

# Abschlußbericht

## **Globale Automatisierung einer Pilotanlage mit gekoppelten Upstream- und Downstream Prozesskomponenten am Beispiel der Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *Pichia pastoris***

**FKZ: 2753**

**Bearbeiter:** Dipl.-Ing. Matthias Eicke  
HAW - Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess- und Analysetechnik  
Lohbrügger Kirchstr. 65  
21033 Hamburg

**Ansprechpartner:** Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann  
Email: [reiner.luttmann@ls.haw-hamburg.de](mailto:reiner.luttmann@ls.haw-hamburg.de)  
Tel.: 040-42875-6357

### **Inhalt:**

1. Herstellung rekombinanter Proteine in Integrierter Bioprozessführung
2. Die eingesetzte Upstream- und Downstreamtechnik
3. Die Prozessentwicklung mit einer virtuellen Anlage

# Globale Automatisierung einer Pilotanlage mit gekoppelten Upstream- und Downstream Prozesskomponenten am Beispiel der Herstellung von equinem Interleukin-4 in Hochzelldichtekultivierungen

## 1. Herstellung rekombinanter Proteine in Integrierter Bioprozessführung

### 1.1 Das Konzept eines Integrierten Bioprozesses

Die direkte prozesstechnische Verbindung von Kultivierung und Produktion mit primären Aufarbeitungsschritten zur Abtrennung des Produktes von den Zellen wird als integrierte Prozessführung verstanden. Bei einem Einsatz der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* als Hostsystem bietet sich dieses Konzept an, da ein extrazelluläres Produkt vorliegt, das noch während der Produktion abgetrennt, aufgereinigt und gelagert werden kann.

Die dafür prinzipiell notwendigen Komponenten einer integrierten Anlage sind in Abb. 1 gezeigt. Insgesamt erfordert der Prozess drei Vorlagen mit den darin enthaltenen Substraten für Wachstum der Zellen und die Produktion des Zielproteins. Am Ausgang des Reaktors befindet sich eine Mikrofiltrationseinheit mit einem permeatseitig angeschlossenen thermostatisierten Behälter für die Lagerung des abgeführten Permeats.

Nach Anzucht von *Pichia pastoris* auf Glycerol im klassischen Batchverfahren folgt eine substratlimitierte Fed Batch-Phase mit gesteuerter Wachstumsrate. Hierbei wird dem Medium über eine Pumpe mit definiertem Profil Glycerol zugeführt bis eine bestimmte Zelldichte erreicht ist.

Die anschließende Induktion wird durch Zufuhr des Induktors Methanol eingeleitet, wodurch mit der Produktion des Zielproteins begonnen wird. Durch die in das System integrierte Mikrofiltrationseinheit kann schließlich eine zyklische Abtrennung des Produktes durchgeführt werden. Das von Zellen befreite Permeat wird in einen gekühlten Behälter geleitet, woraufhin die Feinreinigung mittels chromatographischer Methoden erfolgen kann. Bei der für diesen letzten Schritt eingesetzten FPLC-Anlage ÄKTApurifier 100 handelt es sich prinzipiell um ein Stand-alone-Gerät, das allerdings eine softwaretechnische Einbindung in die Reaktorsteuerung zulässt.

Der für dieses Konzept notwendige hohe Automatisierungsaufwand erfordert das Vorhandensein von Komponenten, die eine Messung, Steuerung und Regelung sämtlicher prozessrelevanter Größen gewährleisten.

