



forschen.
vernetzen.
anwenden.

Innovationsreport 2024

Industrielle Gemeinschaftsforschung

IGF-Forschungsvorhaben 21824 N

Entwicklung einer variablen mikrofluidischen Sensorplattform zur Online-Prozessüberwachung miniaturisierter Bioreaktoren (vaMiSeP)

Laufzeit:

01.06.2021 – 31.03.2024

Beteiligte Forschungsstelle(n):

Leibniz Universität Hannover
Institut für Technische Chemie

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V. (IUTA)
Forschungsabteilung Forschungsanalytik & Miniaturisierung

Schlussbericht vom 28.08.2024

zu IGF-Vorhaben Nr. 21824 N / 01IF21824N

Thema

Entwicklung einer variablen mikrofluidischen Sensorplattform zur Online-Prozessüberwachung miniaturisierter Bioreaktoren (vaMiSeP)

Berichtszeitraum

01.06.2021 - 31.03.2024

Forschungsvereinigung

Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V

Forschungseinrichtung(en)

FE 1: Universität Hannover, Institut für Technische Chemie

FE 2: Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e.V., Duisburg



Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes	15
2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse	17
2.1 Einleitung	17
2.2 3D-Design, Modellierung und Systementwicklung	17
2.2.1 Einleitung	17
2.2.2 3D-Design der mikrofluidischen Systeme zur Sensorintegration	17
2.2.3 3D Design des mikrofluidischen Systems für die Probenahme und den Anschluss der μ LC-MS	21
2.2.4 Testung des Probenahmesystems	25
2.2.5 Strömungssimulation	28
2.3 Sensorfunktionsprüfung und Strömungssimulation	30
2.3.1 Einleitung	30
2.3.2 Simulation der Einbautiefe der Sensorplugs	30
2.3.3 Bestimmung der Verzögerung für eine Messung im mikrofluidischen Bypass-System	31
2.3.4 Bestimmung der Messzeit der eingebauten Sensoren	32
2.3.5 Einfluss der Glucosemessung auf die Messdaten der Sensorplugs	35
2.4 Systemintegration und Automatisierung der Online-Sensorplattform	38
2.4.1 Einleitung	38
2.4.2 Integration der funktionellen Einheiten auf einer Plattform	38
2.4.3 Anschluss der Sensorplattform an verschiedene Kultivierungssysteme	39
2.4.4 Online-Messungen unterschiedlicher Kultivierungen	43
2.5 Entwicklung von Methoden zur Atline-Analyse mittels μ LC-MS-Kopplung	52
2.5.1 Einleitung	52

2.5.2	Der Systemaufbau	53
2.5.3	Größenausschluss-Chromatographie	55
2.5.4	Umkehrphasen-Chromatographie	57
2.5.5	Hydrophile Interaktions-Chromatographie	60
2.5.6	Poröser graphitisierter Kohlenstoff.....	63
2.5.7	Derivatisierung und Trennung mittels Umkehrphasen-Chromatographie 67	
2.6	Matrixabtrennung und Analytanreicherung mittels Atline-Probenaufbereitung 68	
2.6.1	Einleitung	68
2.6.2	Abtrennung der Matrix auf kurzen C4-Katuschen	69
2.7	Automatisierung des instrumentellen Atline- μ LC-Systems.....	74
2.7.1	Einleitung	74
2.7.2	Orchestration	75
2.7.3	Datenfluss	77
2.7.4	Geräteanbindung	80
2.8	Kopplung und Validierung von Online-Sensorplattform und instrumentellem, mikrofluidischem Gesamtsystem	82
2.8.1	Einleitung	82
2.8.2	Geräteintegration und Datenfluss	83
2.8.3	Orchestration	83
2.8.4	Fazit.....	84
3	Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	84
3.1	Entwicklung einer mikrofluidischen Sensorplattform zur Online-Messung relevanter Prozessparameter.....	84
3.2	Kopplung der mikrofluidischen Sensorplattform mit der Atline μ LC-MS	86

4	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU, sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	88
5	Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	90
5.1	Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses	90
5.2	Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen	90
5.3	Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen	90
5.4	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts	92
6	Verwendung der Zuwendung	93
6.1	Forschungsstelle (IUTA e. V.)	93
6.1.1	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	93
6.1.2	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)	93
6.1.3	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans).....	93
6.2	Forschungsstelle (TCI)	93
6.2.1	Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)	93
6.2.2	Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)	93
6.2.3	Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans).....	93
7	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	94
8	Literaturverzeichnis	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellungen des CAD-Modells zur Integration von PreSens Sensorspots in den mikrofluidischen Bypasskanal. A: Querschnitt. B: Dimetrische Ansicht.....	19
Abbildung 2: 3D gedrucktes mikrofluidisches Bypass-System mit integrierten Sensorplugs. A: Vollständig zusammengesetztes System mit drei Sensorplugs und angeschlossenen optischen Polymerfasern. B: Explosionsansicht der Komponenten mit Sensorplug, Überwurfmutter und optischer Polymerfaser.....	20
Abbildung 3: CAD-Darstellung des mikrofluidischen Systems zur Integration der Dialysemembran für die Messung der Glucose- und Lactatkonzentration mit dem TRACE C2 Messgerät. A: Schnittansicht. B: Dimetrische Ansicht.....	21
Abbildung 4: 3D-gedrucktes mikrofluidisches Bypass-System mit integrierter Dialysemembran zur Messung der Glucose- und Lactatkonzentration. A: Zusammengesetztes System. B: einzelne Komponenten des Systems. C: Foto des Aufbaus mit Klammer und Aluminiumblock zum Verbessern der Dichtigkeit.....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Probenahmesystems mit integrierter Filtermembran.	22
Abbildung 6: Ablauf der Probenahme mit dem entwickelten Probenahmesystem mit integrierter Filtermembran. Die Pfeile deuten die Flussrichtung der gezogenen Probenflüssigkeit an. A: Pumpe S1 zieht die Probe aus dem Bypass. B: Pumpe S1 drückt die Probe in Richtung LC-MS, um in den Grundzustand zurückzukehren. C+D: Pumpe S2 drückt die Probe mit Luft zur LC-MS. E: Pumpe S2 drückt den verbleibenden Rest der Probe unter Ventil 2 zurück in den Bypass. F: Pumpe S2 zieht Luft auf, um in den Grundzustand zurückzukehren.	23
Abbildung 7: CAD-Darstellung des Probenahmesystems mit integrierter Filtermembran. A: Schnittansicht. B: Isometrische Ansicht.....	24

Abbildung 8: Foto des 3D-gedruckten Probenahmesystems. A: Seitenansicht von Ventil 1 und dem Filtrationssystem mit integrierter Filtrationsmembran und Ventil 2. B: Aufsicht der beiden Systemteile.	25
Abbildung 9: Gewicht der Probe bei wiederholter Probennahme mit dem entwickelten Probenahmesystem mit CHO-Zellsuspension mit unterschiedlicher Zellkonzentration zwischen 5 und 20 Millionen Zellen pro Milliliter.	26
Abbildung 10: Probengewicht und optische Dichte der gezogenen Probe nach mehreren Autoklavierzyklen des Probenahmesystems.	27
Abbildung 11: Glutaminkonzentration in den entnommenen Proben zum Nachweis des Einflusses eines potenziellen Carry-Over.	28
Abbildung 12: Ergebnisse der CFD-Simulation der Designkandidaten des Kombinationssystems, des PreSens-Teilsystems und des Glucose-Teilsystems. A: Fließgeschwindigkeit auf der mittleren horizontalen Schnittebene mit Detailansicht des Verbindungselements. B: Wandscherstress des Verbindungselements.	29
Abbildung 13: Simulationsergebnisse von CFD-Simulationen zum Vergleich der Einbautiefe von 0,01 mm, 0,2 mm und 0,75 mm der Sensorspots. A: Wandscherstress an der Kanaloberseite. B: Fließgeschwindigkeit in der mittleren vertikalen Schnittebene des Kanals.	31
Abbildung 14: Verlauf der Messung des pH-Wertes zur Bestimmung der Messzeit des pH Sensorplugs direkt im Messpuffer bzw. eingebaut im mikrofluidischen Bypass-System. Rote Linien markieren den Wechsel des Messpuffers.	33
Abbildung 15: Zeitliche Veränderung der Glucosekonzentration zur Bestimmung der Messzeit des Glucosemesssystems.	35
Abbildung 16: Seitenansicht der CAD-Darstellung mit Integration der Sensorspots und der Dialysemembran zur Glucosemessung.	36
Abbildung 17: Gemessener pH-Wert im ersten Kombinationsdesign.	36
Abbildung 18: CAD-Design des zweiten Kombinationssystems zur Messung von pH, O ₂ , CO ₂ und Glucose + Lactat. A: Schnittansicht. B: Isometrische Ansicht.	37

Abbildung 19: Gemessener pH-Wert im zweiten Kombinationsdesign zur Integration von Sensorspots und Dialysemembran bei gleichzeitiger Glucosemessung.....	37
Abbildung 20: CAD-Darstellung der kompletten mikrofluidischen Sensorplattform. A: Seitenansicht mit Beschriftung der einzelnen Teilsysteme im Gesamtsystem. B: Isometrische Ansicht.	39
Abbildung 21: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen 250 mL Schüttelkolben. A: Detailansicht der Sensorplattform am Schüttelkolben. B: Versuchsaufbau im Inkubator mit Schlauchpumpe und Sensorplattform auf oberer Inkubatorebene. C: Detailansicht des Anschlusses der PTFE-Schläuche an den Schüttelkolben mittels Silikonschläuchen am Deckel.	40
Abbildung 22: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen 2 L-Rührkesselreaktor.	41
Abbildung 23: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen miniaturisierten Bioreaktor "ambr250".	42
Abbildung 24: Aufgenommene Daten einer CHO-Batch-Kultivierung über 72 h. A: Zellkonzentration und Viabilität der Kultur mit angeschlossenem Sensorplattformsystem (P1) und Vergleichskultur ohne System (BP). B: Online-Daten des TRACE Messgeräts für die Bestimmung von Glucose und Lactat. C: Online-Daten der PreSens Sensoren zu pH, dO ₂ und dCO ₂	43
Abbildung 25: Aufgenommene Daten einer weiteren CHO-Batch-Kultivierung über 48 h. A: Zellkonzentration und Viabilität der Kultur mit angeschlossenem Sensorplattformsystem (P1) und Vergleichskultur ohne System (BP). B: Online-Daten des TRACE Messgeräts zu Glucose und Lactat. C: Online-Daten der PreSens Sensoren zu pH, dO ₂ und dCO ₂	45
Abbildung 26: Verlauf der viablen Zellkonzentration bei unterschiedlichen Flussraten.	46
Abbildung 27: Daten der Kultivierung von <i>E. coli</i> . A: Verlauf der optischen Dichte (OD ₆₀₀) bei der Kultivierung im Schüttelkolben ohne Sensorplattform und Pumpe (BP), mit Pumpe (1 mL min ⁻¹ , P1) und mit Pumpe und Sensorplattform (1 mL min ⁻¹ , P2). B: Verlauf der Glucosekonzentration gemessen mit dem TRACE-Gerät (online) und nach	

manueller Probenahme (offline). C: Verlauf der Sauerstoffsättigung und des pH-Wertes gemessen mit dem PreSens System (online) und einem pH-Meter bei manueller Probenahme (offline).	47
Abbildung 28: Messwerte der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> . A: Verlauf der optischen Dichte (OD ₆₀₀) bei der Kultivierung im Schüttelkolben ohne Sensorplattform und Pumpe (BP), mit Pumpe (1 mL min ⁻¹ , P1) und mit Pumpe und Sensorplattform (1 mL min ⁻¹ , P2). B: Verlauf der Glucosekonzentration gemessen mit dem TRACE-Gerät (Online) und nach manueller Probenahme (Offline). C: Verlauf der Sauerstoffsättigung und des pH-Wertes gemessen mit dem PreSens System (Online) und einem pH-Meter nach manueller Probenahme (Offline).	49
Abbildung 29: Gewicht der entnommenen Probe einer CHO-Kultivierung über die Kultivierungszeit von 96 h. Bei jeder Probenahme wurden drei Proben entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der drei Proben.....	50
Abbildung 30: Gewicht der entnommenen Probe einer <i>E. coli</i> Kultivierung über die Kultivierungszeit von 10 Stunden.	51
Abbildung 31: Skizze des Messsystems zur Implementierung der komplexen Säulenschaltung für die parallele Analyse der AAs und mAbs, bestehend aus einer Sciex NanoLC 425, einem Knauer DAD 2.1 L und einem Sciex QTrap 3200 Massenspektrometer.	53
Abbildung 32: Säulenschaltkonzept zur parallelen Produkt- und Eduktkontrolle. Für weitere Informationen: siehe Text.....	54
Abbildung 33: SEC-Trennung der chromophoren Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tryptophan (Trp) sowie des Antikörpers Trastuzumab (TTZmAb). A) Einzelinjektionen der Analyten. B) Injektion des Substanzgemisches.	56
Abbildung 34: Versuchsreihe zur Abtrennung der Matrix vom mAb. Chromatogrammdarstellung von jeweils drei übereinander gelegten Wiederholungsmessungen (1, 2, 3) bei einer Plateauzeit von 1,5 min, 3,0 min und 6,0 min vor Beginn des Lösungsmittelgradienten.....	58

Abbildung 35: Kalibriergerade zur Erfassung der Bestimmungsgrenze des Antikörpers. Orange dargestellt sind niedrige Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs.

..... 59

Abbildung 36: Chromatogramm von TZZmAb bei einer Retentionszeit von 2,1 min auf einer YMC-Triart Bio C4-Säule (3 μm , 0,3 x 100 mm); Mobile-Phase: A: H_2O + 0,1% FA; B: ACN + 0,1% FA; Säulentemperatur: 60 $^\circ\text{C}$; Injektionsvolumen: 500 nL; Flussrate: 20 $\mu\text{L min}^{-1}$; Konzentration des mAb 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in H_2O , Detektor: DAD bei 214 nm..... 60

Abbildung 37: Chromatogramm von Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe), Prolin (Pro), Serin (Ser), Tryptophan (Trp) und Valin (Val). Die Trennung erfolgte auf einer YMC-Triart Diol-HILIC (0,3 * 100 mm), mit einem Injektionsvolumen von 500 nL. Alle AAs hatten eine Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und wurden mit einer Flussrate von 4 $\mu\text{L min}^{-1}$ bei Raumtemperatur eluiert. 61

Abbildung 38: Messungen aller 17 AAs auf der YMC-Triart Diol-HILIC (0,3 * 100 mm) mit einem Injektionsvolumen von 500 nL. Erhöhung der Flussrate auf 6 $\mu\text{L min}^{-1}$. Alle AAs hatten eine Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und wurden bei Raumtemperatur eluiert.

..... 62

Abbildung 39: Chromatogramme zur Trennung der AA auf der Hypercarb PGC-Säule. Probeninjektion: 17 AAs mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Injektionsvolumen: 1,1 μL . Bei einer Flussrate von 6 $\mu\text{L min}^{-1}$. A) Startpunkt für den Vergleich: Messung bei RT mit 1% ACN. B) Erhöhung der Temperatur auf 60 $^\circ\text{C}$ und Ausschluss des organischen Teils des Lösungsmittels (0% ACN). C) Senkung der Temperatur auf RT bei 0% ACN. D) Das Lösungsmittel B wurde von reinem ACN auf ACN/ H_2O (50/50) geändert. E) Abkühlung der Säule mit Eis auf etwa 4 $^\circ\text{C}$ und Verwendung des Lösungsmittels ACN/ H_2O (50/50). F) Temperatur von 4 $^\circ\text{C}$ und Wechsel des organischen Lösungsmittels B zu ACN. 66

Abbildung 40: Chromatogramm der 13 derivatisierten AAs, die mit einem 1260 Infinity II DAD nachgewiesen wurden. Der Analysenmix bestand aus Ala, Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr und Val. Säule: YMC-Triart C18 (0,3 * 50 mm, 3 μm); Injektionsvolumen: 442 L; Säulentemperatur 30 $^\circ\text{C}$ und Flussrate 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. 13 Analyt- und ein Derivatisierungspeak sind sichtbar. 67

Abbildung 41: Trappingversuche des mAb auf der Kartusche Daisogel C4-Bio (0,3 x 10 mm). A) $\beta = 1,0 \text{ mg/mL}$. Injektionsvolumen: 1.000 nL. B) $\beta = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 1.000 nL. C) $\beta = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 500 nL. D) $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 100 nL. UV-Detektion bei 210 nm. Blau: Chromatogrammspur, pink: Verlauf des Gradienten.	70
Abbildung 42: Chromatogramme der Trappinversuche auf einer Daisogel C4-Bio (0,3 x 10 mm) Kartusche. Es ist eine deutliche Erhöhung des Grundrauschen zu erkennen, zusätzlich war keine reproduzierbare Messung möglich.....	71
Abbildung 43: Weißer Rückstand am Kartuschenausgang.....	72
Abbildung 44: Chromatogramm des „Trappings“ und Abtrennungsversuches auf der YMC-Triart Bio C4 (0,3 * 5 mm) Vorsäulenkartusche.	73
Abbildung 45: Schematische Darstellung der Orchestration.....	76
Abbildung 46: Version 0.0.4 der Workflow-Textdatei "VaMiSeP.yaml", die zur ersten Erprobung der Workflow-Umgebung genutzt wurde. Der "flow" (roter Pfeil) beschreibt dabei die einzelnen Arbeitsschritte, die iterativ durchgeführt werden. Die "steps" (blauer Pfeil) beinhalteten die konkreten Befehle für die Geräte.	77
Abbildung 47: Screenshot einer AnIML-Datei in der Programmierumgebung Visual Studio Code. Die Daten sowie deren Strukturierung sind ohne Dekodierung durch den Menschen lesbar.	79
Abbildung 48: Screenshot der Laboperator-Middleware, welche lokal auf den Messsystemen installiert wurde, um die Kommunikation zu ermöglichen und die Konvertierung zu starten.....	79
Abbildung 49: Screenshot eines Laboperator-Workflowschrittes. Dargestellt ist die Visualisierung der CHRONOS-Integration zur manuellen Erstellung von Batchlisten. Diese Funktionalität wird von der Workflow-Engine ohne eine grafische Darstellung verwendet, um die Chronos sowie Analyst Methoden auszuwählen und zu starten.	82
Abbildung 50: Screenshot der Visualisierung des PreSens O2-Sensors im OPC-UA-Viewer UA-Expert.	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Messung der t_{90} -Werte der Sensorplugs bei der Messung direkt im Medium und eingebaut ins Bypass-System und die jeweilige Herstellerangabe.	34
Tabelle 2: Elutionsreihenfolge der 17 untersuchten Aminosäuren.....	62
Tabelle 3: Liste der Peakflächen, Retentionszeiten, Peakhöhen und FWHMs von TTZmab mit verschiedenen Vorbehandlungen. Ohne Vorbehandlung auf 55 °C erhitzt und im Derivatisierungsmedium gemischt.	68
Tabelle 4: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.	91

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäuren (Amino Acid)
Ala	Alanin
CAD	<i>Computer Aided Design</i>
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i>
CHO	Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (<i>Chinese Hamster Ovary Cell</i>)
DAD	Dioden Array Detektor
dCO ₂	Gelöster Kohlenstoffdioxid (<i>Dissolved CO₂</i>)
dO ₂	Gelöster Sauerstoff (<i>Dissolved O₂</i>)
ELDS	Lichtstreuendetektor (<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Ile	Isoleucin
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
Leu	Leucin
mAb	Monoklonaler Antikörper
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PES	Polyethersulfon
PGC	Poröser graphitischer Kohlenstoff
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin

PTFE	Polytetrafluorethylen
RP	Umkehrphasen Chromatographie (Reverse Phase)
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>Size Exclusion Chromatographie</i>)
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
TTZmAb	Trastuzumab
Val	Valin

1 Einleitung und Zielsetzung des Projektes

Die Entwicklung neuer Medikamente verursacht bereits bei der Erforschung des Wirkprinzips einer Substanz mehr 25 Mio. Dollar in einem Zeitrahmen von rd. 40 Monaten. Darauf folgen jahrelange klinische Phasen mit mehreren Wirkstoffkandidaten [1]. Um diesen Zeit- und Kostendruck zu verringern, werden in der biopharmazeutischen Industrie vermehrt parallelisierbare miniaturisierte Systeme für die Stammevaluierung und Prozessentwicklung eingesetzt. Dies führt zur Einsparung teurer Kulturmedien und Substrate und erhöht gleichzeitig den Durchsatz, wodurch die Entwicklungszeit verkürzt wird.

Eine Herausforderung beim Einsatz miniaturisierter Kultivierungssysteme bleibt die Analyse prozessspezifischer Parameter. Herkömmliche Messsonden, welche in klassischen Bioreaktoren zum Einsatz kommen, lassen sich allein aufgrund ihrer physischen Größe oft nicht in die miniaturisierten Systeme einbauen. Gleichzeitig sind Online-Sensoren für das Prozessverständnis und die Prozessoptimierung unerlässlich. Die Anzahl der analysierbaren Parameter von vorhandenen Online-Sensoren ist jedoch begrenzt, sodass eine Anbindung von komplexeren Analysegeräten wie beispielsweise Flüssigkeitschromatographie (LC)-Systemen mit massenspektrometrischen (MS) Detektoren notwendig ist, um alle prozessrelevanten Parameter zu erfassen. Durch eine automatisierte Probenahme kann der manuelle Aufwand reduziert und eine kontinuierliche Atline-Analyse über die gesamte Kultivierungsdauer sichergestellt werden.

Die Steuerung der Online- und Atline-Analysesysteme sowie die Menge der anfallenden Prozessdaten erfordert heutzutage eine digitale Einbindung aller Geräte in eine zentrale Laborsteuerungssoftware. Diese erlaubt eine flexible und einfache Prozesssteuerung sowie einen sicheren Datentransfer zur Auswertung der erhaltenen Kultivierungsdaten. Demgegenüber stehen isolierte und meist proprietäre Software-Lösungen der Geräte- und Softwarehersteller.

Vor diesem Hintergrund haben die Forschungseinrichtungen Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. (IUTA) und das Institut für technische Chemie der Leibniz Universität Hannover eine variablen miniaturisierte Online-Sensorplattform entwickelt, welche mit einer LC-MS gekoppelt werden kann, um eine Analyse

prozessspezifischer Parameter und Bioprozessen in miniaturisierten Bioreaktoren zu ermöglichen.

2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

2.1 Einleitung

Im Rahmen des Projektes sollte eine variable Online-Sensorplattform zur parallelen Steuerung bzw. Überwachung miniaturisierter Bioreaktoren entwickelt und eine Atline miniaturisierte Flüssigchromatographie (μ LC) mit massenspektrometrischer Detektionseinheit (MS) integriert werden.

Die Sensorplattform sollte mittels Computer-Aided-Design (CAD) entworfen und mit hochauflösendem 3D-Druck hergestellt werden. Aufgrund der geringen Kulturvolumina von miniaturisierten Bioreaktoren wurde ein mikrofluidisches System als Sensorplattform genutzt, um das Totvolumen zu minimieren und geringere Flussraten nutzen zu können.

Nachfolgend werden die Ergebnisse strukturiert nach den Arbeitspaketen des Projektantrags vorgestellt.

2.2 3D-Design, Modellierung und Systementwicklung

2.2.1 Einleitung

Im Rahmen der Projektarbeiten wurden zunächst geeignete Sensor-Systeme ausgewählt und mikrofluidische Teilsysteme zur Sensorintegration entwickelt. In Simulationen wurden unterschiedliche Kanalgrößen getestet. Außerdem wurde ein Probenahmesystem entworfen, welches den Transfer einer Probe zur Atline- μ LC-MS ermöglicht.

2.2.2 3D-Design der mikrofluidischen Systeme zur Sensorintegration

Für die Integration der Online-Sensorik mit miniaturisierten Kultivierungssystemen wurde ein mikrofluidisches Bypass-System entworfen. Dieses erlaubt die Integration der nötigen Sensorik und den Einsatz unterschiedlicher Kultivierungssysteme. Durch den Bypass wird das Kulturmedium stets zurückgeführt. Das Totvolumen des Bypasses ist im Vergleich zum Reaktorvolumen möglichst gering zu halten, da die Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration im Bypass herabgesetzt wird. Um das Totvolumen des Bypasses zu verringern, wurden PTFE-Schläuche und Pumpschläuche mit geringeren Durchmessern gewählt. Der Anschluss des 3D-

gedruckten mikrofluidischen Systems erfolgte mittels flanschlosen Schraubanschlüssen, welche in der HPLC (*high performance liquid chromatography*) zum Einsatz kommen. Die nötigen Schraubgewinde wurden direkt im 3D-Design integriert und beim 3D-Druck der Systeme mitgefertigt.

2.2.2.1 Testsystem zur Messung von pH-Wert, dO₂- und dCO₂-Konzentration

Zuerst wurde eine Auswahl der nötigen Parameter und Analysegeräte zur Integration in die Sensorplattform getroffen. Für die Kultivierung von Mikroorganismen (z. B. *Escherichia coli*) sind der pH-Wert, die Sauerstoffsättigung und Säugerzellen (z. B. Chinesische Hamsterovariencellen (CHO)), sowie zusätzlich die gelöste CO₂-Konzentration wichtige Parameter zur Prozessüberwachung. Klassische pH- und Sauerstoffsonden für Bioreaktoren sind aufgrund ihrer Größe nicht einsetzbar. Daher wurden optische Sensoren von der Firma PreSens Precision Sensing GmbH für die Messung dieser Parameter vorgesehen.

Für den Einsatz in Zellkulturen ist die Sterilität der verwendeten Sensorik zu beachten. Für mikrofluidische Systeme bietet die Firma PreSens integrierbare Sensorplugs an, die bereits steril geliefert werden. Durch die Verwendung autoklavierbarer 3D-Druckmaterialien kann die Sterilität der mikrofluidischen Systeme gewährleistet werden.

Im ersten Schritt wurde das mikrofluidische System in verschiedenen Teilsystemen mittels der CAD-Software Solidworks (Dassault Systemes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich) geplant. Die Integration der Sensorplugs zur Messung von pH, dO₂ und dCO₂ erfolgt durch einen passgenauen Einsatz in einen mikrofluidischen Kanal. Hierfür werden 3D-gedruckte Überwurfmuttern verwendet, welche die Sensorplugs in die vorgesehen Öffnungen drücken. Hierdurch werden die Sensorplugs abdichtend eingesetzt und die Sensoroberflächen während des Einsetzens nicht berührt, wodurch Schäden vermieden werden. Ein Querschnitt des entwickelten CAD-Modells ist in Abbildung 1 dargestellt.

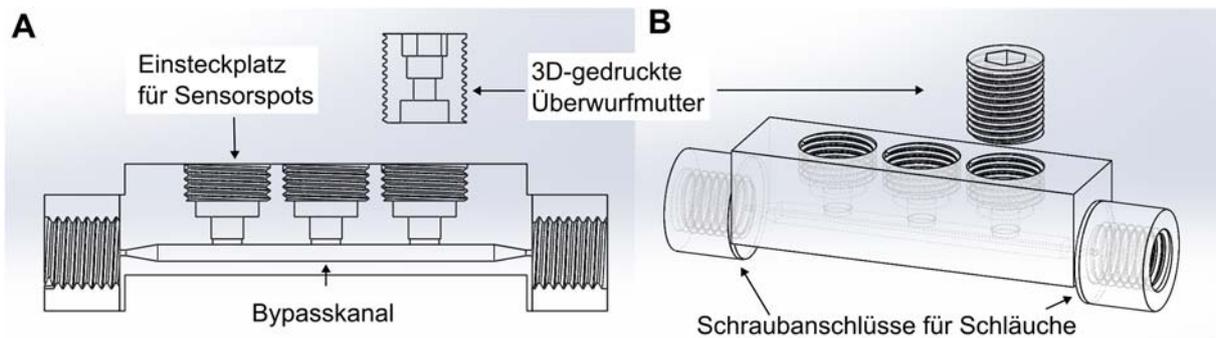


Abbildung 1: Darstellungen des CAD-Modells zur Integration von PreSens Sensorspots in den mikrofluidischen Bypasskanal. A: Querschnitt. B: Dimetrische Ansicht.

Das System wurde mittels MultiJet 3D-Druck mit dem MJP 2500 Plus (3D Systems, Rock Hill, USA) mit dem Druckmaterial HT-90 gedruckt. Nach dem Druck wurde das Stützmaterial nach Herstelleranweisung entfernt. Für den Einsatz bei einer Kultivierung wird das gedruckte System in einem luftdicht verschlossenen Beutel autoklaviert und die Sensorplugs erst in einer Sterilwerkbank unter aseptischen Bedingungen eingesetzt. Die eingebauten Sensorplugs werden mittels optischen Polymerfasern mit den jeweiligen Sensoren verbunden. Die Sensoren sind über USB an einen PC angeschlossen und die Messwerte werden über die mitgelieferte Software ausgelesen und aufgezeichnet. In Abbildung 2 ist das 3D-gedruckte System dargestellt.

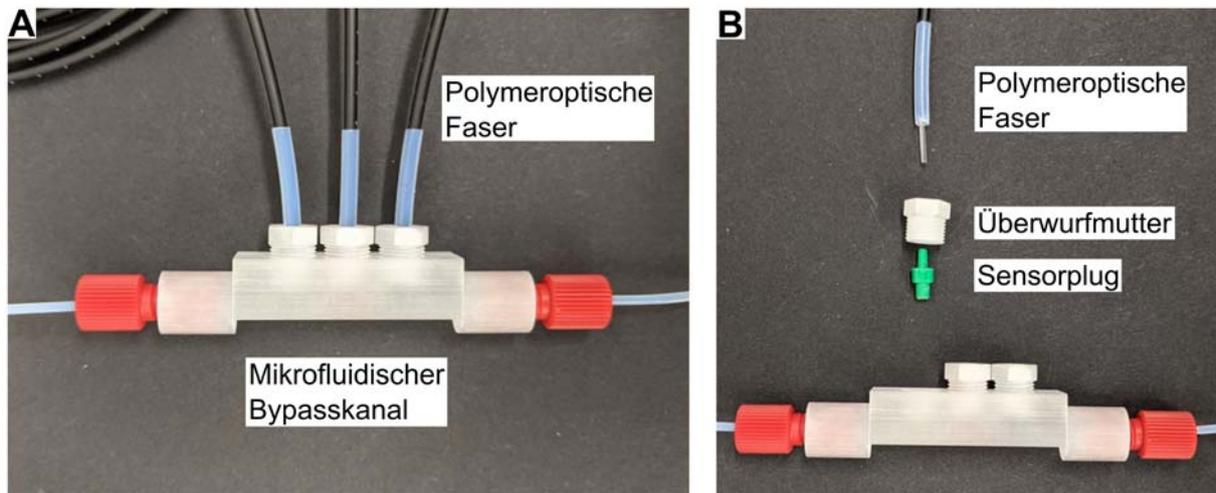


Abbildung 2: 3D gedrucktes mikrofluidisches Bypass-System mit integrierten Sensorplugs. A: Vollständig zusammengesetztes System mit drei Sensorplugs und angeschlossenen optischen Polymerfasern. B: Explosionsansicht der Komponenten mit Sensorplug, Überwurfmutter und optischer Polymerfaser.

2.2.2.2 Testsystem zur Messung der Glucose- und Lactatkonzentration

Zur Messung der Glucosekonzentration wurde das TRACE C2 Messgerät von 908 Devices Inc. (Boston, USA) ausgewählt. Bei der Kultivierung von Mikroorganismen, aber auch bei der Kultivierung von CHO-Zellen, ist Glucose eine wichtige C-Quelle im Medium. Zusätzlich wird während der Kultivierung von den Zellen Lactat produziert, welches ebenfalls ein wichtiges Stoffwechselprodukt darstellt. Mit dem TRACE C2 Messgerät kann mit Biosensoren die Glucose- als auch die Lactatkonzentration Online bestimmt werden.

Um das Bypass-Volumen weiterhin minimal zu halten, wurde eine Dialysemembran ausgewählt. Dadurch können die Analyten aus dem Kulturmedium des Bypasses in den Messpuffer des Messgerätes diffundieren und werden anschließend im Messpuffer nachgewiesen. Wie schon beim Teilsystem zur Messung von pH, dO_2 und dCO_2 , wurden sowohl für den Bypass-Strom als auch für den Anschluss des Messpuffers flanschlose Schraubanschlüsse verwendet.

Im 3D-Design wurde die vom Hersteller angebotene Dialysemembran für den Einsatz im mikrofluidischen System integriert. In Abbildung 3 ist das mikrofluidische System zur Integration der Dialysemembran dargestellt.

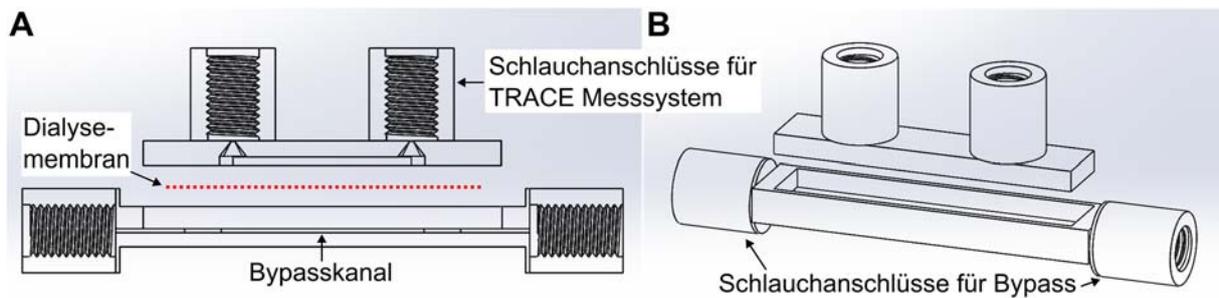


Abbildung 3: CAD-Darstellung des mikrofluidischen Systems zur Integration der Dialysemembran für die Messung der Glucose- und Lactatkonzentration mit dem TRACE C2 Messgerät. A: Schnittansicht. B: Dimetrische Ansicht.

