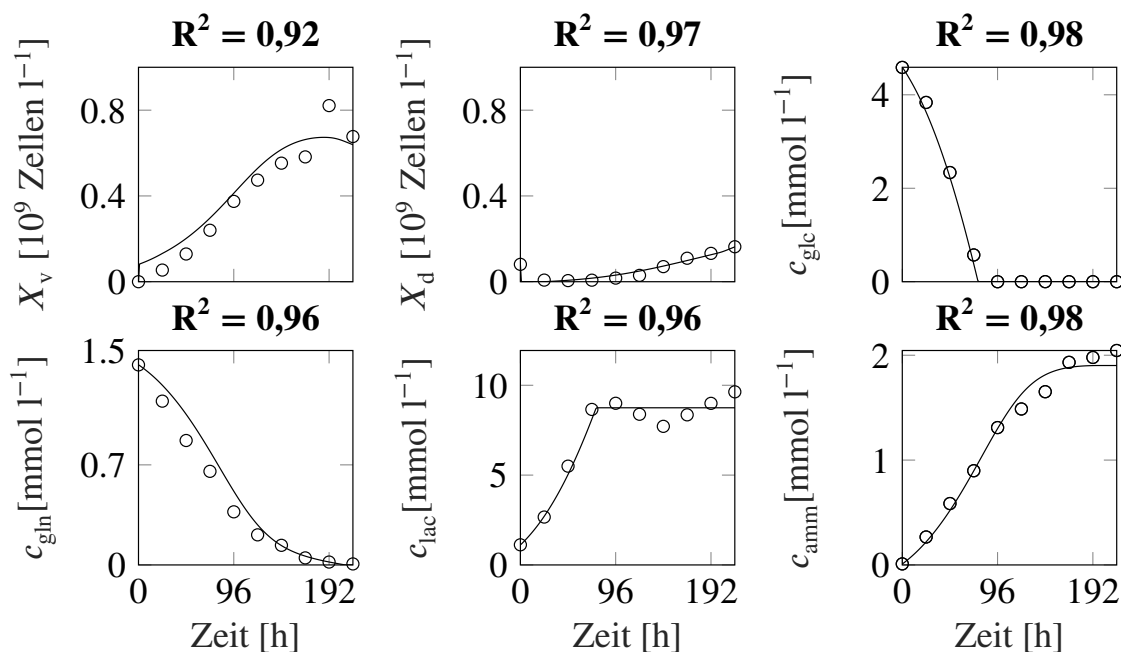


Abbildung 6.28: Konzentrationsverläufe der hMSC-TERT-Kultivierung. Die hMSC-TERT wurden auf Cytodex 3-MCs in DMEM für 216 h kultiviert.

Die Daten eines Schüttelkolbenversuches waren jedoch nicht ausreichend, um das Zellverhalten über ein breites Spektrum zu beschreiben. Daher wurden weitere Versuche geplant und umgesetzt. Die Anfangskonzentration der D-Glukose wurde im Bereich von 5 - 60 mmol l⁻¹ und L-Glutamin im Bereich 2 - 12 mmol l⁻¹ variiert. Der Konzentrationsbereich der MCs wurde im Bereich von 1 - 5 g l⁻¹ freigegeben. Die Experimente wurden ausgewählt, um den Versuchsraum bestmöglich abzudecken und sind der Tabelle 6.10 zu entnehmen.

Tabelle 6.10: Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells.

Versuchsnr.	c_{MC} [g l ⁻¹]	c_{Glc} [mmol l ⁻¹]	c_{Gln} [mmol l ⁻¹]	$X_{Inokulum}$ [Zellen cm ⁻²]
1	5	60	12	
2	5	5	12	
3	1	5	2	5.000
4	1	60	2	
5	2,5	27,5	5	

Die Grenzen der MC-Konzentrationen wurden verkleinert, da die Experimente der L929-Zellen gezeigt hatten, dass geringe MC-Konzentrationen das Wachstum im Schüttelkolben fördern (siehe Kapitel 6.2). Zusätzlich wurden die Kultivierungen um einen *Bead-to-Bead*-Transfer ergänzt. Dieser wurde nach 120 h mit einer 100 % Medium- und einer 50 % MC-Zugabe durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse sind in Tabelle 6.11 die Wachstumsraten bis zum *Bead-to-Bead*-Transfer und nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer, die maximale Zellzahl $X_{v, max}$ und der Vermehrungsfaktor (VF) dargestellt.

Tabelle 6.11: Durchgeführte Experimente im Schüttelkolben zur modellgestützten Analyse des Zellverhaltens von L929-Zellen und zur Entwicklung eines mathematischen Prozessmodells.

Versuchsnr.	μ_{max, vor_btb} [h ⁻¹]	$\mu_{max, nach_btb}$ [h ⁻¹]	$X_{v, max}$ [Zellen cm ⁻²]	VF [-]
1	0,007	0,008	9345	1,27
2	0,012	0,011	8770	1,32
3	0,024	0,019	92555	8,45
4	0,029	0,021	115394	15,52
5	0,015	0,014	29235	4,45

Durch eine Analyse der Daten hinsichtlich des Zellverhaltens wurden folgende Ursache-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet:

- Bei einer MC-Konzentration von 1 g l⁻¹ wurden die höchsten maximalen Zellzahlen erreicht. Es wurde daher eine mittlere maximale spezifische Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,027 \text{ h}^{-1}$ angenommen.
- Bei MC-Konzentrationen von 5 g l⁻¹ und 3,75 g l⁻¹ (nach *Bead-to-Bead*-Transfer) wurde ein vermindertes Wachstum beobachtet. Es wurde eine Minderung auf 30 % von μ_{max} angenommen.

- Eine MC-Konzentration von $< 1 \text{ g l}^{-1}$ verminderte ebenfalls das Wachstum. Es trat in Versuch 3 und 4 nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer eine Reduktion des μ_{max} um 30 % ein.
- Bei Versuch 5 hatte der *Bead-to-Bead*-Transfer keinen Einfluss, jedoch reduzierte sich das Wachstum insgesamt um 30 % im Vergleich zu Versuch 3 und 4.

Generell verlangsamte sich das Wachstum nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer. Durch eine Viabilitätsmessung wurde der Einfluss des *Bead-to-Bead*-Transfers überprüft (Abbildung 6.29). Nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer waren die Zellen überwiegend rot gefärbt (tot), nach einem weiteren Tag in Kultivierung hatten sich die Zellen erholt und eine grüne Färbung (lebend) wurde detektiert.

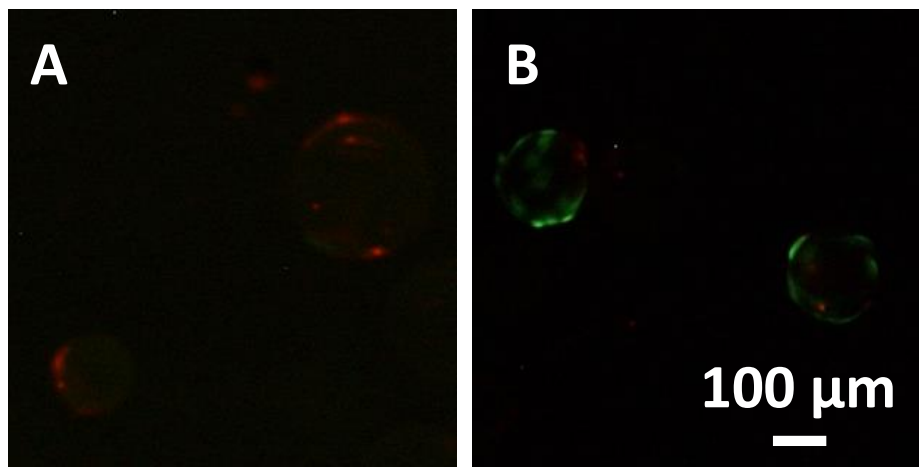


Abbildung 6.29: Lebend-Tod-Färbung der kultivierten hMSC-TERT auf den MC einen Tag nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer und 3 Tage nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer. Eine rote Färbung verdeutlicht die toten Zellen, während eine grüne Färbung die lebenden Zellen hervorhebt.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass die hMSC-TERTs schneller an den MCs anhafteten als die L929-Zellen. Dafür wurde ein Schüttelkolbenversuch angesetzt und es wurden in einem Zeitraum von fünf Stunden stündlich und einmalig nach 24 h Proben entnommen.

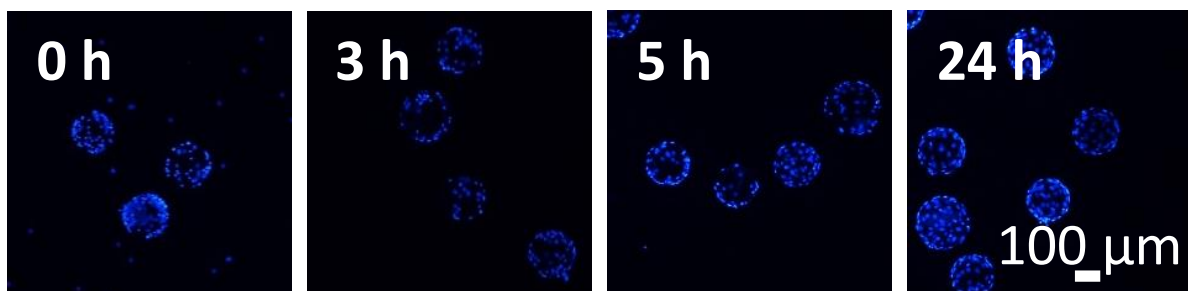


Abbildung 6.30: Entwicklung der Anhaftung der hMSC-TERT an die MCs. Dargestellt ist eine DAPI-Färbung von Start der Inokulations bis 24 h.

Wie in Abbildung 6.30 dargestellt, wurden direkt nach Inokulation Zellen an den MCs detektiert. Lediglich die Anzahl an Suspensionszellen verringerte sich, bis nach 24 h keine Suspensionszellen mehr zu detektieren waren. Dies bestätigte wiederum den geringen Einfluss des Anhaftungsprotokolls [11].

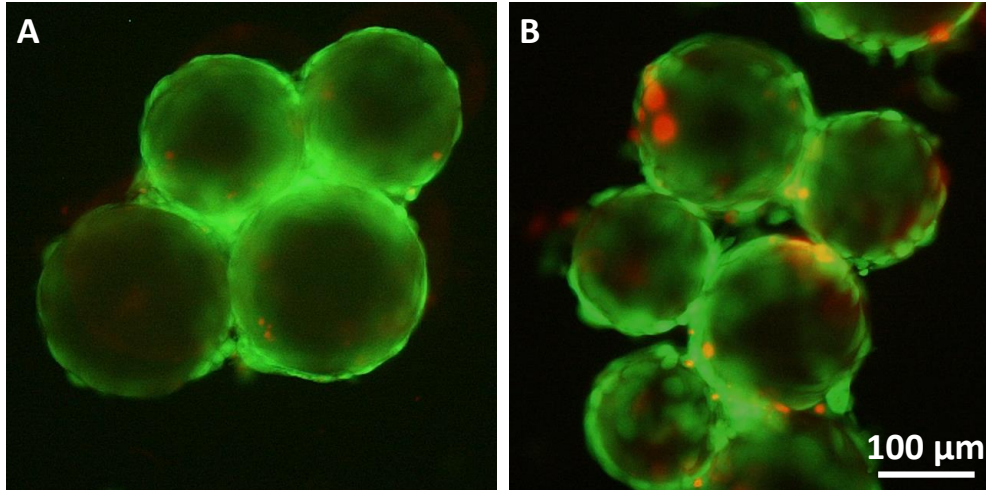


Abbildung 6.31: Lebend-Tod-Färbung von MC-Zell-Agglomeraten. Dargestellt sind Versuch 3 (A) und Versuch 4 (B) nach 18 und 14 Tagen Kultivierung. Angefärbt wurde mittels einer Calcein-PI-Färbung.

In Abbildung 6.31 wurden die Versuche 3 und Versuche 4 nach jeweils 18 und 14 Tagen Kultivierung mittels einer Calcein-PI-Färbung quantifiziert. In Versuch 3 (Abbildung 6.31, A) wurden selbst nach 18 Tagen Kultivierung nur lebende Zellen detektiert. Bei Versuch 4 zeigten sich überwiegend lebende Zellen, wobei bereits einige tote Zellen zu sehen sind. Damit wurde mit den Experimenten bestätigt, dass Zell-MC-Agglomerate keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der hMSC-TERT haben.

Anpassen des mathematischen Modells

Basierend auf den zuvor getroffenen Annahmen wurde das mathematische Modell, welches in Kapitel 6.2.5 entwickelt wurde, an das Verhalten der hMSC-TERT angepasst. Allerdings mussten keine Differentialgleichungen verändert werden, sondern nur die Startparameter neu berechnet und die Randbedingungen angepasst werden. In Tabelle 6.12 sind die angepassten Parameter der einzelnen Versuche dargestellt. Durch die Anpassung an die einzelnen Experimente wurde das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit zu den Faktoreinstellungen herausgearbeitet und die Annahmen in spezifische Randbedingungen umgesetzt.

Tabelle 6.12: Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die zugehörigen Startwerte und resultierenden Werte.

Parameter	Einheit	Startwert	Angepasste Werte				
			V1	V2	V3	V4	V5
$\mu_{d,max}$	h^{-1}	0,02	0,0092	0,0075	0,0083	0,0083	0,014
$\mu_{d,min}$	$10^{-4}h^{-1}$	0,003	1	3	1,9	3	2,9
μ_{max}	h^{-1}	0,02	0,0082	0,011	0,018	0,02	0,013
$K_{att,max}$	h^{-1}	0,03	0,5	0,07	0,05	0,04	0,06
$K_{d,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	0,005	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04
K_{Glc}	$mmol\ l^{-1}$	0,19	0,28	0,3	0,3	0,18	0,2
K_{Gln}	$mmol\ l^{-1}$	2,5	6,4	5,1	4,5	3,9	6,4
$k_{s,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	0,01	0,002	0,002	0,002	0,003	0,0005
k_{LS}	$mmol\ l^{-1}$	0,1	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03
$Y_{X/Glc}$	$10^7\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	7,2	1,3	1,1	1,9	2,2	3,1
$Y_{X/Gln}$	$10^8\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	1,7	4,9	7,2	5	5	7
$q_{LS,max}$	$10^{-11}\ mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$	1,4	9,6	1,1	5,6	6,8	5,1
$Y_{Lac/Glc}$	-	1,5	2,5	2	2,4	2,1	2
$Y_{Amm/Gln}$	-	0,6	0,6	0,3	0,7	0,6	0,7

Besonders die Parameter μ_{max} und $q_{LS,max}$, durch die das Wachstum beeinflusst wird, wiesen in Abhängigkeit zur MC-Konzentration Unterschiede auf. Des Weiteren wurden die Parameter $Y_{X,Gln}$, $Y_{Amm,Gln}$ und $Y_{Lac,Glc}$ durch die Versuchskonstellationen beeinflusst. Hier zeigte sich erneut der Einfluss der MC-Konzentration auf die Substratkonzentrationen. Durch die MC-Konzentration wurde ebenfalls die Ausbeute beeinflusst. Bei niedriger MC-Konzentration von $1\ g\ l^{-1}$ beeinflusste jedoch auch die D-Glukosekonzentration das Wachstum. Bei höherer D-Glukosekonzentration trat ein höheres Wachstum auf. Dies wurde durch die in Tabelle 6.13 genannten Begrenzungen ins Modell implementiert.