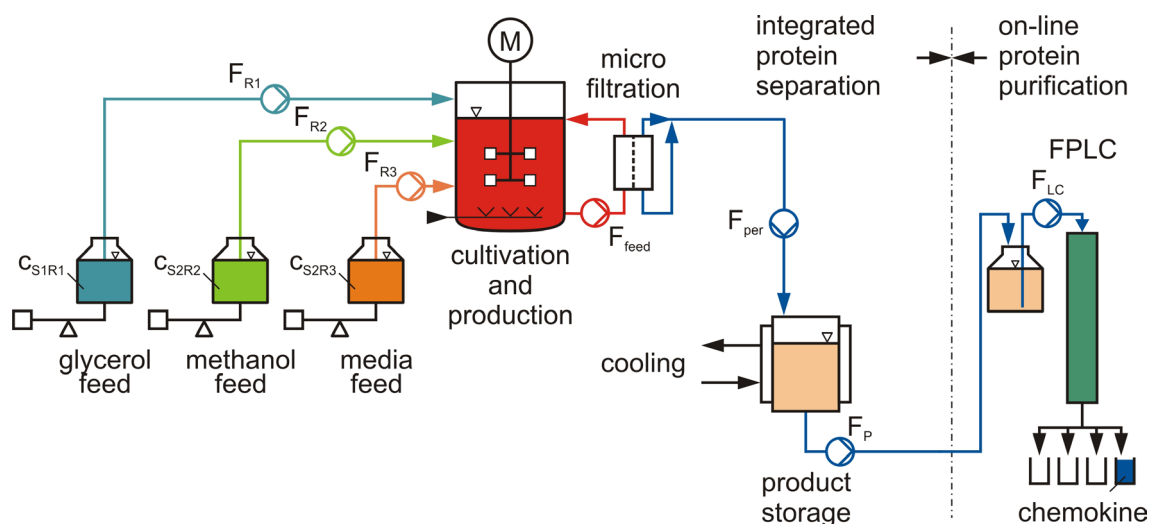


Abb. 1: Konzept einer Anlage für eine Integrierte Bioprozessführung

## 1.2 Geplanter Prozessablauf im Batch und Fed Batch

Nach dem Animpfvorgang erfolgt zunächst eine Batch-Phase, in der die Mikroorganismen unlimitiert wachsen. Wie in Abb. 2 dargestellt wird der  $pO_2$  bis zum Erreichen seines Sollwertes  $pO_{2w}$  von 10 % nicht geregelt. Zum Zeitpunkt  $t_1$  erfolgt anfangs eine Regelung des  $pO_2$  durch Anhebung der Luftbegasungsrate  $F_{nAIR}$  bis diese einen Wert  $F_{nAIRmax} = 18 \text{ lmin}^{-1}$  ( $\cong 1.5 \text{ vvm}$ ) erreicht.

Während dieser Phase verbleibt die Rührerdrehzahl auf ihrem Anfangswert  $N_{St0}$ . Anschließend wird der erforderliche Stoffübergang durch automatische Aktivierung der  $pO_2$ -Drehzahlregelung gewährleistet ( $t_2$ ). Dies soll idealerweise bis zum Ende einer Kultivierung genügen, um den Sollwert einzuhalten. Für den Fall, dass die Drehzahlgrenze  $N_{Stmax}$  erreicht wird, ist als dritte Methode eine  $pO_2$ -Gas-mix-Regelung vorgesehen, die bei gleich bleibender Gesamtbegasungsrate  $F_{nG}$  den  $O_2$ -Stoffmengenanteil am Gaseintritt durch Beimischung reinen Sauerstoffs verändert (nicht in Abb 1 gezeigt).

Mit dem quantitativen Verbrauch der ersten Kohlenstoffquelle Glycerol (S1) ist die Batchphase beendet ( $t_3$ ), was durch ein rapides Ansteigen des  $pO_2$  gekennzeichnet ist. Die Prozessleitsoftware nutzt diesen Effekt, um das Eintreten der Substratlimitierung zu detektieren und mit der exponentiellen Zufütterung von Glycerol zu beginnen. Während der Fed Batch-Phase wird die zellspezifische Wachstumsrate auf einem kleinen  $\mu_{1w}$  von  $0.1 \text{ h}^{-1}$  gesteuert, um eine  $O_2$ -Begasung zu vermeiden. Bei Erreichen einer Zelldichte  $c_{XLturb}$  von  $30 \text{ gl}^{-1}$  bei  $t_4$  wird die Fed Batch-Phase durch Einstellen der Zufütterung aus der Glycerolvorlage beendet und mit der Induktion der Zielproteinexpression durch Wechsel der Kohlenstoffquelle auf Methanol (S3) begonnen. Die gemessene Substratkonzentration  $c_{S3M}$  wird durch Regelung für den restlichen Verlauf der Kultivierung auf einem konstanten Sollwert gehalten (Abb. 3).