Das System wurde ebenfalls mittels MultiJet 3D-Druck hergestellt und das Stützmaterial nach Herstelleranweisung entfernt. In den unteren Teil des mikrofluidischen Systems wurde daraufhin die Dialysemembran eingesetzt und anschließend der obere Systemteil aufgesetzt. Um eine wasserdichte Verbindung sicherzustellen, wurde biokompatibler Zwei-Komponenten Klebstoff Loctite EA M-31CL (Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland) an dem Übergang beider Systemteile verstrichen. Zusätzlich wurde eine Klammer mit einem Aluminiumblock eingesetzt, um Druck auf die Dichtung an der Dialysemembran auszuüben. In Abbildung 4 ist das 3D-gedruckte System dargestellt.

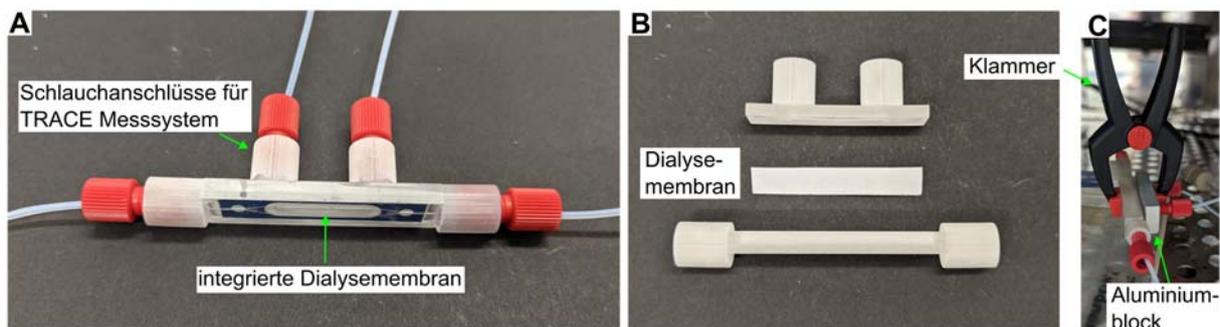


Abbildung 4: 3D-gedrucktes mikrofluidisches Bypass-System mit integrierter Dialysemembran zur Messung der Glucose- und Lactatkonzentration. A: Zusammengesetztes System. B: einzelne Komponenten des Systems. C: Foto des Aufbaus mit Klammer und Aluminiumblock zum Verbessern der Dichtigkeit.

2.2.3 3D Design des mikrofluidischen Systems für die Probenahme und den Anschluss der μ LC-MS

Zur Analyse von weiteren Medienbestandteilen, wie z. B. Aminosäuren und produzierten Proteinen (z. B. Antikörper) ist der Anschluss eines Flüssigkeitschromatographiesystems mit Massenspektrometrie vorgesehen. Hierfür

muss eine Probe aus dem Reaktor entnommen werden und zum Atline-Chromatographiesystem transferiert werden. Für die Chromatographie ist es zusätzlich nötig, die Zellen aus der Probe zu entfernen. Daher wurde ein System entworfen, welches automatisiert aus dem Bypass über eine 0,2 µm Filtermembran eine Probe zieht und diese aus einem PTFE-Schlauch abgeben kann. Dieser PTFE-Schlauch sollte mit dem Autosampler (x,y,z-Roboter) des µLC-systems verbunden werden, welcher letztendlich die Probe in das µLC-System injiziert. In Abbildung 5 ist ein Schema des Probenahmesystems dargestellt.

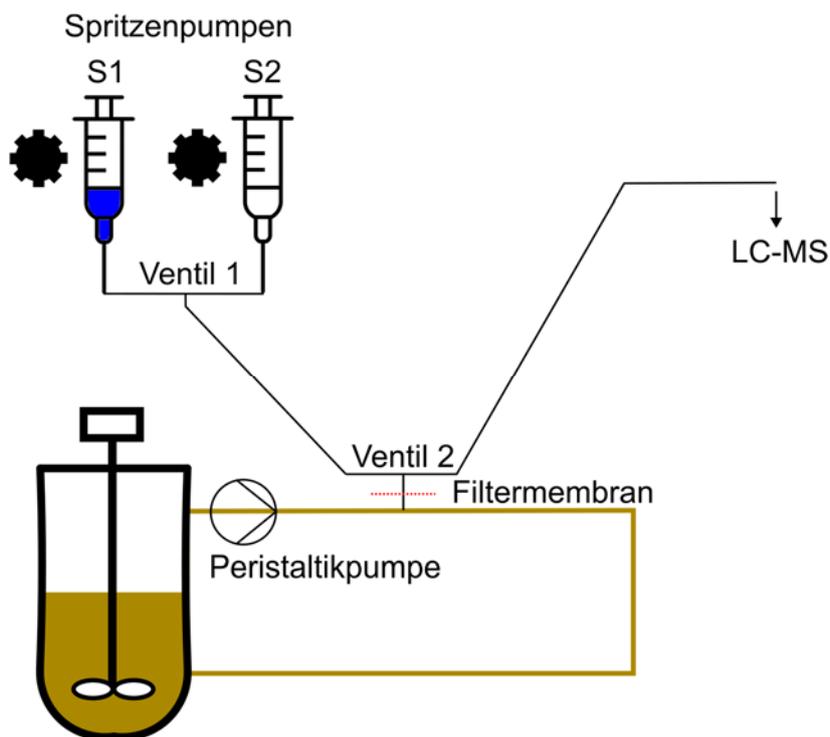


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Probenahmesystems mit integrierter Filtermembran.

Das Grundprinzip der Probenahmeeinheit bildet eine Cross-Flow-Filtration mit dem Bypass-Strom tangential zur Filtrationsmembran. Zusätzlich werden zwei Ventile und zwei Spritzenpumpen eingesetzt. In Abbildung 6 ist der Ablauf einer Probenahme schematisch dargestellt.

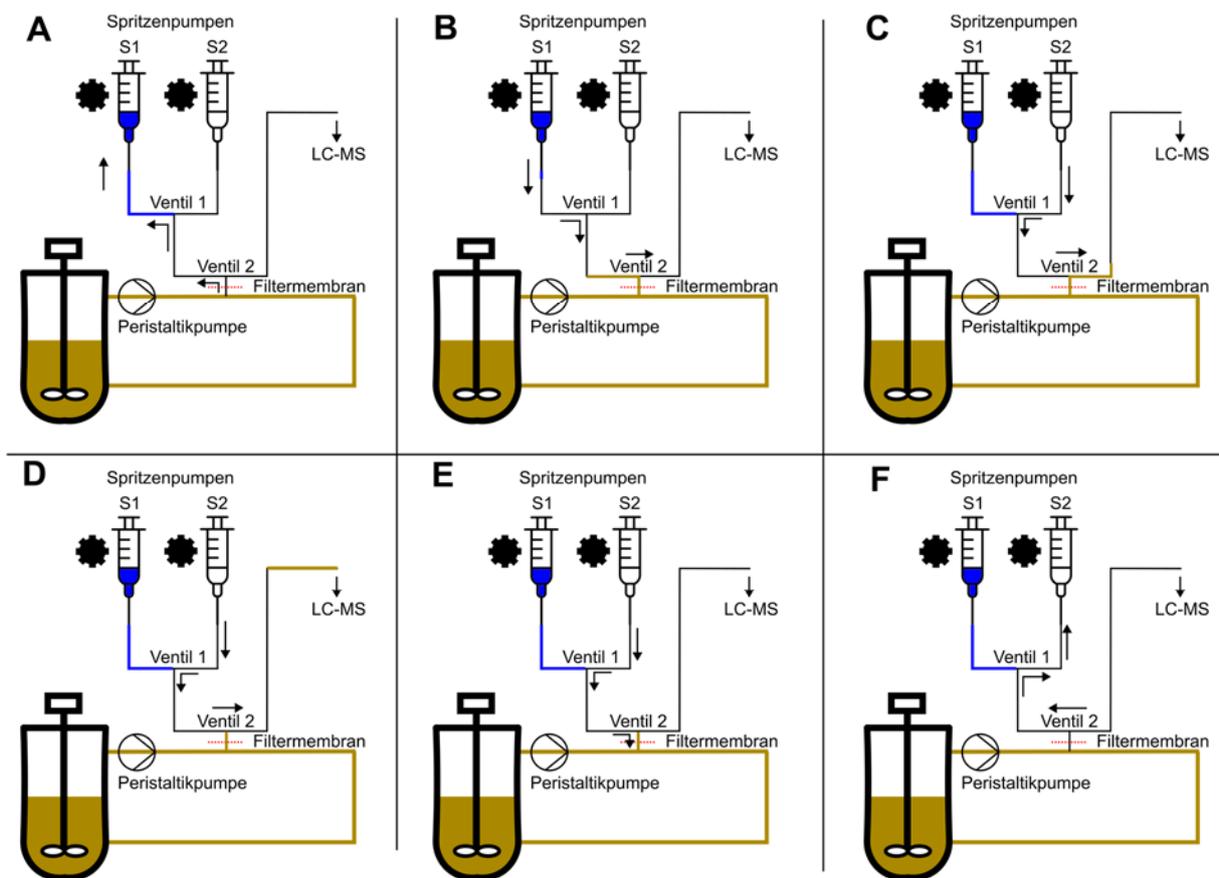


Abbildung 6: Ablauf der Probenahme mit dem entwickelten Probenahmesystem mit integrierter Filtermembran. Die Pfeile deuten die Flussrichtung der gezogenen Probenflüssigkeit an. A: Pumpe S1 zieht die Probe aus dem Bypass. B: Pumpe S1 drückt die Probe in Richtung LC-MS, um in den Grundzustand zurückzukehren. C+D: Pumpe S2 drückt die Probe mit Luft zur LC-MS. E: Pumpe S2 drückt den verbleibenden Rest der Probe unter Ventil 2 zurück in den Bypass. F: Pumpe S2 zieht Luft auf, um in den Grundzustand zurückzukehren.

Um eine Probe aus dem Bypass-Strom zu ziehen, wird das Ventil 2 umgeschaltet, um die Verbindung vom Filter zu den Spritzenpumpen zu öffnen. Zusätzlich wird Ventil 1 so gestellt, dass Pumpe S1 eine Probe ziehen kann. In Pumpe S1 sowie im Schlauch bis zum Ventil 1 ist Wasser, um die Expansion zu minimieren und somit das Volumen der gezogenen Probe möglichst konstant zu halten. Pumpe S1 zieht das Probenvolumen auf (siehe Abbildung 6 A). Die Probenflüssigkeit gelangt dabei in den Schlauch zwischen Ventil 1 und Ventil 2. Sobald die Probe gezogen wurde, wird Ventil 2 umgeschaltet, um die Probe in Richtung der Probenabgabe zur LC-MS herzustellen. Pumpe 1 drückt dann die Probe anfänglich, bis die Pumpe wieder im Ursprungszustand angekommen ist (siehe Abbildung 6 B). Danach wird Ventil 1 umgeschaltet und über Pumpe 2 mit Luft die Probe aus dem Ausgabeschlauch bzw. zur LC-MS herausgedrückt (siehe Abbildung 6 C+D). Da zwischen dem Ventil 2 und der Filtermembran ein Rest der Probe verbleibt, wird dieser durch Schaltung von Ventil

2 mit Pumpe S1 in den Bypass zurückgepumpt (siehe Abbildung 6 E). Anschließend zieht Pumpe 2 wieder Luft auf, um in den Ausgangszustand zu kommen und es kann eine neue Probe gezogen werden (siehe Abbildung 6 F).

Ähnlich zum Testsystem für die Messung von Glucose und Lactat wurde ein Design erstellt, bei dem die Filtermembran zwischen zwei 3D-gedruckten Teilen platziert wird. Zur Abdichtung der Membran wurden PTFE-Flachdichtungen auf beiden Membranseiten vorgesehen. In Abbildung 7 ist das 3D Design des Testsystems zur Probenahme dargestellt.

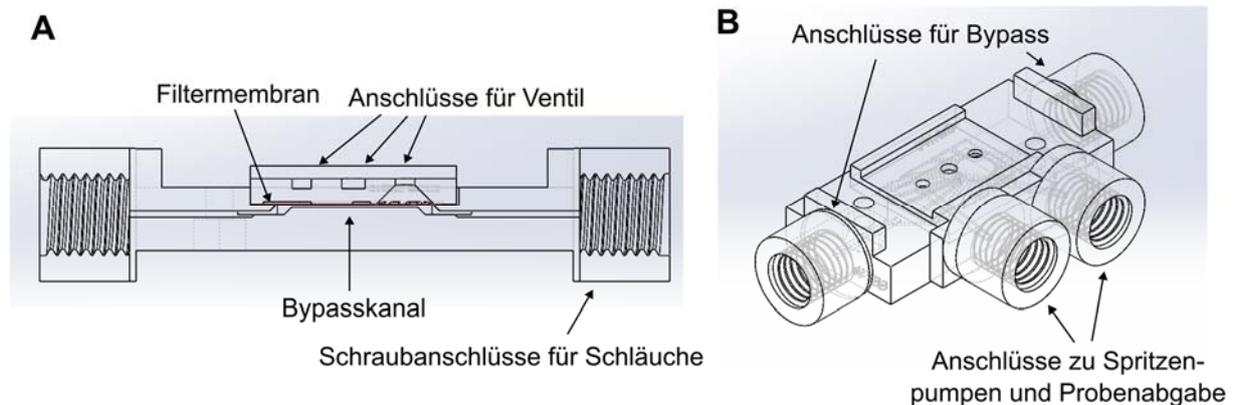


Abbildung 7: CAD-Darstellung des Probenahmesystems mit integrierter Filtermembran. A: Schnittansicht. B: Isometrische Ansicht.

Das Testsystem wurde mittels MultiJet-Printing hergestellt und das Stützmaterial nach Herstelleranweisung entfernt. Die PTFE-Flachdichtungen wurden mit 3D gedruckten Schneidehilfen aus 0,1 mm starkem PTFE-Dichtband (W. Kirchhoff GmbH, Wallenhorst, Deutschland) manuell zugeschnitten. Die PES-Filtermembran (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde ebenfalls passgenau zugeschnitten. In den unteren Teil des Testsystems wurde zunächst eine Flachdichtung, dann die Filtermembran und die zweite Flachdichtung eingesetzt. Daraufhin wurde der obere 3D-gedruckte Teil aufgesetzt und mit einer Klammer fixiert. Um eine wasserdichte Verbindung der beiden gedruckten Teile herzustellen, wurde ebenfalls biokompatibler Zwei-Komponenten Klebstoff Loctite EA M-31CL an dem Übergang beider Systemteile verstrichen. Um den Flüssigkeitsstrom zu lenken, wurden Magnetventile eingesetzt. Hierfür wurden die Magnetventile mit den mitgelieferten Schrauben auf das Probenahmesystem aufgesetzt, welches Aussparungen für die passenden Sechskantmutter aufweist. Das zusammengesetzte System zur Probenahme ist in Abbildung 8 dargestellt.

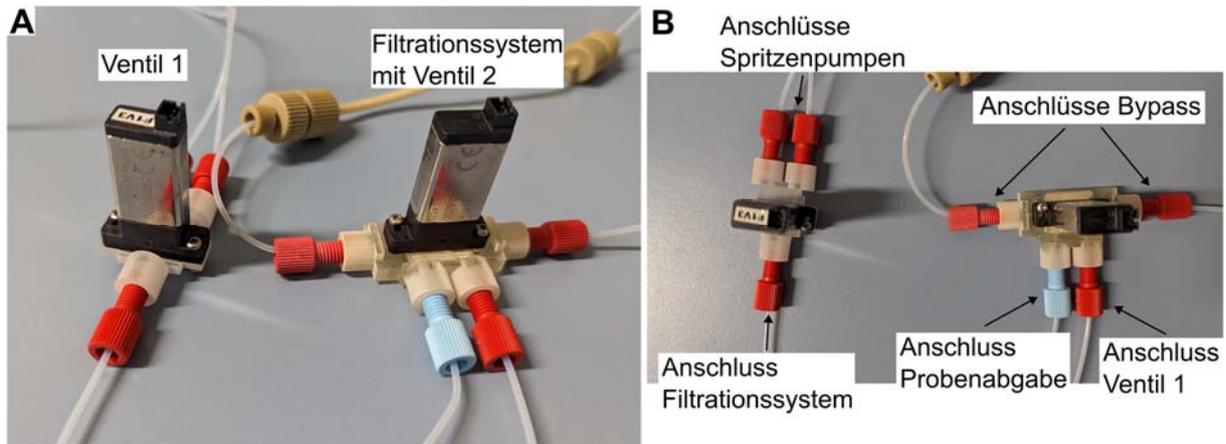


Abbildung 8: Foto des 3D-gedruckten Probenahmesystems. A: Seitenansicht von Ventil 1 und dem Filtrationssystem mit integrierter Filtrationsmembran und Ventil 2. B: Aufsicht der beiden Systemteile.

2.2.4 Testung des Probenahmesystems

Das Filtrationssystem wurde möglichst praxisnah auf eine mögliche Verblockung sowie Stabilität und Sterilisierbarkeit getestet. Hierfür wurden in mehreren Untersuchungen Filtrationstests mit Hefen und CHO-Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde das System mehrfach autoklaviert und anschließend die Integrität der Filtrationsmembran und der Dichtungen mit Zellfiltrationstests untersucht.

Um das Probenahmesystem auf mögliche Verblockungen bei wiederholter Probenahme zu testen, wurden bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen jeweils zehn Proben nacheinander auf die gleiche Weise gezogen und das Probengewicht bestimmt. Alle Tests wurden dabei mit demselben System durchgeführt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

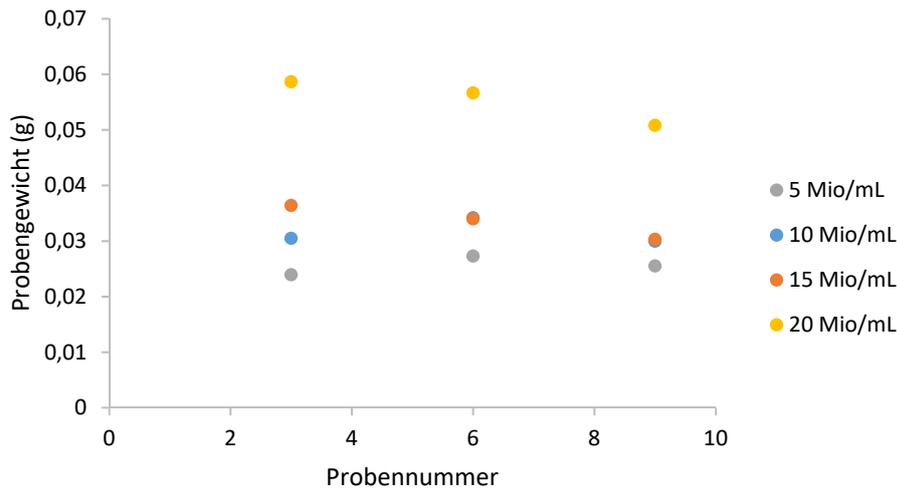


Abbildung 9: Gewicht der Probe bei wiederholter Probennahme mit dem entwickelten Probenahmesystem mit CHO-Zellsuspension mit unterschiedlicher Zellkonzentration zwischen 5 und 20 Millionen Zellen pro Milliliter.

Das Gewicht der gezogenen Probe bleibt auch bei wiederholter Probenahme bei einer Konzentration von 5 Millionen Zellen pro mL nahezu konstant. Bei höheren Zellkonzentrationen zeigt sich ein leicht abnehmender Trend. Durch Unterschiede beim Anschließen der Spritzen ergeben sich Differenzen beim Startgewicht der Proben. Allerdings zeigt sich, dass ein minimales Probengewicht von 20 µg für die LC-MS-Analyse bei allen Zellkonzentrationen garantiert werden kann. Zusätzlich ist die Modifikation der gezogenen Probenmenge im Steuerungsskript einfach möglich, sollte die Probenmenge über die Zeit nicht ausreichen. Insgesamt wurden mit diesem System über 40 Proben gezogen, ohne dass eine Modifikation nötig war, um die Mindestmenge zu erreichen.

Um das Probenahmesystem im Bypass einsetzen zu können, muss es vorher sterilisiert werden. Daher wurde untersucht, ob die eingebaute Filtermembran durch mehrfaches Autoklavieren Schäden aufweist. Hierfür wurden aus einer Hefesuspension mit einem OD₆₀₀-Wert von ca. 0,25 mehrfach mit dem Probenahmesystem Proben entnommen. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Autoklavieruntersuchung dargestellt.

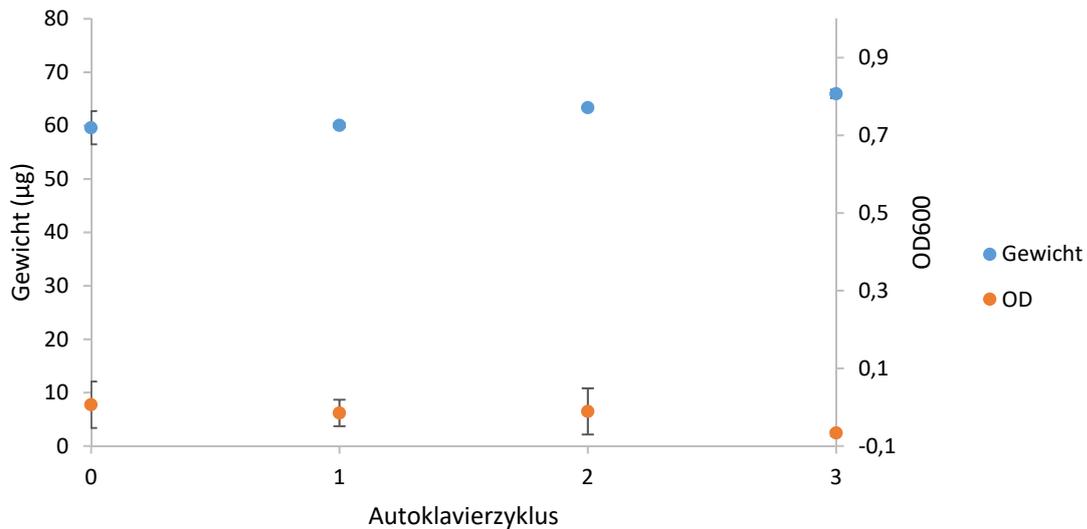


Abbildung 10: Probengewicht und optische Dichte der gezogenen Probe nach mehreren Autoklavierzyklen des Probenahmesystems.

Für jeden Autoklavierzyklus wurden drei Proben gezogen und sowohl das Probengewicht als auch die optische Dichte geprüft. Sowohl vor dem Autoklavieren als auch nach insgesamt drei Autoklavierzyklen ist das Probengewicht konstant bei ca. 60 µg und die optische Dichte ungefähr 0. Bei einer beschädigten Membran wäre ein höheres Probengewicht durch den geringeren Widerstand der Membran und eine höhere optische Dichte zu erwarten. Da beide Parameter in diesem Experiment konstant waren kann angenommen werden, dass das Probenahmesystem autoklavierbar ist. Um eine Fremdkontamination der Membran zu verhindern, wird davon ausgegangen, dass ein Probenahmesystem nur für eine Kultivierung genutzt wird und daher nur einmal sterilisiert, werden muss.

Ein weiteres mögliches Problem bei der Probenahme sind Reste von der vorigen Probe, die im Probenahmesystem verbleiben können (Carry-Over). Diese könnten die nächste Probe beeinflussen. Um den Einfluss eines potenziellen Carry-Over zu untersuchen, wurde aus einer Glutaminlösung eine Probe mit dem Probenahmesystem entnommen. Anschließend wurde die Glutaminlösung im Bypass mit PBS-Puffer ohne Glutamin ersetzt und erneut Proben gezogen. Die Glutaminkonzentration der Proben wurde anschließend mit CEDEX Bio (Roche Diagnostics International AG, Indianapolis, USA) bestimmt. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse dargestellt.

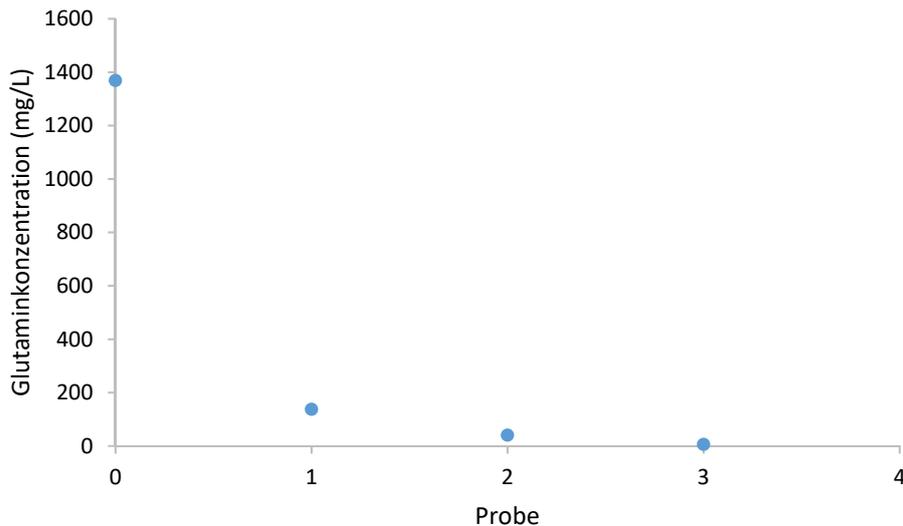


Abbildung 11: Glutaminkonzentration in den entnommenen Proben zum Nachweis des Einflusses eines potenziellen Carry-Over.

Die Konzentration der Glutaminlösung lag bei 1369 mg L^{-1} (Probe 0). Nach dem Wechsel auf die glutaminfreie Lösung waren in der ersten Probe noch 137 mg L^{-1} nachweisbar, in der zweiten Probe war die Konzentration bereits auf 40 mg L^{-1} gesenkt worden. Die dritte Probe wies eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Analysegeräts auf. Im Probenahmesystem verbleibt also ein Teil der vorigen Probe. Dies ist auch im 3D-gedruckten Teil sichtbar. Jedoch ist dieser Einfluss bei der zweiten Probenahme schon unter 3 %. Daher kann bei einer Probenahme die erste Probe jeweils verworfen werden und als Spülung des Systems angesehen werden, während die zweite Probe bereits analysiert werden kann.

2.2.5 Strömungssimulation

Um einen genaueren Einblick in die Strömungsumgebung innerhalb des Messsystems zu erlangen, wurden mit der Simulationssoftware COMSOL Multiphysics (COMSOL AB, Schweden) Strömungssimulationen (CFD) nach der Finite-Elemente-Methode durchgeführt.

Für die Systemintegration (siehe Kapitel 2.5) wurde ein Kombinationssystem aus den zwei Testsystemen für pH, dO_2 , dCO_2 sowie Glucose und Lactat untersucht. Der Fokus der Simulationen lag hierbei auf dem Scherstress innerhalb des Systems, um mögliche Zellschäden durch die Auslegung der Kanalstruktur zu vermeiden. Verglichen wurden zwei Möglichkeiten zur Kombination der Messsysteme: In der ersten Variante wurde ein schmaler Kanal zwischen den beiden Messkanälen eingesetzt. Dieser verringert das

Totvolumen des Bypasskanals und ist zudem ähnlicher zu den Ein- und Ausgangskanälen der Testsysteme. In einer zweiten Variante wurde die große Kanalgeometrie der Messkanäle auch für den Übergangsteil beibehalten, wodurch ein größeres Totvolumen entsteht, aber der Scherstress durch die geringere Veränderung der Kanalgrößen und des Drucks im System wahrscheinlich verringert wird.

Für die Simulation wurden die Modelle aus der CAD-Software in COMSOL Multiphysics 5.2 importiert. Für die Mesh-Erzeugung wurde die Voreinstellung „Fine“ gewählt. Als Eingangsgeschwindigkeit wurde eine Flussrate von $500 \mu\text{L min}^{-1}$ bestimmt, was den Parametern in den Experimenten entspricht.

In Abbildung 12 ist ein Vergleich der Simulationsergebnisse der beiden Geometrien dargestellt.

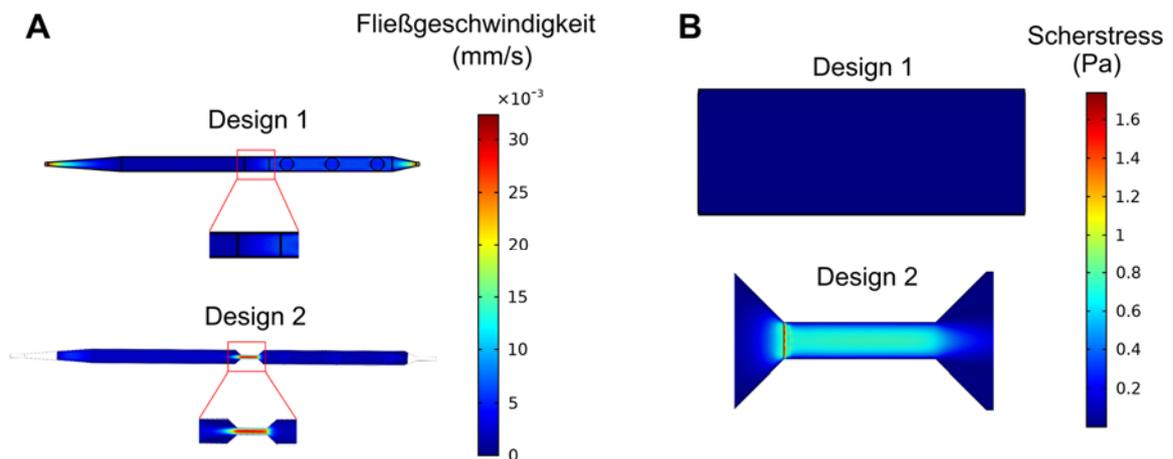


Abbildung 12: Ergebnisse der CFD-Simulation der Designkandidaten des Kombinationssystems, des PreSens-Teilsystems und des Glucose-Teilsystems. A: Fließgeschwindigkeit auf der mittleren horizontalen Schnittebene mit Detailansicht des Verbindungselements. B: Wandscherstress des Verbindungselements. In den Simulationsergebnissen ist deutlich zu erkennen, dass Design 2 mit dem schmaleren Kanalquerschnitt als Verbindungskanal eine deutlich höhere Fließgeschwindigkeit im Verbindungskanal erzeugt und vor allem am Eingangsteil einen sehr viel höheren Scherstress aufweist als Design 1. Ein Scherstress von ca. $2,0 \text{ Pa}$ gilt als Auslöser für die Apoptose von CHO-Zellen [2]. Durch die geringe Länge des Verbindungskanals wurde daher das Kombinationssystem und das vollständige Design 1 als Verbindungskanal verwendet, da die Verringerung des Totvolumens gegenüber dem Risiko von Zellschäden durch den erhöhten Scherstress als vernachlässigbar betrachtet wurde.

2.3 Sensorfunktionsprüfung und Strömungssimulation

2.3.1 Einleitung

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde die Funktion der in die Testsysteme (siehe Kapitel 2.2) verbauten Sensoren überprüft. Die Einbautiefe der verwendeten Sensorplugs wurde mittels CFD-Simulationen vorgegeben. Darüber hinaus wurde die Messverzögerung durch das Totvolumen der Schläuche und des Bypasses ermittelt. Zusätzlich wurde die Messzeit der eingebauten Sensoren mit nicht-eingebauten Sensoren und den Herstellerangaben verglichen. Ferner wurde der Einfluss der Glucosemessung auf die anderen Messsensoren bei einer Kombination der Teilsysteme in ein System untersucht.

2.3.2 Simulation der Einbautiefe der Sensorplugs

In CFD-Simulationen wurde die Einbautiefe der Sensorspots untersucht. Hierbei sollte der Scherstress und die Fließgeschwindigkeit überprüft werden. Bei einer höheren Fließgeschwindigkeit antwortet der Sensor schneller, da die Konvektion der Analyten zum jeweiligen Sensor verstärkt wird. Eine Erhöhung des Scherstress im mikrofluidischen Bypass-Kanal kann sich jedoch negativ auf die Viabilität der Zellen auswirken.

Es wurde eine Einbautiefe von 0,01 mm (abschließend mit der Kanaldecke) bis 0,75 mm (bis zur Kanalmitte) miteinander verglichen. Die Fließgeschwindigkeit und der Wandscherstress sind in Abbildung 13 dargestellt.