Tabelle 6.13: Implementierte Begrenzungen zur Aufnahme des Einflusses der MC-Konzentration.

c_{MC} [g l ⁻¹]	Randbedingung [-]	
5	μ	= $0,7 \cdot \mu_{max}$
	$q_{ls,max}$	= $1,2 \cdot q_{ls,max}$
	$Y_{X,Gln}$	= $0,5 \cdot Y_{X,Gln}$
	$Y_{Lac,Glc}$	= $1,5 \cdot Y_{Lac,Glc}$
	$Y_{Amm,Gln}$	= $0,5 \cdot Y_{Amm,Gln}$
3,75	μ	= $0,7 \cdot \mu_{max}$
	$q_{ls,max}$	= $1,2 \cdot q_{ls,max}$
	$Y_{X,Gln}$	= $1,2 \cdot Y_{X,Gln}$
	$Y_{Lac,Glc}$	= $1,5 \cdot Y_{Lac,Glc}$
	$Y_{Amm,Gln}$	= $0,5 \cdot Y_{Amm,Gln}$
2,5	μ	= $0,95 \cdot \mu_{max}$
	$q_{ls,max}$	= $0,85 \cdot q_{ls,max}$
	$Y_{Amm,Gln}$	= $0,7 \cdot Y_{Amm,Gln}$
1	glc < 6 mmol l ⁻¹ : μ	= $1,35 \cdot \mu_{max}$
	glc ≥ 6 mmol l ⁻¹ : μ	= $1,5 \cdot \mu_{max}$

Evaluation des mathematischen Modells

Zur Beurteilung der Güte des mathematischen Modells wurde das angepasste mathematische Modell zur Simulation aller bisher durchgeführten Experimente verwendet und das Bestimmtheitsmaß berechnet (Abbildung 6.32). Die Lebendzellzahlen auf den MCs wurden mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 0,8$ simuliert. Bei der D-Glukosekonzentration wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,85 erreicht und bei L-Laktat folgte ein Bestimmtheitsmaß von 0,69. Die L-Glutaminkonzentration wurde ebenfalls mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,68 simuliert, wobei für Ammonium nur ein Bestimmtheitsmaß von -0,25 ermittelt wurde. Ähnlich wie bei den L929-Zellen wurde kein Zusammenhang für die Abnahme der Ammoniumkonzentration erkannt, sodass dieses Phänomen nicht simuliert wurde (siehe Kapitel 6.2).

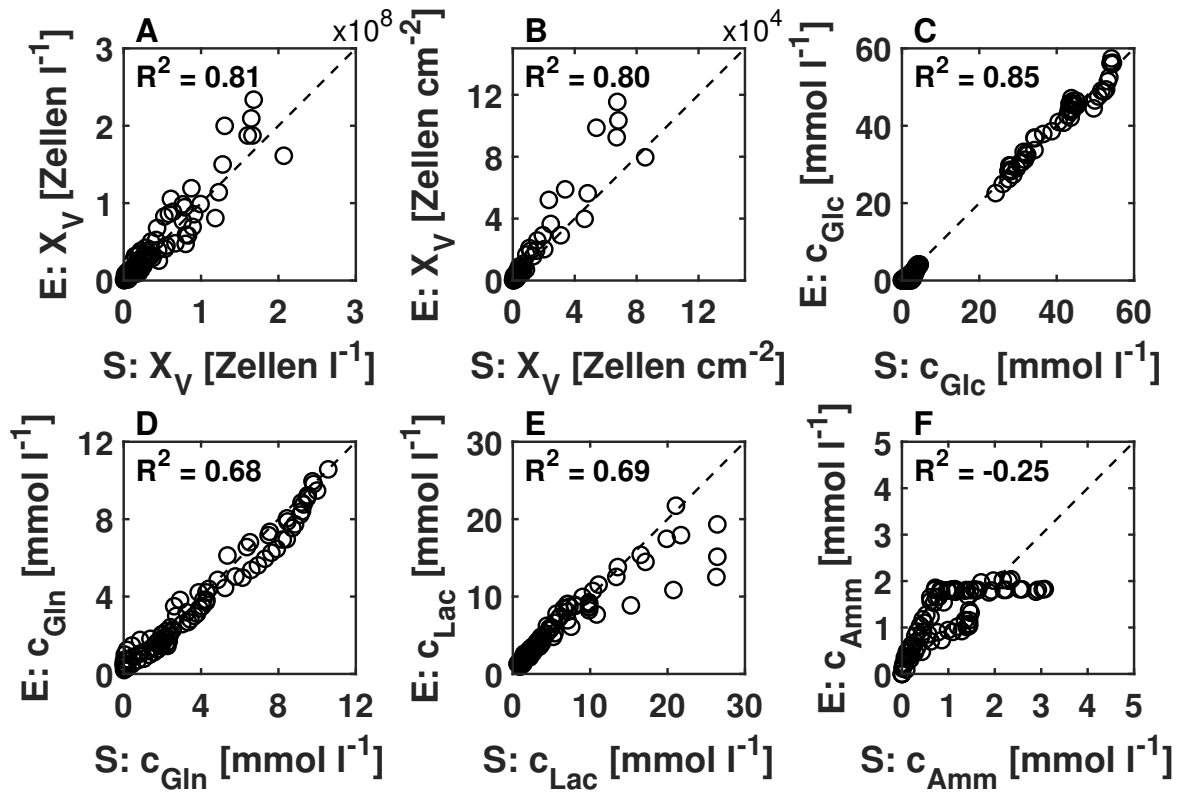


Abbildung 6.32: Experimentelle Verläufe des Zellwachstums sowie der Substrate und Metabolite der Kultivierung im Schüttelkolben im Vergleich zu den simulierten Verläufen. Simuliert wurden die 6 Schüttelkolbenexperimente.

Quantifizierung der Unsicherheit

Um die Unsicherheitsverteilung in der mDoE-Toolbox anzuwenden, wurden die Startwerte 1000-fach um $\pm 5\%$ variiert und die Parameter Monte-Carlo-basiert bestimmt. Die sich ergebenden gemittelten Parameter, inklusive deren Standardabweichung, sind in Tabelle 6.14 dargestellt.

Tabelle 6.14: Parameter des mathematischen Prozessmodells sowie die gemittelten Werte nach 1000 Iterationen bei 5 % Variation in den Startwerten.

Parameter	Einheit	Angepasste Werte
$\mu_{d,max}$	h^{-1}	$0,008 \pm 0,002$
$\mu_{d,min}$	$10^{-4}h^{-1}$	$0,0002 \pm 0,002$
μ_{max}	h^{-1}	$0,013 \pm 0,0005$
$K_{att,max}$	h^{-1}	$0,053 \pm 0,003$
$K_{d,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	$0,03 \pm 0,004$
K_{Glc}	$mmol\ l^{-1}$	$0,25 \pm 0,02$
K_{Gln}	$mmol\ l^{-1}$	$5,43 \pm 0,46$
$k_{s,LS}$	$mmol\ l^{-1}$	$0,002 \pm 0,0002$
k_{LS}	$mmol\ l^{-1}$	$0,03 \pm 0,003$
$Y_{X/Glc}$	$10^7\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	$2 \pm 0,2$
$Y_{X/Gln}$	$10^8\ Zelle\ l^{-1}\ mmol^{-1}$	$6 \pm 0,6$
$q_{LS,max}$	$10^{-11}\ mmol\ Zelle^{-1}\ h^{-1}$	9 ± 1
$Y_{Lac/Glc}$	-	$2,5 \pm 0,2$
$Y_{Amm/Gln}$	-	$0,6 \pm 0,09$

Modellgestützte Festlegung neuer Experimente

Mithilfe des mathematischen Modells wurden weitere Experimente geplant, um den Startzeitpunkt und die Menge des *Bead-to-Bead*-Transfers mit Hinblick auf eine maximale Zellausbeute anzupassen. Dafür wurde auf Basis des mathematischen Modells ein mDoE durchgeführt. Es wurden zwei Faktoren, Startzeitpunkt des Zustroms $t_{Zustrom}$ und Konzentration der MC im Zustrom $c_{F, MC}$, untersucht. Die Faktorgrenzen wurden breit aufgestellt, sodass ein großer Versuchsraum untersucht wurde. Die MC-Konzentration im Zustrom variierte von $0,25\ g\ l^{-1}$ bis $1\ g\ l^{-1}$ und der Startzeitpunkt des Zustroms von 72 h bis 168 h. Die minimale Grenze des Startzeitpunktes des Zustroms wurde auf 72 h festgelegt, um den Zellen ein Anhaften an die MCs sowie einen Übergang in die exponentielle Phase zu ermöglichen. Nach 168 h wurde bereits vereinzelt ein Übergang in die stationäre Phase beobachtet, sodass dies als maximale Grenze festgelegt wurde. Als Versuchsplan wurde ein D-Optimaler Versuchsplan gewählt, da mit einer geringen Anzahl an Faktorkombinationen solide Versuchspläne erstellt werden können.

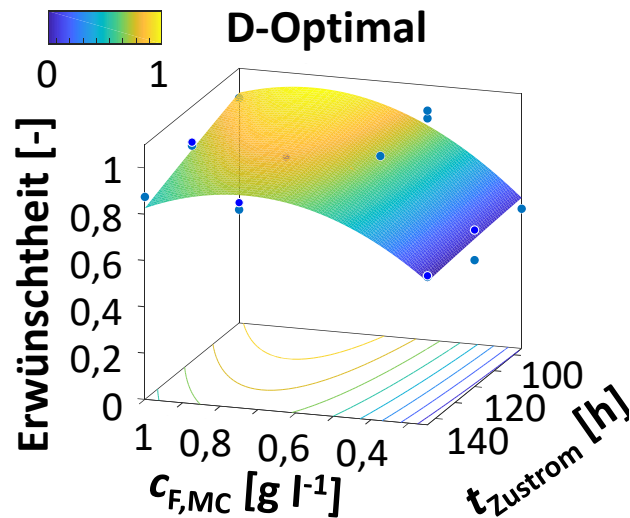


Abbildung 6.33: RSM eines D-Optimalen Versuchsplans der Faktoren Startzeitpunkt des Zustroms t_{Zustrom} und MC-Konzentration im Zustrom $c_{F,MC}$ in Abhängigkeit zur Erwünschtheit. Die Erwünschtheit wird berechnet, indem die Zellzahl pro Fläche maximiert wurde.

Eine maximale Zellzahl wird nach Abbildung 6.33 bei einem frühen Startzeitpunkt des Zustroms und einer mittleren Konzentration an MCs im Medium erreicht. Um die Ergebnisse zu evaluieren, wurden 6 Experimente durchgeführt. Diese sind in Tabelle 6.15 aufgeführt.

Tabelle 6.15: Empfohlene Experimente zur Evaluation des mDoE und die resultierenden maximalen Zellzahlen.

Versuchsnr.	$c_{F,MC}$ [%]	t_{Zustrom} [h]	Exp: $X_{v,\max}$ [$\cdot 10^5$ Zellen cm^{-2}]	Sim: $X_{v,\max}$ [$\cdot 10^5$ Zellen cm^{-2}]
1	25	72	1,5	1,6
2	100	72	1,8	2,3
3	50	120	1,3	2,3
4	100	120	0,7	2,3
5	25	168	1,9	1,6
6	100	168	1,1	2,1

$$c_{\text{Glc}} = 12 \text{ mmol l}^{-1}, c_{\text{Gln}} = 4 \text{ mmol l}^{-1}, c_{\text{MC}} = 1 \text{ g l}^{-1}, X_{\text{Inokulum}} = 5000 \text{ Zellen cm}^{-2}$$

Durch die Simulationen wurden maximale Zellzahlen von $2,3 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} bei mittleren sowie maximalen MC-Konzentrationen im Zustrom sowie frühem bis mittlerem Startzeitpunkt des Zustroms erreicht. Die Daten der Experimente zeigten jedoch, dass eher in den Randgebieten maximale Zellzahlen zu erzielen sind - bei maximaler MC-Konzentration im Zustrom und minimalem Startzeitpunkt des Zustroms sowie minimaler MC-Konzentration im Zustrom und maximalem Startzeitpunkt des Zustroms. Die geringe Übereinstimmung der experimentellen und simulierten

Daten führte zu der Erkenntnis, dass spezifisches Wissen über das Zellverhalten vor Beginn der Experimente noch nicht vorlag. Die geschätzten Werte der spezifischen Wachstumsraten wurden bei geringen MC-Konzentrationen unterschätzt. Die durchgeführten Experimente haben jedoch das Wissen erhöht, sodass die spezifische Wachstumsrate für geringe MC-Konzentrationen im mathematischen Modell angepasst wurde.

Durch die Simulationen wurden maximale Zellzahlen von $2,3 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} bei mittleren sowie maximalen MC-Konzentrationen im Zustrom sowie frühem bis mittlerem Startzeitpunkt des Zustroms erreicht. Die Daten der Experimente zeigten jedoch, dass eher in den Randgebieten maximale Zellzahlen zu erzielen sind - bei maximaler MC-Konzentration im Zustrom und minimalem Startzeitpunkt des Zustroms sowie minimaler MC-Konzentration im Zustrom und maximalem Startzeitpunkt des Zustroms. Die Unterschiede führten zu der Erkenntnis, dass spezifisches Wissen über das Zellverhalten vor Beginn der Experimente noch nicht vorlag.

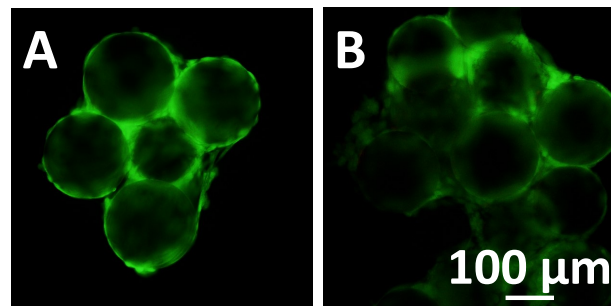


Abbildung 6.34: Lebend-Tod-Färbung von MC-Zell-Agglomeraten. Dargestellt sind Versuch 5 vor dem (A) und nach dem *Bead-to-Bead*-Transfers (B). A wurde nach 168 h aufgenommen - b nach 216 h. Angefärbt wurde mittels einer Calcein-PI-Färbung.

Nach einer Kultivierungszeit von 120 h wurde eine maximale Zellkonzentration von $0,4 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} und $0,5 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} erreicht (Versuch 3 und Versuch 4 vor dem *Bead-to-Bead*-Transfer). Nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer wurde eine 6,3-fache Steigerung der Zellkonzentration erzielt. Leber et al. (2017) erzielten bei einer Zugabe von 80 % frischen MCs nach einer Kultivierungszeit von 120 h vor und nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer lediglich eine Zellkonzentration von $0,3 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} [13]. Versuch 5 erzielt mit $1,9 \cdot 10^5$ Zellen cm^{-2} die höchste Zellausbeute. Dementsprechend wäre eine geringe MC-Konzentration im Zustrom und ein später Startzeitpunkt des *Bead-to-Bead*-Transfers zu empfehlen. Allerdings wurden in diesem Versuch bereits vor dem *Bead-to-Bead*-Transfers Zell-MC-Agglomerate mit einer Größe von 250 μm detektiert, die nach dem *Bead-to-Bead*-Transfers auf eine Größe von 400 μm anwachsen.

