

Projektplan

ISICOM: Entwicklung eines neuartigen, nicht invasiven in situ Kombi-Sensors (ISICOM) zur Überwachung des metabolischen Zustands von Kultivierungsprozessen (19361 N)

Der Markt für (Bio-)Pharmazeutika hat mit weltweit ca. 700 Mrd. EURO eine enorme Bedeutung in der Weltwirtschaft erlangt und weist jährliche Wachstumsraten zwischen 5 % und 10 % auf. Ähnliche Wachstumsraten werden für den Markt von „Process Analysis Instrumentation“ prognostiziert. Während die Entwicklung neuer Pharmazeutika, aufgrund der damit verbundenen enormen Kosten für klinische Studien und Zulassung, für KMUs eine eher geringe Rolle spielt, ist der Markt für Prozessanalytoren und Prozesssoftware nicht zu vernachlässigen. Insbesondere da die FDA (U. S. Food and Drug Administration) mit der Process Analysis Technology (PAT)-Initiative eine Plattform geschaffen hat, die eine Umfassende Prozessüberwachung und -kenntnis in das Zentrum eines Zulassungsverfahrens stellt. Mit dem steigenden Bedarf an Pharmazeutika geht somit auch ein steigender Bedarf an neuen Sensorkonzepten einher, die von KMUs entwickelt und geliefert werden können.

Biotechnologische Prozesse sind komplexe Mehrphasenprozesse und die ganzheitliche Beschreibung dieser ist heute nur mit erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich. Um solche Prozesse sicher und effizient zu gestalten, sind Sensoren nötig, die den Prozess- und insbesondere den Zellzustand möglichst nicht-invasiv und in situ erfassen. Speziell Sensoren zur Beobachtung der metabolischen Aktivität der Zellen und zur Beurteilung des Zustands des Gesamtprozesses fehlen bisher. Hier eignet sich die Sauerstoffaufnahme (OUR) bzw. die spezifische Sauerstoffaufnahme (qOUR) als ein robuster Indikator zur Bestimmung zellulärer Aktivität, denn eine Vielzahl von mikrobiellen Prozessen, die meisten Pilz- und Pflanzenkulturen und alle Säugerzellkulturen sind aerobe Prozesse.

Forschungsziel

In diesem Forschungsprojekt soll ein neuartiger in situ Kombi-Sensor (ISICOM) entwickelt werden, der den spezifischen Sauerstoffverbrauch (qOUR) der Zellpopulationen direkt im Reaktor (in-situ) während des Kultivierungsprozesses erfasst. Der ISICOM ist so konzipiert, dass nicht die gesamte Zellsuspension im Reaktor vermessen wird, sondern ein definiertes, zeitlich segmentiertes Volumen. Dazu besteht der Sensor aus einer zeitweise, dicht verschließbaren Messkammer. In dieser homogen durchmischten Zone werden pH- und pO₂- Sensoren, basierend auf Glasfaseroptik, integriert. Über eine Streulicht-, IR- oder Fluoreszenzoptode ist außerdem die Biomassekonzentration bestimmbar. Bei geschlossener Kammer ist die spezifische Sauerstoffaufnahme direkt, aus der Kombination dieser Messwerte, mittels der dynamischen Methode zugänglich. Der Vorteil dieser Sensorkombination ist, dass der

ISICOM bei geöffnetem Messraum als konventionelle pH-, pO₂- und Streulicht, IR oder Fluoreszenzsensor arbeitet und mit den anderen Sensoren im Reaktor abgeglichen werden kann. Bei geschlossener Messkammer ist die qOUR der Zellen charakterisierbar, ohne den Kultivierungsprozess zu beeinflussen oder eine Probe aus dem Reaktor zu nehmen. Eine Beschreibung der biologischen Aktivität bzw. des metabolischen Zustands der Kultur wird hierdurch möglich.

Lösungsweg zur Erreichung des Forschungsziels

Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über den geplanten Sensoraufbau. Der Sensor wird für den Einsatz im 25 mm- Ingold-Port entworfen und getestet. Die Konstruktion dieser Messkammern inklusive Verschlussmechanismus und Rührereinheit erfolgt mittels CAD-System und Rapid-Prototyping (3D-Druck) schnell, kostengünstig und flexibel in Kunststoffaufbauten. Sobald vielversprechende Varianten entwickelt sind, werden diese in Edelstahlversionen gebaut, um die Prozesstauglichkeit zu gewährleisten. Für das Öffnen und Schließen der Messkammer muss eine entsprechende Steuereinheit entwickelt, auch muss die Datenaufzeichnung und -weitergabe gewährleistet sein. Zusätzlich werden Auswertelgorithmen für die Ermittlung der qOUR und die spektroskopischen Datenauswertung implementiert und automatisierte Rekalibrationen mit anderen verfügbaren Sensoren für pH und pO₂ entwickelt.

