

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Paradigmenwechsel in der pharmazeutischen Produktion	1
1.2 Ansätze einer integrierten kontinuierlichen pharmazeutischen Produktion	2
1.3 Zielsetzung der Arbeit	3
2. Zielprodukte, Hostsystem und Zielprodukt-Analytik	5
2.1 Potentielle Malariaimpfstoffe D1M1 und D1M1H	5
2.2 Das Hostsystem <i>Pichia pastoris</i>	6
2.3 Offline-Analytik der Zielprodukte	7
2.3.1 Ermittlung der Konzentration des sekretierten Gesamtproteins	7
2.3.2 Bestimmung der Produktreinheit und der Konzentration des Zielproduktes	7
3. Grundoperationen eines integrierten Bioprozesses im Labormaßstab	9
3.1 Prozesstechnische Zielsetzung	9
3.2 Die erweiterte Instrumentierung des Upstream-Prozesses	10
3.2.1 Die eingesetzte Bioreaktoreinheit mit seiner MSR-Technik	10
3.2.2 Bestimmung der Zelldichte über das Trübungssignal	11
3.2.3 O ₂ - und CO ₂ -Gasbilanzen zur Online-Prozessbeobachtung	13
3.3 Zellabtrennung und Proteinvorreinigung	15
3.3.1 Grundlagen der Expanded Bed Adsorptions-Chromatografie	15
3.3.2 Das Adsorbentmaterial und die eingesetzte Säule	17
3.3.3 Aufbau und MSR-Technik der EBA-Anlage	18
3.3.4 Ablauf einer Aufarbeitungsprozedur	21
3.3.5 Automatisierung der Aufarbeitungsprozedur	24
3.4 Feinreinigung des Zielproduktes mit einem FPLC-System	25
4. Integrierte Prozessführung mit einer EBA-Chromatografie	28
4.1 Das Konzept des Integrierten EBA-Bioprozesses	28
4.2 Sequentielle Zellkultivierung und Proteinexpression	28
4.3 Die Erprobung der integrierten Produktionsweise	31
4.3.1 Prozessverlauf mit nicht optimalen Prozessparametern	31
4.3.2 Verbesserung der Produktqualität mit optimalen Kultivierungsparametern	32
5. Implementierung von Vorgaben des Quality by Design	34
5.1 Zielsetzungen von QbD in der Bioprozessentwicklung	34
5.2 Definition der Critical Quality Attributes im Downstream	35
5.2.1 Optimierungspotential und Gütekriterium des EBA Prozesses	35
5.2.2 Auswahl möglicher Critical Process Parameter	36
5.3 Die Idee des Design of Experiments	37

5.4	Lösungsansatz zum Optimierungsproblem der Aufarbeitung mit der EBA.....	42
5.5	Screening des mehrparametrischen Problems im ÄKTA™purifier 100.....	43
5.6	Konsequente Pre-Optimierung mit dem ÄKTA™purifier 100.....	46
5.7	In-situ-Optimierung mit der EBA im integrierten Prozess.....	49
5.8	Erweiterung der integrierten Anlage um einen Feinreinigungsschritt.....	54
6.	Aufbau und Erprobung eines quasi-kontinuierlichen Bioprozesses.....	57
6.1	Entwicklung einer industrie-kompatiblen integrierten Produktionsanlage.....	57
6.2	Konzept eines sechsstufigen integrierten Prozesses.....	58
6.3	Die Upstream Unit-Operationen.....	60
6.3.1	Aufbau der zweistufigen Upstream-Anlage.....	60
6.3.2	Die zweistufige zyklische Produktionsstrategie.....	60
6.4	Eingesetzte Mess-, Steuer- und Regelungstechnik.....	63
6.4.1	Grundautomatisierung der Bioreaktoren.....	63
6.4.2	Messung des Sekundärsubstrates Methanol.....	63
6.4.3	Abgasmessung und Gasbilanzen.....	64
6.4.4	Einsatz einer NIR-Spektroskopie.....	64
6.4.5	Überwachung der Expression mit einer Atline-HPLC.....	66
6.5	Die Downstream Unit-Operationen.....	69
6.5.1	Zellabtrennung mit dem Separator SC1.....	69
6.5.2	Mikrofiltration mit Sartoclon Slice MF-Modulen.....	70
6.5.3	Ultrafiltration mit Sartoclon Slice UF-Modulen.....	71
6.5.4	Chromatographische Produktreinigung mit einem ÄKTA™purifier 100.....	73
6.6	Automatisierung des integrierten Prozesses.....	73
6.6.1	Übersicht der dezentralen Automatisierungskomponenten.....	73
6.6.2	Automatisierung des Upstream-Prozesses mit MFCS/win.....	75
6.6.3	Integration und Automatisierung der Gesamtanlage über PCS 7.....	75
6.7	Die quasi-kontinuierliche Herstellung des Malaria-Vakzinkandidaten D1M1H.....	76
6.7.1	Verlauf eines integrierten Produktionszyklus.....	76
6.7.2	Quasi-kontinuierliche Produktion in sequentiell/paralleler Prozessführung.....	79
6.8	Erfassung und Vorverarbeitung von Prozessdaten zur MVDA.....	81
6.8.1	Erweiterung der Anlage um eine komplexe Datenverarbeitung.....	81
6.8.2	Erfassung und Datenverarbeitung mit PCS 7 und SIPAT.....	82
6.8.3	Das Offline-Modul SIMCA.....	83
6.8.4	Das Online-Modul SIMCA Q.....	83
6.8.5	Das Prädiktor- und Control-Modul SIMCA-online.....	84