Obwohl die Lebend-Tod-Färbung in Abbildung 6.34 lebende Zellen zeigt, ist eine mögliche Veränderung des Phänotyps zu berücksichtigen. In Abbildung 6.35 ist die Phänotypisierung von Versuch 2 nach 408 h Kultivierung dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich ebenfalls große MC-Zell-Agglomerate gebildet. Wie in Abbildung 6.34 zu erkennen, können die Oberflächenmarker CD90 und CD105 nicht mehr nachgewiesen werden.

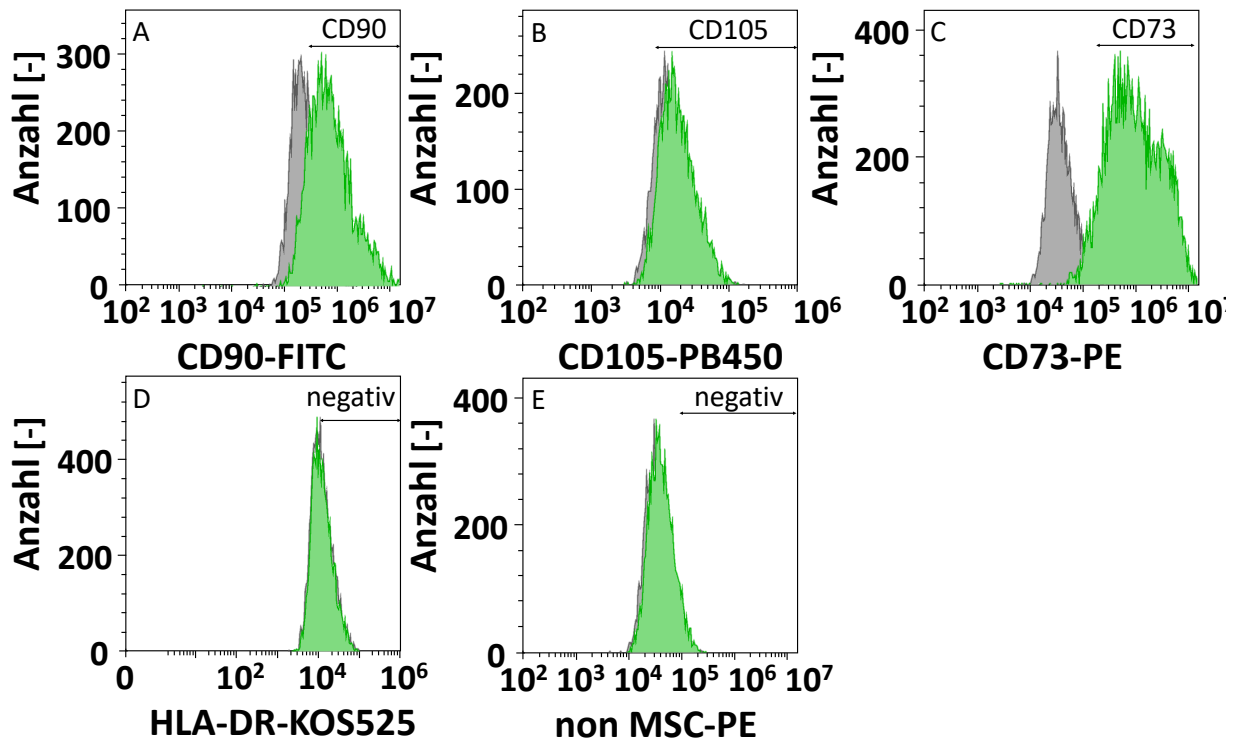


Abbildung 6.35: Oberflächenmarker-Analyse von hMSC-TERT nach 408 h Kultivierung (Versuch 2), die auf Cytodex 3-MCs im DMEM expandiert wurden. Positive Marker CD90, CD105 und CD73 (A-C) und der Negativcocktail mit CD45, CD34, CD14, CD19 (D) sowie HLA-DR (E). Isotyp-Kontrollen sind in grau dargestellt.

MSC-TERT sollten daher nicht bis zum Übergang in die stationäre Phase expandiert werden. Daher werden die Versuchseinstellungen von Versuch 2 für die weitere Verwendung empfohlen.

6.3.4 Evaluation der modellgestützten Auslegung des Kultivierungsprozesses von hMSC-TERTs

Durch die wissensbasierte Analyse des Zellverhaltens wurde eine erfolgreiche Kultivierung im Schüttelkolben durchgeführt und sogar eine erhebliche Steigerung der Zellausbeute erreicht. Im Vergleich zur Literatur wurde eine 6,3-fache Steigerung der Zellausbeute erzielt [13]. Nach Wyrobnik et al. (2020) wird typischerweise von Zellviabilitäten über 90 % und Zelldichten im Bereich $1 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1} - $1 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1} in STRs berichtet [93]. Diese Werte konnten durch die Kultivierung im Schüttelkolben ebenfalls bestätigt werden.

Obwohl wenige Studien Kultivierungen im Schüttelkolben durchführten, detektierten Siddiquee et al. (2013) in ihrer Studie sogar höhere D-Glukoseverbrauchs- und L-Laktatproduktionsraten in Schüttelkolbenkultivierungen [227]. Dies unterstützt die These, dass die MSCs unter den Schüttelkolbenbedingungen schneller wachsen als in Spinnerflaschen. Zusätzlich hat Siddiquee et al. (2013) gezeigt, dass selbst eine geringe Menge Ammonium ($1,9 \text{ mmol l}^{-1}$) das Wachstum von MSCs hemmt. Die Spinnerkultivierung zeigte einen Ammoniumgehalt von mehr als 2 mmol l^{-1} . Das

langsamere Wachstum bei der Kultivierung in der Spinnerflasche könnte somit eine Folge der durch Ammoniumtoxizität induzierten Wachstumshemmung sein [227].

Das bereits vorhandene mathematische Modell zur Beschreibung adhärenen Wachstums wurde anhand weniger Versuche an das Verhalten der hMSC-TERT angepasst. Bei der Anwendung im klinischen Bereich sollte die maximal zu bewachsende Fläche auf den MCs jedoch begrenzt werden, da ein Konfluenzgrad von 100 % durch Veränderung des Phänotyps zu vermeiden ist. Es kann zu einem Wachstumsstopp durch Kontakthemmung und einer möglichen Änderung der Zelleigenschaften oder einer induzierten Differenzierung kommen [63]. Eine weitere Herausforderung sind die Bildung großer MC-Zell-Agglomerate, die zu Massentransferbeschränkungen und inhomogenen Verteilungen von Stammzellen in der Kulturbrühe führen können [109]. Die Verklumpung von MCs, die bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten stärker ausgeprägt ist, ist ein weiterer Aspekt, der sorgfältig berücksichtigt werden muss. Die MC-Aggregation kann durch die Zunahme der Zelldichte bei längerer Kulturdauer weiter stimuliert werden und zu schädlicher Hypoxie und Nährstoffentzug führen [93]. Die Ergebnisse der Kultivierungen im Schüttelkolben zeigen jedoch, dass die hMSC-TERT Wachstum in komplexen MC-Zell-Aggregate bevorzugen. Dieser schmalere Grad zwischen maximaler Zellausbeute und verändertem Phänotyp ist somit bei der hMSC-Kultivierung stets zu berücksichtigen.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Thesis wurde das mDoE-Konzept zur Kombination von mathematischen Prozessmodellen mit konventioneller DoE beschrieben, in einen mDoE-Workflow implementiert und für suspendierbare und adhärent-wachsende Zelllinien angewendet. Dabei lag der Fokus auf der Untersuchung der Anwendbarkeit der mDoE-Methoden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Prozesse.

Die suspendierbare Zelllinie wurde aufgrund einer breiten vorliegenden Datenlage zur Entwicklung eines mDoE-Workflows sowie der *in silico*-Methodik verwendet. Es wurden Versuchspläne in eine mDoE-Toolbox implementiert sowie Randbedingungen (z. B. Einfluss Gütefunktional, Vorwissen) untersucht, um optimale Voraussetzungen für eine mDoE-Nutzung zu schaffen. Eine tiefgehende Analyse ist zielführend bei der Bewertung der Ergebnisse des mDoEs. Es ist sinnvoll Gütefunktionale mit Fokus auf die jeweilige Fragestellung miteinander zu vergleichen. Dadurch wird unter anderem die Iterationszeit reduziert oder eine höhere Anpassungsgüte erzielt. Zusätzlich zeigt der Vergleich verschiedener Versuchspläne, dass unterschiedliche Versuchsmaxima empfohlen werden. Experimentell wäre diese Erkenntnis nicht möglich gewesen. Auf Basis dieser Erkenntnisse kann nun der Versuchsraum eingegrenzt und Experimente wissenschaftlich ausgewählt werden.

Für die adhärent-wachsenden Zelllinien wurde ein mathematisches Prozessmodell auf der Basis von jeweils sechs Experimenten abgeschätzt und zur Simulation des Zellverhaltens genutzt. Durch den Mangel an Vorwissen über das Verhalten der Zellen lag der Fokus insbesondere auf der wissenschaftlichen Analyse der Kultivierungen zur Formulierung von Ursachen-Wirkungs-Beziehungen. Die iterative Umsetzung der Experimente ermöglichte so eine Kosten und Zeit sparende Etablierung von Methoden zur Beschreibung des adhärenen Wachstums. Zusätzlich wurden mithilfe des mathematischen Prozessmodells weit verteilte Randwerte für DoEs mit Modellvorhersagen anstelle von Laborversuchen bewertet. Die optimalen empfohlenen Versuchsbedingungen wurden anschließend experimentell erfolgreich im Schüttelkolben durchgeführt und mit der simulierten DoE verglichen. Für beide adhärent-wachsenden Zelllinien wurden so Steigerungen in der Zellausbeute generiert. Für L929-Zellen wurde durch eine Reduzierung der initialen MC-Konzentration von 5 g l^{-1} auf 1 g l^{-1} eine 6-fache Steigerung der Zellausbeute erzielt. Bei einer Reduzierung von 20 g l^{-1} auf 1 g l^{-1} wurde sogar eine 8-fache Steigerung der Zellausbeute erreicht. Beim Anpassen des *Bead-to-Bead*-Transfers der hMSC-TERTs wurde eine 6,3-fache Steigerung der Zellkonzentration erzielt. Leber et al (2017) erzielten bei einer Zugabe von 80 % frischen MCs nach 120 h Kultivierung vor und nach dem *Bead-to-Bead*-Transfer lediglich eine Zellkonzentration von $0,3 \cdot 10^5 \text{ Zellen cm}^{-2}$ [13]. Währenddessen wurde in dieser Thesis bereits nach 120 h Kultivierung eine Zellkonzentration von $0,4 \cdot 10^5 \text{ Zellen cm}^{-2}$ und $0,5 \cdot 10^5 \text{ Zellen cm}^{-2}$ erreicht (Versuch 3 und Versuch 4 vor dem *Bead-to-Bead*-Transfer). Es waren keine heuristischen DoE-Runden notwendig, da die Kultivierungsdaten tiefgehend analysiert und das mathematische Prozessmodell iterativ modifiziert wurde. Dadurch wurden nur Experimente mit hohem Informationsgehalt umgesetzt.

7.1 Anwendungspotential der mDoE-Methoden

Durch die wachsende Nachfrage an Biopharmazeutika steigt der Entwicklungsdruck für produktive und effiziente Prozesse kontinuierlich an [1]. Zusätzlich wird die Herstellung mit komplexen Systemen umgesetzt, wodurch sich unter anderem hohe Anforderungen an deren Entwicklung, Produktion und Zulassung ergeben. mDoE-Methoden werden hierbei als neuartige Werkzeuge angesehen, um die Entwicklungsdauer und -kosten drastisch zu reduzieren. Mit dem mDoE werden optimale Prozessbereiche mit hoher Aussagekraft detektiert, die zu wissensbasierten Versuchsplänen und somit Experimenten führen [156]. Generell sind zwei Ansätze möglich.

Bei einer geringen Datenlage wird zu Beginn der Versuchsraum möglichst breit aufgestellt, um Hypothesen zu verifizieren. Wenn genügend Daten vorhanden sind, wird hingegen der Versuchsraum verkleinert. Insgesamt dient die kombinierte Verwendung des mathematischen Prozessmodells mit konventionellem DoE als Hilfsmittel bei der Auswertung und Interpretation der Daten. Dafür werden Experimente mit hohem Informationsgehalt benötigt. Der mDoE ermöglicht jedoch eine wissensbasierte Auswahl an Experimenten durch die tiefgehende Analyse. Dadurch wird der Erkenntnisgewinn gesteigert und Wissenslücken aufgedeckt. Es werden Eigenschaften vorhergesagt, die die Sicherheit des Endprodukts gefährden könnten, sowie dynamisch Änderungen vorgenommen, um diese Risiken zu mindern [228].

Allerdings kann mDoE nur angewendet werden, wenn ein Verständnis der mechanistischen Zusammenhänge bekannt ist und dies als sinnvolle Entscheidungsfindung für die Prozessentwicklung und -optimierung mittels DoE in QbD angesehen wird. Insgesamt liefert eine dynamische Analyse der Datensätze andere Ergebnisse als eine reine Endpunktanalyse [19]. Effekte werden dadurch geeigneter detektiert. Alternativ besteht die Möglichkeit, den gesamten Versuchsraum zu berechnen. Dies erfordert zum einen eine hohe Rechenleistung. Zum anderen ergibt sich ein gekrümmtes Volumen mit Senkungen und/oder Erhebungen, dessen Interpretation sehr schwer bis unmöglich ist. Zusätzlich zu den bereits bekannten Problemen entstehen neue numerische Probleme. Dennoch ergibt sich der Vorteil, dass steile Übergänge detektiert werden. In diesem Punkt ist jedoch eine Erweiterung des mDoE möglich, indem beispielsweise ein Kugelvolumen um die empfohlenen Faktorkombinationen/Experimente gelegt wird. Dies ermöglicht somit auch beim mDoE die Detektion von steilen Übergängen. Das mDoE-Konzept ermöglicht eine Zusammenfassung des Wissens über das untersuchte experimentelle System in einem computergestützten System. Gleichzeitig werden physikalische Gesetze mit metabolischem Verständnis verknüpft. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, Kultursysteme zu entwerfen und zu bewerten und dies auch in verschiedenen Maßstäben umzusetzen. Zusätzlich ergeben sich weitere Vorteile des mDoEs [228]:

- Stetige Erhöhung des Wissensstandes über den Prozess.
- Zunehmendes Verständnis des Prozesses und seines Einflusses auf Zellwachstum, Phänotypisierung, epigenetische Kriterien, prognostische Marker etc. in vielen Prozessschritten.

- Senkung der Entwicklungskosten für die Versuchsplanung zur Definition einer schnellen und effizienten Zellexpansion, wodurch die Zeit bis zur klinischen Phase beschleunigt wird.
- Die Bewertung, das *Screening* und die virtuelle Erprobung neuer Konfigurationen/Einstellungen vor den Experimenten.

