

Einführung in DSP - Ernten

Ihre Ziele:

Am Ende dieser Lektion sollten Sie in der Lage sein, die einzelnen Schritte des Erntens zu verstehen.

Ernten

Die Zellernte ist ein entscheidender Schritt bei der Verbindung der vorgeschalteten Produktion monoklonaler Antikörper mit der nachgeschalteten Aufreinigung. Die Auswahl der besten Technologie für die Zellernte auf der Grundlage der Merkmale des Zellkulturprozesses kann eine Herausforderung darstellen. Diese Entscheidung wird bereits in einem frühen Stadium der Prozessentwicklung getroffen; ein fundiertes Verständnis des aktuellen Prozesses sowie der Vor- und Nachteile der verschiedenen verfügbaren Zellerntetechnologien ist erforderlich.

Die Unternehmen werden entscheiden, welche Erntetechnik am besten zu ihrem eigenen Prozess passt und welche Variablen für sie vorteilhaft sind.

Die Wahl der Erntemethode und der Ausrüstung hängt von (1) der Art der Zellen, (2) dem zu erntenden Produkt und (3) den Eigenschaften der Prozessflüssigkeiten ab. Zu den traditionellen (Standard-)Techniken gehören die Mikrofiltration mit Membranen, die Tangentialflussfiltration (TFF oder Querstromfiltration), die Zentrifugation und die Tiefenfiltration sowie spezielle Lösungen, die entweder mit der Mikrofiltration oder der Zentrifugation mit TFF oder dann mit der Tiefenfiltration gekoppelt werden müssen.

Zentrifugation

Die Teller-Zentrifugation (z. B. von Alfa Laval Inc. oder Westfalia Separator Group Ltd.) wird schon seit einiger Zeit für die Zellgewinnung eingesetzt. Eine Tellerzentrifuge verwendet gestapelte, geneigte konische Scheiben, um ganze Zellen und grosse Zelltrümmer abzutrennen.

Die Scherung kann jedoch die Zellen beschädigen und dadurch die Anzahl der Submikronpartikel erhöhen, die nicht entfernt werden können. Stattdessen sind Systeme und Techniken mit geringer Scherung in Verbindung mit der zweiten Stufe der Tiefenfiltration besonders nützlich. Die Tiefenfiltration kann eine weitere Klärung bewirken, indem sie kleinere Feststoffpartikel entfernt.

Filtration

Die Bioprozessindustrie hat Membran-Klärungsmethoden aus anderen Technologien übernommen, aber auch Module speziell für biopharmazeutische Zwecke entwickelt, u. a. für

die Vorklä rung von Fermentations- und Zellkultursystemen. Bei der Verwendung einer Membrantechnik wird die Grösse und das Fouling-Potenzial der Membran berücksichtigt.

Die **Mikrofiltration** reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen in der Qualität des Ausgangsmaterials, wie z. B. die Lebensfähigkeit der Zellkultur, die Zelldichte und die Bestandteile des Mediums. Hohe Zelldichten und niedrige Zellvitalitäten können bei Membranen mit konstantem Durchfluss zu einem hohen **Transmembrandruck** (TMP) führen, dessen Ausmass von der Grösse des Einsatzmaterials abhängt. Der TMP ist bei typischen Querstrom-Mikrofiltrationsverfahren (MF-TFF) relativ niedrig. Der Durchfluss der Einsatzzlösung durch die Membran verringert die Konzentrationspolarisation und erzeugt einen Druckabfall, wodurch ein Grössenausschluss erzwungen wird. Solche Filter sind derzeit mit verschiedenen Porengrössen erhältlich, typischerweise zwischen 0,1 µm und 1 µm für die Primärgewinnung (z. B. das ProStak-System von EMD Millipore und PallSep Biotech von Pall Corporation).