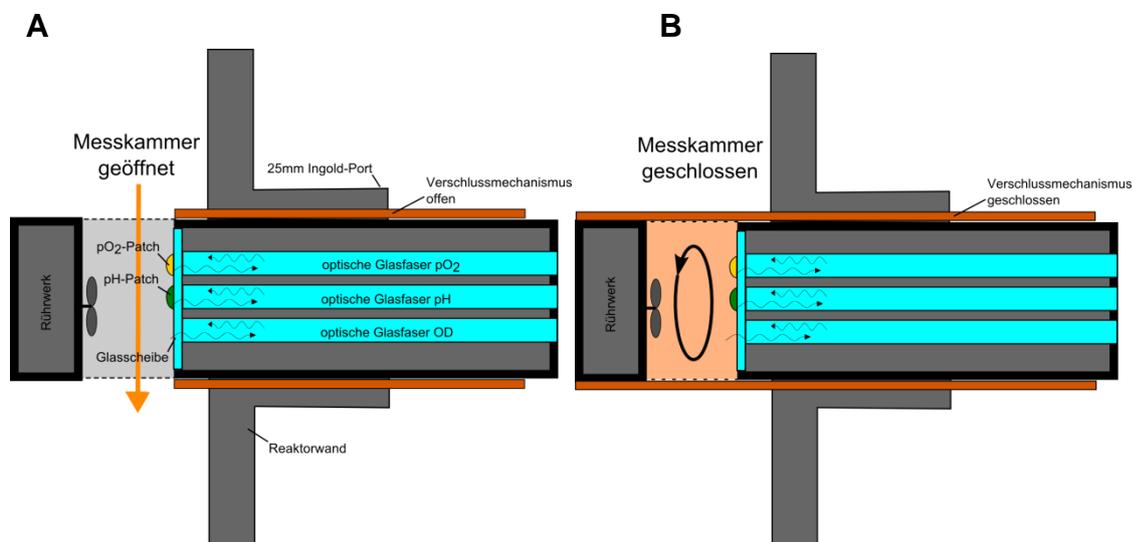


Abbildung 1: Stark schematisierte Darstellung der Funktionsweise des ISICOM Grundsensors. A zeigt das Durchströmen der Kultursuspension bei geöffneter Probenkammer mit gleichzeitiger Sauerstoff-, pH- und Biomassemessung. B die durchmischte (Rührwerk sinnbildlich gezeigt) Messkammer des Sensorkopfes bei geschlossener Probenkammer während der qOUR Messung.

Im Anschluss an die Konstruktion wird der Sensor an Modellsystemen charakterisiert. Es sind Modellsysteme mit definierter Sauerstoffführung, definierten Sauerstoffverbrauchssystemen (z.B. Glukose und Glukoseoxidase) und variablen Trübungsverhalten geplant, um Untersuchungen zur

Sensitivität, Selektivität, dem Langzeitverhalten und der Auswertesicherheit durchzuführen. Diese Testmessungen werden in Rührkesselreaktoren realisiert, wobei die Prozessgrößen (Trübung, pO₂-Wert) gezielt verändert und mit dem Sensor erfasst werden. Anhand der Modellsysteme sind die geeigneten Messbereiche des Sensors bestimmbar.

Abschließend erfolgt der Einsatz des Sensors an biotechnologisch relevanten Modellprozessen (E. coli, S. cerevisiae, Tierzellkultivierungen). Dazu wird der Sensor in 2 L bzw. 10 L Rührkesselreaktoren bei der Kultivierung von S. cerevisiae und E. coli genutzt und intensiv getestet. Ein Vergleich der Sensordaten mit offline Daten und den herkömmlichen qOUR-Analysen zeigt die Zuverlässigkeit, Messempfindlichkeit und Genauigkeit des Sensors über den Prozessverlauf und ermöglicht die Optimierung für den Einsatz an biotechnologischen Prozessen. Die minimalen Analysezeiten zur verlässlichen Bestimmung der qOUR und maximalen Analysenfrequenzen ohne Zellschädigung werden ermittelt. Änderung von unterschiedlichen Testsignalen in Form von veränderten Prozessvariablen wie Temperatur, pO₂, pH-Wert oder Substratkonzentration sollen das Antwortverhalten des Sensors erfassen. Mit Hilfe biochemischer Experimente (z.B. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mittels 2,4-Dinitrophenol, etc.) soll die Einsatzbreite des Sensors genauer beschrieben werden. In einem weiteren Abschnitt der Arbeiten kommt der Sensor bei Kultivierung von tierischen Zellen zum Einsatz. Dazu werden CHO-Kultivierungen bis in den Bereich von 20 · 10⁶ Zellen/mL in Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen durchgeführt.

Bei erfolgreicher Entwicklung des Sensors, kann dieser stets durch weitere Komponenten, wie zum Beispiel einer pCO₂-Optode, erweitert werden. Dadurch ergeben sich auch langfristig vielfältige Einsatzmöglichkeiten in einem breiten Prozessspektrum.

Projektbegleitender Ausschuss

Unternehmen
art photonics GmbH
Blue Ocean Nova AG
Christian Hansen
LabCognition, Analytical Software GmbH & Co. KG
Ocean Optics BV
PreSens - Precision Sensing GmbH
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Weihenstephaner Förderverein für Brau-, Getränke-, und Getreide-technologie e. V.