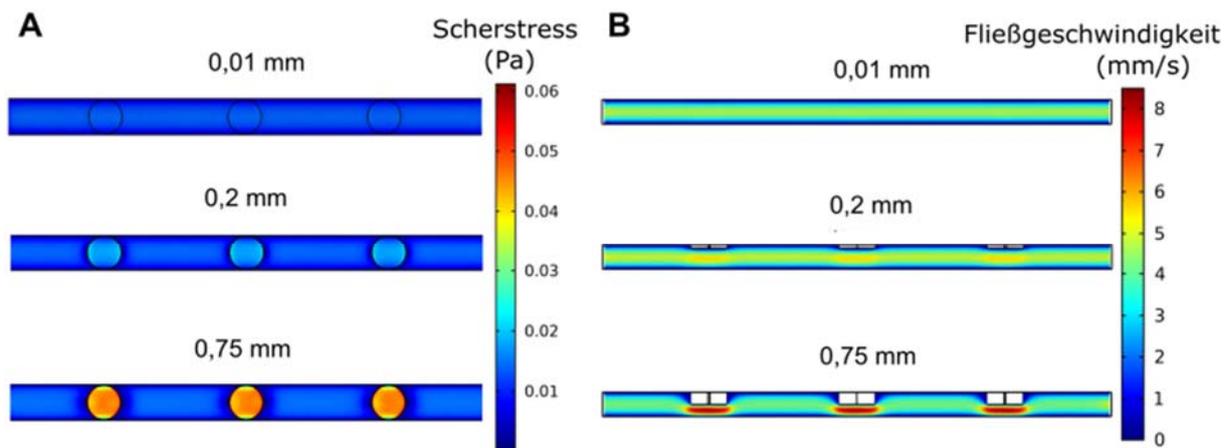


Abbildung 13: Simulationsergebnisse von CFD-Simulationen zum Vergleich der Einbautiefe von 0,01 mm, 0,2 mm und 0,75 mm der Sensorspots. A: Wandscherstress an der Kanaloberseite. B: Fließgeschwindigkeit in der mittleren vertikalen Schnittebene des Kanals.

In den Simulationsergebnissen ist deutlich erkennbar, dass bei größeren Einbautiefen sowohl die Fließgeschwindigkeiten als auch die Scherrate an den Sensorplugs ansteigt. Die Scherrate bleibt jedoch in einem geringen Bereich von weit unter 2 Pa, sodass ein geringes Risiko für Zellschäden durch die niedrigere Einbautiefe besteht [2].

Die Ergebnisse der Simulation zeigen, dass ein tieferer Einbau der Sensorplugs zu einer höheren lokalen Fließgeschwindigkeit an der Sensoroberfläche führt. Dies kann die Reaktionszeit des Sensors begünstigen. Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob erhöhte Fließgeschwindigkeiten tatsächlich die Sensorleistung positiv beeinträchtigen. In realen Einbautests der Sensorplugs konnte die optimale Einbautiefe in Abhängigkeit zum Ansprechverhalten der Sensoren nicht ermittelt werden. Es stellten sich Unterschiede in den Abmessungen zwischen den einzelnen Sensorplugs dar, sodass die nötige Präzision beim Einbau fehlte und damit die Dichtheit des Systems beeinträchtigt wurde.

2.3.3 Bestimmung der Verzögerung für eine Messung im mikrofluidischen Bypass-System

Bei der Verwendung der Sensoren im Bypass entsteht eine Verzögerung bei Erhebung der Online-Daten, da die Flüssigkeit zunächst durch Schläuche aus dem Kultivierungssystem zu den Messsensoren transportiert werden muss. Um diese Verzögerung zu bestimmen, wurden zwei PBS-Lösungen mit einem pH-Wert von 6,2 und 7,5 angesetzt und mit dem Testsystem zur Messung von pH, dO_2 und CO_2

gemessen. Als Vergleich wurden Messungen mit dem pH-Sensorplug direkt in den Lösungen durchgeführt. Als Startpunkt der Messung galt das Eintauchen des Bypass-Schlauchs in die jeweilige Pufferlösung. Der erste signifikant veränderte Messwert wurde als Endpunkt für die Messung der Messverzögerung definiert.

Die Messverzögerung bei der Messung im Bypass betrug demnach $50,6 \pm 1,1$ s. Eine theoretische Berechnung der Messverzögerung kann durch die Bestimmung des Schlauchvolumens bis zum mikrofluidischen System und der Flussrate der Pumpe durchgeführt werden. Hierbei betrug das Schlauchvolumen von PTFE-Schläuchen und Pumpschlauch insgesamt 0,83 mL. Bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} ergibt sich so eine theoretische Messverzögerung von 50,1 s. Die gemessene und berechnete Verzögerung stimmt also gut überein.

Im Kontext von mikrobiologischen Fermentationen und Säugerzellkultivierungen mit einer Dauer von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen kann eine Messverzögerung von unter einer Minute als akzeptabel betrachtet werden. Zusätzlich ist die Messverzögerung berechenbar und kann durch die Erhöhung der Flussrate gesenkt werden.

2.3.4 Bestimmung der Messzeit der eingebauten Sensoren

Die Integration der verschiedenen Sensoren in ein mikrofluidisches System könnte zu einer ungewollten Verlängerung der Messzeit führen, der Einbau könnte fehlerhaft sein oder das Design des Systems könnte dazu führen, dass ein schlechter Kontakt zwischen Sensor und Medium entsteht. Um diese Einflussfaktoren zu überprüfen, wurden die entwickelten Testsysteme mit verschiedenen Puffern auf ihre Funktionalität getestet und die Messzeit ermittelt. Hierbei wurde die Reaktionszeit der jeweiligen Sensoren gemessen, um nach einer sprunghaften Veränderung der Messgröße 90 % des Endwertes zu erreichen (t_{90}). Zum Vergleich wurden, falls möglich, die Sensoren auch außerhalb des mikrofluidischen Systems auf dieselbe Weise überprüft.

In Abbildung 14 ist der Messverlauf der pH Messung dargestellt. Zuerst wurden die Messungen direkt im Messpuffer durchgeführt. Hierfür wurde der Sensorplug an der polymeroptischen Faser in den Messpuffer gehängt und der Messpuffer mit einem Magnetrührer agitiert. Nach dem Erreichen des erwarteten Messwertes wurde der Sensorplug in einen zweiten Messpuffer mit einem niedrigeren pH-Wert platziert. Der Pufferwechsel ist mit einer roten Linie markiert. Nach den Direktmessungen wurde der

gleiche Sensorplug in das mikrofluidische Bypass-System eingesetzt und der Schlauch des Bypasses in die jeweiligen Messpuffer eingesetzt. Dadurch konnten die Verzögerung des Messbeginns (Zeit vom Pufferwechsel bis zu erster Messwertänderung) und die Antwortzeit des Sensors (t_{90} , Zeit bis zu Erreichen von 90 % des finalen Wertes) bestimmt werden.

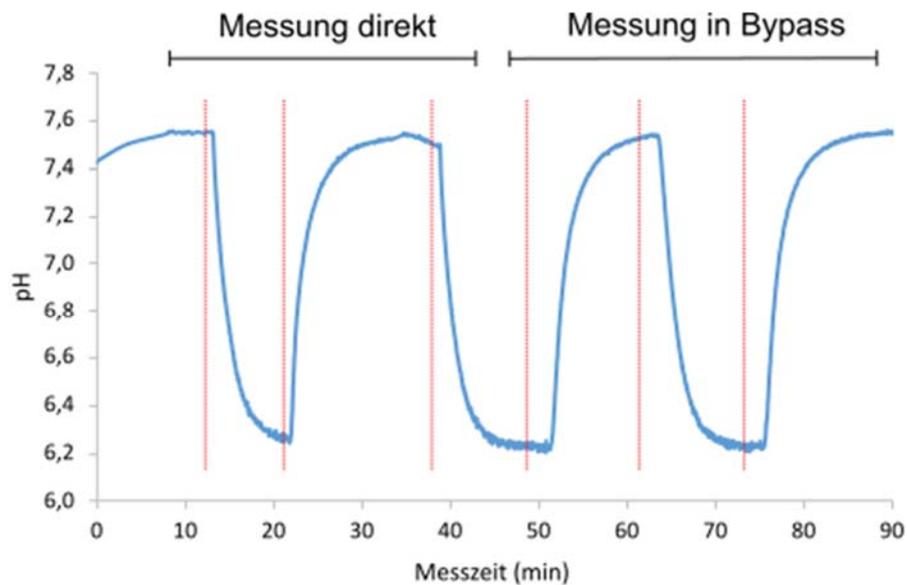


Abbildung 14: Verlauf der Messung des pH-Wertes zur Bestimmung der Messzeit des pH Sensorplugs direkt im Messpuffer bzw. eingebaut im mikrofluidischen Bypass-System. Rote Linien markieren den Wechsel des Messpuffers.

Zur Bestimmung der t_{90} -Werte für die O₂-Sensorplugs wurde nach Herstellerangabe zur Kalibration des Sensorplugs eine sauerstoff-gesättigte und eine sauerstofffreie Lösung hergestellt. Für die sauerstofffreie Lösung wurde 1 g Natriumsulfit (NaSO₃) und 50 µL Cobaltnitrat-Lösung (0,5 mol L⁻¹) in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und in einer verschlossenen Flasche ca. 1 min gerührt. Um zusätzlichen Sauerstoffeintrag zu verhindern, wurde die Flasche nur für die Experimente geöffnet. Das sauerstoffgesättigte Wasser wurde für 20 Minuten kräftig gerührt, um möglichst hohen Sauerstoffeintrag aus der Luft zu gewährleisten. Anschließend wurde analog zum Test der pH-Spots die Untersuchung direkt in den Lösungen bzw. im Bypass durchgeführt.

Um die t_{90} -Werte der CO₂ Sensorplugs zu bestimmen, wurden 100 mL destilliertes Wasser in einem Zellkulturinkubator mit einer CO₂-Konzentration von 5 % für ca. 30 Minuten gerührt. Zwischen den Untersuchungen wurde diese Probe mit erhöhter CO₂-Konzentration wieder in den Inkubator platziert, um dem Ausgasen des CO₂ entgegenzuwirken. Als zweite Vergleichslösung wurde abermals 100 mL destilliertes Wasser genutzt, welches normaler Atmosphäre ausgesetzt war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bestimmung der t_{90} -Werte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Messung der t_{90} -Werte der Sensorplugs bei der Messung direkt im Medium und eingebaut ins Bypass-System und die jeweilige Herstellerangabe.

Sensorplug	Messort	t_{90} (s)	t_{90} Herstellerangabe (s)
pH	Direkt	$268,01 \pm 14,15$	120 (bei 37 °C)
	Bypass	$262,68 \pm 5,04$	
O ₂	Direkt	$6,00 \pm 0,02$	6
	Bypass	$12,66 \pm 1,16$	
CO ₂	Direkt	$11,81 \pm 1,99$	<180
	Bypass	$10,30 \pm 0,09$	

Im Vergleich zur Herstellerangabe war die Messzeit deutlich erhöht [3]. Dies lässt sich jedoch durch die geringere Temperatur (Raumtemperatur, ca. 20 °C) in diesem Experiment erklären, während die Herstellerangabe auf einer Messung bei 37 °C beruht. Die Sauerstoffmessung war die schnellste Messung mit einem t_{90} -Wert von nur 6 s bei der Messung direkt im Medium und 12,66 s bei der Messung im Bypass. Die relative Differenz ist hier am höchsten, kann jedoch bei einer Anwendung im Kultivierungsbereich vernachlässigt werden, bei der sich die Sauerstoffkonzentrationen eher im Minuten- bis Stundenmaßstab ändern. Die Messzeit entspricht hierbei der Herstellerangabe. Der t_{90} -Wert der CO₂-Sensorplugs ist mit 10 bis 12 s erneut niedrig und die Differenz zwischen den Messorten gering [4]. Die Herstellerangabe wurde bei dieser Messung weit unterboten, jedoch ist die Angabe lediglich ein Maximalwert bei der Änderung der CO₂-Konzentration der Atmosphäre [5]. Der Einbau der Sensorplugs in das mikrofluidische Messsystem ist in Hinblick auf die Messzeit daher unproblematisch.

Zusätzlich zu den Sensorplugs soll auch die Dialysemembran für das Glucosemessgerät TRACE C2 im mikrofluidischen BypassSystem integriert werden. Auch hierfür sollte die Messzeit (t_{90}) bestimmt werden. Durch die geringe Messfrequenz von einer Messung alle zwei Minuten ist eine präzise Bestimmung jedoch nicht möglich. In Abbildung 15 sind die Messergebnisse einer Testmessung dargestellt, bei der zwischen Glucoselösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (6 g L⁻¹, 3 g L⁻¹ und 1,5 g L⁻¹) gewechselt wurde.

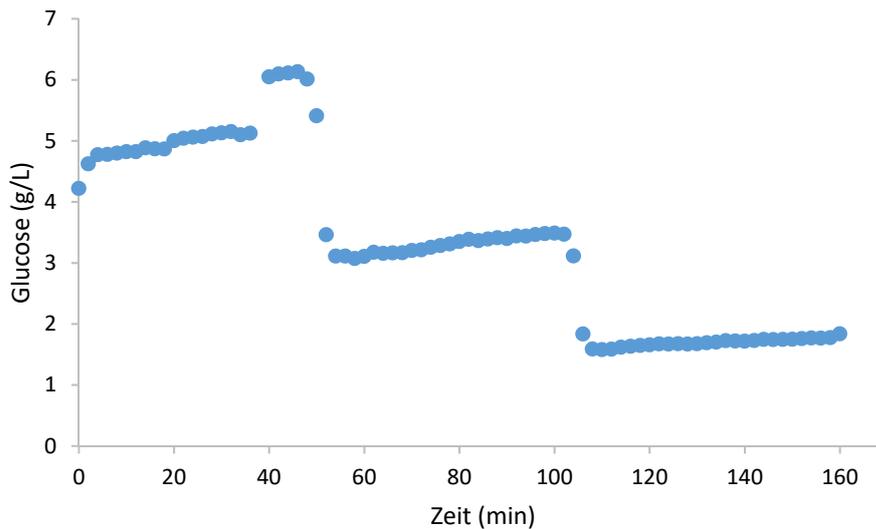


Abbildung 15: Zeitliche Veränderung der Glucosekonzentration zur Bestimmung der Messzeit des Glucosemesssystems.

Bereits nach zwei Messpunkten wird in dieser Testmessung die korrekte Glucosemessung angezeigt. Die t_{90} -Zeit beträgt daher ca. 4 min. Eine Vergleichsmessung wurde durch den Einsatz der Dialysemembran bei diesem Messprinzip nicht durchgeführt. Der Hersteller hat zu dem System leider keine Literaturangaben bezüglich der Messzeit veröffentlicht. Dennoch zeigt der Test, dass der Einsatz der Dialysemembran im mikrofluidischen System die Funktion des Messgeräts nicht beeinträchtigt und eine zeitnahe Messung der Glucosekonzentration möglich ist.

2.3.5 Einfluss der Glucosemessung auf die Messdaten der Sensorplugs

Bei der Integration der Sensortestsysteme in ein mikrofluidisches System ist die Beeinflussung der Sensoren untereinander zu beachten. Sollten sich die Messungen gegenseitig beeinflussen, muss dies in der Analyse der Daten berücksichtigt werden. Idealerweise sollte allerdings das Design des mikrofluidischen Systems so ausgelegt werden, dass es zu keiner Beeinflussung der Sensoren untereinander kommt.

In Abbildung 16 ist ein Kombinationsdesign der Teilsysteme dargestellt, bei dem die preSens Sensorspots und die Dialysemembran zur Glucosemessung an jeweils zwei Seiten desselben Kanalabschnitts eingebaut werden.

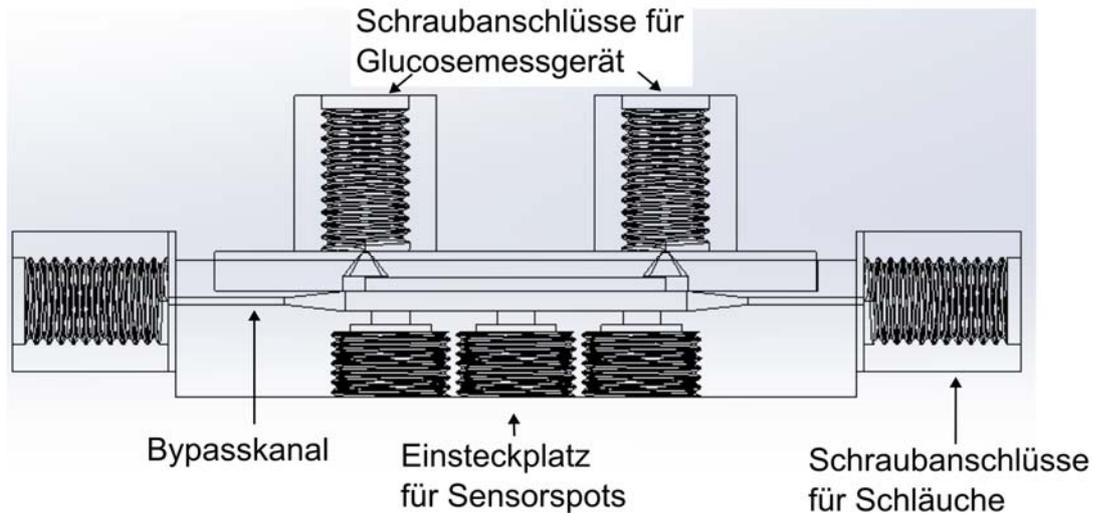


Abbildung 16: Seitenansicht der CAD-Darstellung mit Integration der Sensorspots und der Dialysemembran zur Glucosemessung.

Abbildung 17 zeigt die Messdaten eines pH Sensorspots bei einer Testmessung, die mit dem gezeigten Design aus Abbildung 16 durchgeführt wurde.

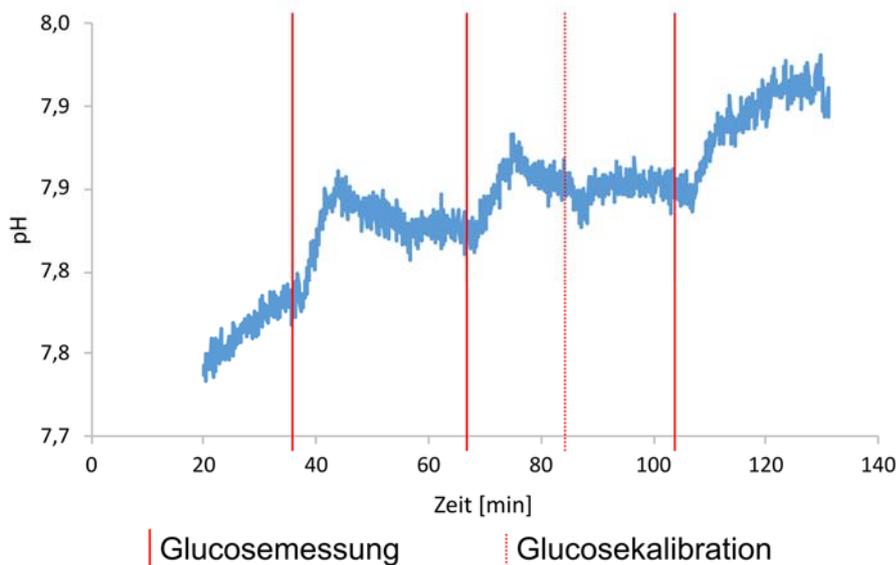


Abbildung 17: Gemessener pH-Wert im ersten Kombinationsdesign.

Nach jedem Start einer Glucosemessung ist ein deutlicher Anstieg des angezeigten pH-Wertes sichtbar. Darüber hinaus beeinflusst die Kalibration des TRACE Glucosemessgeräts die pH-Messung. In einem alternativen Design wurde die Position der Dialysemembran verändert, sodass die Sensorspots und die Dialysemembran hintereinander liegen. Das Medium bzw. das Kultivierungsmedium fließt somit zuerst an den Sensorspots und dann an der Dialysemembran vorbei. In Abbildung 18 ist das zweite Kombinationsdesign dargestellt.

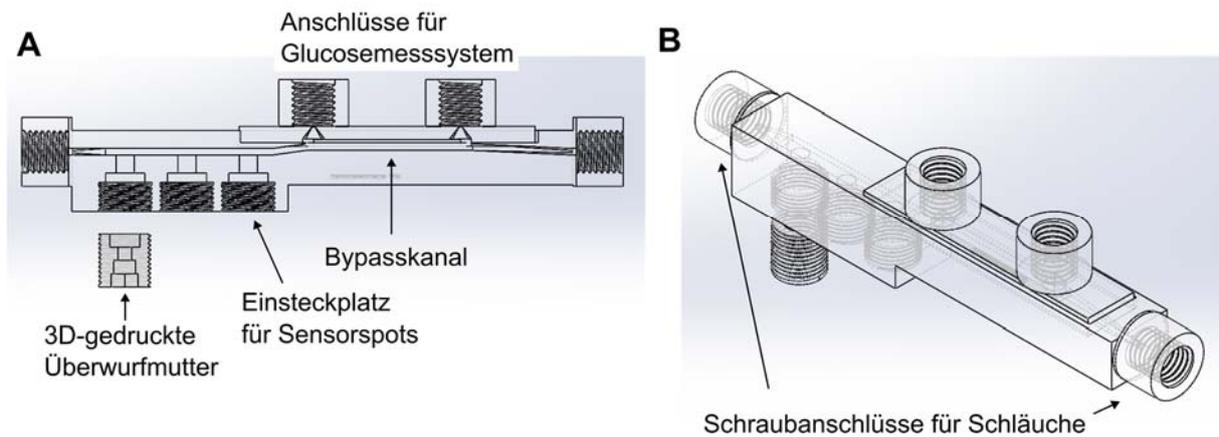


Abbildung 18: CAD-Design des zweiten Kombinationssystems zur Messung von pH, O₂, CO₂ und Glucose + Lactat. A: Schnittansicht. B: Isometrische Ansicht.

In Abbildung 19 sind die Messwerte eines pH-Sensorspots im zweiten Kombinationsdesign dargestellt.

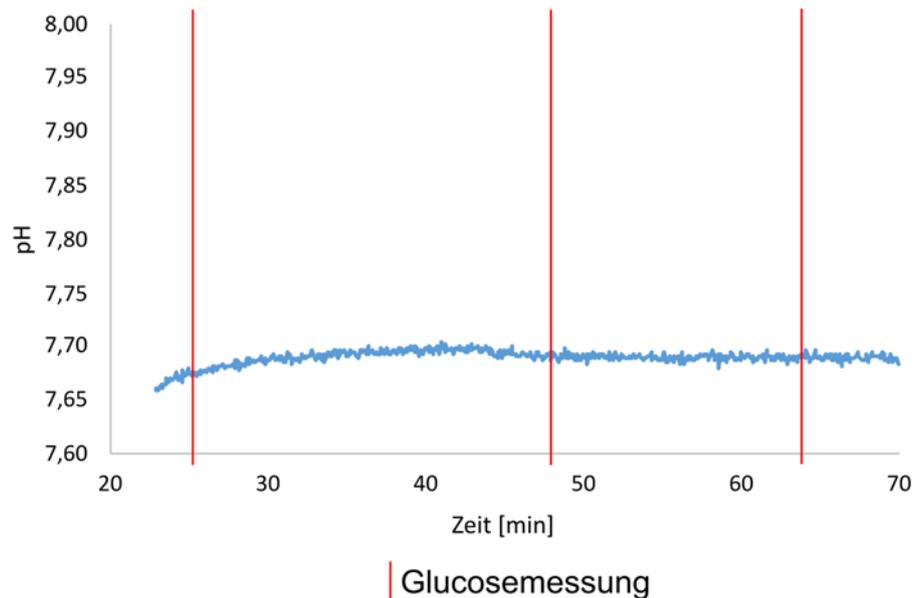


Abbildung 19: Gemessener pH-Wert im zweiten Kombinationsdesign zur Integration von Sensorspots und Dialysemembran bei gleichzeitiger Glucosemessung.

In dieser Anordnung zeigten sich keine Veränderungen des angezeigten pH-Wertes durch die Glucosemessungen. Daraus lässt sich schließen, dass die Positionierung der Sensorplugs hinter der Dialysemembran von Vorteil ist und sich in diesem Design die Messverfahren nicht gegenseitig beeinflussen.

2.4 Systemintegration und Automatisierung der Online-Sensorplattform

2.4.1 Einleitung

In diesem Arbeitspaket wurden die vorher erstellten und getesteten Teilsysteme in eine mikrofluidische Plattform integriert. Dieses Gesamtsystem wurde dann an verschiedene Kultivierungssysteme wie Inkubatoren und Bioreaktoren angeschlossen. Darüber hinaus wurde die Schnittstelle zum Kultivierungssystem erarbeitet. Als Modellorganismen wurden zusätzlich zu CHO-Zellen auch *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* kultiviert, um die flexiblen Einsatzmöglichkeiten des Messsystems zu demonstrieren.

2.4.2 Integration der funktionellen Einheiten auf einer Plattform

Auf Basis der in Kapitel 2.2.5 durchgeführten Strömungssimulation wurde ein scherstressarmes Design zur Kopplung der Teilsysteme erarbeitet. Auf dieser Grundlage wurde zunächst ein Kombinationsdesign aus den Teilsystemen zur Messung von pH, O₂ und CO₂ sowie dem Teilsystem zur Messung von Glucose und Lactat entworfen und hergestellt. Basierend auf diesem System wurden die in 2.3.5 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt, in denen bewiesen wurde, dass die Glucosemessung keinen Einfluss auf die anderen Messgrößen nimmt. Das Kombinationsdesign ist in Abbildung 18 dargestellt.

In einem weiteren Schritt wurde das Probenahmesystem zum Kombinationsdesign hinzugefügt, um die mikrofluidische Sensorplattform zu vervollständigen. Die Anschlüsse wurden hierbei alle auf einer Seite des Systems platziert, um die Zugänglichkeit der Anschlüsse im Einsatz an Kultivierungssystemen zu erleichtern. Abbildung 20 zeigt die mikrofluidische Sensorplattform aus allen Teilsystemen.

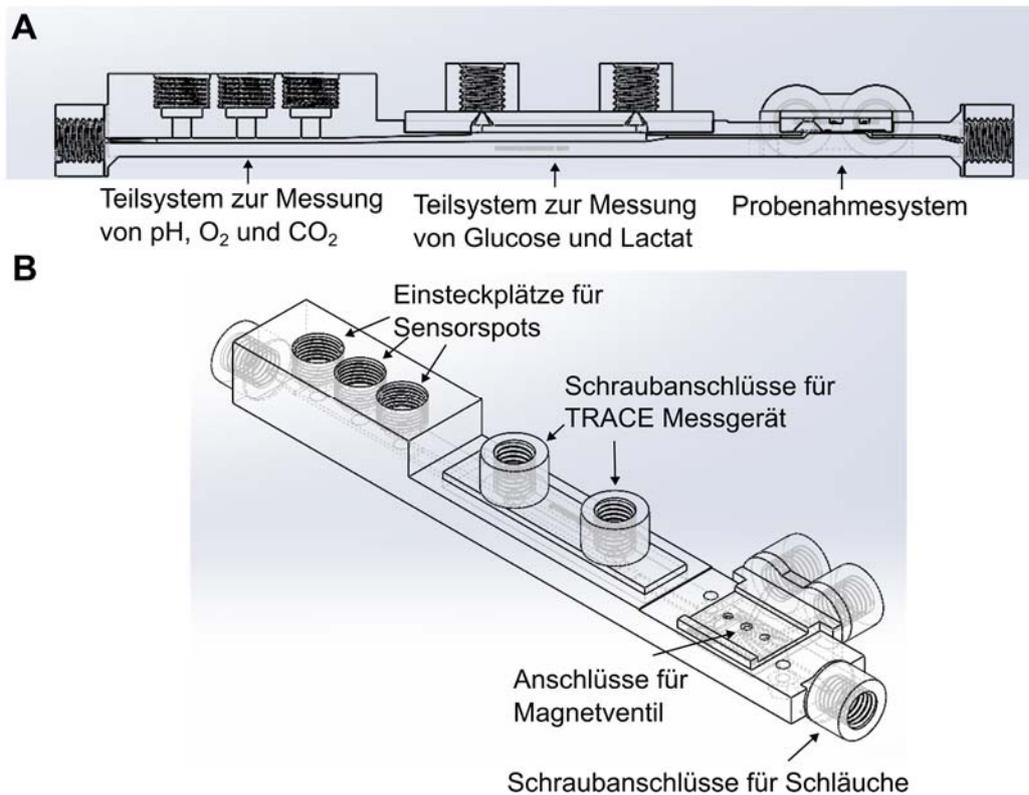


Abbildung 20: CAD-Darstellung der kompletten mikrofluidischen Sensorplattform. A: Seitenansicht mit Beschriftung der einzelnen Teilsysteme im Gesamtsystem. B: Isometrische Ansicht.

Das Gesamtsystem ermöglicht somit die Online-Messung von pH, O₂, CO₂, Glucose und Lactat sowie die (automatisierte) Entnahme einer zellfreien Probe. Das System kann hierfür als Bypass an verschiedene Kultivierungssysteme angeschlossen werden.

2.4.3 Anschluss der Sensorplattform an verschiedene Kultivierungssysteme

Das entwickelte mikrofluidische Sensorsystem soll für die Online-Überwachung von miniaturisierten Reaktoren eingesetzt werden. Hierfür wurde das System an unterschiedliche Kultivierungssysteme angeschlossen, um den flexiblen Einsatz des Systems zu demonstrieren.

Trotz der Entwicklung miniaturisierter Rührkesselreaktoren ist der Einsatz klassischer Schüttelkolben für kleine Kulturvolumina auch in der Biopharmaindustrie immer noch weit verbreitet. Ein Nachteil der Verwendung von Schüttelkolben sind die stark begrenzten Möglichkeiten für automatisierte Online-Sensorik.

Der Anschluss des mikrofluidischen Sensorsystems wurde über PTFE-Schläuche realisiert. Im Kolbendeckel wurden hierfür Schlauchanschlüsse integriert und die dünnen PTFE-Schläuche durch die Anschlüsse direkt ins Kulturmedium eingetaucht.

Mit Schlauchklemmen und dickeren Silikonschläuchen wurde eine sterile Abdichtung um die PTFE-Schläuche geschaffen. Das Sensorsystem und die Peristaltikpumpe wurden für die Kultivierung im Inkubator in der Ebene über dem Schüttelkolben platziert. Dadurch konnte der Kolben sicher auf einem Schüttler platziert werden, während die Stromkabel, optischen Fasern und Schlauchanschlüsse des Sensorsystems keiner Bewegung ausgesetzt waren. In Abbildung 21 ist der Aufbau des mikrofluidischen Sensorsystems, angeschlossen an einen Schüttelkolben, dargestellt.

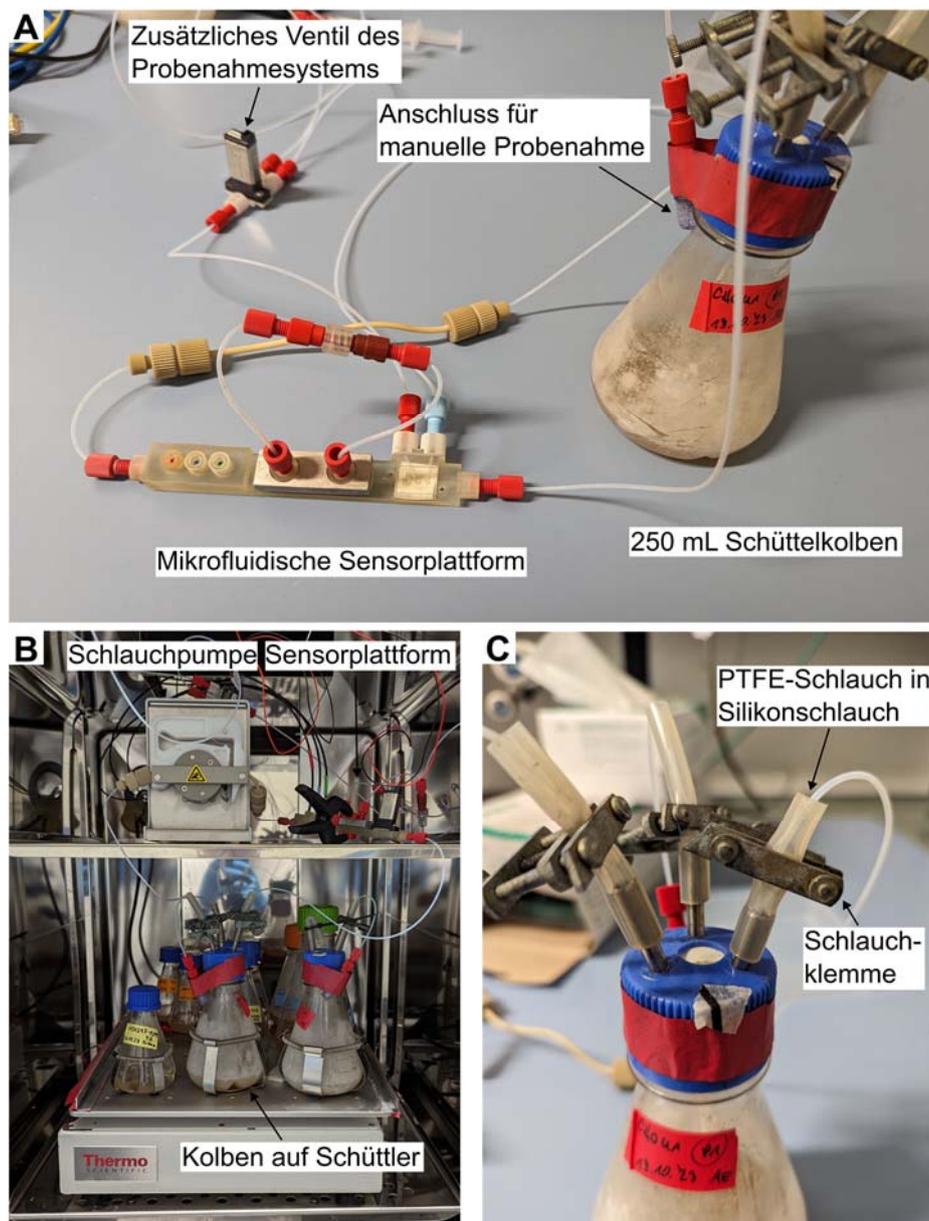


Abbildung 21: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen 250 mL Schüttelkolben. A: Detailansicht der Sensorplattform am Schüttelkolben. B: Versuchsaufbau im Inkubator mit

Schlauchpumpe und Sensorplattform auf oberer Inkubatorebene. C: Detailansicht des Anschlusses der PTFE-Schläuche an den Schüttelkolben mittels Silikonschläuchen am Deckel.

