Bioprozessentwicklung zur Herstellung von Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

Dem Promotionszentrum für Ingenieurwissenschaften
am Forschungscampus Mittelhessen

vorgelegt von
Lukas Graf
(M.Sc.)

aus Bad Mergentheim

Unterbalbach, 24.11.2025

Begutachtung durch:

Prof. Dr.-Ing. habil. Denise Salzig und Prof. Dr. Stephan Becker

Vorwort

Das Promotionsvorhaben ist im Fachgebiet „Life Science Engineering (LSE)“ unter Federführung der Technischen Hochschule Mittelhessen angesiedelt. Die Forschungsarbeit wurde in Kooperation mit der Institut Virion\Serion GmbH durchgeführt. Der projektspezifische Forschungsschwerpunkt innerhalb des Fachgebietes liegt in den Bereichen der Biotechnologie, der Molekularbiologie und der In-vitro-Diagnostik (IVD).

Die Institut Virion\Serion GmbH wurde 1978 gegründet und ist ein nach ISO 13485 zertifizierter in-vitro Diagnostikhersteller (IVD) für die humane Infektionsserologie. Das mittelständige Unternehmen mit Sitz in Würzburg verfügt über eines der weltweit größten ELISA-Portfolios für die Diagnostik von bakteriellen und viralen Infektionserkrankungen. Neben der Entwicklung von ELISA-Tests für die IVD beschäftigt sich das Unternehmen intensiv mit der Entwicklung einer partikelbasierten, multiplexen Technologie für die Serologie und der Entwicklung von neuen Antigenen, Antikörpern und verschiedenen Reagenzien für den Weltmarkt auf dem Gebiet der Rohstoffe für die IVD.

Die für das Projekt erforderlichen Ressourcen (Zugang zu Laboren, Bereitstellung der benötigten Rohmaterialien etc.) wurden durch die Virion\Serion GmbH bereitgestellt. Die Technische Hochschule Mittelhessen ermöglichte für die erforderlichen Literaturrecherchen einen Zugang zu Online-Literaturdatenbanken sowie zur Bibliothek der Hochschule.

Kurzfassung

Die serologische Rötelndiagnostik ist vor dem Hintergrund schwerwiegender Folgen wie des kongenitalen Rötelnsyndroms (CRS) insbesondere während der Schwangerschaft von hoher klinischer Relevanz. Gängige serologische Testsysteme basieren überwiegend auf nativen Viruspräparaten oder auf Glykoproteinen, die aus infizierten Zellen gewonnen werden, deren standardisierte und wirtschaftliche Herstellung limitiert ist. Rubella Virus-like Particles (VLPs) stellen aufgrund ihrer virusähnlichen Eigenschaften eine vielversprechende rekombinante Alternative dar. In dieser Arbeit wurde ein skalierbarer, reproduzierbarer und kosteneffizienter Herstellungs- und Reinigungsprozess für Rubella-VLPs zur Anwendung in der Humanserologie entwickelt. Im Upstream Processing (USP) wurde ein stabiles Expressionssystem mit monoklonaler HEK293T-Zelllinie etabliert und erfolgreich in eine serumfreie Suspensionskultur überführt. Optimierte Kultivierungs- und Feeding-Strategien sowie Anpassungen von pH-Wert, Inokulationsdichte, DO-Wert und Rührerdrehzahl führten zu einer signifikanten Steigerung von Zelldichte, Zellvitalität und Rubella-VLP-Ausbeute, sodass im 10-L- und 40-L-Bioreaktorprozess eine volumetrische Produktivität von 5–10 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur erzielt wurde. Für das Downstream-Processing (DSP) wurde eine antikörperbasierte Affinitätschromatographie etabliert, ergänzt durch eine Crossflow-Filtration, wodurch eine Reinheit der Rubella-VLPs > 90 % mit Gesamtausbeuten von ca. 88 % erreicht wurde. Die hergestellten Rubella-VLPs wiesen eine Partikelgröße von ungefähr 87 nm auf, waren morphologisch homogen, aggregatfrei und zeigten eine außergewöhnlich hohe physikochemische Stabilität unter verschiedenen Lagerbedingungen. Analytische Methoden wie quantitative Nachweisverfahren (Bradford-Assay), SDS-PAGE, DLS-Messungen und Elektronenmikroskopie ermöglichten eine umfassende Charakterisierung der VLPs. In serologischen Testsystemen (ELISA und FLIA) bestätigten die Rubella-VLPs ihre hohe diagnostische Eignung mit Sensitivitäten und Spezifitäten von jeweils 85–100 % und erwiesen sich im direkten Vergleich zu einem nativen Rubella-Referenzantigen als funktionell gleichwertige Alternative. Die Arbeit demonstriert die erfolgreiche biotechnologische Prozessentwicklung und das Potenzial rekombinanter Rubella-VLPs als standardisierte Antigene für die Humanserologie.

Abstract

Serological diagnostics for rubella are of high clinical relevance, particularly during pregnancy, given the serious consequences of congenital rubella syndrome (CRS). Conventional serological test systems predominantly use native virus preparations or glycoproteins obtained from infected cells, which are difficult to produce in a standardised and economical way. Rubella virus-like particles (VLPs) are a promising alternative due to their virus-like properties. This study presents a scalable, reproducible, and cost-efficient manufacturing and purification process for rubella-VLPs for use in human serology. In the first stage of upstream processing (USP), a stable expression system was established using a monoclonal HEK293T cell line and successfully adapted to serum-free culture conditions in suspension. Optimised cultivation and feeding strategies, along with adjustments to pH, inoculation density, dissolved oxygen value, and agitation speed, resulted in a significant increase in cell density, vitality, and rubella-VLP yield. These yielded a volumetric productivity of 5–10 mg of rubella-VLPs per litre of cell culture in the 10 L and 40 L bioreactor processes. Downstream processing (DSP) was established with antibody-based affinity chromatography followed by crossflow filtration. This approach led to purities of over 90% and total yields of approximately 88 %. The rubella-VLPs produced had a typical particle size of around 87 nm. They were morphologically homogeneous, free of aggregates, and exhibited exceptionally high physicochemical stability under various storage conditions. Comprehensive characterisation of the VLPs was enabled by analytical methods such as quantitative detection methods (Bradford protein assay), SDS-PAGE, DLS measurements and electron microscopy. In serological test systems (ELISA and FLIA), the rubella-VLPs demonstrated their high diagnostic suitability, with sensitivities and specificities of 85–100%, proving them to be a functionally equivalent alternative to native rubella reference antigens. This work demonstrates successful biotechnological process development and the potential of recombinant rubella-VLPs as standardised antigens for human serology.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT ..... **I**

KURZFASSUNG ..... **II**

ABSTRACT ..... **III**

INHALTSVERZEICHNIS ..... **IV**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **VIII**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **X**

TABELLENVERZEICHNIS ..... **XIII**

1. EINLEITUNG **1**

1.1. Rubella-Virus 1
1.1.1. Krankheitsbild 1
1.1.2. Rubella-Virus 2
1.1.3. Glykoprotein E1 3
1.1.4. Glykoprotein E2 3
1.1.5. Kapsidprotein 3
1.2. Röteln-Diagnostik 4
1.3. Rubella-Antigene für die Infektionsserologie 4
1.4. Virus-like Particles 6
1.4.1. Allgemeines 6
1.4.2. Upstream Processing 7
1.4.2.1. Allgemeines 7
1.4.2.2. Zelllinienentwicklung 9
1.4.2.3. Prozessentwicklung 10
1.4.2.4. Medienanalyse 11
1.4.2.5. Scale-Up 12
1.4.3. Downstream Processing 13
1.4.4. Charakterisierung 14
1.4.5. Diagnostik 15

2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG **16**

3. MATERIAL UND METHODEN **17**

3.1. Material 17
3.1.1. Geräte 17
3.1.2. Verbrauchsmaterialien 18
3.1.3. Chemikalien, Lösungen und Reagenzien 20

3.2. Methoden ... 21
3.2.1. Upstream Processing: Zelllinienentwicklung ... 23
3.2.2. Upstream Processing: Optimierung der Prozessbedingungen ... 26
3.2.3. Downstream Processing ... 29
3.2.3.1. Antikörper-Affinitätschromatographie ... 29
3.2.3.1.1. Auswahl und Charakterisierung Rubella-spezifischer monoklonaler Antikörper ... 30
3.2.3.1.2. Screening potenzieller Elutionsbedingungen ... 30
3.2.3.1.3. Funktionelle Bewertung der Elutionsbedingungen ... 31
3.2.3.1.4. Übertragbarkeit der Inkubationszeiten ... 33
3.2.3.1.5. Auswahl der Chromatographiematrices und -bedingungen ... 33
3.2.3.1.6. Durchführung der Ligandenimmobilisierung ... 34
3.2.3.1.7. Bedingungen der Antikörper-Affinitätschromatographie ... 34
3.2.3.1.8. Antikörper-Affinitätschromatographie mit Zellkulturüberständen als Input ... 35
3.2.3.1.9. Auswahl und Evaluation geeigneter Chromatographiematrices ... 35
3.2.3.1.10. Strategien zur Ligandenimmobilisierung ... 35
3.2.3.1.11. Evaluierung der Tricorn™ 5/50-Chromatographiesäulen ... 36
3.2.4. Upscaling des Downstream Processing ... 37
3.2.5. Screening von Puffer- und Lagerbedingungen der Rubella Virus-like Particles ... 44
3.2.6. Finalisierung des Downstream Processing ... 46
3.2.7. Upscaling des Upstream Processing ... 46
3.2.8. Prozessanalytische Verfahren ... 53
3.2.8.1. Bead-basierter Fluoreszenz-Immunoassay ... 53
3.2.8.2. Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung ... 58
3.2.8.3. Dynamische Lichtstreuung ... 58
3.2.8.4. Transmissionselektronenmikroskopie ... 59
3.2.8.5. SDS-PAGE-Analyse ... 60
3.2.8.6. Bradford Assay ... 61
3.2.8.7. Medienanalyse ... 62
3.2.8.8. Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F ... 63
3.2.9. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie ... 63
3.2.9.1. Multiplexe FLIA-Studien ... 64
3.2.9.2. ELISA-Studien ... 66
3.2.10. Statistische Datenauswertung ... 68
3.2.10.1. Passing-Bablok-Regression ... 68
3.2.10.2. ROC-Analyse ... 69
3.2.10.3. Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test ... 70
3.2.10.4. Levene-Test ... 70
3.2.10.5. t-Test ... 71

3.2.10.6. ANOVA ... 71
3.2.10.7. Design of Experiment ... 72
3.2.10.8. Pareto-Diagramm ... 72
3.2.10.9. Haupteffektediagramm ... 73
3.2.10.10. Wechselwirkungsdiagramm ... 73

4. ERGEBNISSE ... 74

4.1. Upstream Processing: Zelllinienentwicklung ... 74
4.1.1. Konstruktion des Expressionsvektors ... 74
4.1.2. Herstellung lentiviraler Partikel und Transduktion ... 75
4.1.3. Single Cell Cloning ... 75
4.1.4. Zellkulturführung der Suspensionskultur ... 76
4.2. Upstream Processing: Optimierung der Prozessbedingungen ... 77
4.2.1. Variation der Zelldichte bei Inokulation ... 77
4.2.2. Feeding-Strategie ... 78
4.2.3. Medienanalyse und Anpassung der Feeding-Strategie ... 80
4.2.4. Reproduzierbarkeit des Rubella Virus-like Particles Herstellungsprozesses ... 83
4.3. Downstream Processing ... 85
4.3.1. Antikörper-Affinitätschromatographie ... 85
4.3.1.1. Funktionelle Bewertung der Elutionsbedingungen ... 85
4.3.1.2. Auswahl der Chromatographiematrices und -bedingungen ... 89
4.3.1.3. Antikörper-Affinitätschromatographie zur präparativen Reinigung von Rubella Virus-like Particles ... 92
4.3.1.4. Auswahl und weiterführende Evaluation geeigneter Chromatographiematrices ... 95
4.4. Upscaling des Downstream Processing ... 100
4.4.1. Upscaling Downstream Processing mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20 ... 101
4.4.2. Upscaling Downstream Processing mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20 ... 104
4.4.3. Screening von Puffer- und Lagerbedingungen der Rubella Virus-like Particles ... 106
4.4.4. Finalisierung des Downstream Processing ... 114
4.5. Upscaling des Upstream Processing ... 116
4.5.1. Etablierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor ... 116
4.5.2. Screening der Bioreaktorprozessparameter über Design of Experiments ... 117
4.5.3. Weitere Anpassungen der Prozessführung im Bioreaktor ... 121
4.5.4. Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes von Rubella Virus-like Particles ... 121
4.5.5. Upscaling des Bioreaktorprozesses ... 122
4.6. Prozessanalytische Verfahren ... 130
4.6.1. Transmissionselektronenmikroskopie ... 130

4.6.2. Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F 130
4.7. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie 132
4.7.1. FLIA-Studien 132
4.7.2. ELISA-Studien 140

5. DISKUSSION 144

5.1. Upstream Processing 144
5.2. Downstream Processing 148
5.3. Prozessanalytische Verfahren zur Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles 151
5.4. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie 152

6. FAZIT UND AUSBLICK 155

7. LITERATUR 156

ANHANG XIV

DANKSAGUNG XXI

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG XXII

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CI	Konfidenzintervall
CIP	Cleaning in place, ortsgebundene Reinigung
CRS	Kongenitales Rubella Syndrom
CV	Variationskoeffizient
DBC	Dynamic binding capacity, dynamische Bindekapazität
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DO	Gelöstsauerstoff / gelöste Sauerstoffkonzentration
DoE	Design of Experiment
DSP	Downstream Processing
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
FKS	Fetales Kälberserum
FLIA	Fluoreszenz-Immunoassay
FPR	Falsch-positiv-Rate
FT	Flow-through, Durchfluss
GOI	Gene of interest, Gen von Interesse
gpE1	Glykoprotein E1
gpE2	Glykoprotein E2
h	Stunde(n)
IFU	Infectious units, infektiöse Einheiten
Ig	Immunglobulin
IVD	In-vitro-Diagnostik
J	Youden-Index
kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
k_La	Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient
mAK	Monoklonale Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

MOI	Multiplicity of infection, Infektionsmultiplizität
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molecular-Weight-Cut-Off, Ausschlussgröße
NHS	N-hydroxysuccinimid
n.a.	Nicht anwendbar
OD	Optische Dichte
PEI	Polyethylenimin
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PDI	Polydispersitätsindex
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PTM	Posttranslationale Modifikationen
P/V	Volumetrischer Leistungseintrag
r	Pearson Korrelationskoeffizient
ROC-Analyse	Receiver-Operating-Characteristics-Analyse
R-PE	R-Phycoerythrin
SARS-CoV-2	schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus-2
SCC	Single Cell Cloning, Einzelzellklonierung
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Size exclusion chromatography, Größenausschlusschromatographie
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SOP	Standard Operating Procedure
SV	Säulenvolumen
t_d	Generationszeit
TNR	True-negative-rate, Richtig-negativ-Rate
TPR	True-positive-rate, Richtig-positiv-Rate
$U_{k=2}$	Erweiterte kombinierte Unsicherheit
USP	Upstream Processing
VLP(s)	Virus-like Particle(s)
α	Signifikanzniveau
μ	Spezifische Wachstumsrate

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachter Aufbau eines Rubella-Virions..... 2
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Bioprozessentwicklung. 22
Abbildung 3: Schematische Darstellung der FLIA-Versuchdesigns. 32
Abbildung 4: BioFlo® 320-Steuereinheit mit BioBLU® 50c Single-Use-Bioreaktor..... 47
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Rubella-FLIA. 56
Abbildung 6: Schematischer Ablauf des Rubella-FLIA. 56
Abbildung 7: Schematischer FLIA-Ablauf. 65
Abbildung 8: Etablierung der Suspensionskultur. 76
Abbildung 9: Feeding-Strategie. 78
Abbildung 10: Entwicklung und Etablierung einer optimierten Feeding-Strategie..... 80
Abbildung 11: Medienanalyse zu Entwicklung und Etablierung optimierter Feeding-Strategie. 81
Abbildung 12: FLIA-Bewertung der Prä-Bindungs-Inkubation potenzieller Elutionsbedingungen. 86
Abbildung 13: FLIA-Bewertung der Post-Bindungs-Inkubation potenzieller Elutionsbedingungen. 87
Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierung von Mab1 an NHS-activated HP..... 89
Abbildung 15: Chromatogramme Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1 und GoBio Mini ACT Mab1. 90
Abbildung 16: Rubella-FLIA Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1 und GoBio Mini ACT Mab1. 91
Abbildung 17: Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1..... 93
Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse zur Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1..... 94
Abbildung 19: Strategien zur Ligandenimmobilisierung. 96
Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierungseffizienz von 1-361 und 1-361_2..... 97

Abbildung 21: Funktionelle Evaluierung der Tricorn™ 5/50 Chromatographiesäulen. 98
Abbildung 22: SDS-PAGE-Analyse zur funktionelle Evaluierung der Tricorn™ 5/50 Chromatographie-säulen. 99
Abbildung 23: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierungseffizienz von 1-375 und 1-387. 100
Abbildung 24: Variation der Prozesstemperatur mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20. 102
Abbildung 25: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20. 103
Abbildung 26: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20. 105
Abbildung 27: Bestimmung dynamischer Bindekapazität der Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20. 106
Abbildung 28: DLS-Messungen zum Screening der Lagerbedingungen von Rubella-VLPs. 107
Abbildung 29: DLS-Messungen zur Bewertung der thermischen Stabilität der Rubella-VLPs. 108
Abbildung 30: DLS-Messungen zur Langzeitlagerung der Rubella-VLPs. 110
Abbildung 31: Bewertung der diagnostischen Eignung (IgG) von Rubella-VLPs nach 56 Tagen. 112
Abbildung 32: Bewertung der diagnostischen Eignung (IgM) von Rubella-VLPs nach 56 Tagen. 113
Abbildung 33: SDS-PAGE zum Downstream Processing von Rubella-VLPs. 115
Abbildung 34: DLS-Messungen der finalen Rubella-VLP-Charge. 116
Abbildung 35: Pareto-Diagramm. 118
Abbildung 36: Haupteffektediagramm. 119
Abbildung 37: Wechselwirkungsdiagramm. 120
Abbildung 38: Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes im Bioreaktorprozess. 122
Abbildung 39: Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 10 L-Maßstab. 123
Abbildung 40: Medienanalyse des 10 L-Bioreaktorlaufs B091. 125

Abbildung 41: Medienanalyse (Glukose, Glutamin, Laktat) der Bioreaktorläufe B071, B072 und B091. 127
Abbildung 42: Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 40 L-Maßstab. 128
Abbildung 43: Transmissionselektronenmikroskopie. 130
Abbildung 44: SDS-PAGE-Analyse zu Deglykosylierung von Rubella-VLPs mit PNGase F. 131
Abbildung 45: Analyse des FLIA-Messbereichs. 133
Abbildung 46: Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im FLIA. 134
Abbildung 47: Passing-Bablok-Regression: Vergleich zweier hergestellter Rubella-VLP-Chargen mittels FLIA. 136
Abbildung 48: ROC Analyse FLIA. 138
Abbildung 49: Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im ELISA. 141
Abbildung 50: ROC Analyse ELISA. 143
Abbildung 51: Plasmidkarte pLVX-TetOne-Puro aus Bedienungsanleitung 5 (Tabelle 18). XIV
Abbildung 52: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 1. XVII
Abbildung 53: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 2. XVII
Abbildung 54: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 3. XVIII
Abbildung 55: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 4. XVIII
Abbildung 56: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes. XIX
Abbildung 57: Aufzeichnung der Bioprozessparameter von 10 L-Bioreaktorlauf B091. XIX
Abbildung 58: Aufzeichnung der Bioprozessparameter von 40 L-Bioreaktorlauf B092. XX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung von Virus-like Particles in verschiedenen Expressionssystemen. 8
Tabelle 2: Verwendete Geräte. 17
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien. 18
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Reagenzien. 20
Tabelle 5: Definition der Zugabe der Feed-Lösung. 27
Tabelle 6: Screening potenzieller Elutionsbedingungen für die Antikörper-Affinitätschromatographie. 30
Tabelle 7: Prozessparameter für das Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie. 39
Tabelle 8: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit des Probenauftrags mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20. 41
Tabelle 9: Prozessparameter der Antikörper-Affinitätschromatographie mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20. 43
Tabelle 10: Vollfaktorielle Versuchsplanung weiterer Anpassungen im Bioreaktorprozess. 50
Tabelle 11: Prozessparameter 10 L-Bioreaktorläufe. 52
Tabelle 12: Prozessparameter 40 L-Bioreaktorlauf. 53
Tabelle 13: Grenzwerte für IgG- und IgM-ELISA mit 4PL-Fit Parametern der Standardkurve. 67
Tabelle 14: Variation der Zelldichte bei Inokulation. 77
Tabelle 15: Supplementierung von Feed-Lösung und L-Glutamin bei entwickelter Feeding-Strategie in Schüttelkultur. 83
Tabelle 16: Reproduzierbarkeit des Rubella-VLP-Herstellungsprozesses..... 84
Tabelle 17: Ergebnisse der vollfaktoriellen Versuchsplanung weiterer Anpassungen im Bioreaktorprozess. 118
Tabelle 18: Übersicht Bedienungsanleitungen. XIV
Tabelle 19: Puffer für das Screening der Lagerbedingungen von Rubella-VLPs. XV

1. Einleitung

1.1. Rubella-Virus

1.1.1. Krankheitsbild

Röteln sind eine hochansteckende Viruserkrankung, die durch eine Infektion mit dem Rubella-Virus, nachfolgend Rubella genannt, verursacht und über Tröpfchen- und Kontaktinfektionen übertragen wird [23, 51, 86]. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 14 Tage. Postnatale Infektionen verlaufen in der Regel mild und sind mit geringen klinischen Symptomen assoziiert, können in seltenen Fällen jedoch schwerwiegende Krankheitsbilder wie Arthropathie, Thrombozytopenie oder Enzephalopathie hervorrufen [51]. Besonders während der Schwangerschaft hat eine Primärinfektion gravierende Folgen, da sie zu schweren Fehlbindungen des Fötus bis hin zu einer Fehlgeburt führen kann [23, 51, 86]. Erfolgt eine Primärinfektion im ersten Trimester der Schwangerschaft, treten angeborene Fehlbildungen, bekannt als kongenitales Rubella Syndrom (CRS), bei 80-85 % der Fälle auf. Weltweit werden jährlich mehr als 100.000 Kinder mit CRS geboren, die meisten davon in Entwicklungsländern [86]. Vor diesem Hintergrund ist die Röteln-Diagnostik bei Schwangeren von besonderer Relevanz.

Infolge der Einführung eines Lebendimpfstoffs konnte die Inzidenz von Röteln in den meisten industrialisierten Ländern erheblich gesenkt werden. In vielen Entwicklungsländern sind die Impfraten jedoch weiterhin niedrig, sodass es dort in Intervallen von 6-9 Jahren zu großen Wellen von Röteln-Infektionen kommt [51]. Der Rötelnimpfstoff wird typischerweise als Kombinationsimpfstoff (Mumps-Masern-Röteln) im Alter von 12-15 Monaten verabreicht, gefolgt von einer Booster-Impfung im Jugendalter [51]. Da Lebendimpfstoffe replikationsfähige Viren enthalten, bergen sie das Risiko einer Impfkrankheit [42]. Daher sind sie für Schwangere, HIV-infizierte Personen und immunsupprimierte Patientinnen und Patienten kontraindiziert, weil in diesen Gruppen schwere Nebenwirkungen auftreten können. Entsprechend erscheint die Entwicklung eines nicht-infektiösen Totimpfstoffes als wünschenswerte Alternative [86]. Während einer Rubella-Infektion werden spezifische Antikörper (AK) gegen die drei Strukturproteine Kapsidprotein, Glykoprotein E1 (gpE1) und Glykoprotein E2 (gpE2) gebildet [14]. Für die Impfstoffentwicklung steht insbesondere das Heterodimer

aus gpE1 und gpE2 im Vordergrund, da die humorale Immunantwort überwiegend auf neutralisierenden anti-gpE1-Antikörpern basiert [51, 86].

1.1.2. Rubella-Virus

Das Rubella-Virus ist ein humanpathogenes positiv-strängiges RNA-Virus aus der Virusfamilie der Togaviridae der Gattung Rubivirus. Rubella-Virionen, die von einer Lipidhülle umgeben sind, zeigen morphologische Variationen von sphärisch bis elongiert [68, 86]. Die Viruspartikel liegen in einem Größenbereich von 50-150 nm [19, 45, 86], wobei die durchschnittliche Partikelgröße bei ca. 70 nm einzuordnen ist [19]. Das Rubella-Genom zeigt eine alphavirusähnliche genomische Organisation und kodiert für die Nichtstrukturproteine p90 und p150, welche die virale RNA-Transkription und –Replikation vermitteln sowie für die Strukturproteine Kapsidprotein, gpE1 und gpE2 [21]. Die Membranproteine gpE1 und gpE2 sind die beiden strukturellen Oberflächenproteine des Rubella-Virions und liegen als Heterodimer vor [68, 86]. gpE1 und gpE2 sind Typ-1-Membranproteine und bilden Spike-Komplexe auf der Rubella-Virusoberfläche aus. Den dritten strukturellen Bestandteil eines Rubella-Virions bildet das Kapsidprotein, das als Homodimer vorliegt [51, 68, 86]. Abbildung 1 skizziert den vereinfachten Aufbau eines Rubella-Virions (A) und der Virionmembran (B).

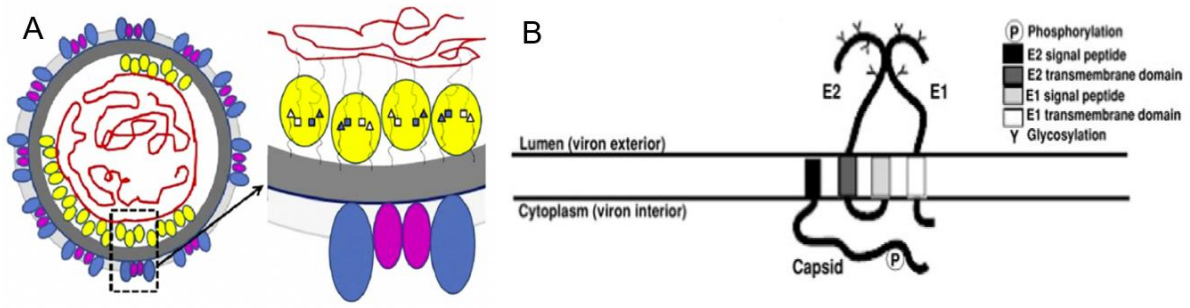


Abbildung 1: Vereinfachter Aufbau eines Rubella-Virions.

A: Querprofil eines Rubella-Virions, blau: Glykoprotein E1, pink: Glykoprotein E2, gelb: Kapsidprotein, rot: genomische RNA. Der graue Bereich kennzeichnet die Membran Ebene. In der vergrößerten Darstellung zeigen die dünnen Linien die Polypeptid-Verbindung der N-Termini (•) und der C-Termini (Δ) des Kapsidproteins mit der RNA und der Membran [51, 86]. B: Anordnung der Glykoproteine E1 und E2 sowie des Kapsidproteins an der Virionmembran [51, 86].

Der Polyproteinvorläufer enthält zwei Signalpeptide, die für die Translokation der Glykoproteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums erforderlich sind. Durch zwei Spaltungen des Polyproteins mittels Signalpeptidasen entstehen die drei Rubella-Strukturproteine Kapsidprotein, gpE1 und gpE2 [59]. Infolge der

Assemblierung der Strukturproteine an den Membranen des Golgi-Apparates werden Rubella-Virionen gebildet, die während des Transports durch den Golgi-Komplex eine Reifung durchlaufen und anschließend in den exträzellulären Raum freigesetzt werden [68].

1.1.3. Glykoprotein E1

Das gpE1 (51-56 kDa [19]) zählt neben gpE2 zu den Strukturproteinen des Rubella-Virus, die auf der Virionoberfläche ein Heterodimer ausbilden. GpE1 besitzt sowohl Rezeptorbindungs- als auch Membranfusionseigenschaften und ermöglicht dadurch den Eintritt des Virus in die Wirtszelle [23, 51, 86]. Diese Funktion wird insbesondere durch die Aminosäuren-Region 109-181 vermittelt, die zugleich für die Heterodimerbildung mit gpE2 essentiell ist [86]. gpE1 stellt mit dem Epitop, gebildet aus den Aminosäuren 208-239, den zentralen Hauptangriffspunkt neutralisierender Antikörper dar. Insgesamt sind drei Hauptepitope auf gpE1 beschrieben [68, 86]. gpE1 spielt eine Schlüsselrolle sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunantwort [23, 86].

1.1.4. Glykoprotein E2

GpE2 (42-47 kDa [19]) stellt das zweite Strukturprotein des Rubella-Virus dar und formt zusammen mit gpE1 einen Heterodimer auf der Virusoberfläche. Es ist für den Transport von gpE1 durch die zellulären Kompartimente sowie dessen korrekte Faltung erforderlich [68, 86]. Zudem vermittelt gpE2 die Bindung des Kapsidproteins an die Virusmembran [51]. Neutralisierende Antikörper gegen gpE2 binden an die Aminosäurereste 1-115, wobei die Immunantwort hauptsächlich gegen gpE1 gerichtet ist. Während Antikörper gegen gpE1 über Jahrzehnte in infizierten Personen persistieren, nimmt der Titer von Antikörpern gegen gpE2 bereits nach wenigen Monaten deutlich ab [23].

1.1.5. Kapsidprotein

Das Kapsidprotein (33 kDa [19]) ist das dritte Strukturprotein des Rubella-Virus und liegt in Form eines Homodimers vor [68]. Über das gpE2-Signalpeptid ist es an die Virionmembran angehängt [59]. Die Hauptaufgabe des Kapsidproteins während der Virusreifung besteht in der Bindung viraler RNA und der Ausbildung des

Nukleokapsids [51], wobei die RNA-Bindungsdomäne in der Aminosäuren-Region 28-56 lokalisiert ist [15]. Darüber hinaus ist das Kapsidprotein an der Regulation der viralen Transkription und Replikation beteiligt [51].

1.2. Röteln-Diagnostik

Die Diagnose einer Rötelninfektion erfolgt über serologische Analysen sowie unter Berücksichtigung des klinischen Bildes. Der Nachweis Rubella-spezifischer IgG-Antikörper im Serum dient zur Bestimmung des Immunstatus und kann durch eine Analyse der IgG-Avidität ergänzt werden [120]. Eine Primärinfektion oder Reinfektion wird hingegen über den Nachweis von Rubella-spezifischer IgM-Antikörper diagnostiziert. Diese sind etwa zehn Tage nach der Infektion nachweisbar und erreichen nach ungefähr vier Wochen ihr Maximum [51]. Wie bereits beschrieben, birgt eine Primärinfektion in den ersten Schwangerschaftsmonaten ein hohes Risiko der Übertragung der Virusinfektion auf den Fötus mit der Folge der Bildung eines CRS [120]. Daher zählt der serologische Nachweis Rubella-spezifischer Immunglobulin (Ig) G-Antikörper zu den ToRCH-Parametern, die vor und zu Beginn der Schwangerschaft routinemäßig bestimmt werden sollten. Etwa drei Wochen nach der Infektion sind Antikörper aller Ig-Klassen nachweisbar, wobei IgA-Antikörper in der Routinediagnostik keine Anwendung finden. Für die Detektion von Rubella-spezifischen Antikörpern werden In-vitro-Diagnostika wie z.B. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) eingesetzt [34, 51], die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Standardverfahren empfohlen werden [121]. Serologische Assays zum Nachweis von anti-Rubella-IgG-Antikörpern werden anhand eines internationalen Standards kalibriert, wodurch eine vergleichbare Interpretation der Ergebnisse (International Units/mL) ermöglicht wird [47]. Die Durchführung serologischer Assays erlaubt in geeigneten Laboren die Bereitstellung von Ergebnissen innerhalb weniger Stunden.

1.3. Rubella-Antigene für die Infektionsserologie

Derzeit basieren zugelassene In-vitro-Diagnostika (z.B. ELISA) zur Detektion Rubella-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper überwiegend auf nativen Viruspräparaten oder auf isolierten Glykoproteinen aus infizierten Zellen. Diese werden typischerweise mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation oder Lektin-Affinitätschromato-

graphie aufgereinigt [120]. Konkrete Angaben zu den in kommerziellen Assays eingesetzten Rubella-Antigenen werden von Herstellern jedoch in der Regel nicht veröffentlicht. Für die Infektionsserologie des 21. Jahrhunderts und zukunftsorientierter Detektionsmethoden, wie partikelbasierte Multiplexsysteme, rücken rekombinante Antigene zunehmend in den Vordergrund. Diese Technologien stellen höhere Anforderungen an die Standardisierung als klassische ELISA-Systeme, was sowohl auf verschärfte regulatorische Vorgaben als auch auf technologische Aspekte, wie die kovalente Antigen-Kopplung auf Trägeroberflächen, zurückzuführen ist. Beides erfordert einen hohen Kenntnisgrad bezüglich der eingesetzten Antigene und deren Eigenschaften. Zudem eröffnen diese Technologien neue diagnostische Möglichkeiten, darunter die multiplexe Analyse individueller Antikörperprofile. Voraussetzung hierfür sind jedoch Antigene mit hoher Qualität, Sensitivität und Spezifität, weshalb rekombinante Proteine eine zentrale Rolle einnehmen [94]. Deren definierte physikochemische Eigenschaften, flexible Epitop-Konstruktionen sowie reproduzierbare und kosteneffiziente Herstellung sind wesentliche Vorteile für den Einsatz rekombinanter Antigene in der Diagnostik [94]. Verschiedene Anbieter haben entsprechende rekombinante Rubella-Proteine etabliert, darunter Rubella gpE1, exprimiert in *Escherichia coli* (Abcam), sowie Rubella Spike Ectodomain gpE1-gpE2, exprimiert in Insektenzellen (SERION Immunologics). Die Wahl des Expressionssystems ist hierbei von entscheidender Bedeutung, da sich posttranslationale Modifikationen unterscheiden und diese die Eignung der Proteine für serologische Assays beeinflussen können [106].

In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression der drei Strukturproteine Kapsidprotein, gpE1 und gpE2 zu einer spontanen Bildung nicht-infektiöser Rubella Virus-like Particles (VLPs) führt. Studien weisen darauf hin, dass die Transmembran- und Cytoplasmadomänen von gpE1 und gpE2 [32] sowie das Kapsidprotein maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind [86]. Gegen alle drei Strukturproteine werden spezifische Antikörper gebildet, wobei die Immunantwort hauptsächlich gegen das gpE1 gerichtet ist [86]. Rubella-VLPs ähneln in Morphologie, Antigenität und Immunogenität den nativen Rubella-Virionen [32, 86] und stellen somit eine potentielle rekombinante Alternative für den Einsatz in der IVD dar. Bereits frühe Arbeiten aus dem Jahr 1994 belegten das diagnostische Potential von Rubella-VLPs [45], deren Anwendung zukünftig sowohl für den Nachweis von anti-Rubella-IgG- und IgM-Antikörpern als auch zur Quantifizierung entsprechender Antikörpertiter vorgesehen

ist. Insbesondere für die Detektion von IgM-Antikörpern bieten Rubella-VLPs durch die Präsentation mehrerer Oberflächenepitope der Strukturproteine die Möglichkeit, die diagnostische Leistungsfähigkeit serologischer Assays zu verbessern. Eine rekombinante Version der Rubella-VLPs ist von *The Native Antigen Company* kommerziell verfügbar. Der bislang fehlende standardisierte Einsatz von Rubella-VLPs im Bereich der IVD dürfte vor allem auf ökonomische Aspekte der Herstellung zurückzuführen sein, die noch erheblichen Optimierungsbedarf aufweist. Dies betrifft nicht nur die rekombinante Herstellung von Rubella-Antigenen, sondern ebenso die Produktion nativer Rubella-Präparate, die ebenfalls mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden ist.

1.4. Virus-like Particles

1.4.1. Allgemeines

VLPs sind multiproteinbasierte Strukturen, die der Morphologie nativer Viren entsprechen, jedoch kein virales Genom enthalten und somit nicht infektiös sind [73, 98]. Mit einer Größe von 10-200 nm [46, 118] können VLPs sowohl als natürliche Nebenprodukte der Virusreplikation entstehen als auch rekombinant hergestellt werden. Die spontane Zusammenlagerung und Selbstorganisation der Proteinuntereinheiten führt hierbei zur Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur, die der nativen Virusstruktur gleicht oder sehr ähnelt [73, 88].

Für die Produktion rekombinanter VLPs stehen verschiedene Expressionssysteme wie Bakterien, Hefen, Insekten- oder Säugerzellen zur Verfügung [73]. Dabei unterscheiden sich die resultierenden posttranslationalen Modifikationen (PTM) systemabhängig [73], was die Eignung der hergestellten VLPs für bestimmte Anwendungen entscheidend beeinflussen kann [110, 129]. PTM beeinflussen Struktur und Funktion von Proteinen maßgeblich. Sie regulieren enzymatische Aktivitäten, Protein-Protein-Interaktionen, Rezeptoraktivierungen, die Proteinfaltung und Proteinlöslichkeit sowie die Proteinlokalisierung. Zudem sind PTM an zentralen biologischen Prozessen wie Genexpressionskontrolle und Signaltransduktion beteiligt [91]. Prokaryotische Expressionssysteme ermöglichen hohe Produktionsraten rekombinanter VLPs [73], wiesen jedoch im Vergleich zu eukaryotischen Systemen weniger komplexe PTM auf [65].

Aufgrund ihrer Stabilität, Morphologie und Größe werden VLPs vielseitig eingesetzt. Neben ihrer etablierten Verwendung als Impfstoffplattform bieten sie Potential in der

Diagnostik, der Drug Delivery Systeme sowie in der Nanotechnologie [98, 110]. Mehrere VLP-basierte Impfstoffe sind bereits zugelassen, darunter Gardasil® (Merck & Co., Inc.) und Cervarix® (GlaxoSmithKline) gegen humane Papillomaviren [73, 98]. Für beide Impfstoffe wird das virale Strukturprotein L1 rekombinant exprimiert und zur Bildung von VLPs assembliert. Für Gardasil® erfolgt die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, gefolgt von einer Aufreinigung über chromatographische Verfahren. Cervarix® basiert auf VLPs, die im Baculovirus-Insektenzellsystem produziert und über Filtrations- und Chromatographieschritte gereinigt werden [98]. Ein wesentlicher Vorteil rekombinanter VLPs liegt in ihrer Nicht-Infektiosität, wodurch weder eine Inaktivierung noch eine Abschwächung des Virus erforderlich ist. Dies verhindert Epitop-Modifikationen auf der Virionoberfläche, die bei Inaktivierungsprozessen häufig auftreten und die Antigenität beeinträchtigen können [98]. Zudem präsentieren VLPs Epitope in ihrer nativen dreidimensionalen Konformation, was im Vergleich zu isolierten, linearen Zielproteinen eine stärkere Antikörper-Reaktivität und Immunantwort induziert [98, 129]. Während lineare Epitope unabhängig von der Proteinfaltung von Antikörpern erkannt werden können, ist die Bindung an konformationelle Epitope von der korrekten Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine abhängig [22]. Neben den genannten Eigenschaften zeichnen sich VLPs insbesondere durch folgende Vorteile aus:

- Hohe Flexibilität durch gentechnische und chemische Modifizierbarkeit [73],
- Möglichkeit zur Produktion in hohen Ausbeuten in natürlichen und heterologen Organismen sowie
- einheitliche Strukturen für jeden Virustyp bzw. jedes gebildete VLP [73, 129].

Aus diesen Gründen sind VLPs für die biotechnologische und pharmazeutische Industrie sowie für die Weiterentwicklung der Infektionsserologie von hohem Interesse.

1.4.2. Upstream Processing

1.4.2.1. Allgemeines

Der Bereich des Upstream Processing (USP) zielt auf eine robuste und effiziente Herstellung von VLPs mit hohen Ausbeuten ab, bei gleichzeitiger Reduktion von Prozesszeiten und -kosten [63]. Die Prozessentwicklung erfolgt durch die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems sowie der Anpassung und Optimierung der Prozessbedingungen an die jeweilige Produktionszelllinie [20, 63]. Bei der Etablierung einer eukaryotischen Zelllinie wird zwischen adhärenten und Suspensionszellen

differenziert. Adhärente Zellkulturen benötigen geeignete Wachstumsoberflächen, was das Scale-Up durch begrenzte verfügbare Flächen einschränkt [20]. In der industriellen Biotechnologie hat sich daher die Nutzung von Suspensionszelllinien vermehrt etabliert [63], da diese in Hochzelldichte kultiviert werden können und keine zusätzlichen Trägermaterialien wie Microcarrier für adhärente Zellkulturen im Bioreaktormaßstab erfordern [20]. Für die Kultivierung müssen die Zellen an das Wachstum in Suspension adaptiert werden [6, 20]. Zellkulturmedium, Kultivierungsgefäß, Prozessbedingungen und optimaler Erntezeitpunkt werden jeweils auf die Produktionszelllinie abgestimmt [20, 63]. Serumfreie, komplexe Zellkulturmedien gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie die Adaption adhärenter Zelllinien an Suspensionskulturen unterstützen, Hochzelldichte-Kultivierungen ermöglichen und das nachgelagerte Downstream Processing (DSP) erleichtern. Zudem entsprechen sie regulatorischen Anforderungen der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA), die den Einsatz von Serum in biotechnologischen Prozessen zur Herstellung von Produkten für die Humanmedizin einschränken [20]. Für das Scale-Up des USP im Labormaßstab werden je nach Zelltyp unterschiedliche Kultivierungsgefäße eingesetzt - von Zellkulturplatten bis hin zu Bioreaktoren [56, 63]. Wie zuvor beschreiben, stehen verschiedene Expressionssysteme für die Produktion rekombinanter VLPs zur Verfügung [73]. Beispiele sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Herstellung von Virus-like Particles in verschiedenen Expressionssystemen.

AAV: Adeno-assoziierte Viren, B/IZ: Baculovirus/Insektenzellen, CHO: Chinese Hamster Ovary, E-M: Envelope-Membran, HBV: Hepatitis B Virus, HPV: humanes Papillomavirus, prM: Pre-Membran, S: small, sAG: Oberflächenprotein, SARS-CoV-2: schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus 2, Sf: *Spodoptera frugiperda*, VP: virales Protein. Tabellenausschnitt aus [98].

Virus	Expressions-system	Zelltyp	Rekombinante Proteine	Ausbeute (Zellkultur)	Ausbeute (Reinigung)
AAV	B/IZ	*Sf-9*	VP1, VP2, VP3	18 µg/mL	n.a.
	Säugerzellen	HEK293	VP1, VP2, VP3	n.a.	500 µg/mL
Dengue	Säugerzellen	HEK293	prM und E Proteine	n.a.	n.a.
HBV	Hefen	*Pichia pastoris*	sAg (S Protein)	400 µg/mL	n.a.
	Hefen	*S. cerevisiae*	sAg (S Protein)	35 µg/mL	n.a.
	Bakterien	*E. coli*	Core-Antigen	n.a.	372 µg/mL
	Säugerzellen	CHO	sAg (S Protein)	3,4 µg/mL	n.a.
	B/IZ	*Sf*	Oberflächen- und Core-Antigen	0,425 µg/mL	n.a.
HPV16	Hefen	*S. cerevisiae*	L1 Protein	2,7 µg/mL	n.a.
	Bakterien	*E. coli*	L1 Protein	0,75 µg/mL	n.a.

Virus	Expressions-system	Zelltyp	Rekombinante Proteine	Ausbeute (Zellkultur)	Ausbeute (Reinigung)
Marburg	Säugerzellen	HEK293T	VP40 und Glykoprotein	n.a.	n.a.
SARS-CoV-2	Säugerzellen	HEK293F	Spike und E-M Protein	n.a.	176 µg/L Zellkultur

Nachfolgend wird die Herstellung von VLPs in Säugerzellen, insbesondere in HEK293-Suspensionszellen, näher beschrieben. Die Produktion rekombinanter VLPs in HEK293-Zellen ist ein etabliertes und weit verbreitetes Verfahren [4]. Diese Zellen werden bevorzugt eingesetzt, da sie komplexe posttranslationale Modifikationen ermöglichen [35, 87] und in Hochzelldichte-Suspensionskulturen kultivierbar sind [87].

1.4.2.2. Zelllinienentwicklung

Für die Produktion von VLPs stehen sowohl stabile Zelllinien [5, 87], als auch transiente Transfektionsverfahren zur Verfügung [116]. Retrovirale Vektoren sind ein etabliertes Werkzeug für den stabilen Gentransfer [25, 76], da sie das Gene-of-interest (GOI) effizient in das Wirtsgenom integrieren [114] und dadurch eine langfristige Expression des GOI ermöglichen [25, 76]. Innerhalb der Gentherapie stehen insbesondere Lentiviren im Fokus, da diese auch sich nicht teilende Zellen infizieren können [25]. Die Produktion und die Infektiosität lentiviraler Viruspartikel beruht auf der Co-Transfektion von Transfer-, Hüll- und Verpackungsplasmiden in geeigneten Wirtszellen [26]. Das Transferplasmid enthält die Expressionskassette des GOI, ist jedoch frei von viralen offenen Leserahmen (ORFs), wodurch eine Replikation des Virus verhindert und ausschließlich das GOI exprimiert wird [26]. Neben den strukturellen Genen *gag*-, *pol*- und *env*, die allen Retroviren gemeinsam sind, verfügen Lentiviren über die regulatorischen Gene *tat* und *rev*, welche für die Virusreplikation essenziell sind [25]. Das ursprüngliche Drei-Plasmid-System der ersten Vektorgeneration bestand aus einem *env*-kodierenden Plasmid, einem Verpackungsplasmid, das sämtliche Gene aus *env* unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimierte, sowie einem Transferplasmid mit den für Integration, Verpackung und reverse Transkription erforderlichen Sequenzen [26, 76]. Nachfolgende Vektorgenerationen wurden durch gezielte Modifikationen weiterentwickelt, um die Transduktionseffizienz und die Expression des GOI zu verbessern sowie Sicherheitsaspekte zu erhöhen [25, 26]. Ein bedeutender Fortschritt in der Gentherapie ist die Einführung induzierbarer Expressionssysteme.

Beispielsweise ermöglicht das Tet-System eine präzise, tetracyclin- oder doxycyclinabhängige Regulation der Expression des GOI und findet deshalb breite Anwendung in der Genforschung und -therapie [133]. Zur Herstellung lentiviraler Vektorpartikel werden bevorzugt HEK293- und insbesondere HEK293T-Zellen eingesetzt [76, 114], die mit den beschriebenen lentiviralen Vektoren co-transfiziert werden [25]. Der Einsatz der HEK293T-Zelllinie beruht auf der Expression des SV40 large T-Antigens, das die Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung nach erfolgreicher Transfektion in die Wirtszelle ermöglicht [24]. Dadurch erhöht die Expression des T-Antigens die Produktionsrate lentiviraler Vektoren [31].

Transiente Transfektionen erlauben die schnelle Herstellung rekombinanter Proteine bis in den Bioreaktormaßstab unter Verwendung kommerziell verfügbarer Transfektionsreagenzien [30, 35, 114]. Allerdings erfordert diese Methode große Mengen hochreiner Plasmid-DNA [114] sowie häufig den Einsatz kostenintensiver Transfektionsreagenzien. Im Gegensatz dazu bieten stabile Zelllinien einen robusten und ökonomisch vorteilhaften Herstellungsprozess im skalierbaren Maßstab über unbefristete Zeiträume [35, 114].

Durch ein zeit- und arbeitsintensives Single Cell Cloning (SCC) können monoklonale Zelllinien bereits in frühen Phasen der Prozessentwicklung etabliert werden, die eine gesteigerte Produktion rekombinanter Zielproteine ermöglichen [134]. Ein gängiger Ansatz hierfür ist Verdünnungsmethode, bei der polyklonale adhärente Zellen in geringer Zelldichte auf Zellkulturplatten ausgesät und anschließend gezielt hochproduktive Einzelzellklone selektiert werden. Typischerweise werden dazu 100 µL einer 5 Zellen/mL Lösung in 96-Well-Zellkulturplatten überführt. Die Identifizierung einzelner Zellklone und deren Abgrenzung von Zellkolonien erfolgt in der Regel mikroskopisch [127].

1.4.2.3. Prozessentwicklung

Bisherige Ansätze zur VLP-Produktion in HEK293-Zellen wurden überwiegend in Schüttelkolbenkulturen unter Verwendung transienter Transfektionsmethoden [30] sowie mit stabilen Zelllinien [30, 116] im Bioreaktormaßstab etabliert [4, 87]. Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen zur Herstellung von Humanes-Immundefizienzvirus-1-(HIV-1)-VLPs wurde beispielsweise unter Verwendung variierender DNA-Konzentrationen und Polyethylenimin (PEI) als Transfektions-reagenz im 125 mL-Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt [30]. Darüber hinaus

konnten mit einer stabilen HEK293-Zelllinie im 2L-Bioreaktor SARS-CoV-2-VLPs produziert werden [87]. Für die VLP-Herstellung wurden verschiedene Kultivierungsstrategien wie Fed-Batch [4, 87] oder Fed-Batch mit Perfusion [5] angewandt, mit Prozessdauern von 168 Stunden [87] bis zu 350 Stunden [5].
Wie bereits beschrieben, müssen für die jede Zelllinie die Prozessbedingungen individuell angepasst und der optimale Erntezeitpunkt zur Erzielung maximaler Produktausbeute definiert werden [20, 63]. Zur Optimierung dieser Bedingungen kann das statistische Versuchsplanungsprinzip Design of Experiments (DoE) eingesetzt werden. Dieses ermöglicht die systematische Untersuchung des Einflusses einzelner Prozessparameter auf definierte Zielgrößen und reduziert zugleich die Anzahl erforderlicher Experimente [79]. Zu den wesentlichen Parametern bei der Zellkulturführung im Bioreaktor zählen die Temperatur, der gelöste Sauerstoffgehalt (DO), der pH-Wert [79], die Rührerdrehzahl [53] sowie die Inokulationsdichte [124]. Als Zielgrößen werden üblicherweise Gesamtzellzahl, vitale Zelldichte, Zellvitalität und Produktausbeute festgelegt [79].