Dennoch kann konventionelles DoE nach wie vor für erste *Screening*-Studien eingesetzt werden und kann auch in mehreren Runden zur Prozessoptimierung führen. Im Vergleich zur konventionellen DoE liefert mDoE jedoch eine stärker wissensbasierte Entwicklung von Bioprozessen. Allerdings müssen noch einige Herausforderungen bewältigt werden. Besonders bei der Herstellung von ATMPs kann im Vergleich zur Produktion von Biopharmazeutika eine fallspezifische, personalisierte Aufbereitung erforderlich sein. Neben diesen technischen Herausforderungen werden Forscher und Wissenschaftler benötigt, die interdisziplinär und branchenübergreifend ausgebildet sind und die klassische Bioverfahrenstechnik, reale industrielle Anwendungen in der Zellkultivierung, Digitalisierungslösungen und fortschrittliche Analytik abdecken. Weitere Forschung ist erforderlich, um die realen Kulturen und die entsprechenden virtuellen mathematischen Modelle eng mit regulatorischen Richtlinien zu verknüpfen. Insgesamt werden mDoE-Methoden die Methoden der Zellkultivierung jedoch in Zukunft deutlich verbessern.

Schlussendlich lässt sich somit festhalten, dass die simplen Modellstrukturen und die generell verständliche Vorgehensweise ein breites Anwendungsgebiet des mDoE ermöglichen. Zusätzlich kann das Vorgehen kontinuierlich erweitert und an neue Herausforderungen angepasst werden. Die mDoE-Methoden haben das große Potenzial, eine hohe Anzahl unterschiedlicher Daten- und Wissensquellen zu berücksichtigen und diese für ein verbessertes Verständnis von Zellkulturtechniken zu nutzen, insbesondere für ATMPs.

7.2 mDoE als Basis eines *Digital Twins*

Durch die stetige Erweiterung des mathematischen Modells und der damit einhergehenden steigenden Komplexität kann das mathematische Modell als Basis für einen digitalen Zwilling (DT) angesehen werden. Obwohl der Begriff „digitaler Zwilling“ noch nicht ausreichend definiert ist und in verschiedenen Teilen der Industrie unterschiedliche Bedeutungen hat, ist nach Ansicht der Autorin die mathematische Modellierung im mDoE als Ausgangspunkt für die Wissensintegration in einen digitalen Zwilling anzusehen.

Historisch gesehen handelt es sich bei einem DT um ein Computermodell einer Werkzeugmaschine oder einer mechanischen Fertigungsanlage (z. B. Flugzeug, Weltraumfahrzeug, Auto) und wird verwendet, um die erhöhte Komplexität zu bewältigen [22, 148]. In der Bioproduktionsindustrie umfassen DTs zunehmend mehrere Teile der Fertigungsschritte und deren Interaktion [229]. Sie sollen ein universelles Werkzeug für den gesamten Lebenszyklus eines Bioprozesses sein, wobei die DTs virtuelle Gegenstücke zu den Prozessen sind. Sie ermöglichen eine prädiktive Fertigung, d. h. Bio-

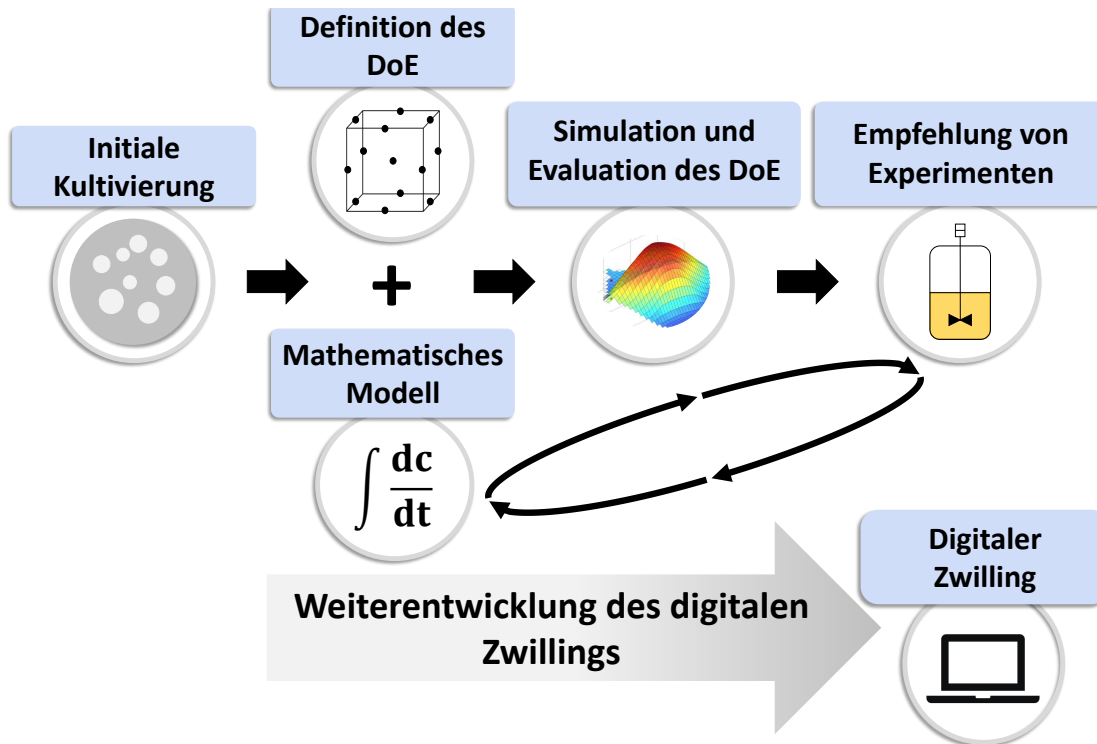


Abbildung 7.1: Verwendung des mDoE-Konzepts im Bioprozessdesign und der -optimierung sowie der Entwicklung eines digitalen Zwillings aus einem mathematischen Modell .

prozesse können analysiert, optimiert, prognostiziert und gesteuert werden [230]. Die Komplexität der DTs hängt stark vom gewünschten Anwendungsschwerpunkt ab und kann auf einer Vielzahl von komplexen Strukturen, wie datengetriebenen Modellen, künstlichen neuronalen Netzen oder mathematischen Prozessmodellen, basieren [169, 231]. Die meisten neueren Bemühungen wurden im Bereich des Maschinenbaus und der Flugzeugkonstruktion unternommen, da der Untersuchungsgegenstand gut bekannt ist und auf physikalischen Gesetzen beruht (z. B. Materialspezifikationen, mechanische Eigenschaften). Darüber hinaus werden moderne Konstruktionsprozesse von Maschinen und Fertigungsseiten mit computergestützter Konstruktionssoftware (z. B. CAD) durchgeführt, die die Grundlage für einen DT in dem jeweiligen Bereich bilden kann. Ein Haupthindernis für die Umsetzung von DTs war die kontinuierliche Steigerung des Rechenaufwandes, die Methoden wie die der künstlichen Intelligenz nun ermöglichen [148, 232].

In den letzten Jahren wird das DT-Konzept zunehmend in medizinisch relevanten Bereichen diskutiert, z. B. bei der Gestaltung und Optimierung von Herstellungsprozessen für Biopharmazeutika, der Entwicklung personalisierter Medizin und bei der Charakterisierung, Gestaltung und Optimierung von 3D-Gewebekultursystemen. Wyrobnik et al. (2020) zeigten beispielsweise, dass CFD-Ansätze (engl. *Computational Fluid Dynamics*) verwendet werden können, um einen DT des Bioreaktoraufbaus zu konstruieren. Der DT dient dann als praktikables Werkzeug zur Verbesserung von Stammzellkulturprotokollen. Besonders betont wird, dass Simulationen in Kombination mit experimentellen Arbeiten notwendig sind, um die Herausforderungen bei der Zellkultur und beim

Scale-up zu überwinden [93]. Im Hinblick auf das mathematische Prozessmodell im mDoE wird dieses als Ausgangspunkt zur Beschreibung des gesamten Lebenszyklus des Bioprozesses im DT gesehen. Es beinhaltet das Prozessverständnis, wobei der Grad der Modellkomplexität im Laufe der durchgeführten Studien schrittweise erhöht werden kann, wie in Abbildung 7.1 dargestellt. In diesem Zusammenhang sollte die Modellstruktur in der anfänglichen Prozessdesignphase so einfach wie möglich gehalten und dann erweitert werden, wenn mehr Daten verfügbar sind oder neuartige biologische Effekte identifiziert wurden.

Literatur

- [1] Walsh, G. “Biopharmaceutical benchmarks 2014”. *Nature Biotechnology* 32 (2014), 992–1000. DOI: 10.1038/nbt.3040.
- [2] Walsh, G. “Biopharmaceutical benchmarks 2018”. *Nature Biotechnology* 36 (2018), 1136–1145. DOI: 10.1038/nbt.4305.
- [3] Lücke, J, Bädeker, M und Hildinger, M. *Biotech Report. Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2020*. <https://www.vfa-bio.de/vb-de/vb-presse/vb-pressemitteilungen/presse-biotech-2020>. Zuletzt aufgerufen: 18.09.2019.
- [4] Pörtner, R, Parida, SK, Schaffer, C und Hoffmeister, H. “Landscape of Manufacturing Process of ATMP Cell Therapy Products for Unmet Clinical Needs”. *Stem cells in clinical practice and tissue engineering*. Hrsg. von Sharma, R. London: Intech Open, 2018. ISBN: 978-1-78923-010-9. DOI: 10.5772/intechopen.69335.
- [5] Jung, S, Panchalingam, KM, Rosenberg, L und Behie, LA. “Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media”. *Stem cells international* (2012). DOI: 10.1155/2012/123030.
- [6] Heathman, T, Rafiq, Q, Chan, A, Coopman, K, Nienow, A, Kara, B und Hewitt, C. “Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development”. *Biochemical Engineering Journal* 108 (2016), 14–23. DOI: 10.1016/j.bej.2015.06.018.
- [7] Jossen, V, Pörtner, R, Kaiser, S, Kraume, M, Eibl, D und Eibl, R. “Mass Production of Mesenchymal Stem Cells - Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation”. 2014, 119–174. DOI: 10.5772/59385.
- [8] Al-Saqi, SH, Saliem, M, Quezada, HC, Ekblad, A, Jonasson, AF, Hovatta, O und Götherström, C. “Defined serum- and xeno-free cryopreservation of mesenchymal stem cells”. *Cell and Tissue Banking* 16 (2015), 181–193. DOI: 10.1007/s10561-014-9463-8.
- [9] Hewitt, CJ, Lee, K, Nienow, A, Thomas, R, Smith, M und Thomas, CR. “Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers”. *Biotechnol Lett* 33 (2011), 2325–2335. DOI: 10.1007/s10529-011-0695-4.
- [10] Jossen, V, Kaiser, S, Schirmaier, C, Herrmann, J, Tappe, A, Eibl, D, Siehoff, A, van den Bos, C und Eibl, R. “Modification and qualification of a stirred single-use bioreactor for the improved expansion of human mesenchymal stem cells at benchtop scale”. *Pharmaceutical Bioprocessing* 2 (2014), 311–322. DOI: 10.4155/pbp.14.29.

- [11] Rafiq, QA, Coopman, K und Hewitt, CJ. “Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges”. *Current Opinion in Chemical Engineering* 2 (2013), 8–16. DOI: 10.1016/j.coche.2013.01.005.
- [12] Elseberg, C, Leber, J, Weidner, T und Czermak, P. “The Challenge of Human Mesenchymal Stromal Cell Expansion: Current and Prospective Answers”. Hrsg. von Gowder, S. 2017. ISBN: 978-953-51-3133-5. DOI: 10.5772/66901.
- [13] Leber, J, Barekzai, J, Blumenstock, M, Pospisil, B, Salzig, D und Czermak, P. “Microcarrier choice and bead-to-bead transfer for human mesenchymal stem cells in serum-containing and chemically defined media”. *Process Biochemistry* 59 (2017), 255–265. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.03.017.
- [14] Justice, C, Leber, J, Freimark, D, Pino Grace, P, Kraume, M und Czermak, P. “Online- and offline- monitoring of stem cell expansion on microcarrier”. *Cytotechnology* 63 (2011), 325–335. DOI: 10.1007/s10616-011-9359-4.
- [15] McReynolds, N, Cooke, FGM, Chen, M, Powis, SJ und Dholakia, K. “Multimodal discrimination of immune cells using a combination of Raman spectroscopy and digital holographic microscopy”. *Scientific reports* 7 (2017), 43631. DOI: 10.1038/srep43631.
- [16] Möller, J, Kuchemüller, KB, Steinmetz, T, Koopmann, KS und Pörtner, R. “Model-assisted Design of Experiments as a concept for knowledge-based bioprocess development”. *Bioprocess and biosystems engineering* 42 (2019), 867–882. DOI: 10.1007/s00449-019-02089-7.
- [17] Mandenius, CF und Brundin, A. “Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology”. *Biotechnology Progress* 24 (2008), 1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
- [18] Parampalli, A, Eskridge, K, Smith, L, Meagher, MM, Mowry, MC und Subramanian, A. “Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design”. *Cytotechnology* 54 (2007), 57–68. DOI: 10.1007/s10616-007-9074-3.
- [19] Moser, A, Kuchemüller, KB, Deppe, S, Hernández Rodríguez, T, Frahm, B, Pörtner, R, Hass, VC und Möller, J. “Model-assisted DoE software: optimization of growth and biocatalysis in *Saccharomyces cerevisiae* bioprocesses”. *Bioprocess and biosystems engineering* 44 (2021), 683–700. DOI: 10.1007/s00449-020-02478-3.
- [20] Kuchemüller, KB, Pörtner, R und Möller, J. “Efficient Optimization of Process Strategies with Model-Assisted Design of Experiments”. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2095 (2020), 235–249. DOI: 10.1007/978-1-0716-0191-4_13.
- [21] Stosch, M von, Hamelink, JM und Oliveira, R. “Hybrid modeling as a QbD/PAT tool in process development: an industrial *E. coli* case study”. *Bioprocess and biosystems engineering* 39 (2016), 773–784. DOI: 10.1007/s00449-016-1557-1.