Zusätzlich zum Anschluss der mikrofluidischen Sensorplattform an Schüttelkolben kann das System auch an herkömmliche Benchtopreaktoren angeschlossen werden. Um das Totvolumen und somit die Verzögerung, bis die Kulturbrühe aus dem Reaktor zu den Sensoren gepumpt wurde, zu reduzieren, wird der PTFE-Schlauch wie beim Anschluss der Schüttelkolben in den Silikonschlauch am Probenahmeport des Reaktors bis zur Kulturbrühe im Reaktor eingesteckt und mit einer Schlauchklemme eine Sterilbarriere erzeugt. Der zweite PTFE-Schlauch, der die Kulturbrühe von der Sensorplattform zurück in den Reaktor führt, wird lediglich an bereits vorhandene Schlauchanschlüsse angeschlossen. In Abbildung 22 ist der Anschluss an einen 2 L-Benchtop Rührkesselreaktor dargestellt.

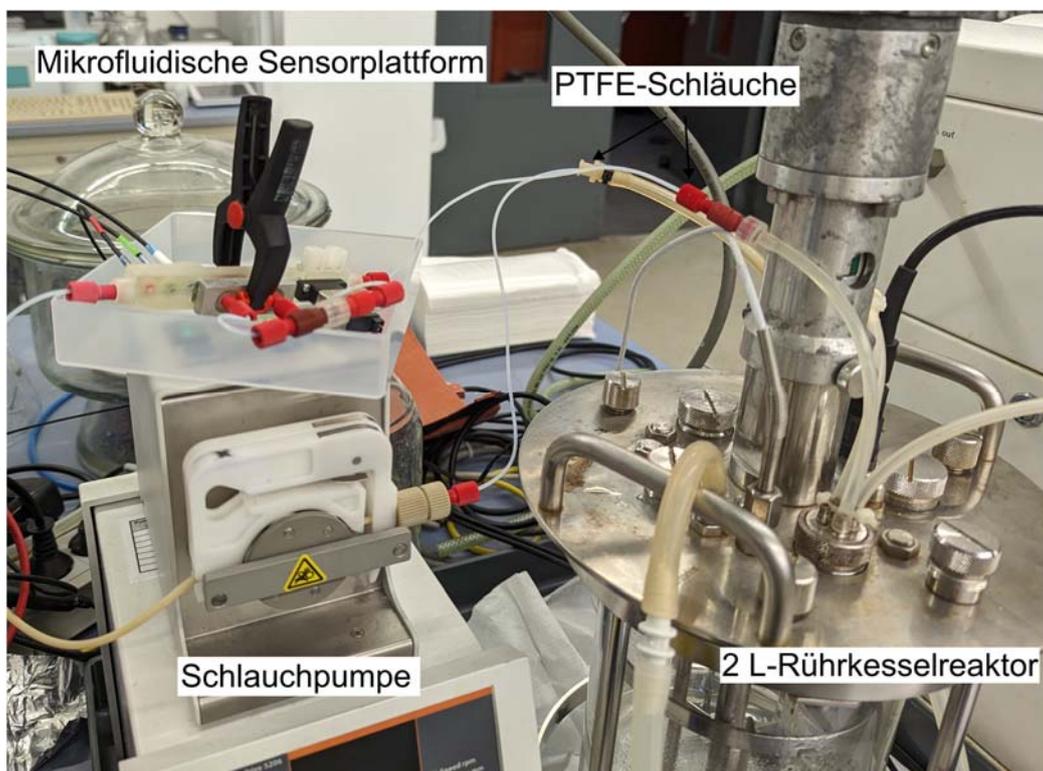


Abbildung 22: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen 2 L-Rührkesselreaktor. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Übertragung von Produktions- und Wachstumscharakteristika aus Schüttelkolben auf größere Rührkesselreaktoren, wurden miniaturisierte Rührkesselreaktoren entwickelt. Diese miniaturisierten Bioreaktoren ermöglichen durch das geringere Volumen eine Reduktion der Kosten bezüglich des Verbrauchs von Medien, Chemikalien und Energie sowie eine Parallelisierung, um den Durchsatz zu erhöhen. Eines dieser miniaturisierten

Bioreaktorsysteme ist das ambr 250–System (Sartorius AG, Deutschland). Die miniaturisierte Sensorplattform wurde mit den an ambr250-Reaktoren vorhandenen Luer-Schraubanschlüssen an den Reaktor angeschlossen. Ein Einsetzen des PTFE-Schlauchs in den Reaktor, analog zum 2 L-Reaktor, ist nicht nötig, da bereits Schläuche mit geringem Innendurchmesser an den verwendeten Anschlüssen verbaut sind. In Abbildung 23 ist die angeschlossene Sensorplattform abgebildet.

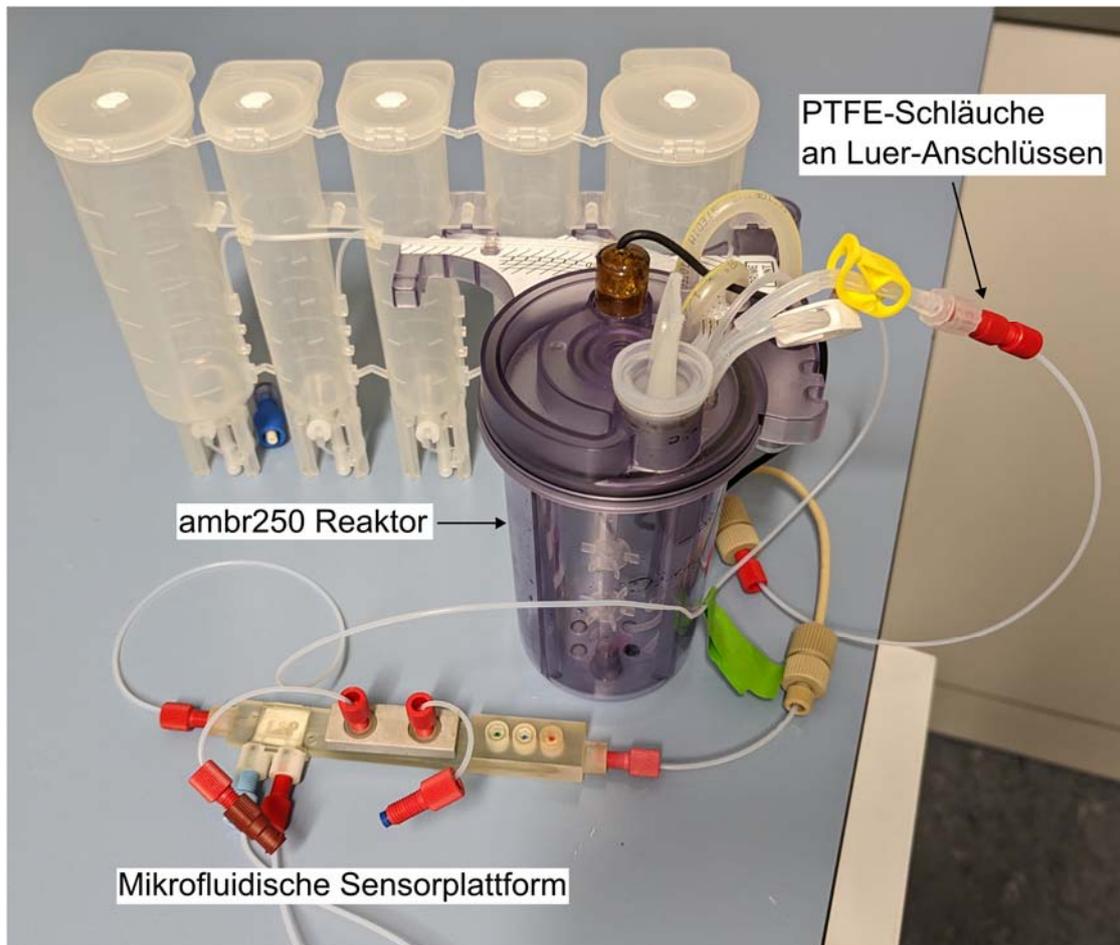


Abbildung 23: Foto der mikrofluidischen Sensorplattform, angeschlossen an einen miniaturisierten Bioreaktor "ambr250".

Die mikrofluidische Sensorplattform kann somit an verschiedene Reaktorsysteme angeschlossen werden. In allen hier gezeigten Fällen waren nur minimale oder gar keine Modifizierungen nötig, um eine feste und sterile Verbindung zwischen Reaktor und Sensorplattform herzustellen. In den meisten Fällen konnten bereits vorhandene Anschlüsse genutzt werden. Dies demonstriert die Flexibilität des Einsatzes der mikrofluidischen Sensorplattform.

2.4.4 Online-Messungen unterschiedlicher Kultivierungen

Die mikrofluidische Sensorplattform sollte eingesetzt werden, um die Kultivierung von CHO-Zellen zu überwachen. Die nachfolgenden Kultivierungen wurden in 250 mL Polycarbonat Erlenmeyerkolben in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. In Abbildung 24 sind die aufgenommenen Daten für eine Batch-Kultivierung über 72 h dargestellt.

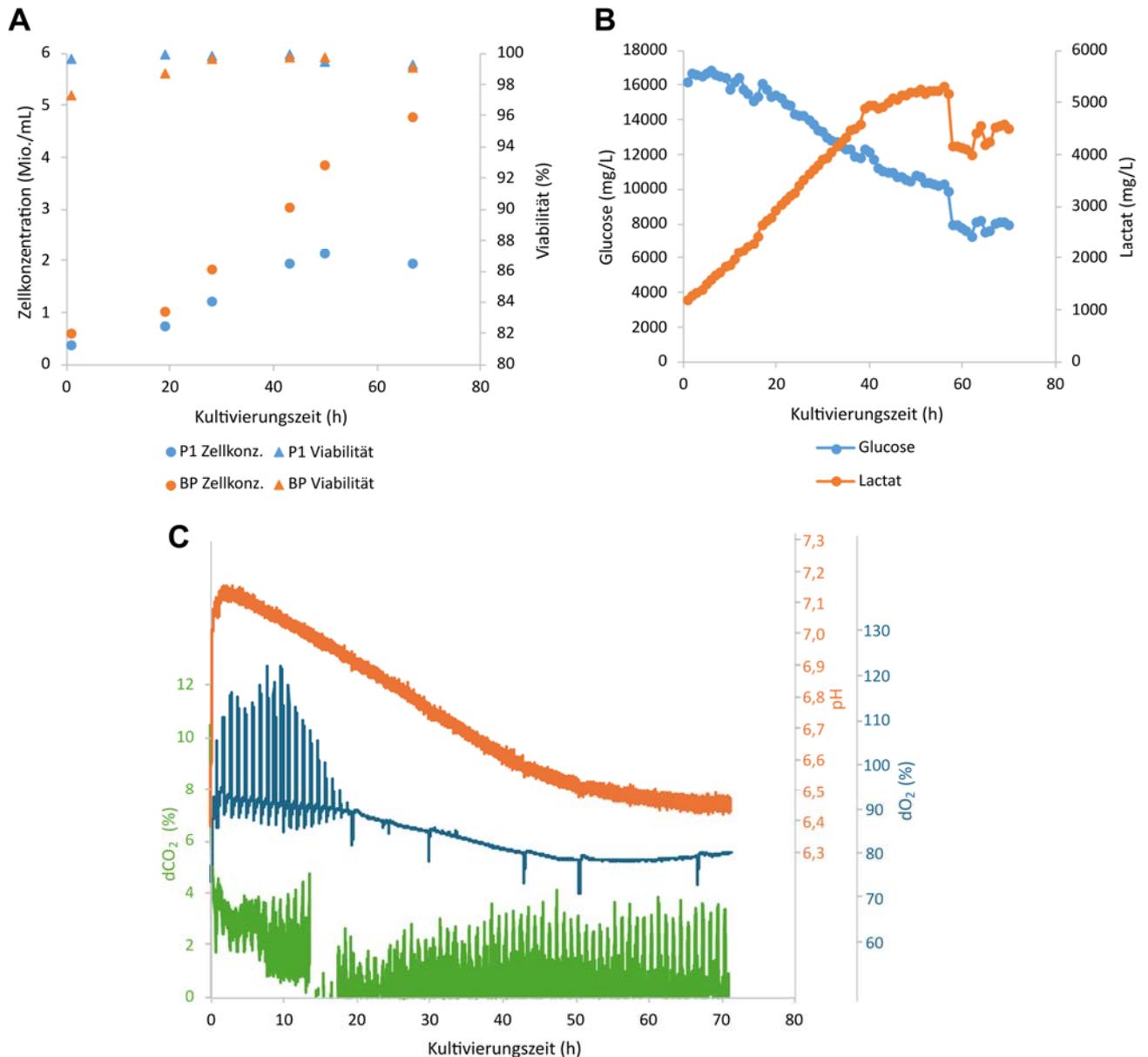


Abbildung 24: Aufgenommene Daten einer CHO-Batch-Kultivierung über 72 h. **A:** Zellkonzentration und Viabilität der Kultur mit angeschlossenem Sensorplattformsystem (P1) und Vergleichskultur ohne System (BP). **B:** Online-Daten des TRACE Messgeräts für die Bestimmung von Glucose und Lactat. **C:** Online-Daten der PreSens Sensoren zu pH, dO₂ und dCO₂.

Über die Kultivierungszeit ist sowohl eine Abnahme der Sauerstoffsättigung, des pH-Wertes und der Glucosekonzentration durch die steigende Zellkonzentration in den

Online-Daten sichtbar. Gleichzeitig nimmt die Lactatkonzentration als Stoffwechselprodukt der CHO-Zellen zu. Nach ca. 48 h ist jedoch die viable Zellkonzentration der Kultur mit angeschlossener Sensorplattform bei nur ca. zwei Millionen Zellen pro mL, während die Vergleichskultur eine Zellkonzentration von knapp vier Millionen Zellen pro mL aufweist. Im weiteren Verlauf wächst die Kultur mit Sensorplattform nicht weiter. Zusätzlich deutet der Sprung der Online-Daten der Glucose- und Lactatkonzentration auf Probleme beim TRACE-Messgerät hin. In den ersten Stunden der Kultivierung sorgte zusätzlich eine Luftblase am Sauerstoff-Sensorspot für starkes Rauschen der Messwerte. Die Einschnitte der Sauerstoffkonzentration im weiteren Verlauf der Kultivierung sind durch den Stopp des Schüttlers bei der manuellen Probenahme zu erklären. Die Messwerte des CO₂ Sensorspots sind sehr verrauscht. Dies kann auf eine Beschädigung des Spots beim Einsetzen hindeuten oder auf eine weitere Luftblase, die keine zuverlässige Messung zuließ.

In Abbildung 25 sind die aufgenommenen Werte einer weiteren CHO-Kultivierung dargestellt.

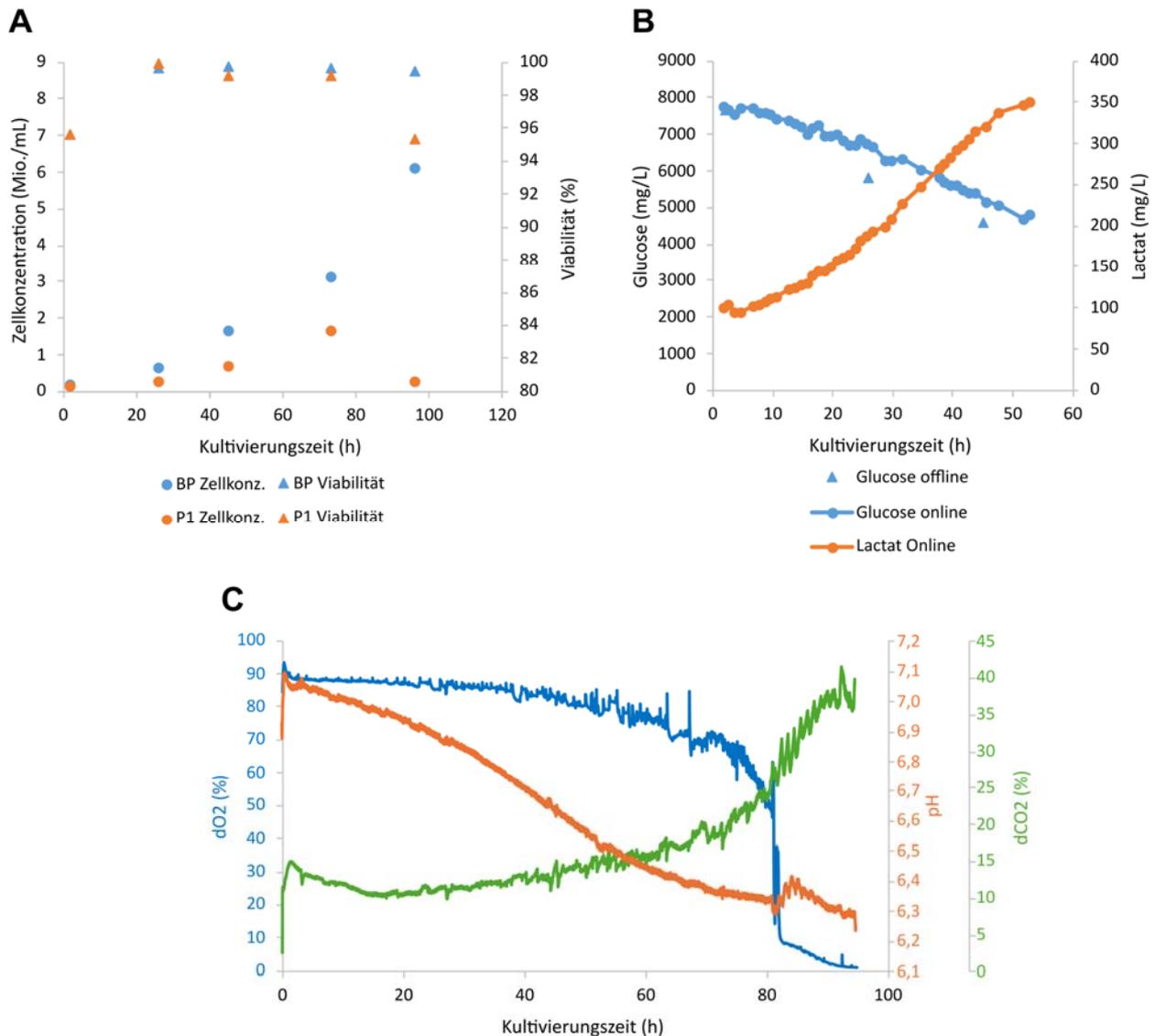


Abbildung 25: Aufgenommene Daten einer weiteren CHO-Batch-Kultivierung über 48 h. A: Zellkonzentration und Viabilität der Kultur mit angeschlossenem Sensorplattformsystem (P1) und Vergleichskultur ohne System (BP). B: Online-Daten des TRACE Messgeräts zu Glucose und Lactat. C: Online-Daten der PreSens Sensoren zu pH, dO₂ und dCO₂.

Der Verlauf der Daten der zweiten Batch-Kultivierung ähnelt grundsätzlich der ersten gezeigten Kultivierung. Abermals ist eine Abnahme der Sauerstoffsättigung, des pH-Wertes und der Glucosekonzentration sichtbar. Ebenfalls fällt das Zellwachstum in der überwachten Kultur geringer aus als in der Vergleichskultivierung. In dieser Kultivierung sind die CO₂-Daten jedoch weniger verrauscht. Jedoch ist nach ca. 96 h eine Kontamination der Kultur durch eine starke Trübung der Kulturbrühe sichtbar geworden. Dies wird auch in den Daten der Sauerstoffsättigung durch eine schnelle Abnahme und der CO₂-Sättigung mit einem rapiden Anstieg sichtbar. Zusätzlich zu der Aufnahme der Glucose- und Lactatkonzentration mit dem angeschlossenen TRACE-Messgerät wurden auch Offline-Daten zur Glucosekonzentration erhoben, welche gut

mit den Online-Daten übereinstimmen. Durch eine Leckage am Schlauchset des TRACE Messgerätes musste die Messung jedoch nach 51 h abgebrochen werden.

Um den negativen Einfluss auf das Zellwachstum bei der mittels mikrofluidischer Sensorplattform überwachten Kultur genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die verwendete Pumpe gegen eine baugleiche Pumpe mit kleineren Rollen getauscht, wodurch ein leicht verbessertes Wachstum erlangt werden konnte. Anschließend wurde in einem weiteren Experiment der verwendete Pumpschlauch (Tygon LMT-55 1,52 mm ID) durch autoklavierbare Schläuche (Pharmed 1,52 mm ID) ersetzt. Vor der Verwendung wird der gesamte Aufbau autoklaviert, weshalb die Tygon LMT-55-Schläuche einen negativen Einfluss auf die Zellen haben könnten. Durch den Tausch wurde jedoch kein merklicher Effekt erzielt. Außerdem wurde die Flussrate variiert, da diese mit dem Scherstress der Zellen korreliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 26 dargestellt.

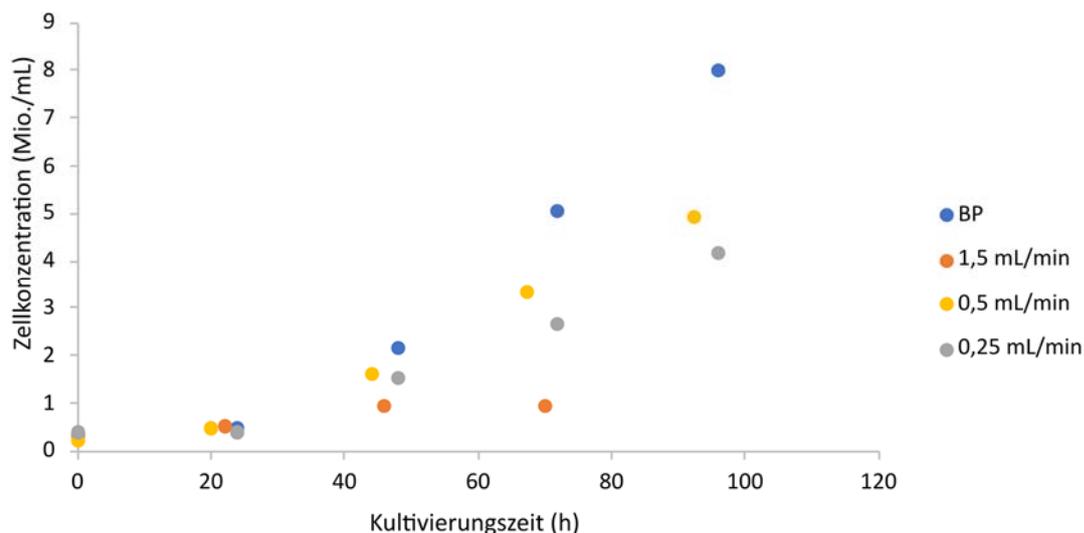


Abbildung 26: Verlauf der viablen Zellkonzentration bei unterschiedlichen Flussraten.

Eine höhere Flussrate von $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ hat in diesem Experiment einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Bei einer niedrigeren Flussrate von $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ sind nach 72 h und 96 h die gemessenen Zellkonzentrationen ähnlich zu der Zellkonzentration bei einer Flussrate von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Eine geringere Flussrate hat somit keinen positiven Effekt auf das Zellwachstum. Es besteht daher weiterhin das Problem, dass der Einsatz von Peristaltikpumpen zu einem verringerten Zellwachstum führt.

Um die Flexibilität der mikrofluidischen Sensorplattform auch in Bezug auf die kultivierten Zellen zu demonstrieren, wurden zusätzlich das Bakterium *Escherichia coli* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in Schüttelkolben kultiviert und parallel mit der Sensorplattform Online-Daten erhoben.

Die Kultivierung von *E. coli* wurde mit dem Stamm TOP10 bei 37 °C in der Wachstumsphase durchgeführt. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 5 wurde die Temperatur auf 20 °C gesenkt, da dieser Stamm das Protein GFP (Green Fluorescent Protein) exprimiert und somit die Proteinproduktion erhöht wird. Als Medium wurde LB-Medium mit 4 g L⁻¹ Glucose verwendet. Der Schüttelkolben wurde in einem Inkubator auf einem Schüttler mit 180 rpm platziert. Zur Überwachung des Zellwachstums wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Zusätzlich wurden der pH-Wert und die Glucosekonzentration Offline gemessen. In Abbildung 27 sind die Daten der Kultivierung dargestellt.

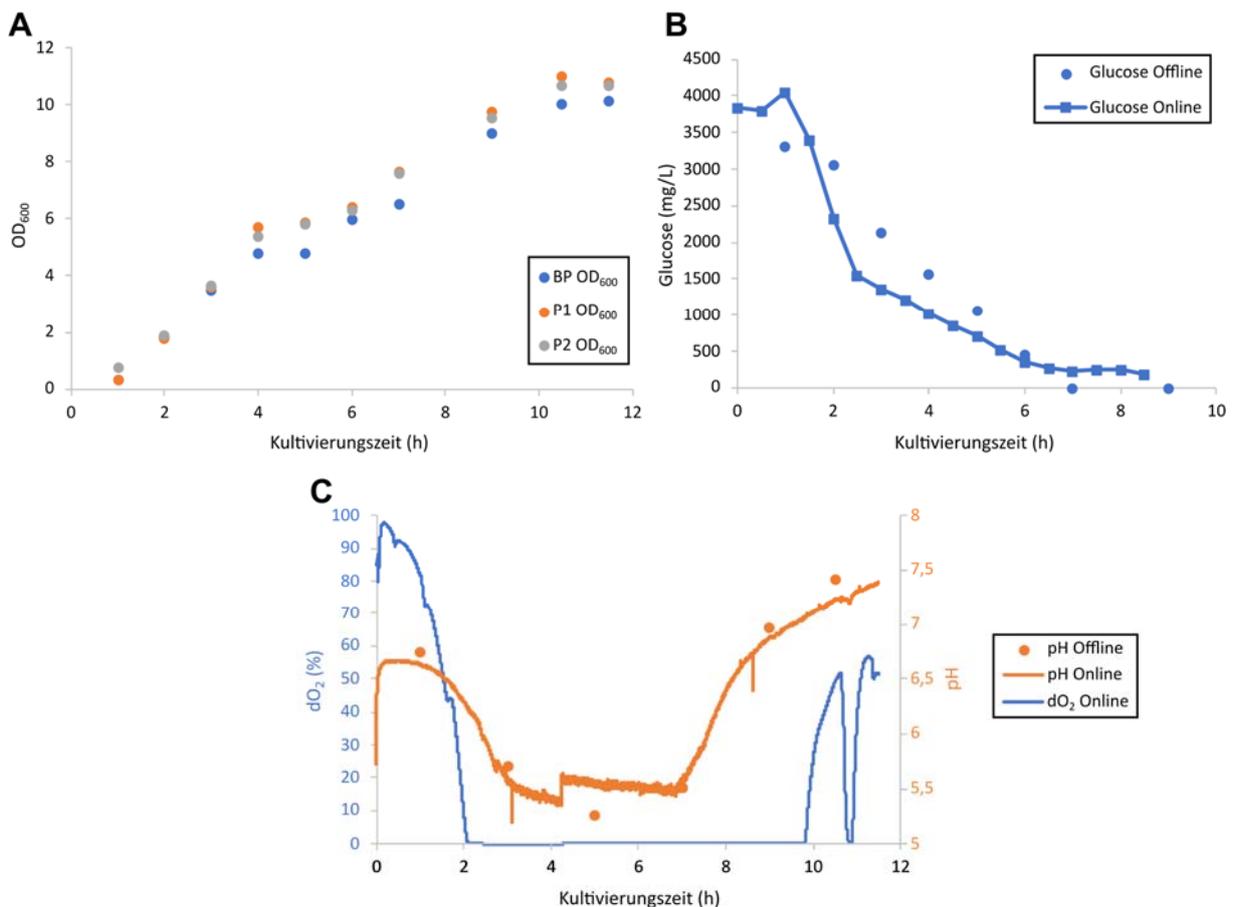


Abbildung 27: Daten der Kultivierung von *E. coli*. A: Verlauf der optischen Dichte (OD₆₀₀) bei der Kultivierung im Schüttelkolben ohne Sensorplattform und Pumpe (BP), mit Pumpe (1 mL min⁻¹, P1) und mit Pumpe und Sensorplattform (1 mL min⁻¹, P2). B: Verlauf der Glucosekonzentration gemessen mit dem TRACE-Gerät (online) und nach manueller Probenahme (offline). C: Verlauf der Sauerstoffsättigung und

des pH-Wertes gemessen mit dem PreSens System (online) und einem pH-Meter bei manueller Probenahme (offline).

Der Verlauf der optischen Dichte ist in allen Schüttelkolben ähnlich und es sind keine negativen Effekte der verwendeten Peristaltikpumpe (P1) und der Sensorplattform (P2) erkennbar. Beim Absenken der Temperatur nach 4 h scheint das Zellwachstum zunächst zu stagnieren, normalisiert sich danach aber wieder.

Im Verlauf der Sauerstoffsättigung im Medium ist nach zwei Stunden der Wert von 0 % erreicht. Nach 10 h steigt die Sauerstoffsättigung wieder an. Dies verdeutlicht, dass die Begasung im Schüttelkolben nicht ausreicht und wahrscheinlich das Zellwachstum hemmt. Gleichzeitig ist das Ende der Kultivierung nach 10 h deutlich zu erkennen, da die Zellen in die Absterbephase übergehen und keinen Sauerstoff mehr verbrauchen.

Ähnlich ist der Verlauf des pH-Wertes. Während des Zellwachstums sinkt der pH-Wert durch das Entstehen von sauren Stoffwechselprodukten wie beispielsweise Laktat ab, steigt am Ende der Kultivierung aber wieder an, da sich der Stoffwechsel der Zellen nach dem Verbrauch der Medienbestandteile ändert. Beim Absenken der Temperatur nach 4 h zeigt sich eine abrupte Änderung der Messwerte, welche durch die manuelle Temperatureinstellung am PreSens-System zu erklären ist, während die Temperatur im Inkubator erst langsam abnahm. Die Offline gemessenen pH-Werte stimmen generell gut mit den Online gemessenen pH-Werten überein. Die geringen Abweichungen entstehen beim Transport der gezogenen Probe, indem die Zellen weiter Stoffwechsel betreiben und keiner Begasung ausgesetzt sind, sowie durch Abweichungen in der Temperatur der manuell gemessenen Probe.

Auch die Glucosekonzentration nimmt wie zu erwarten mit der Kultivierungszeit stark ab, wobei in der frühen Wachstumsphase bei 37 °C ein erhöhter Glucoseverbrauch zu beobachten ist. Am Ende der Kultivierung ist die Glucose komplett verbraucht. Die Offline-Messwerte stimmen auch hier gut mit den Online-Messwerten überein.

In einer weiteren Kultivierung wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) verwendet. Die erhobenen Messwerte sind in Abbildung 28 dargestellt.