1.4.2.4. Medienanalyse

Zur Kontrolle der Nährstoffversorgung erfolgte in den meisten Fällen die Überwachung der Glukose- und Laktatkonzentration während des Kultivierungsprozesses [4]. Die Grenzen für das Zellwachstum von HEK293-Zellen resultieren überwiegend aus dem Verbrauch essentieller Nährstoffe sowie der Anreicherung von Stoffwechselnebenprodukten [60]. Die Kultivierung im Fed-Batch-Prozess mit gezielter Supplementierung einer Feed-Lösung ist daher ein etabliertes Verfahren in der biotechnologischen Industrie, um Nährstofflimitierungen zu vermeiden, hohe Zelldichten zu erreichen und die volumetrische Produktivität des Zielproteins zu steigern. Die Entwicklung einer auf die jeweilige Zelllinie angepassten Feeding-Strategie stellt jedoch einen komplexen Prozess dar, da die Anforderungen der Nährstoffversorgung variieren können [108].
Für die Charakterisierung von HEK293-Zelllinien sind insbesondere Glukose, Glutamin, Ammonium, Glutamat und Laktat von zentraler Bedeutung [16]. Glutamin stellt neben Glukose eine wesentliche Energiequelle dar [90]. Der Glutamin-Metabolismus führt jedoch zur Bildung von Ammonium, welches das Zellwachstum sowie die Produktbildung hemmt [90] und zusätzlich die Protein-Glykosylierungen negativ beeinflussen kann [48]. Auch erhöhte Laktatkonzentrationen wirken sich

negativ auf Zellwachstum, Vitalität und Produktivität aus [48]. Solche Inhibierungen durch Ammonium und Laktat sind typische Herausforderungen von Fed-Batch-Prozessen [48] und müssen durch eine geeignete Feeding-Strategie minimiert werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase von HEK293-Zellen steigt bei zunehmender Glukoseverfügbarkeit der metabolische Glukose-Fluss an, was über die Glykolyse zu einer Anreicherung von Laktat führt [69]. Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen sind HEK293-Zellen jedoch in der Lage, Laktat zu metabolisieren. Insbesondere der pH-Wert wird als entscheidender Faktor für den Übergang vom Glukoseverbrauch mit gleichzeitiger Laktatproduktion hin zum Co-Metabolismus von Glukose und Laktat beschrieben, was wiederum direkte Auswirkungen auf Zellwachstum, Vitalität und Produktbildung haben kann [100].

1.4.2.5. Scale-Up

Für die biotechnologische Herstellung rekombinanter Proteine stellt das Scale-Up vom Labor- in den Produktionsmaßstab einen entscheidenden Schritt der Prozessentwicklung dar. Ziel ist die Übertragung des Prozesses auf größere Arbeitsvolumina bei gleichbleibender Produktqualität und -ausbeute [78]. Dabei müssen die hydrodynamischen Bedingungen innerhalb des Bioreaktors möglichst konstant gehalten werden, um eine reproduzierbare Zellkulturführung sicherzustellen [53]. Eine wesentliche Herausforderung besteht darin, dass nicht alle relevanten Prozessparameter während der Skalierung konstant gehalten werden [53] und deren Einflüsse berücksichtigt werden können [78]. Zur Steuerung des Scale-up werden häufig der volumetrische Leistungseintrag (P/V, spezifische Rühr- bzw. Energieeintragsleistung pro Volumen) sowie der volumenbezogene Sauerstoff-übergangskoeffizient (k_La) herangezogen und konstant gehalten [53, 124]. Ein konstanter P/V-Wert während der Skalierung erlaubt keine Rückschlüsse auf das Risiko potenzieller Zellschädigungen oder die Effizienz der Durchmischung im Bioreaktor. Entscheidend ist daher, welcher dieser Faktoren für die jeweilige Zelllinie den maßgeblichen Einfluss auf Zellwachstum und Produktbildung ausübt [53]. Der k_La-Wert beschreibt den Sauerstoffmassentransfer, der insbesondere bei Hochzelldichtekultivierungen einen limitierenden Faktor für die maximale Zelldichte darstellen kann [53, 124]. Eine kontinuierliche Anpassung des k_La-Wertes an die steigende Sauerstoffaufnahme der Zellen während der Kultivierung ist daher erforderlich. In diesem Zusammenhang kommt der Rührerdrehzahl eine zentrale

Bedeutung zu, da sie sowohl den Sauerstoffeintrag als auch die Scherkräfte im Bioreaktor wesentlich beeinflusst [53].

1.4.3. Downstream Processing

Das DSP umfasst sämtliche Verfahrensschritte, die nach Abschluss der Zellkultivierung zur Gewinnung des Zielproteins erforderlich sind. Ziel ist die Isolierung, Reinigung, Konzentration und Lagerung des Zielproteins in hoher Reinheit als finales Produkt. Die Wahl geeigneter Methoden richtet sich nach den physikochemischen Eigenschaften des Zielproteins, wie Größe, Ladung oder molarer Masse ab [103]. Für jedes neu konstruierte und bislang nicht charakterisierte VLP ist daher die Entwicklung eines spezifisch angepassten Reinigungsschemas erforderlich [129]. Im ersten Schritt werden während der Ernte zelluläre Bestandteile durch Zentrifugations- und/oder Filtrationsprozesse abgetrennt [103]. Entscheidend ist hierbei, ob VLPs in das Zellkulturmedium sezerniert werden oder intrazellulär akkumulieren, wodurch eine zusätzliche Zelllyse erforderlich sein kann [118, 129]. Zum Schutz der VLPs vor proteolytischem Abbau während des Aufarbeitungsprozesses werden die eingesetzten Puffer häufig mit geeigneten Proteaseinhibitoren versetzt [129]. Anschließend folgen meist mehrere Reinigungsschritte, die prozessual aufeinander abgestimmt sein müssen [103]. Diese basieren für die Aufarbeitung von VLPs überwiegend auf Ultrazentrifugationsschritten, die jedoch zeitintensiv, schwer skalierbar und durch geringe Volumina limitiert ist [55, 129]. Die geringen Volumina beziehen sich hierbei auf die begrenzten Kapazitäten der Ultrazentrifugation, während im industriellen Maßstab deutlich größere Volumina aus der Zellkultivierung aufgearbeitet werden müssen. Daher gewinnen Chromatographie- und Filtrationsmethoden im industriellen Maßstab zunehmend an Bedeutung, da sie eine effiziente und skalierbare Aufarbeitung von VLPs ermöglichen [129]. Zu den häufig eingesetzten Chromatographieverfahren zählen Affinitäts-, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie (SEC) [84, 118]. Alternativ kann eine Fällung der VLPs mittels Polyethylenglykol (PEG) erfolgen [41, 55].

Zur Anpassung geeigneter Pufferbedingungen für die gewählte Reinigungsmethode sowie zur Konzentrierung des Zielproteins können vorgelagerte Filtrationsschritte erforderlich sein [103]. Rotavirus-VLPs wurden beispielsweise zunächst durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen getrennt, bevor weitere Reinigungsschritte mittels Ultrazentrifugation und SEC durchgeführt wurden [84]. Norovirus-VLPs wurden

nach der Expression in Insektenzellen durch Zentrifugation isoliert und anschließend über eine PEG-Fällung präzipitiert. Die weiterführende Reinigung erfolgte über eine Ionenaustauscherchromatographie mit einem nachgeschalteten Ultrazentrifugationsschritt [52].

Für die finalen Reinigungsschritte werden Filtrationsverfahren wie Ultrafiltration und Diafiltration sowie weitere membranbasierte Konzentrationsmethoden genutzt, die eine effiziente VLP-Konzentration und einen vollständigen Pufferaustausch in die finalen Lagerbedingungen ermöglichen [84].

Zu den zentralen Herausforderungen im DSP zählen die Vermeidung proteolytischer Abbauprozesse, die Minimierung struktureller Veränderungen der VLPs während der Aufarbeitung sowie die hohen Prozesskosten für die Etablierung alternativer Reinigungsstrategien [55, 118]. Da die Herstellung neuer VLPs grundsätzlich sehr kosten- und zeitintensiv ist [129], besteht das Ziel der Prozessentwicklung darin, reproduzierbare, kosten- und zeiteffiziente Verfahren zur Gewinnung hochreiner VLPs zu etablieren. Hierfür sind Strategien zur Entwicklung und Optimierung geeigneter Methoden erforderlich, die zudem mit den Maßstabsanforderungen des USP abgestimmt werden müssen.

1.4.4. Charakterisierung

Für die Charakterisierung von VLPs ist der Einsatz geeigneter Methoden erforderlich, die eine Identifizierung entlang des gesamten Herstellungsprozesses ermöglichen und somit Rückschlüsse auf Produktausbeuten und -verluste erlauben [129]. Ergänzend sind analytische Technologien notwendig, die Informationen zur Morphologie und Struktur in den einzelnen Prozessschritten liefern [92]. Eine PEG-Fällung ermöglicht die Abtrennung hochmolekularer VLP-Strukturen von niedermolekularen Verunreinigungen, sodass die typischen Strukturproteine von VLPs bereits in frühen Produktionsstadien mit etablierten biochemischen Methoden wie Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen werden können [12, 129]. Zusätzlich können Western Blot und ELISA [38] eingesetzt werden, sofern geeignete mono- oder polyklonale Antikörper verfügbar sind [129]. Die Morphologie, Größe und Homogenität der VLPs lässt sich mittels Elektronenmikroskopie visuell bestätigen [129]. Für die hochauflösende Darstellung der Oberflächenstrukturen stehen darüber hinaus Immun- und Kryo-Elektronenmikroskopie zur Verfügung [129]. Weitere verbreitete Analysemethoden

sind die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) [12] sowie die SEC in Kombination mit dynamischer Mehrwinkellichtstreuung (MALS) [92]. Für eine sensitive und robuste Charakterisierung von VLPs kann darüber hinaus die Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC) eingesetzt werden [92].
Nach Abschluss der Aufreinigung können VLPs hinsichtlich PTM wie Glykosylierungen untersucht werden [129]. Hierfür kommen unter anderem spezifische Verdauverfahren [58] sowie massenspektrometrische Analysen zum Einsatz [129]. Ein weiterer zentraler Aspekt der Charakterisierung betrifft die Stabilität der VLPs. Hierzu müssen geeignete Pufferbedingungen und Lagertemperaturen definiert werden, um die strukturelle Integrität der VLPs nach der Herstellung sicherzustellen [129]. Verfahren wie die dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglichen hierbei die Untersuchung der Morphologie, der thermischen Stabilität sowie des Aggregationsverhaltens [131].
Zur Quantifizierung der VLPs werden häufig Proteinbestimmungsmethoden wie der Bradford- oder Lowry Assay verwendet [92]. Darüber hinaus ist, abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Antikörper, auch der Einsatz antikörperbasierter Quantifizierungsassays denkbar.

1.4.5. Diagnostik

Das Potenzial von VLPs als nicht-infektiöse Antigene für die serologische Diagnostik ergibt sich aus der Präsentation spezifischer Oberflächenproteine mit konformationellen Epitopen, die den nativen Virusstrukturen ähneln oder gleichen [98, 104]. Sowohl die Immunogenität von VLPs [131] als auch die Bindung spezifischer monoklonaler Antikörper (mAK) an VLPs wurde bereits nachgewiesen [80], was ihre Eignung für den Einsatz in der Humanserologie unterstreicht. Beispiele hierfür sind Dengue-Virus-VLPs [72], SARS-CoV-2-VLPs [54] und Zika-Virus-VLPs [117], deren Integration in serologische Testsysteme (ELISA) eine hohe Sensitivität und Spezifität sowohl im IgG- als auch im IgM-Nachweis gezeigt hat [117]. Für Zika-Virus-VLPs konnten darüber hinaus im IgM-ELISA höhere Sensitivitäten und Spezifitäten im Vergleich zum rekombinanten Oberflächenprotein E beobachtet werden [117]. Vor diesem Hintergrund stellen auch Rubella-VLPs eine vielversprechende Option dar, da sie in Morphologie, Antigenität und Immunogenität den nativen Virionen ähneln [32, 86] und somit als rekombinante Antigene für die Infektionsserologie genutzt werden können.

2. Motivation und Zielsetzung

Der Nachweis akuter und reaktivierter Röteln-Infektionen sowie die Bestimmung des Immunstatus haben insbesondere während der Schwangerschaft hohe klinische Relevanz. Gegenwärtig eingesetzte serologische Testsysteme basieren überwiegend auf nativen Viruspräparaten oder aufgereinigten Glykoproteinen aus infizierten Zellen, deren Herstellung sowohl hinsichtlich der Standardisierung als auch der Kosteneffizienz limitiert ist. Aufgrund ihrer virusähnlichen Eigenschaften wurden Rubella-VLPs als vielversprechende rekombinante Alternative identifiziert.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines skalierbaren, kosteneffizienten und reproduzierbaren Herstellungsprozesses für Rubella-VLPs vom Labor- bis in den industriellen Produktionsmaßstab zur Anwendung in der Humanserologie. Im USP liegt der Fokus auf der Etablierung einer stabilen Zelllinie als leistungsfähiges Expressionssystem. Durch die Selektion einer monoklonalen Zelllinie soll die Produktivität gesteigert und die Robustheit des Produktionsprozesses durch homogene Expressionsraten gesichert werden. Ergänzend ist die Etablierung einer serumfreien Suspensionskultur mit geeigneten Kultivierungs- und Feeding-Strategien vorgesehen, um die Ausbeute zu erhöhen. Angestrebt ist eine Herstellung von 5-10 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur in Bioreaktorsystemen bis 40 L, wobei Prozessoptimierungen zunächst im 1 L-Maßstab mittels DoE erfolgen sollen.

Im DSP sollen skalierbare Reinigungs- und Polishingverfahren mit wenigen Prozessschritten entwickelt werden, die eine hohe Reinheit und Stabilität der VLPs gewährleisten. Parallel werden geeignete analytische Methoden etabliert, die eine Steuerung, Bewertung und Optimierung der Prozessentwicklung ermöglichen. Dazu zählen Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung der Rubella-VLPs sowie DLS-Messungen und Elektronenmikroskopie zur Charakterisierung von Morphologie, Größe und Stabilität. Darüber hinaus werden optimale Lagerbedingungen bestimmt und die diagnostische Eignung der VLPs in serologischen Testsystemen überprüft.

Mit der Entwicklung eines wirtschaftlichen Produktions- und Reinigungsprozesses für Rubella-VLPs leistet die Arbeit einen Beitrag zur biotechnologischen Prozessentwicklung und erweitert zugleich die Grundlage für den Einsatz rekombinanter Antigene in der Röteln-Diagnostik.

3. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel sind die verwendeten Geräte, Materialien und Reagenzien aufgeführt. Darüber hinaus werden die angewandten experimentellen Verfahren sowie die zugrunde liegenden methodischen Ansätze beschrieben. Der Zusatz „in-house“ bzw. „intern“ bezeichnet Verfahren, Methoden, Richtlinien oder Materialien, die im Unternehmen Institut Virion\Serion GmbH entwickelt, validiert oder angewendet wurden.

3.1. Material

3.1.1. Geräte

In Tabelle 2 sind sämtliche für die experimentellen Arbeiten verwendeten Geräte systematisch aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Übersicht der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Geräte mit Gerätetyp, Hersteller, Modellbezeichnung und Verwendungszweck.

Gerätetyp	Hersteller	Modellbezeichnung	Verwendungszweck
Automatisiertes Extraktionssystem	Thermo Fisher Scientific	KingFisher Flex	Fluoreszenz-Immunoassay (FLIA)
Automatisierter Zellzähler	NanoEnTek Inc.	EVE™	Zellzählung
Bioreaktor Steuereinheit	Eppendorf SE	BioFlo® 320	Prozesssteuerung Bioreaktor
BioSealer	Sartorius Stedim Biotech GmbH	BioSealer® TC	Schlauchversiegelung
Chromatographiesystem	Cytiva	ÄKTA pure	Chromatographie
Durchflusszytometer	Beckman Coulter GmbH	CytoFLEX S	Fluorescence Immunoassay
Elektronenmikroskop	JEOL Ltd.	JEM-2100	Elektronenmikroskopische Aufnahmen
Elektrophorese-Netzgerät	BioRad	PowerPac 1000	SDS-PAGE
ELISA Analysesoftware	Institut Virion\Serion	SERION easyANALYZE 1.3.	ELISA
GraphPad Prism	GraphPad Software	GraphPad Prism 10	Statistische Auswertung, Erstellung Abbildungen
Kompressor	Implotex Limited	Ultra-silent 480W 1-480-9	Begasung Bioreaktor Steuereinheit
Medienanalyser	4BioCell	4BioCore	Medienanalyse
Mikrotiterplatten Lesegerät	Tecan	Sunrise	ELISA
Mikrotiterplatten Washer	BioTek	Elx50	ELISA

Gerätetyp	Hersteller	Modellbezeichnung	Verwendungszweck
pH Meter	Schott Instruments	Lab 850	pH Messung
Pipetten	Eppendorf SE	n.a.	Laborarbeit
Schlauchschweißgerät	Sartorius Stedim Biotech	BioWelder® Total Containment	Schlauchverschweißung
Schüttelinkubator	Labwit	ZWYC-290A	Zellkultivierung
Software Chromatographiesystem	Cytiva	Unicorn 7.6.	Chromatographie
Software Durchflusszytometer	Beckman Coulter	CytExpert 2.6.	Fluorescence Immunoassay
Statistik Kalkulator	DATAtab	numiqo Team (2025)	Statistische Datenanalyse
TFF-System	Sartorius Stedim Biotech	Sartoflow® Smart	Crossflow-Filtration
Waagen	Kern	n.a.	Laborarbeit
Zentrifuge	Thermo Scientific	Sorvall RC6 Plus	Zentrifugation
Zentrifuge	Thermo Scientific	Sorvall BIOS 16	Zentrifugation
Zentrifuge	Thermo Scientific	Sorvall LYNX 6000	Zentrifugation

Die verwendeten Geräte wurden gemäß interner standardisierter Protokolle (SOPs) in festgelegten Wartungsintervallen auf ihre korrekte und vollständige Funktionsfähigkeit überprüft. Daher werden die mit diesen Geräten erhobenen Messdaten als zuverlässig eingestuft.

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 enthält sämtliche im Rahmen der Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien. Nicht explizit aufgeführte Kunststoffartikel wurden von den Herstellern BD Plastipak, Brand, Corning, Eppendorf, Greiner Bio-One, Sarstedt, Sigma-Aldrich und Starlab bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Übersicht der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung, Hersteller, Artikelnummer und Charge/Lot.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Charge / Lot
4BioCore Cuvettes	4BioCell	700204	n.a.
4BioCore Sample Cups	4BioCell	700203	n.a.
Ammonia Assay	4BioCell	700302	-09
BioBLU 1c	Eppendorf SE	13861102000	N215445I
BioBLU 10c	Eppendorf SE	1386141300	M213209N
BioBLU 50c	Eppendorf SE	1386163000	O220804J
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad	5000002	n.a.
Cleaning Solution	4BioCell	900360	-04
Diluent	4BioCell	700344	-10
Esel-anti-Maus-IgG-Antikörper	Jackson Immuno Research	715-116-151	152380

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Charge / Lot
Feed-Lösung	Capricorn	HEKF-1000ML	CP24-7395
FKS	Capricorn	FBS-22A	n.a.
Glucose Assay	4BioCell	700306	-09
Glutamate Assay	4BioCell	700307	-10
Glutamine Assay	4BioCell	700308	-10
Glutamine Calibrator	4BioCell	900322	-28
Glutamine Control L2	4BioCell	900335	-28
GoBio Mini ACT	Bio-Works	45400001	154999
HiScale 16/20 Leersäule	Cytiva	28964441	n.a.
HiScale 16/20 Leersäule	Cytiva	28964441	n.a.
HiScale 50/20 Leersäule	Cytiva	28964445	n.a.
HiTrap NHS-activated HP	Cytiva	17071601	10346883
KingFisher 96 tip comb	Thermo Scientific	97002524	23107130
KingFisher 96 plate 200 µL	Thermo Scientific	97002540	25107FO
Lactate Assay	4BioCell	700315	-11
Lenti-X GoStix Plus	Takara	631280	21328
Multi Calibrator	4BioCell	900319	-20
Multi Control L3	4BioCell	900330	-20
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	Cytiva	17090601	10342129
NHS-activated Sepharose HP	Cytiva	90100402	10341538
pLVX-TetOne-Puro Vector Set	Takara	631849	n.a.
PNGase F	New England Biolabs	SP0704S	10039550
PureCube NHS act. Agarose XL	Cube Biotech	58303	80001-3038-124-1
Rubella-Antigen	Microbix	EL-05-11	KC050960A1
Rubella Virus Antikörper Capsid Protein	Antibodies-Online	ABIN809896	n.a.
Rubella Virus Antikörper gpE1	Antibodies-Online	ABIN349770	n.a.
Rubella Virus Antikörper gpE2	Antibodies-Online	ABIN809897	n.a.
SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG	Institut Virion\Serion	ESR129G	EQ0051
SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgM	Institut Virion\Serion	ESR129M	EP0203
System Solution	4BioCell	900359	-08
TFF-Membran	Sartorius	3081467902E-SG	250148123-013
Tricorn 5/50 Leersäule	Cytiva	28406409	n.a.
Tris-Glycin Gele	anamed Elektrophorese	TG42015	n.a.
UV-Küvette	Sarstedt	67.754	n.a.
UV-Küvette micro	Brand	759200	0000010508
WorkBeads 200 ACT	Bio-Works	SA1000192	EXP088116AD
Zellkulturmedium adhärente Zellen (DMEM)	PAN Biotech	P04-035001	n.a.
Zellkulturmedium Suspensionszellen	Capricorn	HEKS-1000ML	CP24-7335

Die in dieser Arbeit eingesetzten Rubella-spezifischen monoklonalen Antikörper sowie die Materialien für die serologischen Testsysteme wurden zur Entwicklung des Bioprozesses freundlicherweise vom Unternehmen Institut Virion\Serion GmbH zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Tabelle 4 enthält eine Übersicht der im Rahmen der Versuchsreihen essentiell eingesetzten Chemikalien, Pufferlösungen und Reagenzien.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Reagenzien.

Übersicht der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Chemikalien, Lösungen und Reagenzien mit Bezeichnung, Hersteller, Artikelnummer und Charge/Lot.

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Charge/Lot
1x NTE	Institut Virion\Serion GmbH	n.a.	n.a.
Albumin bovine Fraction	Serva Electrophoresis	11930.04	230055
Brilliant Blau R250	Carl Roth	3862.1	434360040
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth	3958.1	284357510
DILB	Institut Virion\Serion GmbH	B231	ECQ0176
Doxycyclin	neoFroxx	1582GR001	67BC43D6
Ethanolamine	Sigma-Aldrich	E9508-500ML	1003641722, MKCQ8982
Glycin	Applichem	131340.1211	0002586443
Guanidin-hydrochlorid	Carl Roth	0037.1	084321434
Harnstoff	Carl Roth	2317.2	195334614
HEPES	Thermo Scientific	10081113	231150
Kaliumchlorid	AppliChem	131494.1214	0002339172
L-Glutamin (200 mM)	PAN Biotech	P04-80100	2720924
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem	131396	0002299758
MSOL (PBS-TBN) pH 7,4	Institut Virion\Serion GmbH	B266	LWN0028
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich	S8875-500G	0000397471
Natriumchlorid	Hartenstein	141659.0416	0002632013
Nigrosin	Thermo Scientific	A18147.22	10240228
ProClin 950	Sigma-Aldrich	46878-U	MKCV9302
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad	5000006	64630589
R-PE Konjugat-Mix Mab1, Mab2	Institut Virion\Serion GmbH	n.a.	EDQ.04
Saccharose	Carl Roth	4621.2	504359672

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Charge/Lot
SERION ELISA classic WASH	Institut Virion\Serion GmbH	B232	ECN0449
Triethanolamin	Millipore	1.08379.1000	K55427679 338
Tri-Natriumcitrat-dihydrat	AppliChem	131655.1211	n.a.

3.2. Methoden

Eine Übersicht der verwendeten Bedienungsanleitungen, die im Fließtext mit dem Hinweis „gemäß Herstellerangaben“ oder Ähnliches referenziert werden, ist im Anhang in Tabelle 18 aufgeführt und entsprechend nummeriert.

Abbildung 2 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Bioprozessentwicklung zur Herstellung von Rubella-VLPs in den Bereichen USP (rot), DSP (grün) sowie die eingesetzten prozessanalytischen Verfahren (blau) zur Identifizierung und Charakterisierung des Zielproteins in den einzelnen Prozessschritten. Die Arbeitsschritte von USP und DSP verliefen dabei parallel und in enger Abstimmung unter Einbezug geeigneter analytischer Methoden. Der frühzeitige Aufbau einer Analytik zur Charakterisierung der Rubella-VLPs erwies sich als essentiell für die gesamte Prozessentwicklung.

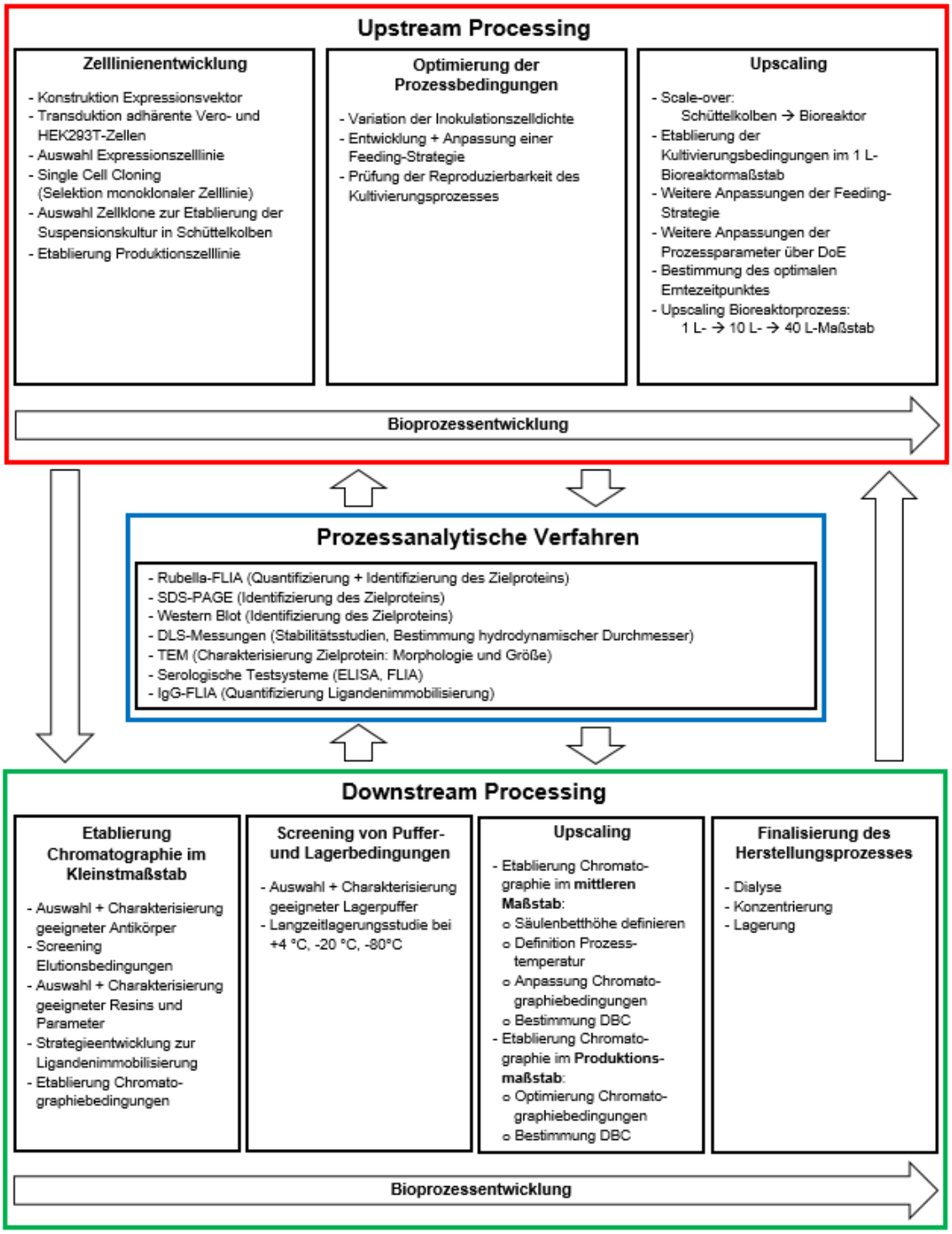


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Bioprozessentwicklung.

Vereinfachte Darstellung der Arbeitsschritte der Bioprozessentwicklung in den Bereichen Upstream Processing (rot), Downstream Processing (grün) sowie die eingesetzten prozessanalytischen Verfahren (blau) zur Herstellung von Rubella-VLPs. Definition Zielprotein = Rubella-VLPs. Definition Chromatographie = Antikörper-Affinitätschromatographie. Der Aspekt Chromatographiebedingungen definiert hier die Anpassung der linearen Flussgeschwindigkeiten einzelner Prozessabläufe sowie die Untersuchung einhergehender Verweilzeiten. Definition der Maßstäbe im Bereich Downstream Processing: Kleinstmaßstab = 1 mL Säulenvolumen (SV); mittlerer Maßstab = 16,1 mL SV; Produktionsmaßstab: 178,1 mL SV.

Im Folgenden werden die einzelnen Prozessschritte der Bioprozessentwicklung zur Herstellung der Rubella-VLPs dargestellt.

3.2.1. Upstream Processing: Zelllinienentwicklung

3.2.1.1. Konstruktion des Expressionsvektors

Zu Beginn musste festgelegt werden, wie das gewünschte Expressionskonstrukt aufgebaut sein soll. Hierbei müssen Entscheidungen bezüglich der darauffolgenden Arbeitsschritte, wie z.B. das Anbringen von Tags für die Entwicklung des DSP und zu erwartende strukturelle Eigenschaften der so generierten Rubella-VLPs miteinbezogen werden.

Das Genkonstrukt für die Rubella-VLPs basiert auf der bekannten Aminosäure-Sequenz für die drei Rubella-Strukturproteine gpE1, gpE2 und Kapsidprotein [17, 44]. Die externe Gensynthese des entworfenen Konstruktes erfolgte in den Expressionsvektor *pLVX-Puro*. Die Sequenz wurde für die Expression in eukaryotischen Zellen optimiert. Im nächsten Schritt wurde das gewünschte Rubella-VLP-Genfragment (3,2 Kilobasen (kb)) über ausgewählte Schnittstellen in den mit Doxycyclin induzierbaren Expressionsvektor *pLVX-TetOne-Puro* (Takara Bio, vgl. Abbildung 51) kloniert. Nach Transduktion exprimieren die Zielzellen das Tet-On-3G-Transaktivatorprotein, das in Anwesenheit von Doxycyclin spezifisch an den induzierbaren P_{TRE3G}-Promotor bindet und die Transkription des GOI induziert. Ein induzierbares Expressionssystem wurde gewählt, da frühere in-house-Studien zur Expression anderer Rubella-Proteine (Institut Virion\Serion) gezeigt hatten, dass diese eine zytotoxische Wirkung auf die die Zielzellen ausübten. Durch die Verwendung eines induzierbaren Systems konnte die Etablierung der Zelllinie ohne Beeinträchtigung durch die Expression des Zielproteins erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Rubella-VLPs als Zielprotein bezeichnet, obwohl sie aus mehreren Strukturproteinen bestehen. Diese Vereinfachung dient der besseren Lesbarkeit und berücksichtigt die Komplexität der VLPs als funktionelle Einheit.

3.2.1.2. Herstellung lentiviraler Partikel und Transduktion

Das lentivirale rekombinante System ermöglicht eine effiziente, irreversible und nicht-zielgerichtete Integration des GOI in das Genom der infizierten Zielzellen. Für die Herstellung lentiviraler Partikel wurde die Produktionszelllinie HEK293T mit lentiviralen Transfer-, Hüll- und Verpackungsplasmiden co-transfiziert. Als Transferplasmid kam *pLVX-TetOne-Puro* zum Einsatz, während *psPAX2* (in-house) als Hüllplasmid und *pVSV-G* (in-house) als Verpackungsplasmid verwendet wurden. Die Calcium-phosphatmethode diente als Transfektionsverfahren. Nach 48 sowie nach 72 Stunden

wurde der Zellkulturüberstand mit lentiviralen sezernierten Partikeln geerntet und mittels PEG-Fällung konzentriert. Die Kontrolle der Herstellung lentiviraler Partikel sowie die Bestimmung des Lentivirus Titers erfolgten gemäß Herstellerangaben (Bedienungsanleitung 4) mittels Lenti-X GoStix (Takara Bio) und einem auf der Antibiotikaresistenz basierenden Selektionsprotokoll, wonach die infectious unit values/mL (IFU/mL) berechnet wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die adhärente HEK293T- und Vero-Zelllinie zur Etablierung stabiler Produktionszelllinien mit einer definierten Anzahl infektiöser lentiviraler Partikel pro Zielzelle (multiplicity of infection, MOI) transduziert. Die Wahl dieser beiden eukaryotischen Expressionszelllinen erfolgte, da sie PTM sowie Proteinprozessierungs- und Sekretionsmechanismen ermöglichen, die für die spätere diagnostische Anwendung des Zielproteins von Vorteil sein können. Durch Variation der MOI sollte die Wahrscheinlichkeit einer mehrfachen Integration des GOI in das Wirtsgenom und damit eine gesteigerte Expressionsrate des GOI erzielt werden.

3.2.1.3. Auswahl und Selektion von Expressionszelllinien

Die Selektion einer polyklonalen Zelllinie erfolgte über eine spezifische Antibiotikaresistenz im kleinen Maßstab (24-Well Zellkulturplatten). Nach Selektion mehrerer polyklonaler Zelllinien wurde deren Expressionsleistung anhand der Produktion von Rubella-VLPs in Zellkulturüberständen verglichen und nach dieser für die weitere Etablierung ausgewählt. Der Nachweis der Rubella-VLPs erfolgte mittels eines in-house entwickelten Fluoreszenz-Immunoassays (FLIA). Für nähere Informationen hierzu siehe Abschnitt Bead-basierter Fluoreszenz-Immunoassay (3.2.8.1). Die Verwendung eines definierten, kommerziell erhältlichen Rubella-Referenzantigens ermöglichte die Quantifizierung der VLPs im Zellkulturüberstand. Als Referenzantigen wurde im Rahmen der gesamten Arbeit ein natives Rubella-Antigen (Microbix) eingesetzt und als Rubella-Referenzantigen deklariert. Dieses wurde in Vero-Zellen hergestellt und über Crossflow-Filtration und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet. Anschließend wurde das native Antigen mittels UV-Strahlung inaktiviert.

Ergänzend zu FLIA wurden SDS-PAGE und Western Blot zur Charakterisierung der Rubella-VLPs eingesetzt. Beim Western Blot kam ein Mix aus drei monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern zum Einsatz, die spezifisch gegen die Rubella-Strukturproteine (Kapsidprotein, gpE1 und gpE2) gerichtet waren (Antibodies-Online). Ein konjugierter

anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma Aldrich) diente als Sekundärantikörper zum Nachweis der gebundenen Detektionsantikörper.

3.2.1.4. Single Cell Cloning

Zur Etablierung hoch exprimierender Zellklone wurde ein SCC mit zwei auf Grundlage von Vorexperimenten ausgewählten Zelllinien (HEK293T und Vero) durchgeführt. Für das SCC wurden je Zelllinie drei Inokulationsdichten (10, 20 und 40 Zellen/mL) in Kulturmedium (DMEM, 10% Fetales Kälberserum (FKS)) angesetzt, je 100 µL des Zellansatzes mit 100 µL frischem Medium in 96-Well-Platten pipettiert und über Verdünnung selektioniert. Für jede Zelldichte wurden zwei 96-Well-Platten eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 unter Antibiotika-Selektion. Ein tägliches mikroskopisches Überwachen über mehrere Tage ermöglichte die Etablierung potenzieller Einzelzellkulturen. Sobald die einzelnen Zellen zu kleinen Zellhaufen angewachsen sind, wurden diese trypsiniert und anschließend in 48-Well-Platten überführt. Durch fortlaufendes Passagieren wurden mehrere Zellklone parallel über Zwischenschritte bis in ein geeignetes Produktionsvolumen (25 cm² Zellkulturflaschen) kultiviert und mittels FLIA auf ihre Rubella-VLP-Expressionsrate untersucht. Zwei monoklonale HEK293T-Zelllinien – im Folgenden als HEK293T RUBV #G04 und HEK293T RUBV #F2 bezeichnet – mit der höchsten Rubella-VLP-Expressionsrate wurden anschließend an ein chemisch definiertes Medium (Capricorn) adaptiert und von adhärenter auf Suspensionskultur überführt. Hierzu wurde die FKS-Konzentration über mehrere Zellpassagen schrittweise von 10 % auf 0 % reduziert, während die Kultivierung in 125 mL Schüttelkolben erfolgte.

3.2.1.5. Zellkulturführung der Suspensionskultur

Die adaptierten Zelllinien wurden in Erlenmeyerkolben bei 37 °C, 5 % CO_2 und 150 rpm kultiviert. Das Animpfen erfolgte mit 0,3 × 10^6 vitalen Zellen/mL in Medium mit 8 mM L-Glutamin. Die Expression der Rubella-VLP-Gene wurde durch Zusatz von 200 ng/mL Doxycyclin induziert. Während der 336-stündigen Kultivierungsphase erfolgte eine tägliche Zugabe (außer am Wochenende) einer chemisch definierten Feed-Lösung sowie von 2 mM L-Glutamin. Zusätzlich wurde alle 48 Stunden Doxycyclin (200 ng/mL) supplementiert. Die Kultivierungsdauer wurde auf Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Experimente festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Produktausbeute erreicht wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für weitere

Experimente eine Kultivierungsdauer von mindestens 120 Stunden gewählt, um ausreichend hohe Zelldichten sowie Proteinexpressionsraten zu erzielen. Zur Prozessüberwachung wurden täglich Proben (außer am Wochenende) zur Bestimmung von Zellzahl, Zellvitalität und Rubella-VLP-Konzentration entnommen. Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität erfolgte gemäß unter 3.2.8.2 beschrieben. Nach Abschluss der Zellkultivierung wurden die entnommenen Proben hinsichtlich der Rubella-VLP-Konzentration mittels Rubella-FLIA analysiert (vgl. 3.2.8.1.2). Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse wurden ausgewählte Zelllinien bezüglich ihrer Eignung für nachfolgende Produktionsprozesse bewertet und für Screening Experimente zur Festlegung der Produktionszelllinie eingesetzt.

3.2.2. Upstream Processing: Optimierung der Prozessbedingungen

Ein besonderes Augenmerk der Prozessentwicklung lag auf der Optimierung der Kultivierungsbedingungen der Produktionszelllinie, mit dem Ziel, eine reproduzierbare und effiziente Herstellung von Rubella-VLPs auf hohem Produktionsniveau zu ermöglichen. Innerhalb der Experimente wurde die Kultivierungsdauer gezielt variiert, um den optimalen Erntezeitpunkt in Bezug auf die maximale Rubella-VLP-Ausbeute zu bestimmen.

3.2.2.1. Screening-Experimente und Zielgrößen

Die initialen Anpassungen ausgewählter Parameter erfolgten im Rahmen von Kultivierungsexperimenten in 500 mL-Erlenmeyerkolben unter definierten Bedingungen. Die standardisierte Inokulation erfolgte in chemisch definiertem Medium (Capricorn) mit 8 mM L-Glutamin (PAN Biotech) und 200 ng/mL Doxycyclin (neoFroxx). Im Rahmen der Screening-Experimente zur Etablierung einer Produktionszelllinie wurden folgende Zielgrößen definiert und zu festgelegten Zeitpunkten erfasst: Produktionsrate des Zielproteins, Zellvitalität sowie Zellwachstum. Als variierende Faktoren wurden die folgenden Parameter systematisch untersucht: Kultivierungsdauer, Zelldichte zum Start des Experiments, Zugabe einer chemisch definierten Feed-Lösung (Capricorn) sowie die Supplementierung von L-Glutamin in Abhängigkeit von Glukose- und Glutamin-Konzentrationen. Die eingesetzte kommerzielle Feed-Lösung ist speziell für die Kultivierung humaner Zellen formuliert, protein- und serumfrei, und enthält neben 40 g/L D-Glukose weitere Kohlenstoffquellen sowie vom Hersteller nicht näher spezifizierte Zusätze wie Vitamine und Aminosäuren.

Ziel der Zugabe war die Steigerung der Rubella-VLP-Ausbeute durch eine verbesserte Nährstoffversorgung der Suspensionskulturen.

3.2.2.2. Variation der Zelldichte bei Inokulation

In ersten Experimenten wurde die Startzelldichte als kritischer Parameter untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Kulturen mit $0{,}3 \times 10^6$, $0{,}5 \times 10^6$ und $0{,}75 \times 10^6$ vitalen Zellen/mL angeimpft und über 240 Stunden kultiviert. Die Probenanalyse zu definierten Zeitpunkten umfasste die festgelegten Zielgrößen. Das Zellkulturvolumen war in jedem Ansatz identisch.

3.2.2.3. Feeding-Strategie

Die initialen Optimierungsversuche der Prozessbedingungen konzentrierten sich auf die Zugabe einer chemisch definierten, protein- und serumfreien Nährstoff- (Feed) Lösung. Die Versuchsgestaltung orientierte sich zunächst an den vom Hersteller empfohlenen Applikationsrichtlinien. Im Fokus stand die Analyse des Einflusses der Feed-Zugabe auf die festgelegten Zielgrößen. Die prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung in Bezug auf das Zellkulturvolumen zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt wurde zunächst gemäß folgender Tabelle 5 durchgeführt. An Tagen der Feed-Zugabe wurde die Feed-Lösung zusätzlich 2 mM L-Glutamin supplementiert.

Tabelle 5: Definition der Zugabe der Feed-Lösung.

Definition der prozentualen Volumenzugabe der Feed-Lösung in Bezug auf das Zellkulturvolumen zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt. Ansatz 1: ohne Feed-Zugabe = -Feed, Ansatz 2: mit Feed-Zugabe = +Feed.

Kultivierungszeitpunkt [in Tagen]	Prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung [%]	
	-Feed	+Feed
0	0	0
1	0	0
2	0	3
3	0	4
4	0	6
5	0	10
6-Ende	0	10

Probenahmen erfolgten zu festgelegten Zeitpunkten während der Kultivierung. Zellvitalität und Zelldichte wurden unmittelbar analysiert, während die Zellkulturüberstände nach Zentrifugation zusätzlich bei –20 °C eingelagert wurden. Die Kultivierung wurde mit einer definierten Inokulationsdichte von $0{,}5 \times 10^6$ vitalen

Zellen/mL durchgeführt und über einen Zeitraum bis 408 Stunden betrieben. In den initialen Versuchsreihen zur Prozessoptimierung wurde der Einfluss der Feed-Lösung auf das Zellwachstum und die Zellvitalität untersucht. Die Rubella-VLP-Expression wurde nicht induziert, um den Einfluss der Feed-Lösung ohne Rubella-VLP-Produktion zu analysieren.

3.2.2.4. Medienanalyse und Anpassung der Feeding-Strategie

In weiteren Kultivierungsversuchen mit der HEK293T-Produktionszelllinie (HEK293T RUBV #F2) wurde basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche eine spezifische Feeding-Strategie entwickelt und etabliert, um die fortlaufende Prozessoptimierung zu unterstützen. Die Kultivierungen wurden mit einer Startzelldichte von 0,5 × 10^6 vitalen Zellen/mL in einem Arbeitsvolumen von 90 mL über einen Zeitraum von 312 Stunden durchgeführt. Zur erweiterten Prozesscharakterisierung wurden die Substrate und Metabolite Glukose, Glutamin, Ammonium, Glutamat und Laktat mithilfe eines Analysegeräts (4BioCore, 4BioCell GmbH & Co. KG) quantifiziert (vgl. 3.2.8.7). Die prozentuale Volumenzugabe der Supplementierung der Feed-Lösung sowie von L-Glutamin wurden entsprechend der Ergebnisse der Medienanalysen angepasst. Dabei wurden sich an den festgelegten Sollwerten für Glukose (4 g/L) und Glutamin (3 mM) orientiert.

Ziel war es, aus den ermittelten Daten Erkenntnisse zu gewinnen, die auf nachfolgende Kultivierungsansätze übertragbar sind, um schrittweise die optimalen Prozessbedingungen für die Produktion von Rubella-VLPs zu etablieren. Im Fokus der Prozessanalyse standen die festgelegten Zielgrößen sowie die Ergebnisse der Medienanalyse. Vorversuche zeigten, dass Rubella-VLPs nach der Expression aktiv in den Zellkulturüberstand sekretiert wurden. Die Ernte erfolgte daher durch Zentrifugation (115 xg, 5 Minuten, 20 °C) zur Abtrennung der Zellen. Die Rubella-VLP-Quantifizierung wurde mittels spezifischen Rubella-FLIA (vgl. 3.2.8.1, Abbildung 5 und Abbildung 6) durchgeführt.

3.2.2.5. Nutzung Zellkulturüberstände für Downstream Processing

Die im Rahmen der Bioprozessentwicklung erzeugten Zellkulturüberstände wurden für das DSP verwendet, unter anderem zur Etablierung und Optimierung der Rubella-VLP-Aufreinigung, zur Entwicklung geeigneter prozessanalytischer Verfahren sowie

zur Prüfung und Charakterisierung der diagnostischen Eignung der Rubella-VLPs für den Einsatz in der Humanserologie.

3.2.3. Downstream Processing

Die Entwicklung des DSP verfolgt das Ziel, ein reproduzierbares, zeit- und kosteneffizientes Herstellungsverfahren für Rubella-VLPs mit hoher Reinheit zu etablieren. Hierzu wurden zunächst die einzelnen Prozessschritte definiert, untersucht und hinsichtlich ihrer Effizienz und Eignung analysiert. Im Fokus steht die Entwicklung von Strategien und Methoden, die sowohl die Etablierung als auch die gezielte Optimierung des Gesamtprozesses ermöglichen. Im Verlauf der Prozessentwicklung sind entsprechende Maßnahmen zu identifizieren, zu implementieren und kontinuierlich zu evaluieren.

Die Entwicklung des DSP erfolgte parallel zur Etablierung des USP, da beide Prozessbereiche eng miteinander verknüpft sind und in ihrer Optimierung wechselseitig voneinander abhängen. Ein wesentlicher Bestandteil war die kontinuierliche Überwachung und Kontrolle der einzelnen Prozessschritte um die gewünschte Produktqualität und -ausbeute sicherzustellen. Hierfür wurden spezifische analytische Verfahren entwickelt und etabliert. Darauf wird später unter dem Punkt Prozessanalytische Verfahren näher eingegangen.

Vorbereitend auf die nachfolgend beschriebenen Strategien und Methoden zur Reinigung von Rubella-VLPs wurden die Überstände aus Zellkulturen der stabil exprimierenden Rubella-VLP-HEK293T-Zelllinie durch Zentrifugation mit 500 × g für 10 Minuten bei 4 °C gewonnen.

3.2.3.1. Antikörper-Affinitätschromatographie

Zur spezifischen Aufreinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen wurde eine antikörperbasierte Affinitätschromatographie entwickelt. Hierfür sollte ein monoklonaler Rubella-spezifischer Maus-Antikörper, der gegen ein natives Rubella-Virus-Antigen gerichtet ist, als Ligand verwendet werden. Das Chromatographieverfahren wurde zunächst im Kleinstmaßstab (vgl. Abbildung 2) entwickelt. Die methodische Vorgehensweise wird im Folgenden beschrieben.

3.2.3.1.1. Auswahl und Charakterisierung Rubella-spezifischer monoklonaler Antikörper

Im Rahmen der methodischen Etablierung wurde die Eignung dreier mAK (Mab1, Mab2 und Mab3) hinsichtlich ihrer spezifischen Bindung an Rubella-VLPs systematisch untersucht. Die Bewertung der Bindungsfähigkeit und Selektivität erfolgte zunächst auf Grundlage multiplexer Bindungsstudien unter Verwendung intern hergestellter magnetischer Beads (Virion\Serion). Die Immobilisierung der Antikörper an die Beads erfolgte über ein intern standardisiertes Kopplungs- und Aktivierungsprotokoll, das auf in-house Kopplungsreagenzien basiert. Zur Evaluierung der Bindungskapazität sowie der Zielprotein-Spezifität diente das bereits beschriebene Rubella-Referenzantigen. Ein zentrales Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten Antikörpers war neben der spezifischen Antigenbindung auch die Möglichkeit der möglichst vollständigen Elution des gebundenen Zielantigens unter milden Bedingungen, um die strukturellen und diagnostischen Eigenschaften der Rubella-VLPs nicht zu beeinträchtigen.

3.2.3.1.2. Screening potenzieller Elutionsbedingungen

Zu diesem Zweck wurde ein umfassendes Screening potenzieller Elutions-bedingungen durchgeführt. Folgende Bedingungen aus Tabelle 6 wurden untersucht.

Tabelle 6: Screening potenzieller Elutionsbedingungen für die Antikörper-Affinitätschromatographie.

Übersicht der eingesetzten Formulierungen für das Screening potenzieller Elutionsbedingungen für die Antikörper-Affinitätschromatographie. Puffer 24 wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Puffernummer	Pufferbezeichnung	Stoffmenge [Mol]	pH-Wert
1	Glycin-HCl	0,1	2,5
2	Glycin-HCl	0,1	3,0
3	Zitronensäure	0,1	3,0
4	Natriumcitrat	0,1	2,5
5	Natriumcitrat	0,1	3,0
6	Triethanolamin	0,1	11,5
7	Glycin-NaOH	0,1	10,0
8	Magnesiumchlorid	3,5	n.a.
9	Kaliumchlorid	3,0	n.a.
10	Kaliumchlorid	3,5	n.a.
11	Guanidin-HCl	2	n.a.
12	Guanidin-HCl	3	n.a.
13	Guanidin-HCl	4	n.a.
14	Guanidin-HCl	5	n.a.
15	Guanidin-HCl	6	n.a.
16	Harnstoff	2	n.a.