Bei der **Tiefenfiltration** werden Partikel, die sowohl grösser als auch kleiner als ihre Porengrösse sind, im gesamten porösen Medium zurückgehalten. Die Partikelretention umfasst sowohl den Grössenausschluss als auch die Adsorption durch hydrophobe und ionische (sowie andere) Wechselwirkungen. Die Tiefenfiltration bietet einige Vorteile, ist aber nicht ohne Einschränkungen. Zu den kommerziell erhältlichen Technologien gehören Filterschichten (Seitz Tiefenfilterschichten von Pall Corporation), gekapselte Module (Supracap 200, von Pall Inc.) und skalierbare Einwegformate (z. B. Millistak+ pod Tiefenfiltermedien von Emanuel Merck, Darmstadt Millipore).

Zellseparation mit Tiefenfiltern

Vorteile

- Niedrige Material- und Hardwarekosten
- Einfacher Gebrauch
- Schnelle Prozesszeiten
- Hohe Flexibilität durch Scale-up-Optionen (z. B. für Multiproduktanlagen)
- Filtration mit minimalen Scherkräften, um Zell- und Produktschutz zu gewährleisten
- FDA-zugelassene Materialien
- Hohe Qualität des Filtrats
- Platz sparende Ausrüstung

Nachteile

- - Erforderliche Überwachung des Differenzdrucks
- - Notwendigkeit der Durchführung einer wirtschaftlichen Bewertung in allen Phasen?
- - Notwendigkeit des Ausbaus und der Entsorgung von Filtern
- - Scale-up-Beschränkungen wie Budgetgrenzen oder infrastrukturelle Grenzen

Tangentialfluss-Filtration: Methoden für die Ernte von Bioreaktoren im kleinen Massstab funktionieren möglicherweise nicht für Prozessgrössen zwischen 10.000 und 20.000 Litern. Wie Ian Sellick feststellte, "erfordern die Anforderungen an die Handhabung solch grosser Chargen den Einsatz grösserer und kontinuierlicherer Verarbeitungssysteme, häufig eine Form von TFF". TFF eignet sich für die Trennung feiner Partikel, da sie Partikel und andere Moleküle zurückhält, die zu gross sind, um die Membranporen zu passieren, und die entlang des tangentialen Flusses transportiert werden.

TFF-Konfigurationen umfassen sowohl Kassetten (flach) als auch Hohlformaten. In seinem Artikel beschreibt Sellick ein kompaktes TFF-Kassettengerät, das Polyethersulfon (PES)-Membranen und Siebe verwendet, um diagonale Strömungswege zu bilden, die eine Produktkanalisierung verhindern (die auftritt, wenn die Membranoberfläche nicht vollständig genutzt wird und die Zufuhrkanäle zum Retentat). Er beschreibt auch verbesserte Hohlformaten für die Zellperfusion, bei denen ein nichtbindendes Polyvinylidendifluorid (PVDF) verwendet wird. Die vordesinfizierten Einweg-TFF-Kassetten bieten gegenüber vielen herkömmlichen Kassettenformaten mehrere Vorteile, darunter Kosteneinsparungen, ein geringeres Risiko der Kreuzkontamination und eine grössere Flexibilität bei der Herstellung.

Quelle: <https://bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/a-decade-of-harvesting-methods-331186/>

Notiz: "z.B." = eines von anderen Beispielen (zum Beispiel) / "i.e." = nämlich (sprich, nämlich, das heisst)

Optimierung

Es wurden Anstrengungen unternommen, um die Eigenschaften einer Zellkultur (z. B. Lebensfähigkeit, Dichte) und die Effizienz eines Ernteverfahrens miteinander in Beziehung zu setzen. In einer Studie über eine Kultur mit hoher Zelldichte hing die Qualität der Primärgewinnung von der Zelldichte und der Lebensfähigkeit der Zellen ab. Hohe Zelldichten und niedrige Lebensfähigkeiten führen zu einer grösseren Anzahl ganzer Zellen und fester Verunreinigungen wie Kolloide und Zelltrümmer. Hohe **Titer*** entstehen in der Regel unter Bedingungen mit hoher Zelldichte und geringer Lebensfähigkeit. Unter Verwendung der **Trübung** als Marker für die Produktqualität wiesen die Forscher eine lineare Korrelation zwischen der Lebensfähigkeit von Zellkulturen und der Klärungseffizienz für eine bestimmte Zentrifugationsbedingung nach. Ihre Ergebnisse zeigten auch, dass höhere Zuführungsraten die Klärung aufgrund geringerer Zentrifugenverweilzeiten verringerten und dass die Korrelationen für die Zentrifuge dieselben waren wie die für den nachfolgenden Tiefenfiltrationsschritt.