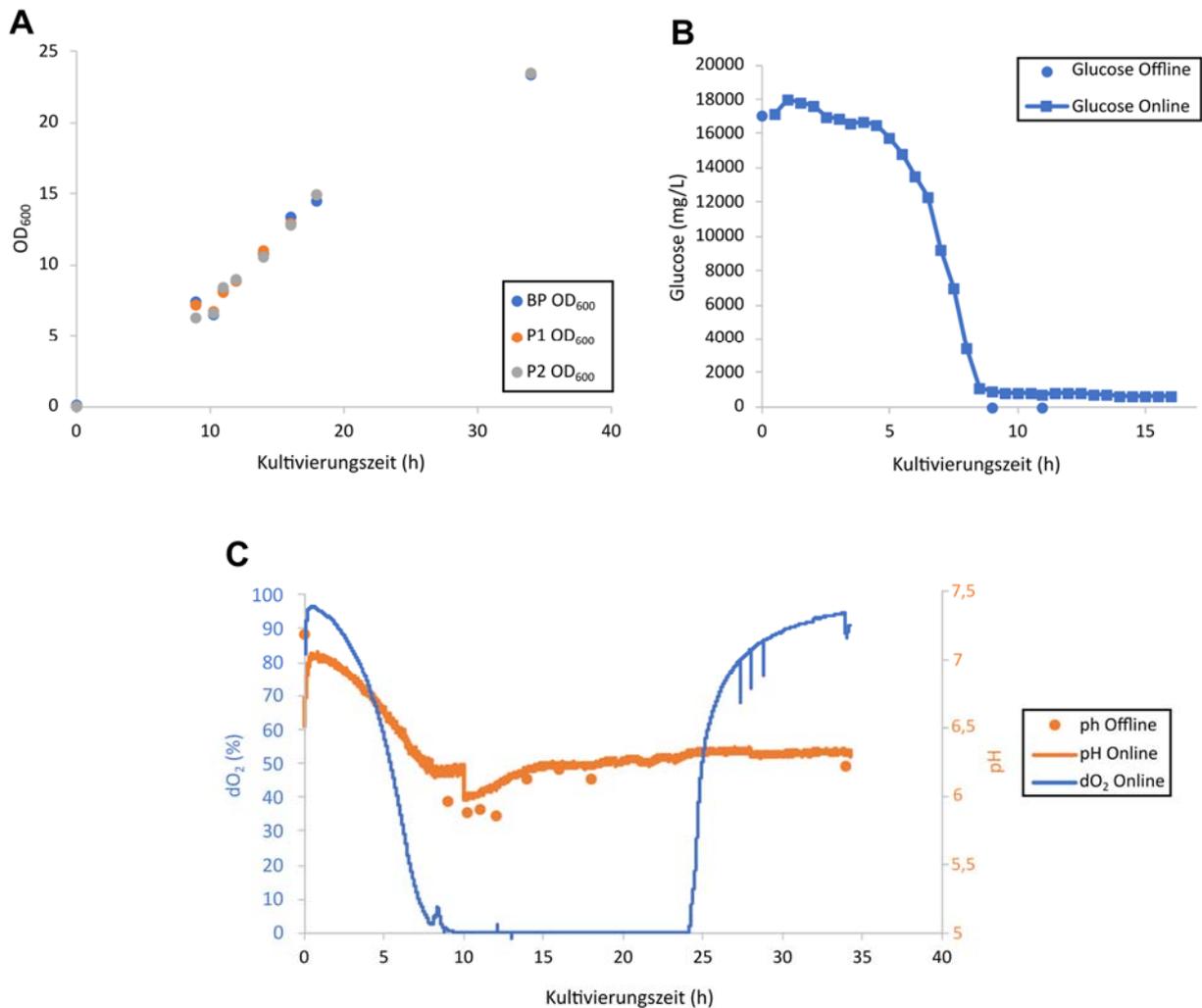


Abbildung 28: Messwerte der Kultivierung von *S. cerevisiae*. A: Verlauf der optischen Dichte (OD₆₀₀) bei der Kultivierung im Schüttelkolben ohne Sensorplattform und Pumpe (BP), mit Pumpe (1 mL min⁻¹, P1) und mit Pumpe und Sensorplattform (1 mL min⁻¹, P2). B: Verlauf der Glucosekonzentration gemessen mit dem TRACE-Gerät (Online) und nach manueller Probenahme (Offline). C: Verlauf der Sauerstoffsättigung und des pH-Wertes gemessen mit dem PreSens System (Online) und einem pH-Meter nach manueller Probenahme (Offline).

Auch bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* ist der Verlauf der optischen Dichte von der Vergleichsprobe, der Probe mit Pumpe und der Probe mit Pumpe und Sensorplattform nahezu identisch. Ein negativer Einfluss der Sensorplattform und der Pumpe auf das Zellwachstum ist also nicht erkennbar.

Der Verlauf der Sauerstoffsättigung zeigt abermals eine Limitierung durch die Begasung, da nach ca. 7 h eine Sättigung von 0 % im gelösten Sauerstoff vorliegt. Der Verlauf des pH-Wertes erfolgt, mit einem Absinken in den ersten 9 h der Kultivierung durch Entstehen von sauren Metaboliten, wie erwartet. Die Online gemessenen Werte sind zudem vergleichbar mit den Offline gemessenen pH-Werten, die wiederum durch den Transport und die Temperaturunterschiede leicht variieren.

Der Verlauf der Glucosekonzentration ist abermals wie zu erwarten. Innerhalb von 9 h ist die Glucose nahezu vollständig verbraucht. Die Onlinemesswerte stimmen auch hier gut mit den Offline gemessenen Proben überein.

Das Sensorsystem kann daher für die Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* eingesetzt werden. Bei der Kultivierung von CHO-Zellen ist ein Einsatz jedoch schwierig, da die Verwendung einer Peristaltikpumpe einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Hier muss eine alternative kontinuierliche Pumpe gefunden werden, die das Wachstum nicht negativ beeinflusst.

Zusätzlich zur Online-Messung von Prozessparametern ist mit der Sensorplattform eine automatisierte Probenahme bei gleichzeitiger Filtration zum Entfernen von Zellen möglich. Um zu prüfen, ob mittels einer automatisierten Probenahme über die gesamte Kultivierungsdauer ein reproduzierbares Probenvolumen entnommen werden kann, wurden bei der Kultivierung von CHO-Zellen und *E. coli* mit der Sensorplattform Proben gezogen.

In Abbildung 29 ist das Probengewicht im Verlauf einer Batch-Kultivierung von CHO-Zellen über 96 h dargestellt.

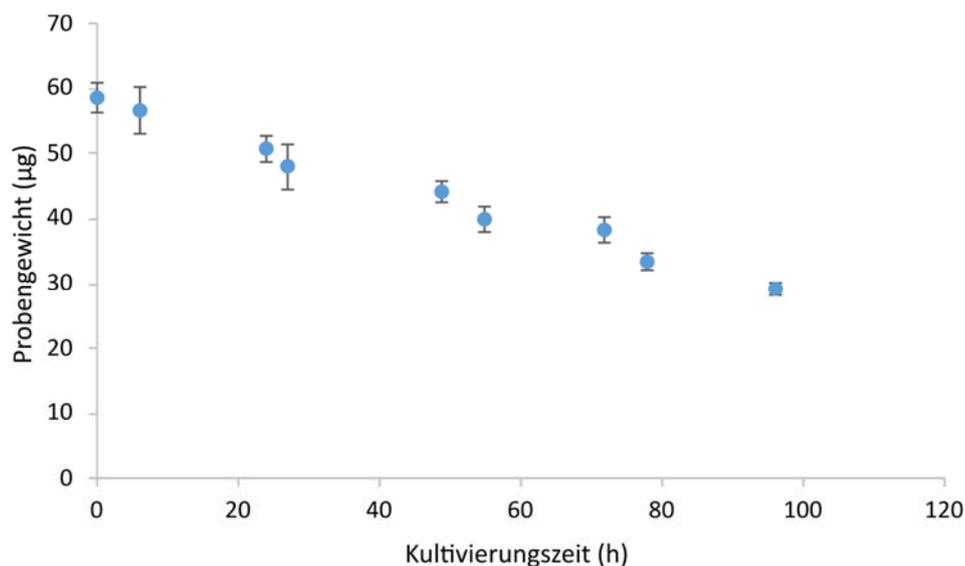


Abbildung 29: Gewicht der entnommenen Probe einer CHO-Kultivierung über die Kultivierungszeit von 96 h. Bei jeder Probenahme wurden drei Proben entnommen. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der drei Proben.

Über die Kultivierungsdauer nimmt das Probengewicht linear ab. Dies ist zu erwarten, da die Zellzahl zunimmt und der in der Sensorplattform integrierte Filter langsam verblockt. Das minimale Probenvolumen für den Einsatz mit einer μ LC-MS wurde auf maximal 20 μ L geschätzt. Hierdurch kann gewährleistet werden, dass trotz

Reduzierung des Reaktorvolumens um das Probenvolumen für die instrumentelle Analytik am Ende der Kultivierung kein negativer Einfluss zu erwarten ist. Zusätzlich bleibt der integrierte Filter über die Kultivierungsdauer intakt, da sonst ein sprunghafter Anstieg des gezogenen Probenvolumens durch ein Leck im Filter zu beobachten wäre.

In Abbildung 30 ist der Verlauf des Probengewichts bei einer Kultivierung von *E. coli* über die Zeit von 10 Stunden dargestellt.

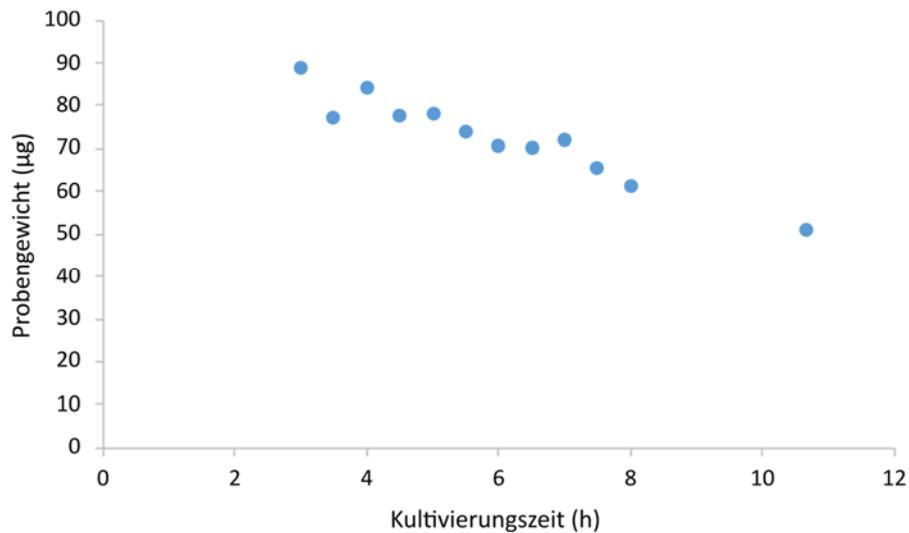


Abbildung 30: Gewicht der entnommenen Probe einer *E. coli* Kultivierung über die Kultivierungszeit von 10 Stunden.

Auch bei der Probenahme aus der *E. coli*-Kultur ist eine Abnahme des Probengewichts über die Kultivierungszeit zu beobachten. Jedoch wurden auch bei dieser Batch-Kultivierung immer noch deutlich mehr als 20 µL Probenvolumen am Ende der Kultivierung entnommen. Darüber hinaus ist kein sprunghafter Anstieg beim Probenvolumen zu beobachten, was bedeutet, dass der eingesetzte Filter auch bei der Kultivierung von *E. coli* intakt geblieben ist.

Sowohl bei der Kultivierung von CHO-Zellen als auch von *E. coli* wurde durch die automatisierte Probenahme über die gesamte Kultivierung genügend Probe entnommen. Zusätzlich war die eingebaute Filtermembran in beiden Kultivierungen über die gesamte Kultivierungsdauer intakt.

2.5 Entwicklung von Methoden zur Atline-Analyse mittels μ LC-MS-Kopplung

2.5.1 Einleitung

Da es gelungen ist mit der Sensorplattform den Nährstoff Glucose und das Stoffwechselprodukt Laktat mittels miniaturisierter Sensorik zu erfassen (siehe Abschnitt 2.2.2.2), mussten im Rahmen dieses Arbeitspaketes vor allem Aminosäuren durch die instrumentelle Analytik mittels μ LC-MS analysiert werden. Ein Ziel bestand hierbei einen Messzyklus von unter 5 Minuten zu erreichen, um die Parallelisierung mehrerer Reaktoren zu ermöglichen. Hierzu wurden verschiedene Ansätze zur Erreichung dieses Ziels geprüft. Eine alternative Variante mit längerem Messzyklus und dem Ziel, Produkt- und Eduktkontrollen parallel durchzuführen, wurde ebenfalls evaluiert.

Ein Säulenscreening für geeignete Trennphasen wurde für standardisierte Säulendurchmesser zu Beginn der Projektarbeiten durchgeführt. Einige Trennphasen wurden in den benötigten Dimensionen nicht kommerziell angeboten und mussten über Drittanbieter hergestellt werden. Insgesamt wurden miniaturisierte Säulen mit Trennphasen für die Hydrophile Interaktions-Chromatographie (HILIC), Umkehrphasen-Chromatographie (RP), Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und porösem graphitisiertem Kohlenstoff (PGC) auf ihre Eignung untersucht.

Hierzu wurden die Säulen zunächst in eindimensionalen HPLC-Experimenten getestet. Um Produktkontrolle und Eduktkonzentration möglichst parallel zu erfassen, wurden im Anschluss zweidimensionale HPLC-Messungen durchgeführt. Auf diese Weise konnten verschiedene Trennmechanismen kombiniert werden, um sowohl die Selektivität zu verbessern als auch die Peakkapazität zu maximieren und dadurch die Erfassung des Antikörpers und der Aminosäuren in einer Methode zu realisieren.

Mit Abschluss dieses Arbeitspakets standen verschiedene Ansätze zum Monitoring der entsprechenden Parameter zur Verfügung. Alle Methoden weisen spezifische Vor- und Nachteile auf und wurden auf ihre potenzielle Anwendbarkeit in der industriellen Prozessanalytik überprüft.

2.5.2 Der Systemaufbau

Um die Erfassung des monoklonalen Antikörpers (mAb, monoclonal Antibody) und der Aminosäuren (AA, amino acids) in einer Methode zu gewährleisten, muss ein komplexes Säulenschaltssystem implementiert werden. Hierzu kam eine NanoLC 425 der Serie Eksigent 400 von Sciex zum Einsatz. Dieses System ist mit zwei binären und einer isokratischen Pumpe sowie einem 6-Port-Ventil und zwei 10-Port-Ventilen ausgestattet. Damit lassen sich durch Lösungsmittelmodulation auch inkompatible chromatographische Trennmechanismen miteinander kombinieren. Zusätzlich zum Massenspektrometer für das Monitoring der AAs, wurde auch ein UV-Detektor zur Kontrolle des mAb eingesetzt. Eine schematische Zeichnung des Analysesystems ist in Abbildung 31 dargestellt.

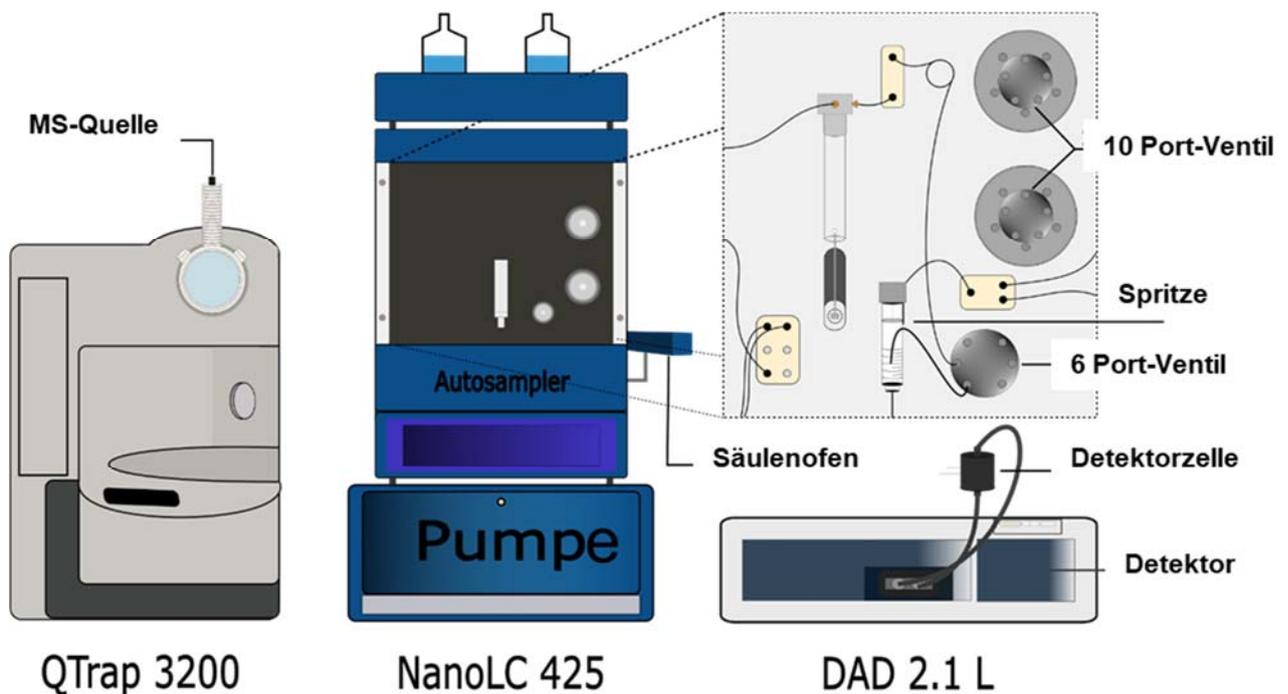


Abbildung 31: Skizze des Messsystems zur Implementierung der komplexen Säulenschaltung für die parallele Analyse der AAs und mAbs, bestehend aus einer Sciex NanoLC 425, einem Knauer DAD 2.1 L und einem Sciex QTrap 3200 Massenspektrometer.

Zu Beginn des Projektes wurde eine Säulenschaltung geplant, die in der Lage sein sollte, die Abtrennung des Produktes von der Matrix und die parallele Bestimmung des mAb und der AAs durchzuführen. Hierfür sollten insgesamt vier verschiedene Trennphasen verwendet werden. Zur Auftrennung und Analyse des komplexen Stoffgemisches waren insgesamt drei Schaltvorgänge angedacht. Diese drei Schritte sind in Abbildung 32 dargestellt.

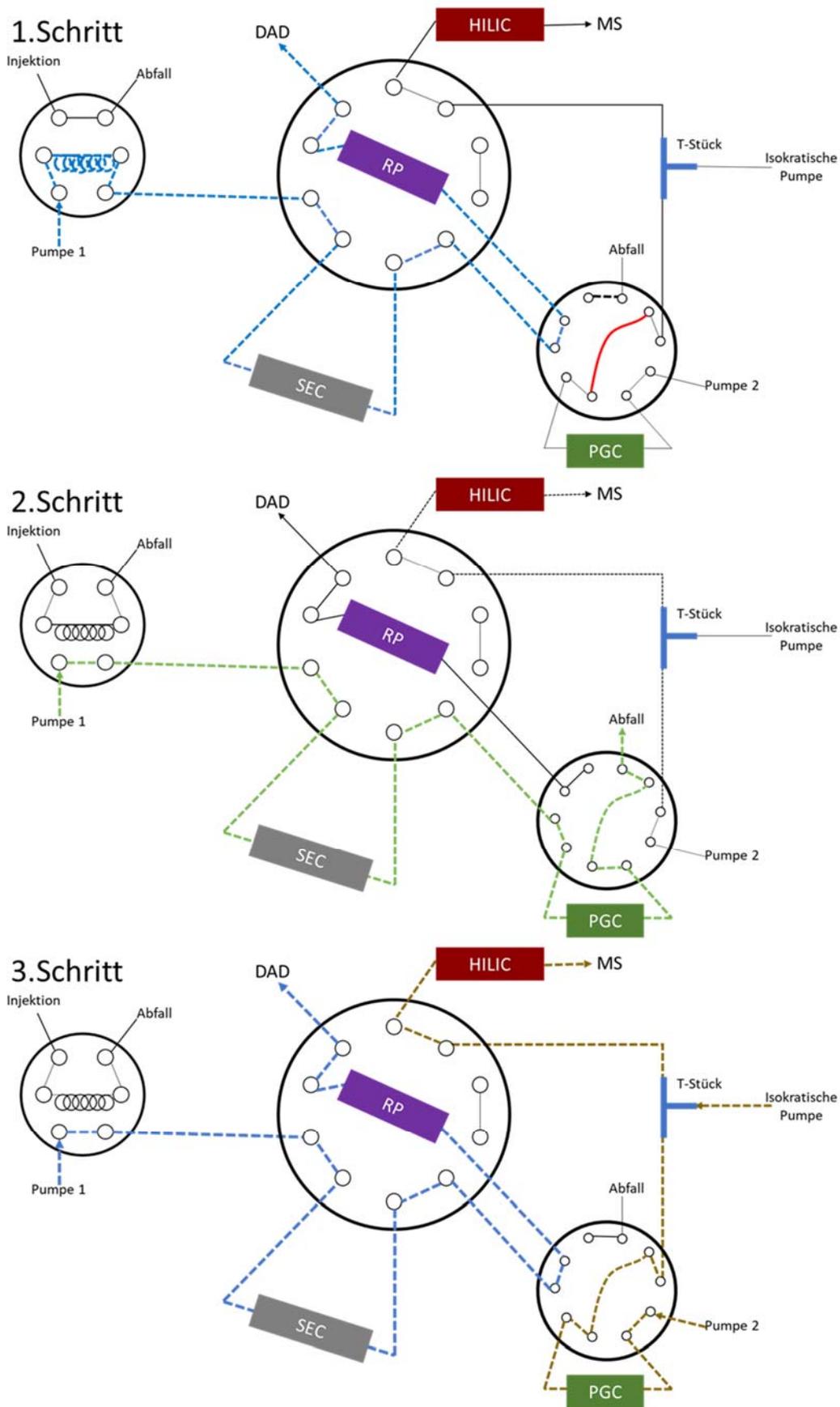


Abbildung 32: Säulenschaltkonzept zur parallelen Produkt- und Eduktkontrolle. Für weitere Informationen: siehe Text.

Im ersten Schritt findet die Trennung von Aminosäuren und des monoklonalen Antikörpers auf der SEC-Säule statt. Die Aminosäuren verweilen länger auf der Säule, während der mAb auf die RP-Säule eluiert und dort rein wässrig angereichert wird.

Im zweiten Schritt werden das 6-Wege-Ventil zur Reduktion des Gradientenverweilvolumens, und das 10-Wege-Ventil geschaltet, um die Aminosäuren von der SEC-Säule auf die PGC-Säule zu eluieren und dort anzureichern. Anschließend wird auf ein organisches Lösungsmittel umgespült, um die Kompatibilität mit der HILIC-Säule zu verbessern. Gleichzeitig wird die HILIC-Säule mit einer isokratischen Pumpe konditioniert.

Im dritten Schritt wird erneut das 10-Wege-Ventil geschaltet, um die Aminosäuren auf der HILIC-Säule über Pumpe 2 aufzutrennen und mittels Massenspektrometrie zu detektieren. Gleichzeitig wird der mAb mittels Pumpe 1 organisch von der RP-Säule eluiert und mittels DAD (Diode Array Detector) detektiert. Zur Überprüfung der experimentellen Umsetzbarkeit dieser Schaltung mussten in erster Instanz die chromatographischen Trennschritte einzeln betrachtet werden.

2.5.3 Größenausschluss-Chromatographie

Aufgabe der SEC ist die Abtrennung des mAb von der Matrix sowie die Entfernung weiterer Proteine von den AAs. Die Trennung von großen und kleinen Molekülen auf einer SEC-Säule basiert auf der Zugänglichkeit der Poren der stationären Phase. Die Zugänglichkeit wird über die Porengröße und Porengrößenverteilung bestimmt. Der mAb kann aufgrund seiner Größe nur in sehr große Poren diffundieren. Dadurch bedarf es eines geringeren Volumens, um den mAb zu eluieren. Die AAs können hingegen auch in die kleinen Poren diffundieren, wodurch sich die Verweilzeit gegenüber großen Molekülen erhöht. Es findet eine Auftrennung auf Basis des hydrodynamischen Durchmessers statt.

Für die SEC-Trennung wurde eine YMC-SEC MAB-Säule verwendet. Der Versuchsaufbau bestand aus einem eindimensionalen HPLC-System mit DAD-Detektion, weshalb die UV-aktiven Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tryptophan (Trp) sowie der monoklonale Antikörper Trastuzumab (TTZmAb) als Modellanalyten ausgewählt wurden. Die Probenkonzentration betrug $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ für TTZmAb und jeweils $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ für die Aminosäuren. Alle Proben wurden isokratisch bei einer Salzkonzentration von 50 % (PBS) und einer Flussrate von $5 \mu\text{L min}^{-1}$ (90 bar)

gemessen. Alle Analyten eluieren in der Nähe der Totzeit, was zu keiner erfolgreichen Trennung von monoklonalem Antikörper und Aminosäuren führte. Des Weiteren wurden bei dieser Stoffkonzentration bereits Anzeichen einer Massenüberladung der Säule beobachtet. Die Trennung der Substanzen ist in Abbildung 33 dargestellt.

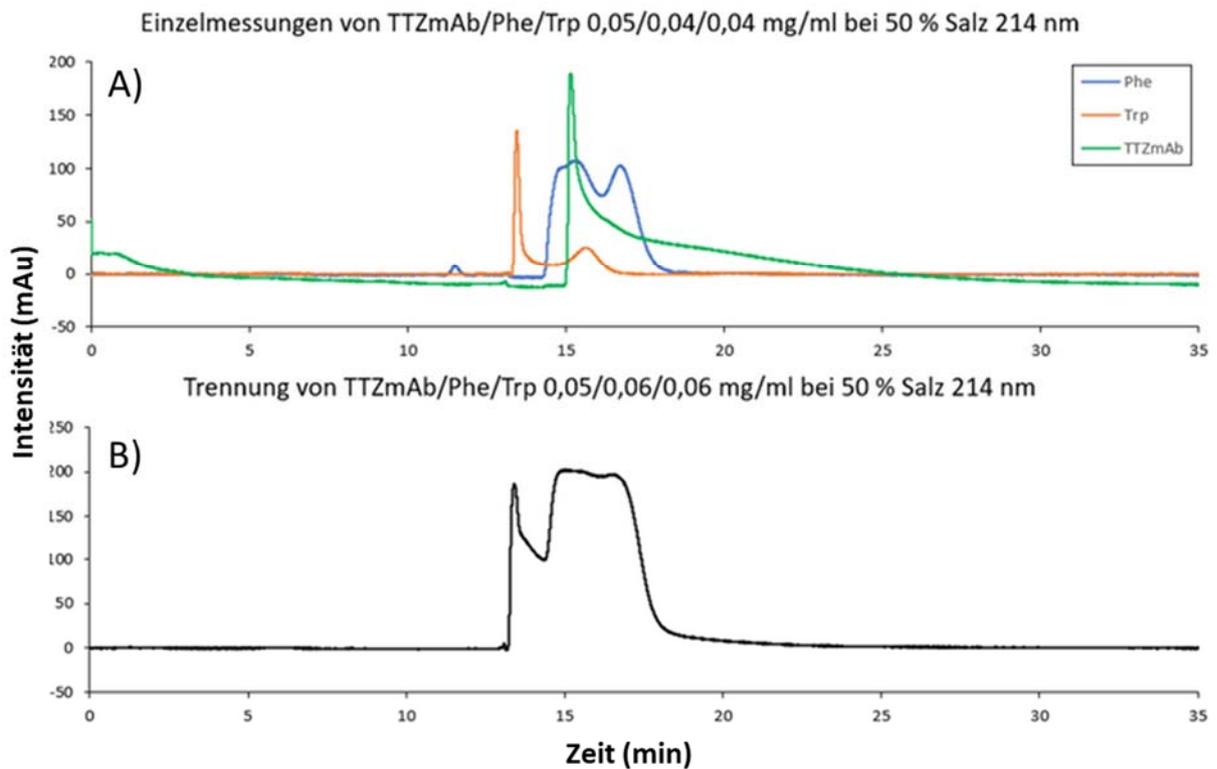


Abbildung 33: SEC-Trennung der chromophoren Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tryptophan (Trp) sowie des Antikörpers Trastuzumab (TTZmAb). A) Einzelinjektionen der Analyten. B) Injektion des Substanzgemisches.

Das Experiment zeigte, dass die YMC-SEC MAB-Säule nicht in der Lage war, Aminosäuren von monoklonalen Antikörpern zu trennen. Daher ist die SEC für die Auftrennung der komplexen Biomatrix in dieser Anwendung nicht geeignet. Zudem ist eine klassische SEC-Trennung sehr zeitaufwendig. Aufgrund des geringen Drucklimits von 140 bar der stationären Phase kann die Flussrate nicht weiter erhöht werden und damit das Ziel einer maximalen Analysezeit von 5 Minuten nicht erreicht werden. Als alternativer Ansatz wurde überprüft, ob eine Abtrennung der AAs von dem mAb auf einer RP-Phase umgesetzt werden kann.

2.5.4 Umkehrphasen-Chromatographie

2.5.4.1 Einleitung

Im Grundkonzept der Säulenschaltung sollte auf der RP-Phase lediglich die Anreicherung bzw. das „Trappen“ des mAb erfolgen. Da der RP-Trennmechanismus auf den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase beruht, ist jedoch auch eine Aufreinigung des mAb von den AAs denkbar. MAb's weisen als hydrophobe Analyten eine starke Retention mit den hydrophoben Gruppen der RP-Phase auf. Damit verhält sich die Elutionsreihenfolge der beiden hier betrachteten Substanzklassen auf der RP-Phase genau invers zur SEC. Im Rahmen der nachfolgenden Experimente sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Abtrennung der AAs vom mAb möglich ist und ob für mAb's eine Nachweisgrenze von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht werden kann. Die Versuche hierzu erfolgten auf einer YMC-Triart Bio C4 ($3 \mu\text{m } 0,3 * 100 \text{ mm}$).

2.5.4.2 Aufreinigungsversuch des mAb

Zur Überprüfung der Eignung der C4-Säule auf die Abtrennung der AAs wurde der Mix aus Kapitel 2.5.3 erneut als Modellmischung genutzt. Die Anreicherung des mAb erfolgte bei einem niedrigen Anteil an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase und unterschiedlich langen isokratischen Plateaus vor Beginn des Lösungsmittelgradienten. Nach 1,5, 3,0 und 6,0 min erfolgte eine Erhöhung des organischen Lösungsmittels auf 35 %. Die resultierenden Chromatogramme sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

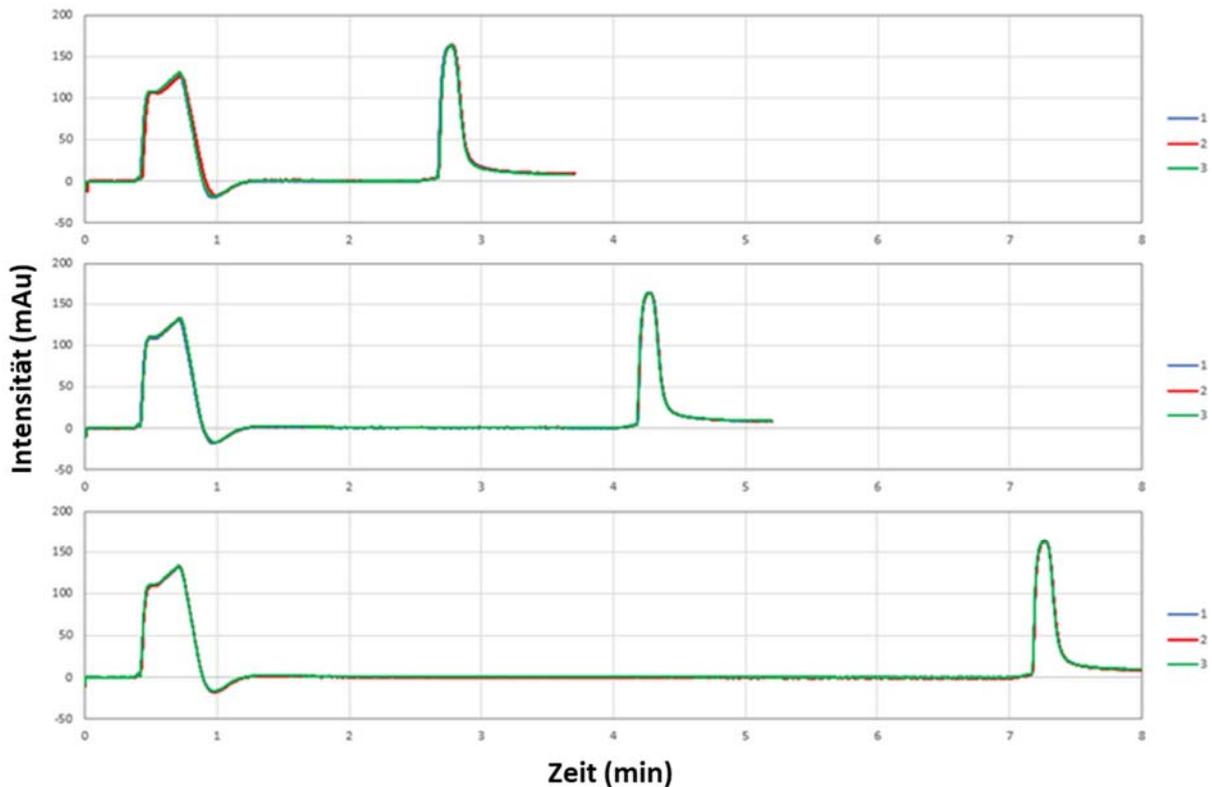


Abbildung 34: Versuchsreihe zur Abtrennung der Matrix vom mAb. Chromatogramm-Darstellung von jeweils drei übereinander gelegten Wiederholungsmessungen (1, 2, 3) bei einer Plateauzeit von 1,5 min, 3,0 min und 6,0 min vor Beginn des Lösungsmittelgradienten.

Wie in Abbildung 34 zu sehen, ist eine Abtrennung des mAb von den AAs möglich. Die untersuchten AA eluieren mit der Totzeit des Systems. Das „Trapping“ des Antikörpers konnte durch die Variation der Plateauzeit nachgewiesen werden. Der Retentionszeitshift des mAb-Peaks entspricht der Dauer der Plateauzeit. Damit kann auf die im zuvor beschriebenen Säulenschaltkonzept aufgeführte SEC verzichtet und die Methode auf drei stationäre Phasen reduziert werden. Dadurch wird die Komplexität des Gesamtsystems reduziert, was wiederum vorteilhaft für den Einsatz in der Prozesskontrolle ist.

2.5.4.3 Bestimmung der Nachweisgrenze des monoklonalen Antikörpers

Zunächst wurde ermittelt, ob eine untere Nachweisgrenze von ca. 50 ng absolut erreicht werden kann. Hierzu wurde eine Kalibration im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ angesetzt. Die Kalibration wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Säulentemperatur wurde auf 60 °C eingestellt und ein Injektionsvolumen von 10 μL appliziert. Die resultierende Kalibriergerade ist in Abbildung 35 dargestellt.