Puffernummer	Pufferbezeichnung	Stoffmenge [Mol]	pH-Wert
17	Harnstoff	3	n.a.
18	Harnstoff	4	n.a.
19	Harnstoff	5	n.a.
20	Harnstoff	6	n.a.
21	Harnstoff	7	n.a.
22	Harnstoff	8	n.a.
23	4 M Harnstoff Aviditätsreagenz aus SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG/IgM (Institut Virion\Serion GmbH)	n.a.	n.a.
24	PBS-TBN	n.a.	7,4

3.2.3.1.3. Funktionelle Bewertung der Elutionsbedingungen

Ziel der Untersuchungen war die Definition von Elutionsbedingungen, die eine effiziente Freisetzung des Zielantigens vom jeweiligen Antikörper (Mab1, Mab2, Mab3) ermöglichen, ohne deren funktionellen Eigenschaften, insbesondere deren Konformation, Stabilität und Bindungsfähigkeit, negativ zu beeinflussen.

Zur Beurteilung möglicher Einflüsse der Elutionspuffer auf die Antikörperstruktur und -funktion wurden zwei FLIA-Formate etabliert, die sich hinsichtlich des Zeitpunkts der Elutionspuffer-Inkubation unterschieden:

1. Post-Bindungs-Inkubation: Der Antikörper wurde zunächst mit dem Rubella-Referenzantigen inkubiert, anschließend erfolgte die Behandlung mit dem jeweiligen Elutionspuffer. Ziel der Untersuchung war die Analyse der Elutionseffizienz durch den Nachweis des gebundenen Referenzantigens nach Inkubation mit den jeweiligen Elutionsbedingungen. Grundlage für die Bewertung bildete hierbei die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals.
2. Prä-Bindungs-Inkubation: Der Antikörper wurde vor der Antigenzugabe mit dem Elutionspuffer inkubiert. Dieses Setup diente der Evaluierung potenziell negativer Effekte der Elutionsbedingungen auf die Antikörperfunktionalität. Auch hier diente der Nachweis des gebundenen Referenzantigens als Analysegrundlage.

Die Auswertung beider Ansätze erlaubt eine differenzierte Bewertung der Eignung einzelner Bedingungen für die Übertragung auf die chromatographische Aufreinigung und die spätere Anwendung im DSP. Die entsprechenden Versuchsdesigns sind in der nachfolgenden Abbildung 3 schematisch dargestellt.

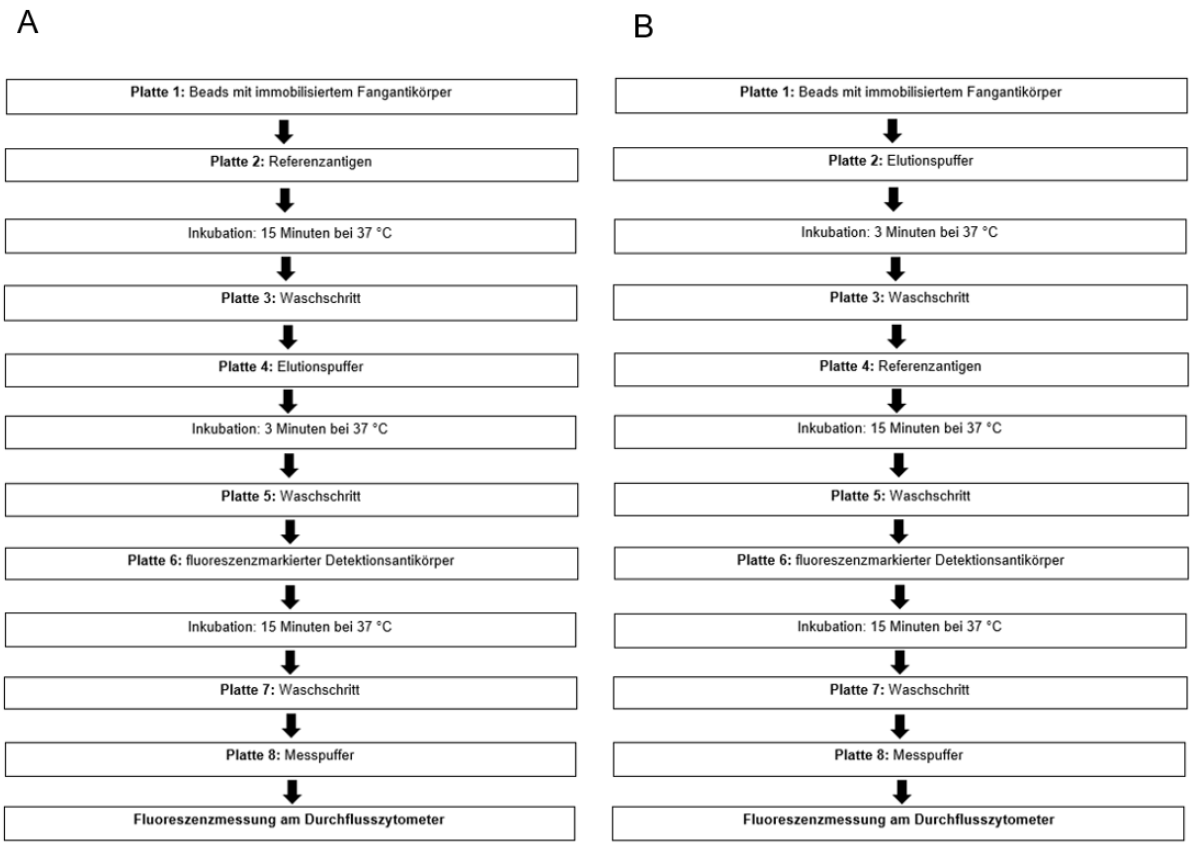


Abbildung 3: Schematische Darstellung der FLIA-Versuchdesigns.

Schematische Darstellung des FLIA-Versuchdesigns zur funktionalen Bewertung der Elutionsbedingungen für die antikörperbasierte Affinitätschromatographie. A: Post-Bindungs-Inkubation, B: Prä-Bindungs-Inkubation. Als Referenz diente das beschriebene Rubella-Referenzantigen. Beispielhafte Darstellung mit dreiminütiger Inkubation mit dem jeweiligen Elutionspuffer.

Ergänzend zur funktionellen Bewertung der Elutionsbedingungen wurde eine externe Bindungsstudie bei der 2bind GmbH (Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Ziel war die detaillierte Charakterisierung der Bindungseigenschaften der eingesetzten mAK (Mab1, Mab2 und Mab3) sowie die Auswahl eines geeigneten Antikörpers für die Etablierung der Antikörper-Affinitätschromatographie. Die Untersuchungen erfolgten mittels Grating-Coupled Interferometry (GCI) mit dem WAVE-System (Creoptix AG). Zum Zeitpunkt der Bindungsstudie lag bereits eine erste Testcharge der Rubella-VLPs vor. Diese wurden auf lipid-capture Chips immobilisiert und die Antikörper in gelöster Form injiziert. Die Analyse umfasste die Bestimmung folgender Affinitäts- und Kinetikparametern:

Die Assoziationsrate k_a (Einheit: $M^{-1}s^{-1}$) beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich Ligand und Analyten (z.B. Antikörper und Antigen) zu einem nicht-kovalenten Komplex binden. Sie spiegelt die Wahrscheinlichkeit wider, mit der beide Moleküle pro Zeiteinheit und Konzentrationseinheit aufeinandertreffen und eine Bindung eingehen.

Eine hohe Assoziationsrate weist auf eine schnelle und effiziente Bindung hin [95, 102].
Die Dissoziationsrate k_d (Einheit: s^{-1}) beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich der zuvor gebildete Komplex wieder in seine Einzelkomponenten auftrennt. Ein niedriger k_d-Wert weist auf eine stabile Bindung hin, während hohe Werte eine schnelle Dissoziation und damit eine geringere Bindungsstabilität anzeigen [126].
Die Affinitätskonstante K_D (Einheit: M) beschreibt die Bindungsaffinität eines Liganden zu seinem Analyten und ist definiert als Quotient der Dissoziations- und Assoziationsrate. Ein niedriger K_D-Wert steht für eine hohe Bindungsaffinität, während hohe K_D-Werte auf schwache Bindungsaffinitäten hinweisen [70].

3.2.3.1.4. Übertragbarkeit der Inkubationszeiten

Die Inkubationszeit mit dem Elutionspuffer im Rahmen des Rubella-Bead-Assays wurde in Bezug auf dessen Übertragbarkeit auf chromatographische Bedingungen analysiert. Ziel war es, vergleichbare Verweilzeiten zwischen Elutionspuffer und Antikörper-Antigen-Komplexen in beiden Systemen sicherzustellen, um valide Rückschlüsse für das spätere Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie ziehen zu können. Die Berechnung der Verweilzeit erfolgte auf Grundlage der linearen Flussgeschwindigkeit (in cm/h), wobei verschiedene Online-Tools von Cytiva verwendet wurden. Als Referenz diente eine kommerzielle 1 mL HiTrap™ N-hydroxysuccinimid (NHS) -activated HP Chromatographiesäule (Cytiva). Die im Bead-Assay gewählten Inkubationszeiten mit dem Elutionspuffer von 1, 3 und 8 Minuten entsprechen unter den gegebenen Bedingungen einem Elutionsschritt von 1, 3 und 8 Säulenvolumen (SV) - Bedingungen, die in der initialen Prozessentwicklung als praktikabel eingestuft wurden.

3.2.3.1.5. Auswahl der Chromatographiematrices und -bedingungen

Basierend auf den im FLIA-Format erzielten Ergebnissen wurden geeignete Elutionsbedingungen in Kombination mit einem bestimmten mAK für die Affinitätschromatographie unter Verwendung des nativen Rubella-Referenzantigens ausgewählt. Ziel war es, diese im Hinblick auf die Etablierung des DSP weiterführend zu evaluieren. Für die ersten chromatographischen Versuchsreihen kamen zwei kommerzielle 1 mL-Säulen zum Einsatz: „HiTrap™ NHS-activated HP“ und „GoBio Mini ACT“ (Bio-Works). Gemäß den jeweiligen Herstellerprotokollen

(Bedienungsanleitung 1 und 2) wurde der mAK Mab1 mit einer Kopplungskonzentration von 4 mg Antikörper pro mL Chromatographiematrix kovalent immobilisiert.

3.2.3.1.6. Durchführung der Ligandenimmobilisierung

Vor Beginn der Ligandenimmobilisierung wird die Chromatographiematrix mit den entsprechenden Kopplungspuffern äquilibriert, um definierte Ausgangsbedingungen für den Kopplungsvorgang sicherzustellen. Als Kopplungspuffer wurde in allen Fällen eine Pufferlösung bestehend aus 0,05 M HEPES und 0,15 M NaCl bei pH 8,0 eingesetzt. Für die GoBio Mini ACT-Säulen diente der Kopplungspuffer zugleich als Waschpuffer. Die Blockierung verbliebener reaktiver Gruppen erfolgte hier mittels 1 M Ethanolamin (pH 9,5). Bei der Verwendung der HiTrap™ NHS-activated HP-Säulen wurden zur Deaktivierung verbleibender aktiver N-Hydroxysuccinimid-Estergruppen sowie zur Entfernung unspezifisch gebundener Liganden mehrere abwechselnd aufeinanderfolgende Pufferschritte appliziert: zunächst 0,5 M Ethanolamin mit 0,5 M NaCl (pH 8,3), gefolgt von 0,1 M Natriumacetat mit 0,5 M NaCl (pH 4,0). Diese Schritte dienten der Vermeidung unspezifischer Reaktionen nach der Kopplung sowie zur Verbesserung der Ligandenspezifität. Die Effizienz der Antikörperkopplung an die Matrix wurde visuell mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 3.2.8.5).

3.2.3.1.7. Bedingungen der Antikörper-Affinitätschromatographie

Sofern nicht explizit erwähnt, erfolgten die Durchführungen nachstehender Chromatographieschritte bei einer Temperatur von +4 °C. Als Modellantigen diente zunächst das Rubella-Referenzantigen. In Anlehnung an die vorausgegangenen Bindungs- und Elutionsstudien aus 3.2.3.1.2 wurden zwei Elutionsbedingungen ausgewählt:

1. 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,5)
2. 0,1 M Triethanolamin (pH 11,5)

Für die initialen Versuchsreihen wurden 0,2 mg des Referenzantigens als Beladungsprobe eingesetzt. Nach dem Probenauftrag erfolgte ein Waschschritt über 5 SV, gefolgt von einer isokratischen Elution über 8 SV. Auftrag-, Wasch- und Elutionslösungen wurden fraktioniert gesammelt. Die Reinigung der Säulen (Cleaning in Place, CIP) erfolgte unter Einsatz von vier sequenziell applizierten Puffern nach jedem Chromatographielauf:

- 1,0 M Kaliumchlorid,

- 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,5),
- 0,1 M Triethanolamin (pH 11,5),
- 0,05 M HEPES; 0,15 M NaCl (pH 8,0).

Die lineare Flussgeschwindigkeit wurde bei allen Schritten auf 156 cm/h eingestellt. Die Chromatographieläufe wurden durch eine kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Darüber hinaus wurden alle Fraktionen mittels FLIA (vgl. 3.2.8.1.2) sowie SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) hinsichtlich Menge und Reinheit des Referenzantigens untersucht.

3.2.3.1.8. Antikörper-Affinitätschromatographie mit Zellkulturüberständen als Input

Im Anschluss wurde die etablierte affinitätschromatographische Methode auf ihre Eignung zur präparativen Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen geprüft. Die zu analysierenden Zellkulturüberstände stammten aus Experimenten zur Entwicklung und Etablierung des USP. Nach Probenauftrag sowie einem Waschschritt über 5 SV wurde eine Elution über 10 SV durchgeführt. Die im Rahmen der Antikörper-Affinitätschromatographie gewonnenen Fraktionen wurden einer weiterführenden Analyse mittels Rubella-FLIA (vgl. 3.2.8.1.2) sowie SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) unterzogen. Der Schwerpunkt der Auswertung lag hierbei auf dem Nachweis sowie der quantitativen Beurteilung der Rubella-VLPs in den Elutionsfraktionen, insbesondere in Bezug auf deren Reinheit (SDS-PAGE) und Ausbeute (Rubella-FLIA).

3.2.3.1.9. Auswahl und Evaluation geeigneter Chromatographiematrices

Basierend auf Ergebnissen von Vorversuchen (hier nicht explizit beschrieben) wurden für die weiterführende Entwicklung des DSP zwei Chromatographiematrices ausgewählt: „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“ sowie „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ (beide Cytiva). In den anschließenden Experimenten erfolgte das Packen einer Tricorn™ 5/50-Säule (Cytiva) mit den jeweiligen Chromatographiematrices mit 1 mL SV.

3.2.3.1.10. Strategien zur Ligandenimmobilisierung

Der Fokus der folgenden Untersuchungen lag auf der Evaluierung unterschiedlicher Ligandenimmobilisierungen. In diesem Kontext wurde der Einfluss der

Kopplungsstrategie auf die Säulen-Performance analysiert. Hierbei erfolgte eine Differenzierung zwischen:

- Batch-Kopplung: Immobilisierung des Antikörpers an die Chromatographiematrix vor dem Packen der Säule.
- In-Column-Kopplung: Immobilisierung des Antikörpers nach dem Säulenpack-prozess direkt im Säulenformat.

Die Untersuchungen mit der „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“ begannen mit dem direkten Vergleich dieser beiden Kopplungsstrategien. Daraus resultierten die folgenden Chromatographiesäulen:

- Säule 1-361: In-Column-Kopplung
- Säule 1-361_1: Batch-Kopplung

Die Kopplungsvorgänge erfolgten nach dem beschriebenen Prinzip sowie gemäß den Herstellerangaben. Zur Evaluierung der Immobilisierungseffizienz wurde eine SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) durchgeführt. Für die Prüfung der Reinigungseffizienz wurden Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen von HEK293T-Schüttelkulturen eingesetzt. Diese Überstände wurden vor der Chromatographie mittels Zentrifugation (≥ 4.000 × g, 30 Minuten, 4 °C) aufbereitet. Die Prozessparameter der Chromatographieläufe orientierten sich an den zuvor durchgeführten Anpassungen mit der 1 mL HiTrap™ NHS-activated HP-Säule (vgl. 3.2.3.1.9), welche ebenfalls mit dem mAK Mab1 beladen wurde. Der Probenauftrag erfolgte mit einer linearen Flussgeschwindigkeit von 16 cm/h, gefolgt von einem Waschschritt über 5 SV bei 156 cm/h und einer isokratischen Elution über 10 SV mit 156 cm/h. Die Bewertung der Reinigungsleistung für Rubella-VLPs erfolgte über die Analyse der einzelnen Fraktionen (Probenauftrag, Durchfluss, Waschfraktionen, Elutionsfraktionen) mittels Rubella-FLIA (vgl. 3.2.8.1.2) und SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5).

3.2.3.1.11. Evaluierung der Tricorn™ 5/50-Chromatographiesäulen

Für die nachfolgenden Versuchsreihen wurde die Chromatographiematrix „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ zum Packen einer Tricorn™ 5/50-Säule verwendet. Analog zu den vorangegangenen Experimenten aus 3.2.3.1.10 erfolgte eine In-Column-Kopplung des Rubella-spezifischen mAK Mab1 an die Chromato-graphiematrix. Die resultierende Antikörper-Affinitätssäule wurde als Säule 1-361_2 bezeichnet. Die Immobilisierungseffizienz des Antikörpers an die Matrix wurde erneut mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) kontrolliert.

Im Anschluss wurde die Funktionalität der Säule im Rahmen einer Antikörper-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen untersucht. Dabei wurden die aus vorherigen Experimenten gewonnenen Prozessparameter teilweise übernommen und gezielt angepasst. Der Probenauftrag erfolgte mit einer linearen Flussgeschwindigkeit von 31 cm/h, während die anschließenden Wasch- und Elutionsschritte mit 305 cm/h durchgeführt wurden. Als Ausgangsmaterial dienten, analog zu den vorangegangenen Experimenten, HEK293T-Zellkulturüberstände aus der Schüttelkultur.
Die im Rahmen dieser Versuchsreihen generierten Daten wurden mit den Ergebnissen der vorangegangenen Antikörper-Affinitätschromatographien mit der Chromatographiematrix „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“ (vgl. 3.2.3.1.9 und 3.2.3.1.10) verglichen. Ziel dieser Analyse ist die Auswahl der hinsichtlich Prozessleistung, Selektivität und Skalierbarkeit am besten geeigneten Chromatographiematrix für die weitere Prozessentwicklung.

3.2.4. Upscaling des Downstream Processing

Ein zentrales Ziel der Entwicklung des DSP bestand in der Skalierung und Anpassung des Verfahrens an das geplante USP mit einem Zellkulturvolumen von bis zu 40 L. Das Upscaling des DSP erfolgte analog zum in Abbildung 2 dargestellten Prozessschema.

3.2.4.1. Upscaling Downstream Processing mit 1-375 HiScale™ 16/20

Für das Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie wurde zunächst eine HiScale™ 16/20 Säule (Cytiva) verwendet. Die Säule wurde mit „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ gepackt, um eine Säulenbetthöhe von 10 cm zu erreichen. Das benötigte Matrixvolumen wurde mithilfe des Chromatography Conversion Calculators (Cytiva) ermittelt. Es wurden 24,1 mL settled Matrix eingesetzt. Der Begriff „settled Matrix“ bezeichnet das Volumen der Chromatographiematrix nach vollständiger Sedimentation der Partikel in der stationären Phase, ohne dass sich Flüssigkeit oder Luftzwischenräume zwischen den Partikeln befinden. In der Praxis wurde das settled Matrix Volumen durch langsames Absetzen der Matrix in einem Messzylinder bestimmt. Das finale Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographiesäule erfolgte mit einer HiScale™ 50/20-Säule (Cytiva) mit einer Säulenbetthöhe von 10 cm. Die detaillierte Umsetzung sowie die damit verbundenen

experimentellen Schritte werden in einem späteren Abschnitt (vgl. 3.2.4.4) beschrieben.

Die Immobilisierung des Rubella-spezifischen mAK Mab1 erfolgte im In-Column-Kopplungsformat unmittelbar nach dem Packen der Säule (vgl. 3.2.3.1.6). Für die Kopplung wurden 3 mg Antikörper pro mL settled Matrix eingesetzt. Die Effizienz der Ligandenimmobilisierung wurde mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. 3.2.8.5). Die resultierende Antikörper-Affinitätschromatographiesäule wurde als 1-375 bezeichnet. Diese wurde für die folgenden Schritte der Prozessentwicklung eingesetzt, um:

- die dynamische Bindekapazität (DBC) in Bezug auf Rubella-VLPs zu bestimmen,
- die finalen Prozessparameter (Flussgeschwindigkeiten bei Probenauftrag, Waschschritte, Elution sowie jeweilige Volumina) zu etablieren,
- sowie eine direkte Übertragbarkeit der Bedingungen auf weitere Upscaling-Prozesse sicherzustellen.

3.2.4.2. Anpassung Upscaling des Downstream Processing an Produktionssäule

In Vorbereitung auf das finale Upscaling der Affinitätschromatographie wurde die Prozessführung an die Verwendung einer HiScale™ 50/20-Säule als Produktionssäule angepasst. Dabei erfolgte die Definition der Prozessparameter unter Berücksichtigung der technischen Spezifikationen des verfügbaren Chromatographiesystems ÄKTA pure (Cytiva), insbesondere in Bezug auf die maximal einstellbaren Flussraten (125 mL/min). Die theoretische Auslegung orientierte sich an einer Ziel-Säulenbetthöhe von 10 cm, wodurch bei gleichbleibender linearer Flussgeschwindigkeit die Verweilzeit über verschiedene Säulenformate hinweg konstant bleibt. Dies erleichtert die Übertragbarkeit der Prozesse und sichert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beim Upscaling.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden die definierten Prozessparameter zunächst auf die HiScale™ 16/20-Säule, hier Säule 1-375, übertragen. Grundlage der Auslegung bildeten sowohl theoretische Berechnungen als auch die im Rahmen der Prozessentwicklung gewonnenen experimentellen Daten aus durchgeführten Chromatographieläufen aus 3.2.3.1.11. Die nachstehende Tabelle 7 zeigt die berechneten Parameter (lineare Flussgeschwindigkeit in cm/h, volumetrische Flussrate in mL/min, sowie Verweilzeit in Minuten) für die jeweils eingesetzten

Chromatographiesäulenformate: Tricorn™ 5/50, HiScale™ 16/20 und HiScale™ 50/20.

Die Berechnungen erfolgten auf Basis folgender Säulenabmessungen:

- Ziel-Säulenbetthöhe: Tricorn™ 5/50 = 5,7 cm; HiScale™ 16/20 und HiScale™ 50/20 = 10 cm
- Säulendurchmesser: Tricorn™ 5/50 = 5 mm; HiScale™ 16/20 = 16 mm; HiScale™ 50/20 = 50 mm

Tabelle 7: Prozessparameter für das Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie.

Übersicht der Prozessparameter für die entsprechenden Chromatographiesäulen, welche im Rahmen des Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie mit Bezug auf die einzustellende Flussgeschwindigkeit (F) in cm/h oder mL/min und die daraus resultierende Verweilzeit (T) in min eingesetzt wurden. Die Berechnungen basieren auf folgenden Höhen des jeweiligen Säulenbetts: Tricorn™ 5/50-Säule = 5,7 cm, HiScale™ 16/20-Säule = 10 cm, HiScale™ 50/20-Säule = 10 cm sowie folgenden Säulendurchmessern: Tricorn™ 5/50-Säule = 5 mm, HiScale™ 16/20-Säule = 16 mm, HiScale™ 50/20-Säule = 50 mm.

Prozess-schritt	**Tricorn™ 5/50-Säule**			**HiScale™ 16/20-Säule**			**HiScale™ 50/20-Säule**		
	F [cm/h]	F [mL/min]	T [min]	F [cm/h]	F mL/min]	T [min]	F [cm/h]	F [mL/min]	T [min]
Proben-auftrag	31	0,1	10,8	55	1,9	10,9	55	18	10,9
Waschen	305	1	1,1	305	10,2	2,0	305	100	2,0
Elution	305	1	1,1	305	10,2	2,0	305	100	2,0
CIP	305	1	1,1	305	10,2	2,0	305	100	2,0

Aufgrund der technischen Grenzen des eingesetzten Chromatographiesystems, dessen maximal einstellbare Flussrate 125 mL/min beträgt, wurde für die Auslegung ein Sicherheitsfaktor berücksichtigt. Die maximale Flussrate wurde daher auf 100 mL/min begrenzt. Dies führt bei größeren Säulenformaten (HiScale™ 16/20 und HiScale™ 50/20) im Vergleich zum Ausgangsformat (Tricorn™ 5/50) zu einer Verdopplung der Verweilzeit, was für die Prozessentwicklung akzeptiert wurde. Die ursprünglich berechneten Flussgeschwindigkeiten und Verweilzeiten der einzelnen Prozessschritte basierten auf einer Ziel-Säulenbetthöhe von 10 cm. Nach dem tatsächlichen Packvorgang der Chromatographiesäule 1-375 wurde jedoch eine effektive Säulenbetthöhe von 8 cm mit einem resultierenden Säulenvolumen von 16,1 mL bestimmt. Zur Gewährleistung reproduzierbarer Prozessbedingungen und einer korrekten Übertragung der linearen Flussgeschwindigkeit wurden alle relevanten Prozessparameter (lineare Flussgeschwindigkeit, volumetrischer Durchfluss und Verweilzeit) entsprechend der realen Säulengeometrie angepasst und neu berechnet. Diese Korrekturen sind essenziell für das Verständnis der nachfolgenden Upscaling-

Strategie und Prozessoptimierung und werden daher an dieser Stelle vorweggenommen.

Als Ausgangsmaterial für die Antikörper-Affinitätschromatographie wurde ein Zellkulturüberstand verwendet, der aus der Kultivierung der stabilen Rubella-VLP exprimierenden HEK293T-Zelllinie in Schüttelkolben gewonnen wurde. Dieser wurde über einen Zentrifugationsschritt bei ≥ 4.000 × g für 30 Minuten bei 4 °C geklärt. Der resultierende Überstand diente als Ausgangsmaterial für die Chromatographie.

3.2.4.3. Charakterisierung der Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20

Die initialen Prozessparameter für die Affinitätschromatographie wurden basierend auf der zuvor ermittelten Säulenbetthöhe (8 cm) und dem resultierenden Säulenvolumen (16,1 mL) für die Chromatographiesäule 1-375 festgelegt (vgl. 3.2.4.2). Hierbei wurden insbesondere die linearen Flussgeschwindigkeiten sowie die daraus resultierenden Verweilzeiten für die jeweiligen Prozessschritte berücksichtigt. Für den Probenauftrag wurde basierend auf den Vorversuchen (vgl. 3.2.3.1.11) eine Verweilzeit von ca. 11 Minuten eingestellt, während für die Wasch-, Elution- und Reinigungsschritte jeweils eine Verweilzeit von ca. 2 Minuten eingestellt wurde.

Zur schrittweisen Entwicklung und Etablierung der Affinitätschromatographie mit der Säule 1-375 wurden zunächst folgende Untersuchungsaspekte definiert:

- Festlegung der Prozesstemperatur: 4 °C vs. Raumtemperatur
- Variation der linearen Flussgeschwindigkeit während des Probenauftrags (bei konstanten Parametern der weiteren Prozessschritte)
- Bestimmung der DBC für Rubella-VLPs

3.2.4.3.1. Variation der Prozesstemperatur

Die Antikörper-Affinitätschromatographien wurden bei +4 °C sowie bei Raumtemperatur durchgeführt, um den Einfluss der Temperatur auf die Bindungs- und Elutionseigenschaften zwischen dem immobilisierten mAK und dem Zielprotein zu untersuchen. Hierfür wurden drei unterschiedliche lineare Flussraten beim Probenauftrag eingesetzt: 24 cm/h, 45 cm/h und 87 cm/h. Die nachfolgenden Wasch-, Elution- und Reinigungsschritte wurden in allen Versuchen mit konstanter Flussgeschwindigkeit (305 cm/h) durchgeführt. Diese Versuchsstrategie ermöglichte eine differenzierte Bewertung der Temperaturabhängigkeit der Affinitätsbindung in Abhängigkeit von der Kontaktzeit zwischen Probe und stationärer Phase bei definierter

Verweilzeit. Als Bewertungsparameter diente die Fläche des Absorptionssignals bei 280 nm während der Elution. Für den direkten Vergleich der beiden Temperaturbedingungen wurde jeweils derselbe Zellkulturüberstand als Ausgangsmaterial verwendet.

3.2.4.3.2. Variation der linearen Flussgeschwindigkeiten bei Probenauftrag

Für die weitere Prozessoptimierung wurden die Erkenntnisse aus den beschriebenen Entwicklungsschritten berücksichtigt. Die lineare Flussgeschwindigkeit des Probenauftrags wurde in vier Stufen variiert, während die übrigen Prozessschritte konstant gehalten wurden. Die jeweilige Verweilzeit wurde rechnerisch aus der Säulenbetthöhe und dem Volumenstrom ermittelt (siehe Tabelle 8). Der Probenauftrag sowie dessen Volumen blieben bei allen Versuchen unverändert. Als Bewertungsparameter diente erneut die Peakfläche des Elutionssignals bei 280 nm.

Tabelle 8: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit des Probenauftrags mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20.

Prozessoptimierung der Affinitätschromatographie mit Säule 1-375 HiScale™ 16/20. Variation der linearen Flussgeschwindigkeit [cm/h] des Probenauftrags. Berechnung jeweiliger Verweilzeit aus Säulenbetthöhe und Volumenstrom mittels des Chromatography conversion calculators (Cytiva).

Lineare Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag [cm/h]	Verweilzeit [min]
45	10,7
87	5,5
170	2,8
239	2,0

3.2.4.3.3. Bestimmung der dynamischen Bindekapazität

Zur finalen Charakterisierung der Chromatographiesäule 1-375 wurde die DBC für Rubella-VLPs bestimmt. Dabei kamen die zuvor etablierten Prozessbedingungen der Affinitätschromatographie zur Anwendung (aus 3.2.4.3.1 und 3.2.4.3.2). Zunächst wurde die Konzentration der Rubella-VLPs im geklärten Zellkulturüberstand aus der Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie mittels des spezifischen Rubella-FLIA (vgl. 3.2.8.1.2) quantifiziert. Basierend auf dieser Quantifizierung sowie auf Erkenntnisse von Vorversuchen (nicht dargestellt) zur maximalen Bindekapazität der eingesetzten Chromatographiematrix wurde das erforderliche Probenvolumen so berechnet, dass die zu applizierende Menge an Rubella-VLPs dem etwa doppelten Wert der geschätzten DBC entsprach. Ziel war es, die maximale Bindekapazität der

Säule gezielt zu überschreiten, um im Durchfluss (FT) die ersten Anzeichen eines Proteindurchbruchs (Breakthrough) nachzuweisen. Während des Probenauftrags wurden die FT-Fraktionen volumendefiniert gesammelt und anschließend mittels Rubella-FLIA ihre Konzentration bestimmt. Die DBC wurde durch die Ermittlung des Zeitpunkts bestimmt, an dem 10 % der Rubella-VLP-Konzentration im FT im Verhältnis zur Konzentration im Probenauftrag detektiert wurden (DBC_{10}). Das bis zu diesem Zeitpunkt aufgetragene Probenvolumen wurde zur Berechnung der gebundenen Proteinmenge herangezogen. Die aus der DBC_{10} ermittelte Proteinmenge diente als Grundlage zur Festlegung der künftig im Prozess einzusetzenden Beladungsmenge. Um Produktverluste im FT zu minimieren, wurde die Beladungsmenge auf 80 % der experimentell bestimmten DBC_{10} festgelegt.

Für jeden Chromatographielauf ist daher im Vorfeld eine standardisierte Quantifizierung der Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand mittels Rubella-FLIA erforderlich, um das Probenvolumen entsprechend anpassen zu können.

3.2.4.4. Upscaling Downstream Processing mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20

Um eine effiziente Reinigung der Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen bei gleichzeitig reduzierter Anzahl an Chromatographieläufen zu ermöglichen, wurde die HiScale™ 50/20 Säule als finale Produktionssäule ausgewählt. Analog zum Vorgehen bei der bereits etablierten Säule 1-375 (vgl. 3.2.4.1) wurde die Säule mit NHS-Activated Sepharose™ High Performance Matrix gepackt und als 1-387 bezeichnet. Um die angestrebte Säulenbetthöhe von 10 cm zu erzielen, wurde diese mit 235,6 mL settled Matrix befüllt, wobei das Packvolumen mithilfe des Cytiva Chromatography Conversion Calculators ermittelt wurde. Das Packen erfolgte nach dem Protokoll der Säule 1-375 (vgl. 3.2.4.1).

Die In-Column-Kopplung des mAK Mab1 an die NHS-aktivierte Matrix erfolgte direkt im Anschluss an das Säulenpacken. Pro Milliliter settled Matrix wurden 3 mg Antikörper eingesetzt. Die Kopplung wurde gemäß Herstellerangaben sowie unter Anwendung der im Rahmen der Vorarbeiten optimierten Bedingungen zur Effizienzsteigerung durchgeführt (vgl. 3.2.3.1.10). Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz wurden sowohl die Antikörperlösung als auch das Material nach der Kopplungsreaktion mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) sowie einem anti-Maus-IgG-spezifischen FLIA (vgl. 3.2.8.1.3) analysiert. Für die Probenahme wurde die Säule mit 1 SV Waschpuffer gespült und

der FT aufgefangen. Die Kopplungseffizienz wurde über den Anteil des nicht-immobilisierten Antikörpers im FT berechnet.
Nach dem Packen wurden eine Säulenbetthöhe von 9,3 cm und ein Säulenvolumen von 178,1 mL bestimmt.

3.2.4.4.1. Charakterisierung der Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20

Um die Übertragbarkeit der mit Säule 1-375 etablierten Parameter auf die Produktionssäule 1-387 zu prüfen, wurden zunächst alle relevanten Prozessparameter – lineare Flussgeschwindigkeit, volumetrischer Durchfluss und Verweilzeit – anhand der neuen Säulengeometrie berechnet. Zur Optimierung der Bindung und der Elution der Rubella-VLPs wurden unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten des Probenauftrags evaluiert. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die verwendeten Prozessparameter.

Tabelle 9: Prozessparameter der Antikörper-Affinitätschromatographie mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20.

Prozessparameter der Antikörper-Affinitätschromatographie mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20. Darstellung der Prozessdauer [SV], der linearen Flussgeschwindigkeit [cm/h], der volumetrischen Flussgeschwindigkeit [mL/min] und der Verweilzeit [min]. Berechnung der Verweilzeiten aus Säulenbetthöhe und Volumenstrom mittels Chromatography Conversion Calculators (Cytiva). CIP mit Reinigung 1: 1 M Kaliumchlorid; Reinigung 2: 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5; Reinigung 3: 0,1 M Triethanolamin pH 11,5; Reinigung 4: 1x NTE.

Prozessschritt	Prozessdauer [SV]	Lineare Flussgeschwindigkeit [cm/h]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]	Verweilzeit je SV [min]
Äquilibrierung	3	240	78,5	2,3
Probenauftrag	n.a.	44	14,4	12,7
	n.a.	87	28,5	6,4
	n.a.	130	42,7	4,3
	n.a.	174	56,9	3,2
Waschen	4	240	78,5	2,3
Elution	3	240	78,5	2,3
Äquilibrierung	2	240	78,5	2,3
Reinigung 1	3	240	78,5	2,3
Reinigung 2	3	240	78,5	2,3
Reinigung 3	3	240	78,5	2,3
Reinigung 4	3	240	78,5	2,3

Für die Chromatographieläufe wurde der geklärte Zellkulturüberstand aus dem 10 L Bioreaktorlauf B072 verwendet (Zentrifugation: 4.000 × g, 30 min, 4 °C). Die Fraktionierung des Elutionsschrittes erfolgte über die Funktion "Peak Fractionation", gesteuert durch die UV-Absorption bei 280 nm (Start: 60 mAU, Ende: 40 mAU).

Separat aufgefangen wurden der FT des Probenauftrags sowie die Waschfraktionen. Alle Fraktionen wurden mittels Rubella-FLIA analysiert.
Die DBC_{10} wurde analog zum Vorgehen bei der Säule 1-375 bestimmt.

3.2.5. Screening von Puffer- und Lagerbedingungen der Rubella Virus-like Particles

Im Anschluss an die Aufreinigung der Rubella-VLPs mittels Chromatographie wurde ein systematisches Screening verschiedener Lagerpufferbedingungen durchgeführt. Ziel war die Etablierung eines Puffersystems, das die strukturelle Stabilität der Rubella-VLPs während der Langzeitlagerung gewährleistet. Hierzu wurden die aufgereinigten VLPs zunächst einem Dialyseprozess unterzogen, um die Pufferumgebung kontrolliert zu verändern. Für die Dialyse wurden die gesammelten Elutionsfraktionen aus der Chromatographie in ausgewählte Lagerbedingungen (vgl. Tabelle 19) überführt. Die Dialyse erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 4 bis 16 Stunden Dauer bei einem Volumenverhältnis von Probe zu Puffer von ≥ 1:50 mit einem Pur-A-Lyzer™ Mega 3500 Dialyse-Kit (Sigma Aldrich) mit einem Molecular-Weight-Cut-Off (MWCO) von 3,5 kDa. Im Anschluss an die Dialyse wurden ausgewählte Proben konzentriert. Die Zielkonzentration der Proteine lag im Bereich von 0,5 bis 2,0 mg/mL, da diese für den Einsatz in diagnostischen Testsystemen als praktikabel eingestuft wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Reagenzes mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard (vgl. 3.2.8.6).
Das Screening umfasste Puffer mit pH-Werten im Bereich von 2,5 bis 10 sowie unterschiedliche Pufferzusammensetzungen, um eine möglichst breite Varianz physikochemischer Bedingungen abzudecken. Eine Übersicht aller getesteten Pufferformulierungen ist in Tabelle 19 im Anhang dargestellt.
Zur Bewertung der Stabilität der Rubella-VLPs wurde die Messmethode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) mittels Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) eingesetzt (vgl. 3.2.8.3). Die DLS-Messungen ermöglichten die Detektion von Aggregaten sowie die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Rubella-VLPs. Die Anwesenheit von Proteinaggregaten sowie die Homogenität der vorhandenen Partikelpopulationen wurden als zentrale Kriterien für eine eingeschränkte Stabilität herangezogen. Für ausgewählte Lagerbedingungen wurde zusätzlich das Zeta-Potenzial der Rubella-VLPs bestimmt, um den isoelektrischen

Punkt einzugrenzen und damit ein weiteres Kriterium zur Auswahl geeigneter Puffer zu erhalten. Diese Information ist besonders für die Dialyse der Elutionsfraktionen aus der Affinitätschromatographie von Bedeutung, da in diesem Prozessschritt stark saure oder basische pH-Bedingungen vorliegen können. Ein während der Dialyse auftretender pH-Shift in den Bereich des isoelektrischen Punktes kann zu irreversiblen Aggregationen der Rubella-VLPs führen und muss daher vermieden werden.

Basierend auf den Ergebnissen des Formulierungsscreenings wurde ein ausgewählter Lagerpuffer einer internen Langzeitlagerungsstudie mit verschiedenen Bedingungen unterzogen. Die Lagerung erfolgte bei definierten Temperaturen (+4 °C, -20 °C und -80 °C) und über unterschiedliche Zeiträume (1–56 Tage). Die Langzeitlagerung erfolgte gemäß interner SOPs, welche eine 56-tägige Lagerung als beschleunigte bzw. verkürzte Langzeitlagerungsstudie definieren und eine Abschätzung der Stabilität der Antigene über verlängerte Lagerungszeiträume ermöglichen. Zusätzlich wurden Auftau- und Einfrierzyklen (bis zu 10 Zyklen) integriert. Neben der kontinuierlichen Überwachung der physikochemischen Stabilität mittels DLS wurde die diagnostische Eignung des Zielproteins für den Einsatz in der Humanserologie mit Abschluss der Lagerversuche durch FLIA (vgl. Abbildung 7) evaluiert. Diese diagnostische Charakterisierung basierte auf der spezifischen Interaktion der Rubella-VLPs mit Rubella-spezifischen humanen-IgG- und IgM-Antikörpern. Hierfür wurden sieben interne IgM-Rubella-Seren (Ru1-Ru7) verwendet, von denen vier als schwach bis stark IgM-positiv (Ru1-Ru4) und drei als IgM-negativ (Ru5-Ru7) intern mittels ELISA vorbewertet waren. Alle eingesetzten Seren wiesen zudem eine variierende positive Bewertung für Rubella-spezifische IgG-Antikörper auf. Diese Versuche dienten der Überprüfung, ob ein Qualitätsverlust auftritt, wenn das Antigen unter den vorgeschriebenen Lagerbedingungen gelagert wird. Aufgrund der zu einem späteren Zeitpunkt vorgesehenen diagnostischen Charakterisierung der Rubella-VLPs mit einer größeren Anzahl an Humanseren (vgl. 3.2.9) sowie aus Kapazitätsgründen wurde in dieser Studie ein verkleinertes, intern etabliertes Serenpanel verwendet, das routinemäßig für derartige Analysen eingesetzt wird.

Detaillierte Informationen zu den eingesetzten Analysemethoden sind in den Abschnitten Prozessanalytische Verfahren (3.2.8) und Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie (3.2.9) dargestellt.

3.2.6. Finalisierung des Downstream Processing

Die nachgeschalteten Aufarbeitungsschritte wurden dem Produktionsmaßstab angepasst. Die Konzentration und Diafiltration erfolgten mithilfe eines Sartoflow® Smart TFF-Systems (Sartorius) und einer Sartocon® Slice 200 PES Kassette (0,02 m² Membranfläche, 300 kDa MWCO, Sartorius). Der Testpool wurde zunächst dreifach konzentriert, anschließend erfolgte ein Pufferaustausch gegen die über DLS definierte Lagerbedingung mittels Diafiltration (vgl. 3.2.5) mit einem Diafiltrationsfaktor von ≥ 10. Abschließend wurde das Retentat auf das technisch mögliche Minimalvolumen von ca. 50 mL konzentriert. Die Konzentration der Rubella-VLPs sollte anschließend zwischen 0,5 und 2,0 mg/mL liegen.

Die finale Produktcharakterisierung umfasste:

- Proteinquantifizierung mit Bradford-Assay (vgl. 3.2.8.6),
- Reinheitsprüfung mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5),
- DLS-Messung zur Bestimmung der Partikelgröße und Aggregationsneigung (vgl. 3.2.8.3).

Auf Grundlage der durchgeführten Analysen wurde eine Testcharge der Rubella-VLPs ausgewählt. Darauf aufbauend konnte ein vollständiger Bioprozess zur Herstellung und Aufarbeitung des Zielproteins entwickelt, skaliert, optimiert und etabliert werden.

3.2.7. Upscaling des Upstream Processing

Im Rahmen der Bioprozessentwicklung wurde der Fokus auf die biotechnologische Herstellung von Rubella-VLPs gelegt. Hierbei erfolgte eine schrittweise Skalierung der Zellkultur von Schüttelkolben bis hin zur Kultivierung in einem Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von bis zu 40 L. Die Prozessentwicklung umfasste dabei den Aufbau, die Optimierung und die Übertragung des Kultivierungsverfahrens auf die erweiterten Produktionsdimensionen. In Abwägung zwischen Batch-, Fed-Batch- und kontinuierlichen Verfahren wurde hinsichtlich der Zellkulturführung in Schüttelkolben ein Fed-Batch-Prozess als Zielbetrieb festgelegt.

3.2.7.1. Etablierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor

Die Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie erfolgte in BioBLU® Single-Use-Bioreaktoren (BioBLU® 1c, 10c oder 50c; Eppendorf), die über BioFlo® 320-Steuereinheiten (Eppendorf) betrieben wurden. Abbildung 4 zeigt exemplarisch eine Kultivierung im 40 L-Produktionsmaßstab unter Einsatz eines BioBLU® 50c Single-

Use-Bioreaktors. Zum Zeitpunkt der Aufnahme befand sich der Prozess im Erntevorgang über den am Reaktor angeschlossenen Ernteschlauch, der in eine externe Pumpe eingespannt und in eine Sicherheitswerkbank geführt wurde. Aufgrund der räumlichen Distanz zwischen Bioreaktor und Sicherheitswerkbank liegen die Pumpe, die Sicherheitswerkbank sowie die an der Deckelplatte angeschlossenen Basenflasche außerhalb des sichtbaren Bildausschnitts. Auf der Rückseite der Steuereinheit befinden sich die Anschlüsse für den Rührwerksmotor, das Begasungssystem sowie die Schnittstellen für Sonden und Sensoren, die für die Prozessführung und -überwachung erforderlich sind.

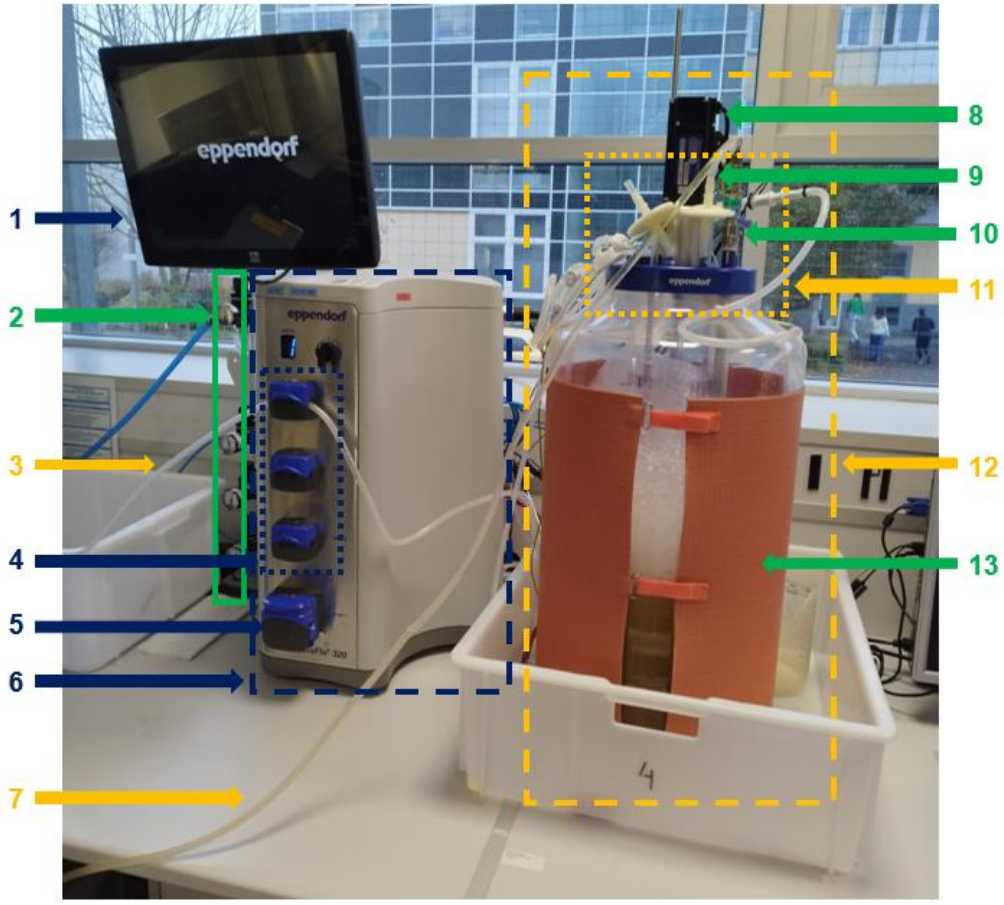


Abbildung 4: BioFlo® 320-Steuereinheit mit BioBLU® 50c Single-Use-Bioreaktor.

Darstellung der Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie im Bioreaktor. Beispielhaft wird hier die Kultivierung im 40 L Produktionsmaßstab visualisiert. Zum Zeitpunkt der Aufnahme wurde die Zellkultur mithilfe einer externen Pumpe geerntet. Blau: Steuereinheit, orange: Bioreaktor, grün: Zubehör. 1: Touchscreen zur Steuerung; 2: Druckturm für die Steuerung von Druckluft, O_2, CO_2 und N_2; 3: Schlauch für Korrekturmittelflasche; 4: Pumpen 1-3 für Korrekturmittel; 5: Erntepumpe; 6: Gehäuse der Steuereinheit; 7: Ernteschlauch; 8: Rührwerksmotor; 9: Zugangsschlauch für Begasung; 10: DO- und pH-Sonde; 11: Deckelplatte des BioBLU® 50c Single-Use-Bioreaktor mit Ports für Sonden und Schläuche; 12: BioBLU® 50c Single-Use-Bioreaktor; 13: Heizmanschette.

Die Steuereinheiten regelten automatisiert die vorgegebenen Sollwerte für pH-Wert, gelöste Sauerstoffkonzentration (DO), Rührerdrehzahl und Kultivierungstemperatur.

Zudem erfolgte die gesteuerte Begasung über einen Sparger mit Druckluft, Sauerstoff und CO_2 über die 3-Gas-Mix-Funktion. Die Geometrien von Rührern und Spargern waren durch die verwendeten Single-Use-Bioreaktoren fest vorgegeben und konnten prozessseitig nicht adaptiert werden. Die Messwerte für pH, DO und Temperatur wurden kontinuierlich mittels entsprechender Sonden erfasst, welche vor Einsatz gemäß Herstellerangaben kalibriert und in der Deckelplatte des Bioreaktors platziert wurden. Zur pH-Regulierung diente eine 0,6 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung als Base, während CO_2 als Säurequelle entsprechend dem Puffersystem des verwendeten Mediums genutzt wurde.

