

# Grundlagen der Prozessleittechnik und Automatisierung - Arten von Analysemethoden und Zellzählung

## Ihre Ziele:

Am Ende der Lektion sollten Sie in der Lage sein, die Bedeutung der Zellzählung zu erkennen.

Die Analysemethoden der **In-Prozess-Kontrolle** (IPC) können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- 1) in-line oder on-line
- 2) at-line oder off-line

Bei den erstgenannten (1) handelt es sich um Techniken, mit denen der Prozess in Echtzeit verfolgt werden kann (z. B. Temperatur, pH-Wert, gelöster Sauerstoff). Letztere (2) werden in der AQC (Analytische Qualitätskontrolle) eingesetzt, um denselben Prozess zu verfolgen und zu bestimmen, ob er innerhalb der akzeptablen Grenzen liegt.

## **Warum werden mehrere Analysemethoden benötigt?**

**AQC** ist ein Teil der **cGMP** (current Good Manufacturing Practices), die sich mit folgenden Punkten befasst:

- Probenahme
- Spezifikation
- Prüfung
- Dokumentation
- Freigabeverfahren

All dies stellt sicher, dass die notwendigen und relevanten Tests durchgeführt werden, so dass die Produkte zur Verwendung freigegeben werden können, aber erst, wenn die erforderliche Qualität erreicht ist.

## **Wissenschaftsbasierte Beurteilungen für Biologika**

Die Produktprüfungsnormen in 21CFR 610/ICHQ6B umfassen die Sicherheit der Herstellung:

- Sterilität
- Mykoplasma
- Reinheit
- zufällige virale Erreger

und Bewertungen anderer Produkteigenschaften, einschliesslich:

- Identität
- Lebensfähigkeit
- Potenz

### **At-line IPC-Methoden**

Quantitative analytische Methoden sind erforderlich für:

- Zellzählung
- Metaboliten-Analyse
- Produktquantifizierung
- Produktqualität
- Bestimmung von Verunreinigungen

### **Methoden der Zellzählung**

- Mikroskopische Zählung
- Vi-Cell®
- Absorption (z.B. bei 600nm)
- Trockengewicht der Zellen (für Mikroorganismen)
- Koloniebildende Einheiten (für Mikroorganismen)

### **Warum ist die Zellzählung notwendig?**

Wir müssen die Gesamtzahl der Zellen, die Anzahl der lebensfähigen Zellen und die Lebensfähigkeit kennen, um die **Wachstumskinetik** zu bestimmen. Jede Zelle produziert eine bestimmte Menge eines Proteinprodukts, die so genannte spezifische Produktivität (g Produkt/Anzahl der Zellen/h). Je mehr Zellen vorhanden sind, desto mehr Produkt wird also gebildet.

Wir müssen wissen, wie reproduzierbar die Kultur von einer Kultur zur nächsten ist (Stabilität).

Wir müssen wissen, wie gesund die Kultur ist, d. h. wie viele Zellen vorhanden sind und wie viele davon tatsächlich lebensfähig sind.

Wir müssen wissen, wann wir potenzielle Induktoren hinzufügen müssen. Wir müssen wissen, wann wir das Produkt ernten müssen.

Die Zellzählung kann verwendet werden, um die Zufuhr rate eines frischen Mediums zu steuern, um eine definierte Fed-Batch-, kontinuierliche oder Perfusionskultur zu erhalten. Bei Suspensionskulturen ist es relativ einfach, die Zellzahl zu messen, bei immobilisierten Zellkulturen hingegen nicht so einfach. Da die Wahrscheinlichkeit grosser Fehler bei den Zellzählverfahren gross ist, versuchen wir, die Verfahren zu automatisieren oder zu standardisieren, um Schwankungen zu vermeiden.

## Techniken der Zellzählung:

### In-line / on-line

Bei Methoden, die direkt im Bioreaktor eingesetzt werden und bei denen keine Probenahme erforderlich ist, können diese Methoden kontinuierliche Messungen liefern, die sich für die Überwachung und Kontrolle eignen (Process Analytical Technology, oder PAT):

- Bei direkten Methoden werden Zellen als feste Objekte gemessen (z. B. Trübung/Absorption; dielektrische Spektroskopie; NIR-Spektroskopie; MIR-Spektroskopie)

Indirekte Methoden messen eine bestimmte Komponente einer Zelle in Bezug auf ihre Zellzahl (z. B. Fluoreszenzspektroskopie (misst NADH oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff); Bestimmung von Glukose oder anderen Produkten; O<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub>-Messungen).

Die wichtigsten Schwachpunkte dieser Methoden sind:

- Robustheit
- Instabilität über längere Zeiträume
- Interferenzen durch andere Zellkomponenten
- Kalibrierung der Methoden

### Off-line

Bei dieser Methode wird der Bioreaktor nicht einbezogen, so dass eine Probenahme erforderlich ist (d. h. die Notwendigkeit

die sterile Grenze zu durchbrechen).

- Bei direkten Methoden werden Zellen als feste Objekte gemessen (z. B. Zelltrockengewicht; Mikroskopzählung; Vi-Cell®; Trübung/Absorption; dielektrische Spektroskopie; NIR; MIR).
- Indirekte Methoden messen irgendeine Komponente einer Zelle, die mit der Zellzahl zusammenhängt (z. B. Fluoreszenzspektroskopie, die NADH misst; Bestimmung von Glukose oder anderen Produkten; O<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub>-Messungen).

Die Vor- und Nachteile der Offline-Methode bestehen darin, dass sie...:

- leicht zu kalibrieren ist
- zeitaufwendig ist
- arbeitsintensiv
- Schwankungen von Person zu Person

Der grösste Schwachpunkt einer solchen Methode ist die Notwendigkeit, die sterile Grenze zu durchbrechen und eine für die **gesamte Kultur** charakteristische Probe zu erhalten.