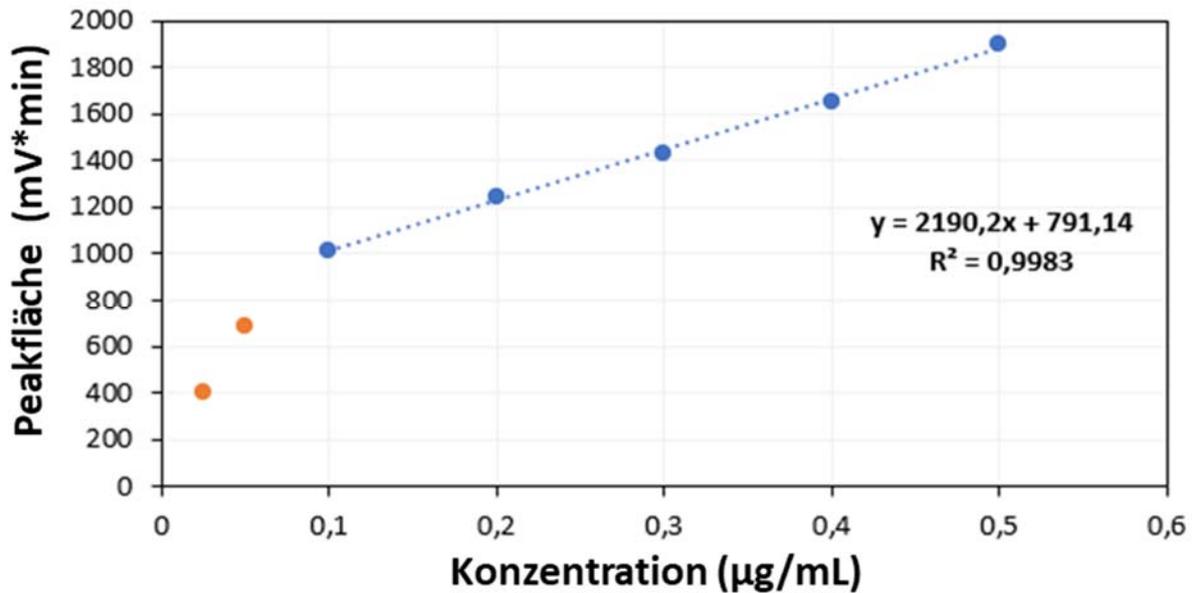


Abbildung 35: Kalibriergerade zur Erfassung der Bestimmungsgrenze des Antikörpers. Orange dargestellt sind niedrige Konzentrationen außerhalb des linearen Bereichs.

Die Kalibration zeigt bei einer Konzentration unterhalb von $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ einen starken Abfall der Peakflächen. Dieser lässt sich auf nicht bioinerte Systemkomponenten zurückführen. Auch ohne Optimierung des Systems lässt sich so jedoch bereits die kritische Nachweisgrenze von 50 ng absolut erreichen. Es konnten Substanzmengen von $2,5 \text{ ng}$ absolut nachgewiesen werden. Dadurch war es nicht erforderlich, den proteolytischen Verdau durch immobilisiertes Trypsin in einer Reaktionssäule zur Quantifizierung spezifischer Fragmente mittels MS durchzuführen, wie er im Antrag definiert war. In Abbildung 36 ist die Messung für die Produktkontrolle dargestellt. Hier konnte die angestrebte Zykluszeit von 5 min erreicht werden.

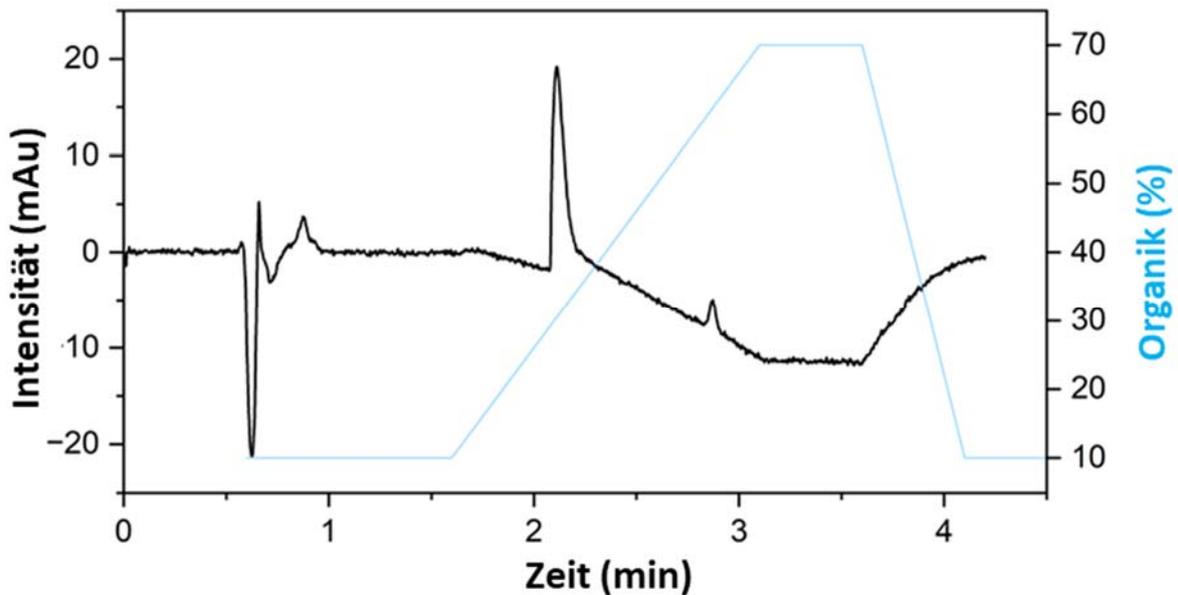


Abbildung 36: Chromatogramm von TZZmAb bei einer Retentionszeit von 2,1 min auf einer YMC-Triart Bio C4-Säule (3 μm , 0,3 x 100 mm); Mobile-Phase: A: H_2O + 0,1% FA; B: ACN + 0,1% FA; Säulentemperatur: 60 $^\circ\text{C}$; Injektionsvolumen: 500 nL; Flussrate: 20 $\mu\text{L min}^{-1}$; Konzentration des mAb 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in H_2O , Detektor: DAD bei 214 nm.

2.5.5 Hydrophile Interaktions-Chromatographie

Anders als bei der RP-Phase, bei welcher hydrophobe Wechselwirkungen zur Trennung genutzt werden, beruht die HILIC-Chromatographie auf hydrophilen Wechselwirkungen des Analyten mit der immobilisierten polaren mobilen Phase. HILIC ist daher ideal für vorwiegend polare und hydrophile Analyten wie AAs geeignet, die auf einer klassischen Umkehrphase nicht retardiert werden. Hierdurch ergibt sich jedoch, dass ein Lösungsmittelwechsel vorgenommen werden muss.

Für erste Experimente wurden 17 AA auf einer YMC-Triart Diol-HILIC (0,3 * 100 mm) mit einem Gradienten getrennt. Hierbei eluierten alle Komponenten in einem Zeitfenster von 2 min, was zu einer Coelution der meisten AA führte. Die Ergebnisse sind für ausgewählte AA in Abbildung 37 dargestellt.

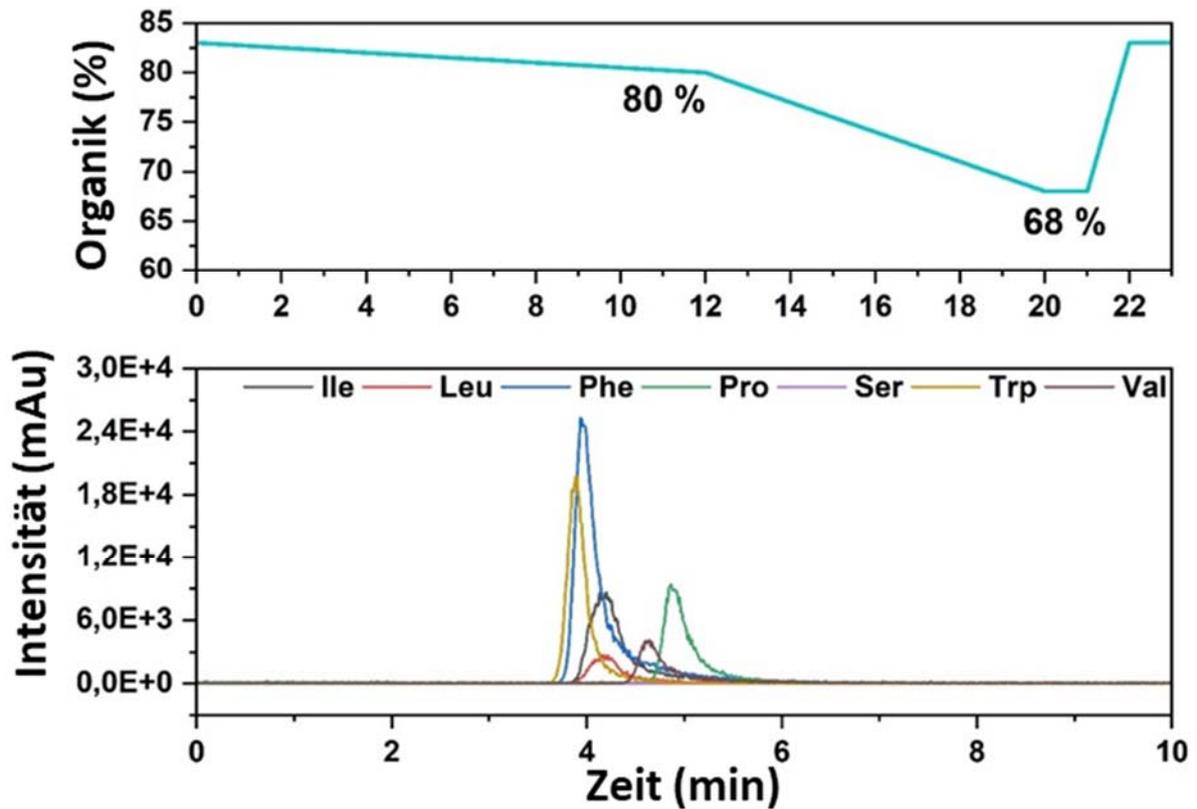


Abbildung 37: Chromatogramm von Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe), Prolin (Pro), Serin (Ser), Tryptophan (Trp) und Valin (Val). Die Trennung erfolgte auf einer YMC-Triart Diol-HILIC (0,3 * 100 mm), mit einem Injektionsvolumen von 500 nL. Alle AAs hatten eine Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ und wurden mit einer Flussrate von $4 \mu\text{L min}^{-1}$ bei Raumtemperatur eluiert.

Durch eine Anpassung der Startbedingungen des Gradienten von 82,5% auf 90% Organik und eine Erhöhung der Flussrate auf $6 \mu\text{L min}^{-1}$ konnte eine bessere Auftrennung der AAs erzielt werden (vergl. Abbildung 36). Jedoch wurde hierdurch eine deutliche Verschlechterung der Peakform der spät eluierenden Substanzen wie Histidin und Lysin beobachtet. Erst ab einem Equilibrierungsvolumen von acht Säulenvolumina lag die Standardabweichung der Retentionszeiten aller detektierten Peaks unter 1%. Die Elutionsreihenfolge der 17 Aminosäuren kann Tabelle 2 entnommen werden.

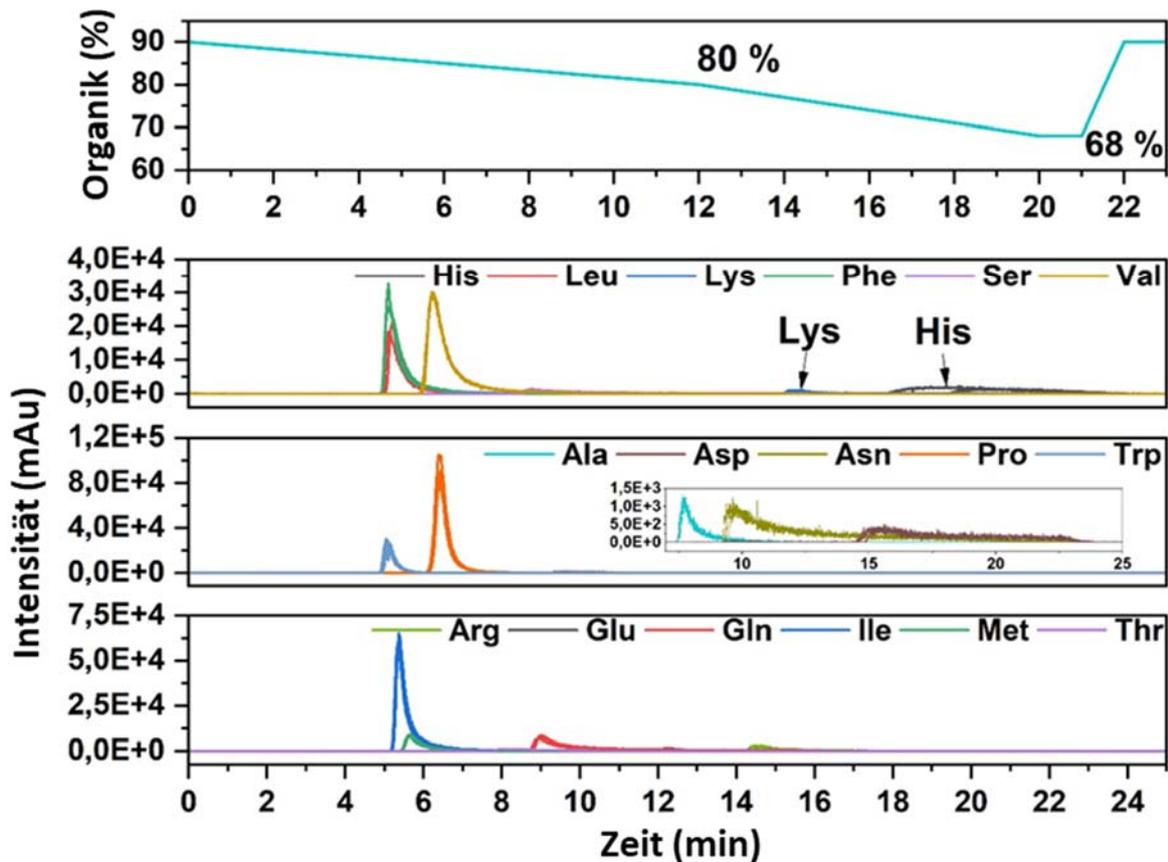


Abbildung 38: Messungen aller 17 AAs auf der YMC-Triart Diol-HILIC (0,3 * 100 mm) mit einem Injektionsvolumen von 500 nL. Erhöhung der Flussrate auf 6 $\mu\text{L min}^{-1}$. Alle AAs hatten eine Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ und wurden bei Raumtemperatur eluiert.

Tabelle 2: Elutionsreihenfolge der 17 untersuchten Aminosäuren

Analyt	Retentionszeit min	Analyt	Retentionszeit min
Trp	5,04	Phe	5,08
Ile	5,16	Leu	5,17
Met	5,72	Val	6,02
Pro	6,22	Ala	7,73
Thr	8,28	Ser	8,89
Gln 1	9,18	Lys 1	9,21
Asn	9,78	Glu	12,64
Arg	14,34	Gln 2	15,17
Lys 2	15,19	Asp	15,41
Asp	18,97	---	---

Der Einfluss der Zusammensetzung des Injektionspfropfens auf die Peakform bei der HILIC-Trennung wurde untersucht, indem drei verschiedene Konzentrationen (1000, 100 und 10 ng mL^{-1}) der 17 Aminosäuren in reinem Wasser anstelle von 10/90 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ analysiert wurden. Alle Peaks zeigten eine Verbreiterung und ein „Fronting“

mit einer durchschnittlichen Breite von etwa 5 min. Die Peakbreite verringerte sich mit abnehmender Probenkonzentration. So betrug bei einer Konzentration von 10 ng mL^{-1} die Peakbreite etwa 4 min. Bei dieser Konzentration konnten jedoch nur Ala, Ile, Leu, Phe, Pro und Val nachgewiesen werden.

Durch das Ansetzen der Analyten in 90% Acetonitril wurden die negativen Effekte reduziert. Die Peaks wurden schärfer und das „Fronting“ verringert, was zu einer durchschnittlichen Peakbreite von etwa zwei Minuten führte. Zusätzlich konnten zwei weitere Aminosäuren (Asn und Met) nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 100 ng mL^{-1} wurden die meisten Aminosäuren detektiert. Die Ergebnisse unterstreichen damit die Bedeutung der Anpassung der mobilen Phase bei der Übertragung von der ersten auf die zweite Dimension. Wasser hat eine hohe Elutionskraft und beeinträchtigt den HILIC-Trennmechanismus, was zu geringerer Reproduzierbarkeit führt.

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass die Realproben entweder vor Injektion in organischen Lösungsmitteln verdünnt oder ein Lösemittelwechsel während der Messung stattfinden muss, um eine Trennung der Analyten auf der HILIC-Phase zu erreichen. Zwar lässt sich eine Antrennung der AA per HILIC erreichen, dennoch kann keine Basislinientrennung erreicht werden, was die Nutzung eines Massenspektrometers für die Identifizierung der einzelnen Komponenten notwendig macht. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Bestimmung mittels UV-Detektion durch fehlende Chromophore der meisten nativen AA keine Alternative ist. Sollte eine vollständige Basislinientrennung erreicht werden, könnte eine Bestimmung über einen Lichtstredetektor (ELSD) eine kostengünstigere Lösung für die Prozesskontrolle darstellen. Ein weiterer Nachteil der HILIC Methodik ist die langwierige Equilibrung von mindestens acht Säulenvolumina, wodurch eine zusätzliche Verlängerung der Zykluszeit resultiert. Deshalb wurden auf der PGC-Phase auch Ansätze zur nativen Trennung der AA untersucht.

2.5.6 Poröser graphitisierter Kohlenstoff

Der Trennmechanismus der PGC-Säulen setzt sich aus einer Kombination aus hydrophoben Wechselwirkungen, π - π -Wechselwirkungen und sterischen Effekten zusammen. Das Phasenmaterial besteht aus porösem graphitierten Kohlenstoff, der eine spezielle Oberflächenstruktur aufweist, die sowohl hydrophobe als auch π - π -

Wechselwirkung mit den Analyten ermöglicht. In der Säulenschaltung sollte über die PGC-Phase das Trapping der AAs sowie der Wechsel der mobilen Phase zwecks Kompatibilitätssteigerung zur HILIC Phase erfolgen. Basierend auf diesen Experimenten wurde zusätzlich überprüft, ob eine Trennung direkt auf der PGC-Säule möglich ist. Hierdurch könnte auf den Einsatz der HILIC-Trennung verzichtet und das Säulenschaltkonzept erneut vereinfacht werden.

Ein „Trapping“ der AAs auf der PGC-Phase war selbst bei einem Anteil von 1% des organischen Lösungsmittels nicht möglich. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit einer 100% wässrigen mobilen Phase durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurden mehrere Experimente durchgeführt, die in Abbildung 39 zusammengefasst sind. Hierbei wurde das Elutionszeitfenster der 17 AAs gewählt, in dem alle AA eluiert sind. Das Experiment A mit 1% ACN wurde als Ausgangspunkt für den Vergleich mit den anderen Experimenten verwendet. Bei 1% ACN wurde bereits ein starkes „Tailing“ der AA beobachtet, was zu einer Gesamtelutionszeit von 1,73 min führte (siehe Abbildung 39A).

Für das Folgeexperiment mit einer mobilen Phase von 100% Wasser wurde die Temperatur auf 60 °C erhöht (siehe Abbildung 39B). Die Erhöhung der Temperatur führte zu einer Minimierung des Tailings und beschleunigte den Trennprozess. Gleichzeitig wurde eine Verbesserung der Selektivität beobachtet, wodurch sich die Auflösung der kritischen Peakpaare verbesserte. Im Vergleich zu Versuch A führte Versuch B zu einer Verringerung des Elutionszeitfensters auf 1,03 min.

Bei Versuch C wurde die Temperatur auf Raumtemperatur (RT) gesenkt. Met eluiert in diesem Experiment bei einer Retentionszeit von 2.51 min und wird von den anderen AAs getrennt. Das Elutionszeitfenster betrug 1,49 min und war damit um 0,25 min kürzer als in Versuch A. Bei Ile und Leu handelt es sich um Isobare, was zu ähnlichen Massenübergängen führt, so dass es nicht möglich ist, sie mit einem Triple-Quad-MS bei einer Coelution voneinander zu unterscheiden. Durch die Senkung der Temperatur konnten die isobaren chromatographisch getrennt werden.

In einem weiteren Experiment wurde ein beobachteter Phantomfluss des Systems und die Auswirkung auf die Trennung untersucht. Bei einer Pumpleistung von 0%, wurde dennoch ein Fluss von etwa 100 nL min⁻¹ erzeugt. Deshalb wurde in Versuch D das Lösungsmittel B in ACN/H₂O (50/50) geändert, wodurch der mögliche organische Einfluss des Phantomflusses effektiv halbiert würde. Die Analyten zeigten hierdurch

eine höhere Retention. Ala, Asn, Pro, Ser, Thr und Val eluierten bereits in den ersten zwei Minuten, gefolgt von Asp, Glu, Ile, Leu und Met. Ile und Leu wiesen erneut Doppelpeaks auf, sowie eine deutliche Peakverbreiterung und geringere Peakhöhen. Des Weiteren verlängerte sich die Gesamtelutionszeit von 1,49 min auf 3,42 min, was einer Steigerung von ca. 130% entspricht. All dies deutet darauf hin, dass der Phantomfluss eine Auswirkung hat und dass die Trennung durch einen Wechsel des Lösungsmittels in der Pumpe 1 B verbessert werden konnte. Dies zeigt, dass selbst ein geringer Anteil an organischem Lösungsmittel die Retention von AAs auf der PGC-Säule erheblich verringert.

In den weiteren Experimenten wurde die Säule mit Eis auf ca. 4 °C gekühlt. Das über Pumpe B geförderte Lösungsmittel enthielt weiterhin ACN/H₂O (50/50). Unter diesen Randbedingungen wurden die Chromatogramme in Abbildung 39 E erhalten. Es wurden eine Verlängerung der Retentionszeit, eine Bandenverbreiterung und ein Verlust der Peakhöhe beobachtet. Die Gesamtelutionszeit stieg auf 4,81 min, wobei Ala, Thr und Ser von Val und Pro getrennt wurden. Darüber hinaus wurden Arg und His zurückgehalten, bis der organische Anteil zunahm. Sie eluierten zusammen mit Phe und Trp zu Beginn des Plateaus.

Für Experiment F wurde Gradient B wieder auf reines ACN umgestellt (siehe Abbildung 39 F). Dies hatte keinen Einfluss auf die Trennung. Met zeigte ein stärkeres Tailing, woraufhin das Elutionszeitfenster auf 5,23 min erhöht wurde. His und Arg eluierten außerhalb des Gradienten nach 10 min und 16 min und sind deshalb nicht dargestellt. Insgesamt nahm die Peakhöhe der Analyten durch geringere Bandenverbreiterung zu. Das Konzept der Trennung nativer AA auf der PGC ist damit vielversprechend.

Die Experimente zeigen, dass eine Trennung der nativen AA unter isokratischen, rein wässrigen Bedingungen auf der PGC Säule möglich ist. Die Auflösung der AA war besser als auf der HILIC-Phase. Ein weiterer Vorteil des Ansatzes ist, dass deutlich weniger organisches Lösungsmittel für die Analytik notwendig ist. Damit wäre für das Gesamtkonzept eine 2D-LC-Methode, bestehend aus einer RP-PGC Kopplung, ausreichend, um eine parallele Bestimmung des mAb und der AA durchzuführen.

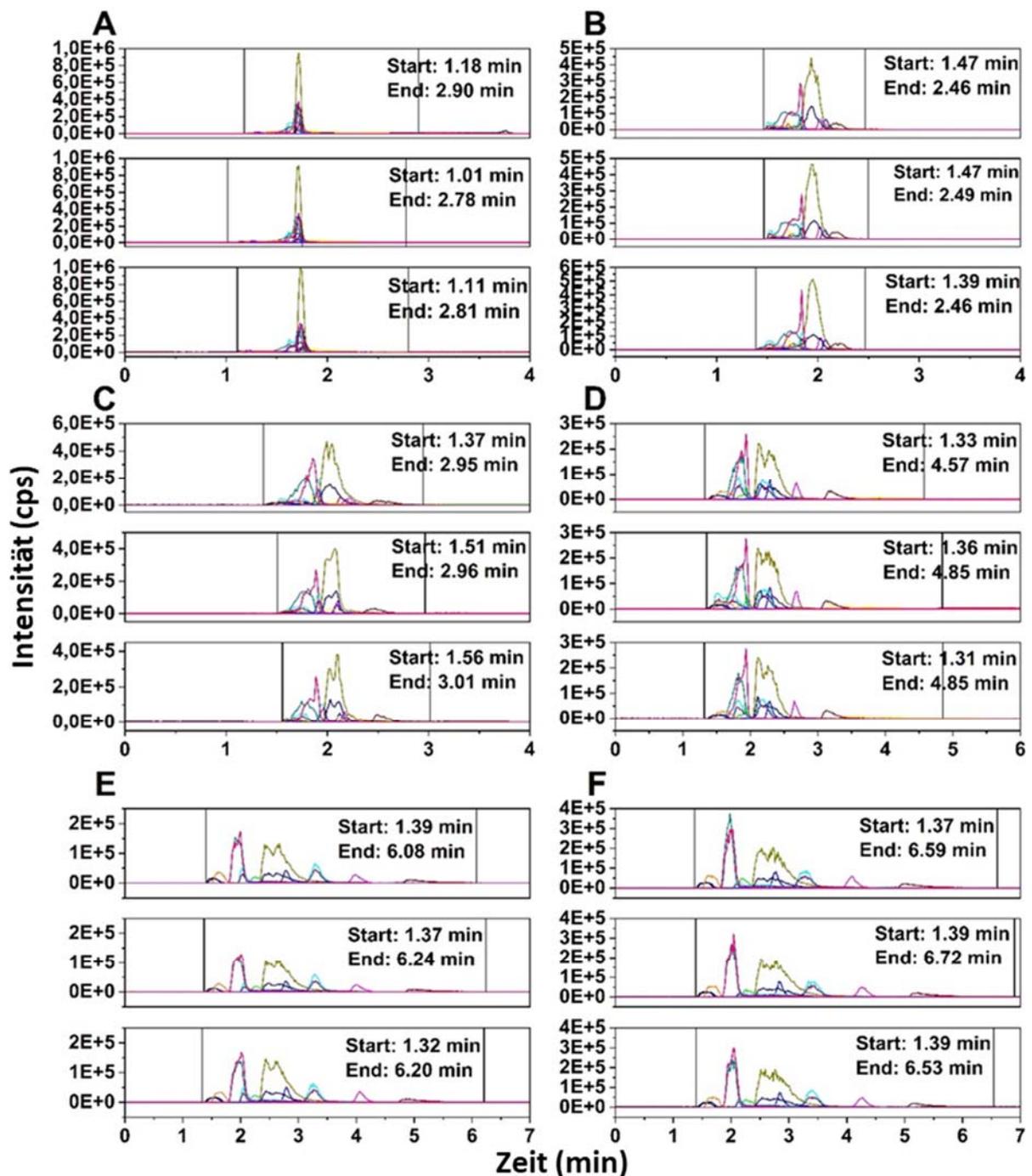


Abbildung 39: Chromatogramme zur Trennung der AA auf der Hypercarb PGC-Säule. Probeninjektion: 17 AAs mit einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, Injektionsvolumen: $1,1 \mu\text{L}$. Bei einer Flussrate von $6 \mu\text{L min}^{-1}$. A) Startpunkt für den Vergleich: Messung bei RT mit 1% ACN. B) Erhöhung der Temperatur auf $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und Ausschluss des organischen Teils des Lösungsmittels (0% ACN). C) Senkung der Temperatur auf RT bei 0% ACN. D) Das Lösungsmittel B wurde von reinem ACN auf ACN/H₂O (50/50) geändert. E) Abkühlung der Säule mit Eis auf etwa $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und Verwendung des Lösungsmittels ACN/H₂O (50/50). F) Temperatur von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und Wechsel des organischen Lösungsmittels B zu ACN.

2.5.7 Derivatisierung und Trennung mittels Umkehrphasen-Chromatographie

Vor allem der Einsatz eines Massenspektrometers als Detektor stellt eine Hürde für die Implementierung des Systems in der industriellen Prozesskontrolle dar. Dies liegt vor allem an den höheren Kosten, die mit der Anschaffung und Wartung von Massenspektrometern einhergehen. Zusätzlich sind Massenspektrometer komplexer in der Bedienung und erfordern spezialisierte Kenntnisse des Anwenders. Der Wartungsaufwand ist ebenfalls relativ hoch, da regelmäßige Kalibrierungen des Systems und wiederholte Reinigungen der Quelle notwendig sind, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Im Vergleich dazu sind UV-Detektoren einfacher zu handhaben und die Technologie kann einfacher miniaturisiert werden. Aufgrund dieser Faktoren wurde die Derivatisierung der AAs als alternativer Ansatz untersucht. Mit diesem Ansatz könnte eine parallele Analyse des mAb und der AA auf einem eindimensionalen RP-LC-System mit UV-Detektor realisiert werden.

Für die Versuche wurde ein Mix aus 13 AA derivatisiert. Die derivatisierte Probe wurde anschließend auf einer YMC Triart C18 mit einem generischen Gradienten getrennt und mittels DAD detektiert. Das Chromatogramm der derivatisierten AAs ist in Abbildung 40 dargestellt.

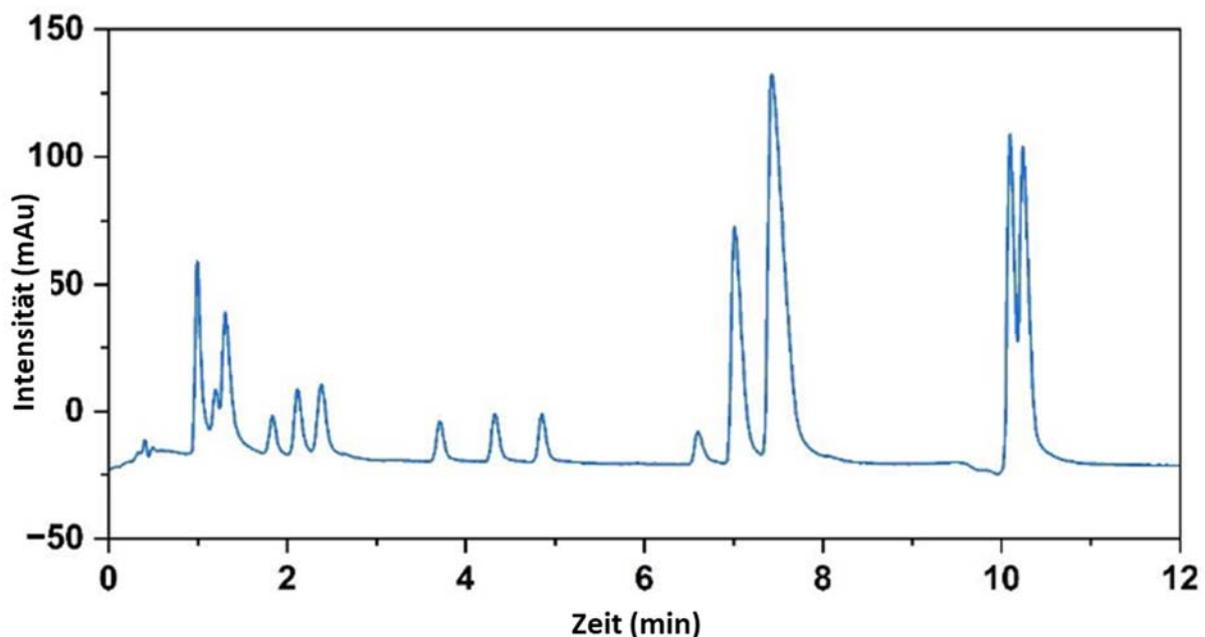


Abbildung 40: Chromatogramm der 13 derivatisierten AAs, die mit einem 1260 Infinity II DAD nachgewiesen wurden. Der Analysenmix bestand aus Ala, Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr und Val. Säule: YMC-Triart C18 (0,3 * 50 mm, 3 µm); Injektionsvolumen: 442 L; Säulentemperatur 30 °C und Flussrate 20 µL min⁻¹. 13 Analyt- und ein Derivatisierungspeak sind sichtbar.

Bei Anwendung der Derivatisierung auf die Probe aus dem Bioreaktor würde TTZmab ebenfalls mit dem Derivatisierungsmittel behandelt und über einen längeren Zeitraum einer erhöhten Temperatur von 55 °C ausgesetzt sein. Deshalb wurde überprüft, inwieweit sich die Derivatisierung auch auf einen möglichen thermisch-induzierten Abbau des Antikörpers auswirkt. Unabhängig von dem Protokoll blieb die Retentionszeit von TTZmab konstant. Beim Erhitzen wurden die Peakflächen und -höhen von TTZmab jedoch um 60% verringert (siehe Tabelle 3). Dies ist ein Hinweis, dass TTZmab bei längeren Expositionstemperaturen über 30 °C denaturiert. Dies deutet darauf hin, dass das Erhitzen auf 55 °C, selbst über einen Zeitraum von 10 min, zu einer gewissen Denaturierung von TTZmab führte. Solange dieser Prozess reproduzierbar ist, lässt sich das Konzept dennoch für die Prozesskontrolle umsetzen.