Für Inokulation, Feeding und Ernte wurden sterile Anschlüsse durch Verschweißen der benötigten Schläuche an die vorgesehenen Ports der Deckelplatte des Bioreaktors hergestellt (mittels BioWelder® Total Containment, Sartorius). Die Basenflasche wurde über die in der Deckelplatte vorinstallierten Schlauchverbindungen mit dem Bioreaktor verbunden. Die Zugabe der Base erfolgte automatisiert über eine der Pumpen der Steuereinheit und wurde entsprechend des eingestellten Soll-pH-Wertes geregelt. Vor Prozessstart wurde der Bioreaktor mit dem maßstabsentsprechenden Volumen an Zellkulturmedium und definierten Supplementen befüllt und die Prozessparameter eingestellt. Die Inokulation erfolgte mit einer definierten Zelldichte aus Vorkulturen, die in Schüttelkolben kultiviert und durch Zentrifugation (115 × g, 5 min, 20 °C) gewonnen wurden. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in den Bioreaktor überführt. Die Prozessführung und alle vorbereitenden Maßnahmen zum Start der Kultivierung wurden unabhängig von der Skalierung der eingesetzten Single-Use-Bioreaktoren nach dem standardisierten Schema umgesetzt.

Es erfolgte eine tägliche sterile Probenahme zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität. Die Proben wurden nach der Analyse bei 500 × g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand bei –20 °C für weitere Analysen eingefroren. Neben der Zellanalytik wurden zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt die Konzentration der Rubella-VLPs im Überstand mittels Rubella-FLIA quantifiziert (vgl. 3.2.8.1.2) sowie die Substrat- und Metabolitkonzentrationen (Glukose, Glutamin, Glutamat, Ammonium, Laktat) mit dem 4BioCore Analyser bestimmt (vgl. 3.2.8.7).

Die Ernte erfolgte durch das Abpumpen der Kultur über den Harvest-Port. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend durch Zentrifugation (≥ 115 × g, ≥ 10 min, 4 °C) von den Zellen separiert und für das DSP bereitgestellt.

3.2.7.2. Feeding-Strategie im Bioreaktor

Aufbauend auf den Ergebnissen vorheriger Schüttelkulturexperimente (vgl. 3.2.2.3 und 3.2.2.4) wurde eine Feeding-Strategie in Kombination mit einer gezielten Supplementierung von Feed-Lösung und L-Glutamin entwickelt und zunächst in den Bioreaktor übertragen. Dabei wurden die aus der Schüttelkultur abgeleiteten prozentualen Zugabemengen der Feed-Lösung entsprechend dem jeweiligen Zellkulturvolumen sowie die L-Glutamin-Supplementierung implementiert. Analog zum Vorgehen in der Schüttelkultur (vgl. 3.2.2.4) wurde im weiteren Verlauf der Prozessentwicklung eine angepasste Feeding Strategie für den Bioreaktor etabliert. Diese umfasste die gezielte Zugabe von Feed-Lösung und L-Glutamin unter Einhaltung definierter Sollwerte für Glukose (4 g/L) und Glutamin (3 mM), basierend auf den Ergebnissen der täglichen Medienanalyse (vgl. 3.2.8.7).

3.2.7.3. Statistische Versuchsplanung

Zur systematischen Prozessentwicklung und -optimierung wurde die Methode der statistischen Versuchsplanung DoE (vgl. 3.2.10.7) eingeführt. Diese ermöglichte eine strukturierte Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente im 1 L-Maßstab. Ziel war die erfolgreiche Übertragung der Kultivierung der HEK293T-Zelllinie von der Schüttelkultur in den Bioreaktor (Scale-over). Für die Experimente wurden BioBLU® 1c Einweg-Bioreaktoren verwendet. Die Versuchsanlage sowie die statistische Auswertung erfolgten mit den Analysewerkzeugen von DATAtab, numiqo Team 2025 (vgl. 3.2.10).

3.2.7.3.1. Kooperation

Die Etablierung des 1 L-Bioreaktorprozesses zur Herstellung von Rubella-VLPs erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau M. Cina im Rahmen ihrer Masterarbeit „Optimierung des Produktionsprozesses von rekombinanten virusähnlichen Partikeln (VLPs) in eukaryotischen Zellen“ [71]. Dabei wurden über ein Screening relevante Prozessparameter zur optimalen Übertragung von der Schüttelkultur in den Bioreaktor untersucht. Der Fokus lag hierbei auf den Zielgrößen Zellvitalität und Zellwachstum. Auf diese Versuchsreihen wird hier nicht eingegangen. Weitere Anpassungen der Kultivierungsstrategie im Bioreaktor sowie die Optimierung der Expressions-bedingungen von Rubella-VLPs erfolgten im Anschluss im Rahmen dieses Promotionsvorhabens.

3.2.7.3.2. Screening der Bioreaktorprozessparameter über Design of Experiments

Für die vier Versuchsreihen zur Optimierung der Feeding-Strategie, Supplementierung sowie ausgewählter Prozessparameter wurde eine Kultivierungsdauer von 312 Stunden basierend auf Vorversuchen mit der Schüttelkultur (vgl. 3.2.2.4) festgelegt. Die Kultivierung der Produktionszelllinie erfolgte im Bioreaktormaßstab unter Verwendung von BioBLU® 1c Single-Use-Bioreaktoren. Die Sollwerte für pH (7,2 ± 0,1) und Kultivierungstemperatur (37 °C) wurden konstant gehalten. Der angegebene pH-Wert mit dem Zusatz „±“ definiert den Toleranzbereich, in dem die pH-Regelung der Steuereinheit inaktiv bleibt und keine automatische Basen- oder Säurezugabe erfolgt. Die eingestellten Sollwerte basierten auf Ergebnissen der Kooperations-Vorversuche aus 3.2.7.3.1. Die Probenahme erfolgte täglich, außer am Wochenende. Dabei wurden zu jedem Kultivierungszeitpunkt die Zellzahl und Zellvitalität bestimmt. Zusätzlich erfolgte die beschriebene Medienanalyse (vgl. 3.2.2.3) und eine Quantifizierung der Rubella-VLP-Konzentration im Zellkulturüberstand (vgl. 3.2.8.1.2).

In einer weiteren statistischen Versuchsplanung wurden die nachstehenden Faktoren mit je zwei Ausprägungen untersucht:

- Inokulationsdichte (niedrig = –1 entsprechend 0,4 × 10^6 vitale Zellen/mL; hoch = +1 entsprechend 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL)
- Zusammenspiel von DO und Rührerdrehzahl (niedrig = –1 entsprechend 50 % DO, 100 rpm; hoch = +1 entsprechend 40 % DO, 150 rpm)

Daraus ergab sich folgender Versuchsplan in Tabelle 10.

Tabelle 10: Vollfaktorielle Versuchsplanung weiterer Anpassungen im Bioreaktorprozess.

Vollfaktorielle Versuchsplanung zur weiteren Anpassungen im Bioreaktorprozess mit Fokus auf der Zielgröße Steigerung der Expressionsrate des Zielproteins. Es wurden die Faktoren Inokulationsdichte (-1 entsprechend 0,4 × 10^6 vitale Zellen/mL; +1 entsprechend 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL) und das Zusammenspiel aus DO-Wert und Rührerdrehzahl (-1 entsprechend 50 % DO, 100 rpm; +1 entsprechend 40 % DO, 150 rpm) mit je zwei Ausprägungen (niedrig = -1 und hoch = +1) betrachtet. Versuchsplanung mit numiqo Team (2025), DATAtab erstellt.

Versuch	Inokulationsdichte	DO-Wert / Rührerdrehzahl
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1

Der Versuchsplan zielte primär auf die Maximierung der Rubella-VLP-Konzentration im Zellkulturüberstand zum Erntezeitpunkt und demnach auf die Steigerung der Rubella-VLP-Produktivität ab.

3.2.7.4. Weitere Anpassungen der Prozessführung im Bioreaktor

Nach einem weiteren Screening der Prozessparameter für die Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie im Bioreaktormaßstab zur Maximierung der Rubella-VLP-Ausbeute mittels DoE wurden die ermittelten Bedingungen aus 3.2.7.3.2 in die nachfolgende Versuchsreihe übertragen. Zusätzlich wurde eine erneute Variation des Faktors pH-Wert untersucht. Die Kultivierung erfolgte in einem BioBLU® 1c Single-Use-Bioreaktor über einen Zeitraum von 456 Stunden. Der pH-Wert wurde über die Regulation der CO_2-Konzentration auf pH 7,1 ± 0,2 eingestellt. Probenahme, Feeding-Strategie sowie Analytik entsprachen den zuvor beschriebenen Versuchsreihen (vgl. 3.2.7.1 und 3.2.7.2). Anhand dieser Versuchsreihe (B075) wurde der optimale Erntezeitpunkt der Rubella-VLPs im Bioreaktorprozess über die Quantifizierung der VLPs im Zellkulturüberstand zu den jeweiligen Kultivierungszeitpunkten definiert. In einem weiteren Experiment (B074) wurde untersucht, welchen Einfluss eine kontinuierliche CO_2-Zufuhr von anteilig 1 % an zugeführten Gasen ohne aktive pH-Regelung auf das Zellwachstum, die Zellvitalität und die Rubella-VLP-Produktivität ausübt. Dieser Ansatz dienste als Referenz zu den Bedingungen der Schüttelkultur, in der eine permanente Begasung mit 5 % CO_2 erfolgte, jedoch ausschließlich über eine Oberflächenbegasung im Inkubator.

3.2.7.5. Upscaling des Bioreaktorprozesses

Nach erfolgreicher Etablierung des Bioreaktorprozesses im 1 L Maßstab wurden die ermittelten Prozessbedingungen aus 3.2.7.3.2 und 3.2.7.4 schrittweise in den 10 L- (BioBLU® 10c) sowie anschließend in den 40 L- (BioBLU® 50c) Maßstab überführt. Zur Etablierung des Bioreaktorprozesses in den 10 L-Maßstab wurden insgesamt drei Scale-up-Versuchsreihen durchgeführt. Die im Verlauf der einzelnen Bioreaktorläufe gewonnenen Erkenntnisse wurden jeweils zur Optimierung der nachfolgenden Prozessläufe herangezogen. In diesem Zusammenhang wurden die Begasungsraten erhöht, der Soll-pH-Wert stufenweise abgesenkt und der pH-Wert-Toleranzbereich erweitert. Hintergrund dieser Anpassungen war der zuvor beobachtete erhöhte Basenverbrauch sowie die Erkenntnis, dass eine pH-Absenkung weder das

Zellwachstum noch die Zellvitalität beeinträchtigte. Vielmehr führte sie zu einer Steigerung der Rubella-VLP-Produktivität. Der Erntezeitpunkt der Zellkulturüberstände wurde bei allen Bioreaktorläufen basierend auf den Versuchen aus 3.2.7.4 auf eine Kultivierungsdauer von etwa 312 Stunden festgelegt. Während der Kultivierungen erfolgten Probenahmen der Zellkultur zu definierten Zeitpunkten. Die Proben wurden anschließend hinsichtlich der drei Zielgrößen Zellwachstum, Zellvitalität und Rubella-VLP-Quantität im Zellkulturüberstand analysiert, analog zu den in den vorherigen Bioreaktorversuchen beschriebenen Methoden. Zudem erfolgte eine Medienanalyse wie unter 3.2.8.7 beschrieben. Die wichtigsten für die jeweiligen Kultivierungsprozesse definierten Parameter sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Prozessparameter 10 L-Bioreaktorläufe.

Übersicht der Prozessparameter der durchgeführten Bioreaktorläufe (B071, B072 und B091) für die Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie in den 10 L-Bioreaktormaßstab zur Herstellung von Rubella-VLPs.

Prozessparameter	**Bioreaktorlauf**		
	B071	**B072**	**B091**
Temperatur [°C]	37	37	37
pH-Wert	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,2	7,05 ± 0,20
DO-Wert [%]	40	40	40
Rührerdrehzahl [rpm]	150	120	120
Begasungsrate [SLPM]	0,04 – 1,00	0,4 – 7,5	0,4 – 7,5
Inokulationsdichte [× 10^6 vitale Zellen/mL]	0,8	0,8	0,8

Nach Auswertung der im 10 L-Maßstab durchgeführten Bioreaktorläufe mit Schwerpunkt auf der Ausbeute des Zielproteins wurden die Prozessparameter des Bioreaktorlaufs mit der höchsten Produktivität in den 40 L-Maßstab übertragen. Dieser stellt im Institut Virion\Serion GmbH den größtmöglichen verfügbaren Maßstab für einen industriellen Bioreaktorprozesses dar. Probenahme, Feeding-Strategie und Analytik wurden analog zu den in den 10 L-Maßstab etablierten Prozessen durchgeführt. Die im 40 L-Maßstab definierten Prozessparameter sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Prozessparameter 40 L-Bioreaktorlauf.

Übersicht der Prozessparameter des Bioreaktorlaufs B092 für die Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie im 40 L-Bioreaktormaßstab zur Herstellung von Rubella-VLPs.

Prozessparameter	Bioreaktorlauf B092
Temperatur [°C]	37
pH-Wert	7,05 ± 0,20
DO-Wert [%]	40
Rührerdrehzahl [rpm]	120
Begasungsrate [SLPM]	1,8 – 7,5
Inokulationsdichte [× 10^6 vitale Zellen/mL]	0,8

3.2.8. Prozessanalytische Verfahren

Im Folgenden werden die in-house entwickelten diagnostischen Assays sowie die für die weiterführende Prozessanalytik eingesetzten Systeme detailliert beschrieben. Neben der quantitativen Bestimmung der Rubella-VLP-Konzentrationen wurden ergänzende Analyseverfahren etabliert, die eine Beurteilung der Funktionalität sowie der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften der hergestellten Rubella-VLPs ermöglichen.

3.2.8.1. Bead-basierter Fluoreszenz-Immunoassay

Der am Institut Virion\Serion GmbH, Bereich Bioanalytics, entwickelte FLIA dient dem spezifischen Nachweis und der quantitativen Bestimmung von Zielproteinen. Das Verfahren basiert auf der Verwendung magnetischer Partikel (Beads, Virion\Serion) als feste Phase, an deren Oberfläche Fängermoleküle (z.B. Antikörper oder Antigene) kovalent immobilisiert werden. Während der Assaydurchführung werden die beschichteten Partikel mit dem Probenmaterial (z.B. humanes Serum oder Zellkulturüberstände) inkubiert, sodass spezifische Analyten (z.B. Antikörper oder Antigene) an die Fängermoleküle binden können. In einem nachfolgenden Inkubationsschritt werden gebundene Analyten über fluoreszenzmarkierte Detektionsantikörper nachgewiesen, die spezifisch an den Analyten binden. Die Detektion erfolgt mittels Durchflusszytometrie, wobei die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals als Maß für die Konzentration des jeweiligen Analyten diente. Der Einsatz magnetischer Partikel ermöglichte eine effiziente Trennung gebundener und ungebundener Komponenten während der Assaydurchführung.

Für die Datenerfassung am Durchflusszytometer wurden die Gates und Stoppbedingungen an die jeweilige Partikelpopulation angepasst, sodass pro Probe

mindestens 100 Ereignisse ausgewertet wurden. Die Identifizierung der Partikel erfolgte anhand ihrer Streueigenschaften (Forward Scatter, FSC) sowie ihres Eigenfluoreszenzsignals. Die Datenerhebung und Vorverarbeitung wurden mit der Software CytExpert 2.6. (Beckman Coulter) durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Templates erstellt, die eine standardisierte Messung und automatisierte Datenauswertung auf Basis der vordefinierten Gates ermöglichten. Die aus den Rohdaten extrahierte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde anschließend in Microsoft Excel und in GraphPad Prism (GraphPad Software) statistisch weiterverarbeitet.

Zur absoluten Quantifizierung wurde ein Standard mit bekannter Konzentration verwendet. Eine Verdünnungsreihe (n = 3 je Konzentrationsstufe) diente der Erstellung der Kalibrationskurve. Für jede Konzentration wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Bei der Erstellung der Standardreihe wurde als Qualitätskriterium festgelegt, dass die SD für jede Konzentrationsstufe < 5 % des Mittelwertes liegen musste.

Die Kalibrationskurve wurde mithilfe eines fünfparametrischen logistischen Fits (5PL-Fit) modelliert, der eine asymmetrische sigmoidale Beziehung zwischen Konzentration (x-Achse) und Signalintensität (y-Achse) beschreibt. Die Berechnung erfolgte mit GraphPad Prism nach folgender Gleichung:

$$y = D + \frac{A-D}{[1+\left(\frac{x}{C}\right)^{B}]^{E}} \qquad (1)$$

wobei

A = obere Asymptote (maximaler y-Wert bei höchster Konzentration)

B = Hill-Slope (Steigung)

C (EC50) = Inflektionspunkt (Konzentration, bei 50 % des maximalen Signals)

D = untere Asymptote (minimaler y-Wert, Hintergrundsignal)

E = Asymmetrieparameter.

Über die invertierte 5PL-Gleichung wurden die Konzentrationen unbekannter Proben durch Interpolation der gemessenen MFI-Werte berechnet. Zur Validierung der Kalibrationskurve wurde ein Backfit der Standardreihe durchgeführt, wobei die berechneten Konzentrationen mit den Sollwerten verglichen wurden. Die daraus abgeleitete Unsicherheitsfortpflanzung diente der Bestimmung des akzeptablen Messbereichs. Abweichungen zwischen Ist- und Sollwerten von bis zu 10 % wurden akzeptiert, während ein idealer linearer Bereich mit einer relativen Unsicherheit < 5 %

definiert wurde. Die Standardreihe wurde bei jeder Messung in Dreifachbestimmung mitgeführt.

Prozess- und zeitpunktunabhängige Proben wurden aus Zellkulturen und definierten Schritten des DSP entnommen. Nach der Abtrennung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation (500 xg, 5 Minuten, 20 °C) wurden die Überstände bis zur weiteren Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Proben unbekannter Konzentration wurden in Abhängigkeit vom erwarteten Signal vorab in DILB-Puffer (Virion\Serion) verdünnt, um innerhalb des definierten linearen Messbereichs zu liegen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Detektionsantikörper waren mit R-Phycoerythrin (R-PE) konjugiert. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 561 nm durch den gelben Laser, die Emission wurde mittels eines 585/42 nm-Bandpassfilters detektiert und in MFI ausgegeben. Das verwendete Durchflusszytometer (CytoFLEX S, Beckman Coulter) erfasste MFI-Werte im Bereich von 10^0 und 10^7.

3.2.8.1.1. Grundprinzipien des Assays

Der Ablauf des Assays gliedert sich in die folgenden Schritte:

1. Vorlage der Beads: Bereitstellung magnetischer Partikel mit kovalent immobilisierten Fängermolekül (hier: Rubella-spezifischer Antikörper).
2. Bindungsschritt: Bindung der im Probenmaterial enthaltenen Analyten (hier: Rubella-VLPs) über das immobilisierte Fängermolekül.
3. Waschschritt: Entfernung ungebundener Probenbestandteile.
4. Detektionsschritt: Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Detektions-antikörper, der spezifisch an den Analyten bindet.
5. Waschschritt: Entfernung ungebundener Detektionsantikörper.
6. Messung: Erfassung des Fluoreszenzsignals mittels Durchflusszytometrie.

Eine schematische Darstellung zeigt den Aufbau des Assays (Abbildung 5), während Abbildung 6 den Ablauf der Durchführung visualisiert.

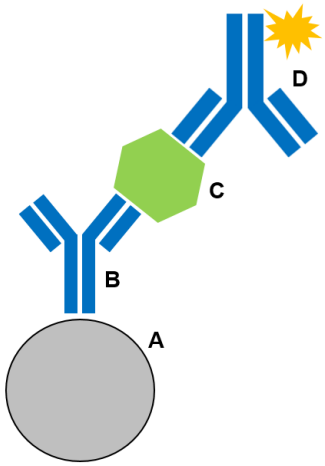


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Rubella-FLIA.

Schematische Darstellung des Aufbaus des Bead-basierten FLIA zum Nachweis und zur Quantifizierung von Rubella-VLPs. A: Magnetische Partikel (Beads), B: kovalent immobilisiertes Fängermolekül (hier: Rubella-spezifischer Antikörper), C: Analyt (hier: Rubella-VLPs), D: fluoreszenzmarkierter Detektionsantikörper.

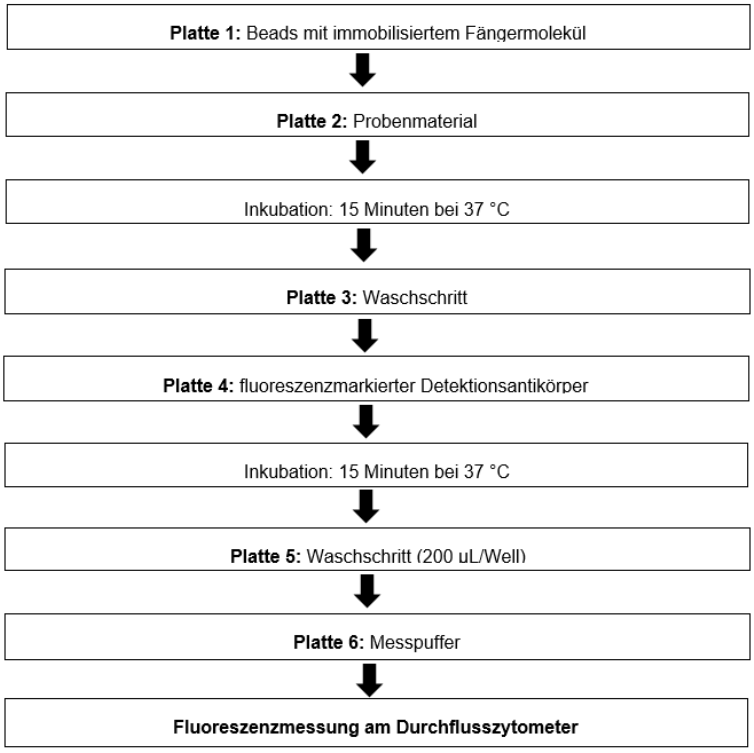


Abbildung 6: Schematischer Ablauf des Rubella-FLIA.

Schematische Darstellung des Ablaufs der Durchführung des Bead-basierten FLIA zum Nachweis und zur Quantifizierung von Rubella-VLPs. Automatisierte Abarbeitung des FLIA mittels KingFisher Flex. Vorlage der jeweiligen Komponenten in Mikrotiterplatten (Platten 1–6).

Für die automatisierte Durchführung des FLIA werden die erforderlichen Reagenzien und Pufferlösungen gemäß der in Abbildung 6 dargestellter Prozessabfolge in Mikrotiterplatten (Platten 1–6) vorgelegt. Der KingFisher Flex (Thermo Scientific) wird zur automatisierten Handhabung der magnetischen Partikel eingesetzt, einschließlich

des Transfers zwischen den einzelnen Mikrotiterplatten. Als Waschpuffer kommt SERION ELISA classic WASH (Virion\Serion) in der definierten Arbeitsverdünnung zum Einsatz. Für die Messung des Fluoreszenzsignals am Durchflusszytometer wird PBS-TBN (pH 7,4) als Messpuffer verwendet.

3.2.8.1.2. Quantifizierung von Rubella Virus-like Particles

Für die Entwicklung des Rubella-FLIA zur Quantifizierung von Rubella-VLPs wurde ein Rubella-spezifischer mAK (Mab1) kovalent an magnetische Partikel immobilisiert. Als Detektionsantikörper diente derselbe mAK, der mit R-PE konjugiert war. Zu Beginn der Assay Etablierung wurde das native Rubella-Referenzantigen verwendet, dessen bekannte Konzentration die Erstellung einer Standardreihe zur Quantifizierung ermöglichte. Im weiteren Entwicklungsverlauf wurde diese Referenz durch eigens hergestellte rekombinante Rubella-VLPs ersetzt, deren Konzentration zuvor mittels Bradford-Assay (vgl. 3.2.8.6) bestimmt worden war. Die Standardreihe umfasste vierzehn Messpunkte im Konzentrationsbereich von 0 - 100 µg/mL (0 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 50,0 µg/mL; 100,0 µg/mL). Der lineare Messbereich wurde auf 0,2-5 µg/mL bestimmt, wobei die relative kombinierte Unsicherheit unter 5 % lag. Die Auswertung der Daten erfolgte gemäß Abschnitt 3.2.8.1.

3.2.8.1.3. Quantifizierung von monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern

Der Maus-IgG-FLIA wurde entwickelt, um die Kopplungseffizienz des Rubella-spezifischen monoklonalen Maus-IgG-Antikörpers an die Chromatographiematrix im Rahmen der Etablierung der Antikörper-Affinitätschromatographie zu bewerten. Hierzu wurde der Anteil des monoklonalen Antikörpers sowohl vor als auch nach der Kopplung quantifiziert.

Die Grundlage des Assays bildeten Esel-anti-Maus-IgG-Antikörper (Jackson Immuno Research), die sowohl als Fängermolekül auf magnetischen Partikeln immobilisiert als auch als Detektionsantikörper eingesetzt wurden. Der Detektionsantikörper war mit R-PE konjugiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardreihe des Rubella-spezifischen monoklonalen Maus-IgG-Antikörpers mit zehn Messpunkten im Konzentrationsbereich von 0 - 16,384 µg/mL (0 µg/mL; 0,00025 µg/mL; 0,001 µg/mL; 0,004 µg/mL; 0,016 µg/mL; 0,064 µg/mL; 0,256 µg/mL; 1,024 µg/mL; 4,096 µg/mL;

16,384 µg/mL). Der lineare Arbeitsbereich mit einer relativen Unsicherheit unter 5 % lag zwischen 0,004-1,024 µg/mL. Die Auswertung der Daten erfolgte gemäß Abschnitt 3.2.8.1.

3.2.8.2. Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität [%] (Quotient aus Lebend- und Gesamtzellzahl multipliziert mit 100) erfolgte mithilfe eines automatisierten Zellzählgeräts (EVE™, NanoEnTek Inc.). Zur Lebend-Tot-Differenzierung wurde Nigrosin (Thermo Scientific) als Farbstoff eingesetzt. Das Verfahren basiert auf der selektiven Anfärbung nicht-vitaler Zellen durch Nigrosin, welches aufgrund intakter Zellmembranen von lebenden Zellen ausgeschlossen wird [112].
Für die Analyse wurden 1 mL der Zellkulturprobe entnommen und im Verhältnis 1:1 (v/v) mit einer 1 mg/mL Nigrosin-Lösung vermischt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung direkt im Zellzählgerät unter Verwendung der gerätespezifischen Objektträger. Das System ermittelte automatisch die Gesamtzellzahl, die Konzentration lebender und toter Zellen sowie die Zellvitalität in Prozent. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert als Grundlage für die weitere Auswertung herangezogen. Eine Zellvitalität von ≥ 85 % wurde als Voraussetzung für den Start der Kultivierung definiert. Die vom Hersteller angegebene Messgenauigkeit des Zellzählgeräts beträgt ±10 %. Lag die gemessene Zellkonzentration außerhalb des spezifizierten Messbereichs (1×10^4 - 1×10^7 Zellen/mL), wurde die Probe vor dem Versetzen mit Nigrosin mit PBS (1:2 - 1:10) verdünnt. Der jeweilige Verdünnungsfaktor wurde anschließend bei der Berechnung der Zellzahl berücksichtigt.

3.2.8.3. Dynamische Lichtstreuung

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers (im Folgenden auch als Partikelgröße bezeichnet) der hergestellten Rubella-VLPs wurden DLS-Messungen mit einem Zetasizer Ultra in Kombination mit der Analysesoftware ZS XPLORER (Malvern Panalytical) durchgeführt. Die Messungen dienten der Ermittlung der Partikelgrößenverteilung sowie der Bewertung der kolloidalen Stabilität, Homogenität und des Aggregationsverhaltens der Rubella-VLPs in den jeweiligen Puffersystemen. Die Messparameter wurden jeweils an die spezifischen Pufferbedingungen angepasst.

Für jede Probe wurde eine SIZE-Messung in n = 3 oder n = 5 technischen Replikaten durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Beurteilung der thermischen Stabilität der Rubella-VLPs erfolgten zusätzliche Messungen in einem Temperaturbereich von 25-70 °C in 5 °C-Schritten. Diese Analysen ermöglichten die Bewertung des Aggregations- und Stabilitätsverhaltens der Rubella-VLPs unter definierten Bedingungen.
Die Datendarstellung erfolgte als volumenbasierte Größenverteilung (y-Achse: Volumenanteil, x-Achse: Partikelgröße), da diese Darstellungsform die tatsächliche Partikelpopulation und Homogenität besser widerspiegelt als eine intensitätsbasierte Darstellung. Über die Softwarefunktion „Peak Mean by Volume nm)“ wurde die Partikelgröße der jeweiligen Populationen ermittelt. Über die Funktion „Peak Area by volume (%)“ wurde die Fläche unter den jeweiligen Peaks (Populationen) bestimmt. Dieser Parameter wurde als Maß für die Reinheit der Rubella-VLP-Charge sowie die Homogenität der vorhandenen Partikelpopulationen herangezogen. Im Rahmen der Stabilitätsstudien wurde die Stabilität der Rubella-VLPs anhand der Veränderung des Parameters „Peak Area by volume (%)“ bewertet. Eine konstante Peakfläche deutete auf ein stabiles Partikelverhalten hin, während eine Abnahme der relativen Peakfläche oder das Auftreten zusätzlicher Peaks auf Aggregationen oder strukturelle Instabilitäten schließen ließ.
Zur ergänzenden Bewertung der Homogenität wurde der Polydispersitätsindex (PDI) über die Analysesoftware bestimmt. Der PDI ist eine dimensionslose Kenngröße, die aus der Kumulantenanalyse der Autokorrelationsfunktion berechnet wird und die Breite der Größenverteilung beschreibt. PDI-Werte bei DLS-Messungen liegen zwischen 0-1, wobei ein Wert von 0 einem vollständig monodispersen System entspricht. Werte < 0,05 werden typischerweise bei hochmonodispersen Standards beobachtet, Werte zwischen 0,1-0,7 deuten auf nahezu monodisperse Proben hin, während Werte > 0,7 auf polydisperse Systeme mit breiter Größenverteilung und damit auf Aggregations- oder Oligomerisierungserscheinungen hinweisen [18, 111].

3.2.8.4. Transmissionselektronenmikroskopie

Zur strukturellen Charakterisierung und morphologischen Beurteilung der hergestellten Rubella-VLPs wurden Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen angefertigt. Ziel war es, die Partikelgröße und Form der Rubella-VLPs zu bewerten. Die Analysen wurden am Lehrstuhl Biocenter/Theodor-Boveri-Institut,

Imaging Core Facility der Universität Würzburg durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte gemäß dem Standardprotokoll der Imaging Core Facility durch Fachpersonal. Die Proben wurden nicht fixiert und mit 0,5 % Uranylacetat als Negativkontrastmittel behandelt. Die TEM-Aufnahmen wurden unter Verwendung eines Transmissions-elektronenmikroskops (JEOL, JEM-2100) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV erstellt. Zur Bildaufnahme kamen die Kamerasysteme TVIPS F416 (4k × 4k) und Olympus Veleta (2k × 2k) zum Einsatz.

3.2.8.5. SDS-PAGE-Analyse

Die Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Prinzip von Laemmli. Dabei werden Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung aufgrund ihrer Größe separiert. Durch Erhitzen der Proben in Gegenwart des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine denaturiert. SDS bindet an hydrophobe Bereiche und überlagert die intrinsische Ladung der Proteine durch seine negativ geladene Sulfatgruppe, wodurch ein gleichmäßiges Ladungs-zu-Masse-Verhältnis entsteht. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in Abhängigkeit ihrer Größe von der Kathode zur Anode, wobei kleinere Proteine schneller migrieren [57, 119].

Für die Analysen wurden kommerzielle Polyacrylamidgele (4-20 % Tris-Glycin, Anamed Elektrophorese) und ein in-house formulierter sechsfach SDS-Probenpuffer verwendet. Die Proben wurden zur vollständigen Denaturierung für 5 Minuten bei 100 °C im Heizblock aufgekocht. Als molekularer Größenstandard (Marker) diente der PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). Die Elektrophorese wurde in zwei Phasen durchgeführt: zunächst bei 120 Volt für 15 Minuten, gefolgt von 180 Volt für 60 Minuten. Nach der Laufzeit erfolgte die Färbung der Gele für 60 Minuten mit einer in-house Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung. Zur Entfernung des Hintergrunds wurde eine in-house Entfärbelösung eingesetzt, bestehend aus 15 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure. Die Proteinbanden wurden anschließend visuell mit dem bloßen Auge anhand der Bandenintensität beurteilt.

Zur Einschätzung der Reinheit einer Rubella-VLP-Probe wurde die Intensität der Zielproteinbanden (gpE1, gpE2, Kapsidprotein) im Verhältnis zur Summe aller sichtbaren Proteinbanden innerhalb derselben Probe bewertet.

Die Effizienz der Ligandenimmobilisierung an die Chromatographiematrix im Rahmen des DSP wurde qualitativ über den Vergleich der Bandenintensität der Antikörperlösung vor und nach der Immobilisierung bewertet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Probe nach der Immobilisierung in einem entsprechend höheren (x-fachen) Volumen im Verhältnis zur Ausgangsprobe aufgetragen. Für die Antikörperlösung vor der Immobilisierung wurde eine definierte Proteinmenge eingesetzt. Eine Abnahme der Bandenintensität in der Probe nach der Immobilisierung wurde als Hinweis auf eine erfolgreiche kovalente Kopplung des Antikörpers an die Chromatographiematrix interpretiert.

3.2.8.6. Bradford Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Standard Assay Methode unter Verwendung des Bio-Rad Proteinreagenzes. Als Referenzstandard diente BSA. Sowohl für die Herstellung der BSA-Kalibrierkurve als auch für die Probenverdünnungen wurde derselbe Puffer verwendet, in dem das zu bestimmende Protein vorlag, um Matrixeffekte zu vermeiden.

Für jede Messreihe wurden eine interne BSA-Kalibrierlösung (2 mg/mL) sowie eine BSA-Validierungslösung (0,5 mg/mL) eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte in Doppelbestimmung über eine BSA-Verdünnungsreihe im Bereich von 0-1,25 mg/mL. Die zu untersuchenden Proben wurden standardmäßig unverdünnt sowie in 2-, 4-, 8- und 16-facher Verdünnung analysiert.

Die Absorptionsmessungen wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm am Spektrophotometer (GENESYS 10S, Fisher Scientific) durchgeführt. Der Autozero wurde mit Reinstwasser vorgenommen. Die Datenauswertung erfolgte durch Erstellung einer Kalibrierkurve, wobei die gemessenen Extinktionswerte (OD_{595nm}, y-Achse) gegen die entsprechenden BSA-Konzentrationen (mg/mL, x-Achse) aufgetragen wurden. Die lineare Regression wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration der unbekannten Proben verwendet, wobei die jeweilige Vorverdünnung berücksichtigt wurde. In die Regression wurden ausschließlich OD-Werte innerhalb des linearen Bereichs einbezogen. Die Kalibrierung wurde nur akzeptiert, wenn das Bestimmtheitsmaß (R^2) mindestens 0,96 betrug, andernfalls wurde sie wiederholt.

Zur Validierung der Kalibrierung wurde der berechnete Proteingehalt der BSA-Validierungslösung überprüft. Die ermittelte Konzentration durfte maximal ±15 % vom

theoretischen Sollwert von 0,5 mg/mL abweichen. Bei Überschreitung dieser Abweichung wurde die gesamte Messreihe einschließlich der Kalibrierung erneut durchgeführt.

3.2.8.7. Medienanalyse

Die Analysen der Zellkulturüberstände wurden mit dem 4BioCore Analyzer (4BioCell) durchgeführt. Das Gerät ist ein photometrisches Benchtop-System mit gekühlten Reagenzien- und Probenkarussell, automatischer Barcode-Identifikation der Reagenzien sowie Einwegküvetten für die Messung und integrierter Vorverdünnung der Proben. Prozess- und zeitpunktunabhängige Proben wurden aus den Zellkulturen entnommen. Nach Zentrifugation (500 xg, 5 Minuten, 20 °C) zur Entfernung zellulärer Bestandteile wurden die Überstände auf Eis gehalten und innerhalb einer Stunde analysiert oder bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Für die Medienanalyse wurden die Konzentrationen der Substrate und Metabolite Glukose, Glutamin, Glutamat, Laktat und Ammonium bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch mit validierten enzymatisch-katalysierten Assay-Kits des Herstellers (4BioCell) quantifiziert. Dabei wurden die Konzentrationen über die Extinktionsänderung, die proportional zur Analytkonzentration ist, ermittelt. Zur Kalibrierung wurden herstellerspezifische Standards eingesetzt. Je nach Assay kam ein kinetisches Verfahren (zeitaufgelöste Extinktionsänderung) oder eine Endpunktbestimmung (Messung nach Reaktionsstopp) zur Anwendung. Die lineare Kalibrierung wurde automatisch durch die Gerätesoftware berechnet und blieb für den vom Hersteller definierten Zeitraum gültig. Die Assay-Kits gewährleisten eine Messpräzision mit einem CV von < 10% über mehrere Tage ohne Re-Kalibrierung. Jede Messreihe enthielt Kontrollmessungen. Das Ergebnis wurde akzeptiert, wenn diese innerhalb des Akzeptanzbereichs von ± 10 % SD der Sollwerte lagen. Die Messergebnisse wurden automatisch in Konzentrationen umgerechnet und als Excel- oder PDF-Datei exportiert. Die quantitativen Messbereiche betrugen:

- Glukose: 0,04-4 g/L
- Glutamin: 0,5-10,2 mmol/L
- Glutamat: 0,015-1,5 g/L
- Laktat: 0,04-5,58 g/L
- Ammonium: 0,2-10 mmol/L.

Die Einheiten wurden entsprechend praxisbezogener Anwendungen gewählt.

3.2.8.8. Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F

Zur Untersuchung PTM der Rubella-VLPs, insbesondere des Vorhandenseins von N-gebundenen Glykosylierungen, wurde eine enzymatische Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) durchgeführt. Das Enzym PNGase F (New England Biolabs) spaltet N-gebundene Oligosaccharide zwischen dem Asparagin-Rest und dem N-Acetylglucosamin der Glykankette und ermöglicht damit den Nachweis und die Analyse von Glykoproteinen [66].
Die Deglykosylierung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll (Bedienungsanleitung 5 aus Tabelle 18 im Anhang). Kurzgefasst wurden 10 µg der Rubella-VLPs mit der vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer- und Denaturierungslösung versetzt und für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurde 1 µL PNGase F zugesetzt und die Reaktionsansätze für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden jeweils parallele, unbehandelte Ansätze ohne Enzym als Referenz geführt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) analysiert. Eine erfolgreiche Deglykosylierung wurde durch eine Verschiebung der Größe der Zielproteine zu niedrigeren Größen im Gel nachgewiesen. Dieses Muster wurde als Hinweis auf das Vorliegen und die Entfernung posttranslationaler N-Glykosylierungen interpretiert.

3.2.9. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie

Die Untersuchung der diagnostischen Eignung zielte darauf ab, die hergestellten Rubella-VLPs im Hinblick auf ihren Einsatz in der Humanserologie zu charakterisieren. Ein Schwerpunkt lag auf der Bestimmung diagnostisch relevanter Eigenschaften, die für den Einsatz in serologischen Testsystemen entscheidend sind. Hierzu gehören vor allem die Reaktivität gegenüber spezifischen Antikörpern sowie die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität. Nachfolgend werden die verwendeten Analysemethoden näher beschrieben. Es wurde nach internen SOPs sowie entsprechend der Gebrauchsanweisung kommerzieller ELISA Kits vorgegangen.
In den FLIA- und ELISA-Studien wurden die Proben aus Kapazitätsgründen und aufgrund des hohen Probenumfangs jeweils nur in Einzelbestimmung gemessen. Doppel- oder Wiederholungsmessungen wurden nicht durchgeführt. Die resultierenden Daten gelten auf Grundlage der etablierten in-house-Kontrollmessungen als methodisch zuverlässig.

3.2.9.1. Multiplexe FLIA-Studien

Die Grundlage der multiplexen Rubella-FLIA-Studien zur Charakterisierung der diagnostischen Eignung der hergestellten Rubella-VLPs bildete die Immobilisierung der jeweiligen VLP-Charge auf magnetische Partikel unterschiedlicher Größen und Eigenfluoreszenzlevel (Virion\Serion). Durch diesen Ansatz können die einzelnen Partikel-populationen, welche jeweils einer bestimmten Rubella-VLP-Charge zugeordnet sind, bei der Analyse im Durchflusszytometer eindeutig voneinander unterschieden und separat ausgewertet werden.

Zur Bewertung der Reaktivität der einzelnen Rubella-VLP-Chargen gegenüber Rubella-spezifischen humanen Antikörpern wurden Humanseren aus dem internen Seren-Pool eingesetzt, welche vor Anwendung zwischen Faktor 50 und 1.000.000 verdünnt wurden. Diese Seren waren zuvor mithilfe zugelassener In-vitro-Diagnostika (ELISA) auf den Nachweis von Rubella-spezifischen humanen IgG- und IgM-Antikörpern bereits vorbewertet und den Kategorien positiv, negativ oder Grenzbereich zugeordnet. Seren mit der Bewertung Grenzbereich wurden für die Analysen ausgeschlossen. Das Serenpanel bestand jeweils aus mindestens 69 Seren, um einen statistisch robusten Vergleich zu gewährleisten. Außerdem wurden die Seren so ausgewählt, dass sie gleichmäßig über den Messbereich verteilt sind. Für die Detektion der gebildeten Immunkomplexe aus Antigen und humanen Antikörpern wurde fluoreszenzmarkierte anti-human-IgG- sowie anti-human-IgM-Antikörper verwendet (vgl. 3.2.8.1). Das resultierende Fluoreszenzsignal wurde mittels Durchflusszytometer gemessen, wobei die Signalstärke proportional zur Konzentration der entsprechenden Antikörper in der Probe ist und ein Maß für die Reaktivität des jeweiligen Antigens gegenüber den spezifischen Antikörpern darstellt.

Ein hoch-positives Rubella-IgG- sowie ein hoch-positives Rubella-IgM-Humanserum wurden im Rubella-FLIA unter Verwendung einer Rubella-VLP-Charge analysiert, um den Messbereich des Assays zu bestimmen. Hierfür erfolgte ebenfalls eine Verdünnungsreihe der Seren im Bereich von 1:50 bis 1:1.000.000 mit insgesamt 20 Messpunkten.

Die nachstehende Abbildung 7 zeigt den Aufbau des FLIA für die diagnostische Charakterisierung der Rubella-VLPs für den Einsatz in der Humanserologie.

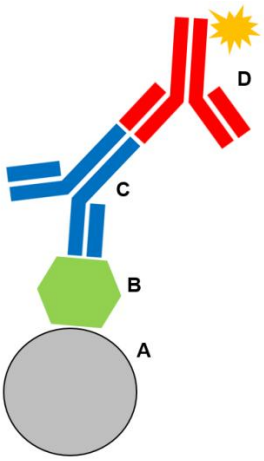


Abbildung 7: Schematischer FLIA-Ablauf.

Schematische Darstellung des Aufbaus des Bead-basierten FLIA für die diagnostische Charakterisierung der Rubella-VLPs für den Einsatz in der Humanserologie. A: Magnetische Partikel (Beads), B: kovalent immobilisiertes Zielantigen (hier: Rubella-VLPs und Referenzantigen), C: Rubella-spezifische Antikörper aus Humanseren, D: fluoreszenzmarkierter Detektionsantikörper.

3.2.9.1.1. FLIA-Studien

Für die immunologischen Austestungen kamen insgesamt 76 vorbewertete Rubella-IgG- sowie 69 vorbewertete Rubella-IgM-Seren aus dem internen Humanserum-Pool der Institut Virion\Serion GmbH zum Einsatz. Von den IgG-Seren wurden 45 als positiv und 31 als negativ für anti-Rubella-human-IgG-Antikörper klassifiziert. Im Fall der IgM-Seren standen sieben Rubella-IgM-positive und 62 Rubella-IgM-negative Humanseren zur Verfügung. Die Vorbewertung der IgG- und IgM-Seren erfolgte mittels des kommerziellen SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG/IgM (Virion\Serion).
Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit positiver Proben ergab sich ein deutliches Ungleichgewicht zwischen den Gruppen, das potenziell zu einer Verzerrung der Datenauswertung führen könnte. Basierend auf internen Erfahrungswerten zeigten positive und negative Rubella-IgM-Seren jedoch eine klare Trennung der Messwerte, weshalb der Einfluss der ungleichen Gruppengröße auf die Interpretation der Ergebnisse als gering eingeschätzt wurde. Dennoch wurde dies statistisch analysiert.
Vor der Anwendung parametrischer Verfahren wurde die Normalverteilungsannahme der Messwerte mittels Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (vgl. 3.2.10.3) überprüft. Bei Erfüllung dieser Voraussetzung erfolgte der Vergleich der Mittelwerte zwischen den Rubella-IgM-positiven und -negativen Gruppen mit einem t-Test (vgl. 3.2.10.5). Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0{,}05$ festgelegt. Eine geringe Zahl positiver Seren kann die statistische Präzision (Teststärke) reduzieren, beeinträchtigt jedoch nicht zwangsläufig die Validität der Ergebnisse, sofern eine deutliche Trennung der Gruppen

gegeben ist. Entsprechende statistische Analysen wurden mit den IgG-Daten durchgeführt.

Die immunologischen Studien basierten auf dem zuvor beschriebenen Aufbau des Bead-basierten FLIA (vgl. 3.2.9.1). Hierfür wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte Testchargen der Rubella-VLPs (Rubella-VLP 1 aus 40 L-Bioreaktorprozess, Rubella-VLP 2 aus 10 L-Bioreaktorprozess) auf magnetischen Partikeln mit unterschiedlichem Eigenfluoreszenzlevel immobilisiert. Ergänzend dazu wurde das Rubella-Referenzantigen gleichermaßen auf Beads mit definierter Eigenfluoreszenz gekoppelt. Dieser Multiplex-Ansatz ermöglichte die parallele Analyse der Antigene innerhalb eines Assays, wodurch die generierten Fluoreszenzsignale direkt miteinander verglichen werden konnten. Die aufgezeichneten Signale erlaubten eine differenzierte Bewertung der spezifischen Interaktionen zwischen den jeweiligen Antigenen und den in den Seren enthaltenen Antikörpern. Diese Informationen sind von zentraler Bedeutung für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit und für einen direkten Lot-zu-Lot-Vergleich der Rubella-VLP-Testchargen. Darüber hinaus liefern sie wichtige Hinweise auf die diagnostische Konkurrenzfähigkeit des Zielantigens im Kontext humanserologischer Anwendungen. Die Datenbasis ermöglichte zudem eine eingehende Charakterisierung weiterer diagnostisch relevanter Eigenschaften wie Sensitivität und Spezifität der Rubella-VLPs im FLIA. Hierzu wurden die statistischen Auswertungen mit Passing-Bablok-Regression (vgl. 3.2.10.1) und ROC-Analyse (vgl. 3.2.10.2) durchgeführt.

3.2.9.2. ELISA-Studien

Weitere immunologische Charakterisierungen zur diagnostischen Eignung der Rubella-VLPs wurden mittels ELISA-Studien im Bereich Bioanalytics und Monitoring der Institut Virion\Serion GmbH durchgeführt. Für die Testungen kamen insgesamt 70 Rubella-IgG- (44 positiv, 26 negativ) sowie 72 Rubella-IgM- (9 positiv, 63 negativ) Seren aus dem internen Humanserum-Pool der Institut Virion\Serion GmbH zum Einsatz. Das Ungleichgewicht zwischen der Anzahl Rubella-IgM-positiver und -negativer Seren wurde statistisch analysiert, um mögliche Verzerrungen in der Datenauswertung zu identifizieren (vgl. 3.2.9.1.1). Entsprechende statistische Analysen wurden mit den IgG-Daten durchgeführt. Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Rubella-VLP-Charge 2 mit einer definierten Antigenkonzentrationen (2 µg/mL) auf Mikrotiterplatten beschichtet. Als Referenz dienten Mikrotiterplatten, die mit

dem nativen Rubella-Referenzantigen (2 µg/mL) beschichtet waren. Eine spezifische in-house Mastercharge des SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG/IgM wurde zusätzlich als Referenz festgelegt. Die Abarbeitung verlief nach entsprechenden internen SOPs für die ELISA Abarbeitung. Als Messwerte wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer aufgezeichnet. In-house Kontroll- und Standardseren wurden in Doppelbestimmung bei jeder Messung mitgeführt. Der ELISA Test war nur auswertbar, wenn die mitgeführten Kontrollen in den intern definierten Toleranzbereichen lagen und der Test somit valide lief. Die Datenanalyse erfolgte automatisiert mittels der Software SERION easyANALYZE (Virion\Serion), welche auf einem 4PL-Fit der Standardreihe basiert. Die entsprechenden Parameter für den 4PL-Fit (vgl. 3.2.8.1) sind Lot-spezifisch und auf dem Zertifikat der jeweiligen ELISA Kit Charge hinterlegt. Für die Datenanalyse der IgG- und IgM-ELISA unter Verwendung der eingesetzten Antigene und der Analysesoftware SERION easyANALYZE wurden die Grenzwerte (positiv, negativ und grenzwertig) anhand der OD_{405nm} wie in Tabelle 13 definiert:

Tabelle 13: Grenzwerte für IgG- und IgM-ELISA mit 4PL-Fit Parametern der Standardkurve.

Darstellung der festgelegten Grenzwerte unterteilt in positiv, negativ und grenzwertig für IgG- und IgM-ELISA anhand der optischen Dichte (OD_{405nm}). Rubella-VLP = Rubella-VLP-Charge 2, Mastercharge = in-house (Virion\Serion) festgelegte Mastercharge des SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG/IgM. Darstellung der 4PL-Fit Parameter A, B, C, D der Standardkurve.