- [22] Möller, J und Pörtner, R. *Model-Based Design of Process Strategies for Cell Culture Bioprocesses: State of the Art and New Perspectives*. Hrsg. von Gowder, SJT. InTech, 2017. ISBN: 978-953-51-3133-5. DOI: 10.5772/67600.
- [23] Siebertz, K, van Bebber, D und Hochkirchen, T. *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE)*. VDI-Buch. Heidelberg: Springer, 2010. ISBN: 9783642054921. DOI: 10.1007/978-3-642-05493-8.
- [24] Abt, V, Barz, T, Cruz-Bournazou, MN, Herwig, C, Kroll, P, Möller, J, Pörtner, R und Schenkendorf, R. “Model-based tools for optimal experiments in bioprocess engineering”. *Current Opinion in Chemical Engineering* 22 (2018), 244–252. DOI: 10.1016/j.coche.2018.11.007.
- [25] Alves, P, Carinhas, N, Glassey, J, Hesse, F, Merten, O, Micheletti, M, Noll, T, Oliveira, R, Reichl, U, Staby, A, Teixeira, A, Weichert, H und Mandenius, C. “How can measurement, monitoring, modeling and control advance cell culture in industrial biotechnology?” *Biotechnology journal* 7 (2012). DOI: 10.1002/biot.201200226.
- [26] Nelson, A, Dhimolea, E und Reichert, J. “Development trends for human monoclonal antibody therapeutics”. *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (2010), 767–774. DOI: 10.1038/nrd3229.
- [27] Chen, YC und Yeh, MK. “Introductory Chapter: Biopharmaceuticals”. IntechOpen, 2018. ISBN: 978-1-78923-718-4. DOI: 10.5772/intechopen.79194.
- [28] Kretzmer, G. “Industrial processes with animal cells. Appl Microbiol Biotechnol”. *Applied microbiology and biotechnology* 59 (2002), 135–42. DOI: 10.1007/s00253-002-0991-y.
- [29] Chen, C, Le, H und Goudar, CT. “Integration of systems biology in cell line and process development for biopharmaceutical manufacturing”. *Biochemical Engineering Journal* 107 (2016), 11–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.11.013>.
- [30] Andrzejewska, A, Lukomska, B und Janowski, M. “Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost”. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 37 (2019), 855–864. DOI: 10.1002/stem.3016.
- [31] Merten, OW. “Advances in cell culture: anchorage dependence”. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (2015). DOI: 10.1098/rstb.2014.0040.
- [32] Puck, T, Cieciora, S und Robinson, A. “Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects”. *The Journal of experimental medicine* 108 (1958), 945–956. DOI: 10.1084/jem.108.6.945.
- [33] Omasa, T, Onitsuka, M und Kim, WD. “Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells”. *Current pharmaceutical biotechnology* 11 (2010), 233–40. DOI: 10.2174/138920110791111960.

- [34] Lai, T, Yang, Y und Ng, SK. “Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production”. *Pharmaceuticals* 6 (2013), 579–603. DOI: 10.3390/ph6050579.
- [35] Zhang, J. “Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production”. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010, 157–178. ISBN: 9781683671282. DOI: <https://doi.org/10.1128/9781555816827.ch12>.
- [36] Brunner, M, Fricke, J, Kroll, P und Herwig, C. “Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO₂ and pCO₂) on CHO batch performance and critical quality attributes”. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40 (2017). DOI: 10.1007/s00449-016-1693-7.
- [37] Heinrich, C, Wolf, T, Kropp, C, Northoff, S und Noll, T. “Growth characterization of CHO DP-12 cell lines with different high passage histories”. *BMC proceedings* 5 Suppl 8 (2011), 29. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P29.
- [38] Klausning, S, Krämer, O und Noll, T. “Enhancing cell growth and antibody production in CHO cells by siRNA knockdown of novel target genes”. *BMC proceedings* 7 (2013), 751. DOI: 10.1186/1753-6561-7-S6-P92.
- [39] Gonzalez, TN, Leong, SR und Presta, LG. *Nucleic acids encoding humanized anti-IL-8 monoclonal antibodies - Google Patents*. 1998.
- [40] Zange, R und Kissel, T. “Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(D,L-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44 (1997), 149–157. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00082-9).
- [41] Brétagnol, F, Rauscher, H, Hasiwa, M, Kylián, O, Ceccone, G, Hazell, L, Paul, AJ, Lefranc, O und Rossi, F. “The effect of sterilization processes on the bioadhesive properties and surface chemistry of a plasma-polymerized polyethylene glycol film: XPS characterization and L929 cell proliferation tests”. *Acta biomaterialia* 4 (2008), 1745–1751. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.06.013.
- [42] Nordin, M, Wieslander, A, Martinson, E und Kjellstrand, P. “Effects of exposure period of acetylsalicylic acid, paracetamol and isopropanol on L929 cytotoxicity”. *Toxicology in Vitro* 5 (1991), 449–450. DOI: 10.1016/0887-2333(91)90070-t.
- [43] Roelofs, B, Tidball, A, Lindborg, A, TenHarmsel, A, Kooy, T und Louters, L. “Acute activation of glucose uptake by glucose deprivation in L929 fibroblast cells”. *Biochimie* 88 (2007), 1941–6. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.08.004.
- [44] Theerakittayakorn, K und Bunprasert, T. “Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast”. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 74 (2011), 378–381.

- [45] Denu, RA, Nemcek, S, Bloom, DD, Goodrich, AD, Kim, J, Mosher, DF und Hematti, P. “Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable”. *Acta haematologica* 136 (2016), 85–97. DOI: 10.1159/000445096.
- [46] Covas, DT, Panepucci, RA, Fontes, AM, Silva, WA, Orellana, MD, Freitas, MCC, Neder, L, Santos, ARD, Peres, LC, Jamur, MC und Zago, MA. “Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts”. *Experimental hematology* 36 (2008), 642–654. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.12.015.
- [47] Saeed, H, Taipaleenmäki, H, Aldahmash, AM, Abdallah, BM und Kassem, M. “Mouse embryonic fibroblasts (MEF) exhibit a similar but not identical phenotype to bone marrow stromal stem cells (BMSC)”. *Stem cell reviews and reports* 8 (2012), 318–328. DOI: 10.1007/s12015-011-9315-x.
- [48] Ratcliffe, E, Glen, KE, Naing, MW und Williams, DJ. “Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies”. *British Medical Bulletin* 108 (2013), 73–94. DOI: 10.1093/bmb/ldt034.
- [49] Kern, S, Eichler, H, Stoeve, J, Klüter, H und Bieback, K. “Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue”. *STEM CELLS* 24 (2006), 1294–1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- [50] Schweizer, RJ, Hüsing, B und Engels, EM, Hrsg. *Menschliche Stammzellen*. Technology Assessment. Bern: Zentrum für Technologiefolgen-Abschätzung, 2003, 337. ISBN: 3-908174-02-3.
- [51] Yu, SJ, Kim, HJ, Lee, E, Park, CG, Cho, SJ und Jeon, S. “ β - Catenin Accumulation Is Associated With Increased Expression of Nanog Protein and Predicts Maintenance of MSC Self-Renewal”. *Cell transplantation* 26 (2016). DOI: 10.3727/096368916X693040.
- [52] Chung, TH, Hsu, SC, Wu, SH, Hsiao, JK, Lin, CP, Yao, M und Huang, DM. “Dextran-coated iron oxide nanoparticle-improved therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in a mouse model of Parkinson’s disease”. *Nanoscale* 10 (2018). DOI: 10.1039/C7NR06976F.
- [53] Serakinci, N und Cagsin, H. “Programming hMSCs into Potential Genetic Therapy in Cancer”. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 29 (2019). DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019030483.
- [54] McKinney, JM, Doan, TN, Wang, L, Deppen, J, Reece, DS, Pucha, KA, Ginn, S, Levit, RD und Willett, NJ. “Therapeutic efficacy of intra-articular delivery of encapsulated human mesenchymal stem cells on early stage osteoarthritis”. *European cells & materials* 37 (2019), 42–59. DOI: 10.22203/eCM.v037a04.

- [55] Dang, L, Phan, N und Truong, K. “Mesenchymal stem cells for diabetes mellitus treatment: new advances”. *Biomedical Research and Therapy* 4 (2017), 1062. DOI: 10.15419/bm-rat.v4i1.144.
- [56] Wei, X, Yang, X, Han, ZP, Qu, FF, Shao, L und Shi, YF. “Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy”. *Acta pharmacologica Sinica* 34 (2013), 747–54. DOI: 10.1038/aps.2013.50.
- [57] Bartsch, G und Frimberger, D. “Embryonale und adulte Stammzellen für Tissue Engineering in der Urologie”. *Der Urologe. Ausg. A* 43 (2004), 1229–1236. DOI: 10.1007/s00120-004-0691-6.
- [58] Baksh, D, Song, L und Tuan, RS. “Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy”. *Journal of cellular and molecular medicine* 8 (2004), 301–316. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.
- [59] MacArthur, BD, Ma’ayan, A und Lemischka, I. “Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (2009), 672–681.
- [60] Baker, CL und Pera, MF. “Capturing Totipotent Stem Cells”. *Cell stem cell* 22 (2018), 25–34. DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.011.
- [61] Zakrzewski, W, Dobrzyński, M, Szymonowicz, M und Rybak, Z. “Stem cells: past, present, and future”. *Stem Cell Research & Therapy* 10 (2019). DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- [62] Silva Meirelles, L da, Fontes, AM, Covas, DT und Caplan, AI. “Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells”. *Cytokine & growth factor reviews* 20 (2009), 419–427. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
- [63] Dos Santos, F, Campbell, A, Fernandes-Platzgummer, A, Andrade, PZ, Gimble, JM, Wen, Y, Boucher, S, Vemuri, MC, da Silva, CL und Cabral, JMS. “A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells”. *Biotechnology and bioengineering* 111 (2014), 1116–1127. DOI: 10.1002/bit.25187.
- [64] Ullah, I, Subbarao, RB und Rho, GJ. “Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective”. *Bioscience reports*. 2015. DOI: 10.1042/BSR20150025.
- [65] Wolbank, S, van Griensven, M, Grillari-Voglauer, R und Peterbauer-Scherb, A. “Alternative Sources of Adult Stem Cells: Human Amniotic Membrane”. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 123 (2010), 1–27. DOI: 10.1007/10_2010_71.
- [66] Pan, Q, Fouraschen, SMG, Ruiters, PE de, Dinjens, WNM, Kwekkeboom, J, Tilanus, HW und van der Laan, LJW. “Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells”. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 239 (2014), 105–115. DOI: 10.1177/1535370213506802.

- [67] Wang, Y, Zhang, Z, Chi, Y, Zhang, Q, Xu, F, Yang, Z, Meng, L, Yang, S, Yan, S, Mao, A, Zhang, J, Yang, Y, Wang, S, Cui, J, Liang, L, Ji, Y, Han, ZB, Fang, X und Han, ZC. “Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation”. *Cell death & disease* 4 (2013), 950. DOI: 10.1038/cd-dis.2013.480.
- [68] Simonsen, JL, Rosada Kjeldsen, C, Serakinci, N, Justesen, J, Stenderup, K, Rattan, S, G Jensen, T und Kassem, M. “Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells”. *Nature biotechnology* 20 (2002), 592–6. DOI: 10.1038/nbt0602-592.
- [69] Gstraunthaler, G und Lindl, T. *Zell- und Gewebekultur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN: 978-3-642-33112-1. DOI: 10.1007/978-3-642-35997-2.
- [70] Cierpka, K, Elseberg, CL, Niss, K, Kassem, M, Salzig, D und Czermak, P. “hMSC Production in Disposable Bioreactors with Regards to GMP and PAT”. *Chemie Ingenieur Technik* 85 (2013), 67–75. DOI: 10.1002/cite.201200151.
- [71] Han, ZC, Du, WJ, Han, ZB und Liang, L. “New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells”. *Bio-medical materials and engineering* 28 (2017), S29–S45. DOI: 10.3233/BME-171622.
- [72] Friedenstein, AJ, Chailakhjan, RK und Lalykina, KS. “The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells”. *Cell Proliferation* 3 (1970), 393–403. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- [73] Panchalingam, KM, Jung, S, Rosenberg, L und Behie, LA. “Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review”. *Stem cell research & therapy* 6 (2015), 225. DOI: 10.1186/s13287-015-0228-5.
- [74] Chen, AKL, Kong Chew, Y, Yu Tan, H, Shaul, R und Kah Weng Oh, S. “Increasing efficiency of human mesenchymal stromal cell culture by optimization of microcarrier concentration and design of medium feed”. *Cytotherapy* 17 (2014). DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.08.011.
- [75] Bourin, P, Bunnell, BA, Casteilla, L, Dominici, M, Katz, AJ, March, KL, Redl, H, Rubin, JP, Yoshimura, K und Gimble, JM. “Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)”. *Cytotherapy* 15 (2013), 641–648. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
- [76] Jung, S und Kleinheinz, J. “Adult Mesenchymal Stem Cells in Current Tissue Engineering Concepts”. *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*. Hrsg. von Eberli, D. Rijeka: IntechOpen, 2014. Kap. 4. DOI: 10.5772/59219.

- [77] National Library of Medicine (NLM) an den National Institutes of Health (NIH). *Clinical-Trials.gov*. www.clinicaltrials.gov. Zuletzt aufgerufen: 14.07.2021.
- [78] Ichimura, T, Chiu, Ld, Fujita, K, Machiyama, H, Yamaguchi, T, Watanabe, TM und Fujita, H. “Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy”. *Scientific reports* 6 (2016), 37562. DOI: 10.1038/srep37562.
- [79] Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, F, Krause, D, Deans, R, Keating, A, Prockop, D und Horwitz, E. “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”. *Cytotherapy* 8 (2006), 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- [80] Okamoto, T, Aoyama, T, Nakayama, T, Nakamata, T, Hosaka, T, Nishijo, K, Nakamura, T, Kiyono, T und Toguchida, J. “Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (2002), 354–361. DOI: 10.1016/s0006-291x(02)00661-7.
- [81] Li, Y, Yue, J, Liu, Y, Wu, J, Guan, M, Chen, D, Pan, H und Lu, W. “Strontium Regulates Stem Cells Fates During Osteogenic Differentiation Through an Asymmetric Cell Division”. *SSRN Electronic Journal* (2020). DOI: 10.2139/ssrn.3640693.
- [82] Stolzing, A, Jones, E, Mcgonagle, D und Scutt, A. “Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. Mech Ageing Dev 129: 163-173”. *Mechanisms of ageing and development* 129 (2008), 163–73. DOI: 10.1016/j.mad.2007.12.002.
- [83] Samsonraj, RM, Rai, BC, Sathiyathan, P, Puan, KJ, Roetzschke, O, Hui, JHP, Raghunath, M, Stanton, LW, Nurcombe, V und Cool, SM. “Establishing Criteria for Human Mesenchymal Stem Cell Potency”. *Stem cells* (2015). DOI: 10.1002/stem.1982.
- [84] Gregory, CA, Prockop, DJ und Spees, JL. “Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation”. *Experimental cell research* 306 (2005), 330–5. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.03.018.
- [85] Sacchetti, B, Funari, A, Remoli, C, Giannicola, G, Kögler, G, Liedtke, S, Cossu, G, Serafini, M, Sampaolesi, M, Tagliafico, E, Tenedini, E, Saggio, I, Robey, P, Riminucci, M und Bianco, P. “No Identical "Mesenchymal Stem Cells at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels”. *Stem Cell Reports* 6 (2016), 897–913. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.011.
- [86] Nienow, AW, Coopman, K, Heathman, TRJ, Rafiq, QA und Hewitt, CJ. “Chapter 3 - Bioreactor Engineering Fundamentals for Stem Cell Manufacturing”. *Stem Cell Manufacturing*. Hrsg. von Cabral, JM, Lobato de Silva, C, Chase, LG und Margarida Diogo, M. Boston:

- Elsevier, 2016, 43–75. ISBN: 978-0-444-63265-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63265-4.00003-0>.
- [87] Hass, VC und Pörtner, R. *Praxis der Bioprozesstechnik: Mit virtuellem Praktikum*. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 2009. ISBN: 9783827417954.
- [88] Eibl, R, Eibl, D, Pörtner, R, Catapano, G und Czermak, P. *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009. DOI: 10.1007/978-3-540-68182-3.
- [89] Pörtner, R. “Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation”. 37 (2009), 13–53. DOI: 10.1007/978-3-540-68182-3_2.
- [90] Montagnon, BJ, Vincent-Falquet, JC und Saluzzo, JF. “Experience with vero cells at Pasteur Mérieux Connaught”. *Developments in biological standardization* 98 (1999), 137–40; discussion 167.
- [91] Barrett, PN, Mundt, W, Kistner, O und Howard, MK. “Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines”. *Expert review of vaccines* 8 (2009), 607–618. DOI: 10.1586/erv.09.19.
- [92] Rafiq, QA, Brosnan, KM, Coopman, K, Nienow, AW und Hewitt, CJ. “Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor”. *Biotechnology letters* 35 (2013), 1233–1245. DOI: 10.1007/s10529-013-1211-9.
- [93] Wyrobnik, TA, Ducci, A und Micheletti, M. “Advances in human mesenchymal stromal cell-based therapies - Towards an integrated biological and engineering approach”. *Stem cell research* 47 (2020), 101888. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101888.
- [94] Schirmaier, C, Jossen, V, Kaiser, SC, Jüngerkes, F, Brill, S, Safavi-Nab, A, Siehoff, A, van den Bos, C, Eibl, D und Eibl, R. “Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions”. *Engineering in Life Sciences* 14 (2014), 292–303. DOI: 10.1002/elsc.201300134.
- [95] Bayne, K, Splan, D, Patel, G, Ravindhar, J, Spruiel, A, Haq, T, Szczypka, M und Capone, J. “A novel, single-use bioreactor system for expansion of human mesenchymal stem/stromal cells”. *Cytotherapy* 21 (2019), 79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.03.486>.
- [96] Merten, OW. “Cell Detachment”. 97 (2010), 265. DOI: 10.1002/9780470054581.eib195.
- [97] Wang, Y und Ouyang, F. “Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarrier culture”. *Bioprocess Engineering* 21 (1999), 211. DOI: 10.1007/s004490050665.
- [98] Kong, D, Chen, M, Gentz, R und Zhang, J. “Cell growth and protein formation on various microcarriers”. *Cytotechnology* 29 (1999), 151–8. DOI: 10.1023/A:1008053421462.
- [99] Xiao, C, Huang, Z, Li, W, Hu, X, Qu, W, Gao, L und Liu, G. “High density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore”. *Cytotechnology* 30 (1999), 143–147. DOI: 10.1023/A:1008038609967.