Tabelle 3: Liste der Peakflächen, Retentionszeiten, Peakhöhen und FWHMs von TTZmab mit verschiedenen Vorbehandlungen. Ohne Vorbehandlung auf 55 °C erhitzt und im Derivatisierungsmedium gemischt.

Versuch	Fläche mAU min	Retentions- zeit min	Höhe mAU	FWHM min
TTZmab	61,4	2,57	226	0,092
Heated	49,3	2,57	191	0,090
Derivatized	36,7	2,55	142	0,083

Die Derivatisierung von AAs ist bereits eine etablierte Form der Probenvorbereitung und die 13 untersuchten AAs wurden auf der C18-Säule sowohl angereichert und getrennt. Diese Experimente deuteten darauf hin, dass die Realprobe auch in Gegenwart von TTZmab derivatisiert werden kann. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Temperatur während der Probenvorbereitung die Denaturierung von TTZmab beschleunigt.

2.6 Matrixabtrennung und Analytanreicherung mittels Atline-Probenaufbereitung

2.6.1 Einleitung

Wie in Kapitel 2.2.4. gezeigt, konnten partikuläre Bestandteile der Proben mithilfe des entwickelten Probenahme-Interfaces erfolgreich entfernt werden. Damit lag das Hauptaugenmerk auf der Abtrennung des monoklonalen Antikörpers vom gelösten Anteil der Matrix. Auf Basis der in Kapitel 2.5 erzielten Ergebnisse konnte gezeigt

werden, dass eine Abtrennung des mAb im chromatographischen Lauf auf einer C4-Phase zu erreichen ist.

Der vor Projektbeginn im Antrag formulierte Ansatz, spezielle Pipettenspitzen mit integrierten Festphasen zu nutzen, konnte deshalb verworfen werden. Dieses Verfahren hätte zu einem zusätzlichen manuellen Schritt in der Probenvorbereitung geführt, der eine kostengünstige Automatisierung des Gesamtkonzepts erschwert. Die Probe nach der Filtration über eine Festphasen-Kartusche zu reinigen wurde ebenfalls zugunsten des Online-2D-LC Ansatzes verworfen.

Ziel war es daher, geeignete Anreicherungsmaterialien in Form von kurzen Trennsäulen zu identifizieren, die zur Abtrennung des mAb von der Matrix führen und in die Säulenschaltung integriert werden können. Dies würde bei der Weiterentwicklung des Demonstrations-Systems zu einem Prototyp eine leichtere Integration in einen vollautomatisierten Prozess ermöglichen.

2.6.2 Abtrennung der Matrix auf kurzen C4-Kartuschen

Wie sich bei der Entwicklung der Säulenschaltung zeigte, reicht es aus, wenn die RP-Trennphase genügend Kapazität aufweist, um den Antikörper zu „trappen“. Dadurch sollte die Dimension der RP-Phase auf ein absolutes Minimum reduziert werden können, da sich daraus signifikante Vorteile für das Gesamtkonzept ableiten lassen.

Durch ein geringes Systemvolumen kann eine Verbesserung der Trennleistung der AA erreicht werden, da eine Reduktion der Bandenverbreiterung resultiert. Dies führt zusätzlich zur Erhöhung der Sensitivität der Methode. Des Weiteren kann die Gesamtanalysezeit verkürzt werden.

2.6.2.1 Trapping des mAb auf Daisogel C4-Bio Kartuschen

Zwecks Trapping des mAb und Reduktion der Bandenverbreiterung der AAs wurde die YMC-Triart C4-Säule gegen eine Trennkartusche Daisogel C4-Bio (0,3 x 10 mm) der Firma Dr. Maisch ausgetauscht. Zur Überprüfung der Eignung der Bio C4-Kartuschen wurden mehrere Experimente durchgeführt. Die Hauptfrage bestand darin zu untersuchen, ob die Kapazität der kleineren Trennkartusche ausreicht, den Antikörper bei Anwesenheit von Matrix weiterhin auf der C4-Phase zurückzuhalten. Hierzu wurde der mAb zusammen mit Aminosäuren bei verschiedenen Konzentrationen untersucht.

In den Experimenten wurde die Konzentration des mAb ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ und $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) und das Injektionsvolumen (1000 nL , 500 nL und 100 nL) variiert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm und einer Flussrate von $5 \mu\text{L min}^{-1}$. Die resultierenden Chromatogramme sind vergleichend in der Abbildung 41 dargestellt. Bei einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} kam es zu einer Massenüberladung der Trennkartusche, charakterisiert anhand eines Durchbruchs sichtbar am stark tailenden Peak am Anfang der Messung (A). Dennoch gelang es hier einen Teil des mAb zu „trappen“, welcher erst nach dem 5-minütigen isokratischen Plateau mit der Erhöhung der organischen Phase eluierte. Auffällig war jedoch die Bildung von Doppelpeaks.

Wie anhand der Abbildung 41 B zu sehen, konnte der Durchbruch bei einer Reduktion der Massenkonzentration auf die Hälfte reduziert werden. Bei einer Konzentration von $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ war kein Durchbruch mehr zu erkennen. Trotz Reduktion des Injektionsvolumens auf bis zu 100 nL wurden weiterhin Doppelpeaks beobachtet (siehe Abbildung 41 D). Auch eine Verlängerung des isokratischen Plateaus von zwei auf vier Minuten brachte keine Verbesserung, was darauf hindeutet, dass der Gradient nicht die Ursache für die Ausbildung der Doppelpeaks war.

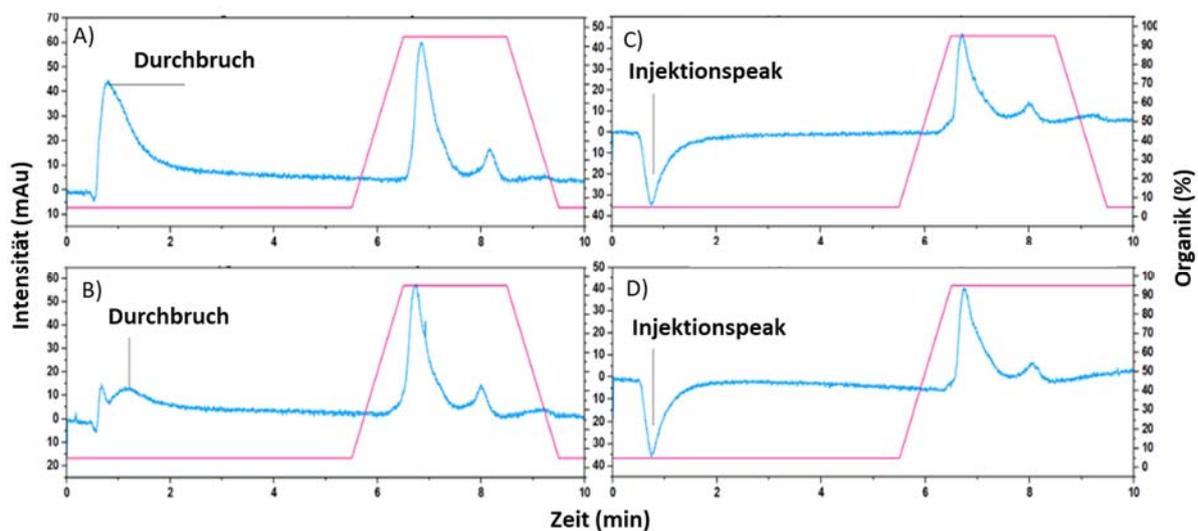


Abbildung 41: Trappingversuche des mAb auf der Kartusche Daisogel C4-Bio ($0,3 \times 10 \text{ mm}$). A) $\beta = 1,0 \text{ mg/mL}$. Injektionsvolumen: 1.000 nL . B) $\beta = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 1.000 nL . C) $\beta = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 500 nL . D) $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Injektionsvolumen: 100 nL . UV-Detektion bei 210 nm . Blau: Chromatogrammspur, pink: Verlauf des Gradienten.

Wiederholungsmessungen auf den gleichen Kartuschen zeigten eine deutliche Variation in den Retentionszeiten, den Peakformen, dem Rauschen und den Druckkurven. Dies lässt auf einen schlecht reproduzierbaren Packprozess der Kartuschen schließen. So wurden Druckanstieg und Anomalien in den Messungen beobachtet, bei weiteren Kartuschen konnte bereits zu Beginn ein erhöhter Druck festgestellt werden, der zu Problemen bei der Integration in das Säulenschaltssystem führte. Auch wurde eine Erhöhung des Grundrauschens beobachtet. Beispielhaft für diese Probleme sind die in Abbildung 42 dargestellten Chromatogramme.

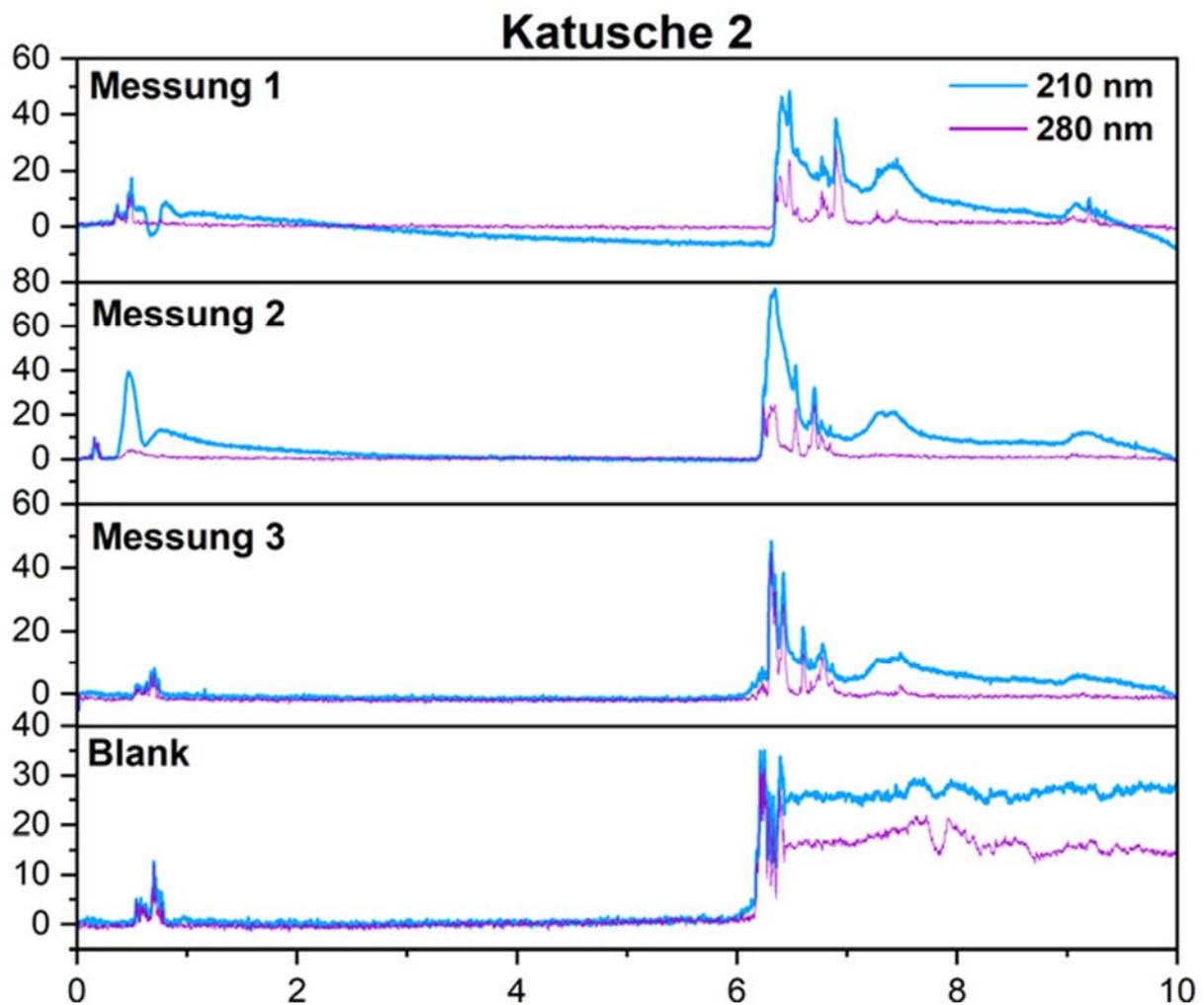


Abbildung 42: Chromatogramme der Trappinversuche auf einer Daisogel C4-Bio (0,3 x 10 mm) Kartusche. Es ist eine deutliche Erhöhung des Grundrauschens zu erkennen, zusätzlich war keine reproduzierbare Messung möglich.

Nach mehreren Testserien erhöhte sich auch der Druck des Messsystems. Auffällig war das Auftreten von weißen Pulverrückständen an den Öffnungen der verwendeten Kartuschen. Säulenbluten ist eine valide Erklärung für die beobachteten Anomalien. Das ausgetretene Phasenmaterial führte im weiteren Verlauf auch zur Verstopfung der

Detektorzelle. In Abbildung 43 sind die Ablagerungen an den Kartuschen zu erkennen, in dem aufgefangenen Eluat konnte jedoch kein Säulenmaterial nachgewiesen werden.

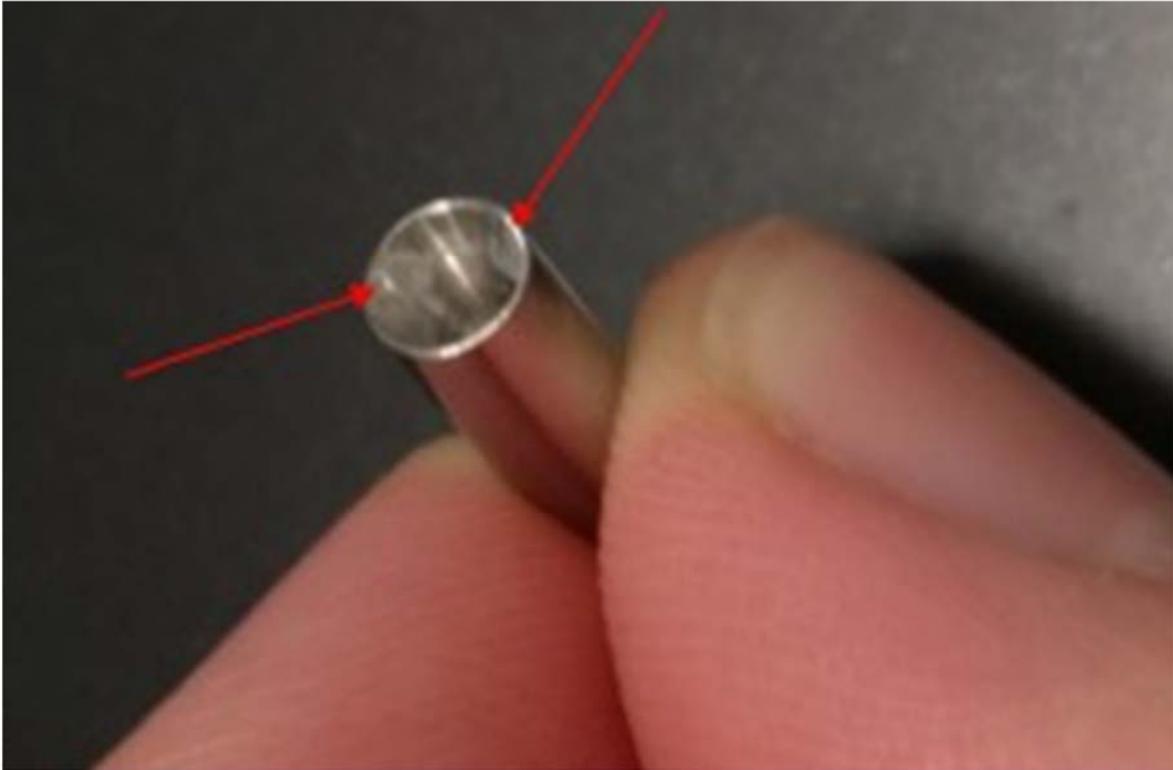


Abbildung 43: Weißer Rückstand am Kartuschenausgang.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Bio C4-Kartuschen zwar geeignet sind ein Trapping des mAb zu gewährleisten, jedoch deuten die Anomalien in den Messungen sowie die Identifizierung von Packmaterialrückständen an den Kartuschen darauf hin, dass Optimierungen in Bezug auf die Qualität der Kartuschen erforderlich sind, um eine zuverlässige und reproduzierbare Trennung zu gewährleisten. Basierend darauf wurden Vorsäulen, welche eigentlich dem Schutz von klassischen Trennsäulen dienen, für weitere Versuche ausgewählt.

2.6.2.2 Trapping des Antikörpers auf Vorsäulen

Weiterführende Experimente für das „Trapping“ des mAb wurden auf Vorsäulen durchgeführt. Diese wurden mit YMC-Triart Bio C4 Material (0,3 * 5 mm) gefüllt, welches bereits in den vorherigen Experimenten genutzt wurde. Auf den Vorsäulen wurde ein Mix aus $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ mAb und ein Mix aus $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ AAs in Wasser angesetzt. Die Probemixtur wurde bei einer Flussrate von $5 \mu\text{L min}^{-1}$ und einem

Injektionsvolumen von 100 nL analysiert. Die Ergebnisse der Anreicherung des mAb und Abtrennung der Matrix sind in Abbildung 44 dargestellt.

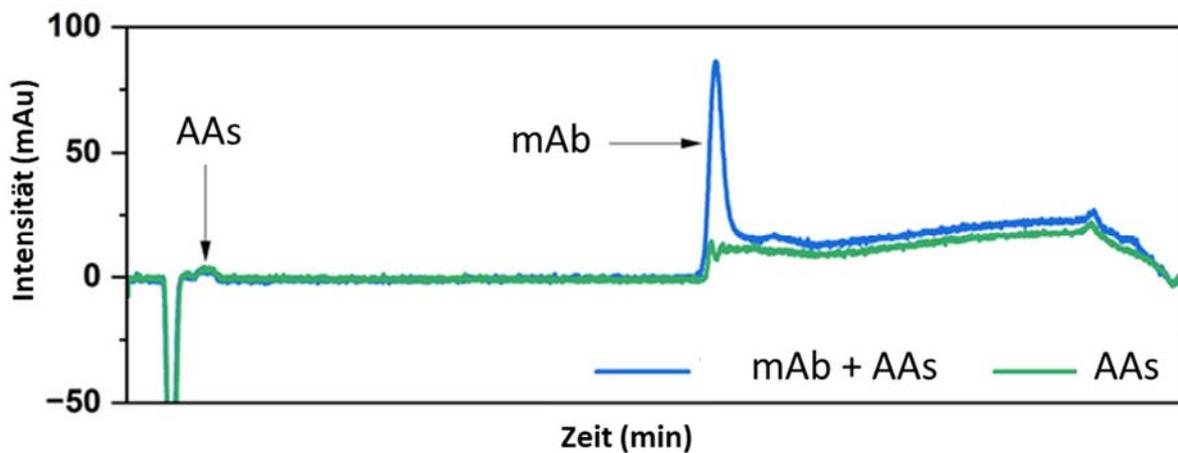


Abbildung 44: Chromatogramm des „Trappings“ und Abtrennungsversuches auf der YMC-Triart Bio C4 (0,3 * 5 mm) Vorsäulenkartusche.

Im Chromatogramm ist zu erkennen, dass die AAs mit der Totzeit eluieren und zusätzlich keinen Einfluss auf die Beladbarkeit der C4-Pase mit dem mAb haben. Die zuvor beobachteten Anomalien mit den Trennkartuschen von Dr. Maisch konnten bei dem System von YMC nicht beobachtet werden. Auch eine reproduzierbare Messung konnte erzielt werden. Bei der Dreifachbestimmung wurde für TTZmab eine Retentionszeit von $6,74 \pm 0,96$ % min, eine Peakfläche von $851 \pm 1,09$ % mV*s bestimmt.

Durch den Wechsel auf die Vorsäulenkartuschen ist es somit gelungen, das Volumen der RP-Phase um den Faktor 10 zu reduzieren. Hierdurch erfahren die AAs eine geringere Bandenverbreiterung durch Diffusion und gelangen fokussierter auf die zweite Dimension der Säulenschaltung. Zusätzlich reduziert sich die Messzykluszeit im Probenvorbereitungsschritt bei einer Flussrate von $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ um ca. 1 min. Mit diesem Konzept ließe sich demnach eine vollständig automatisierte Abtrennung der Matrix realisieren, was die Grundvoraussetzung für den industriellen Einsatz in der Prozessüberwachung ist.

2.7 Automatisierung des instrumentellen Atline- μ LC-Systems

2.7.1 Einleitung

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde die Automatisierung des Atline- μ LC-Systems als zentrale Aufgabe definiert. Diese wurde mit Hilfe eines übergeordneten Laborausführungssystems (LES, Laboratory Execution System) realisiert, welches dazu genutzt wurde, die Datenverfügbarkeit von heterogenen und teils proprietären Datenformaten zu erhöhen. Zudem konnte das LES dazu verwendet werden, sowohl das μ LC-MS Analysesystem als auch den XYZ-Roboter digital anzubinden und zu steuern. Dies ermöglichte die logikbasierte und automatisierte Gerätesteuerung bzw. Orchestrierung des Gesamtprozesses.

Um die Prozessautomation zu realisieren, wurden die größten zu überwindenden Hürden in diesem Arbeitspaket identifiziert und in drei Arbeitsschwerpunkte aufgeteilt. Identifiziert wurden folgende Arbeitsschwerpunkte:

1. Orchestration
2. Datenfluss
3. Geräteanbindung & -steuerung

Zu Beginn galt es ein geeignetes Laborausführungssystem zu definieren, welches über die technischen Grundvoraussetzungen für eine performante Orchestration und die erforderliche Geräteanbindung verfügt. Dieser Arbeitsschritt musste an erster Stelle erfolgen, da dieses System die Rahmenbedingung für den Datenfluss, bspw. in Form nativ unterstützter Datenformate sowie die Geräteanbindung, bspw. in Form vorhandener Schnittstellen, vorgibt.

Das Laborausführungssystem Laboperator wurde aufgrund bereits bestehender Expertise seitens FE2 und der im Folgenden beschriebenen Eigenschaften für geeignet befunden. Laboperator stellt eine flexible Node.js-basierte Plattform dar, welche sowohl in der Cloud als auch als On-Premise Lösung betrieben und ohne großen Aufwand migriert werden kann. Die Software verfolgt einen „Lowcode-Ansatz“ [6], welcher es auch programmierunerfahrenen Nutzern ermöglichen soll, ohne das Erlernen komplexer Programmiersprachen, sogenannte Laboperator-Workflows zu schreiben. Dabei handelt es sich um Textdateien im YAML (Yet Another Markup Language) Format, welche in den Laboperator importiert werden. Aus diesen YAML-

Dateien erzeugt die Laboperatorumgebung automatisch eine Benutzeroberfläche, über die Geräte und Arbeitsabläufe gesteuert werden können. Diese Workflow-Umgebung macht somit die Frontend-, Backend- und sogar auch die Datenbankprogrammierung unnötig. Das Workflow-Feature wird in Kapitel 2.7.2 genauer beschrieben. Zusätzlich verfügt der Laboperator bereits über eine generische LADS OPC-UA sowie SiLA2 Geräteschnittstelle. Diese Schnittstellen stellen eine enorme Erleichterung bei der Geräteeinbindung dar, sofern die anzubindenden Geräte diese unterstützten.

Im Folgenden wird die konkrete Bearbeitung der zuvor definierten Arbeitsschwerpunkte beschrieben.

2.7.2 Orchestration

Nachdem der Laboperator als Laborausführungssystem ausgewählt wurde, konnte eine erste Erprobung der Workflow-Umgebung erfolgen. Ziel war es, die softwareseitige Performanz sowie Funktionalitäten zu überprüfen. Da die angestrebte Prozessautomation einen hohen Grad komplexer Logikalgorithmen erforderlich macht, galt es sicherzustellen, dass diese den Erwartungen entsprechend, durch die Workflow-Umgebung abgearbeitet werden können.

Zunächst wurde dazu ein Orchestrationsschema (Abbildung 45) entwickelt, welches eine Prozessautomation bei einem Einsatz von Bioreaktoren vorsah, und in AP8 um weitere Reaktoren ergänzt werden konnte.

Wie im Orchestrationsschema zu sehen ist, wurde die Orchestration in zwei Teilbereiche aufgeteilt. Die „Softwareebene“ wurde vollständig über Laboperator abgebildet. Die „Hardwareebene“ wurde zunächst vernachlässigt, da die Geräteintegration erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte. Da das Ausführungssystem zudem über die Möglichkeit verfügte, Geräte in der Workflow-Umgebung zu simulieren, konnten dennoch alle Funktionalitäten und die Performanz erprobt werden. Die Entwicklerkonsole ermöglichte es, die ausgehenden Befehle zu überprüfen. Nachdem die Geräteintegration erfolgte, wurden die simulierten Geräte durch die physischen im Workflow ersetzt und erfolgreich getestet.

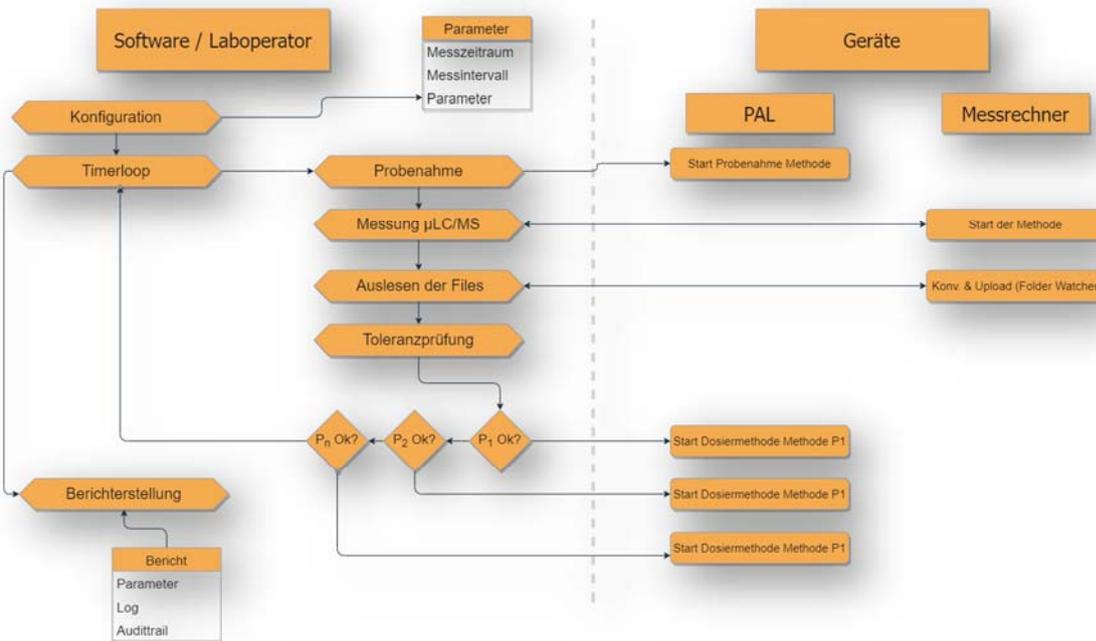


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Orchestration.

Diese frühe Version des Workflows, welche sukzessive im Projektzeitraum um weitere Funktionalitäten erweitert wurde, bildet bereits die grundlegenden Konzepte der Prozesssteuerung ab. In der Startoberfläche des Workflows kann dieser bspw. in Form von Zielkonzentrationen, Messintervallen, Versuchsdauer parametrisiert werden. Sobald dieser Schritt abgeschlossen wird, startet die vollautomatisierte Prozesssteuerung durch eine Schleife, die entsprechend dem Messintervall und der Versuchsdauer iteriert.

Die Schleife ist, vereinfacht dargestellt, wie folgt aufgebaut. Im ersten sog. „Step“ erfolgt ein Timer, welcher entsprechend dem Messintervall die Probenahme und dazugehörige Messung ($\mu\text{LC-MS}$) startet.

Nachdem die Messdatensätze erzeugt wurden, werden diese im Step „Readdata“ ausgelesen und ein Algorithmus prüft, ob der Kalibrierbereich eingehalten wurde. Ist dieser überschritten, wird die Probe verdünnt und erneut geprüft. Sofern eine Verdünnung oder Zufütterung von AA erforderlich ist, wird ein entsprechend parametrisierter Befehl an den XYZ-Roboter gesendet. Die Analyseergebnisse sowie die Zudosierung werden sukzessive in einer AnIML-Datei, wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben, erfasst.

```

14
15 flow: ←
16   - cfg
17   - loop:
18     - waitfornext
19     - readdata
20     - if: hP1 <= Par1
21       then: DosP1S1
22     else:
23       - if: hP1 <= Par2
24         then: DosP1S2
25       else:
26         - if: hP1 <= Par3
27           then: DosP1S3
28 >   - if: hP2 <= Par1...
36 >   - if: hP3 <= Par1...
44   until: IsCmplt = true
45   - reporting
46
47
48 steps: ←
49 #onetime
50 >   cfg: ...
76
77 >   reporting: ...
104
105 ##loop##
106 >   waitfornext: ...
164
165 >   readdata: ...

```

Abbildung 46: Version 0.0.4 der Workflow-Textdatei "VaMiSeP.yaml", die zur ersten Erprobung der Workflow-Umgebung genutzt wurde. Der "flow" (roter Pfeil) beschreibt dabei die einzelnen Arbeitsschritte, die iterativ durchgeführt werden. Die "steps" (blauer Pfeil) beinhalteten die konkreten Befehle für die Geräte.

Zum Ende des Versuchszeitraums wird die Schleife abgebrochen und es erfolgt die automatisierte Berichterstellung. Dazu wird die AnIML_Datei ausgelesen und mit den Ergebnissen sowie Protokolldaten eine .docx-Vorlage automatisch ausgefüllt. Dazu wird die webbasierte Anwendung „Carbone.io“ verwendet. Diese verfügt über eine RESTful Schnittstelle, welche direkt aus der Workflow-Umgebung heraus angesteuert werden kann.

2.7.3 Datenfluss

Nachdem die Grundlagen für die Orchestration geschaffen wurden, wurde der Arbeitsschwerpunkt „Datenfluss“ bearbeitet. Bereits bei einer oberflächlichen Betrachtung der Datenformate und -speicherung, der Messgeräte und unterschiedlichen Sensorsysteme wird deutlich, dass eine Datenharmonisierung zwingend erforderlich ist [7].

Dazu wurden bereits die Sensordaten der im folgenden Arbeitspaket 7 zu integrierenden PreSens und TRACE-Systeme berücksichtigt. Die Daten des TRACE Glucose Sensors werden in einfachen Text- oder .csv- Dateien abgespeichert. Die

Messdaten des PreSens-Systems werden über das PreSens Measurement Studio 2 (PMS2) in verschiedenen Formaten wie bspw. .xls oder .csv lokal auf dem Messlaptop abgespeichert. Eine automatisierte Datenauswertung erfolgt in diesem Kontext weder beim TRACE noch beim PreSens-System. Während die unstrukturierte Ablage dieser Daten das Auslesen nicht erleichtert, ist dies dennoch durch das Ausführungssystem möglich. Die proprietären Daten der instrumentellen Analysesysteme können jedoch nicht vom Ausführungssystem verarbeitet werden. Ziel war es daher, die Daten in einer zentralen Datei zusammenzuführen, welche vom Ausführungssystem ausgelesen und letztlich weiterverarbeitet werden konnten. Nach intensiver Recherche wurde das AnIML-Datenformat, aufgrund der im Folgenden beschriebenen Eigenschaften, als geeignet befunden.

AnIML ist ein auf XML basierendes Format und kann dadurch mit einem Texteditor geöffnet und vom Menschen, wie in Abbildung 47 dargestellt, gelesen werden. Folglich zeichnet sich dieses Format durch eine inhärente FAIR-Data-Konformität aus [8]. Die Daten sind also auffindbar (Findable), zugänglich (Accessible), interoperabel (Interoperable) und wiederverwendbar (Reusable).

Zudem ist die Datenstruktur, in Form einer Aufteilung in Metadaten, Probandaten, Experimentschritten und Audittrail, hochgradig mit dem Orchestrationskonzept kompatibel. Die Möglichkeit, die Datenstruktur über sogenannte AnIML Technique Definitions (ATDDs) vorzuschreiben, wurde im Kontext dieses Projektes nicht verfolgt, böte aber für ein mögliches Folgeprojekt interessante Anknüpfungspunkte.