Klassifizierung	**IgG-ELISA**			**IgM-ELISA**		
	Rubella-VLP	Rubella-Referenz-antigen	Master-charge	Rubella-VLP	Rubella-Referenz-antigen	Master-charge
Negativ: OD_{405nm} <	0,779	0,422	0,452	0,417	0,311	0,313
Grenzbereich	0,779 ≤ OD_{405} ≤ 1,177	0,422 ≤ OD_{405} ≤ 0,687	0,452 ≤ OD_{405} ≤ 0,784	0,417 ≤ OD_{405} ≤ 0,545	0,311 ≤ OD_{405} ≤ 0,412	0,313 ≤ OD_{405} ≤ 0,392
Positiv: OD_{405nm} >	1,177	0,687	0,784	0,545	0,412	0,392
Untere Nachweisgrenze (OD_{405nm})	0,231	0,115	0,135	0,348	0,258	0,272
Obere Nachweisgrenze (OD_{405nm})	2,644	2,282	1,46	3,183	2,993	1,48
4PL-Fit-Parameter	Rubella-VLP	Rubella-Referenz-antigen	Master-charge	Rubella-VLP	Rubella-Referenz-antigen	Master-charge
A	0,000	0,000	-0,106	0,000	0,003	0,007
B	0,903	0,885	0,875	0,900	0,923	1,005
C	3,385	4,189	3,898	3,313	3,605	3,485
D	2,850	2,662	2,892	4,027	3,998	3,777

3.2.10. Statistische Datenauswertung

Nachfolgend werden die statistische Versuchsplanung mit DoE sowie die angewandten Methoden zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten erläutert.

3.2.10.1. Passing-Bablok-Regression

Der Vergleich zweier Rubella-VLP-Chargen wurde mittels Passing-Bablok-Regression durchgeführt. Dieses Verfahren wird insbesondere im Methodenvergleich eingesetzt, um die Übereinstimmung zweier Messreihen zu bewerten. Voraussetzung für die Anwendung der Passing-Bablok-Regression ist ein starker positiver linearer Zusammenhang zwischen gepaarten Messreihen. Der Passing-Bablok-Ansatz ist ein nicht-parametrisches Regressionsverfahren zur Schätzung der Regressionskoeffizienten a (Steigung) und b (Achsenabschnitt) einer einfachen linearen Gleichung: $y = a \times x + b$. Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Robustheit gegenüber Ausreißern, während parametrische Regressionsansätze - insbesondere bei geringer Stichprobengröße - stärker durch Extremwerte beeinflusst werden [82, 83].

Für die Bewertung der Vergleichbarkeit zweier Rubella-VLP-Chargen wurde zunächst die Steigung der Passing-Bablok-Regression herangezogen. Diese beschreibt den Grad der Übereinstimmung der Reaktivität beider Chargen gegenüber Rubella-spezifischen Antikörpern aus Humanseren. Als Datengrundlage dienten die im FLIA generierten Rohdaten, ausgedrückt als MFI-Werte. Als Akzeptanzkriterium wurde eine Steigung von 1 ± 0,3 definiert, wobei eine Steigung von 1 eine vollständige Übereinstimmung der Messergebnisse anzeigt.

Zur ergänzenden Beurteilung der diagnostischen Übereinstimmung wurde der Pearson Korrelationskoeffizient (r) berechnet, der die Stärke und Richtung des linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Datensätzen beschreibt. Der Korrelationskoeffizient nimmt Werte zwischen -1 und +1 an, wobei r = 1 eine perfekte positive und r = -1 eine perfekte negative Korrelation kennzeichnet [1].

Die Interpretation von r erfolgte gemäß [13]:

- ±1,00: perfekte Korrelation
- ±0,99-±0,80: sehr starke Korrelation
- ±0,79-±0,60: moderate Korrelation
- ±0,59-±0,30: faire Korrelation
- ±0,29-±0,01: schlechte Korrelation

- 0: keine Korrelation

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Excel-Add-in Analyse-it, das sowohl die Regressionsparameter als auch den Pearson Korrelationskoeffizienten berechnete.

3.2.10.2. ROC-Analyse

Die diagnostische Leistungsfähigkeit der Rubella-VLP-basierten Assays (FLIA und ELISA) wurde mittels Receiver-Operating-Characteristics-(ROC)-Analyse bewertet, um deren Eignung zur Differenzierung von Rubella-IgG- und Rubella-IgM-positiven bzw. -negativen Humanseren zu untersuchen. Ziel war die Charakterisierung der Assays hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität und Gesamtgenauigkeit für den Einsatz in der Humanserologie.

Als Testvariablen dienten die gemessenen Signalintensitäten der jeweiligen Assay-Formate, d.h. MFI aus dem FLIA sowie die OD_{405nm} aus dem ELISA. Diese kontinuierlichen Messgrößen wurden als Maß für die Reaktivität der Rubella-VLPs gegenüber spezifischen Antikörpern aus den Humanseren herangezogen.

Für die ROC-Analyse wurden pro Immunglobulinklasse (IgG, IgM) zwei Gruppen definiert: Rubella-positiv und Rubella-negativ. Basierend auf den Messwerten wurden für eine Reihe potenzieller Schwellenwerte die Sensitivität (Richtig-positiv-Rate, TPR = Anteil korrekt positiver Klassifikationen) und die Spezifität (Richtig-negativ-Rate, TNR = Anteil korrekt negativer Klassifikationen) bestimmt. Die Falsch-positiv-Rate (FPR) wurde als FPR = 1-Spezifität berechnet [37, 39].

Die ROC-Kurve wurde als Plot der FPR (x-Achse) gegen die Sensitivität (y-Achse) dargestellt. Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) diente als Maß für die Gesamtleistung der Testsysteme. Dabei wurden die Tests gemäß dem Klassifikationsschema aus [37] bewertet:

- AUC = 0,5: nicht-informativer Test
- 0,5 < AUC ≤ 0,7: geringe diagnostische Genauigkeit
- 0,7 < AUC ≤ 0,9: gute Genauigkeit
- 0,9 < AUC < 1,0: sehr hohe Genauigkeit
- AUC = 1: perfekte Trennung zwischen positiven und negativen Proben.

Der optimale Schwellenwert (Cut-off) wurde nach dem Youden-Index (J) bestimmt, definiert als

$$J_i = Sensitivität_i + Spezifität_i - 1 \qquad (2)$$

Für jeden potenziellen Schwellenwert der Testvariablen (MFI- und OD_{405nm}-Werte) wurde J_i berechnet. Der Schwellenwert mit dem maximalen J_i wurde als optimaler diagnostischer Cut-off definiert. Dieser Punkt gewährleistet die bestmögliche Trennschärfe zwischen positiven und negativen Seren und minimiert gleichzeitig Fehlklassifikationen. Der Youden-Index nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, wobei 0 keine Trennschärfe und 1 eine perfekte Diskriminierung beschreibt [37, 39].
Die Berechnungen wurden mit dem Excel-Add-in Analyse-it durchgeführt.

3.2.10.3. Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test

Zur Überprüfung der Normalverteilungsannahme der Messdaten wurde der Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test angewendet. Dieser Test prüft die Nullhypothese H_0, dass die beobachteten Daten einer Normalverteilung entsprechen [9]. Als Testgröße wurde der p-Wert (Signifikanzwert) berechnet, der die Wahrscheinlichkeit angibt, ein gleich starkes oder stärker von der Normalverteilung abweichendes Ergebnis zu erhalten - unter der Annahme, dass die Daten tatsächlich normalverteilt sind. Ein p-Wert ≥ 0,05 wurde als Hinweis darauf interpretiert, dass keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorliegt und die Annahme der Normalverteilung beibehalten werden kann. Ein p-Wert < 0,05 hingegen deutet auf eine signifikante Abweichung hin, sodass die Normalverteilungsannahme verworfen wurde [36].
Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

3.2.10.4. Levene-Test

Vor der Durchführung parametrischer Signifikanztests wurde die Voraussetzung der Varianzhomogenität (Gleichheit der Varianzen zwischen den Gruppen) mittels Levene-Test überprüft. Der Test prüft die Nullhypothese H_0, dass die Varianzen der Gruppen gleich sind gegen die Alternativhypothese (H_1), dass sich mindestens eine Gruppenvarianz signifikant unterscheidet [10]. Ein p-Wert ≥ 0,05 wurde als Hinweis auf Varianzgleichheit interpretiert, wodurch die Anwendung parametrischer Verfahren wie des t-Tests (vgl. 3.2.10.5) oder der einfaktoriellen ANOVA (vgl. 3.2.10.6) gerechtfertigt war. Ein p-Wert < 0,05 deutet hingegen auf signifikant unterschiedliche Varianzen hin.
Die Berechnungen wurden mit numiqo Team (2025), DATAtab durchgeführt.

3.2.10.5. t-Test

Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier unabhängiger Gruppen (hier: Rubella-IgM-positiv und Rubella-IgM-negativ) wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dieser Test prüft die Nullhypothese H_0, dass die Mittelwerte beider Gruppen gleich sind ($M_1 = M_2$), gegen die Alternativhypothese H_1, dass sich die Mittelwerte signifikant unterscheiden ($M_1 \neq M_2$) [101]. Die Anwendung des t-Test setzt voraus, dass die Daten innerhalb jeder Gruppe annährend normalverteilt sind [33]. Die Normalverteilung der Messdaten wurde zuvor mittels Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test geprüft (vgl. 3.2.10.3).
Die Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test (vgl. 3.2.10.4) überprüft, der testet, ob die Varianzen der beiden Gruppen gleich sind. Abhängig vom Ergebnis wurde anschließend entweder der t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen oder der Welch-t-Test bei ungleichen Varianzen angewendet. Der Welch-t-Test berücksichtigt ein Ungleichgewicht von Stichprobenumfängen. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. Der Test berechnet die Teststatistik *t* sowie den zugehörigen p-Wert, der die Wahrscheinlichkeit beschreibt, ein mindestens ebenso extremes Ergebnis unter Annahme von H_0 zu beobachten. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert und führte zur Zurückweisung der Nullhypothese [50].
Die statistischen Analysen wurden mit numiqo Team (2025), DATAtab durchgeführt.

3.2.10.6. ANOVA

Zur Bewertung signifikanter Unterscheide zwischen den Mittelwerten mehrerer Gruppen (z.B. verschiedene Temperatur- oder Lagerbedingungen der Rubella-VLPs) wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese Methode dient dem Vergleich der Mittelwerte von drei oder mehr unabhängigen Gruppen und prüft die Nullhypothese H_0, dass alle Gruppenmittelwerte gleich sind gegen die Alternativhypothese H_1, dass sich mindestens zwei Gruppen signifikant unterscheiden [74]. Vor Durchführung der ANOVA wurde die Normalverteilungsannahme der Messdaten mittels Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (vgl. 3.2.10.3) überprüft. Bei $p \geq 0,05$ wurde die Normalverteilung angenommen. Die Voraussetzung der Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test überprüft (vgl. 3.2.10.4). Bei bestätigter Normalverteilung und Varianzgleichheit erfolgte die Auswertung über den F-Test der ANOVA. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Ein

berechneter p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert und führe zur Zurückweisung der Nullhypothese.
Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

3.2.10.7. Design of Experiment

Zur systematischen Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Rubella-VLP-Produktivität im 1L-Bioreaktor wurde ein DoE-Ansatz implementiert. Die statistische Versuchsplanung ermöglichte es, die Haupteffekte und Wechselwirkungen mehrerer Prozessparameter gleichzeitig zu analysieren und deren Einfluss auf die Zielgröße (Rubella-VLP-Konzentration in mg/mL) quantitativ zu bewerten [3, 79].
Für die Studie wurde ein vollfaktorielles 2^2-Design gewählt (vgl. 3.2.7.3.2), bei dem zwei Faktoren mit jeweils zwei Ausprägungen untersucht wurden: die Inokulationsdichte (Faktor 1) und DO-Wert/Rührerdrehzahl (Faktor 2). Dieses Design ermöglicht die Identifikation sowohl linearer Effekte als auch potenzieller Interaktionen zwischen den Prozessparametern [3]. Die Faktorstufen wurden so definiert, dass sie den relevanten Bereich der Prozessbedingungen im Bioreaktor abdecken.
Die aus dem DoE resultierenden Daten bildeten die Grundlage für die Erstellung von Pareto- (vgl. 3.2.10.8), Haupt- (vgl. 3.2.10.9) und Wechselwirkungs- (vgl. 3.2.10.10) diagrammen, welche die relativen Effektstärken der Prozessparameter auf die Rubella-VLP-Produktivität visualisieren.
Die statistische Versuchsplanung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

3.2.10.8. Pareto-Diagramm

Zur Bewertung des Einflusses experimenteller Faktoren (Faktor 1: Inokulationsdichte, Faktor 2: DO-Wert/Rührerdrehzahl) auf eine definierte Zielgröße (Rubella-VLP-Konzentration in mg/mL) wurde eine statistische Effektanalyse unter Anwendung eines Pareto-Diagramms durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, den relativen Beitrag der einzelnen Faktoren auf die untersuchte Antwortvariable zu quantifizieren und deren statistische Signifikanz zu bewerten. Die Effektgrößen wurden auf Grundlage der t-Statistik berechnet und nach ihrer absoluten Stärke in absteigender Reihenfolge dargestellt. Das Pareto-Diagramm visualisiert die standardisierten Effektkoeffizienten, wobei eine horizontale Signifikanzlinie das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ markiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurden positive Effekte als Indikatoren für eine förderliche Wirkung des jeweiligen Faktors auf die Zielgröße gewertet, während

negative Effekte auf eine hemmende Wirkung hinweisen. Die Größe des jeweiligen Balkens im Pareto-Diagramm korreliert mit der Stärke des Einflusses, wodurch eine visuelle Rangordnung der experimentellen Faktoren ermöglicht wird [3].
Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

3.2.10.9. Haupteffektediagramm

Zur Identifizierung der Haupteffekte auf die Rubella-VLP-Produktion wurde im Rahmen der statistischen Auswertung ein Haupteffektediagramm erstellt. Diese Analyse diente dazu, den Einfluss einzelner Prozessfaktoren auf die Zielgröße (hier: Rubella-VLP-Konzentration in mg/mL) unabhängig voneinander zu bewerten.
Als untersuchte Faktoren wurden die Inokulationsdichte (Faktor 1) und der kombinierte Prozessparameter DO-Wert/Rührerdrehzahl (Faktor 2) herangezogen. Beide Parameter wurden in zwei definierten Ausprägungen (niedrig und hoch) im Rahmen des DoE (vgl. 3.2.10.7) variiert. Die jeweiligen Mittelwerte der Rubella-VLP-Konzentrationen für jede Faktorstufe wurden berechnet und grafisch im Haupteffektediagramm dargestellt. Im Haupteffektediagramm wurde die Mittelwertänderung der Zielgröße entlang der Faktorstufen aufgetragen. Eine steile Steigung der Verbindungslinie zwischen den Faktorstufen zeigt einen starken Einfluss des Faktors auf die Zielgröße an, während eine nahezu horizontale Linie auf einen geringen oder keinen Effekt hinweist. Ein positiver Anstieg deutet auf eine förderliche Wirkung des Faktors auf die Rubella-VLP-Produktion hin, wohingegen eine negative Steigung einen hemmenden Effekt signalisiert [3].
Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

3.2.10.10. Wechselwirkungsdiagramm

Zur Untersuchung potenzieller Wechselwirkungen zwischen den experimentellen Faktoren wurde ein Wechselwirkungsdiagramm erstellt. Dieses dient der grafischen Darstellung und Bewertung, ob er Effekt eines Faktors auf die Zielgröße vom Niveau des zweiten Faktors abhängt. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Inokulationsdichte (Faktor 1) und DO-Wert/Rührerdrehzahl (Faktor 2) in Bezug auf die Rubella-VLP-Konzentration (mg/mL) analysiert.
Im Wechselwirkungsdiagramm wurde für jede Stufe eines Faktors (niedrig und hoch) der Mittelwert der Zielgröße über die Stufen des zweiten Faktors aufgetragen. Verlaufen diese Verbindungslinien parallel, liegt keine signifikante Wechselwirkung

vor, d.h. der Einfluss eines Faktors bleibt über die Stufen des anderen Faktors konstant. Kreuzen oder divergieren die Linien hingegen deutlich, weist dies auf eine Interaktion zwischen den Faktoren hin, d.h. der Effekt eines Faktors ändert sich in Abhängigkeit des anderen Faktors [3].
Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab.

4. Ergebnisse

Eine schematische, vereinfachte Übersicht der Bioprozessentwicklung zur Herstellung von Rubella-VLPs ist in Abbildung 2 dargestellt. Gezeigt sind die wesentlichen Prozessbereiche USP, DSP sowie die eingesetzten prozessanalytischen Verfahren, welche eine Identifizierung und Charakterisierung des Zielproteins in den jeweiligen Prozessphasen ermöglichten. Die Entwicklungsschritte USP und DSP wurden dabei parallel durchgeführt und eng miteinander abgestimmt. Die frühzeitige Implementierung geeigneter Analysemethoden zur Charakterisierung der Rubella-VLPs erwies sich als ein zentraler Faktor für die Prozessentwicklung.

Bei der Darstellung der Ergebnisse beziehen sich Verweise wie „in eigenen Vorarbeiten untersucht“ oder „in Vorexperimenten erarbeitet“ auf eigenständig erarbeitete, jedoch nicht explizit aufgeführte Resultate, die auf Nachfrage zugänglich sind. Entsprechendes gilt für Ergebnisse, die mit den Zusätzen „Ergebnisse nicht dargestellt“ oder „exemplarisch dargestellt“ gekennzeichnet wurden.

4.1. Upstream Processing: Zelllinienentwicklung

4.1.1. Konstruktion des Expressionsvektors

Nach externer Gensynthese wurde das Rubella-VLP-Genfragment codierend für das Kapsidprotein, gpE1 und gpE2, in einen induzierbaren Expressionsvektor pLVX-TetOne-Puro inseriert. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Kolonie-Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie einen Kontrollverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Eine externe DNA-Sequenzierung bestätigte zusätzlich die korrekte Integration und Sequenzintegrität des Rubella-VLP-Gens im Zielvektor.

4.1.2. Herstellung lentiviraler Partikel und Transduktion

Nach Überprüfung der erfolgreichen Herstellung der lentiviralen Partikel sowie Bestimmung des Lentivirus-Titers mittels Lenti-X GoStix mit resultierenden $4{,}64 \times 10^5$ IFU/mL erfolgte die Transduktion der Zielzellen (Vero und HEK293T) mit dem Expressionsvektor in definierten MOI. Die Variation des MOI zwischen 1 und 10 zeigte, dass nach Antibiotikaselektion der transduzierten Zielzellen mit steigendem MOI höhere Zellzahlen erzielt wurden. Negative Effekte auf die Zellvitalität wurden nicht beobachtet. Zudem konnte mit zunehmender MOI von 1 auf 10 eine rund 30 %ige Steigerung der Rubella-VLP-Expression erreicht werden, wobei in HEK293T-Zellen eine maximale Produktionsrate von 2,3 µg/mL resultierte.

4.1.3. Single Cell Cloning

Für das SCC zur Etablierung hoch exprimierender Zellklone und zur Selektion der polyklonalen zu monoklonalen Zelllinien, wurden die mit MOI = 10 transduzierten Vero- und HEK293T-Zelllinien eingesetzt. Aus dem SCC resultierten insgesamt 33 Einzelzellklone der HEK293T-Zelllinie und drei Einzelzellklone der Vero-Zelllinie. Diese Klone wurden in geeigneten Zellkulturflaschen (25 cm^2) kultiviert und die Expression der Rubella-VLPs durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Nach einer Produktionsphase von 48 Stunden erfolgte die Quantifizierung der Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand mittels Rubella-FLIA (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 6). Zwei ausgewählte, monoklonale HEK293T-Zelllinien mit den höchsten Rubella-VLP-Expressionsraten, HEK293T RUBV #G04 (6,2 µg/mL) und HEK293T RUBV #F2 (7,1 µg/mL), wurden anschließend durch eine schrittweise Serumreduktion an ein chemisch definiertes Medium adaptiert und erfolgreich in eine Suspensionskultur überführt. Die beiden HEK293T-Zelllinien zeigten eine mehr als zehnfach gesteigerte Rubella-VLP-Produktionsleistung im Vergleich zur Vero-Zelllinie mit der höchsten Rubella-VLP-Expression. Die Rubella-VLP Expressionsrate der Zelllinie HEK293T RUBV #F2 betrug 7,1 µg/mL und lag damit deutlich über dem Niveau der niedrigsten Expressionsrate von HEK293T RUBV #G2 (3,8 µg/mL), was einer Steigerung um etwa 87 % entspricht.

4.1.4. Zellkulturführung der Suspensionskultur

Die beiden Zelllinien HEK293T RUBV #G04 und HEK293T RUBV #F2 wurden über einen Zeitraum von 336 Stunden kultiviert und dabei in festgelegten Intervallen bezüglich der Zellzahl, der Zellvitalität und der Rubella-VLP-Konzentration analysiert. Die Kultivierungsdauer wurde auf Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Experimente festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Produktausbeute erreicht wurde.

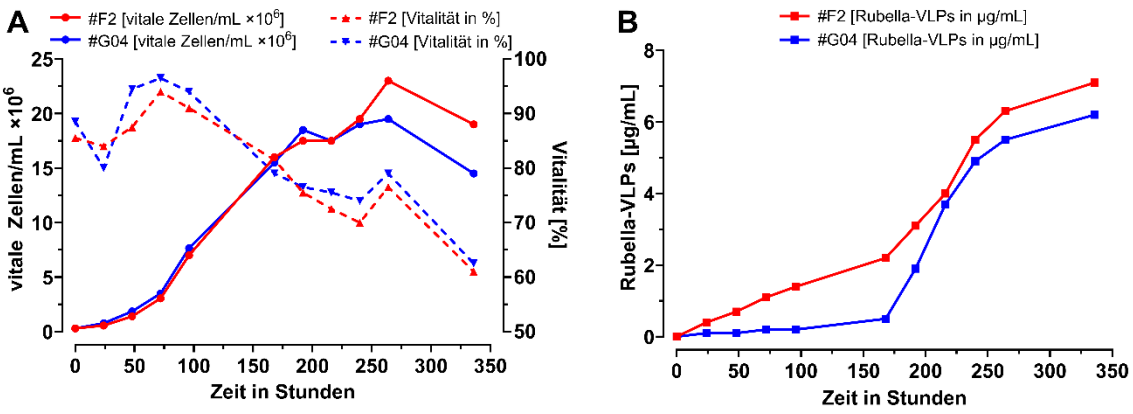


Abbildung 8: Etablierung der Suspensionskultur.

Vergleich der beiden Zelllinien HEK293T RUBV #F2 (rot) und HEK293T RUBV #G04 (blau) über eine Kultivierungsdauer von 336 Stunden zur Expression von Rubella-VLPs. A: Bewertung des Prozesses hinsichtlich der Zellzahl (Y-Achse links; vitale Zellen/mL×10^6; durchgezogene Linie) und der Zellvitalität (Y-Achse rechts; in %; gestrichelte Linie). B: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Rubella-VLP-Konzentration im Zellkulturüberstand (in µg/mL; über Rubella-FLIA ermittelt).

Die in Abbildung 8 dargestellten Verläufe verdeutlichen, dass das Zellwachstum (über vitale Zellen/mL definiert) beider Zelllinien bis zu einer Kultivierungsdauer von 240 Stunden nahezu identisch verläuft und zu diesem Zeitpunkt eine maximale Zelldichte von etwa 19 × 10^6 vitalen Zellen/mL erreicht wird. Im weiteren Verlauf stagnierte das Wachstum der Zelllinie HEK293T RUBV #G04 und fiel bis zum Ende des Experiments auf 14,5 × 10^6 vitale Zellen/mL ab. Dagegen zeigte die Zelllinie HEK293T RUBV #F2 einen stetigen Anstieg der Zellzahl bis zu einem Peak von 23 × 10^6 vitalen Zellen/mL nach 264 Stunden, bevor diese bei 336 Stunden auf 19 × 10^6 vitalen Zellen/mL zurückging.

Die Zellvitalitäten beider Zelllinien entwickelten sich über den gesamten Kultivierungszeitraum nahezu deckungsgleich. Das Maximum der Vitalität wurde nach 72 Stunden mit rund 95 % erreicht und sank bis zum Versuchsende kontinuierlich auf etwa 61 %.

Die Analyse der Rubella-VLP-Konzentrationen zeigte einen stetigen Anstieg über die gesamte Kultivierungsdauer. Nach 336 Stunden betrug die Rubella-VLP-Konzentration im Überstand der Zelllinie HEK293T RUBV #G04 6,2 µg/mL, während die Zelllinie HEK293T RUBV #F2 mit 7,1 µg/mL eine um rund 15 % höhere Ausbeute erzielte, jeweils bei identischem Kulturvolumen. Somit ergab die Hochrechnung für HEK293T RUBV #F2 eine Ausbeute von 7,1 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur. Diese Ergebnisse verdeutlichen die höhere Produktionsleistung der Zelllinie HEK293T RUBV #F2 gegenüber HEK293T RUBV #G04, wonach mit der monoklonalen HEK293T RUBV #F2 Zelllinie als Produktionszelllinie weitergearbeitet wurde.

4.2. Upstream Processing: Optimierung der Prozessbedingungen

4.2.1. Variation der Zelldichte bei Inokulation

Für die Versuchsreihe zur Variation der Zelldichte bei Inokulation wurden die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse ermittelt.

Tabelle 14: Variation der Zelldichte bei Inokulation.

Kultivierungsdauer von HEK293T Produktionszelllinie über 240 Stunden mit Variation der Zelldichte bei Inokulation: 0,3 ×10^6 (VZ1), 0,5 ×10^6 (VZ2) und 0,75 ×10^6 (VZ3) vitale Zellen/mL. Bewertung der Prozesse hinsichtlich Zellzahl (vitale Zellen/mL×10^6), Zellvitalität (in %) und Rubella-VLP-Konzentration (in µg/mL; über Rubella-FLIA ermittelt).

Kultivierungs-zeitpunkt in Stunden	vitale Zellen/mL × 10^6			Zellvitalität [%]			Rubella-VLPs [µg/mL]		
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ1	VZ2	VZ3	VZ1	VZ2	VZ3
0	0,3	0,5	0,75	85,0	96,0	98,0	0,0	0,0	0,0
24	0,6	1,2	1,9	94,0	89,0	96,5	0,0	0,1	0,1
48	1,1	2,0	3,5	89,5	90,5	97,0	0,1	0,2	0,1
72	3,6	4,6	6,9	95,0	94,0	97,5	0,3	0,3	0,3
96	4,4	6,8	9,9	86,5	86,0	91,5	0,4	0,5	0,4
168	15,0	14,0	16,0	84,5	75,0	72,5	1,5	1,9	1,7
192	16,5	16,0	14,5	79,5	82,0	64,0	3,2	4,1	3,8
216	19,5	21,5	16,0	79,0	80,5	64,5	3,9	4,4	4,2
240	19,5	20,0	15,0	72,5	79,5	59,5	5,0	5,8	5,3

Die Ansätze VZ1 (0,3 × 10^6 vitale Zellen/mL) und VZ2 (0,5 × 10^6 vitale Zellen/mL) zeigten vergleichbare Verläufe hinsichtlich Zellzahl und Zellvitalität. Besonders hervorzuheben ist, dass bei einer Inokulationsdichte von 0,5 × 10^6 vitalen Zellen/mL (VZ2) der höchste Maximalwert der Zellzahl mit 21,5 × 10^6 vitalen Zellen/mL sowie die höchste Zellvitalität am Kultivierungsende (79,5 %) erreicht wurde. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen bei einer Inokulationsdichte von 0,75 × 10^6 vitalen Zellen/mL (VZ3) das geringste Zellwachstum auf, mit einem Maximum von 16,0 × 10^6 vitalen Zellen/mL.

Bezogen auf die Rubella-VLP-Konzentrationen zum Erntezeitpunkt nach 240 h wurden in allen drei Ansätzen vergleichbare Werte gemessen. Den höchsten Wert erreichte VZ2 mit 5,8 µg/mL. Aus diesem Grund wurde für zukünftige Experimente eine Zelldichte bei Inokulation von 0,5 × 10⁶ vitalen Zellen/mL festgelegt.

4.2.2. Feeding-Strategie

In den initialen Versuchsreihen zur Prozessoptimierung wurde der Einfluss einer Nährstoff- (Feed) Lösung auf das Zellwachstum und die Zellvitalität untersucht. Die Rubella-VLP-Expression wurde nicht induziert, um den Einfluss der Feed-Lösung ohne Rubella-VLP-Produktion zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden zwei Ansätze über eine Kultivierungsdauer von 408 Stunden betrachtet, wobei Ansatz 1 ohne Feed-Zugabe (-Feed) und Ansatz 2 mit Feed-Zugabe (+Feed) definiert wurden. Die Zugabe der Feed-Lösung bei Ansatz 2 erfolgte volumetrisch gemäß den in Tabelle 5 aufgeführten Parametern. Die Feed-Lösung enthält neben einer definierter Glukose-Konzentration (40 g/L) weitere Kohlenstoffquellen sowie vom Hersteller nicht näher spezifizierte Zusätze wie Vitamine und Aminosäuren.

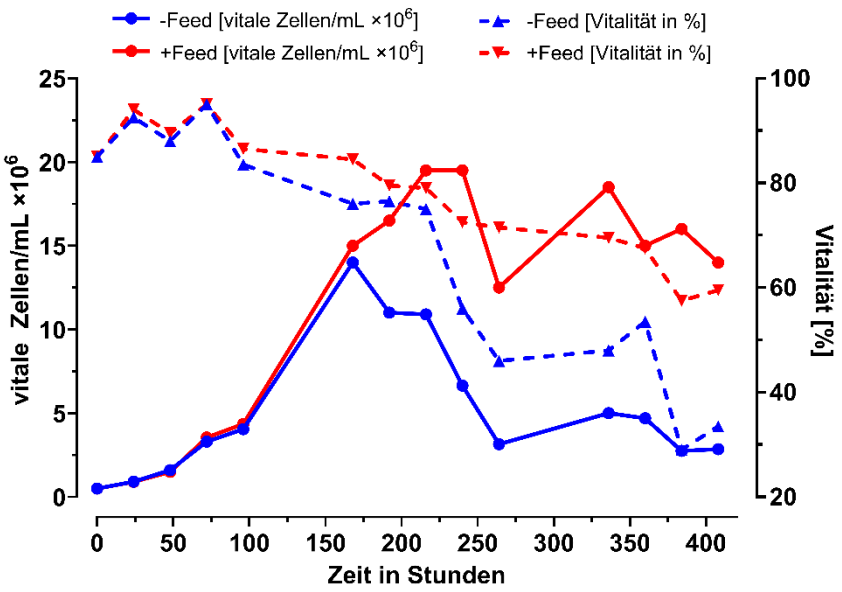


Abbildung 9: Feeding-Strategie.

Optimierung der Prozessbedingungen durch Zugabe einer Feed-Lösung mit Blick auf das Zellwachstum und die Zellvitalität. Einsatz der Zelllinie HEK293T RUBV #F2. Ansatz 1: Ohne Feed-Zugabe = -Feed (blau), Ansatz 2: mit Feed-Zugabe = +Feed (rot). Y-Achse links: vitale Zellen/mL ×10^6 mit durchgezogenen Linien, Y-Achse rechts: Zellvitalität [%] mit gestrichelten Linien.

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse belegen, dass die Zugabe der Feed-Lösung über den gesamten Kultivierungszeitraum zu einer deutlichen Verbesserung

sowohl des Zellwachstums als auch der Zellvitalität führte. Im Ansatz ohne Feed-Supplementierung (blau) wurde eine maximale Zellzahl von 14 × 10^6 vitalen Zellen/mL nach 168 Stunden erreicht. Demgegenüber lag der Spitzenwert bei Ansatz 2 (+Feed, rot) bei 19,5 × 10^6 vitalen Zellen/mL nach 216 Stunden, was einer Steigerung von etwa 25 % gegenüber den nicht supplementierten Ansätzen entspricht. Ab 168 Stunden Kultivierungsdauer war in dem nicht supplementierten Ansatz 1 (-Feed) ein deutlicher Rückgang sowohl der Zellzahl als auch der Zellvitalität zu verzeichnen. Die Entwicklung von Zellwachstum und Zellvitalität in der +Feed-Variante verlief dagegen bis 336 Stunden ohne deutliche Einbrüche. Folglich zeigte sich ein positiver Einfluss der Nährstoffsupplementierung auf die Zielgrößen Zellwachstum und Zellvitalität.

4.2.3. Medienanalyse und Anpassung der Feeding-Strategie

In den ersten Anpassungen der Feeding-Strategie wurden die Konzentrationen von Glukose, Glutamin, Ammonium, Glutamat und Laktat unter Verwendung des 4BioCore-Analysers über die Kultivierungsdauer quantifiziert. Auf Grundlage dieser Daten (nicht dargestellt) sowie der in eigenen Vorexperimenten erarbeiteten Resultaten wurde die Feeding-Strategie weiter entwickelt. Insbesondere die Glukose- und Glutamin-Konzentrationen wurden durch Supplementierung der Feed-Lösung und L-Glutamin aktiv beeinflusst.

Über die Supplementierung einer angepassten prozentualen Volumenzugabe beider Komponenten konnte das Zellwachstum und die Zellvitalität (vgl. Abbildung 9) positiv beeinflusst werden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse hinsichtlich der Parameter Zellvitalität, Zellwachstum (Abbildung 10A) und Produktion von Rubella-VLPs (Abbildung 10B) sowie der Medienanalyse (Abbildung 11).

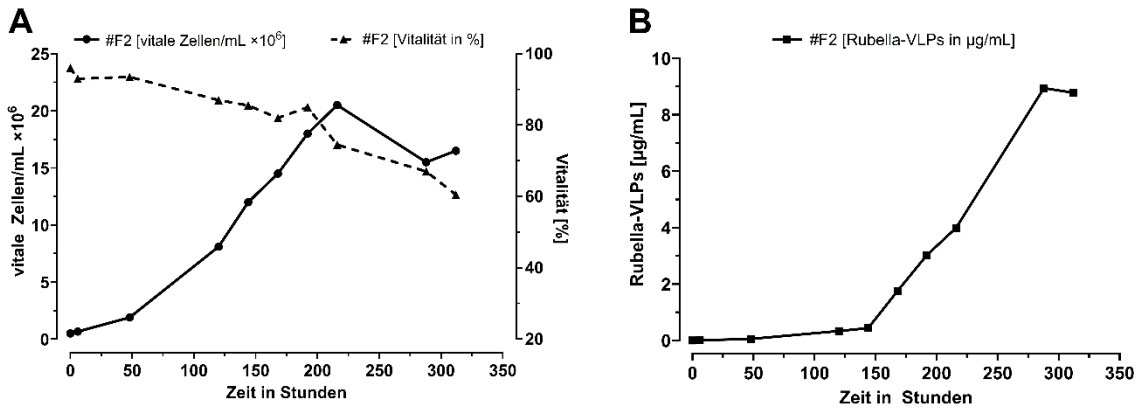


Abbildung 10: Entwicklung und Etablierung einer optimierten Feeding-Strategie.

Einsatz der Produktionszelllinie HEK293T RUBV #F2. A: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Zellzahl (Y-Achse links; vitale Zellen/mL×10^6; durchgezogene Linie) und Zellvitalität (Y-Achse rechts; in %; gestrichelte Linie). B: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Rubella-VLP-Konzentration im Zellkulturüberstand (in µg/mL; über Rubella-FLIA ermittelt).

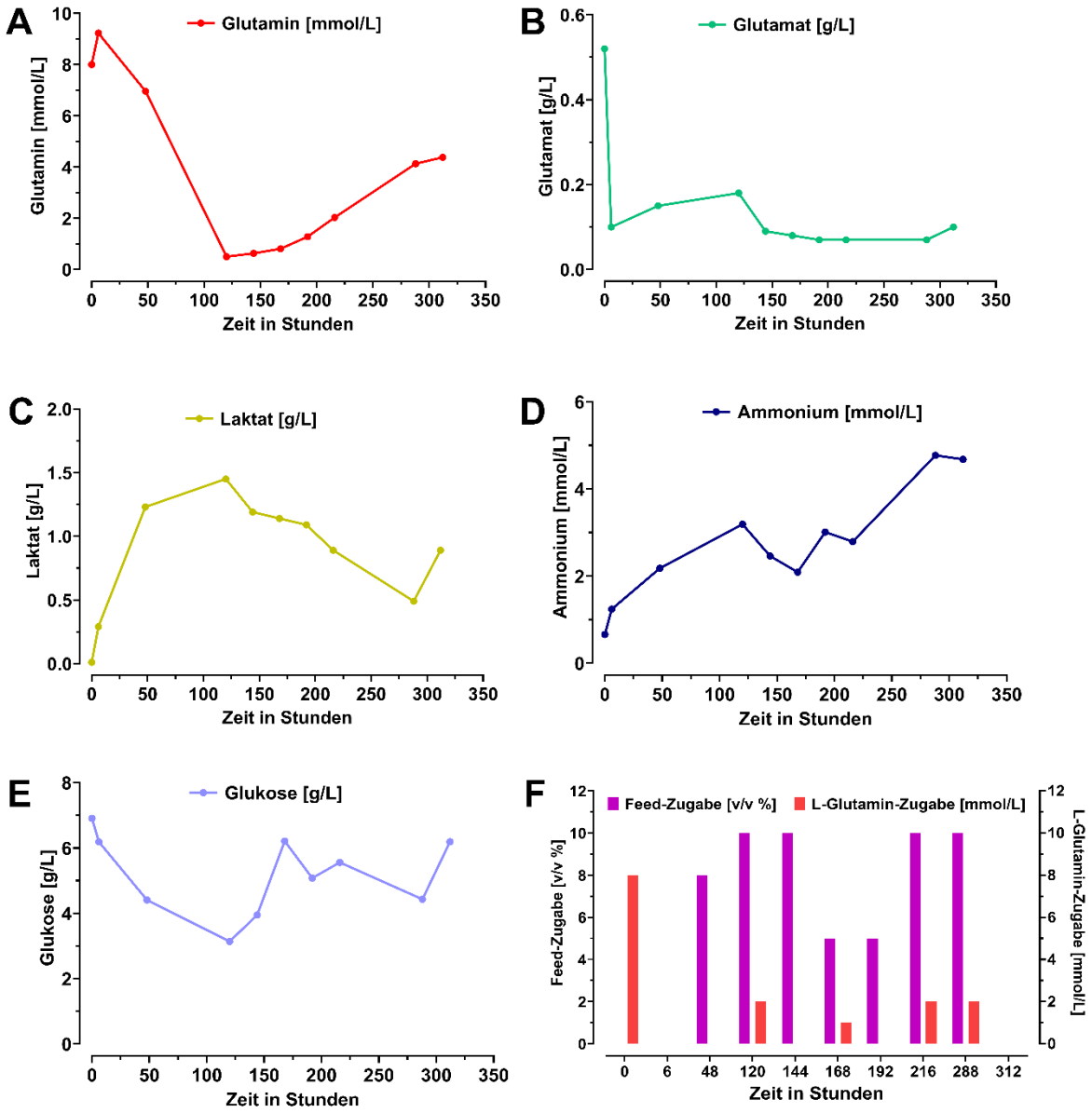


Abbildung 11: Medienanalyse zu Entwicklung und Etablierung optimierter Feeding-Strategie.

Entwicklung und Etablierung einer optimierten Feeding-Strategie. Einsatz der Produktionszelllinie HEK293T RUBV #F2. Medienanalyse des Kultivierungsprozesses mittels 4BioCore Analyser zur Konzentrationsbestimmung der Parameter A: Glutamin [mmol/L] (rot), B: Glutamat [g/L] (grün), C: Laktat [g/L] (orange), D: Ammonium [mmol/L] (dunkelblau) und E: Glukose [g/L] (hellblau). F: Darstellung der Feed-Zugabe [v/v %] (lila) und L-Glutamin-Zugabe [mmol/L] (rot).

Während der Kultivierung wurde bis 216 Stunden ein exponentieller Anstieg der Zellzahl auf 20,5 × 10^6 vitale Zellen/mL beobachtet. Anschließend stagnierte das Zellwachstum, und die Anzahl vitaler Zellen sank bis zum Ende der Kultivierung auf 16,5 × 10^6 Zellen/mL ab (Abbildung 10). Diese Werte liegen im Bereich vorheriger Experimente (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 14). Die Zellvitalität nahm ab 192 Stunden deutlich ab und erreichte zum Prozessende ein Niveau von 60 %. Die Ausbeute an Rubella-VLPs stieg über den gesamten Zeitraum bis 288 Stunden kontinuierlich an

(Abbildung 10B). Trotz der Abnahme der Zellvitalität konnte zwischen 216 und 288 Stunden (Abbildung 10A) eine mehr als zweifache Erhöhung der VLP-Menge erzielt werden. Zum Ende des Kultivierungsprozesses resultierte, hochgerechnet auf ein Liter Zellkulturvolumen, eine Ausbeute von 8,8 mg Rubella-VLPs (Konzentration: 8,8 µg/mL). Damit wurde im Vergleich zu vorherigen Ansätzen eine Steigerung der Ausbeute um 19 % erreicht (vgl. 4.1.4).

Die Glutamin-Konzentration (Abbildung 11A) sank zwischen 48 und 120 Stunden auf etwa 0,5 mmol/L ab. Nach Supplementierung (Abbildung 11F) zu diesem Zeitpunkt sowie nach 168 Stunden stieg sie bis 216 Stunden auf ein Niveau von ca. 2 mmol/L an. Durch weitere Zugaben bei 216 und 288 Stunden erhöhte sich die Konzentration auf knapp über 4 mmol/L. Typische Glutaminkonzentrationen während der Kultivierung von HEK293-Zellen liegen im Bereich von 0–6 mM und werden häufig auf einem Sollwert zwischen 2–3 mM gehalten [48, 90]. Die Glukosekonzentration (Abbildung 11E) lag während der gesamten Kultivierung oberhalb von 3 g/L und erreichte im Mittel etwa 5 g/L. Der empfohlene Sollwert für die Kultivierung von HEK293-Zellen beträgt ca. 4 g/L [16].

Die Laktatkonzentration (Abbildung 11C) stabilisierte sich ab 48 Stunden über den gesamten Kultivierungsverlauf bei ca. 1,2 ± 0,3 g/L. Auffällig war ein deutlicher Anstieg der Ammoniumkonzentration (Abbildung 11D) nach 168 Stunden, der ein Maximum von 4,7 mmol/L erreichte und parallel zum Anstieg der Glutaminkonzentration verlief. Als kritischer Grenzwert für Ammoniumkonzentrationen wird in der Literatur ein Niveau von < 2 mmol/L angegeben [89].

Aus der für die Schüttelkultur entwickelten Feeding-Strategie ergab sich die prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung in Bezug auf das Zellkulturvolumen zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt sowie der L-Glutamin-Supplementierung, wie in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Supplementierung von Feed-Lösung und L-Glutamin bei entwickelter Feeding-Strategie in Schüttelkultur.

Prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung in Bezug auf das Zellkulturvolumen zum jeweiligen Kultivierungszeitpunkt sowie L-Glutamin-Supplementierung anhand entwickelter Feeding-Strategie in der Schüttelkultur.

Kultivierungszeitpunkt [in Stunden]	Prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung [%]	L-Glutamin-Supplementierung [mM]
0	0	8
1	0	0
24	0	0
48	8	0
120	10	2
144	10	0
168	5	1
192	5	0
216	10	2
288	10	2
312	0	0

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten aus Abbildung 10 und Abbildung 11 lag der optimale Erntezeitpunkt bei 288 Stunden, da darüber hinaus kein weiterer Anstieg der Rubella-VLP-Ausbeute festgestellt wurde. Zudem hätte auf eine Supplementierung der Feed-Lösung (Abbildung 11F) auf Grund höherer Glukose-Konzentrationen verzichtet werden können. Auf den idealen Erntezeitpunkt wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen. Basierend auf den dargestellten Ergebnissen (Abbildung 8 und Abbildung 10) ist dieser voraussichtlich im Bereich zwischen 250 und 350 Stunden zu erwarten.

4.2.4. Reproduzierbarkeit des Rubella Virus-like Particles Herstellungsprozesses

Die Reproduzierbarkeit des Bioprozesses zur Herstellung von Rubella-VLPs wurde in drei unabhängigen Kultivierungsansätzen mit der Produktionszelllinie HEK293T in eigenen Vorarbeiten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die drei Versuchsreihen in Bezug auf die definierten Zielgrößen vergleichbare Werte und somit eine hohe Reproduzierbarkeit des Prozesses bestätigten. Folglich wurden in Tabelle 16 die Mittelwerte (±SD) der drei Zielgrößen sowie das Zellkulturvolumen über den Kultivierungszeitraum von 312 Stunden für weitere Analysen dargestellt. Das Zellkulturvolumen wurde in allen Ansätzen durch die einheitliche Supplementierung mit Feed-Lösung und L-Glutamin konstant gehalten.

Tabelle 16: Reproduzierbarkeit des Rubella-VLP-Herstellungsprozesses.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses von Rubella-VLPs in Schüttelkultur. Mittelwerte (± SD) drei unabhängig durchgeführter Kultivierungsansätze mit der HEK293T Produktionszelllinie. Darstellung der Zielgrößen Zellwachstum, Zellvitalität sowie die Konzentrationen der Rubella-VLPs über die Dauer der Kultivierung. Das Zellkulturvolumen wurde in allen Ansätzen durch die einheitliche Supplementierung mit Feed-Lösung und L-Glutamin konstant gehalten.

Kultivierungs-zeitpunkt t in Stunden	Vitale Zellen/mL × 10^6	Zellvitalität [%]	Zellkultur-volumen V [mL]	Rubella-VLPs [µg/mL]
0	0,5 ±0,0	95,8 ±1,3	93,6	0,0 ±0,0
48	2,2 ±0,5	95,2 ±2,8	100,0	0,0 ±0,0
120	9,5 ±0,9	86,7 ±1,6	111,0	0,5 ±0,2
144	13,8 ±2,3	87,0 ±5,6	122,1	0,7 ±0,4
168	16,3 ±0,8	85,0 ±6,1	128,8	1,8 ±0,5
192	17,5 ±3,3	82,8 ±4,2	135,3	3,5 ±0,7
216	19,8 ±2,8	77,7 ±5,0	150,1	4,0 ±0,6
288	18,7 ±3,3	64,7 ±3,2	166,7	8,3 ±1,3
312	18,7 ±2,5	63,2 ±5,0	165,7	7,2 ±1,8

Anhand der in Tabelle 16 dargestellten Daten wurde die spezifische Wachstumsrate µ (Formel 3) sowie die Generationszeit t_d (Formel 4) der HEK293T Produktionszelllinie ermittelt. Hierbei entspricht die Zellkonzentration zu einem bestimmten Kultivierungszeitpunkt $t = X(t)$ [vitale Zellen/mL], das Zellkulturvolumen $V = V(t)$ [mL] und die Gesamtzellzahl (Biomasse B) $B(t) = X(t) \times V(t)$ [vitale Zellen].
Die spezifische Wachstumsrate µ der HEK293T-Zellen im Fed-Batch-Prozess wurde für die exponentielle Wachstumsphase wie folgt berechnet:

$$\mu = \frac{\ln B(t2) - \ln B(t1)}{t2 - t1} \qquad (3)$$

Daraus wurde auf die Generationszeit t_d geschlossen:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (4)$$

Im Zeitraum von 0–120 Stunden ergab sich eine spezifische Wachstumsrate von $\mu = 0{,}02562$ h^{-1}, entsprechend einer Generationszeit von $t_d = 27{,}06$ Stunden. Innerhalb der ersten 48 Stunden lag $\mu = 0{,}03302$ h^{-1} mit einer Generationszeit von $t_d = 20{,}99$ Stunden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zellen zu Beginn der Kultivierung eine höhere Wachstumsdynamik aufwiesen, die sich im weiteren Verlauf verlangsamte. Die ermittelten Werte lagen im bekannten Bereich für HEK293-Zellen ($\mu_{max} = 0{,}020 - 0{,}029$ h^{-1} [107]) und überschritten diesen in den ersten 48 Stunden sogar.

4.3. Downstream Processing

In eigenen Vorexperimenten (hier nicht dargestellt) wurden verschiedene etablierte Aufarbeitungsschritte - darunter PEG-Fällung**,** Größenausschluss- sowie Ionenaustauschchromatographie - hinsichtlich ihrer Eignung zur Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen untersucht. Obwohl mit allen Verfahren grundsätzlich eine Aufarbeitung der Rubella-VLPs erzielt werden konnte, waren die erreichten Reinheitsgrade nicht zufriedenstellend. Für die Erreichung einer Reinheit von > 90 % waren zusätzliche Reinigungsschritte erforderlich. Vor diesem Hintergrund wurde ein alternatives chromatographisches Verfahren untersucht. Die Entscheidung fiel auf die Affinitätschromatographie, da diese aufgrund der hochspezifischen Interaktion zwischen Ligand und Zielprotein im Vergleich zu unspezifischeren chromatographischen Methoden typischerweise deutlich höhere Reinheitsgrade in einem einzigen Schritt ermöglicht [75].

4.3.1. Antikörper-Affinitätschromatographie

Zur spezifischen Aufreinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen wurde ein antikörperbasiertes Affinitätschromatographieverfahren etabliert. Als Ligand diente ein Rubella-spezifischer mAK, der gegen ein natives Rubella-Virus-Antigen gerichtet ist. Das Chromatographieverfahren wurde zunächst im Kleinstmaßstab entwickelt und optimiert, bevor es für die Anwendung im DSP weiter skaliert wurde (vgl. Abbildung 2).

4.3.1.1. Funktionelle Bewertung der Elutionsbedingungen

Zur Evaluierung potenzieller Elutionspuffer wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen untersucht. Beispielhaft sind die Ergebnisse einer dreiminütigen Inkubation im Ansatz Prä-Bindungs-Inkubation (Abbildung 12) und Post-Bindungs-Inkubation (Abbildung 13) dargestellt. Bei der Prä-Bindungs-Inkubation wurde der an die Beads immobilisierte Antikörper zunächst mit dem jeweiligen Elutionspuffer inkubiert, bevor das Rubella-Referenzantigen zugegeben wurde. Eine Abnahme des detektierten Signals wurde hierbei als Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Antikörperfunktionalität durch die entsprechende Elutionsbedingung gewertet. Im Gegensatz dazu war bei der Post-Bindungs-Inkubation, bei der der Elutionspuffer erst nach Bindung des Rubella-Referenzantigens appliziert wurde, eine Signalabnahme erwünscht. Diese wurde als Maß für die Elutionseffizienz interpretiert - vorausgesetzt,

dass die betreffende Elutionsbedingung in der Prä-Bindungs-Inkubation keine Beeinträchtigung der Antikörperaktivität gezeigt hatte.