- [100] Takahashi, I, Sato, K, Mera, H, Wakitani, S und Takagi, M. “Effects of agitation rate on aggregation during beads-to-beads subcultivation of microcarrier culture of human mesenchymal stem cells”. *Cytotechnology* 69 (2016). DOI: 10.1007/s10616-016-9999-5.
- [101] Jossen, V, van den Bos, C, Eibl, R und Eibl, D. “Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges”. *Applied microbiology and biotechnology* 102 (2018), 3981–3994. DOI: 10.1007/s00253-018-8912-x.
- [102] Abraham, E, Gupta, S, Jung, S und McAfee, E. “Bioreactor for Scale-Up: Process Control”. 2017, 139–178. ISBN: 9780128028261. DOI: 10.1016/B978-0-12-802826-1.00006-4.
- [103] Nienow, AW. “Reactor Engineering in Large Scale Animal Cell Culture”. *Cytotechnology* 50 (2006), 9–33. DOI: 10.1007/s10616-006-9005-8.
- [104] Chen, AKL, Reuveny, S und Oh, SKW. “Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction”. *Biotechnology advances* 31 (2013), 1032–1046. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.03.006.
- [105] GE Healthcare Bio-Sciences AB, Hrsg. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*. 2013. URL: http://www.gelifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2016/07/023.8_Microcarrier-Cell-Culture.pdf.
- [106] Goh, TKP, Zhang, ZY, Chen, AKL, Reuveny, S, Choolani, M, Chan, JKY und Oh, SKW. “Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells”. *IntechOpen 2* (2013), 84–97. DOI: 10.1089/biores.2013.0001.
- [107] Heathman, TRJ, Stolzing, A, Fabian, C, Rafiq, QA, Coopman, K, Nienow, AW, Kara, B und Hewitt, CJ. “Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate”. *Cytotherapy* 18 (2016), 523–535. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.01.007.
- [108] Heathman, TRJ, Nienow, AW, Rafiq, QA, Coopman, K, Kara, B und Hewitt, CJ. “Agitation and aeration of stirred-bioreactors for the microcarrier culture of human mesenchymal stem cells and potential implications for large-scale bioprocess development”. *Biochemical Engineering Journal* 136 (2018), 9–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.011>.
- [109] Jossen, V, Schirmer, C, Mostafa Sindi, D, Eibl, R, Kraume, M, Pörtner, R und Eibl, D. “Theoretical and Practical Issues That Are Relevant When Scaling Up hMSC Microcarrier Production Processes”. *Stem cells international* 2016 (2016). DOI: 10.1155/2016/4760414.
- [110] Tan, KY, Teo, KL, Lim, JFY, Chen, AKL, Choolani, M, Reuveny, S, Chan, J und Oh, SK. “Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture”. *Cytotherapy* 17 (2015), 1152–1165. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.05.001.

- [111] Yang, HS, Jeon, O, Bhang, SH, Lee, SH und Kim, BS. "Suspension Culture of Mammalian Cells Using Thermosensitive Microcarrier that Allows Cell Detachment without Proteolytic Enzyme Treatment". *Cell Transplantation* 19 (2010), 1123–1132. DOI: 10.3727/096368910X516664.
- [112] Cabral, JMS und Lobato da Silva, C. *Bioreactors for Stem Cell Expansion and Differentiation*. Gene and Cell Therapy Ser. Milton: Chapman and Hall/CRC, 2018. ISBN: 9781498795906.
- [113] Ulloa-Montoya, F, Verfaillie, C und Hu, WS. "Culture systems for pluripotent stem cells". *Journal of bioscience and bioengineering* 100 (2005), 12–27. DOI: 10.1263/jbb.100.12.
- [114] Ohad Karnieli, Oryan Makler Friedner, Julie G. Allickson, Nan Zhang, Sunghoon Jung, David Fiorentini, Eytan Abraham, Shannon S. Eaker, tan Kah Yong, Allan Chan, Sarah Griffiths, Amy K. Wehn und Steve Oh. "A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies". *Cytotherapy* 19.2 (2016), 155–169. ISSN: 1465-3249. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011.
- [115] Jung, S, Sen, A, Rosenberg, L und Behie, LA. "Human mesenchymal stem cell culture: Rapid and efficient isolation and expansion in a defined serum-free medium". 6 (2012), 391–403. DOI: 10.1002/term.441.
- [116] Salzig, D, Leber, J, Merkewitz, K, Lange, MC, Köster, N und Czermak, P. "Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium". *Stem cells international* 2016 (2016), 5246584. DOI: 10.1155/2016/5246584.
- [117] Tekkatte, C, Gunasingh, GP, Cherian, KM und Sankaranarayanan, K. "'Humanized' stem cell culture techniques: the animal serum controversy". *Stem cells international* 2011 (2011), 504723. DOI: 10.4061/2011/504723.
- [118] Erickson, GA, Bolin, SR und Landgraf, JG. "Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns". *Developments in biological standardization* 75 (1991), 173–175.
- [119] Simonetti, AB, Englert, GE, Campos, K, Mergener, M, David, C de, Oliveira, AP de und Roehle, PM. "Nanobacteria-like particles: a threat to cell cultures". *Brazilian Journal of Microbiology* 38 (2007), 153–158. DOI: 10.1590/S1517-83822007000100032.
- [120] Jung, S, Sen, A, Rosenberg, L und Behie, LA. "Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells". *Cytotherapy* 12 (2010), 637–657. DOI: 10.3109/14653249.2010.495113.
- [121] dos Santos, F, Andrade, PZ, Abecasis, MM, Gimble, JM, Chase, LG, Campbell, AM, Boucher, S, Vemuri, MC, Silva, CLd und Cabral, JMS. "Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions". *Tissue engineering. Part C, Methods* 17 (2011), 1201–1210. DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0255.

- [122] Timmins, NE, Kiel, M, Günther, M, Heazlewood, C, Doran, MR, Brooke, G und Atkinson, K. “Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells”. *Biotechnology and bioengineering* 109 (2012), 1817–26. DOI: 10.1002/bit.24425.
- [123] Moreira, F, Mizukami, A, de Souza, LEB, Cabral, JMS, da Silva, CL, Covas, DT und Swiech, K. “Successful Use of Human AB Serum to Support the Expansion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell in a Microcarrier-Based Platform”. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8 (2020), 307. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00307.
- [124] Costa, AC, Atala, DI, Maugeri, F und Maciel, R. “Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation”. *Process Biochemistry* 37 (2001), 125–137. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00188-1.
- [125] Kalil, SJ, Maugeri, F und Rodrigues, MI. “Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization”. *Process Biochemistry* 35 (2000), 539–550. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00101-6.
- [126] Montgomery, DC. *Design and analysis of experiments*. 8. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. ISBN: 9781118146927.
- [127] Nasri Nasrabadi, MR und Razavi, SH. “Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1”. *Journal of bioscience and bioengineering* 109 (2010), 361–368. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.013.
- [128] Zhang, H, Wang, H, Liu, M, Zhang, T, Zhang, J, Wang, X und Xiang, W. “Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody”. *Cytotechnology* 65 (2013), 363–378. DOI: 10.1007/s10616-012-9488-4.
- [129] Horvath, B, Mun, M und Laird, MW. “Characterization of a monoclonal antibody cell culture production process using a quality by design approach”. *Molecular biotechnology* 45 (2010), 203–206. DOI: 10.1007/s12033-010-9267-4.
- [130] Mandenius, CF, Graumann, K, Schulz, TW, Premstaller, A, Olsson, IM, Petiot, E, Clemens, C und Welin, M. “Quality-by-Design for biotechnology-related pharmaceuticals”. *Biotechnology journal* 4 (2009), 600–9. DOI: 10.1002/biot.200800333.
- [131] Duvar, S, Hecht, V, Finger, J, Gullans, M und Ziehr, H. “Developing an upstream process for a monoclonal antibody including medium optimization”. *BMC proceedings* 7 (2013), P34. DOI: 10.1186/1753-6561-7-S6-P34.
- [132] Legmann, R, Schreyer, HB, Combs, RG, McCormick, EL, Russo, AP und Rodgers, ST. “A predictive high-throughput scale-down model of monoclonal antibody production in CHO cells”. *Biotechnology and Bioengineering* 104 (2009), 1107–1120. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.22474>.

- [133] Dubey, KK und Behera, BK. “Statistical optimization of process variables for the production of an anticancer drug (colchicine derivatives) through fermentation: at scale-up level”. *New biotechnology* 28 (2011), 79–85. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.07.008.
- [134] Kleppmann, W. *Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren*. 9. überarbeitete Auflage. Praxisreihe Qualitätswissen. München und Wien: Hanser, 2016. ISBN: 9783446447172.
- [135] Myers, RH, Anderson-Cook, C und Montgomery, DC. *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. Fourth Edition. Wiley series in probability and statistics. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. ISBN: 9781118916018.
- [136] Sandadi, S, Ensari, S und Kearns, B. “Application of fractional factorial designs to screen active factors for antibody production by chinese hamster ovary cells”. *Biotechnology progress* 22 (2006), 595–600. DOI: 10.1021/bp050300q.
- [137] Asghar, A, Abdul Raman, AA und Daud, WMAW. “A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process”. *The Scientific World Journal* 2014 (2014), 869120. DOI: 10.1155/2014/869120.
- [138] Castillo, ED. *Process Optimization: A Statistical Approach*. Bd. 105. International Series in Operations Research & Management Science. Boston, MA: Springer Science+Business Media LLC, 2007. ISBN: 9780387714349. DOI: 10.1007/978-0-387-71435-6.
- [139] Ferreira, SLC, Bruns, RE, Ferreira, HS, Matos, GD, David, JM, Brandão, GC, da Silva, EGP, Portugal, LA, dos Reis, PS, Souza, AS und dos Santos, WNL. “Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods”. *Analytica chimica acta* 597 (2007), 179–186. DOI: 10.1016/j.aca.2007.07.011.
- [140] Goel, T, Haftka, RT, Shyy, W und Watson, LT. “Pitfalls of using a single criterion for selecting experimental designs”. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 75 (2008), 127–155. DOI: 10.1002/nme.2242.
- [141] Santner, TJ, Williams, BJ und Notz, WI. *The Design and Analysis of Computer Experiments*. Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer, 2003. ISBN: 9781441929921. DOI: 10.1007/978-1-4757-3799-8.
- [142] Lee, GM, Kim, EJ, Kim, NS, Yoon, SK, Ahn, YH und Song, JY. “Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design”. *Journal of Biotechnology* 69 (1999), 85–93. DOI: 10.1016/s0168-1656(99)00004-8.
- [143] Chun, C, Heineken, K, Szeto, D, Ryll, T, Chamow, S und Chung, JD. “Application of factorial design to accelerate identification of CHO growth factor requirements”. *Biotechnology progress* 19 (2003), 52–57. DOI: 10.1021/bp025575.

- [144] Rouiller, Y, Périlleux, A, Vesin, MN, Stettler, M, Jordan, M und Broly, H. “Modulation of mAb quality attributes using microliter scale fed-batch cultures”. *Biotechnology progress* 30 (2014), 571–583. DOI: 10.1002/btpr.1921.
- [145] Yang, WC, Lu, J, Nguyen, NB, Zhang, Healy, NV, Kshirsagar, R, Ryll, T und Huang, YM. “Addition of valproic acid to CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers”. *Molecular biotechnology* 56 (2014), 421–428. DOI: 10.1007/s12033-013-9725-x.
- [146] Torkashvand, F, Vaziri, B, Maleknia, S, Heydari, A, Vossoughi, M, Davami, F und Mahboudi, F. “Designed Amino Acid Feed in Improvement of Production and Quality Targets of a Therapeutic Monoclonal Antibody”. *PloS one* 10 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0140597.
- [147] Ganguly, R und Puri, IK. “Mathematical model for the cancer stem cell hypothesis”. *Cell Proliferation* 39 (2006), 3–14. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2006.00369.x.
- [148] Kuchemüller, KB, Pörtner, R und Möller, J. “Digital Twins and Their Role in Model-Assisted Design of Experiments”. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 177 (2021), 29–61. DOI: 10.1007/10{\textunderscore }2020{\textunderscore }136.
- [149] Kreutz, C und Timmer, J. “Systems biology: experimental design”. *The FEBS journal* 276 (2009), 923–942. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06843.x.
- [150] Smucker, B, Krzywinski, M und Altman, N. “Optimal experimental design”. *Nature methods* 15 (2018), 559–560. DOI: 10.1038/s41592-018-0083-2.
- [151] Anselment, B, Schoemig, V, Kesten, C und Weuster-Botz, D. “Statistical vs. stochastic experimental design: an experimental comparison on the example of protein refolding”. *Biotechnology progress* 28 (2012), 1499–1506. DOI: 10.1002/btpr.1635.
- [152] Banga, J und Balsa-Canto, E. “Parameter estimation and optimal experimental design”. *Essays in biochemistry* 45 (2008), 195–209. DOI: 10.1042/BSE0450195.
- [153] Chaudhuri, P und Mykland, PA. “Nonlinear Experiments: Optimal Design and Inference Based on Likelihood”. *Journal of the American Statistical Association* 88 (1993), 538–546. DOI: 10.1080/01621459.1993.10476305.
- [154] Ford, I, Titterington, DM und Kitsos, CP. “Recent Advances in Nonlinear Experimental Design”. *Technometrics* 31 (1989), 49. DOI: 10.2307/1270364.
- [155] Franceschini, G und Macchietto, S. “Model-based design of experiments for parameter precision: State of the art”. *Chemical Engineering Science* 63 (2008), 4846–4872.
- [156] Möller, J, Kuchemüller, KB, Hernández Rodríguez, T, Frahm, B, Hass, VC und Pörtner, R. “Model-assisted design of process strategies for cell culture processes”. *American Pharmaceutical Review* 21 (2018).
- [157] Shirsat, NP, English, NJ, Glennon, B und Al-Rubeai, M. “Modelling of Mammalian Cell Cultures”. *Animal Cell Culture*. 2015, 259–326. DOI: 10.1007/978-3-319-10320-4_10.