Der zunehmende Einsatz von Einwegtechnologien in Upstream-Prozessen kann eine Änderung der Erntestrategien erforderlich machen. Bei traditionellen **Fed-Batch-Kulturverfahren** wird die Klärung der Ernte in der Regel durch Zentrifugation und anschliessende Tiefenfiltration

erreicht. Bei Prozessen, die vollständig auf Einwegprodukten basieren, muss die Tellerstapelzentrifuge durch reine Filtration ersetzt werden.

* **Titer:** (US: titer) = Konzentration einer Lösung, die durch Titration bestimmt wird; das Mindestvolumen einer Lösung, das erforderlich ist, um den Endpunkt einer Titration zu erreichen; die Konzentration eines Antikörpers, die durch die Ermittlung der höchsten Verdünnung bestimmt wird, bei der er noch in der Lage ist, eine Agglutination des Antigens zu verursachen.

Herausforderungen im Massstab

Der derzeitige Trend zu **kleinen Chargenprozessen** macht primäre Rückgewinnungstechniken erforderlich, die eine schnelle Umsetzung ermöglichen. Ein System aus Glasfaserfiltern, gekoppelt mit einer Retentionsmembran, um "eine schnelle Lösung zu bieten, die mit sehr wenig Vorbereitung umgesetzt werden kann", könnte verwendet werden. Glasfaser- und Polyethersulfonmembranen sind von Natur aus arm an extrahierbaren Stoffen und wurden für niedrige Konzentrationen von Endotoxinen und anderen Kontaminanten validiert. Sie sind dampfsterilisierbar und mit Gammabestrahlung kompatibel, was eine Drucksterilisation mit beiden Methoden ermöglicht.

TFF und Zentrifugentieffenfiltration sind typische Methoden für die Gewinnung **grosser Chargen**. Der Prozesstransfer erfordert jedoch manchmal alternative, rationalisierte Ansätze. Eine Studie von Genentech untersuchte verschiedene doppellagige, einstufige Tiefenfiltermedien, um eine Alternative zur herkömmlichen zweistufigen Tiefenfiltration zu finden, die in einer separaten Anlage eingesetzt werden sollte. Die Arbeit umfasste Tests bei verschiedenen Trübungsgraden und führte zu einem System, das auf allen Ebenen eine höhere Kapazität aufwies, ohne dass es zu einer signifikanten Verstopfung der internen Porenstruktur der Tiefenfilter kam. Die Forscher weisen ferner darauf hin, dass "ein Schlüssel zur Erhöhung der zukünftigen Kapazität von Tiefenfiltern (...) in der Steuerung der Partikelansammlung (...) oder der Modulation der Durchflussrate liegen könnte, um kritische Scherschwelen innerhalb eines Tiefenfilters zu vermeiden oder auszunutzen".

Zellkulturen mit hoher Dichte

Mit dem Anstieg der Titer in den letzten zehn Jahren wuchs auch die Bedeutung effizienter Methoden zur Produktrückgewinnung. Mit monoklonalen Antikörpertitern, die ~25 g/L erreichen, und der Erwartung, dass in Zukunft noch höhere Werte erreicht werden, stellt die Klärung von Zellkulturen mit hoher Dichte die Bioproduzenten vor besondere Herausforderungen. Immer grössere Mengen an Zelltrümmern müssen schnell entfernt werden, um Engpässe in nachgeschalteten Prozessen zu vermeiden.