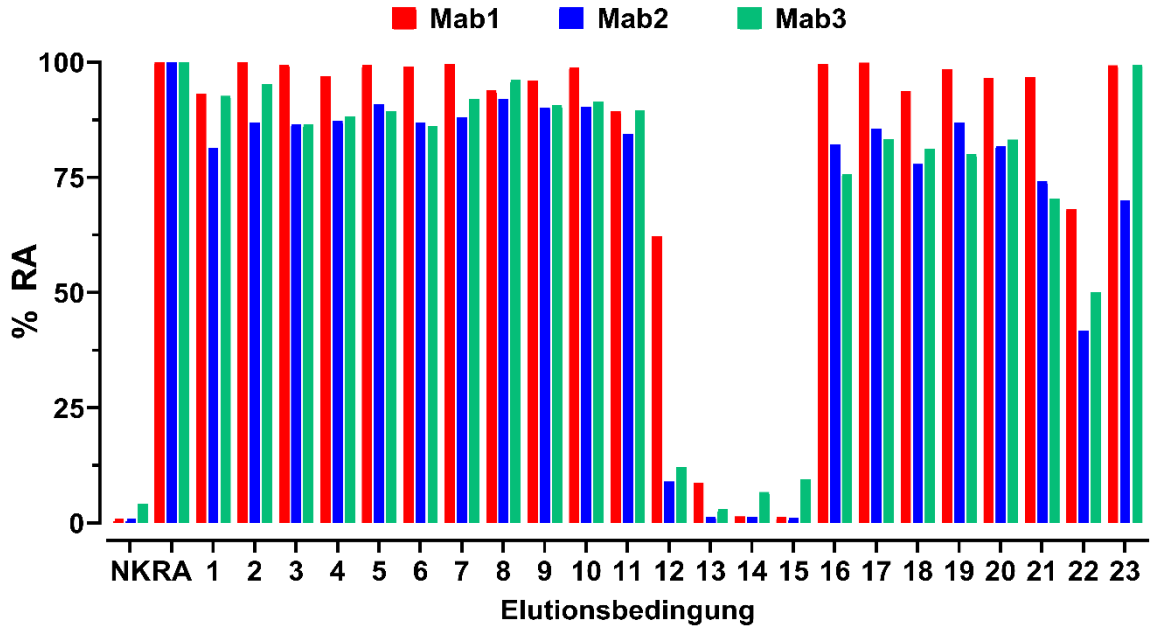


Abbildung 12: FLIA-Bewertung der Prä-Bindungs-Inkubation potenzieller Elutionsbedingungen.

Multiplexer FLIA zur funktionalen Bewertung der potenziellen Elutionsbedingungen aus Tabelle 6 für die antikörperbasierte Affinitätschromatographie mit Ansatz Prä-Bindungs-Inkubation. Analyse Elutionsbedingungen für Antikörper-Affinitätschromatographie. NK = Puffer 24 als Negativkontrolle ohne Referenzantigen. Als Referenz (RA) diente das beschriebene Rubella-Referenzantigen; dessen Reaktivität in MFI wurde als 100 % normiert. Mab1: rot, Mab2: blau, Mab3: grün. Beispielhafte Darstellung der dreiminütigen Inkubation mit der jeweiligen Elutionsbedingung.

Die Reaktivität des Referenzantigens ohne Elutionsbedingung in Form der MFI-Werte wurde als Referenz (RA) auf 100 % normiert und die Signale der einzelnen Elutionsbedingungen prozentual dazu angegeben. Eine Negativkontrolle ohne Referenzantigen mit Puffer 24 (NK) wurde ebenfalls berücksichtigt. In Abbildung 12 ist erkennbar, dass die Puffer 12 bis 15 (3–6 M Guanidin-HCl) im Ansatz Prä-Bindungs-Inkubation zu einer drastischen Reduktion des Fluoreszenzsignals auf < 10 % bei nahezu allen getesteten Antikörpern führten. Dies deutet darauf hin, dass diese Bedingungen die Konformation der Antikörper so verändern, dass eine Bindung des Referenzantigens nicht mehr möglich ist. Ein ähnlicher, wenngleich schwächerer Effekt, zeigte sich bei den Puffern 21 und 22 (7–8 M Harnstoff). Die übrigen Elutionsbedingungen beeinflussten die Antigenbindung hingegen kaum, mit Signalintensitäten von > 80 % im Vergleich zur Referenz.

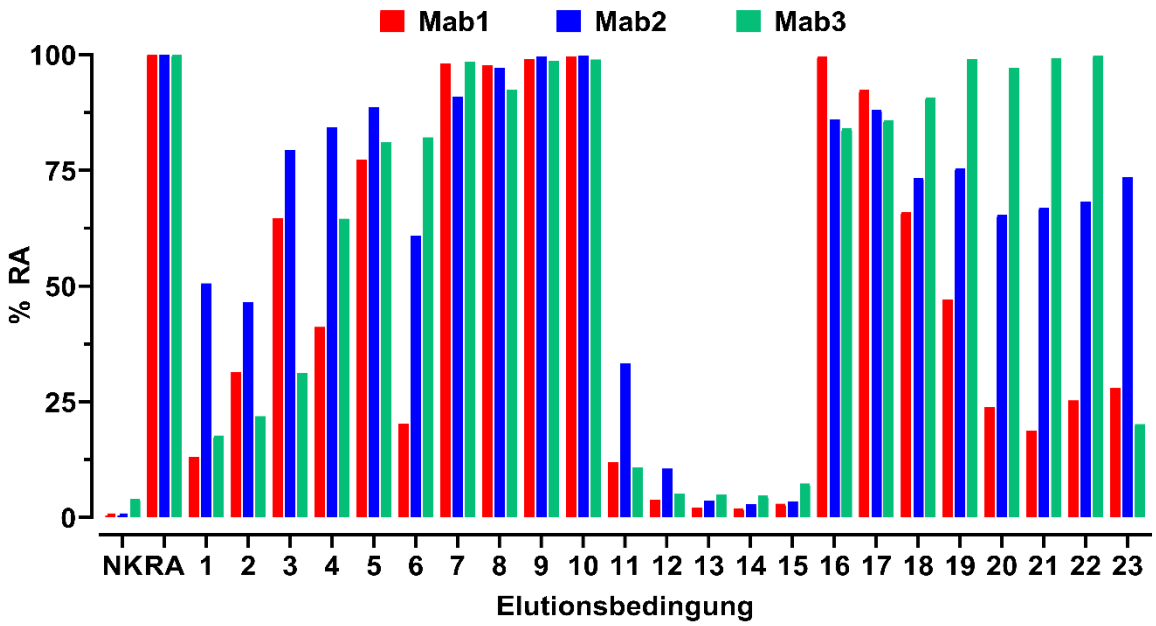


Abbildung 13: FLIA-Bewertung der Post-Bindungs-Inkubation potenzieller Elutionsbedingungen.

Multiplexer FLIA zur funktionalen Bewertung der potenziellen Elutionsbedingungen aus Tabelle 6 für die antikörperbasierte Affinitätschromatographie mit Ansatz Post-Bindungs-Inkubation. Analyse Elutionsbedingungen für Antikörper-Affinitätschromatographie. NK = Puffer 24 als Negativkontrolle ohne Referenzantigen. Als Referenz (RA) diente das beschriebene Rubella-Referenzantigen; dessen Reaktivität in MFI wurde als 100 % normiert. Mab1: rot, Mab2: blau, Mab3: grün. Beispielhafte Darstellung der dreiminütigen Inkubation mit der jeweiligen Elutionsbedingung.

In Abbildung 13 wird deutlich, dass die Elutionsbedingungen 1 (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5), 6 (0,1 M Triethanolamin, pH 11,5), 11 (2 M Guanidin-HCl) und 21 (7 M Harnstoff) in Kombination mit dem mAK Mab1 eine starke Reduktion des Fluoreszenzsignals auf < 20 % bewirkten. Für die mAK Mab3 traten bei Elutionsbedingung 1 und 11 ähnliche Effekte auf. Dies weist auf geeignete Bedingungen für die Elution des gebundenen Referenzantigens vom jeweiligen mAK hin. Für Mab2 konnte mit denselben Elutionsbedingungen lediglich eine Reduktion des Fluoreszenzsignals auf 50 % (Bedingung 1) bzw. 60 % (Bedingung 6) erzielt werden, was auf eine besonders starke Bindung dieses Antikörpers zum Referenzantigen hindeutet. Aufgrund der potenziell schädigenden Wirkung auf Konformität und Struktur der Antikörper und des Zielproteins wurden die Elutionsbedingungen 11 und 21 von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen.

Zusammenfassend erwiesen sich die Elutionsbedingungen 1 (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5) und 6 (0,1 M Triethanolamin, pH 11,5) in Kombination mit dem mAK Mab1 als besonders geeignet für die Etablierung der antikörperbasierten Affinitätschromatographie. Beide Bedingungen führten in der Prä-Bindungs-Inkubation zu keiner nennenswerten Reduktion des detektierten Signals im Vergleich zur

Referenz, sodass davon auszugehen ist, dass weder die strukturelle Integrität noch die funktionelle Bindungsfähigkeit des immobilisierten Antikörpers beeinträchtigt wurden. Gleichzeitig verursachten diese Bedingungen in der Post-Bindungs-Inkubation eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals, was als Hinweis auf eine hohe Elutionseffizienz und damit eine effektive Dissoziation des Rubella-Referenzantigens vom Antikörper interpretiert wurde. Damit wurden die Elutionsbedingungen 1 und 6 als geeignete Kandidaten für die weitere Prozessentwicklung festgelegt.

Ergänzend wurde eine externe Bindungsstudie (2bind GmbH) zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der eingesetzten mAK sowie zur Auswahl eines geeigneten Liganden für die Etablierung der Antikörper-Affinitätschromatographie durchgeführt (vgl. 3.2.3.1.3). Die Analysen zeigten, dass sowohl Mab1 als auch Mab2 eine konzentrationsabhängige Interaktion mit Rubella-VLPs aufwiesen und Affinitäten im ein- bis zweistelligen Nanomolarbereich besitzen. Für die Antikörper wurden folgende Kinetik- und Affinitätsparameter bestimmt:

Mab1: k_a ($M^{-1}s^{-1}$) = $1{,}3 \times 10^5$; k_d (s^{-1}) = $4{,}6 \times 10^{-3}$; K_D (M) = $3{,}6 \times 10^{-8}$

Mab2: k_a ($M^{-1}s^{-1}$) = $8{,}1 \times 10^4$; k_d (s^{-1}) = $2{,}7 \times 10^{-4}$; K_D (M) = $3{,}3 \times 10^{-9}$.

Eine erhöhte Assoziationsrate (k_a) zeigt eine schnellere Komplexbildung zwischen Antikörper und Rubella-VLPs an; hier lag Mab1 leicht über Mab2. Die Dissoziationsrate (k_d) ist ein Maß für die Stabilität des Antikörper-Antigen-Komplexes. Mab2 zeigte eine deutlich geringe k_d als Mab 1, was auf eine wesentlich stabilere Bindung hinweist. Die Affinitätskonstante (K_D) beschreibt die Gesamtbindungsstärke; kleinere Werte reflektieren eine höhere Affinität. Mab2 wies mit einem rund zehnfach niedrigeren K_D eine deutlich stärkere Bindung an Rubella-VLPs auf als Mab 1.

Eine Bindung an die Negativkontrolle (Chikungunya-VLPs) konnte für keinen der Antikörper nachgewiesen werden, was die hohe Spezifität bestätigt. Mab3 zeigte unter den verwendeten Bedingungen keine Bindung an Rubella-VLPs. Auffällig war darüber hinaus, dass eine vollständige Elution der Rubella-VLPs von Mab2 unter den getesteten Bedingungen kaum möglich war, wohingegen Mab 1 eine vollständige und rasche Dissoziation erlaubte. Dieses Verhalten korrespondiert mit den kinetischen Parametern und den Ergebnissen der zuvor durchgeführten multiplexen Bead-Assays zur Bestimmung geeigneter Elutionsbedingungen. Die Befunde deuten darauf hin, dass Mab1 und Mab2 unterschiedliche Epitope auf den Rubella-VLPs erkennen, die jeweils eine unterschiedliche Bindungsstärke erzeugen.

Vor diesem Hintergrund wurde Mab1 für die weitere Prozessentwicklung ausgewählt, da für eine effiziente antikörperbasierte Affinitätschromatographie sowohl eine ausreichend starke Bindung während des Probenauftrags als auch eine vollständige Dissoziation während der Elution notwendig ist. Beide Anforderungen werden durch Mab1 erfüllt.

4.3.1.2. Auswahl der Chromatographiematrices und -bedingungen

Für die initialen Versuchsreihen wurden die Chromatographiesäulen Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 sowie Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 durch kovalente Immobilisierung des mAK Mab1 hergestellt. Die Effizienz der Immobilisierung wurde mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.8.5) analysiert. Beispielhaft ist in Abbildung 14 das Ergebnis für die Säule Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 dargestellt.

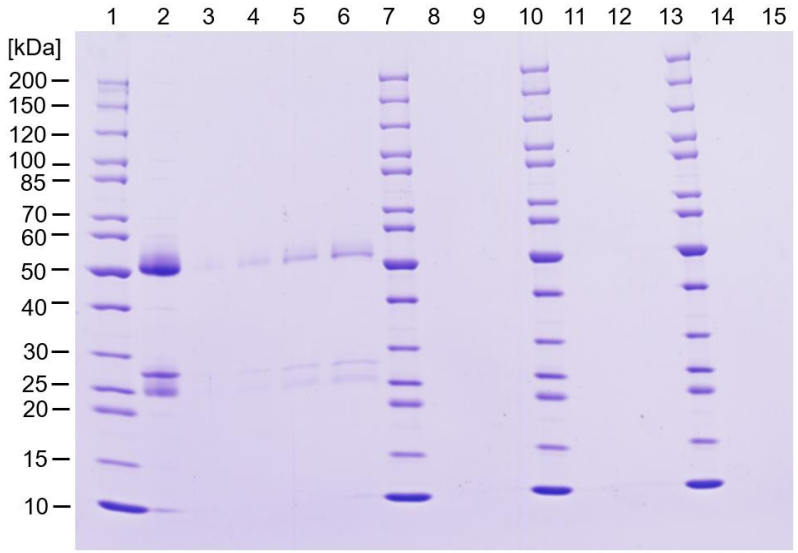


Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierung von Mab1 an NHS-activated HP.

SDS-PAGE mit Coomassie-Blaufärbung zur Immobilisierung des mAK Mab1 an die Chromatographiematrix 1 mL NHS-activated HP von Cytiva. Herstellung der Chromatographiesäule Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1. Das MW des Antikörpers war nicht bekannt. Gelbelegung der Proben: 1 = Proteinmarker, 2 = Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) 1x (= 2 µg), 3 = Antikörperlösung nach der Immobilisierung (n.I.) 1x, 4 = Antikörperlösung n.I. 2,5x, 5 = Antikörperlösung n.I. 5x, 6 = Antikörperlösung n.I. 10x, 7 = Proteinmarker, 8 = Blockierungsschritt 1 1x, 9 = Blockierungsschritt 1 10x, 10 = Proteinmarker, 11 = Blockierungsschritt 2 1x, 12 = Blockierungsschritt 2 10x, 13 = Proteinmarker, 14 = Waschschritt 1x, 15 = Waschschritt 10x.

Der Vergleich der relativen Proteinbandenintensität der Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) und nach der Immobilisierung (n.I.) erlaubt Rückschlüsse auf die Immobilisierungseffizienz des Antikörpers. Für die Antikörperlösung vor der Immobilisierung wurde eine definierte Proteinmenge von 2 µg eingesetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Probe nach der Immobilisierung in einem entsprechend

höheren (2,5x; 5x; 10x) Volumen im Verhältnis zur Ausgangsprobe aufgetragen. Während im direkten Vergleich identischer Probenvolumina (v.I. 1x, n.I. 1x) nach Immobilisierung (Probe 3) kaum Proteinbanden sichtbar sind, nimmt die Intensität der Banden mit steigendem Probenvolumen der Fraktionen nach Immobilisierung (Proben 3-6) zu. Dies weist auf eine weitgehende Kopplung des mAK aus der Probe vor Immobilisierung (Probe 2) hin. Die Immobilisierungseffizienz des mAK an die Chromatographiematrix wurde anhand der Abnahme der Bandenintensität visuell mit dem bloßen Auge auf > 95 % geschätzt. In den Fraktionen der Blockierungs- und Waschschritte (Proben 8-9, 11-12, 14-15) waren keine Proteinbanden nachweisbar, was als Hinweis auf eine erfolgreiche kovalente Kopplung des Antikörpers an die Chromatographiematrix interpretiert wurde.

Im nächsten Schritt wurde das Potenzial der hergestellten Chromatographiesäulen für die affinitätschromatographische Reinigung der Rubella-VLPs anhand des Rubella-Referenzantigens untersucht. Die Chromatogramme der durchgeführten Läufe sind in Abbildung 15 dargestellt.

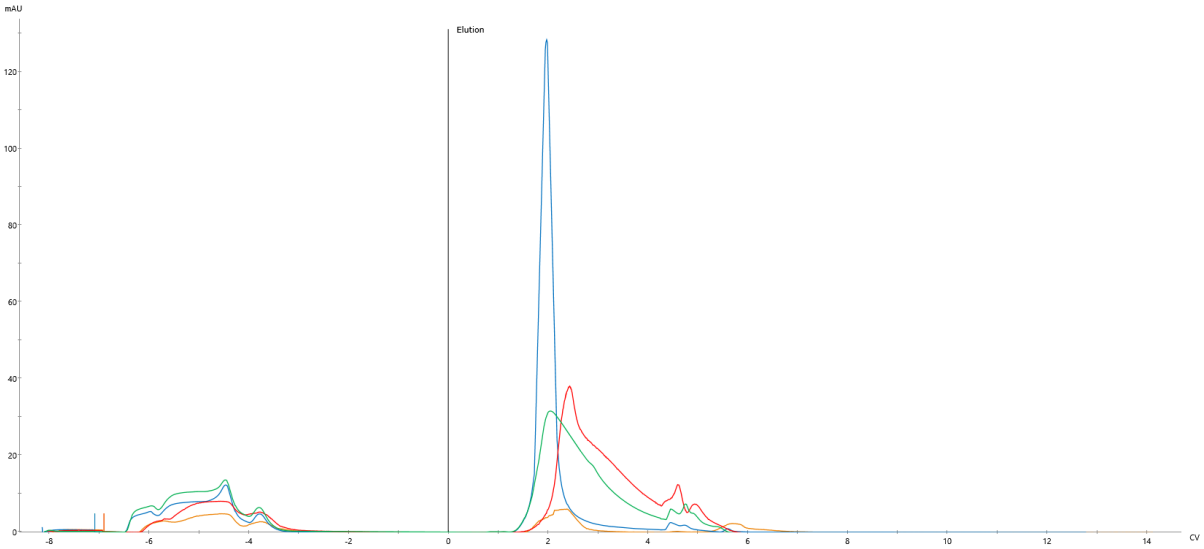


Abbildung 15: Chromatogramme Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1 und GoBio Mini ACT Mab1.

Chromatogramme der Antikörper-Affinitätschromatographien mit den Chromatographiesäulen Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 und Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1. Austestung der Elutionsbedingungen 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 und 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5. Einsatz des Rubella-Referenzantigens zur Charakterisierung der Chromatographiesäulen. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 mit 0,1 M Triethanolamin pH 11,5: grün, Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5: blau, Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 mit 0,1 M Triethanolamin pH 11,5: rot, Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5: orange.

Die Chromatographieläufe mit dem Puffer 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 zeigten bei beiden Chromatographiesäulen Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 (grün) und

GoBio Mini ACT Mab1 (rot) im Elutionsschritt vergleichbare Absorptionssignale. Auch die berechneten Peakflächen der Elutionsfraktionen lagen bei ähnlichen Werten (Bio-Works: 45,1 mL × mAU; Cytiva: 40,5 mL × mAU).

Besonders auffällig war, dass die Cytiva 1 mL HiTrap NHS-activated HP Mab1-Säule in Kombination mit dem Elutionspuffer 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5 (blau) ein sehr schmales Elutionsprofil mit hoher Absorption zeigte. Die resultierende Peakfläche von 39,5 mL × mAU war damit vergleichbar mit der unter basischen Elutionsbedingungen erzielten. Im Gegensatz dazu konnte mit der Bio-Works-Säule unter identischen Bedingungen nahezu kein Zielprotein eluiert werden (Peakfläche: 5,2 mL × mAU; orange).

Die in der Affinitätschromatographie detektierten Peakflächen wurden als Referenzgröße für die Menge des eluierten Zielproteins herangezogen. Die zugrunde liegende Korrelation zwischen Peakfläche und tatsächlicher Proteinkonzentration wurde mittels Rubella-FLIA überprüft (Abbildung 16).

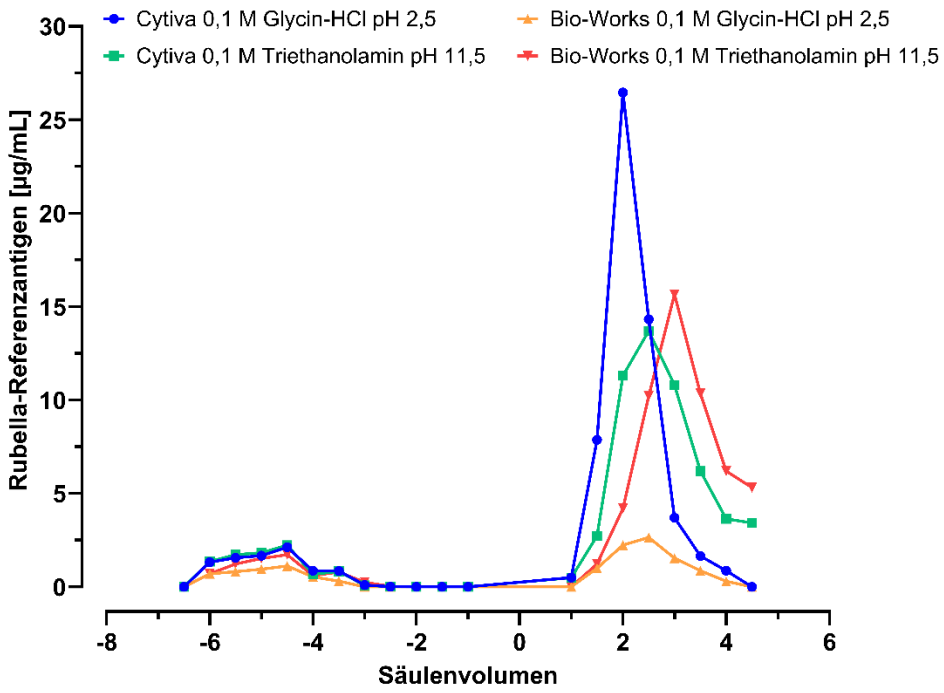


Abbildung 16: Rubella-FLIA Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1 und GoBio Mini ACT Mab1.

Konzentrationsbestimmung des Rubella-Referenzantigens mittels Rubella-FLIA in ausgewählten Fraktionen (0,5 mL) der Antikörper-Affinitätschromatographien mit den Chromatographiesäulen Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 und Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1. Austestung der Elutionsbedingungen 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 und 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5. Einsatz des Rubella-Referenzantigens zur Charakterisierung der Chromatographiesäulen. y-Achse: Rubella-Referenzantigen [µg/mL], x-Achse: Säulenvolumen (SV).

Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 mit 0,1 M Triethanolamin pH 11,5: grün, Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5: blau, Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 mit 0,1 M Triethanolamin pH 11,5: rot, Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5: orange.

Hierzu wurden ausgewählte Fraktionen des FT (SV: -6,5 bis -4), der Waschschritte (SV: -4 bis 0) sowie der Elutionsschritte (SV: 0 bis +4,5) aus den in Abbildung 15 dargestellten Antikörper-Affinitätschromatographien hinsichtlich der Konzentration an Rubella-Referenzantigen quantifiziert. Der Verlauf der Absorptionssignale aus den Chromatographien stimmte mit den FLIA-basierten Konzentrationsbestimmungen überein. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die eingesetzte Referenzprobe weitgehend frei von Proteinverunreinigungen war. Der Hauptteil des eingesetzten Rubella-Referenzantigens wurde in den Elutionsfraktionen detektiert (> 79,8 % ±2,4 SD), während nur geringe Mengen im FT (< 10,5 % ±1,7 SD) und in den Waschschritten (< 1,5 % ±0,1 SD) nachweisbar waren. Leichte Abweichungen zur eingesetzten Gesamtmenge ergaben sich daraus, dass nicht alle Chromatographie Fraktionen analytisch erfasst wurden. Die Daten des Chromatographielaufs „Bio-Works 1 mL GoBio Mini ACT Mab1 mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5“ wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Das in dieser Bedingung beobachtete geringe Absorptionssignal sowie die entsprechend niedrige mittels Rubella-FLIA quantifizierte Proteinmenge in der Elutionsfraktion (12,8 % der Gesamtmenge) deuten auf eine unzureichende Eignung dieser Elutionsbedingung in Kombination mit der Chromatographiesäule hin. Mögliche Ursachen wie eine ineffiziente Dissoziation des Antikörper-Antigen-Komplexes wurden an dieser Stelle nicht weiter untersucht.
Die Übereinstimmung der chromatographischen Peakverläufe mit den FLIA-Quantifizierungen bestätigte die Funktionalität der Chromatographiesäulen und belegte eine erfolgreiche Immobilisierung der mAK an die Chromatographiematrix.
Das schmale Elutionsprofil der Cytiva-Säule in Kombination mit 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5, führte zu einem geringen Fraktionsvolumen und damit zu einer erhöhten Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen. Aufgrund dieser Vorteile wurden diese Bedingungen in der weiteren Prozessentwicklung eingesetzt.

4.3.1.3. Antikörper-Affinitätschromatographie zur präparativen Reinigung von Rubella Virus-like Particles

Im nächsten Schritt wurden die ausgewählten Chromatographie Bedingungen auf ihre Eignung zur präparativen Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen überprüft. In Abbildung 17 ist das resultierende Chromatogramm dargestellt, während Abbildung 18 die Analyse der Chromatographie Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigt.

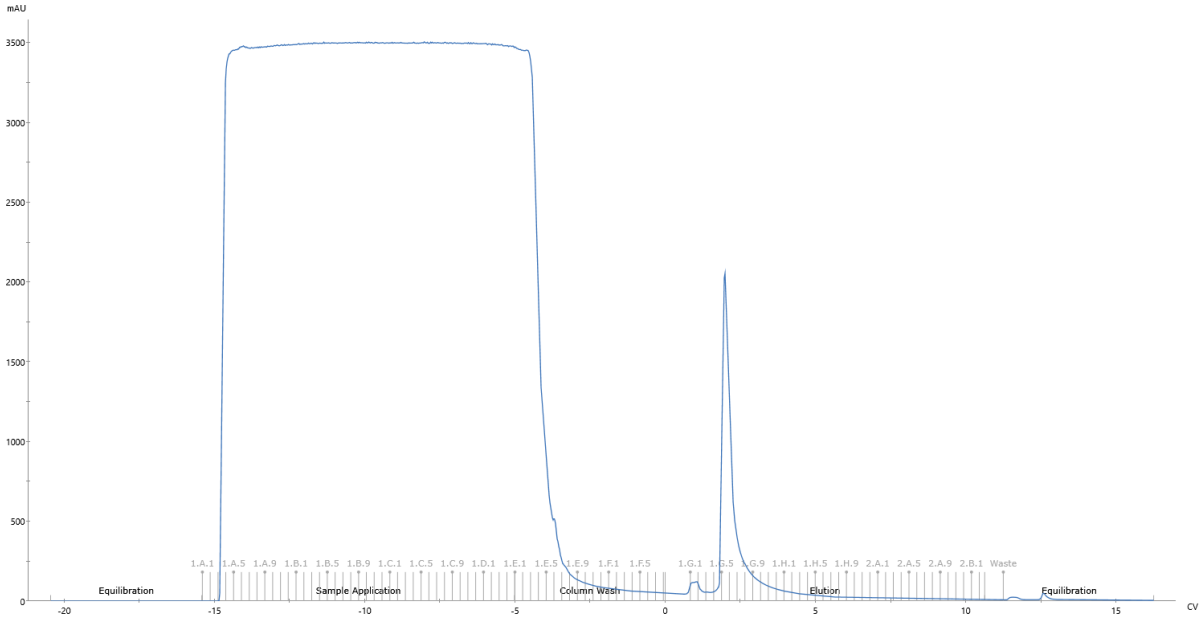


Abbildung 17: Antikörper-Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1.

Chromatogramm der Antikörper-Affinitätschromatographie mit Chromatographiesäule Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 und Elutionsbedingung 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5. Austestung der ausgewählten Chromatographie Bedingungen auf Eignung zur präparativen Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Das Chromatogramm zeigt, dass beim Probenauftrag das Absorptionssignal den oberen Messbereich des UV-Detektors erreichte, was auf das Vorhandensein zahlreicher Proteinkomponenten im Zellkulturüberstand hinweist. Dieser Befund wurde durch die entsprechende SDS-PAGE-Analyse (Proben 3 und 4) bestätigt. Nach Durchführung des Waschschrittes konnte das UV-Signal erwartungsgemäß auf ein Niveau nahe null reduziert werden. Der Verlauf der Elution entsprach den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente (vgl. Abbildung 15) und wies erneut ein schmales Elutionsprofil mit hoher Absorption auf.

Das Vorhandensein der Rubella-VLPs in den Elutionsfraktionen konnte mittels SDS-PAGE bestätigt werden (Abbildung 18). Hierbei waren die drei charakteristischen Strukturproteine deutlich nachweisbar: das Kapsidprotein (ca. 33 kDa), gpE2 (ca. 45 kDa) sowie gpE1 (ca. 58 kDa). Die Proteingrößen können aufgrund von Glykosylierungen leicht variieren, wobei die spezifischen Glykosylierungsmuster durch das verwendete Expressionssystem sowie die Kulturbedingungen beeinflusst werden können [28, 130].

Die Reinheit der Rubella-VLPs in den Elutionsfraktionen wurde auf > 90 % geschätzt (vgl. 3.2.8.5). Mit abnehmender Absorption im Chromatogramm reduzierte sich ebenfalls der Anteil an Rubella-VLPs in den korrespondierenden Fraktionen. Das

Proteinbandenmuster der aufgereinigten Rubella-VLPs entsprach dem des eingesetzten Referenzantigens.

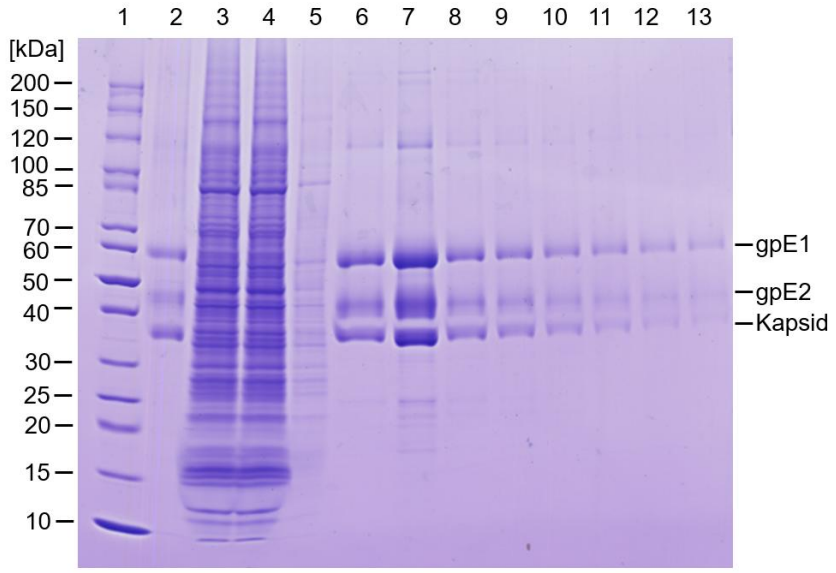


Abbildung 18: SDS-PAGE-Analyse zur Affinitätschromatographie mit NHS-activated HP Mab1.

SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie-Blaufärbung zur Antikörper-Affinitätschromatographie mit Chromatographiesäule Cytiva 1 mL NHS-activated HP Mab1 und Elutionsbedingung 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5. Austestung der ausgewählten Chromatographie Bedingungen auf Eignung zur präparativen Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen. Gelbelegung der Proben: 1 = Proteinmarker, 2 = Rubella-Referenzantigen (2 µg), 3 = Zellkulturüberstand, 4 = Pool FT Probenauftrag, 5 = Waschschritt, 6 = Elution Fraktion 5, 7 = Elution Fraktion 6, 8 = Elution Fraktion 7, 9 = Elution Fraktion 8, 10 = Elution Fraktion 9, 11 = Elution Fraktion 10, 12 = Elution Fraktion 11, 13 = Elution Fraktion 12. MW Rubella Kapsidprotein: ca. 33 kDa; MW Rubella gpE2: ca. 42-47 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW Rubella gpE2: ca. 31 kDa; MW gpE1: ca. 56 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW gpE1: ca. 51 kDa [19].

Für eine erste systematische Anpassung der chromatographischen Prozessparameter wurde die Flussgeschwindigkeit gezielt variiert. Zunächst erfolgte eine Variation während des Probenauftrags (156 cm/h, 78 cm/h, 16 cm/h) bei konstanter Flussgeschwindigkeit der Elution (156 cm/h). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Flussgeschwindigkeit der Elution verändert (156 cm/h, 78 cm/h, 39 cm/h, 16 cm/h), während der Probenauftrag jeweils mit konstanter Flussgeschwindigkeit (16 cm/h) durchgeführt wurde. Das eingesetzte Probenmaterial sowie das Probenauftragsvolumen wurden zwischen den Läufen konstant gehalten, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Auf Grundlage der Analyse der größten Peakflächen der Elutionsfraktionen konnten eine lineare Flussgeschwindigkeit von 16 cm/h für den Probenauftrag sowie von 156 cm/h für die Elution als optimale Prozessparameter für zukünftige Chromatographien definiert werden. Die detaillierten Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

4.3.1.4. Auswahl und weiterführende Evaluation geeigneter Chromatographiematrices

Neben der Anpassung der Prozessparameter wurden alternative Chromatographiematrices hinsichtlich ihrer Eignung für die antikörperbasierte Aufreinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen in eigenen Vorexperimenten evaluiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Ziel dieser Untersuchungen war zum einen die Berücksichtigung der teils stark variierenden Kosten vergleichbarer Chromatographiematrices, die im Rahmen eines Upscaling des DSP einen wesentlichen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit haben können. Zum anderen sollten die technischen Eigenschaften der Materialien bewertet werden, um die Grundlage für die Etablierung eines skalierbaren und robusten Reinigungsprozesses zu schaffen.
Darüber hinaus wurde neben der chromatographischen Anwendung im Säulenformat geprüft, inwieweit eine Batch-basierte Aufarbeitung ohne Säulenformat eine praktikable und ressourcenschonende Alternative darstellt. Auf Basis der Ergebnisse dieser Vorversuche wurden für die weitere Prozessentwicklung des DSP die beiden Matrices „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“ sowie „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ ausgewählt.

4.3.1.4.1. Strategien zur Ligandenimmobilisierung

Für die Experimente zum Einfluss der Kopplungsart auf die Reinigungsleistung der Säule wurde die Chromatographiematrix „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“ in Kombination mit einer Tricorn™ 5/50-Säule eingesetzt. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der beiden hergestellten Chromatographiesäulen dargestellt, bei denen der mAK entweder über Batch-Kopplung (rot) oder über In-Column-Kopplung (blau) immobilisiert wurde.

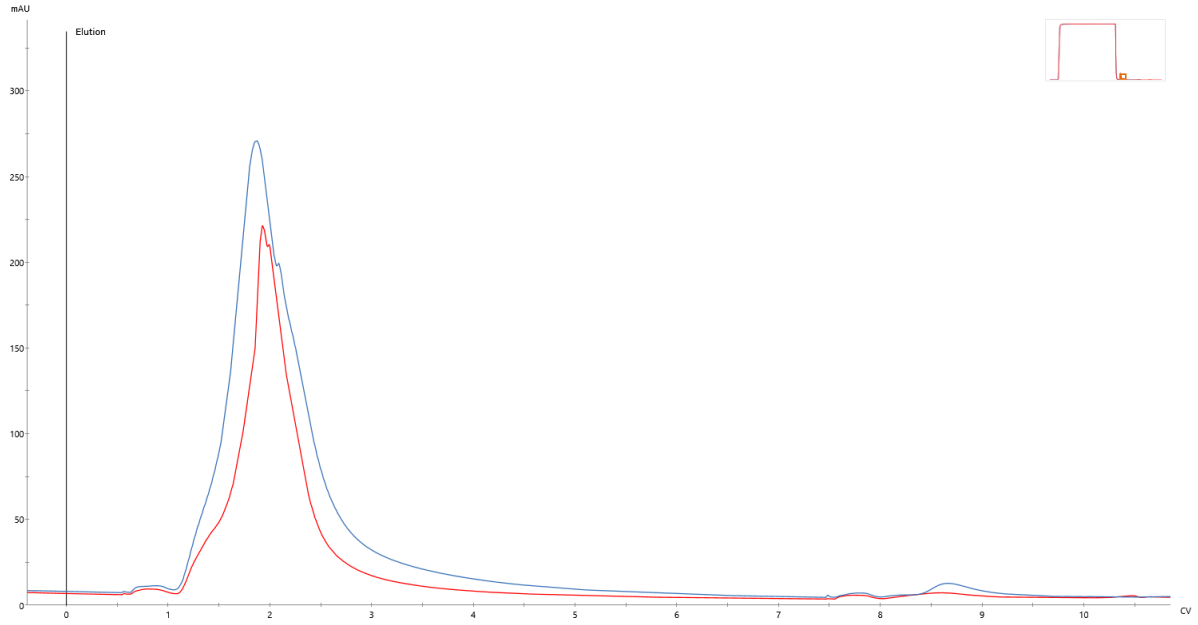


Abbildung 19: Strategien zur Ligandenimmobilisierung.

Vergleich der beiden Kopplungsarten bei identischem Volumen (100 mL) und Art des Ausgangsmaterials (Zellkulturüberstand aus Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie zur Expression von Rubella-VLPs): Batch-Kopplung (rot, Säule: 1-361_1, Peakfläche: 142,6 mL × mAU) und In-Column-Kopplung (blau, Säule: 1-361, Peakfläche: 243,1 mL × mAU). Überlagerung der Ausschnitte des Elutionsschritts (Elutionsbedingung 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5) aus den Chromatogrammen der jeweiligen Antikörper-Affinitätschromatographien. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Obwohl beide Chromatogramme einen vergleichbaren Verlauf des Absorptionssignals bei 280 nm aufzeigen, ergab sich ein deutlicher Unterschied in den Peakflächen. Die Säule mit In-Column-Kopplung (Säule 1-361, blau, Peakfläche: 243,1 mL × mAU) wies eine um ca. 40 % größere Peakfläche auf als die Säule mit Batch-Kopplung (Säule: 1-361_1, rot, Peakfläche: 142,6 mL × mAU). Da die Prozessparameter in beiden Ansätzen identisch waren, ist dieser Unterschied unmittelbar auf die höhere Reinigungsleistung der In-Column-Kopplung zurückzuführen. Die Reinigungsleistung der Säulen wurde hierbei über die zwei Kriterien definiert:

- die Effizienz der Bindung des Zielproteins an die Säule und
- die vollständige Elution des gebundenen Zielproteins.

Die Ergebnisse der beiden Kopplungsansätze wurden ergänzend durch die quantitative Analyse der Chromatographie Fraktionen (Probenauftrag, FT, Wasch- und Elutionsfraktionen) mittels Rubella-FLIA bestätigt. In den Elutionsfraktionen der In-Column-Kopplung wurden 0,20 mg Rubella-VLPs detektiert, während im Ansatz der Batch-Kopplung lediglich 0,08 mg Rubella-VLPs quantifiziert wurden.

Im Hinblick auf die Immobilisierungseffizienz des mAK an die Matrix zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Verfahren. Die Effizienz lag in beiden Fällen - basierend

auf dem Vergleich der Bandenintensitäten gemäß Abbildung 14 - bei geschätzt > 95 % (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die In-Column-Kopplung gegenüber der Batch-Kopplung eine deutlich höhere Leistungsfähigkeit bei der affinitätschromatographischen Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen aufweist und daher für die weitere Prozessentwicklung eingesetzt wurde.

4.3.1.4.2. Funktionelle Evaluierung der Tricorn™ 5/50 Chromatographiesäulen

Für die vergleichende Analyse der Reinigungsleistung unterschiedlicher Chromatographiematrices wurden die nach identischem Pack- und Immobilisierungsvorgang hergestellten Chromatographiesäulen 1-361 (NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow) und 1-361_2 (NHS-Activated Sepharose™ High Performance) eingesetzt. In Bezug auf die Immobilisierungseffizienz des mAK an die Matrix zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Chromatographiematrices. Die Effizienz lag jeweils bei geschätzt > 95 % (Abbildung 20).

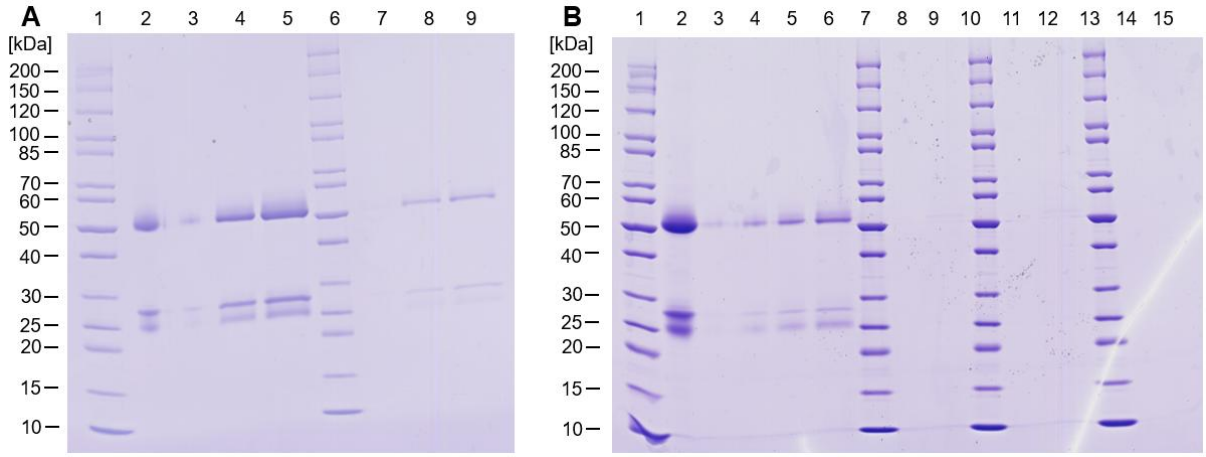


Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierungseffizienz von 1-361 und 1-361_2.

SDS-PAGE mit Coomassie-Blaufärbung zur Immobilisierung des mAK Mab1 an die Chromatographiematrices NHS-activated Sepharose 4FastFlow und NHS-activated HP. Herstellung der Chromatographiesäulen A: 1-361 (NHS-activated Sepharose 4FastFlow) und B: 1-361_2 (NHS-activated HP). Das MW des Antikörpers war nicht bekannt.

Gelbelegung der Proben in A: 1 = Proteinmarker, 2 = Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) 1x (= 2 µg), 3 = Antikörperlösung nach der Immobilisierung (n.I.) 1x, 4 = Antikörperlösung n.I. 10x, 5 = Antikörperlösung n.I. 20x, 6 = Proteinmarker, 7 = Blockierungsschritt 1 1x, 8 = Blockierungsschritt 1 10x, 9 = Blockierungsschritt 1 20x.

Gelbelegung der Proben in B: 1 = Proteinmarker, 2 = Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) 1x (= 2 µg), 3 = Antikörperlösung nach der Immobilisierung (n.I.) 1x, 4 = Antikörperlösung n.I. 5x, 5 = Antikörperlösung n.I. 10x, 6 = Antikörperlösung n.I. 20x, 7 = Proteinmarker, 8 = Blockierungsschritt 1 1x, 9 = Blockierungsschritt 1 20x, 10 = Proteinmarker, 11 = Blockierungsschritt 2 1x, 12 = Blockierungsschritt 2 20x, 13 = Proteinmarker, 14 = Waschschritt 1 1x, 15 = Waschschritt 1 20x.

Das Volumen des eingesetzten Ausgangsmaterials wurde variiert (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL). Exemplarisch sind in Abbildung 21 die Chromatogramme der Läufe mit einem Probenvolumen von 50 mL dargestellt.

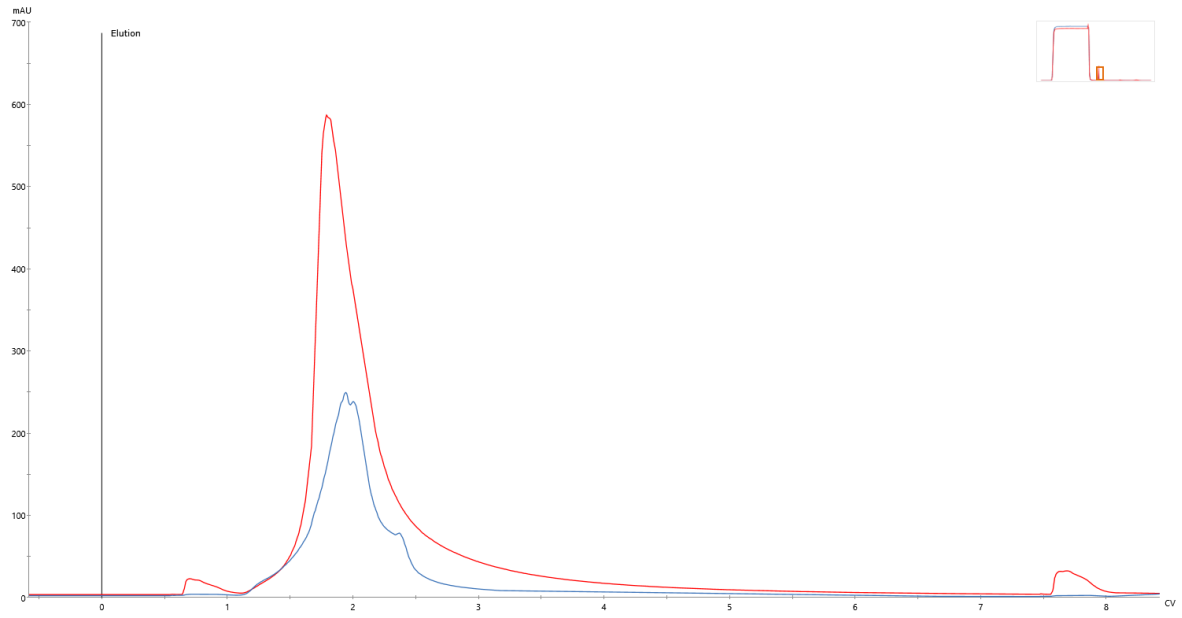


Abbildung 21: Funktionelle Evaluierung der Tricorn™ 5/50 Chromatographiesäulen.

Funktionelle Evaluierung selbst-gepackter Tricorn™ 5/50 Antikörper-Affinitätschromatographiesäulen zur Reinigung von Rubella-VLPs. Vergleich der beiden Chromatographiematrices bei identischem Volumen (50 mL) und Art des Ausgangsmaterials (Zellkulturüberstand aus Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie zur Expression von Rubella-VLPs): NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow (blau, Säule: 1-361, Peakfläche: 151,8 mL × mAU) und NHS-Activated Sepharose™ High Performance (rot, Säule: 1-361_2, Peakfläche: 339,3 mL × mAU). Überlagerung der Ausschnitte des Elutionsschritt (Elutionsbedingung 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5) aus den Chromatogrammen der jeweiligen Chromatographieläufe. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Die Säule 1-361_2 (NHS-Activated Sepharose™ High Performance, rot) zeigte eine deutlich gesteigerte Reinigungsleistung im Vergleich zur Säule 1-361 (NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow, blau). Dies spiegelt sich in der erreichten Peakfläche wider, die bei 339,3 mL × mAU für die High Performance Matrix lag, während die Fast Flow Matrix lediglich eine Peakfläche von 151,8 mL × mAU aufwies. Damit wurde eine Steigerung der Peakfläche um 41 % erzielt, was auf eine höhere Bindekapazität der High Performance Matrix für das Zielprotein hinweist.

Diese Beobachtungen wurden durch die SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen bestätigt. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen der jeweiligen Chromatographieläufe beider Matrices direkt miteinander verglichen. Da für alle Proben identische Auftragsvolumina verwendet wurden, konnte die Bandenintensität der Rubella-Strukturproteine (Kapsidprotein, gpE1 und gpE2) unmittelbar gegenübergestellt werden.

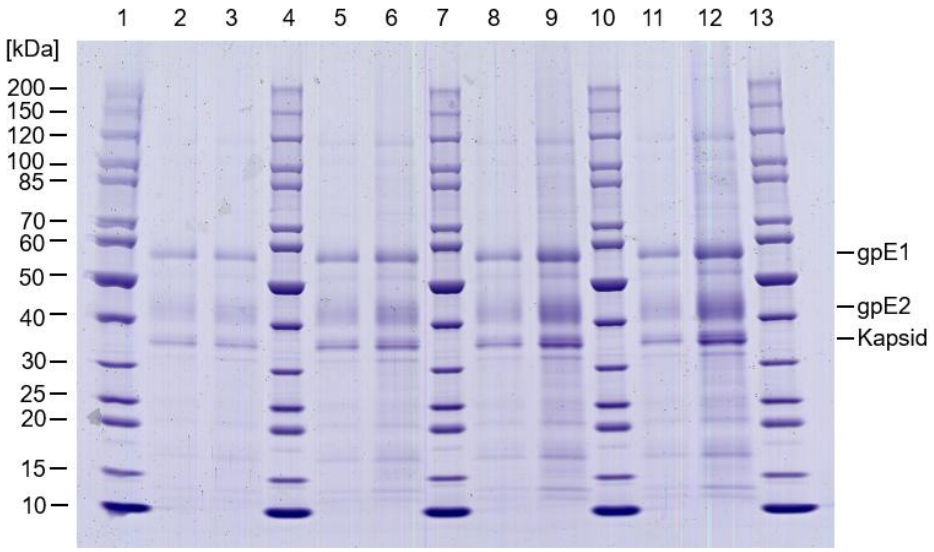


Abbildung 22: SDS-PAGE-Analyse zur funktionelle Evaluierung der Tricorn™ 5/50 Chromatographiesäulen.