- [158] Pörtner, R und Schäfer, T. “Modelling hybridoma cell growth and metabolism - a comparison of selected models and data”. *Journal of Biotechnology* 49 (1996), 119–135. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01535-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01535-0).
- [159] Pörtner, R, Platas Barradas, O, Frahm, B und Hass, VC. “Advanced Process and Control Strategies for Bioreactors”. 105 (2017), 463–493. DOI: 10.1016/B978-0-444-63663-8.00016-1.
- [160] E. Bailey, J. “Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities”. *Biotechnology progress* 14 (1998), 8–20. DOI: 10.1021/bp9701269.
- [161] Shirsat, N, Mohd, A, Whelan, J, English, NJ, Glennon, B und Al-Rubeai, M. “Revisiting Verhulst and Monod models: analysis of batch and fed-batch cultures”. *Cytotechnology* 67 (2015), 515–530. DOI: 10.1007/s10616-014-9712-5.
- [162] Deppe, S, Frahm, B, Hass, VC, Hernández Rodríguez, T, Kuchemüller, KB, Möller, J und Pörtner, R. “Estimation of Process Model Parameters”. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2095 (2020), 213–234. DOI: 10.1007/978-1-0716-0191-4_12.
- [163] Kroll, P, Hofer, A, Stelzer, IV und Herwig, C. “Workflow to set up substantial target-oriented mechanistic process models in bioprocess engineering”. *Process Biochemistry* 62 (2017), 24–36. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.07.017.
- [164] Storhas, W und Behrendt, U. *Bioverfahrensentwicklung*. 2., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. ISBN: 9783527673834.
- [165] Orth, JD, Thiele, I und Palsson, BØ. “What is flux balance analysis?” *Nature biotechnology* 28 (2010), 245–248. DOI: 10.1038/nbt.1614.
- [166] Lularevic, M, Racher, AJ, Jaques, C und Kiparissides, A. “Improving the accuracy of flux balance analysis through the implementation of carbon availability constraints for intracellular reactions”. *Biotechnology and bioengineering* 116 (2019), 2339–2352. DOI: 10.1002/bit.27025.
- [167] Mantzaris, NV, Daoutidis, P und Sreenc, F. “Numerical solution of multi-variable cell population balance models. II. Spectral methods”. *Computers & Chemical Engineering* 25 (2001), 1441–1462. DOI: 10.1016/S0098-1354(01)00710-4.
- [168] Jandt, U, Barradas, OP, Pörtner, R und Zeng, AP. “Synchronized mammalian cell culture: part II—population ensemble modeling and analysis for development of reproducible processes”. *Biotechnology progress* 31 (2015), 175–185. DOI: 10.1002/btpr.2006.
- [169] Möller, J, Bhat, K, Riecken, K, Pörtner, R, Zeng, AP und Jandt, U. “Process-induced cell cycle oscillations in CHO cultures: Online monitoring and model-based investigation”. *Biotechnology and bioengineering* 116 (2019), 2931–2943. DOI: 10.1002/bit.27124.

- [170] Sanderson, CS, Barford, JP und Barton, GW. "A structured, dynamic model for animal cell culture systems". *Biochemical Engineering Journal* 3 (1999), 203–211. DOI: 10.1016/S1369-703X(99)00021-2.
- [171] Jang, JD, Sanderson, CS, Chan, LC, Barford, JP und Reid, S. "Structured modeling of recombinant protein production in batch and fed-batch culture of baculovirus-infected insect cells". *Cytotechnology* 34 (2000), 71–82. DOI: 10.1023/A:1008178029138.
- [172] Kontoravdi, C, Wong, D, Lam, C, Lee, YY, Yap, MGS, Pistikopoulos, EN und Mantalaris, A. "Modeling amino acid metabolism in mammalian cells-toward the development of a model library". *Biotechnology progress* 23 (2007), 1261–1269. DOI: 10.1021/bp070106z.
- [173] Ozturk, SS und Hu, WS. *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*. Bd. 30. Biotechnology and bioprocessing series. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. ISBN: 0824753348.
- [174] Glacken, MW, Fleischaker, RJ und Sinskey, AJ. "Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells". *Biotechnology and bioengineering* 28 (1986), 1376–1389. DOI: 10.1002/bit.260280912.
- [175] Chen, Z, Lu, W, Garcia-Prieto, C und Huang, P. "The Warburg effect and its cancer therapeutic implications". *Journal of bioenergetics and biomembranes* 39 (2007), 267–274. DOI: 10.1007/s10863-007-9086-x.
- [176] Vander Heiden, M, Cantley, L und Thompson, C. "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation". *Science (New York, N.Y.)* 324 (2009), 1029–33. DOI: 10.1126/science.1160809.
- [177] Miller, WM, Wilke, CR und Blanch, HW. "Transient responses of hybridomas to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture". *Bioprocess Engineering* 3 (1988), 113–122. DOI: 10.1007/BF00373474.
- [178] Hassell, T, Gleave, S und Butler, M. "Growth inhibition in animal cell culture - The effect of lactate and ammonia". *Applied biochemistry and biotechnology* 30 (1991), 29–41. DOI: 10.1007/BF02922022.
- [179] Lüdemann, I, Pörtner, R und Märkl, H. "Effect of NH₃ on the cell growth of a hybridoma cell line". *Cytotechnology* 14 (1994), 11–20. DOI: 10.1007/BF00772191.
- [180] Zeng, AP, Deckwer, WD und Hu, WS. "Determinants and rate laws of growth and death of hybridoma cells in continuous culture". *Biotechnology and bioengineering* 57 (1998), 642–654.

- [181] Frahm, B, Lane, P, Atzert, H, Munack, A, Hoffmann, M, Hass, VC und Pörtner, R. “Adaptive, Model-Based Control by the Open-Loop-Feedback-Optimal (OLFO) Controller for the Effective Fed-Batch Cultivation of Hybridoma Cells”. *Biotechnology Progress* 18 (2002), 1095–1103. DOI: 10.1021/bp020035y.
- [182] Hayter, PM, Curling, EM, Baines, AJ, Jenkins, N, Salmon, I, Strange, PG und Bull, AT. “Chinese hamster ovary cell growth and interferon production kinetics in stirred batch culture”. *Applied microbiology and biotechnology* 34 (1991), 559–564. DOI: 10.1007/BF00167898.
- [183] Schop, D, Janssen, FW, van Rijn, LDS, Fernandes, H, Bloem, RM, de Bruijn, J und van Dijkhuizen-Radersma, R. “Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells”. *Tissue engineering. Part A* 15 (2009), 1877–86. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0345.
- [184] Nienow, AW, Rafiq, QA, Coopman, K und Hewitt, CJ. “A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers”. *Biochemical Engineering Journal* 85 (2014), 79–88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.02.005>.
- [185] He, MYC, Stacker, SA, Rossi, R und Halford, MM. “Counting nuclei released from microcarrier-based cultures using pro-fluorescent nucleic acid stains and volumetric flow cytometry”. *BioTechniques* 63 (2017), 34–36. DOI: 10.2144/000114568.
- [186] Rafiq, QA, Coopman, K, Nienow, AW und Hewitt, CJ. “Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors”. *Biotechnology Journal* 11 (2016), 473–486. DOI: 10.1002/biot.201400862.
- [187] Schop, D, van Dijkhuizen-Radersma, R, Borgart, E, Janssen, FW, Rozemuller, H, Prins, HJ und Bruijn, JD de. “Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism”. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4 (2010), 131–140. DOI: 10.1002/term.224.
- [188] Myers, MA. “Direct measurement of cell numbers in microtitre plate cultures using the fluorescent dye SYBR green I”. *Journal of immunological methods* 212 (1998), 99–103.
- [189] *Ammonia, UV method*. Zuletzt aufgerufen: 06.08.2021. 10/2018. URL: <https://www.nzytech.com/products-services/assay-kits/ak00091/>.
- [190] Hernández Rodríguez, T, Posch, C, Pörtner, R und Frahm, B. “Dynamic parameter estimation and prediction over consecutive scales, based on moving horizon estimation: applied to an industrial cell culture seed train”. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44 (2021), 793–808. DOI: 10.1007/s00449-020-02488-1.
- [191] Möller, J, Hernández Rodríguez, T, Müller, J, Arndt, L, Kuchemüller, KB, Frahm, B, Eibl, R, Eibl, D und Pörtner, R. “Model uncertainty-based evaluation of process strategies during scale-up of biopharmaceutical processes”. *Computers & Chemical Engineering* 134 (2020), 106693. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.106693>.

- [192] Ulonska, S, Kroll, P, Fricke, J, Clemens, C, Voges, R, MÃ¼ller, MM und Herwig, C. “Workflow for Target-Oriented Parametrization of an Enhanced Mechanistic Cell Culture Model”. *Biotechnology Journal* 13 (2018). DOI: 10.1002/biot.201700395.
- [193] Colin Cameron, A und Windmeijer, FA. “An R-squared measure of goodness of fit for some common nonlinear regression models”. *Journal of Econometrics* 77 (1997), 329–342. DOI: 10.1016/S0304-4076(96)01818-0.
- [194] Bhattacharya, S. “Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy”. *Response Surface Methodology in Engineering Science*. IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.95835.
- [195] Jones, B und Goos, P. “I-Optimal Versus D-Optimal Split-Plot Response Surface Designs”. *Journal of Quality Technology* 44 (2012), 85–101. DOI: 10.1080/00224065.2012.11917886.
- [196] Das, AK und Dewanjee, S. “Chapter 3 - Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation”. *Computational Phytochemistry*. Hrsg. von Sarker, SD und Nahar, L. Elsevier, 2018, 75 –106. ISBN: 978-0-12-812364-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812364-5.00003-1>.
- [197] Chigbu, PE, Ukaegbu, EC und Nwanya, JC. “On comparing the prediction variances of some central composite designs in spherical regions: a review”. *Statistica* 69 (2008), 286–298. DOI: 10.6092/issn.1973-2201/3560.
- [198] Oyejola, BA und Nwanya, JC. “Selecting the Right Central Composite Design”. *International Journal of Statistics and Applications* 2015 (2015), 21–30. DOI: 10.5923/j.statistics.20150501.04.
- [199] Wald, A. “On the Efficient Design of Statistical Investigations”. *The Annals of Mathematical Statistics* 14 (1943), 134–140. DOI: 10.1214/aoms/1177731454.
- [200] Vera Candioti, L, De Zan, MM, Cámara, MS und Goicoechea, HC. “Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development”. *Talanta* 124 (2014), 123–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>.
- [201] Derringer, G und Suich, R. “Simultaneous Optimization of Several Response Variables”. *Journal of Quality Technology* 12 (1980), 214–219. DOI: 10.1080/00224065.1980.11980968.
- [202] Zhang, XY, Trame, MN, Lesko, LJ und Schmidt, S. “Sobol Sensitivity Analysis: A Tool to Guide the Development and Evaluation of Systems Pharmacology Models”. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 4 (2015), 69–79. DOI: 10.1002/psp4.6.
- [203] Fajraoui, N, Marelli, S und Sudret, B. “On optimal experimental designs for Sparse Polynomial Chaos Expansions”. *Methodology (stat.ME)* (2017). DOI: arXiv:1703.05312.

- [204] Harman, R, Filová, L und Richtárik, P. “A Randomized Exchange Algorithm for Computing Optimal Approximate Designs of Experiments”. *Journal of the American Statistical Association* 115 (2018). DOI: 10.1080/01621459.2018.1546588.
- [205] Berry, B, Moretto, J, Matthews, T, Smelko, J und Wiltberger, K. “Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis”. *Biotechnology progress* 31 (2015), 566–577. DOI: 10.1002/btpr.2035.
- [206] Lawson, J. *Design and Analysis of Experiments with SAS*. Chapman & Hall / CRC Texts in Statistical Science. Hoboken: CRC Press, 2010. ISBN: 978142 0060607.
- [207] Johnson, RT, Montgomery, DC und Jones, BA. “An Expository Paper on Optimal Design”. *Quality Engineering* 23 (2011), 287–301. DOI: 10.1080/08982112.2011.576203.
- [208] Kenett, R und Steinberg, D. “New frontiers in the design of experiments”. *IEEE Engineering Management Review* 35 (2007), 91. DOI: 10.1109/EMR.2007.329145.
- [209] Steinberg, DM und Lin, DKJ. “Amendments and Corrections”. *Biometrika* 93 (2006), 1025. DOI: 10.1093/biomet/93.4.1025-a.
- [210] Bursztyn, D und Steinberg, DM. “Comparison of designs for computer experiments”. *Journal of Statistical Planning and Inference* 136 (2006), 1103 –1119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2004.08.007>.
- [211] Vining, GG und Kowalski, S. *Statistical Methods for Engineers*. Cengage Learning, 2010. ISBN: 9780538735186.
- [212] Kuhfeld, WF. “MR-2010C - Experimental Design: Efficiency, Coding, and Choice Designs Experimental Design: Efficiency, Coding, and Choice Designs”. *Mark. Res. Methods Sas Exp. Des. Choice, Conjoint, Graph. Tech.* (2012).
- [213] Zagari, F, Jordan, M, Stettler, M, Broly, H und Wurm, FM. “Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity”. *New biotechnology* 30 (2013), 238–245. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.05.021.
- [214] Schop, D, Dijkhuizen-Radersma, R, Borgart, E, Janssen, F, Rozemuller, H, Prins, HJ und Bruijn, J de. “Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: Growth and metabolism”. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4 (2010), 131–40. DOI: 10.1002/term.224.
- [215] Vallée, C, Durocher, Y und Henry, O. “Exploiting the Metabolism of PYC Expressing HEK293 Cells in Fed-batch Cultures.” *Journal of biotechnology* 169 (2013). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.002.
- [216] Fomina-Yadlin, D, Gosink, JJ, McCoy, R, Follstad, B, Morris, A, Russell, C und McGrew, J. “Cellular Responses to Individual Amino-Acid Depletion in Antibody-Expressing and Parental CHO Cell Lines”. *Biotechnology and bioengineering* 111 (2014). DOI: 10.1002/bit.25155.