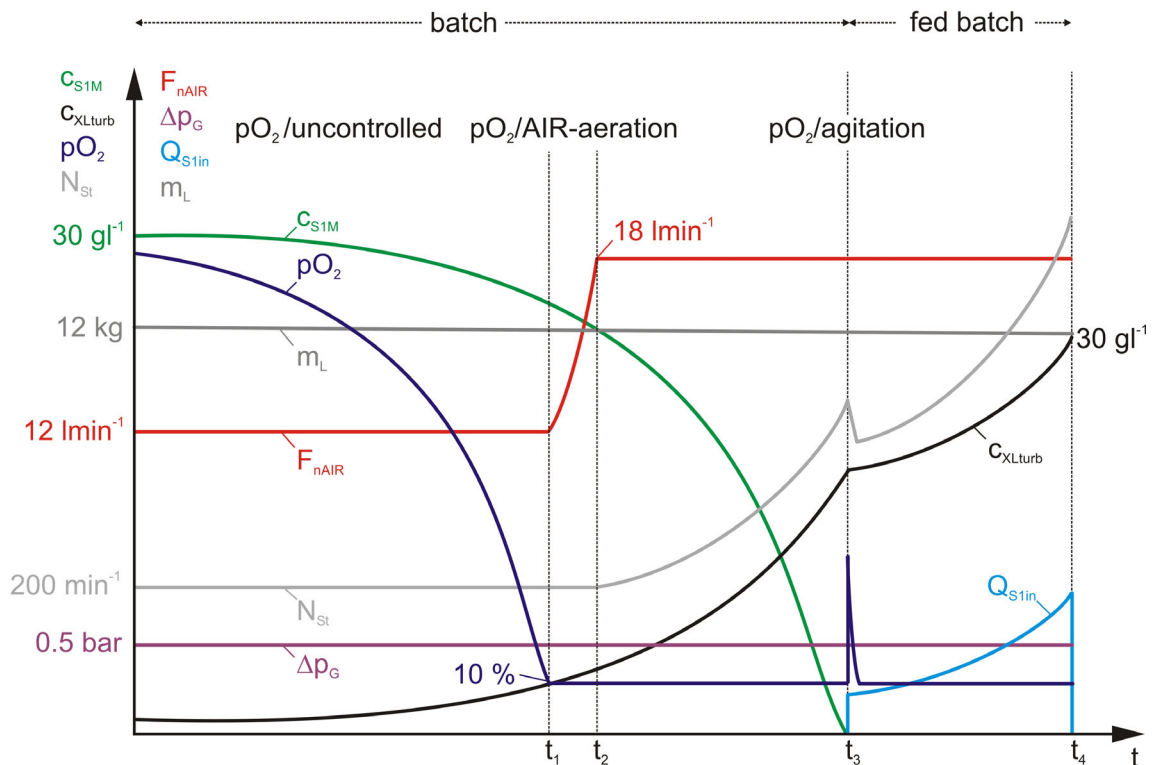


Abb. 2: Experimental Design der Batch- und Fed Batch-Phase für die Zellanzucht

### 1.3 Experimental Design der Sequentiell Integrierten Prozessführung

Die Sequentiell Integrierte Prozessführung ist in vier sich zyklisch wiederholende Phasen unterteilt. Eine Sequenz beginnt immer mit der Produktion, gefolgt von den Phasen Mikrofiltration, Zellernte und Mediaauffrischung.

Vor Beginn der ersten Mikrofiltration und im Anschluss an eine Membranreinigung wird einmalig eine Kuchenbildung durchgeführt, die zum Aufbau einer Deckschicht (Sekundärschicht) führt. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass beim späteren Öffnen der Permeatausgänge anfänglich kein zu hoher Permeatfluss entsteht, was zu einer verstärkten Ablagerung von Substanzen auf der Membran und schließlich zu einer Verstopfung der Poren (fouling) führen kann, wodurch die Filtrationsleistung beeinträchtigt wird. Es wird somit gewährleistet, dass die anschließende Crossflow-Filtration unter nahezu konstanten Bedingungen ablaufen kann.

Hochzelldichten sind in der Integrierten Prozessführung ein nicht maßgebendes Ziel, da die Filtrationsleistung stark von der Rheologie der Zellsuspension abhängt. Zelldichten im Bereich von 40 bis 60  $\text{gl}^{-1}$  BTM wurden in Vorversuchen als geeignet ermittelt, um eine ausreichende Produktivität sowie eine moderate Standzeit der Module zwischen den Filtrationsphasen zu gewährleisten.

Die angestrebte Prozessführungsstrategie, dargestellt in Abb. 3, sieht eine Filtration immer dann vor, wenn eine Zelldichte von 40  $\text{gl}^{-1}$  erreicht wird, wobei dieser als Automatisierungskriterium verwendete Wert an die jeweiligen Anforderungen angepasst werden kann.

Während der Abtrennung des Zielproteins wird die Masse des Reaktorvolumens durch Zufuhr frischen Mediums auf einen Sollwert  $m_{Lw}$  von 12 kg geregelt, d.h. die Mikrofiltration wird als Diafiltration durchgeführt und abgeführtes Permeat kontinuierlich durch frisches Medium ersetzt.