7. Multivariate Datenanalyse zur Prozessbewertung.....	85
7.1 Zielsetzung des MVDA-Einsatzes.....	85
7.2 MVDA als PAT-Tool zur Beherrschung großer Datenmengen	85
7.3 Vorbereitung der Prozessdaten zur Anwendung der MVDA.....	86
7.3.1 Aufbau der Prozessdatenmatrix D.....	86
7.3.2 Entfernen von Datenausreißern.....	86
7.3.3 Die skalierte Prozessdatenmatrix X.....	86
7.4 Eine kurze Einführung in PCA – Principal Component Analysis.....	88
7.5 Anwendung der MPCA zur Prozessbewertung.....	90
7.5.1 Aufbau einer dreidimensionalen Prozessdatenmatrix D.....	90
7.5.2 MPCA – Multiway Principal Component Analysis.....	91
7.6 Entwicklung des Golden Batch Modells.....	94
7.7 Anwendung der MPLS zur Prozessprädiktion	95
7.7.1 Hinführung auf das MVDA-Problem	95
7.7.2 MPLS – Multiway Partial Least Squares Regression	96
7.8 Modellvalidierung	100
8. Golden Batch Diagnose, Monitoring und Control zyklischer Teilprozesse	106
8.1 Forschungsbedarf einer MVDA basierten Prozessführung.....	106
8.2 Ermittlung des Golden Batch-Tunnels für den Upstream Prozess	107
8.3 Überwachung der Prozessreproduktion mit einem Golden Batch-Monitoring	108
8.4 Beobachtung, Prognose und Steuerung QbD-konformer Golden Batch-Verläufe.....	110
8.4.1 Erstellung QbD-konformer Golden Batch-Modelle	110
8.4.2 Prognose des Golden Batch-Verlaufes	112
8.4.3 Modellgestützte multivariate Steuerung der Prozessqualität	112
9. Bestimmung zellspezifischer Reaktionsraten über MVDA	118
9.1 Beteiligte Reaktionskomponenten	118
9.2 Herleitung von Massen- und Konzentrationsbilanzen.....	119
9.3 Herleitung der $q_{i/x}$ -Auswertungen des zyklischen Prozesses	123
9.4 Die Prädiktion der Zelldichte mit Hilfe eines PLS-Modells	126
9.4.1 Die Bereitstellung von Trainingsdaten	126
9.4.2 Prädiktion der Zelldichte	128
9.4.3 Prädiktion des sekretierten Zielproduktes.....	132
9.4.4 Prädiktion der Komponenten im cell breeding Prozess	133
9.4.5 PLS-Koeffizienten der entwickelten Prädiktionsmodelle.....	134
9.5 Ermittlung der zellspezifischen Reaktionsraten	136
9.5.1 Offline-Auswertung der drei Prozessphasen	136

9.5.2	Identifikation der maximalen zellspezifischen Reaktionsraten.....	137
9.5.3	Online-Bestimmung der zellspezifischen Raten	138
10.	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
11.	Anhang.....	143
11.1	Kultivierungsmedien.....	143
11.2	Pufferlösungen für Filtration und Chromatographie	144
11.3	Offline-Messungen.....	145
11.3.1	Bestimmung der optischen Dichte, der Biofeucht- und Biotrockenmasse	145
11.3.2	Bestimmung des Gesamtproteingehalts (Bradford-Test)	146
11.3.3	SDS-PAGE zur Reinheitsbestimmung.....	146
12.	Literaturverzeichnis	148
12.1	Literatur.....	148
12.2	Veröffentlichungen des Autors.....	153