- [217] Locasale, JW. “Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle”. *Nature reviews. Cancer* 13 (2013). DOI: 10.1038/nrc3557.
- [218] Salazar, A, Keusgen, M und Hagen, J. “Amino acids in the cultivation of mammalian cells”. *Amino Acids* 48 (2016). DOI: 10.1007/s00726-016-2181-8.
- [219] Hawboldt, KA, Kalogerakis, N und Behie, LA. “A cellular automaton model for microcarrier cultures”. *Biotechnology and bioengineering* 43 (1994), 90–100. DOI: 10.1002/bit.260430112.
- [220] Frame, KK und Hu, WS. “A model for density-dependent growth of anchorage-dependent mammalian cells”. *Biotechnology and bioengineering* 32 (1988), 1061–1066. DOI: 10.1002/bit.260320813.
- [221] Lim, JHR und Davies, GA. “A stochastic model to simulate the growth of anchorage dependent cells on flat surfaces”. *Biotechnology and bioengineering* 36 (1990), 547–562. DOI: 10.1002/bit.260360602.
- [222] Möhler, L, Bock, A und Reichl, U. “Segregated Mathematical Model for Growth of Anchorage-Dependent MDCK Cells in Microcarrier Culture”. *Biotechnology progress* 24 (2008), 110–9. DOI: 10.1021/bp0701923.
- [223] Higuera, G, Schop, D, Janssen, F, van Dijkhuizen-Radersma, R, van Boxtel, T und van Blitterswijk, C. “Quantifying In Vitro Growth and Metabolism Kinetics of Human Mesenchymal Stem Cells Using a Mathematical Model”. *Tissue engineering. Part A* 15 (2009), 2653–63. DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0328.
- [224] Möller, J, Kuchemüller, KB, Steinmetz, T, Koopmann, KS und Pörtner, R. “Model-assisted Design of Experiments as a concept for knowledge-based bioprocess development”. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42 (2019), 867–882. DOI: 10.1007/s00449-019-02089-7.
- [225] Birch, J und Cartwright, T. “Environmental factors influencing the growth of animal cells in culture”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 32 (1982), 313–317. DOI: 10.1002/jctb.5030320135.
- [226] Hernández Rodríguez, T, Posch, C, Schmutzhard, J, Stettner, J, Weihs, C, Pörtner, R und Frahm, B. “Predicting industrial-scale cell culture seed trains-A Bayesian framework for model fitting and parameter estimation, dealing with uncertainty in measurements and model parameters, applied to a nonlinear kinetic cell culture model, using an MCMC method”. *Biotechnology and bioengineering* 116 (2019), 2944–2959. DOI: 10.1002/bit.27125.
- [227] Siddiquee, K und Sha, M. “A Novel Method for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells using a New Brunswick S41i CO₂ Incubator Shaker”. *Eppendorf Inc., Enfield, CT, U.S.A* (2013).
- [228] Möller, J und Pörtner, R. “Digital Twins for Tissue Culture Techniques-Concepts, Expectations, and State of the Art”. *Processes* 9.3 (2021), 447. DOI: 10.3390/pr9030447.

- [229] Puskeiler, R, Kreuzmann, J, Schuster, C, Didzus, K, Bartsch, N, Hakemeyer, C, Schmidt, H, Jacobs, M und Wolf, S. “The way to a design space for an animal cell culture process according to Quality by Design (QbD)”. *BMC proceedings* 5 Suppl 8 (2011), P12. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P12.
- [230] Nargund, S, Guenther, K und Mauch, K. “The Move toward Biopharma 4.0”. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 39 (2019), 53–55. DOI: 10.1089/gen.39.06.18.
- [231] Möller, J, Korte, K, Pörtner, R, Zeng, AP und Jandt, U. “Model-based identification of cell-cycle-dependent metabolism and putative autocrine effects in antibody producing CHO cell culture”. *Biotechnology and bioengineering* 115 (2018), 2996–3008. DOI: 10.1002/bit.26828.
- [232] Möller, J und Pörtner, R. “Digital Twins for Tissue Culture Techniques - Concepts, Expectations, and State of the Art”. *Processes* 9 (2021), 447. DOI: 10.3390/pr9030447.

A Anhang

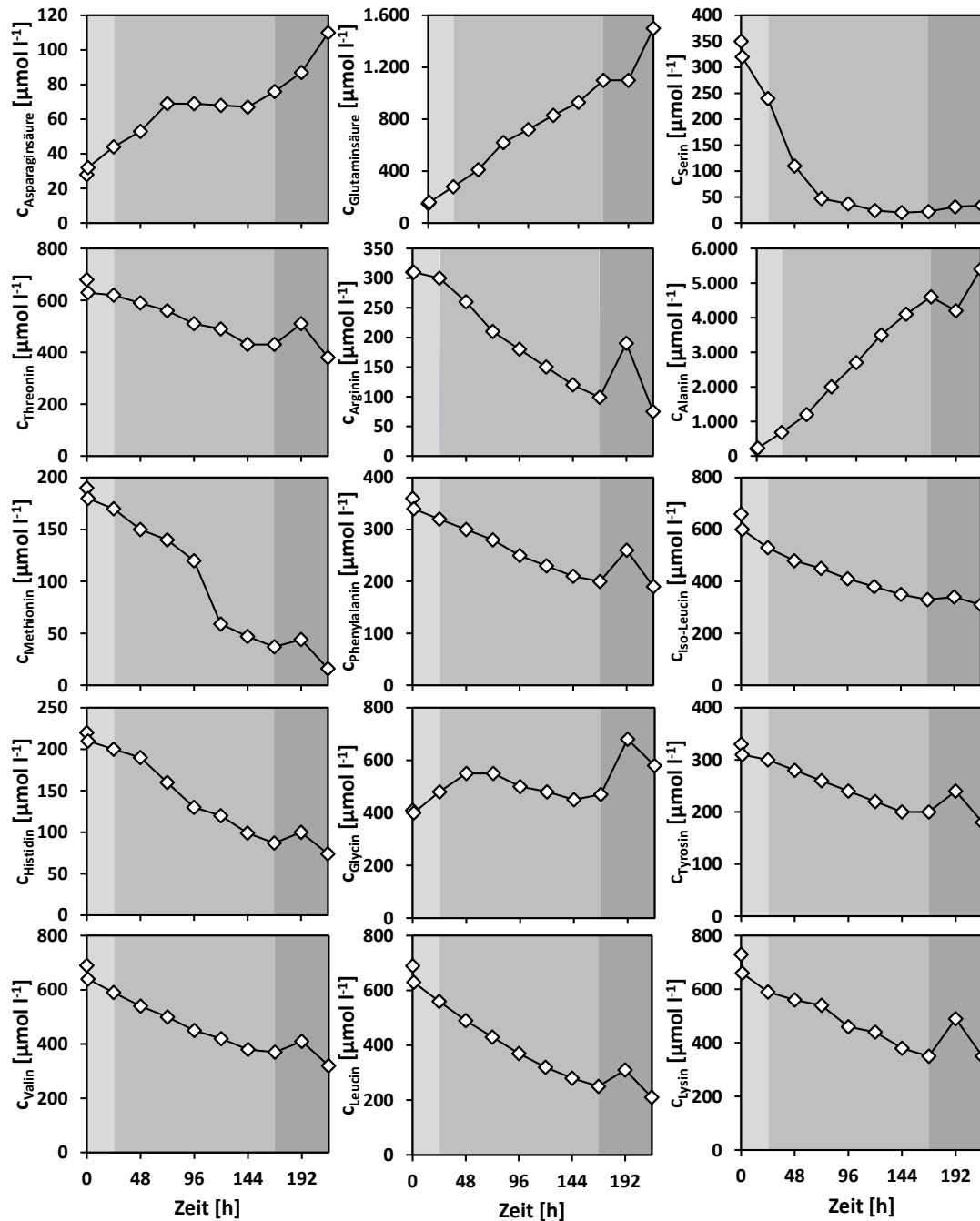


Abbildung A.1: Verläufe der 15 ausgewerteten Aminosäuren von Versuch 1. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase.

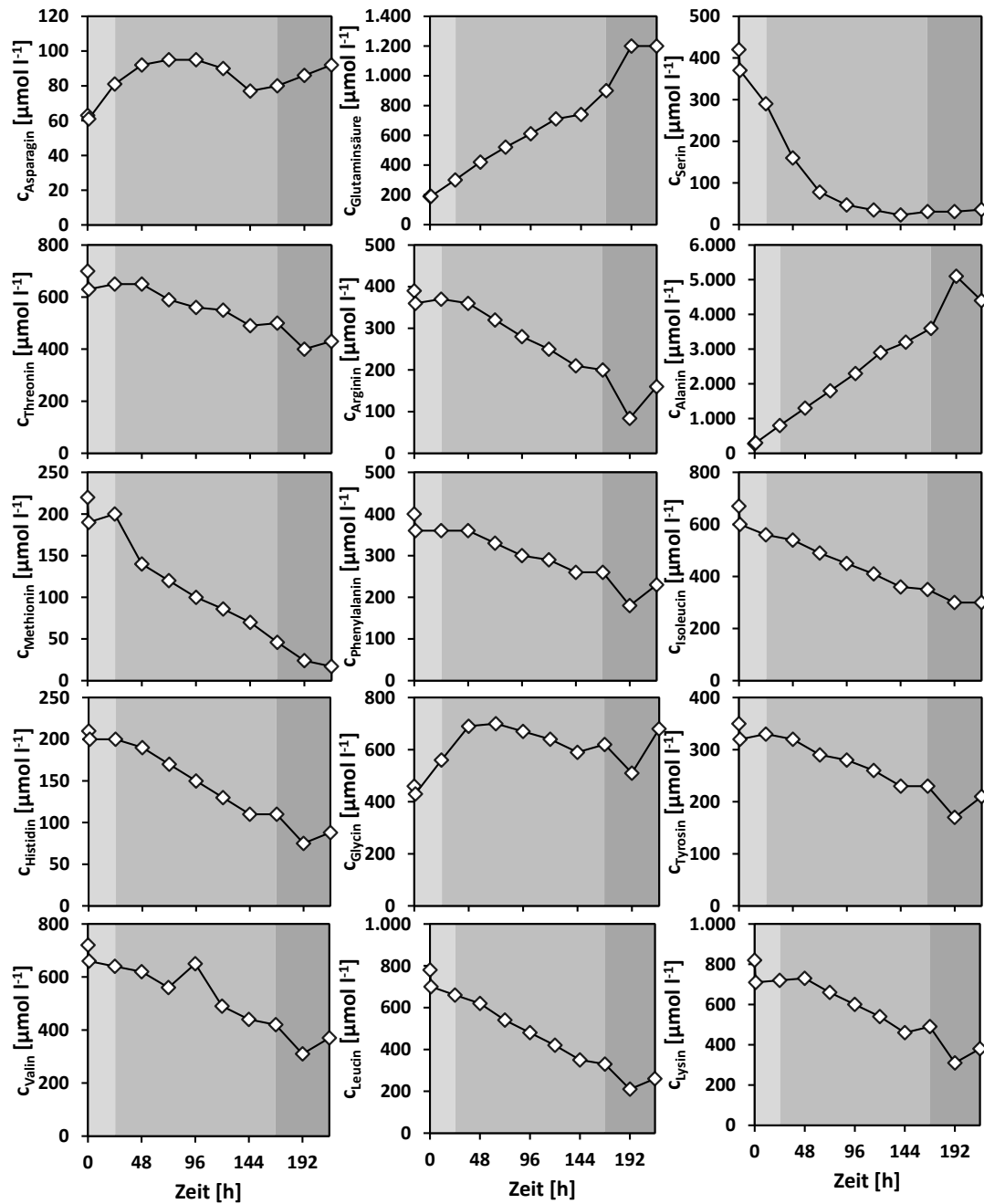


Abbildung A.2: Verläufe der 15 ausgewerteten Aminosäuren von Versuch 2. Die farbliche Hinterlegung verdeutlicht die Anhaftung, die exponentielle Phase und die Sterbephase.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Moser A, Kuchemüller KB, Deppe S, Hernández Rodríguez T, Frahm B, Pörtner R, Hass VC, Möller J. „Model-assisted DoE software: optimization of growth and biocatalysis in *Saccharomyces cerevisiae* bioprocesses“. *Bioprocess Biosyst Eng* (2021). DOI: 10.1007/s00449-020-02478-3.

Arndt L, Wiegmann V, Kuchemüller KB, Baganz F, Pörtner R, Möller J. „Model-based workflow for scale-up of process strategies developed in miniaturized bioreactor systems“. *Biotechnology Progress* (2021). DOI: 10.1002/btpr.3122.

Möller J, Hernández Rodríguez T, Müller J, Arndt L, Kuchemüller KB, Frahm B, Eibl R, Eibl D, Pörtner R. „Model uncertainty-based evaluation of process strategies during scale-up of biopharmaceutical processes“. *Computers & Chemical Engineering* (2020). DOI: 10.1016/j.compchemeng.2019.106693.

Deppe S, Frahm B, Hass VC, Hernández Rodríguez T, Kuchemüller KB, Möller J, Pörtner R. (2020) „Estimation of Process Model Parameters“. In: Pörtner R. (eds) *Animal Cell Biotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 2095. Humana, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-0191-4_12.

Kuchemüller KB, Pörtner R, Möller J. (2020) „Efficient Optimization of Process Strategies with Model-Assisted Design of Experiments“. In: Pörtner R. (eds) *Animal Cell Biotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 2095. Humana, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-0191-4_13.

Kuchemüller K.B., Pörtner R., Möller J. (2020) *Digital Twins and Their Role in Model-Assisted Design of Experiments*. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/10_2020_136.

Möller J, Kuchemüller KB, Steinmetz T, Koopmann KS, Pörtner R. „Model-Assisted Design of Experiments as a Concept for Knowledge-Based Bioprocess Development“. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42.5, 867-882 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02089-7>

Posterpräsentationen

Kuchemüller KB, Möller J, Pörtner R. „Model-Assisted Design and Optimization of Cell Culture Processes“. Himmelfahrtstagung Hamburg (2019).

Kuchemüller KB, Möller J, Pörtner R. „Design of Expansion Processes Using a Computer-Aided Method“. ESACT Kopenhagen (Dänemark) (2019).

Kuchemüller KB, Freiburger F, Levermann P, Möller J, Pörtner R. „Model-assisted Design and Optimization Concepts for Process Strategies“. ProcessNet Aachen (2018).

Betreute studentische Arbeiten

Romanenkov E. „Modellgestützte Expansion von humanen immortalisierten mesenchymalen Stammzellen“. Masterarbeit (2021).

Preda L. „Implication of hMSC-TERT culture heterogeneity in the differentiation process *in vitro*“. Projektarbeit (2021).

Romanenkov E. „Evaluation verschiedener Versuchspläne mittels modellgestütztem *Design of Experiments*“. Projektarbeit (2020).

Lüllau A. „Untersuchung des Wachstumsverhaltens von L929-Zellen auf verschiedenen *Microcarriern*“. Projektarbeit (2020).

Geray DJA. „Anpassung eines mathematischen Modells an das Wachstum von L929-Zellen in *Microcarrier*-Systemen“. Bachelorarbeit (2019).

Raab E. „Modellgestütztes *Design of Experiments*: Vergleich verschiedener Versuchspläne“. Projektarbeit (2019).

Geray DJA. „Charakterisierung des Wachstums von L929-Zellen in *Microcarrier*-Systemen“. Projektarbeit (2019).

Frost FK. „Charakterisierung der Zellzahlbestimmung für L929 Zellen in *Microcarrier*-Systemen“. Projektarbeit (2018).