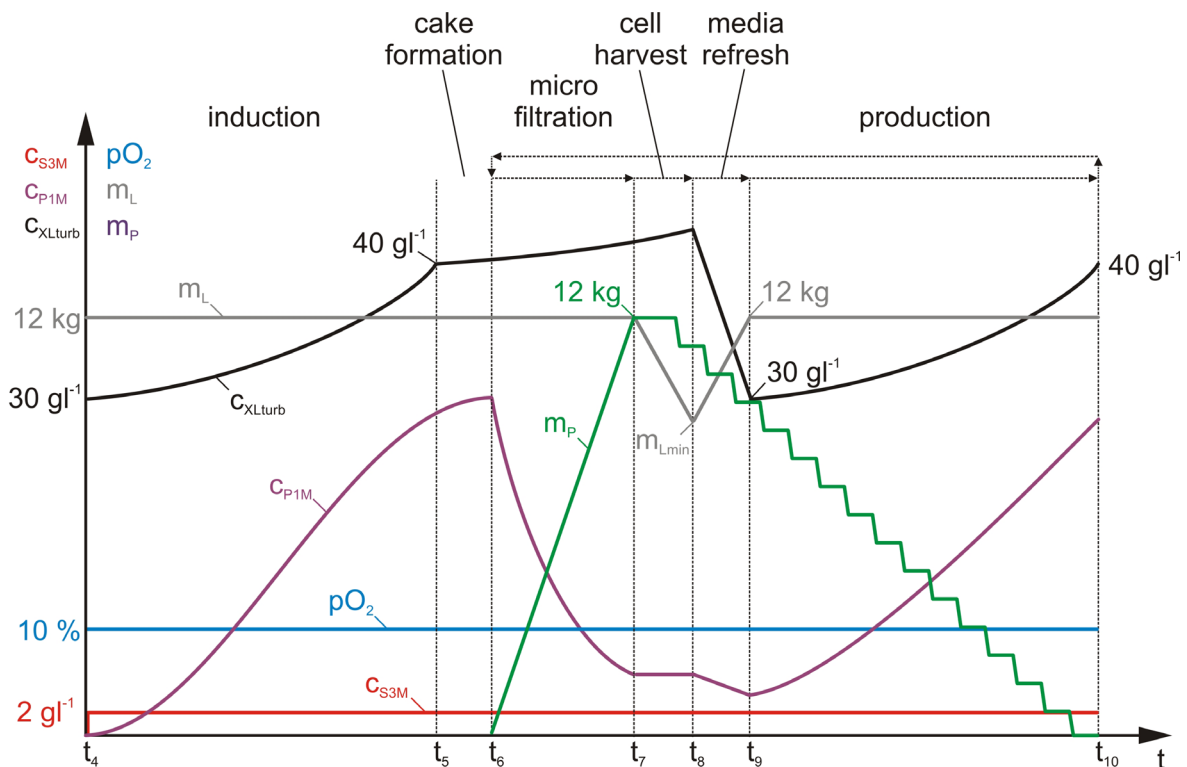


Abb. 3: Experimental Design der Sequentiell Integrierten Prozessführung

Vorgesehen ist ein vollständiger Austausch des im Reaktor befindlichen Flüssigvolumens. Sobald die Masse des produktbehafteten Mediums im Permeattank den Sollwert  $m_{pw}$  von 12 kg erreicht, wird die Filtration beendet. Es folgt die Feinreinigung, bei der die angeschlossene FPLC-Anlage wiederum zyklisch mit Probe aus dem Permeattank versorgt wird.

Die anschließende Konditionierung der Fermenterbrühe durch die Phasen Zellernte und Mediaauffrischung ist notwendig, um die gleichen Bedingungen zu schaffen, die zu Beginn der Induktion vorlagen. Anhand der online ermittelten Zelldichte  $c_{XL,turb}$  und der Masse des Reaktorvolumens  $m_L$  wird die Verdünnung berechnet, die notwendig ist, um nach einer Mediaauffrischung bei einem vorgegebenen Reaktorvolumen  $V_L$  von 12 l wieder eine Zelldichte von  $30 \text{ gl}^{-1}$  zu erreichen.

Die nächste Sequenz beginnt bei  $t_9$  erneut mit einer Produktionsphase, während derer die Hefezellen bis zu einer Zelldichte  $c_{XL,turb}(t_{10})$  von  $40 \text{ gl}^{-1}$  heranwachsen, bevor eine weitere Produktabtrennung durchgeführt wird.

## **2. Die eingesetzte Upstream- und Downstreamtechnik**

### **2.1 Der Bioreaktor *BIOSTAT C X-flow***

Der in Abb. 4 gezeigte Reaktor *BIOSTAT*<sup>®</sup> C-30 (Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH) besteht aus einem Edelstahlkessel, der mit einem Arbeitsvolumen von 7 l bis 30 l betrieben werden kann. Die Durchmischung der Flüssigphase erfolgt durch drei höhenverstellbare 6-Blatt-Scheibenrührer, die von einem Gleichstrom-Servomotor (Typ 6SM57M-3000, Fa. Kollmorgen/Seidel Servo Drives, Düsseldorf) angetrieben werden. Eine Rotation der Kulturbrühe wird durch vier Strömungsbrecher verhindert. Die Wellendurchführung im Reaktordeckel erfolgt über eine dampfsterilisierbare doppelte Gleitringdichtung.

Der Kessel ist mit einer maximal möglichen Anzahl von 25 mm Normstutzen ausgestattet. Diese verteilen sich auf einen oberen sowie einen unteren Stutzenkranz. Die Zugabe von Glycerol, Methanol und Refreshmedium sowie die Zellernte und der Retentatrücklauf erfolgt über fünf 25 mm Normstutzen im oberen Stutzenkranz. Hierbei sind die Anschlüsse für Zellernte, Methanolzufütterung und Retentatrücklauf mit Steigrohren versehen. Der untere Stutzenkranz besteht aus vier radialen 25 mm Sicherheitsstutzen sowie zwei radialen 25 mm Normstutzen zur Aufnahme von Reaktorsonden, einem geraden 25 mm Sicherheitsstutzen für das Probenahmeventil und einem 12 mm Normstutzen für die Temperatursonde.

Der Reaktordeckel ist neben den Anschlüssen für das CIP-System mit Stutzen für Säure-, Lauge- und Antischaummittelzugabe sowie einer Schaumsonde (Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH) ausgestattet, die in 19 mm Normstutzen eingelassen sind. Reaktorbegasung und Abgasstrecke sind ebenfalls über den Deckel an das System angeschlossen. Die Begasung erfolgt mit einer oberhalb des Kessels installierten Gasmischstation, die mit Mass-Flow-Controllern (Fa. Christian Bürkert GmbH & Co. KG) für Luft, Sauerstoff und Stickstoff bestückt ist.