Funktionelle Evaluierung selbst-gepackter Tricorn™ 5/50 Antikörper-Affinitätschromatographiesäulen zur Reinigung von Rubella-VLPs. Vergleich der Elutionsfraktionen bei Anwendung beider Chromatographiematrices NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow (FF) und NHS-Activated Sepharose™ High Performance (HP) bei variierendem Volumen (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL) und gleichbleibendem Ausgangsmaterial (Zellkulturüberstand aus Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie zur Expression von Rubella-VLPs). Gelbelegung der Proben: 1 = Proteinmarker, 2 = FF 25 mL, 3 = HP 25 mL, 4 = Proteinmarker, 5 = FF 50 mL, 6 = HP 50 mL, 7 = Proteinmarker, 8 = FF 100 mL, 9 = HP 100 mL, 10 = Proteinmarker, 11 = FF 200 mL, 12 = HP 200 mL, 13 = Proteinmarker. MW Rubella Kapsidprotein: ca. 33 kDa; MW Rubella gpE2: ca. 42-47 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW Rubella gpE2: ca. 31 kDa; MW gpE1: ca. 56 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW gpE1: ca. 51 kDa [19].

Mit zunehmendem Volumen des eingesetzten Ausgangsmaterials nahm die Intensität der Rubella-spezifischen Proteinbanden konsistent zu. Über alle Volumina hinweg zeigte sich, dass die Banden der Elutionsfraktionen aus der Reinigung mit der „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ intensiver ausgeprägt waren als jene aus der „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“. Die Reinheit des Zielproteins wurde für alle untersuchten Proben anhand Abbildung 22 auf > 90 % geschätzt. Insgesamt belegen diese Ergebnisse eine deutliche Verbesserung der chromatographischen Leistungsfähigkeit durch den Einsatz der High Performance Matrix.

Die Kosten der High Performance Matrix liegen etwa beim dreifachen Niveau der Fast Flow Matrix. Im Kontext des angestrebten Upscaling und der im direkten Vergleich nachgewiesenen deutlich höheren Reinigungsleistung (vgl. Abbildung 21) wird der Mehrpreis als ökonomisch vertretbar eingestuft. Unter den Kriterien Prozessleistung, Selektivität und Skalierbarkeit wurde die „NHS-Activated Sepharose™ High Performance Matrix“ für die weitere Prozessentwicklung und das Upscaling des DSP festgelegt.

4.4. Upscaling des Downstream Processing

Für das Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie wurde zunächst eine HiScale™ 16/20-Säule (4.4.1) eingesetzt, bevor im finalen Upscaling Schritt die HiScale™ 50/20-Säule als Produktionssäule (4.4.2) etabliert wurde. Beide Säulen wurden mit „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ gepackt, wobei jeweils eine Säulenbetthöhe von 10 cm angestrebt wurde.

Analog zu den Vorversuchen erfolgte die Immobilisierung des Rubella-spezifischen mAK Mab1 unmittelbar nach dem Packprozess im In-Column-Kopplungsformat. Es resultierten die HiScale™ 16/20-Säule mit der Codierung 1-375 (Säulenbetthöhe: 8 cm; Säulenvolumen: 16,1 mL) sowie die HiScale™ 50/20-Säule mit der Codierung 1-387 (Säulenbetthöhe: 9,3 cm; Säulenvolumen: 178,1 mL). Die Effizienz der Ligandenimmobilisierung wurde für beide Säulen zunächst mittels SDS-PAGE auf > 90 % geschätzt (Abbildung 23).

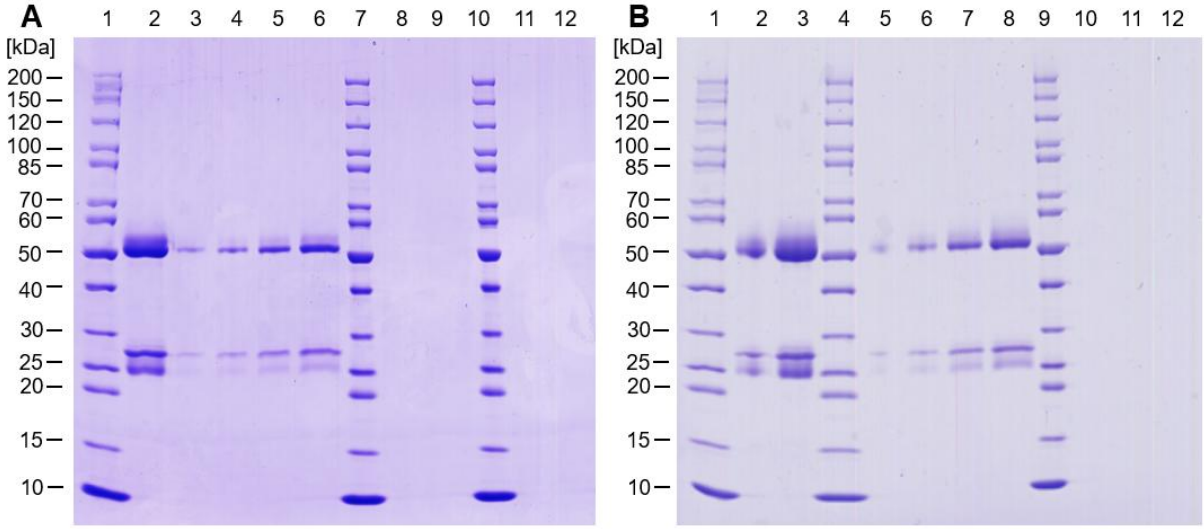


Abbildung 23: SDS-PAGE-Analyse zur Immobilisierungseffizienz von 1-375 und 1-387.

SDS-PAGE mit Coomassie-Blaufärbung zur Immobilisierung des mAK Mab1 an die Chromatographiematrix NHS-activated HP von Cytiva. Das MW des Antikörpers war nicht bekannt. Herstellung der Chromatographiesäulen A: 1-375 (HiScale™ 16/20-Säule) und B: 1-387 (HiScale™ 50/20-Säule).

Gelbelegung der Proben in A: 1 = Proteinmarker, 2 = Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) 1x (= 2 µg), 3 = Antikörperlösung nach der Immobilisierung (n.I.) 1x, 4 = Antikörperlösung n.I. 2,5x, 5 = Antikörperlösung n.I. 5x, 6 = Antikörperlösung n.I. 10x, 7 = Proteinmarker, 8 = Blockierungsschritt 1 1x, 9 = Blockierungsschritt 1 10x, 10 = Proteinmarker, 11 = Waschschritt 10x, 12 = Blockierungsschritt 2 10x,.

Gelbelegung der Proben in B: 1 = Proteinmarker, 2 = Antikörperlösung vor der Immobilisierung (v.I.) 1x (= 2 µg), 3 = Antikörperlösung v.I. 2x (= 4 µg), 4 = Proteinmarker, 5 = Antikörperlösung nach der Immobilisierung (n.I.) 1x, 6 = Antikörperlösung n.I. 2,5x, 7 = Antikörperlösung n.I. 5x, 8 = Antikörperlösung n.I. 10x, 9 = Proteinmarker, 10 = Blockierungsschritt 1 10x, 11 = Waschschritt 10x, 12 = Blockierungsschritt 2 10x.

Ergänzend wurde die Kopplungseffizienz an die Produktionssäule 1-387 über einen anti-Maus-IgG-FLIA quantifiziert (vgl. 3.2.8.1.3). Hierbei wurde die

Ausgangskonzentration der eingesetzten Antikörperlösung vor der Immobilisierung als 100 % definiert, während der im Durchfluss bestimmte Restgehalt an ungebundenem Antikörper die Probe nach der Immobilisierung darstellte. Auf dieser Basis ergab sich eine Kopplungseffizienz von 93 %, womit die Ergebnisse der SDS-PAGE bestätigt wurden.

Im Folgenden werden die ermittelten charakteristischen Leistungsparameter der beiden hergestellten Chromatographiesäulen im Rahmen des Upscaling des DSP sowie deren Einsatz für die weitere Prozessentwicklung dargestellt.

4.4.1. Upscaling Downstream Processing mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20

Für die Etablierung der finalen Prozessparameter der Antikörper-Affinitätschromatographie mit der Säule 1-375 (HiScale™ 16/20) wurde das bisher eingesetzte Tricorn™ 5/50-Säulenformat sowie die für das Upscaling vorgesehene HiScale™ 50/20-Säule als Referenz herangezogen (vgl. Tabelle 7). In diesem Zusammenhang wurden drei zentrale Aspekte systematisch untersucht:

- Prozesstemperatur: Vergleich der Prozessführung bei 4 °C gegenüber Raumtemperatur.
- Variation der linearen Flussgeschwindigkeit: Untersuchung unterschiedlicher linearer Flussraten während des Probenauftrags, bei gleichbleibenden Parametern in den nachfolgenden Prozessschritten.
- Bestimmung der DBC für Rubella-VLPs.

Ab diesem Entwicklungsschritt wurde die Probenaufbereitung standardisiert. Vor der Chromatographie erfolgte eine Zentrifugation (≥ 4.000 × g, 30 Minuten, 4 °C) zur Klärung. Den eigenen Vorexperimenten sowie Erkenntnissen aus dem Screening der Lagerbedingungen der Rubella-VLPs (vgl. 4.4.3) folgend wurde für den Elutionsschritt mit der Säule 1-375 0,1 M Triethanolamin (pH 11,5) als Standard Elutionspuffer etabliert. Im Zuge dieser Standardisierung wurden zudem die Prozesszeiten für Wasch-, Elution- und Reinigungsschritte definiert. Parallel dazu erfolgte eine Anpassung des CIP-Prozesses sowohl hinsichtlich der eingesetzten Puffer als auch der Prozessdauer.

4.4.1.1. Variation der Prozesstemperatur

Der Einfluss der Prozesstemperatur auf die Bindung- und Elutioneigenschaften zwischen dem immobilisierten mAK und den Rubella-VLPs ist in Abbildung 24 dargestellt. Exemplarisch werden Chromatographieläufe mit einer linearen Flussrate von 45 cm/h während des Probenauftrags gezeigt. Weitere untersuchte Fluss-geschwindigkeiten führten zu vergleichbaren Resultaten und sind daher nicht explizit aufgeführt.

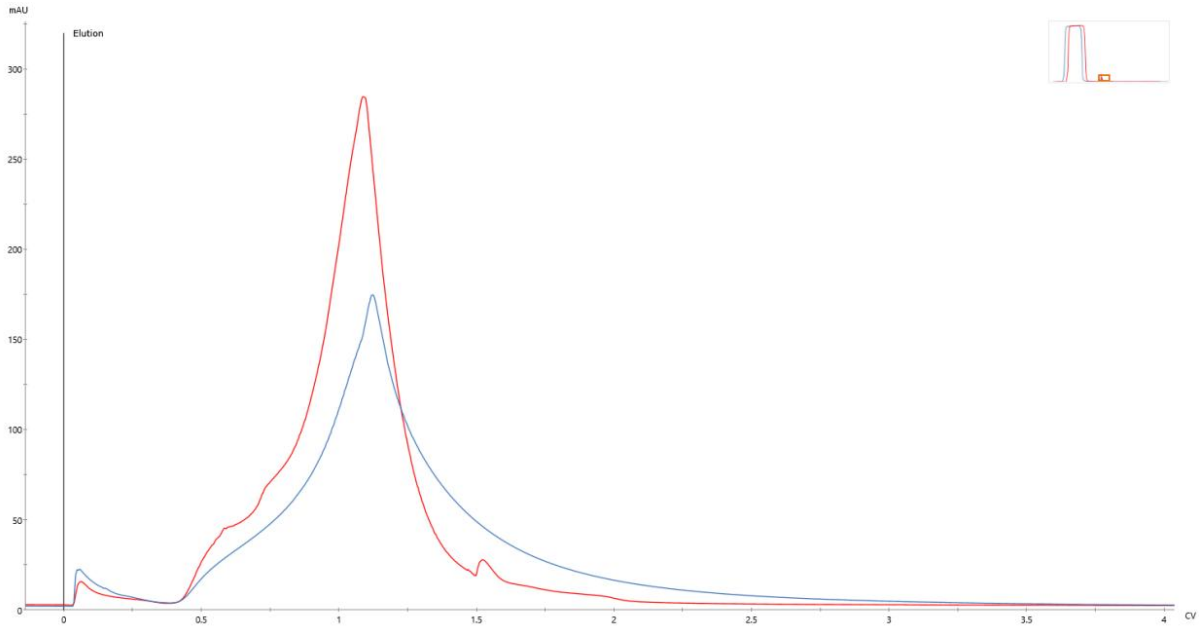


Abbildung 24: Variation der Prozesstemperatur mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20.

Variation der Prozesstemperatur mit Einsatz der Chromatographiesäule 1-375 (HiScale™ 16/20) und einer linearen Flussgeschwindigkeit von 45 cm/h beim Probenauftrag bei identischem Volumen (100 mL) und Art des Ausgangsmaterials (Zellkulturüberstand aus Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie zur Expression von Rubella-VLPs). Vergleich zwischen Raumtemperatur (rot, Peakfläche: 1589 mL × mAU) und 4 °C (blau, Peakfläche: 1471 mL × mAU). Überlagerung der Ausschnitte des Elutionsschritt (Elutionsbedingung 0,1 M Triethanolamin pH 11,5) aus den Chromatogrammen der jeweiligen Antikörper-Affinitätschromatographien. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Die Versuchsreihen ermöglichten eine differenzierte Bewertung der Temperaturabhängigkeit der Affinitätsbindung zwischen Rubella-VLPs und stationärer Antikörper-Phase bei definierter Verweilzeit. Als Bewertungsparameter diente erneut die Peakfläche des Elutionssignals bei 280 nm. Der Vergleich der Elutionsprofile zeigte, dass bei Raumtemperatur eine höhere Peakfläche erzielt wurde (1589 mL × mAU) als bei 4 °C (1471 mL × mAU). Darüber hinaus führte die Prozessführung bei Raumtemperatur zu einem schmaleren Elutionspeak, was eine höhere Konzentration der Rubella-VLPs bei gleichzeitig geringerem Fraktionsvolumen zur Folge hatte. Dies ermöglichte eine Reduktion der erforderlichen Konzentrierungs- und Diafiltrations-

schritte und trug somit zur Steigerung der Gesamteffizienz des DSP bei. Alle weiteren Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.4.1.2. Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag

Die lineare Flussgeschwindigkeit während des Probenauftrags wurde in vier Stufen variiert, um den Einfluss der Verweilzeit auf die Bindungseffizienz der Rubella-VLPs an die Chromatographiematrix zu untersuchen (Abbildung 25).

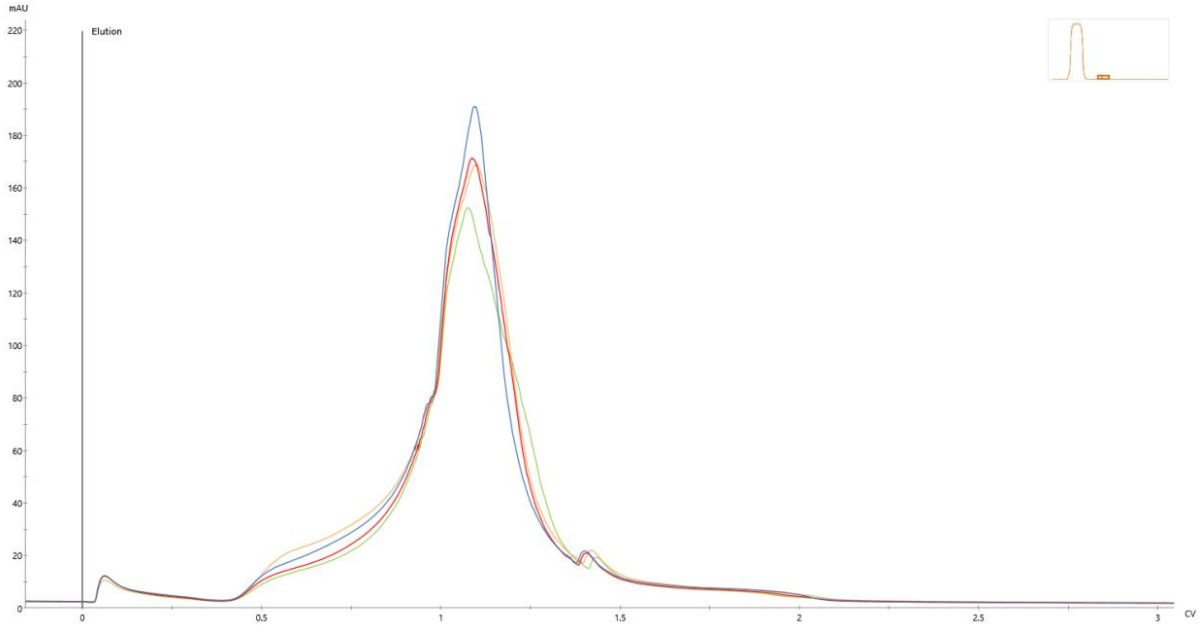


Abbildung 25: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Chromatographiesäule 1-375 HiScale™ 16/20.

Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Einsatz der Chromatographiesäule 1-375 (HiScale™ 16/20) bei identischem Volumen (50 mL) und Art des Ausgangsmaterials (Zellkulturüberstand aus Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie zur Expression von Rubella-VLPs). Vergleich der linearen Flussgeschwindigkeiten von 45 cm/h (orange, Peakfläche: 629,2 mL × mAU), 87 cm/h (blau, Peakfläche: 625,1 mL × mAU), 170 cm/h (rot, Peakfläche: 617,4 mL × mAU) und 239 cm/h (grün, Peakfläche: 593,2 mL × mAU). Überlagerung der Ausschnitte des Elutionsschritt (Elutionsbedingung 0,1 M Triethanolamin pH 11,5) aus den Chromatogrammen der jeweiligen Antikörper-Affinitätschromatographien. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, zeigte die Variation der Flussgeschwindigkeit nur einen geringen Einfluss auf die Peakfläche der Elutionssignale bei 280 nm. Dennoch war ein Trend erkennbar, wonach mit zunehmender Flussgeschwindigkeit und damit verkürzter Kontaktzeit eine reduzierte Bindungseffizienz beobachtet wurde. Zur Prozessoptimierung wurde ein Kompromiss zwischen Bindeleistung und Prozessdauer angestrebt. Auf Grundlage der Ergebnisse wurde eine lineare Flussgeschwindigkeit von 87 cm/h für den Probenauftrag festgelegt.

4.4.1.3. Bestimmung der dynamischen Bindekapazität der Säule 1-375 HiScale™ 16/20

Die experimentelle Bestimmung der DBC_{10} der Säule 1-375 zeigte, dass nach einem Beladungsvolumen von 120 mL Zellkulturüberstand mit einer Rubella-VLP-Konzentration von 0,065 mg/mL ein Durchbruch von ≥ 10 % der Rubella-VLP-Konzentration detektiert werden konnte. Dies entspricht einer gebundenen Gesamtmenge von 7,8 mg Rubella-VLPs. Bezogen auf das Säulenvolumen von 16,1 mL ergibt sich daraus eine DBC_{10} von 0,484 mg pro mL Matrix. Für die weitere Prozessführung wurde unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 0,8 eine Beladung von 0,387 mg pro mL Matrix festgelegt, was einem beladbaren Volumen identischer Zellkulturüberstände von 96 mL pro Chromatographielauf entspricht. Auf eine grafische Darstellung der Ermittlung der DBC_{10} wurde verzichtet, da diese analog zu Abbildung 27 verläuft.

4.4.2. Upscaling Downstream Processing mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20

Zur Übertragung der mit der Säule 1-375 HiScale™ 16/20 etablierten Prozessparameter auf die Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20 wurden die linearen Flussgeschwindigkeiten skaliert und deren Einfluss auf die Reinigungsleistung systematisch evaluiert (Abbildung 26).

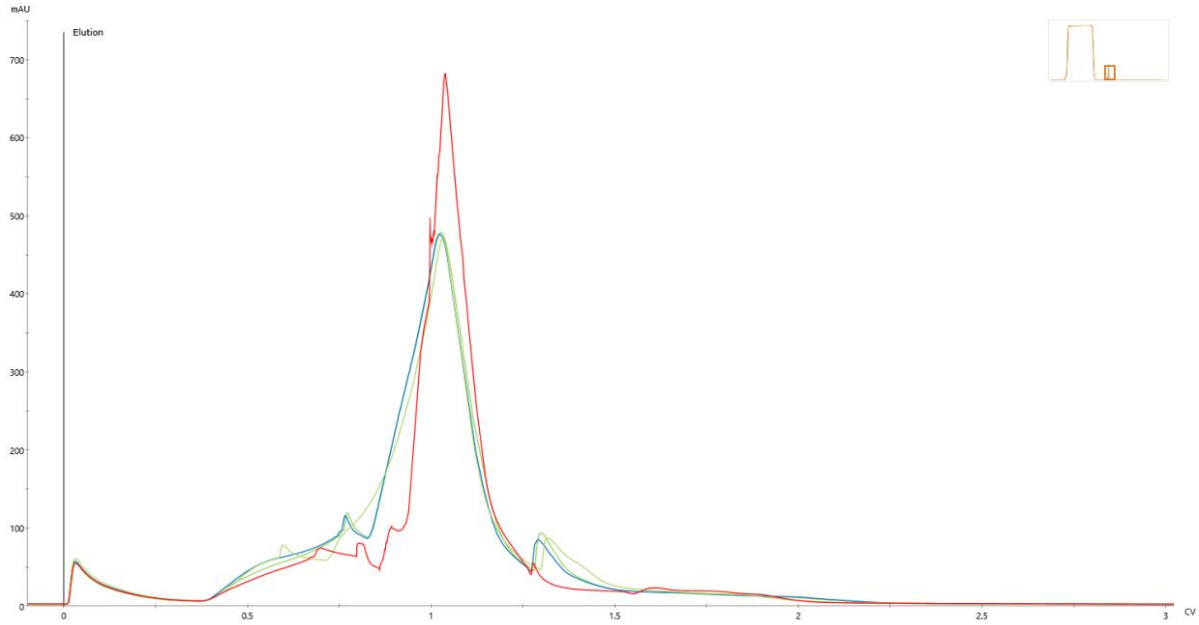


Abbildung 26: Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20.

Variation der linearen Flussgeschwindigkeit bei Probenauftrag mit Einsatz der Chromatographiesäule 1-387 (HiScale™ 50/20). Vergleich der linearen Flussgeschwindigkeiten von 44 cm/h (orange, Peakfläche: 19310 mL × mAU), 87 cm/h (blau, Peakfläche: 19530 mL × mAU), 130 cm/h (grün, Peakfläche: 19849 mL × mAU) und 170 cm/h (rot, Peakfläche: 17879 mL × mAU). Überlagerung der Ausschnitte des Elutionsschritt (Elutionsbedingung 0,1 M Triethanolamin pH 11,5) aus den Chromatogrammen der jeweiligen Antikörper-Affinitätschromatographien. y-Achse: UV-Absorption$_{280nm}$ [mAU], x-Achse: Säulenvolumen.

Abbildung 26 verdeutlicht, dass die Variation der Flussgeschwindigkeit beim Probenauftrag einen messbaren Effekt auf die Fläche des Elutionspeaks hatte. Die Quantifizierung der Rubella-VLPs in den Elutionsfraktionen bestätigte diesen Zusammenhang. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 130 cm/h konnte mit 3,84 mg die höchste Ausbeute erzielt werden. Dies entspricht einer Steigerung um 12,3 % im Vergleich zu 44 cm/h (3,42 mg) sowie um 6,7 % im Vergleich zu 87 cm/h (3,60 mg). Im Gegensatz dazu führte eine weitere Erhöhung auf 170 cm/h zu einem deutlichen Abfall der Produktmenge auf 2,91 mg, was einer Reduktion um 24,2 % gegenüber der Bedingung mit der höchsten Rubella-VLP-Quantität entspricht. Die größte Elutionpeakfläche sowie die größte Menge an Zielprotein wurden somit bei 130 cm/h beobachtet, weshalb diese Flussgeschwindigkeit als optimaler Prozessparameter für das Upscaling der Antikörper-Affinitätschromatographie festgelegt wurde.

4.4.2.1. Bestimmung der dynamischen Bindekapazität der Säule 1-387 HiScale™ 50/20

Die Bestimmung der DBC_{10} der Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20 erfolgte unter Verwendung eines Zellkulturüberstandes aus einem Bioreaktorprozess mit einer Rubella-VLP-Konzentration von 0,0058 mg/mL.

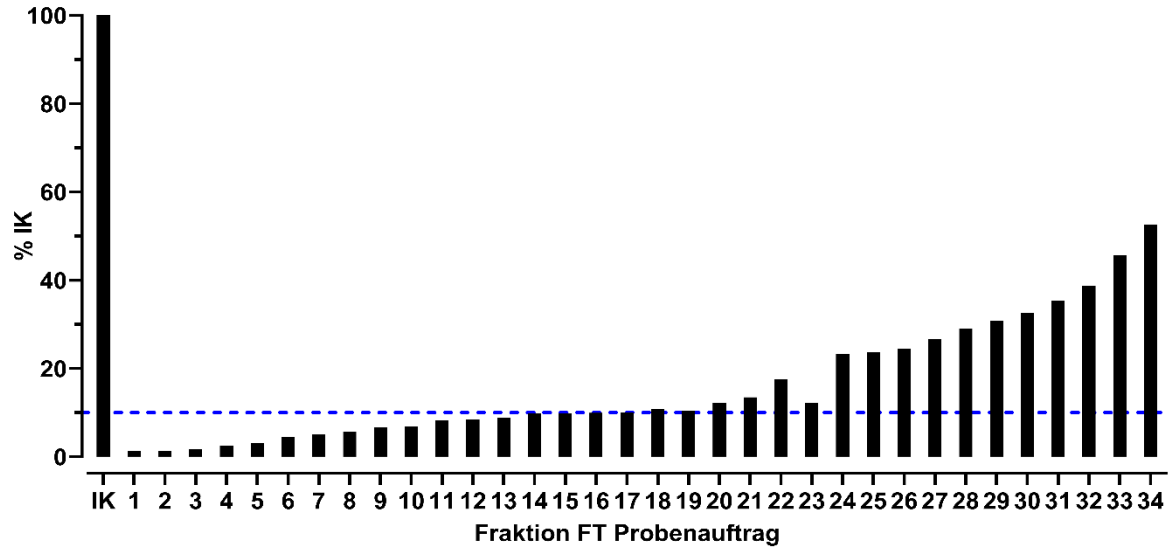


Abbildung 27: Bestimmung dynamischer Bindekapazität der Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20.

Bestimmung der DBC_{10} der Chromatographiesäule 1-387 (HiScale™ 50/20) in Bezug auf Rubella-VLPs. Prozentuales Verhältnis der Rubella-VLP-Konzentration der Fraktionen des FT beim Probenauftrag zur Inputkonzentration (IK) des Zellkulturüberstandes. Gestrichelte blaue Linie zeigt 10 %-Durchbruch. Rubella-VLP-Konzentrationen mittels Rubella-FLIA bestimmt. Fraktionen FT Probenauftrag 1-7: je 1 L, Fraktionen FT Probenauftrag 8-34: je 0,5 L.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurde der 10 %-Durchbruch (gestrichelte blaue Linie) ab Fraktion 18 detektiert. Bis einschließlich Fraktion 17 konnten insgesamt 12 L Zellkulturüberstand auf die Säule appliziert werden, was einer gebundenen Gesamtmenge von 69,6 mg Rubella-VLPs entsprach. Daraus errechnet sich eine DBC_{10} von 0,391 mg pro mL Matrix. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 0,8 ergibt sich eine effektive DBC von 0,313 mg pro mL Matrix. Für nachfolgende Chromatographieläufe wurde auf dieser Basis eine maximale Beladungsmenge von 55,7 mg Rubella-VLPs definiert.

4.4.3. Screening von Puffer- und Lagerbedingungen der Rubella Virus-like Particles

Im Anschluss an den Chromatographieprozess wurde ein Screening verschiedener Lagerbedingungen zur Stabilitätsbewertung der Rubella-VLPs durchgeführt. Dabei

wurden Puffer mit pH-Werten zwischen 2,5 und 10 sowie unterschiedliche Pufferzusammensetzungen untersucht (vgl. Tabelle 19 im Anhang). Zu diesem Zweck wurden die Elutionsfraktionen aus der Antikörper-Affinitätschromatographie in die jeweiligen Lagerpuffer dialysiert. Die Stabilität der Rubella-VLPs wurde mittels DLS-Messungen analysiert (vgl. 3.2.8.3). Die Bewertung erfolgte über die volumenbasierte Größenverteilung, die Rückschlüsse auf die Homogenität der Partikelpopulationen und die Reinheit der VLPs zulässt (Abbildung 28). Exemplarisch sind die Ergebnisse zweier Lagerpufferbedingungen dargestellt.

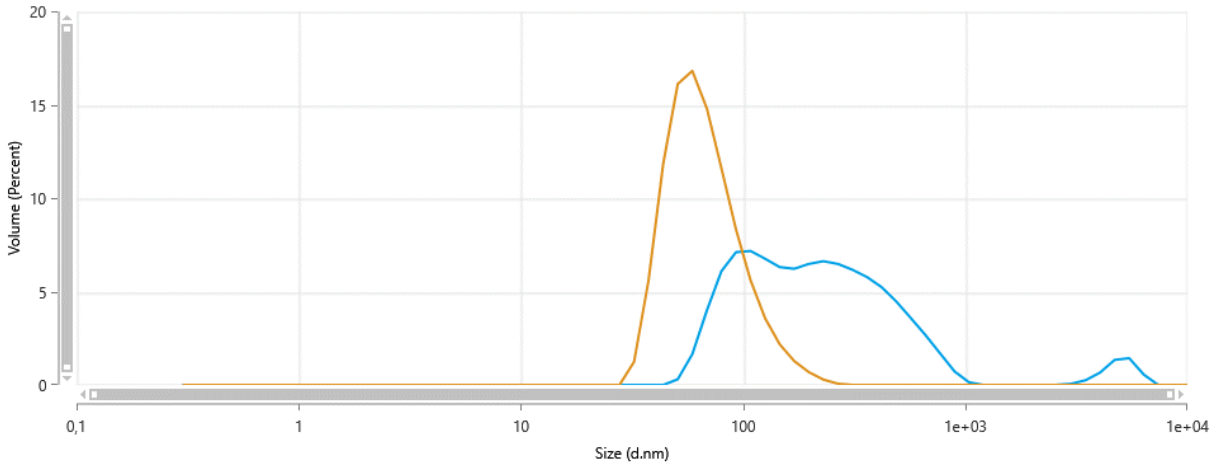


Abbildung 28: DLS-Messungen zum Screening der Lagerbedingungen von Rubella-VLPs.

DLS-Messungen (Size, n = 3) für das Screening der Lagerbedingungen für Rubella-VLPs. Darstellung der Messung über „Size Distribution by Volume“, y-Achse: Volumen [%], x-Achse: hydrodynamischer Durchmesser [nm]. Beispielhaft sind jeweils eine Messung der folgenden Lagerpuffer dargestellt: Dialysepuffer nativ (blau, Puffer 14 aus Tabelle 19) und Carbonatpuffer 9 + 20 % (w/v) Saccharose (orange, Puffer 29 aus Tabelle 19). Eine komplette Übersicht der eingesetzten Lagerpuffer ist in Tabelle 19 im Anhang ersichtlich.

Für Lagerpuffer 29 (orange) wurde ein schmaler monomodaler Peak mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser (Partikelgröße) von 71,1 nm (±0,7 SD) detektiert. Dieser Wert liegt im typischen Größenbereich von Rubella-VLPs (50–150 nm) [19, 45, 86]. Der Peakverlauf zeigte keine weiteren Signale, sodass weder kleinere Fragmente noch größere Aggregate nachweisbar waren. Über die Analysesoftware ZS XPLORER wurde mithilfe der Funktion „Peak Area by volume (%)“ die Fläche unter dem jeweiligen Peak (Population) berechnet. Dieser Parameter wurde als Maß für die Reinheit und Homogenität der Rubella-VLP-Population herangezogen. Für Lagerpuffer 29 (orange) ergaben sich eine „Peak One Area by Volume (%)“ von 100 (±0 SD) sowie ein PDI von 0,158 (±0,024 SD). Der PDI beschreibt die Breite der Größenverteilung beschreibt. Ein niedriger Wert weist auf eine monodisperse und homogene Partikelpopulation hin.

Im Gegensatz dazu zeigte Lagerpuffer 14 (blau) kein monomodales Signal, sondern mehrere überlappende Peaks im Bereich größerer hydrodynamischer Durchmesser (> 100 nm). Die fehlende Abgrenzung der Signale deutet auf eine inhomogene Partikelpopulation mit ausgeprägter Aggregatbildung hin. Die quantitativen Ergebnisse bestätigten diese Beobachtung: „Peak One Area by Volume (%)“ = 43 % (±1,7 SD), „Peak Two Area by Volume (%)“ = 45 % (±1,5 SD) und „Peak Three Area by Volume (%)“ = 4 % (±0,8 SD). Der PDI lag bei 0,242 (±0,032 SD) und weist auf eine deutlich erhöhte Heterogenität der Probe hin.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zusammensetzung und der pH-Wert des Lagerpuffers einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität und Aggregationsneigung der Rubella-VLPs haben.

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität wurde die Partikelgröße der Rubella-VLPs in einem Temperaturbereich von 25-70 °C in 5 °C-Schritten bestimmt (Abbildung 29).

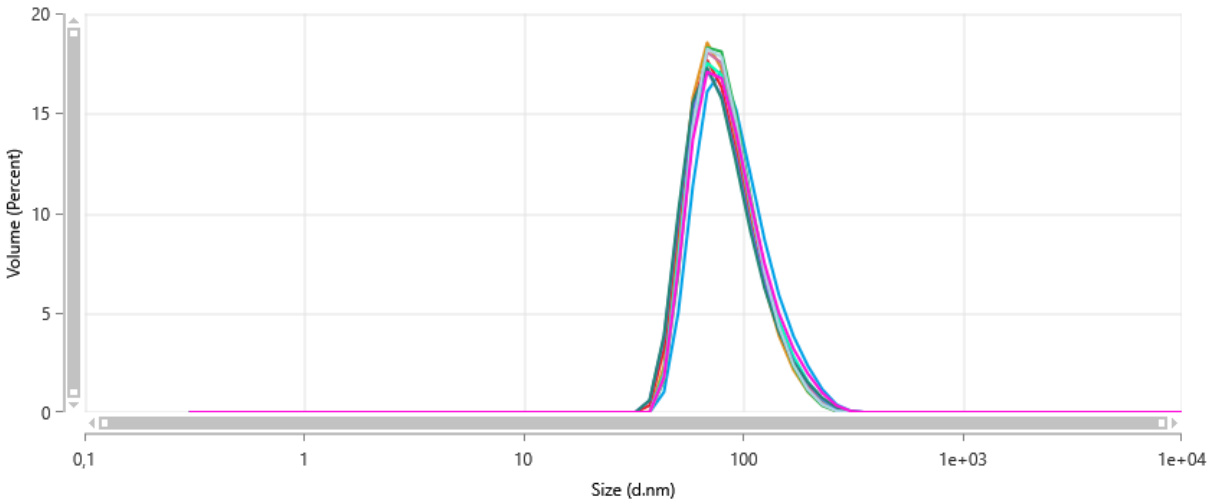


Abbildung 29: DLS-Messungen zur Bewertung der thermischen Stabilität der Rubella-VLPs.

DLS-Messungen (Size, n = 3) zur Bewertung der thermischen Stabilität der Rubella-VLPs in einem Temperaturbereich von 25-70 °C in 5 °C-Schritten. Überlagerung jeweils einer ausgewählten DLS-Messung bei 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C und 70 °C. Darstellung der Messung über „Size Distribution by Volume“, y-Achse: Volumen [%], x-Achse: hydrodynamischer Durchmesser [nm]. Rubella-VLPs in Carbonatpuffer 9 + 20 % (w/v) Saccharose (orange, Puffer 29 aus Tabelle 19).

Die Analysen dienten der Bewertung des Aggregations- und Stabilitätsverhaltens der Rubella-VLPs im eingesetzten Lagerpuffer. Die berechneten Mittelwerte der Partikelgröße der jeweiligen Messungen (n = 3) zeigten über den gesamten Temperaturbereich nur minimale Schwankungen. Die ermittelten Mittelwerte betrugen: 25 °C = 86,62 nm, 30 °C = 87,44 nm, 35 °C = 87,98 nm, 40 °C = 89,06 nm, 45 °C =

89,53 nm, 50 °C = 88,59 nm, 55 °C = 87,39 nm, 60 °C = 87,90 nm, 65 °C = 89,90 nm und 70 °C = 89,50 nm. Der Gesamtmittelwert über alle Temperaturstufen lag bei 87,99 nm (±1,9 SD).

Zur Prüfung der statistischen Signifikanz möglicher Größenänderungen wurde zunächst die Normalverteilungsannahme mittels Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test überprüft (vgl. 3.2.10.3). Für keine der Temperaturgruppen konnte eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung festgestellt werden ($p \geq 0,05$), sodass die Anwendung parametrischer Verfahren gerechtfertigt war. Die Varianzhomogenität wurde anschließend mit dem Levene-Test überprüft (vgl. 3.2.10.4). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Varianzunterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,48$). Daraufhin erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, vgl. 3.2.10.6) zur Überprüfung, ob sich die Mittelwerte der Partikelgrößen zwischen den verschiedenen Temperaturstufen signifikant unterscheiden. Der ANOVA-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte im untersuchten Temperaturbereich ($p = 0,68$).

Diese Ergebnisse bestätigten, dass die gemessenen Temperaturstufen keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgröße der Rubella-VLPs hatten. Dies weist auf eine hohe thermische Stabilität der Rubella-VLPs hin.

Die Mittelwerte der volumenbasierten Größenverteilung für „Peak One Area by Volume (%)“ betrugen 100 % (±0 SD) und der PDI lag im Mittel bei 0,137 (±0,013 SD). Diese Werte deuten auf eine homogene Partikelpopulation mit enger Größenverteilung und ohne Anzeichen thermisch induzierter Aggregation hin.

In ergänzenden eigenen Voruntersuchungen wurde das Zeta-Potenzial der Rubella-VLPs unter ausgewählten Lagerbedingungen bestimmt, um den Bereich um den isoelektrischen Punkt einzugrenzen. Diese Ergebnisse (hier nicht dargestellt) lieferten zusätzliche Hinweise zum Aggregationsverhalten der Rubella-VLPs während der Dialyse in verschiedene Lagerpuffer.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Lagerpuffer 29 im Vergleich zu den insgesamt 31 getesteten Lagerpuffern (vgl. Tabelle 19 im Anhang) die höchste Stabilität und Homogenität der Rubella-VLPs gewährleistete und somit als geeigneter Lagerpuffer identifiziert wurde.

4.4.3.1. Langzeitlagerungsstudie mit der ausgewählten Lagerbedingung

Exemplarisch für den Langzeitlagerungsversuch wurde der Carbonatpuffer 9 mit 20 % (w/v) Saccharose (Puffer 29 aus Tabelle 19 im Anhang) in Kombination mit einer

Lagerung bei –80 °C über einen Zeitraum von 56 Tagen untersucht. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgten zehn Einfrier- und Auftauzyklen, wobei die Proben nach jedem Auftauen erneut bei –80 °C eingefroren wurden. Eine Probe, die lediglich einmal aufgetaut wurde, diente als Referenz. Nach einem, drei, fünf sowie zehn Zyklen erfolgten DLS-Messungen zur Bestimmung der Partikelgröße der Rubella-VLPs (Abbildung 30).

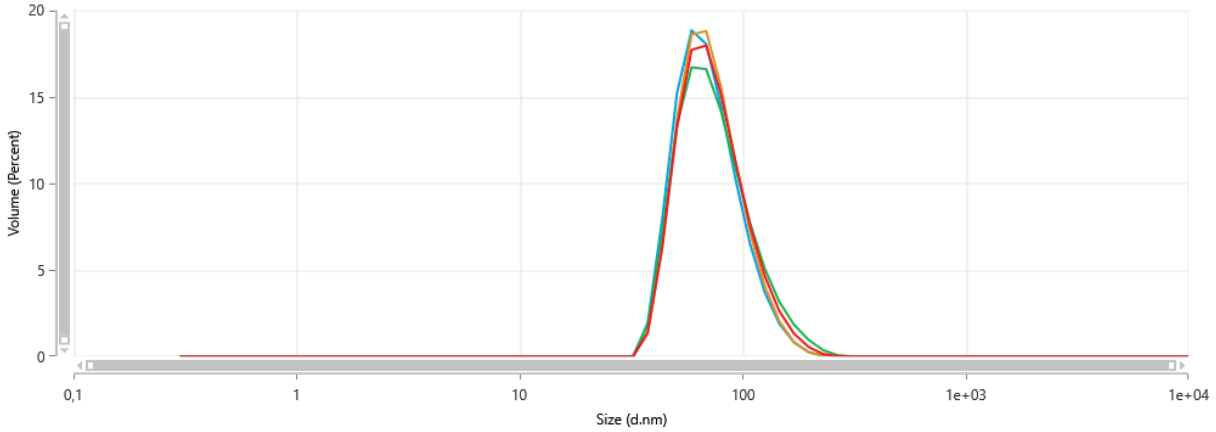


Abbildung 30: DLS-Messungen zur Langzeitlagerung der Rubella-VLPs.

DLS-Messungen (Size, n = 3) zur Langzeitlagerungsstudie der Rubella-VLPs mit ausgewählten Bedingungen. Darstellung jeweils einer augewählten Messung über „Size Distribution by Volume“, y-Achse: Volumen [%], x-Achse: hydrodynamischer Durchmesser [nm]. Lagerbedingung: -80 °C mit einem (rot), drei (blau), fünf (grün) und zehn (orange) Einfrier- und Auftauzyklen innerhalb einer Gesamtlagerdauer von 56 Tagen. Lagerpuffer: Carbonatpuffer 9 + 20 % (w/v) Saccharose (Puffer 29 aus Tabelle 19).

Die Messungen erfolgten mittels DLS in drei technischen Replikaten pro Bedingung (Anzahl Einfrier- und Auftauzyklen). Die ermittelten Mittelwerte (n = 3) der Partikelgrößen lagen bei: 1x = 76,99 nm, 3x = 72,55 nm, 5x = 78,92 nm und 10x = 73,37 nm. Der Gesamtmittelwert über alle Messpunkte betrug 75,96 nm (±2,5 SD), was bereits visuell auf eine sehr geringe Schwankung zwischen den Bedingungen hinweist.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz möglicher Größenänderungen wurde zunächst die Normalverteilungsannahme der Messdaten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test überprüft (vgl. 3.2.10.3). Für alle vier Gruppen (1x, 3x, 5x, 10x Einfrier- und Auftauzyklen) wurde kein signifikanter Unterschied zur Normalverteilung festgestellt ($p \geq 0,05$). Die Voraussetzung für parametrische Verfahren war damit erfüllt. Die Varianzhomogenität wurde im Anschluss mit dem Levene-Test getestet. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Varianzunterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,57$), womit die Anwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, vgl. 3.2.10.6) gerechtfertigt war. Die ANOVA ergab keinen signifikanten Unterschied

zwischen den Mittelwerten der Einfrier- und Auftauzyklen (p = 0,49). Diese Ergebnisse zeigen, dass die gemessenen Partikelgrößen der Rubella-VLPs über bis zu zehn Einfrier- und Auftauzyklen hinweg keine signifikante Veränderung aufwiesen.
Der mittlere PDI lag bei 0,139 (±0,012), was auf eine homogene Partikelpopulation hinweist. Zusätzlich wurde eine „Peak One Area by Volume (%)“ von 100 % (±0 SD) bestimmt. Es wurden keine größeren Partikelstrukturen detektiert, die auf Aggregationen hinweisen würden.
Damit konnte statistisch bestätigt werden, dass die Rubella-VLPs auch nach wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen keine messbare Aggregation oder strukturelle Instabilität zeigten.
Vergleichbare Ergebnisse wurden für die kontinuierliche Lagerung bei +4 °C und –20 °C über denselben Zeitraum beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Lagerung bei -80 °C, wie unternehmensintern üblich, wurde somit als stabil und reproduzierbar für Rubella-VLPs eingestuft.

4.4.3.2. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie nach ausgewählter Lagerbedingung

Die diagnostische Eignung der Rubella-VLPs zur Detektion von Rubella-spezifischen IgG- (Abbildung 31) und IgM-Antikörpern (Abbildung 32) wurde exemplarisch an einer Auswahl vorbewerteter Rubella-IgG- und IgM-Humanseren untersucht. Für die Analysen kamen Proben der bei –80 °C gelagerten Rubella-VLP-Charge zum Einsatz. Die gemessenen MFI-Werte wurden als Maß für die Reaktivität der Rubella-VLPs mit den spezifischen Antikörpern aus den Humanseren herangezogen. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die dargestellten Werte entsprechen den berechneten Mittelwerten der jeweiligen Bedingung (Einfrier- und Auftauzyklus) für IgG und IgM.

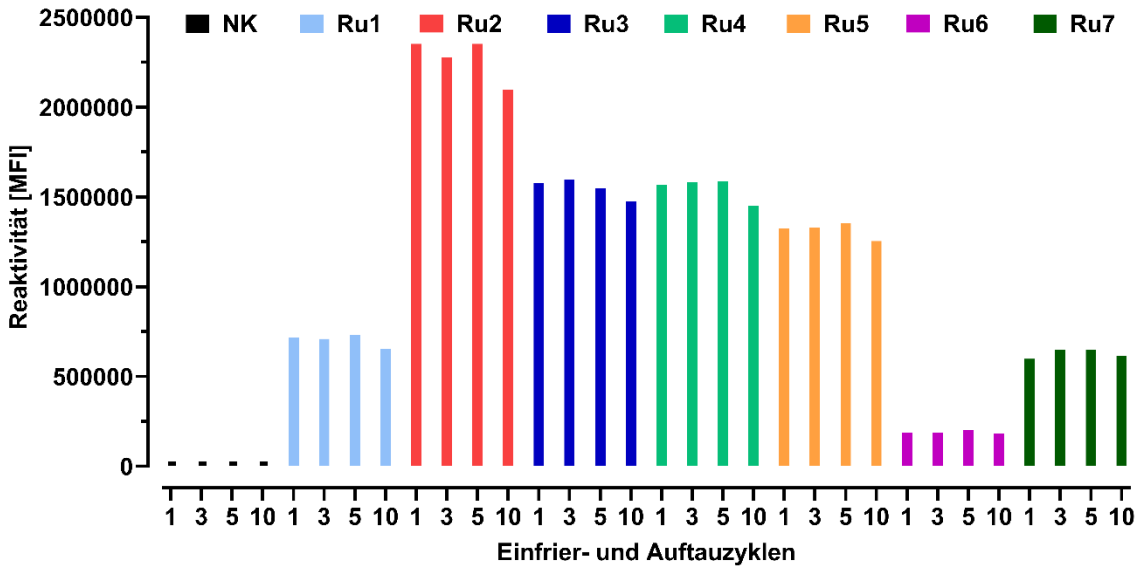


Abbildung 31: Bewertung der diagnostischen Eignung (IgG) von Rubella-VLPs nach 56 Tagen.

Bewertung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs für den Einsatz in der Humanserologie nach Lagerung bei -80 °C mit einer kleinen Auswahl an vorbewerteten Rubella-IgG-Studienseren (Ru) im serologischen Testsystem FLIA. Das gemessene mittlere Fluoreszenzsignal (MFI, y-Achse) repräsentiert die Reaktivität der Rubella-VLPs zu den jeweiligen Versuchsbedingungen (x-Achse) mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren. Ru1 (hellblau), Ru2 (rot), Ru3 (dunkelblau), Ru4 (grün), Ru5 (orange), Ru6 (lila) und Ru7 (braun) wurden als Rubella-IgG-positive-Humanseren definiert. NK = Negativkontrolle (schwarz), Einsatz von Messpuffer. Lagerbedingung: -80 °C mit einem, drei, fünf und zehn Einfrier- und Auftauzyklen innerhalb einer Gesamtlagerdauer von 56 Tagen. Lagerpuffer: Carbonatpuffer 9 + 20 % (w/v) Saccharose (Puffer 29 aus Tabelle 19).

Abbildung 31 zeigt, dass die untersuchte Rubella-VLP-Charge gegenüber Rubella-spezifischen IgG-Antikörpern aus den Humanseren Ru1-Ru7 unterschiedlich starke Reaktivitäten aufwies. Diese Variation reflektiert die vorbewertete Spannbreite der Seren von schwach bis stark positiv und verdeutlicht, dass die eingesetzten Rubella-VLPs im FLIA eine differenzierte serologische Reaktivität abbilden können. Darüber hinaus zeigte sich, dass wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen (bis zu zehn Zyklen) nur einen geringen Einfluss auf die Reaktivität der Rubella-VLPs im serologischen IgG-Testsystem hatten. Der Variationskoeffizient (CV) lag für alle Messbedingungen unter 5 %, im Mittel sogar unter 2 %, was auf eine sehr geringe Streuung der Messwerte um den jeweiligen Mittelwert hinweist. Innerhalb der untersuchten Seren und der Negativkontrolle wurden folgende Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) und CV über die Einfrier- und Auftauzyklen 1-10 ermittelt: Negativkontrolle = 2148 MFI (±118 SD; 5,5 % CV), Ru1 = 702146 MFI (±34389 SD; 4,9 % CV), Ru2 = 2269449 MFI (±121226 SD; 5,3 % CV), Ru3 = 1549031 MFI (±54511 SD; 3,5 % CV), Ru4 = 1546239 MFI (±65917 SD; 4,2 % CV), Ru5 = 1315608 MFI (±43197 SD; 3,3 % CV), Ru6 = 189470 MFI (±8793 SD; 4,6 % CV) und Ru7 = 627869 MFI (±25871 SD; 4,1 % CV). Diese Ergebnisse bestätigen, dass wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen keinen

messbaren Einfluss auf die serologische Reaktivität der Rubella-VLPs im IgG-FLIA hatten.