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" standalone="yes"?>
<AnIML xmlns="urn:org:astm:animl:schema:core:draft:0.90" xmlns:ds="http://www.w3.org/2000/09/xmldsig#" xmlns:xsi="http://www.w3.org/
  <SampleSet>
    <Sample id="sample_1" name="Applikationsbeutel 1" sampleID="LR-20240221-001">
      <Category name="Substanzinformationen">
        <Parameter name="Substanzname" parameterType="String">
          <S>Gemcitabin</S>
        </Parameter>
      </Category>
    </Sample>
    <Sample id="sample_2" name="Applikationsbeutel 2" sampleID="LR-20240221-002">
      <Category name="Substanzinformationen">
        <Parameter name="Substanzname" parameterType="String">
          <S>Paclitaxel</S>
        </Parameter>
      </Category>
    </Sample>
  </SampleSet>
  <ExperimentStepSet>
    <ExperimentStep id="weighing_1" name="1. Wägeschritt (voll)">
      <Infrastructure>
        <SampleReferenceSet>
          <SampleReference id="sample_1" samplePurpose="weighing" role="Weighted Sample" sampleID="LR-20240221-001"/>
          <SampleReference id="sample_2" samplePurpose="weighing" role="Weighted Sample" sampleID="LR-20240221-002"/>
        </SampleReferenceSet>
        <Timestamp>2024-02-21T10:31:50.818923</Timestamp>
      </Infrastructure>
      <Method id="weighing_method" name="Wägemethode">
        <Author userType="software">
          <Name>Max_Jorchums</Name>
        </Author>
      </Method>
    </ExperimentStep>
  </ExperimentStepSet>
</AnIML>
```

Abbildung 47: Screenshot einer AnIML-Datei in der Programmierumgebung Visual Studio Code. Die Daten sowie deren Strukturierung sind ohne Dekodierung durch den Menschen lesbar.

Um sämtliche Daten in einer AnIML-Datei zusammenführen zu können, wurden zunächst entsprechende Konverter entwickelt, welche über die Kommandozeile des Betriebssystems ausgeführt werden können. Diese können die proprietären Roh- und Ergebnisdaten dekodieren und in einer AnIML-Datei abspeichern. Die Rohdaten können dabei wahlweise im nicht proprietären Kodierungsschema Base64 abgespeichert werden, um die Größe der Datei zu minimieren und den späteren Upload in den Laboperator zu beschleunigen.

Um die Konvertierung, den Upload und das Parsen in das Ausführungssystem ermöglichen zu können, wurde eine Middleware (**Abbildung 48**) auf den entsprechenden Messrechnern installiert. Diese koordiniert die Kommunikation zwischen Messrechner und Ausführungssystem und ermöglicht es diesem, Kommandozeilenbefehle auszuführen, um so bspw. eine Konvertierung anzustoßen.

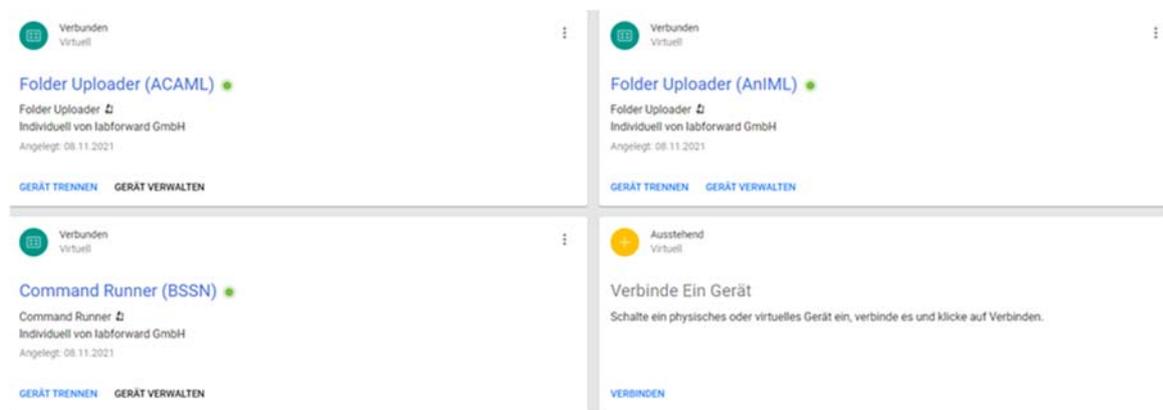


Abbildung 48: Screenshot der Laboperator-Middleware, welche lokal auf den Messsystemen installiert wurde, um die Kommunikation zu ermöglichen und die Konvertierung zu starten.

Die Text-, CSV- oder .XLS-Dateien benötigen keine Konvertierung, um geparkt werden zu können und werden direkt von der Middleware hochgeladen. Somit konnten die Messdaten in der Workflowumgebung aktiv ausgelesen, weiterverarbeitet und für die Steuerung der Aktorik verwendet werden. Die Daten sowie Arbeitsschritte wurden dann je Iteration der Schleife in der prozessbegleitenden AnIML-Datei als sog. „ExperimentStep“ protokolliert.

Zunächst traten während des Uploads häufige Aussetzer und Fehlermeldungen auf, die auf ein Timeout des Uploads aufgrund dekodierter Rohdaten zurückzuführen

waren. Mit Hilfe der Kodierung in Base64 konnte die Dateigröße um den Faktor zehn minimiert und ein Timeout verhindert werden.

2.7.4 Geräteanbindung

Zur Anbindung des XYZ-Roboters und des μ LC/MS-Systems wurden jeweils zwei Integrationsansätze verfolgt. Der erste Ansatz sah eine direkte „hardwarebasierte“ Anbindung vor. Das heißt, dass die einzelnen Komponenten der o.g. Geräte physisch an ein Kommunikationsinterface (wie bspw. eine Laboperator Connectorbox) angeschlossen werden, sodass diese auf dem Hardwarelevel angesteuert und Sensordaten direkt ausgelesen werden können. Dies bietet den Vorteil einer sehr geringen Latenz bei der Gerätesteuerung und kann ggf. Softwarelimitierungen umgehen. Dieser Ansatz konnte erfolgreich genutzt werden, um bspw. Benchtop-Geräte wie Waagen und Zentrifugen anzubinden [9]. Dieser Vorteil ist gegenüber dem erheblichen Programmieraufwand, der ggf. ein sog. Reverse Engineering der Komponenten erfordert, im Einzelnen abzuwägen.

Der „softwarebasierte Ansatz“ stellt einen geringeren Entwicklungsaufwand dar. Dabei werden vorhandene Schnittstellen in der Herstellersoftware verwendet. Mit Hilfe einer Middleware kann so eine Gerätekommunikation etabliert werden. Dies bedeutet, dass über eine einzige Softwareanbindung alle systemrelevanten Komponenten (z. B. Pumpen, Öfen, Injektoren, Detektoren) aus dem gleichen Ökosystem (z. B. Agilent Openlabs CDS, Sciex Analyst) eingebunden werden können. Insgesamt wird so der Integrationsaufwand erheblich reduziert, jedoch bedeutet dies gleichzeitig eine Limitierung auf die durch den Hersteller freigegebenen Funktionalitäten. Zudem gibt es Hersteller, die diese Schnittstellen, insbesondere für ältere Geräte, gar nicht zur Verfügung stellen. In diesem Fall verbliebe ausschließlich der „hardwarebasierte Ansatz“.

Da die hier einzubindenden Systeme über eine Vielzahl an Komponenten, aber gleichzeitig moderne Steuerungssoftware verfügen, wurde zuerst der softwarebasierte Ansatz zur Integration geprüft. Dazu wurde die entsprechende Herstellersoftware auf mögliche Schnittstellen untersucht und die folgenden Integrationsmöglichkeiten identifiziert. Das μ LC-System von Agilent wird standardmäßig durch die Openlabs CDS Software gesteuert. Diese kann bereits an die Analyst-Software (Sciex), welche zur Steuerung des MS-Detektors verwendet wird, angebunden werden. Eine intensive

Analyse der CHRONOS-Software (Axel Semrau), welche zur Steuerung des XYZ-Roboters verwendet wird, zeigte, dass diese in der Lage ist, Batchlisten zu erstellen, in diesen auf in Analyst hinterlegte Methoden zuzugreifen und diese Batchlisten dann im Analyst zu starten. Dies bedeutet, dass über die Chronos-Software die drei verwendeten Systeme gesteuert werden können.

Die für den Workflow erforderlichen Funktionalitäten konnten vollständig über CHRONOS abgedeckt werden. Daher wurde zur Anbindung von CHRONOS an das Laborausführungssystem ein CHRONOS-Plugin entwickelt. Auf Anfrage beim Softwarehersteller „Axel Semrau“ wurde die erforderliche Dokumentation zur Entwicklung eines Chronos – Laboperator - Plugins zur Verfügung gestellt. Das Plugin wurde im .Net-Framework entwickelt und bietet die Funktionalität, Batchlisten mit einem oder mehreren Jobs zu erstellen und an die Analyst-Software zu übertragen, zu starten und den Gerätestaus bzw. Fehlermeldungen auszugeben.

Für die Prozessautomation wurde dann ein Methodenportfolio angelegt, welches die erforderlichen Bewegungsabläufe (z. B. Bewegung zu vordefinierten Positionen, Probenahme bzw. Injektionen mit dynamischen Volumina) für den XYZ-Roboter und Analysenmethoden abdeckt.

Zur Kommunikation zwischen Plugin und Laboperator wurde die für den Datenfluss entwickelte Middleware (Abbildung 48) erweitert. So konnte über eine einzige Software sowohl der Datenfluss als auch die Gerätesteuerung abgebildet werden.

Sample List

Analysis Method	Sample Name	Source Tray	Source Vial	Seat
-	-	-	-	-

Method List

Analysis Method	Description
Liquid Injection	Simple liquid injection with Analyst acquisition

Method Parameter List

Method Parameter	Value	
Inj. Volume [µL]	60	Tr
LC Runtime [s]	780	Tr
Source Tray	Drawer 2:Slot1	Tr
Analyst Method	D:\Analyst Data\Projects\PharmaMonitor\HPLC\Acquisition Methods	Tr
Analyst Filename	Data	Tr



Chronos_PharmaMonitor
 Chronos 4
 Individuell von Axel Semrau
 Status: ● an

ADD SAMPLE W/ SELECTED METHOD
REMOVE SELECTED SAMPLE
SEND NEXT SAMPLE TO CHRONOS
RE-TRIGGER LAST COMMAND
QUEUE/SCHEDULE SAMPLES IN CHRONOS

Abbildung 49: Screenshot eines Laboperator-Workflowschrittes. Dargestellt ist die Visualisierung der CHRONOS-Integration zur manuellen Erstellung von Batchlisten. Diese Funktionalität wird von der Workflow-Engine ohne eine grafische Darstellung verwendet, um die Chronos sowie Analyst Methoden auszuwählen und zu starten.

Zusammenfassend betrachtet konnte das Arbeitspaket somit vollumfänglich umgesetzt werden. Aufgrund der fehlenden Unterstützung von generischen Schnittstellen wie bspw. LADS OPC UA seitens der Gerätehersteller, hat sich die Bearbeitung des Arbeitspakets merklich verzögert, da eine Vielzahl von zusätzlichen Entwicklungsarbeiten erforderlich wurde.

2.8 Kopplung und Validierung von Online-Sensorplattform und instrumentellem, mikrofluidischem Gesamtsystem

2.8.1 Einleitung

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurde die Sensorplattform an die FE2 überführt und mit der µLC-MS gekoppelt und eine mögliche Parallelisierung erprobt. Dazu mussten analog zum vorangegangenen Arbeitspaket Geräte (TRACE & PreSens-Sensoren) angebunden und die Orchestration in der Workflow-Umgebung angepasst werden. Im Folgenden werden die durchgeführten Arbeitsschritte beschrieben.

2.8.2 Geräteintegration und Datenfluss

Der TRACE Glucosesensor wurde ausschließlich über das Auslesen der .csv Ergebnisdatei realisiert. Die Software bot keine geeignete Schnittstelle und eine hardwarebasierte Schnittstellenanbindung konnte im Projektzeitraum nicht vollumfänglich abgeschlossen werden. Das Auslesen der .csv-Dateien erfolgt analog zum Auslesen der AnIML-Dateien (**Kapitel 2.7.3**).

Die Anbindung der PreSens-Sensoren war sowohl über den hardware- als auch softwarebasierten Ansatz möglich. PreSens bietet Platinen, mit welchen serielle Schnittstellen nachgerüstet werden können, an. Das PreSens Measurement Studio 2 (PMS2) bot jedoch bereits eine generische OPC UA Schnittstelle (Abbildung 50), welche eine effizientere Integration erlaubte.

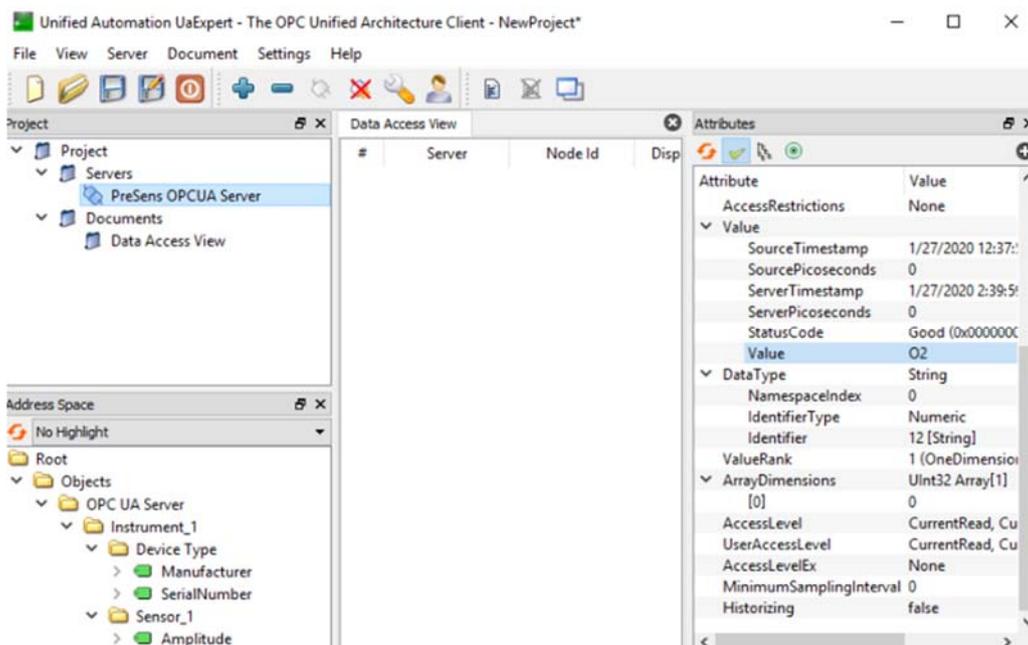


Abbildung 50: Screenshot der Visualisierung des PreSens O2-Sensors im OPC-UA-Viewer UA-Expert.

Nach der Konfiguration der Netzwerkparameter konnte die im Laboperator bereits vorhandene Client-Schnittstelle genutzt werden, um die Sensordaten direkt im Laborausführungssystem abzubilden.

2.8.3 Orchestration

Zunächst ließ FE1 der FE2 die 3D-Druckdateien für das Probenahmeinterface zukommen. Nachdem Druck dieser Dateien mittels FDM-3D-Druck wurden die in

Kapitel 2.7.2 beschriebenen Methoden angepasst. Dazu wurden sechs Reaktorinterfaces im Arbeitsbereich des XYZ-Roboters installiert und neue Methoden in der CHRONOS Software angelegt. Abschließend wurde die Schleife in der Workflow-Umgebung angepasst und die Bewegungsabläufe erprobt.

2.8.4 Fazit

Trotz erheblicher Verzögerungen im vorangegangenen Arbeitspaket, konnten die Systeme erfolgreich zusammengeführt werden. Aufgrund der Möglichkeit, Geräte und deren Kommunikation im Laborausführungssystem zu simulieren, stellte eine Anpassung auf Orchestrationsebene kein Hindernis dar. Die Harmonisierung der Daten wurde erfolgreich abgeschlossen, sodass die Sensordaten ebenfalls in einer AnIML-Datei erfasst werden konnten. Die Validierung des Gesamtsystems gemäß ICH-Richtlinien konnte im Projektzeitraum jedoch nicht durchgeführt werden.

3 Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

3.1 Entwicklung einer mikrofluidischen Sensorplattform zur Online-Messung relevanter Prozessparameter

Im Rahmen der Projektarbeiten konnte eine mikrofluidische Sensorplattform zur Messung von pH, dO₂, CO₂, Glucose und Lactat technisch realisiert werden. Hierbei wurde Sensorik verschiedener Hersteller mittels hochauflösendem Multijet-Printing 3D-Druck in ein System integriert. Der gewählte Ansatz erlaubt die flexible Erweiterung, indem mittels Computer-Aided-Design weitere Teilsysteme mit zusätzlicher Sensorik angehängt werden können. Das im Projektantrag angegebene Ziel, auch das Zellwachstum zu überwachen, wurde aufgrund fehlender verfügbarer Sensorik in so kleinem Maßstab nicht umgesetzt. In einer weiteren Entwicklung des Systems kann jedoch aus den vorhandenen Daten spezifisch zum Zelltyp eine Vorhersage der Zellzahl errechnet werden [10].

Für die mikrofluidische Sensorplattform wurden Pumpschläuche und PTFE-Schläuche mit geringem Innendurchmesser sowie flanschlose Schraubanschlüsse gewählt.

Hierdurch konnten die nötigen Anschlüsse direkt an die 3D-gedruckten Modelle integriert werden, wodurch dichte Verbindungen und ein geringes Totvolumen des Systems erlangt werden konnten.

Die integrierte Sensorik wurde zunächst in Teilsystemen experimentell überprüft. Für die Messung von pH-Wert, der dO_2 - und der dCO_2 -Konzentration wurden die Sensorplugs der Firma PreSens Precision Sensing GmbH integriert. Die Messung der Glucose- und Lactatkonzentration erfolgte über das TRACE C2 Messgerät von 908 Devices Inc. mittels einer ins mikrofluidische System integrierten Dialysemembran. Zunächst wurde die Messzeit (t_{90}) der verwendeten Sensorplugs der Firma PreSens GmbH experimentell im mikrofluidischen System mit einer Direktmessung verglichen und vergleichbare Werte festgestellt. Die Messzeit der Glucose-Messung lag bei ca. 4 Minuten und ist somit für den Einsatz bei Tierzellkultivierungen oder bakteriellen Fermentation mit Kultivierungsdauern von über 10 Stunden ausreichend.

Ein weiteres Ziel war es, mittels CFD-Simulationen (Computational Fluid Dynamics) die Strömungsdynamik innerhalb des Systems zu untersuchen. Der Fokus wurde in diesem Forschungsprojekt auf den Einfluss der Kanalstruktur und der Positionierung der Sensorspots auf den Scherstress gelegt, welcher einen negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben kann. Dadurch konnte eine Kanalstruktur zur Kombination mehrerer Teilsysteme mit geringem Scherstress entwickelt werden. Zusätzlich wurde die Position der Sensorplugs mit dem geringsten Scherstress gefunden. Eine Umsetzung der Positionierung der Sensorplugs erwies sich in der Praxis jedoch als schwierig, da Abweichungen in den Dimensionen der Plugs und das manuelle Einsetzen einen so präzisen Einsatz nicht ermöglichten.

Zur Kopplung der Teilsysteme wurden zwei verschiedene Designs entworfen und experimentell untersucht, ob die Glucosemessung die anderen Messungen beeinflusst. Hierbei wurde ein Design gefunden, bei dem kein Einfluss nachweisbar war.

Die Sensorplattform sollte flexibel an miniaturisierte Bioreaktoren angeschlossen werden. Hierfür wurden Anschlussmöglichkeiten an Schüttelkolben, den miniaturisierten Bioreaktor ambr250 von Sartorius AG sowie einen 2 L-Benchtop Reaktor dargestellt. Mittels stabiler Standard-Schlauchverbindungen wie beispielsweise Luer-Anschlüsse ist die Kopplung an die verschiedenen Reaktortypen einfach zu bewerkstelligen.

Der praktische Einsatz der Sensorplattform wurde mit Kultivierungen von CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*), *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert. Hierbei konnten über die gesamte Kultivierungszeit Messwerte erhoben werden. Offline-Messungen der Glucose-Konzentration und des pH-Wertes stimmten gut mit den Online-Messwerten überein. Während bei der Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* kein negativer Einfluss des Sensorsystems auf das Zellwachstum beobachtet werden konnte, war das Wachstum der CHO-Zellen gehemmt. In weiteren Experimenten konnte der Einsatz der Peristaltikpumpe als Hemmfaktor identifiziert werden. Bei der Untersuchung unterschiedlicher Pumpschläuche und Flussraten konnte der negative Einfluss nicht vollständig minimiert werden. Der Einsatz einer zellschonenden Pumpentechnologie ist in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte ein Demonstrator einer 3D-gedruckten Sensorplattform zur Messung der prozessrelevanten Parameter pH-Wert, dO_2 und CO_2 -Konzentration, Glucose- und Lactatkonzentration entwickelt werden. Die Sensorplattform kann einfach an verschiedene (miniaturisierte) Bioreaktoren angeschlossen werden und über die gesamte Kultivierungsdauer mit unterschiedlichen Zelltypen eingesetzt werden.

3.2 Kopplung der mikrofluidischen Sensorplattform mit der Atline μ LC-MS

Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollte zusätzlich zur Online-Messung verschiedener Prozessparameter auch eine automatisierte Atline-Analyse relevanter Nährstoffe durchgeführt werden, die zurzeit noch nicht mit Online-Messmethoden nachweisbar sind. Hierfür muss eine (zellfreie) Probe entnommen und der μ LC-MS-Anlage zugeführt werden.

Vor diesem Hintergrund wurde ein miniaturisiertes, automatisiertes Probenahmesystem entwickelt, welches durch einen integrierten Filter die Zellen abtrennt und die gezogene Probe über PTFE-Schläuche zur Injektionsstelle der μ LC-MS transportiert. Für die Probenahme werden zwei Spritzenpumpen und zwei Magnetventile eingesetzt, welche in einem computergesteuerten Ablauf automatisch die Probe entnehmen. Zur Testung des Systems wurden Filtrationstests mit CHO-Zellen bei Konzentrationen bis 20 Millionen Zellen pro mL durchgeführt, wobei kein deutlicher Leistungsverlust sichtbar wurde. Zusätzlich wurde die Sterilisierbarkeit des

Systems untersucht, indem das System mehrfach autoklaviert und anschließend die Filtrationsleistung überprüft wurde. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit Reste einer vorhergegangenen Probenahme die nächste Probe beeinflussen. Hierbei wurde festgestellt, dass eine Probe verworfen werden sollte, sodass die zweite Probe nur noch eine Restkonzentration von 3 % der vorherigen Probe aufweist.

Das Teilsystem zur Probenahme wurde in die Sensorplattform integriert und in der Praxis bei der Kultivierung von *E. coli* und CHO-Zellen getestet. Hierbei konnte über die gesamte Kultivierungsdauer genügend Probe entnommen werden, um eine Analyse mit der μ LC-MS durchzuführen.

4 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU, sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens konnte die Online-Messung relevanter Prozessparameter auf einer mikrofluidischen Sensorplattform mit der Kopplung einer Atline- μ LC-MS-Analyse erfolgreich umgesetzt werden. Mittels hochauflösendem 3D-Druck wurden bereits erhältliche miniaturisierte Sensoren unterschiedlicher Hersteller in ein System integriert, um Online den pH-Wert, die gelöste Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration sowie die Glucose- und Lactatkonzentration zu messen. Mit Hilfe der eingesetzten flanschlosen Schraubanschlüsse konnten verschiedene Reaktorsysteme von Schüttelkolben, miniaturisierten Rührkesselreaktoren bis größere 2-L-Reaktoren an die Sensorplattform angeschlossen werden. Somit konnten die Reaktorsysteme mit zahlreichen Online-Sensoren ausgestattet werden, für die bisher keine angepasste Sensorik verfügbar ist. Die technische Herausforderung des wasserdichten und sterilen Einbaus der Sensorik wurde mit 3D-gedruckten Einsätzen gelöst, wodurch die Sensoren sicher eingesetzt werden konnten. Eine Dialysemembran als Bestandteil des Glucose- und Lactatmesssystems und eine Filtermembran konnten zusammen mit der 3D-gedruckten Sensorplattform durch Autoklavieren sterilisiert werden. Die Sensorplattform wurde mit relevanten Produktionsspezies wie *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) eingesetzt.

Schüttelkolben und miniaturisierte Reaktorsysteme kommen hauptsächlich im Bereich der Forschung und Entwicklung zum Einsatz. Hierbei können Prozesse oder auch neue Produktionsstämme entwickelt werden. Durch den Einsatz kleinerer Reaktorsysteme kann ein höherer Parallelisierungsgrad bei Einsparung von Medien, Chemikalien und Energie erlangt werden. Durch die Online-Analyse mit der hier vorgestellten Sensorplattform können mit diesen Reaktorsystemen belastbare Daten in Echtzeit über den gesamten Kultivierungszeitraum erfasst werden. Vor allem die Kopplung der μ LC-MS mit einem auf der Sensorplattform integrierten automatisierten Probenahmesystem ermöglicht die Atline-Analyse zahlreicher Medienbestandteile und führt somit zu tiefen Einblicken in den Kultivierungsverlauf. Ein Analysesystem mit

einem solchen Umfang ist nach Kenntnisstand der beteiligten Forschungseinrichtungen nicht auf dem Markt erhältlich.

Eine mittelfristige wirtschaftliche Nutzung des technischen Demonstrators bei konsequenter Umsetzung der hier getroffenen wissenschaftlich-technischen Erkenntnisse ist aus Sicht der beteiligten Forschungseinrichtungen möglich. Eine kurzfristige Umsetzung scheitert aktuell an der Verwendung der Peristaltikpumpe, wodurch bei CHO-Zellen ein eingeschränktes Wachstum zu beobachten ist. Ein zellschonendes Pumpverfahren kann dieses Problem beheben, muss allerdings mit dem Sensorsystem umsetzbar sein.

5 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

5.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder sind den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzurechnen. Die aufgeführten Unternehmen entstammen vorwiegend den Branchen der Analysen- und Labortechnik. Dies gewährleistet, dass nach Ende des Projektes mittel- bis langfristig eine Umsetzung der in diesem Projekt entwickelten variablen mikrofluidischen Sensorplattform möglich ist. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt, um technische Herausforderungen zeitnah zu diskutieren und um neue technische Lösungsansätze umzusetzen.

5.2 Vorstellung der Ergebnisse durch Publikationen, Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte vorwiegend in Form von Vorträgen auf spezifischen Fachtagungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen auch über die Projektlaufzeit hinaus können der in Tabelle 4 aufgeführten Auflistung entnommen werden. Hervorzuheben ist dabei, dass die Posterpräsentation auf der Himmelfahrtstagung 2023 prämiert wurde. Dies zeigt nochmal deutlich das Interesse und den Bedarf auf Seiten der Industrie.

5.3 Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

Die Auflistung der durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen kann Tabelle 4 entnommen werden. Die Transfermaßnahmen konnten insbesondere in der ersten Hälfte der Projektlaufzeit aufgrund der pandemischen Lage nicht entsprechend den Vorplanungen umgesetzt werden.

Tabelle 4: Auflistung aller durchgeführten, sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.

Bereits umgesetzte Maßnahmen	Ziel	Rahmen	Zeitraum
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA1 - Projektvorstellung und Diskussion zu den geplanten Arbeiten.	08.12.21
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA2 - Darstellung der Ergebnisse, Diskussion zum weiteren Vorgehen.	07.12.22
PA-Sitzung	Die Forschungsergebnisse werden fortlaufend im PA diskutiert und die weitere Vorgehensweise abgestimmt.	PA3 - Darstellung der Ergebnisse, Diskussion zum weiteren Vorgehen.	07.03.24
Vortrag	Präsentation der Forschungsergebnisse	Netzwerkveranstaltung Bio.NRW.red, BioCampus Cologne	28.10.22
Posterpräsentation	Präsentation der Forschungsergebnisse	DECHEMA Himmelfahrtstagung	15.05.23
Vortrag	Vortrag bei einer internationalen Fachkonferenz	European Conference on Biotechnology	19.09.23
Maßnahmen nach Projektende	Ziel	Rahmen	Zeitraum
Publikation in Fachzeitschriften	Ergebnistransfer in Wirtschaft und Wissenschaft	Publikation ausgewählter Ergebnisse in Peer-Review Journalen wie z. B. Analytical Bioanalytical Chemistry, Analytical Chemistry, Lab-on-a-Chip, International Journal of Pharmaceutics, European Journal of Pharmaceutics und weiteren Fachzeitschriften wie z. B. GIT, Laborpraxis u. ä.	Ende 2024
Beratung von KMU	Schnelle Verbreitung des Standes der Projektbearbeitung.	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend durchgeführt.	Fortlaufend

5.4 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

In den vorangegangenen Unterkapiteln wurden bereits einzelne Transfermaßnahmen benannt. Hieraus geht hervor, dass seitens der Forschungseinrichtungen zahlreiche Maßnahmen unternommen wurden und auch zukünftig unternommen werden, um eine breite Öffentlichkeit zu erreichen. Die Transfermaßnahmen wurden zu Projektbeginn durch die Corona-Pandemie leicht ausgebremst. Zu Projektende konnten jedoch Beiträge auf Tagungen entsprechend der Auflistung in Tabelle 1 Tabelle 4 platziert werden.

Das Institut für Umwelt & Energie, Technik & Analytik e. V. verfügt über ein großes interdisziplinäres wissenschaftliches Netzwerk und arbeitet im Rahmen von Innovationsprogrammen als auch der Normungstätigkeit im DIN eng mit kleinen und mittleren Unternehmen zusammen.

Aufgrund der teils langjährigen Erfahrungen und Arbeiten in Kooperation mit KMU besteht auch hier ein ausgezeichnetes Industrie-Netzwerk, das einen optimalen Wissenstransfer in die Wirtschaft ermöglicht. Es wird angestrebt, im Rahmen einer weiteren FuE-Maßnahme über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand die noch resultierenden technischen Herausforderungen zu adressieren und die technische Entwicklung des Demonstrators zu einem Prototypen zu forcieren.

Abschließend ist zu konstatieren, dass das ursprüngliche Transferkonzept in weiten Teilen entsprechend der im ursprünglichen Forschungsantrag dargelegten Strategie umgesetzt werden konnte und weiterhin wie geplant realisiert werden kann.

6 Verwendung der Zuwendung

6.1 Forschungsstelle (IUTA e. V.)

6.1.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurde wissenschaftlich-technisches Personal wie geplant für insgesamt 28,5 Personenmonate eingesetzt.

6.1.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

entfällt

6.1.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

entfällt

6.2 Forschungsstelle (TCI)

6.2.1 Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Es wurden die im Antrag vorgesehenen Einsatzzeiten erbracht. Im Einzelnen erfolgten die Arbeiten des Angestellten mit wiss. Ausbildung (HPA-A) über 27 Personenmonate (bewilligt 27 Personenmonate).

6.2.2 Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans)

Im Berichtszeitraum wurden 1 Stück Sensorarray for Microfluidics (30.157,17 €), sowie eine μ -Prozessdosierpumpe (14.000,35) nach Einzelansatz B des Finanzierungsplans von der LUH angeschafft. Diese Geräte waren für die Bearbeitung der AP 1, 2, 3 und 7 notwendig.

6.2.3 Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans)

Entfällt

7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag, d. h. die geleisteten Arbeiten waren für den Projekterfolg notwendig und angemessen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] V. Bronsema, P. Serrano, N. Arnold, BIOTECHNOLOGIE IN DEUTSCHLAND, (2009), Konrad-Adenauer-Stiftung e.V..
- [2] T. Tanzeglock, M. Soos, G. Stephanopoulos, M. Morbidelli, Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows, *Biotechnol. Bioeng.* 104 (2009) 360–370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.22405>.
- [3] PreSens, pH SensorPlug, (n.d.). <https://www.presens.de/products/detail/ph-sensorplug>.
- [4] PreSens, O2 SensorPlug, (n.d.). <https://www.presens.de/products/detail/o2-sensorplug>.
- [5] PreSens, CO2 SensorPlug, (n.d.). <https://www.presens.de/products/detail/co2-sensorplug>.
- [6] A.C. Bock, U. Frank, Low-Code Platform, *Bus. Inf. Syst. Eng.* 63 (2021) 733–740. <https://doi.org/10.1007/s12599-021-00726-8>.
- [7] A. Dutta, T. Deb, S. Pathak, Automated Data Harmonization (ADH) using Artificial Intelligence (AI), *OPSEARCH.* 58 (2021) 257–275. <https://doi.org/10.1007/s12597-020-00467-4>.
- [8] M.D. Wilkinson, M. Dumontier, I.J. Aalbersberg, G. Appleton, M. Axton, A. Baak, N. Blomberg, J.-W. Boiten, L.B. da Silva Santos, P.E. Bourne, J. Bouwman, A.J. Brookes, T. Clark, M. Crosas, I. Dillo, O. Dumon, S. Edmunds, C.T. Evelo, R. Finkers, A. Gonzalez-Beltran, A.J.G. Gray, P. Groth, C. Goble, J.S. Grethe, J. Heringa, P.A.C. 't Hoen, R. Hooft, T. Kuhn, R. Kok, J. Kok, S.J. Lusher, M.E. Martone, A. Mons, A.L. Packer, B. Persson, P. Rocca-Serra, M. Roos, R. van Schaik, S.-A. Sansone, E. Schultes, T. Sengstag, T. Slater, G. Strawn, M.A. Swertz, M. Thompson, J. van der Lei, E. van Mulligen, J. Velterop, A. Waagmeester, P. Wittenburg, K. Wolstencroft, J. Zhao, B. Mons, The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship, *Sci. Data.* 3 (2016) 160018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18>.
- [9] M. Jochums, L.M.H. Reinders, J. Tuerk, T. Teutenberg, Flexible Digitization of Highly Individualized Workflows Demonstrated Through the Quality Control of

Patient-Specific Cytostatic Application Bags: Digitization from the Perspective of Small and Medium-Sized Laboratories, in: S. Beutel, F. Lenk (Eds.), *Smart Biolabs Futur.*, Springer International Publishing, Cham, 2022: pp. 115–129. https://doi.org/10.1007/10_2021_190.

- [10] C.T. Goudar, J.M. Piret, K.B. Konstantinov, Estimating cell specific oxygen uptake and carbon dioxide production rates for mammalian cells in perfusion culture, *Biotechnol. Prog.* 27 (2011) 1347–1357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/btpr.646>.