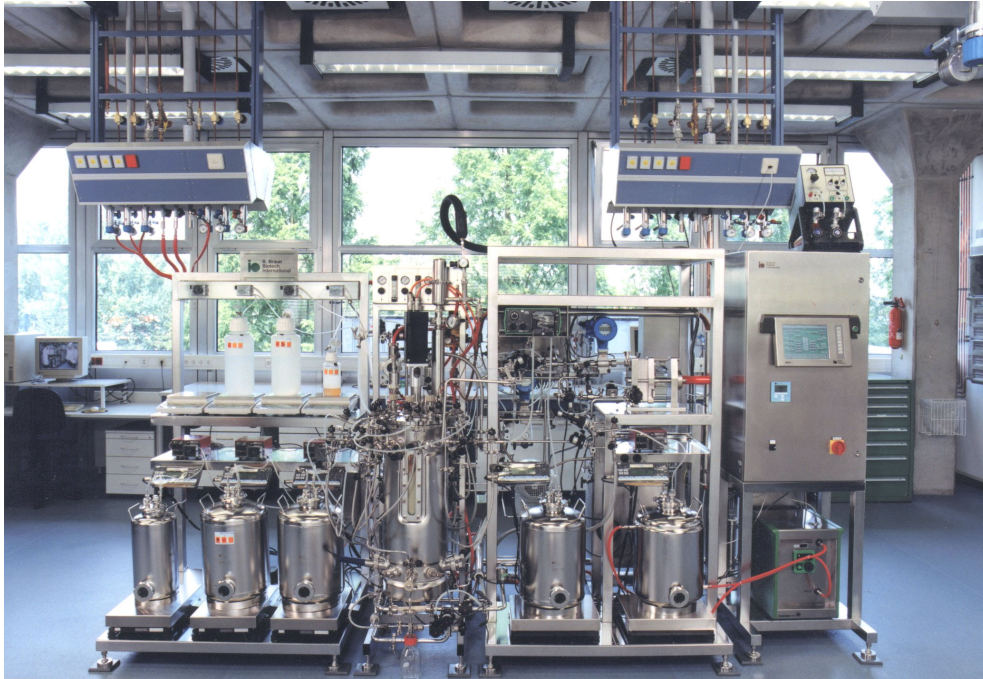


Abb. 4: Der BIOSTAT C-Xflow für Integrierte Prozessführungen

Das Temperiersystem besteht aus einem elektrischen Heizaggregat (Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH) und einem Plattenwärmetauscher (Fa. Sweb International AB, Schweden) sowie einem Zirkulationssystem, das an den Reaktordoppelmantel angeschlossen ist. Die Sterilisation des Kessels wird ebenfalls von diesem System übernommen.

Der BIOSTAT C bietet zusätzlich die Möglichkeit einer Wägung des gesamten Kessels, wodurch eine Bilanzierung der Zellsuspension möglich ist. Realisiert wird die Gewichtsbestimmung durch drei DMS-Wägezellen des Typs PR 6207/51D1 (Fa. GWT GmbH), an denen der Kessel aufgehängt ist. Die Wägezellen sind als Vollbrücken geschaltet und haben eine jeweilige Nennlast von 50 kg.

In die Verrohrung und in die Automatisierungstechnik des BIOSTAT<sup>®</sup> C-30 Reaktor ist eine Sartococon Slice Crossfloweinheit (Xflow) zur direkten Abtrennung zellfreier Fermenterbrühe integriert.

### ***2.2 Die Primäraufarbeitungseinheit Sartococon Slice***

Die während des sequentiell integrierten Betriebes zyklisch durchgeführten Mikrofiltrationssequenzen werden mit der in Abb. 5 dargestellten Filtrationseinheit Sartococon Slice (Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH) durchgeführt.

Sie ist über das Bodenablassventil mit dem Bioreaktor verbunden und wird durch eine Kreis-Kolbenpumpe mit Zellsuspension durchströmt. Die Membranen der eingespannten Filtrationsmodule werden dabei in Querrichtung angeströmt wobei es zu der gewünschten Abtrennung des Produktes von den Zellen kommt. Das Retentat wird über einen Anschluss im oberen Stützenkranz kontinuierlich in den Reaktor zurückgeleitet. Gleichzeitig wird das Permeat in einem Produktbehälter gesammelt und auf 4 °C gekühlt. Für diesen Zweck ist der Permeattank mit einem Doppelmantel ausgestattet, der wiederum mit einem Durchlaufkühler (Frigomix R, Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH) verbunden ist.

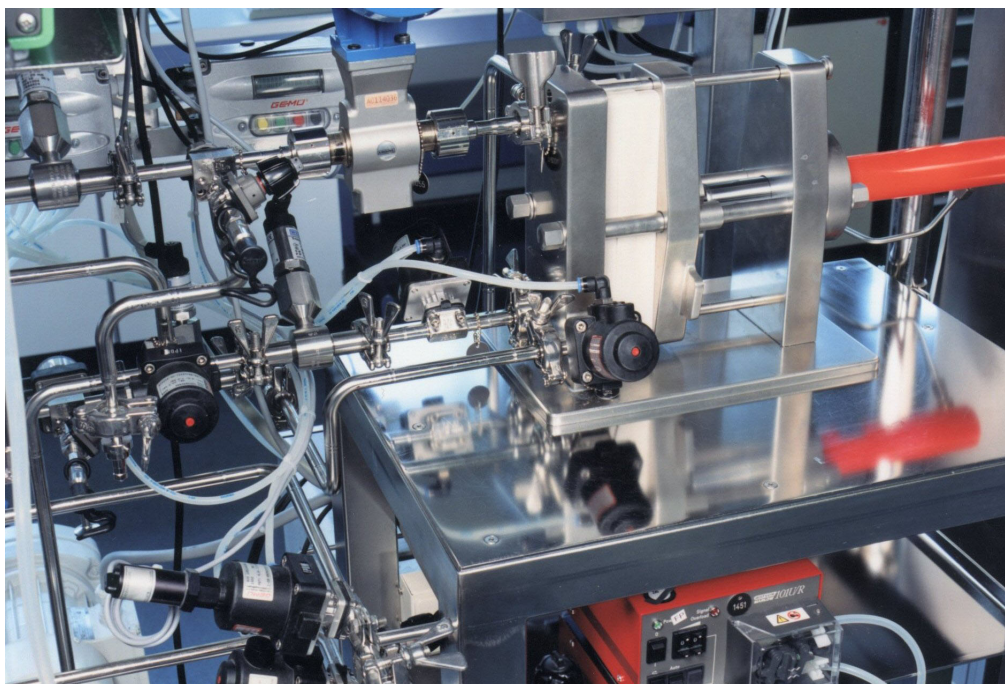


Abb. 5: Filtrationseinheit des BIostat C-Xflow zur Durchführung von Crossflow-Filtrationen

Die Erfassung der während einer Filtration auftretenden Flüsse im Retentat- und Permeatweg wird durch magnetisch-induktive Durchflussmesser (Fa. Krohne Messtechnik GmbH & Co. KG) realisiert. Des Weiteren werden die Filtrationsbedingungen über drei Druckregelkreise eingestellt. Hierfür sind im Feedweg, im Retentatweg und im Permeatweg Druckmessumformer (Typ C-10, Fa. WIKA Alexander Wiegand GmbH & Co. KG) installiert, die entsprechende Messwerte für die Regelung erzeugen. Die Hubbegrenzung des Retentat- und Permeatventils erfolgt über Linear-Weggeber, (Typ 4232, Fa. GEMÜ), die über ein Sollwertsignal eines intelligenten elektropneumatischen Stellungsregler (Typ ePos 1435, Fa. GEMÜ) angesteuert werden.

Der Filterhalter Sartocoon Slice kann bis zu sechs Mikrofiltrationskassetten aufnehmen und ermöglicht den vom Anlagenkonzept geforderten vollautomatischen Betrieb. Der durch die DCU3 vorgegebene Anpressdruck der Module wird durch ein Hydraulikaggregat (Fa. Haskel HochdruckSysteme GmbH) erzeugt.

Die eingesetzten Filterkassetten (Tab. 1) der Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH besitzen eine Hydrosart<sup>®</sup> Membran mit einer effektiven Filterfläche von 0.1 m<sup>2</sup> pro Filtrationsmodul. Aufgrund des hydrophilen Charakters der Membran soll eine Proteinbindung verhindert werden, was einem unerwünschten Fouling-Effekt entgegenwirkt.

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten Mikrofiltrationsmodule

Membranmaterial	Porengröße	Bestell-Nr.	Filterfläche	pH-Stabilität	P <sub>feedmax</sub> bei 20°C	max. Dauerbetriebstemp.	Dichtung	Vergussmasse
Hydosart <sup>®</sup>	0.2 µm	3051860701 W--SG	0.1 m <sup>2</sup>	2-14	4 bar	50 °C	PVDF	Silikon
Hydosart <sup>®</sup> (open channel)	0.2 µm	3051860701O--SG	0.1 m <sup>2</sup>	2-14	4 bar	50 °C	PVDF/PS U	Silikon

### 3. Die Prozessentwicklung mit einer virtuellen Anlage

#### 3.1 Das Prinzip des Apparent Processing

Der BIOSTAT® C-Xflow stellt mit der direkten technologischen Verbindung von Kultivierung und primärer Separation ein System dar, das eine integrierte Prozessführung ermöglicht. Zusammen mit der vorhandenen Automatisierungstechnik können komplexe Experimente durchgeführt werden, die der Herstellung rekombinanter pharmakologischer Wirkstoffe dienen. Die gewählte Sequentiell Integrierte Prozessführung stellt dabei eine Herausforderung an die Vorortautomatisierung sowie die übergeordnete Prozessleittechnik dar. Letztere ist für den geplanten Ablauf eines Kultivierungsexperimentes entsprechend dem gewählten Experimental Design verantwortlich.

Die Umsetzung der Prozessführungsstrategie erfolgt mit einem ISA S88 Standard unter der Prozessleitsoftware MFCS/win® und stellt dabei einen kritischen Schritt auf dem Weg zur eigentlichen Kultivierung und Produktion dar. Gerade bei komplexeren Kultivierungsstrategien wie der hier angewandten Sequentiell Integrierten Fahrweise ist es fast unmöglich, sämtliche Eventualitäten vorab zu erfassen, die zu einem Misslingen der Kultivierung führen können. Eine Erprobung am realen Prozess ist dabei eine ineffiziente Lösung, da es viel Zeit und Kosten bedarf, bis alle Fehler erkannt und behoben sind.

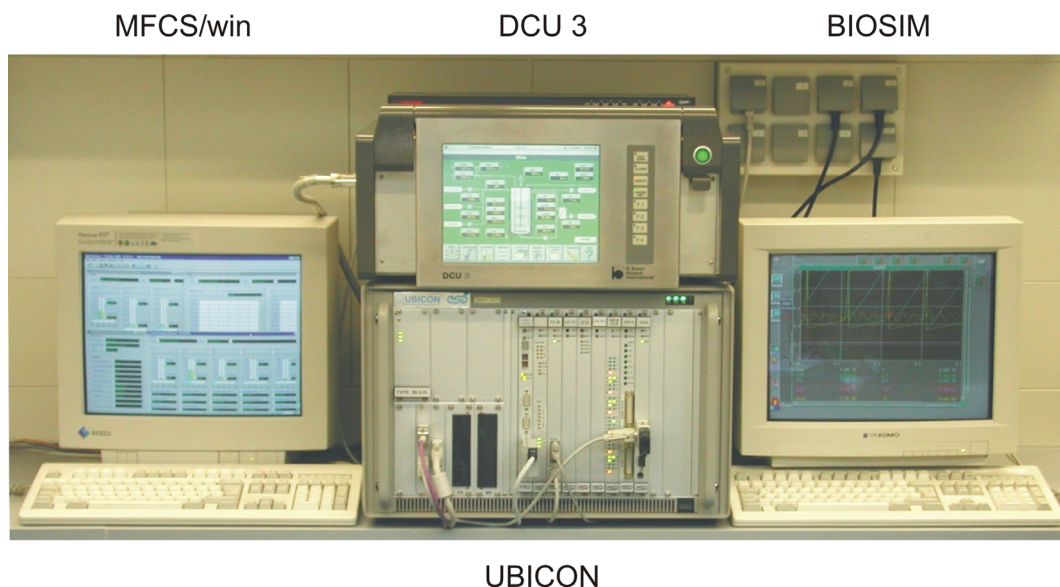


Abb. 6: Aufbau der Simulationsumgebung

Um diese Problematik zu umgehen, wurde der gesamte Prozess im Verlauf der Entwicklung mit einem in Abb. 6 gezeigten echtzeitfähigen Simulationssystem virtuell gefahren. Der dafür erforderliche Prozessaufbau beinhaltet den realen Prozesscontroller DCU 3 mit der darin enthaltenen Vorortautomatisierung als auch den Prozessleitrechner, der die übergeordnete Prozesssteuerung mit dem SCADA-System MFCS/win® 3.0 übernimmt. Der Echtzeitsimulator ist Teil eines VMEbus-Industrirechners, der die I/O-Eigenschaften der verfahrenstechnischen Anlage emuliert und an die zum realen Prozess identische Automatisierungstechnik physikalisch angeschlossen ist. Auf dieser Plattform werden das Simulationsprogramm BIOSIM und das Prozessleitsystem UBICON ausgeführt. Letzteres ist nur für den Datenaustausch zwischen Echtzeitsimulator und den angeschlossenen Systemen DCU3 und MFCS/win® verantwortlich, übernimmt dabei aber keinerlei Prozessführungsaufgaben. Es ermöglicht vielmehr die signaltechnische Anpassung des virtuellen Prozesses an das Input/Output-Verhalten der realen Mess- und Steuerungstechnik.



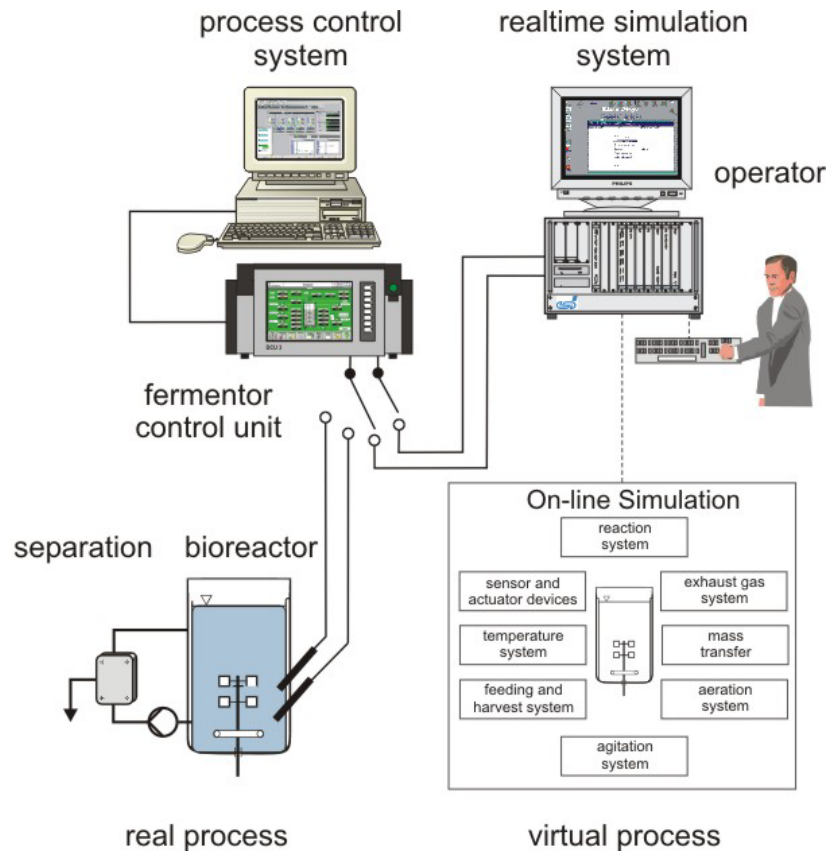


Abb. 7: Das Prinzip des Apparent Processing

Bei dieser als Apparent Processing bezeichneten Herangehensweise emuliert der Echtzeitrechner durch ein entsprechendes Prozessmodell den gesamten Bioreaktor mit seiner Peripherie sowie die Mikrobiologie des betrachteten Organismus. Die zugrundeliegende Idee dieses Prinzips ist in Abb. 7 dargestellt.

Das Programmpaket BIOSIM löst unter Steuerung der DCU- und MFCS/win-Stellsignale die im Prozessmodell enthaltenen algebraischen und dynamischen Gleichungen in Echtzeit und stellt wiederum über UBICON der angeschlossenen Automatisierungstechnik sämtliche Messdaten zur Verfügung, die auch bei einem tatsächlich durchgeführten Kultivierungsexperiment entstehen würden.

Auf diese Weise können durch die Verwendung einer realen DCU 3 und des ebenfalls am BIOSTAT C-Xflow eingesetzten Prozessleitsystems MFCS/win virtuelle Experimente durchgeführt werden, die eine Erprobung von Prozessführungsstrategien im Vorfeld einer realen Kultivierung erlauben.

Darüber hinaus bietet der Aufbau, wie in Abb. 7 angedeutet, die Möglichkeit die verwendete Prozessautomatisierungstechnik und die softwareseitig mit S88 implementierte Fahrweise nach virtuellen Erprobungen ohne Änderung der Hardware oder Konfigurationen direkt am realen Fermentationsprozess einzusetzen.

### 3.2 Ein Simulationsbeispiel – Prozess start up

Die in MFCS/win<sup>®</sup> 3.0 mit S88 umgesetzte Prozessführung wird im Folgenden anhand einer Simulation dargestellt. Das Prinzip des Apparent Processing ist speziell für die Erprobung der automatischen Batchende-Erkennung von großer Bedeutung, da eine Fehlfunktion dieses Automatisierungsschrittes im realen Prozess unter Umständen zu einer langanhaltenden Substratlimitierung führen würde, die vom Organismus nicht dauerhaft toleriert werden kann.

Einen Überblick verschafft Abb. 8, die den Verlauf einer virtuellen Kultivierung bis zur ersten Mikrofiltration zeigt. Die Übergänge vom Batch in den Fed Batch-Betrieb sowie die eingeleitete Induktion sind jeweils durch ein starkes Ansteigen des  $pO_2$ -Wertes gekennzeichnet. Während des später folgenden Sequentiell Integrierten Betriebes sollte die Zelldichte  $c_{XL}$  zu Beginn einer Produktionsphase immer bei einem Wert  $c_{XL,min}$  von  $25 \text{ gl}^{-1}$  liegen. Der Übergang zur anschließenden Mikrofiltration sollte bei einer Zellkonzentration von  $35 \text{ gl}^{-1}$  stattfinden.

Die Batchende-Erkennung konnte somit erfolgreich realisiert werden. Die einsetzende Substratlimitierung wurde ordnungsgemäß erkannt und der Fed Batch-Betrieb automatisch eingeleitet.

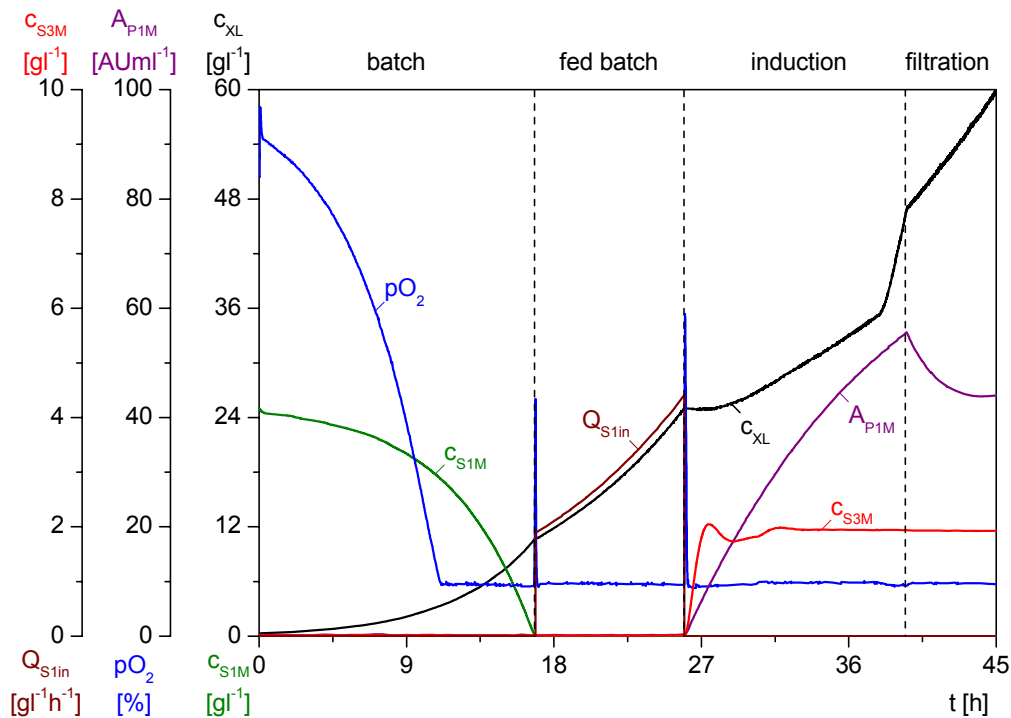


Abb. 8: Prozessverlauf bis zum Beginn der ersten Mikrofiltration