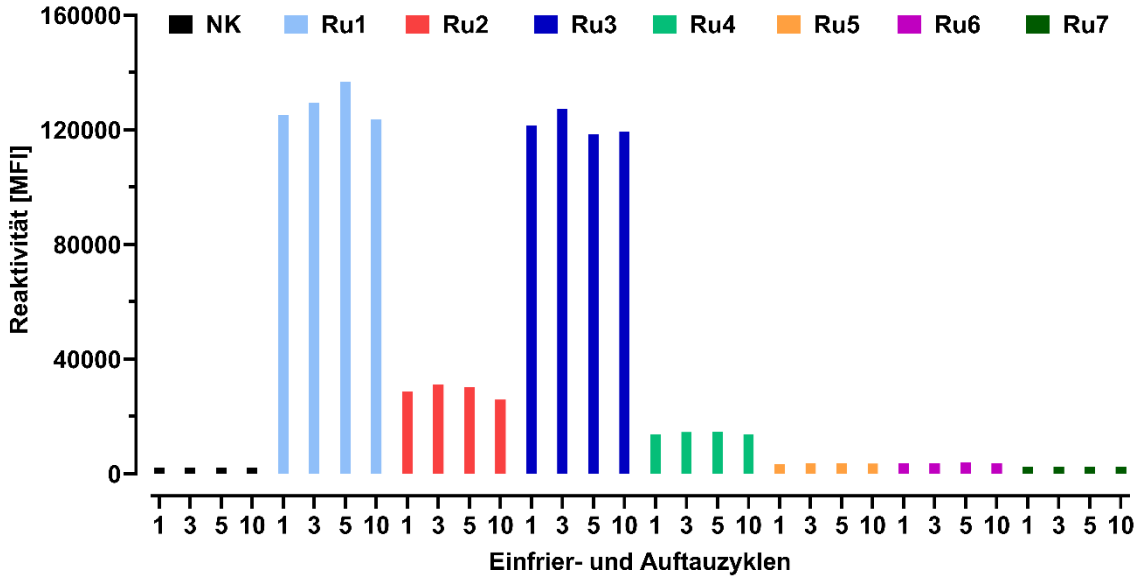


Abbildung 32: Bewertung der diagnostischen Eignung (IgM) von Rubella-VLPs nach 56 Tagen.

Bewertung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs für den Einsatz in der Humanserologie nach Lagerung bei -80 °C mit einer kleinen Auswahl an vorbewerteten Rubella-IgM-Studienseren (Ru) im serologischen Testsystem FLIA. Das gemessene mittlere Fluoreszenzsignal (MFI, y-Achse) repräsentiert die Reaktivität der Rubella-VLPs zu den jeweiligen Versuchsbedingungen (x-Achse) mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren. Ru1 (hellblau), Ru2 (rot), Ru3 (dunkelblau) und Ru4 (grün) wurden als Rubella-IgM-positive-Humanseren und Ru5 (orange), Ru6 (lila) und Ru7 (braun) als Rubella-IgM-negative-Humanseren definiert. NK = Negativ-kontrolle, Einsatz von Messpuffer. Lagerbedingung: -80 °C mit einem, drei, fünf und zehn Einfrier- und Auftauzyklen innerhalb einer Gesamtlagerdauer von 56 Tagen. Lagerpuffer: Carbonatpuffer 9 + 20 % (w/v) Saccharose (Puffer 29 aus Tabelle 19).

In Abbildung 32 ist dargestellt, dass die Seren Ru1-Ru4, welche als IgM-positiv vorbewertet waren, deutlich höhere Reaktivitäten aufwiesen als die Seren Ru5–Ru7 sowie die Negativkontrolle. Die als IgM-negativ klassifizierten Seren Ru5–Ru7 zeigten Reaktivitäten auf einem Niveau vergleichbar zur Negativkontrolle. Somit konnte durch die FLIA-Analysen eine klare Abgrenzung zwischen positiven und negativen Rubella-IgM-Seren erzielt werden, was die diagnostische Eignung der Rubella-VLPs im FLIA-System bestätigt.

Vor der Durchführung des t-Tests wurde die Normalverteilungsannahme der Messdaten in beiden Gruppen (IgM-positive und -negative Seren) mittels Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (vgl. 3.2.10.3) überprüft. Die Testergebnisse ($p \geq 0{,}05$) bestätigten, dass keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorlag. Anschließend wurde ein t-Test (vgl. 3.2.10.5) für unabhängige Stichproben ($\alpha = 0{,}05$) durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu bewerten. Da die

Stichprobengröße der IgM-positiven Gruppe vergleichsweise gering war (n = 4), wurde dies bei der Auswertung durch die Berechnung der exakter p-Werte und die zusätzliche Bestimmung der Effektstärke statistisch berücksichtigt, um die Aussagekraft der Ergebnisse abzusichern. Der Gruppenvergleich ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den IgM-positiven (Ru1-Ru4) und IgM-negativen (Ru5-Ru7) Seren ($p < 0,001$), womit die serologische Trennschärfe des Rubella-VLP-basierten FLIA statistisch bestätigt wurde.

Die wiederholten Einfrier- und Auftauzyklen (bis zu zehn Zyklen) zeigten nur einen minimalen Einfluss auf die Reaktivität der Rubella-VLPs im serologischen IgM-FLIA-Testsystem. Der Variationskoeffizient (CV) lag für alle Messbedingungen unter 6 %, im Mittel unter 2 %, was auf eine äußerst geringe Streuung der Messwerte um den jeweiligen Mittelwert hinweist. Über die Einfrier- und Auftauzyklen 1-10 wurden für die untersuchten Seren und die Negativkontrolle folgende Mittelwerte (±SD; CV) ermittelt: Negativkontrolle = 2087 MFI (±32; 1,5 %), Ru1 = 128773 MFI (±5825; 4,5 %), Ru2 = 28964 MFI (±2355; 8,1 %), Ru3 = 121619 MFI (±3975; 3,3 %), Ru4 = 14200 MFI (±520; 3,7 %), Ru5 = 3573 MFI (±87; 2,4 %), Ru6 = 3789 MFI (±118; 3,1 %) und Ru7 = 2452 MFI (±30; 1,2 %).

Die statistische Analyse bestätigte, dass keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Bedingungen vorlagen ($p > 0,05$), womit die Lagerung der Rubella-VLPs bei -80 °C sowie wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen keine negativen Auswirkungen auf deren serologische Reaktivität im IgM-FLIA hatten.

Zur weiterführenden Beurteilung der diagnostischen Leistungsfähigkeit der Rubella-VLPs in der Humanserologie wurden ergänzend Validierungsstudien mit einer erweiterten Anzahl an Rubella-IgG- und Rubella-IgM-Humanseren durchgeführt (vgl. 4.6).

4.4.4. Finalisierung des Downstream Processing

Die finale Aufarbeitung nach der Antikörper-Affinitätschromatographie erfolgte mittels Konzentrierung und Dialyse unter Einsatz eines Sartoflow® Smart TFF-Systems mit einer Sartocon® Slice 200 PES Kassette (0,02 m² Membranfläche, 300 kDa MWCO). In Abbildung 33 sind exemplarisch die SDS-PAGE-Analysen ausgewählter Proben aus unterschiedlichen Prozessschritten dargestellt.

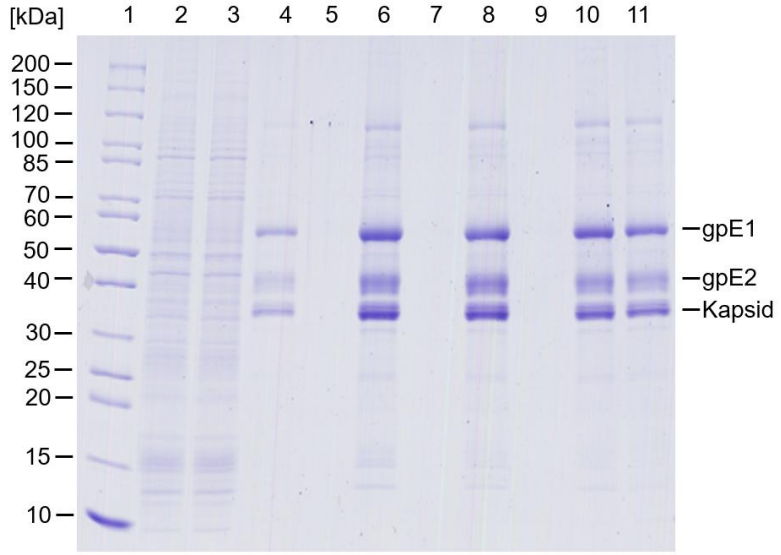


Abbildung 33: SDS-PAGE zum Downstream Processing von Rubella-VLPs.

SDS-PAGE mit Coomassie-Blaufärbung Analyse zum Aufarbeitungsprozess von Rubella-VLPs. Gelbelegung der Proben: 1 = Proteinmarker, 2 = Zellkulturüberstand nach Ernte, 3 = FT Probenauftrag Chromatographie, 4 = Elutionsfraktion Chromatographie (1 µg), 5 = FT 1. Konzentrierung, 6 = Rubella-VLPs nach 1. Konzentrierung, 7 = FT Dialyse, 8 = Rubella-VLPs nach Dialyse, 9 = FT 2. Konzentrierung, 10 = Rubella-VLPs nach 2. Konzentrierung (2 µg), 11 = fertige Charge Rubella-VLPs (2 µg). MW Rubella Kapsidprotein: ca. 33 kDa; MW Rubella gpE2: ca. 42-47 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW Rubella gpE2: ca. 31 kDa; MW gpE1: ca. 56 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW gpE1: ca. 51 kDa [19].

Die mittels Bradford-Assay (vgl. 3.2.8.6) quantifizierten Rubella-VLPs aus der Elutionsfraktion der Antikörper-Affinitätschromatographie (Probe 4; 0,15 mg/mL in 1450 mL; Gesamtproteinmenge = 217,5 mg), der zweiten Konzentrierungsstufe (Probe 10; 1,76 mg/mL in 112,2 mL; Gesamtproteinmenge = 197,5 mg) sowie der finalen Charge (Probe 11; 1,41 mg/mL in 140,7 mL; Gesamtproteinmenge = 198,4 mg) wurden jeweils mit definierter Proteinmenge für die SDS-PAGE-Analyse eingesetzt. Auf die ermittelten Ausbeuten wird in Kapitel 4.5.5.2 näher eingegangen. Es zeigte sich, dass in den Konzentrierungs- und Dialyseschritten keine relevanten Verluste des Zielproteins im jeweiligen FT auftraten. In den entsprechenden Gelfraktionen (Proben 5, 7 und 9) waren die Strukturproteine der Rubella-VLPs erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Die Reinheit des Zielproteins in der finalen Charge (Probe 11) wurde erneut auf > 90 % geschätzt. Die Endkonzentrationen der hergestellten Rubella-VLP-Chargen aus den Kultivierungen der 10 L- und 40 L-Bioreaktorläufen lagen im Bereich von 0,52–1,41 mg/mL und erfüllten damit den intern festgelegten Sollbereich von 0,5–2,0 mg/mL.

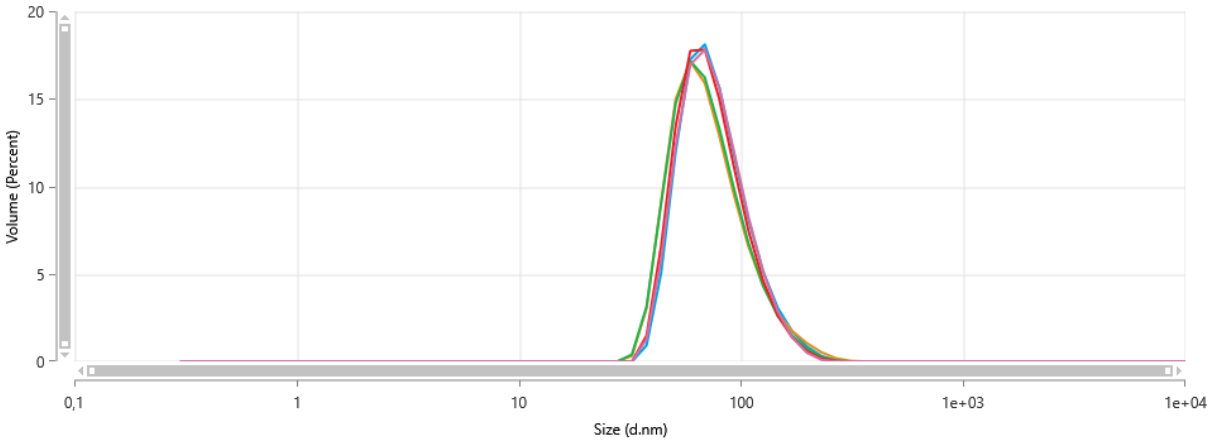


Abbildung 34: DLS-Messungen der finalen Rubella-VLP-Charge.

DLS-Messungen (Size, n = 5) der finalen Rubella-VLP-Charge nach Kultivierung der HEK293T-Produktionszelllinie im 40 L-Bioreaktor und anschließendem Downstream Processing. Darstellung der Messung über „Size Distribution by Volume“, y-Achse: Volumen [%], x-Achse: hydrodynamischer Durchmesser [nm].

DLS-Messungen (n = 5) bestätigten die Rubella-VLPs mit einer mittleren Partikelgröße von 75,38 nm (±4,1 SD). Der mittlere PDI lag bei 0,136 (±0,011), was auf eine homogene Partikelpopulation hinweist. Zusätzlich wurde eine „Peak One Area by Volume (%)“ von 100 % (±0 SD) bestimmt. Hinweise auf größere Partikel, die als Proteinaggregate interpretiert werden könnten, wurden nicht detektiert.

4.5. Upscaling des Upstream Processing

4.5.1. Etablierung der Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor

Das Scale-over der Kultivierungsbedingungen vom Schüttelkolben in den Bioreaktor wurde von M. Cina [71] mittels DoE untersucht. Als Zielgrößen wurden Zellvitalität und Zellwachstum definiert. Berücksichtigt wurden die Prozessparameter pH-Wert, DO, Rührerdrehzahl und Zelldichte bei Inokulation, während weitere Faktoren wie Rührergeometrie, Begasungsrate, Mediumzusammensetzung oder Zellpassage nicht in die Planung einbezogen wurden. Für die Versuchsplanung wurde ein teilfaktorielles Design mit einer Auflösung von IV gewählt, mit jeweils zwei Ausprägungen pro Parameter. Daraus ergaben sich acht Versuchsreihen sowie ein Zentralpunkt. In ergänzenden Experimenten wurde die Kultivierungstemperatur untersucht und anschließend festgelegt. Die statistische Auswertung zeigte, dass keiner der vier Faktoren einen signifikanten Effekt auf Zellvitalität oder Zellwachstum ausübte. Den größten Einfluss auf die Zellvitalität hatte der pH-Wert, während DO und Rührerdrehzahl den größten Effekt auf das Zellwachstum zeigten [71]. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden zunächst die folgenden Kultivierungsbedingungen für den

Bioreaktorprozess definiert: 37 °C, pH 7,2 ± 0,1, DO 50 %, Rührerdrehzahl 100 rpm sowie eine Inokulationsdichte von 0,4 × 10^6 vitalen Zellen/mL.

4.5.1.1. Feeding-Strategie im Bioreaktorprozess

Zunächst wurde im Bioreaktor die zuvor in der Schüttelkultur entwickelte Feeding-Strategie (vgl. 4.2.3) implementiert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die prozentuale Volumenzugabe der Feed-Lösung entsprechend dem jeweiligen Zellkulturvolumen sowie die L-Glutamin-Supplementierung angepasst (vgl. Tabelle 15). Die Kultivierungen erfolgten unter den zuvor festgelegten Prozessbedingungen (vgl. 4.5.1). Als Zielgrößen dienten Zellvitalität, Zellwachstum und die Konzentration der Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand.

Analog zum Vorgehen in der Schüttelkultur (vgl. 3.2.2) wurde im weiteren Verlauf der Prozessentwicklung eine angepasste Feeding-Strategie für die Kultivierung im Bioreaktor etabliert. Diese umfasste die gezielte Zugabe von Feed-Lösung und L-Glutamin unter Einhaltung definierter Sollwerte für Glukose (4 g/L) und Glutamin (3 mM), basierend auf den Ergebnissen der täglichen Medienanalytik (vgl. 3.2.8.7).

4.5.2. Screening der Bioreaktorprozessparameter über Design of Experiments

Zur Untersuchung des Einflusses der Inokulationsdichte (Faktor 1) und des kombinierten Parameters aus DO-Wert und Rührerdrehzahl (Faktor 2) auf die Produktivität der Rubella-VLPs (Konzentration der Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand) im Bioreaktor wurde ein vollfaktorielles 2^2-Design mit den Faktorstufen -1 (niedrig) und +1 (hoch) durchgeführt (vgl. Tabelle 10). Grundlage der Auswertung bildeten die Analysen des Zellkulturüberstandes nach einer Kultivierungsdauer von 312 Stunden (vgl. Tabelle 17). Die statistische Auswertung erfolgte mit numiqo Team (2025), DATAtab (vgl. 3.2.10.7). Die ermittelten Werte der Zielgrößen wurden mithilfe eines linearen Modells ausgewertet, wobei jeweils die Haupteffekte der einzelnen Faktoren sowie deren Wechselwirkung berücksichtigt wurden.

Tabelle 17: Ergebnisse der vollfaktoriellen Versuchsplanung weiterer Anpassungen im Bioreaktorprozess.

Ergebnisse zur vollfaktorielle Versuchsplanung zu weiteren Anpassungen im Bioreaktorprozess mit Fokus auf der Zielgröße Steigerung der Produktivität des Zielproteins. Es wurden die Faktoren Inokulationsdichte (-1 entsprechend 0,4 × 10^6 vitale Zellen/mL; +1 entsprechend 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL) und das Zusammenspiel aus DO-Wert und Rührerdrehzahl (-1 entsprechend 50 % DO, 100 rpm; +1 entsprechend 40 % DO, 150 rpm) mit je zwei Ausprägungen (niedrig = -1 und hoch = +1) betrachtet. Versuchsplanung und Auswertung wurde mit numiqo Team (2025), DATAtab durchgeführt.

Versuch	Inokulationsdichte	DO-Wert / Rührerdrehzahl	Rubella-VLPs [µg/mL]	vitale Zellen/mL × 10^6	Zellvitalität [%]
1	-1	-1	0,4	7,8	62,0
2	-1	+1	2,8	8,2	59,5
3	+1	-1	3,0	10,0	65,0
4	+1	+1	4,5	13,5	59,5

Zur Überprüfung der Modellvoraussetzungen wurde die Normalverteilungsannahme mittels eines Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test (vgl. 3.2.10.3) geprüft. Der Test ergab einen p-Wert von 0,75, womit keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung festgestellt wurde (α = 0,05). Somit konnte die Nullhypothese H_0 beibehalten werden und die Gültigkeit der Modellannahmen für das lineare Modell wurde bestätigt.

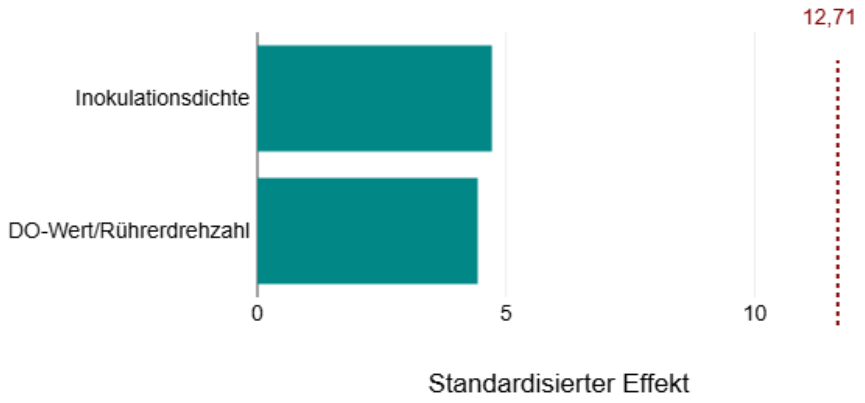


Abbildung 35: Pareto-Diagramm.

Pareto-Diagramm der standardisierten Effekte zu den Ergebnissen der Versuche 1-4 aus Tabelle 17. Betrachtete Faktoren: Inokulationsdichte und DO-Wert/Rührerdrehzahl. Zielgröße: Konzentration der Rubella-VLPs [mg/mL]. Rot gestrichelte Linie: Referenzlinie für statistische Signifikanz von α = 0,05. Erstellt mit numiqo Team (2025), DATAtab.

Das Pareto-Diagramm (vgl. 3.2.10.8) stellt die Rangfolge der standardisierten Effekte auf die Zielgröße Konzentration der Rubella-VLPs dar (Abbildung 35). Die festgelegte Signifikanzgrenze von α = 0,05 wurde von keinem der untersuchten Faktoren überschritten, sodass kein statistisch signifikanter Einfluss auf die Zielgröße nachgewiesen werden konnte. Beide Faktoren zeigen jedoch positive Effekt und damit

eine förderliche Wirkung auf die Zielgröße. Der Faktor Inokulationsdichte wies hierbei den größten Effekt auf die Steigerung der Rubella-VLP-Produktivität auf.

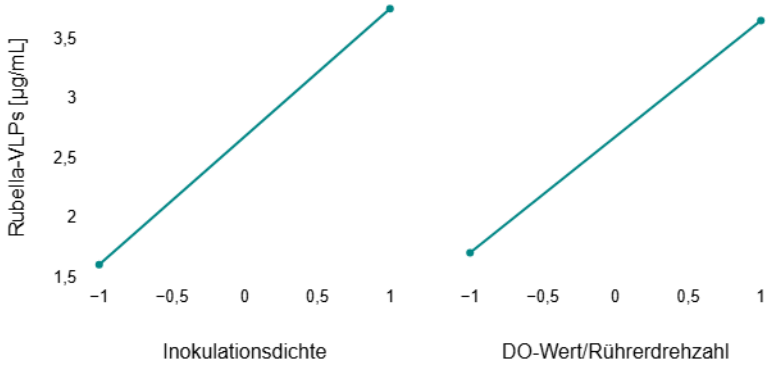


Abbildung 36: Haupteffektediagramm.

Haupteffektediagramm für die Zielgröße Konzentration der Rubella-VLPs [mg/mL] mit Bezug auf die Faktoren Inokulationsdichte (-1 = 0,4 × 10⁶ vitale Zellen/mL; 1 = 0,8 × 10⁶ vitale Zellen/mL) und DO-Wert/Rührerdrehzahl (-1 = 50 % DO, 100 rpm; 1 = 40 % DO, 150 rpm). Y-Achse: Zielgröße Konzentration der Rubella-VLPs [mg/mL], X-Achse: Ausprägungen je Faktor. Erstellt mit numiqo Team (2025), DATAtab.

In Abbildung 36 sind die Haupteffekte der beiden Faktoren Inokulationsdichte und DO-Wert/Rührerdrehzahl dargestellt. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Ausprägungen (-1 und 1) dargestellt, während die Y-Achse die Konzentration der Rubella-VLPs zeigt. Die Haupteffektanalyse (vgl. 3.2.10.9) verdeutlicht, dass beide Faktoren einen deutlichen Einfluss auf die Konzentration der Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand ausüben. Bei hoher Inokulationsdichte (+1) wurde eine höhere durchschnittliche Produktivität der Rubella-VLPs beobachtet als bei der niedrigen Ausprägung. Ebenso führte eine Erhöhung des DO/Rührerdrehzahl-Faktors (+1) zu einer Steigerung der Produktbildung, was auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung und Durchmischung während der Kultivierung hinweist. Beide Haupteffektkurven zeigen eine positive Steigung, was auf einen direkten proportionalen Zusammenhang zwischen den Faktorausprägungen und der Zielgröße schließen lässt.

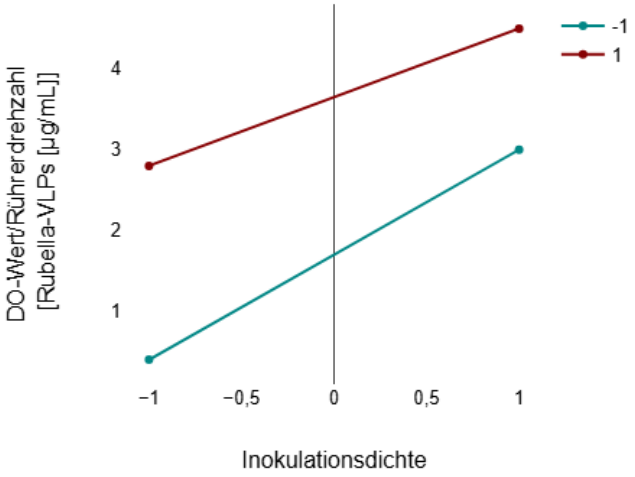


Abbildung 37: Wechselwirkungsdiagramm.

Wechselwirkungsdiagramm für die Zielgröße Konzentration der Rubella-VLPs [mg/mL] mit Bezug auf die Faktoren Inokulationsdichte (-1 = 0,4 × 10⁶ vitale Zellen/mL; 1 = 0,8 × 10⁶ vitale Zellen/mL) und DO-Wert/Rührerdrehzahl (-1 = 50 % DO, 100 rpm; 1 = 40 % DO, 150 rpm). Y-Achse: Zielgröße Konzentration der Rubella-VLPs [mg/mL], X-Achse: Ausprägungen je Faktor. Erstellt mit numiqo Team (2025), DATAtab.

Darüber hinaus wurden die potenziellen Wechselwirkungen zwischen Inokulationsdichte und DO-Wert/Rührerdrehzahl untersucht (vgl. 3.2.10.10). Das Wechselwirkungsdiagramm (Abbildung 37) zeigt nahezu parallele Linien, was darauf hinweist, dass keine signifikante Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren besteht. Die Effekte der einzelnen Faktoren wirken somit additiv auf die Zielgröße, ohne sich gegenseitig wesentlich zu beeinflussen.

Zusammenfassend führten eine hohe Inokulationsdichte und eine erhöhte Rührerdrehzahl bei niedrigerem DO-Wert zu einer deutlichen Steigerung der Rubella-VLP-Produktivität (4,1 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur). Der stärkste Haupteffekt wurde für die Inokulationsdichte festgestellt, während ein synergistischer Wechselwirkungseffekt der Faktoren nicht nachgewiesen werden konnte. Da das Design keine Wiederholungen enthielt, war eine Schätzung der experimentellen Fehlervarianz nicht möglich, weshalb t-Tests der einzelnen Effekte nur eingeschränkt interpretierbar sind und somit nicht durchgeführt wurden.

Basierend auf den Ergebnissen des DoE wurden folgende optimale Prozessparameter für den Bioreaktorprozess festgelegt: Kultivierungstemperatur 37 °C, pH-Wert 7,2 ± 0,1, Inokulations-dichte 0,8 × 10⁶ vitale Zellen/mL, DO 40 % sowie eine Rührerdrehzahl von 150 rpm.

Die Kontrolle der Prozessparameter der Bioreaktorläufe 1-4 sind im Anhang (Abbildung 52-Abbildung 55) dargestellt.

4.5.3. Weitere Anpassungen der Prozessführung im Bioreaktor

In Vorexperimenten mit DoE-gestützter Planung und statistischer Auswertung zeigte der pH-Wert einen großen Effekt auf die Zellvitalität und das Zellwachstum (Ergebnisse nicht dargestellt). In den bisherigen Bioreaktorprozessen (1 L-Maßstab) wurde der pH-Wert standardmäßig auf 7,2 ± 0,1 eingestellt und die zuvor in der Schüttelkultur entwickelte Feeding-Strategie (vgl. Tabelle 15) implementiert. Dabei war während des Kultivierungsverlaufs eine kontinuierliche und umfangreiche Basenzugabe notwendig, um den pH-Wert anzuheben und stabil zu halten. Neben einem Experiment mit kontinuierlicher CO_2-Zufuhr von anteilig 1 % an zugeführten Gasen (Bioreaktorlauf B074) wurde in weiteren Experimenten (Bioreaktorlauf B075) der Sollwert auf 7,1 ± 0,2 herabgesetzt und die pH-Regulierung ausschließlich über die Variation der CO_2-Zufuhr als Säurequelle gesteuert. Unter diesen Bedingungen (B075) wurden Zellzahlen von bis zu 15 × 10^6 vitalen Zellen/mL bei einer Zellvitalität von 82,5 % nach 288 Stunden erreicht. Gleichzeitig lag die Rubella-VLP-Konzentration im Zellkulturüberstand bei 7,7 mg/L. Damit konnten erstmals in Bioreaktorprozessen mit der Schüttelkultur vergleichbar hohe Zellzahlen, Zellvitalitäten und Produktausbeuten erzielt werden. Die angepasste pH-Regelung erwies sich somit als vorteilhaft und wurde in die weiteren Bioreaktorläufe integriert. Die Ergebnisse der Versuchsreihe B074 in Anlehnung an die Schüttelkultur zeigten, dass eine kontinuierliche CO_2-Zugabe (1 %) zur pH-Steuerung zwar eine vergleichbar hohe Zellvitalität wie im Ansatz B075 aufrechterhalten konnte (77 % nach 312 Stunden Kultivierungsdauer), jedoch sowohl das Zellwachstum als auch die Produktivität deutlich beeinträchtigte. Die maximale Zelldichte lag bei 5,2 × 10^6 vitale Zellen/mL und die Ausbeute betrug 3,1 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur. Damit führte die CO_2-basierte pH-Steuerung zu einer deutlichen Einschränkung der bioprozessrelevanten Leistungsparameter.

4.5.4. Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes von Rubella Virus-like Particles

Der optimale Erntezeitpunkt für Rubella-VLPs im Bioreaktorprozess wurde in der Versuchsreihe B075 anhand der Quantifizierung der VLPs im Zellkulturüberstand zu definierten Kultivierungszeitpunkten bestimmt (Abbildung 38).

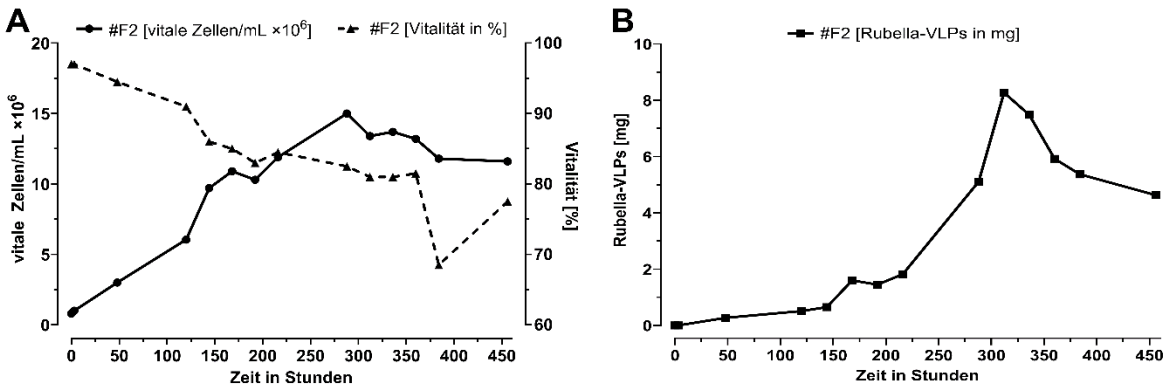


Abbildung 38: Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes im Bioreaktorprozess.

Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes von Rubella-VLPs im Bioreaktorprozess – hier am Beispiel eines 1 L-Bioreaktorlaufs. A: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Zellzahl (Y-Achse links; vitale Zellen/mL×10^6; durchgezogene Linie) und Zellvitalität (Y-Achse rechts; in %; gestrichelte Linie). B: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Rubella-VLP-Quantität im Zellkulturüberstand (in mg; über Rubella-FLIA ermittelt).

Wie in Abbildung 38 gezeigt, stieg die Rubella-VLP-Quantität kontinuierlich bis 312 Stunden auf 8,3 mg an (Konzentration: 8,7 µg/mL), bevor anschließend ein fortschreitender Rückgang zu beobachten war. Somit wurde 312 Stunden als optimaler Erntezeitpunkt festgelegt. Durch diese Festlegung lässt sich für künftige Bioreaktorprozesse eine maximale Ausbeute bei gleichzeitig hoher Prozessstabilität sicherstellen.

Die Überwachung der Prozessparameter des Bioreaktorlaufs ist im Anhang in Abbildung 56 dargestellt.

4.5.5. Upscaling des Bioreaktorprozesses

Nach erfolgreicher Etablierung des Bioreaktorprozesses im 1 L-Maßstab (vgl. 4.5.3 und 4.5.4) wurden die Prozessbedingungen schrittweise in den 10 L- (vgl. 4.5.5.1) sowie anschließend in den 40 L- (vgl. 4.5.5.2) Maßstab übertragen.

4.5.5.1. Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 10 L-Maßstab

Im 10 L-Maßstab wurden drei Scale-up-Bioreaktorläufe durchgeführt (vgl. Tabelle 11). Die Entwicklung der drei Zielgrößen Zellwachstum, Zellvitalität und Rubella-VLP-Quantität ist in Abbildung 39 dargestellt.

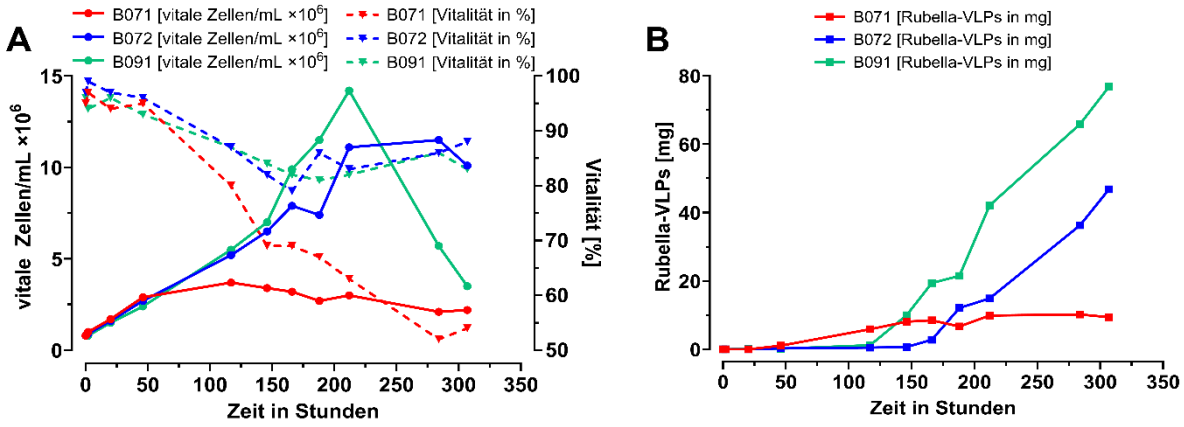


Abbildung 39: Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 10 L-Maßstab.

Durchführung von drei 10 L-Bioreaktorläufen: B071 (rot), B072 (blau) und B091 (grün) über eine Kultivierungsdauer von jeweils 307 Stunden. Die Prozessparameter sind Tabelle 11 zu entnehmen. A: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Zellzahl (Y-Achse links; vitale Zellen/mL×10^6; durchgezogene Linie) und Zellvitalität (Y-Achse rechts; in %; gestrichelte Linie). B: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Rubella-VLP-Quantität im Zellkulturüberstand (in mg; über Rubella-FLIA ermittelt).

Der erste Bioreaktorlauf B071 (rot) im vergrößerten Maßstab lief noch mit Einstellungen aus dem ersten Screening der Prozessparameter und mit reduzierter Begasungsrate (0,04–1,0 SLMP). Hier wird deutlich, dass der definierte pH-Wert von 7,2 ± 0,1 zu deutlich niedrigeren Zellzahlen sowie Zellvitalitäten im Vergleich zu den anderen beiden Bioreaktorprozessen führte. Die maximale Zellzahl lag bei 3,7 × 10^6 vitalen Zellen/mL bei einer Zellvitalität von 80 % zum Zeitpunkt 117 Stunden. Ab diesem Zeitpunkt kam es zu keinem weiteren Zellwachstum, zusätzlich sank die Zellvitalität rapide auf 54 % zum Ende der Kultivierung (Abbildung 39A). Die Menge an Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand zum Erntezeitpunkt lag bei 9,4 mg und somit bei 0,94 mg pro Liter Zellkultur (Abbildung 39B).

Im Vergleich dazu konnten im zweiten Scale-up-Versuch B072 (blau) mit Anpassungen des pH-Wertes auf 7,1 ± 0,2 sowie der Begasungsrate auf 0,4–7,5 SLPM, maximale Zellzahlen von 11,5 × 10^6 vitalen Zellen/mL bei einer Zellvitalität von 86 % zum Zeitpunkt 284 Stunden erreicht werden (Abbildung 39A). Die Menge an Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand nach 307 Stunden konnte auf 46,8 mg und demnach auf 6,2 mg pro Liter Zellkultur gesteigert werden (Abbildung 39B).

Infolge der Ergebnisse der beiden Scale-up-Ansätze B071 und B072 wurde der pH-Wert für den dritten Bioreaktorprozess B091 (grün) erneut angepasst. Daraus resultierten eine maximale Zellzahl von 14,2 × 10^6 vitalen Zellen/mL sowie Zellvitalitäten ≥ 81 % über den gesamten Prozess (Abbildung 39A). Der Einbruch der Zellzahlen ab dem Zeitpunkt von 212 Stunden ist auf eine starke Schaumbildung

zurückzuführen, wodurch Biomasse aus dem Reaktor entfernt wurde. Im Vergleich der drei Bioreaktorprozesse konnte bei B091 die größte Menge an Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand mit 76,8 mg nach 307 Stunden quantifiziert werden (Abbildung 39B). Dies entspricht einer Ausbeute an Zielprotein von 10,2 mg pro Liter Zellkultur.

Im quantitativen Vergleich der drei Scale-up-Prozesse zeigt sich eine deutliche Steigerung der Prozessleistung. Die maximale Zelldichte konnte von 3,7 × 10^6 Zellen/mL in B071 auf 11,5 × 10^6 Zellen/mL in B072 und schließlich auf 14,2 × 10^6 Zellen/mL in B091 erhöht werden. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 3,1 von B071 zu B072 und insgesamt um den Faktor 3,8 bis B091. Auch die Rubella-VLP-Ausbeute im Zellkulturüberstand konnte deutlich gesteigert werden: von 0,94 mg/L in B071 über 6,2 mg/L in B072 bis hin zu 10,2 mg/L in B091. Dies entspricht einer mehr als sechsfachen Erhöhung zwischen B071 und B072 sowie einer elffachen Steigerung von B071 zu B091. Parallel dazu konnte die Zellvitalität von maximal 80 % in B071 auf Werte zwischen 81–86 % in den Läufen B072 und B091 stabilisiert werden. Damit wird deutlich, dass die sukzessive Anpassung der Prozessparameter insbesondere in Bezug auf den pH-Wert und die Begasungsstrategie entscheidend zur Verbesserung von Zellwachstum, Vitalität und Produktausbeute beigetragen hat. Die Überwachung der Prozessparameter des Bioreaktorlaufs B091 sind im Anhang in Abbildung 57 visualisiert. Daten für die Bioreaktorläufe B071 und B072 werden nicht gezeigt.

Zur weiteren Charakterisierung der Prozesse wurden die Konzentrationen wichtiger Substrate und Metabolite (Glukose, Glutamin, Glutamat, Ammonium, Laktat) über die gesamte Kultivierungsdauer quantifiziert.

Für den Bioreaktorlauf B071 wurde die in der Schüttelkultur etablierte Feeding-Strategie angewandt (vgl. Tabelle 15), während für die Bioreaktorläufe B072 und B091 eine schrittweise an den Bioreaktormaßstab adaptierte Feeding-Strategie entwickelt wurde. Ziel war es, durch gezielte Zugabe von Feed-Lösung und L-Glutamin definierte Sollbereiche für Glukose (4 g/L) sowie Glutamin (2-3 mM) einzuhalten. Details zur Medienanalyse (vgl. 3.2.8.7) sowie zu den üblichen Konzentrationsbereichen dieser Parameter für die Kultivierung von HEK293-Zellen wurden bereits in den Kapiteln 3.2.8.7 und 4.2.3 beschrieben. Exemplarisch zeigt Abbildung 40 die Ergebnisse der Medienanalyse für den Bioreaktorprozess B091. Darüber hinaus werden in Abbildung 41 die Verläufe der Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen der Bioreaktorläufe B071, B072 und B091 über den gesamten Kultivierungszeitraum miteinander verglichen.

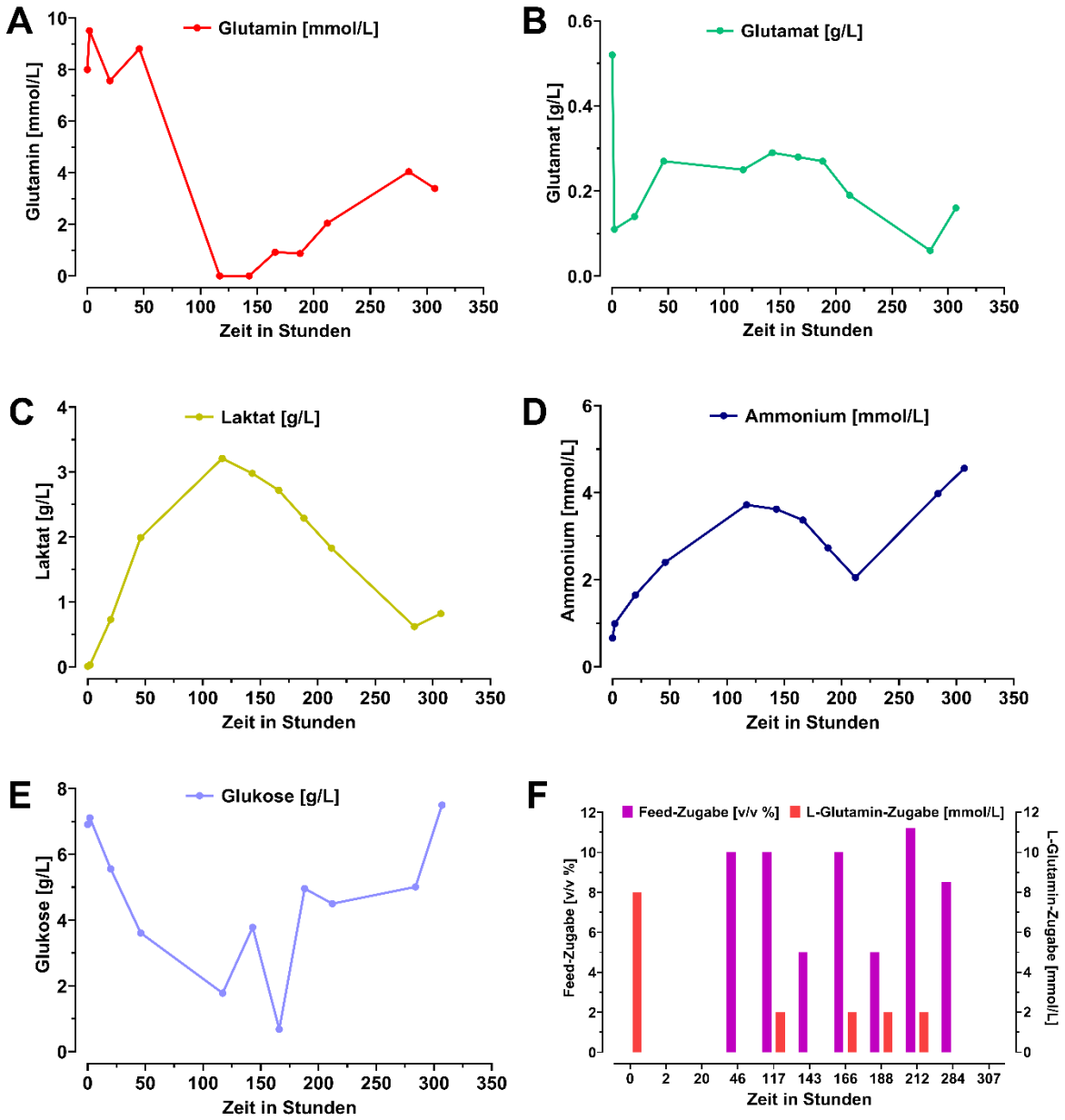


Abbildung 40: Medienanalyse des 10 L-Bioreaktorlaufs B091.

Medienanalyse des Kultivierungsprozesses B091 mittels 4BioCore Analyser zur Konzentrationsbestimmung der Parameter A: Glutamin [mmol/L] (rot), B: Glutamat [g/L] (grün), C: Laktat [g/L] (orange), D: Ammonium [mmol/L] (dunkelblau) und E: Glukose [g/L] (hellblau). F: Darstellung der Feed-Zugabe [v/v %] (lila) und L-Glutamin-Zugabe [mmol/L] (rot).

Die Glutamin-Konzentration ist zwischen 46 und 117 Stunden auf 0 mmol/L abgefallen (vgl. Abbildung 40A). Eine Supplementierung nach 117 Stunden konnte das Niveau von Glutamin bis 143 Stunden nicht anheben. Erst durch eine erneute L-Glutamin-Supplementierung von 2 mmol/L nach 143 Stunden konnte die Konzentration auf ca. 1 mmol/L nach 166 Stunden angehoben werden. Darauffolgende erneute L-Glutamin-Supplementierungen führten zu einem fortlaufenden Anstieg der Glutamin-Konzentration in der Zellkultur bis auf ein Niveau von ca. 4 mmol/L nach 284 Stunden.

Die letzten 23 Stunden vor der Ernte fiel die Konzentration auf ca. 3,4 mmol/L ab. Die Glutamin-Konzentration konnte über den Kultivierungsverlauf annäherungsweise im angestrebten Sollbereich (3,0 mM) gehalten werden. Allerdings zeigte sich, dass eine erhöhte L-Glutamin-Supplementierung nach 117 Stunden erforderlich gewesen wäre, um den Bedarf der Zellen vollständig zu decken. Gegen Ende der Kultivierung hätte die Zugabe von L-Glutamin hingegen reduziert werden sollen, da die beobachtete Anreicherung von Ammonium (vgl. Abbildung 40D) auf eine Überversorgung hindeutete und potenziell negative Effekte auf Zellwachstum und Produkt nach sich ziehen kann.

Während des gesamten Kultivierungsverlaufs wurden schwankende Glukose-Konzentrationen zwischen 7,0 und 0,7 g/L gemessen (vgl. Abbildung 40E). Der Mittelwert lag bei 5,1 g/L und damit leicht oberhalb des definierten Sollbereichs von 4,0 g/L. Gegen Ende der Kultivierung hätte die Zugabe der Feed-Lösung reduziert werden können, um die Glukose-Konzentration auf einem niedrigeren Niveau zu stabilisieren. Effekte der zusätzlichen Inhaltsstoffe der Feed-Lösung (z.B. Vitamine und Aminosäuren) auf Zellwachstum, Vitalität und Produktbildung konnten mangels Analytik nicht untersucht werden. Die Glutamat-Konzentration erreichte ihr höchstes Niveau bei 146 Stunden mit 0,32 g/L, wonach diese anschließend kontinuierlich bis 284 Stunden auf 0,06 g/L abfiel (vgl. Abbildung 40B). Die letzten 23 Stunden der Kultivierung zeigte sich nochmals ein Anstieg auf 0,16 g/L Glutamat. Die Laktat-Konzentration erreichte in B091 nach 117 Stunden mit 3,2 g/L ihren Maximalwert (vgl. Abbildung 40C). Anschließend nahm sie kontinuierlich ab und lag zum Ende der Kultivierung bei etwa 0,7 g/L.

In Abbildung 41 sind die Verläufe der Glukose-, Glutamin- und Laktatkonzentrationen der Bioreaktorläufe B071, B072 und B091 im direkten Vergleich über den gesamten Kultivierungsverlauf dargestellt.

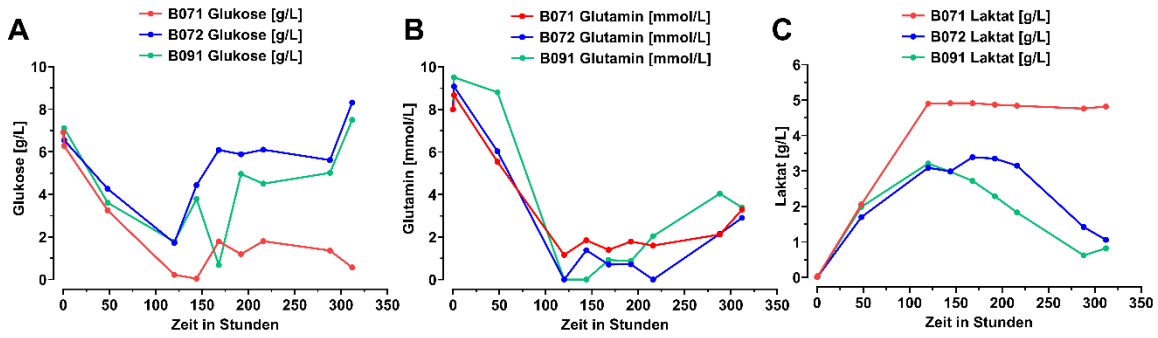


Abbildung 41: Medienanalyse (Glukose, Glutamin, Laktat) der Bioreaktorläufe B071, B072 und B091.

Medienanalyse der Bioreaktorläufe B071 (rot), B072 (blau) und B091 (grün) mittels 4BioCore Analyser zur Konzentrationsbestimmung von Glukose [g/L] (A), Glutamin [mM] (B) und Laktat [g/L] (C) über den gesamten Kultivierungsverlauf.

Beim Vergleich der Glukosekonzentrationen (Abbildung 41A) zeigte sich, dass die Glukosekonzentration in B071 nach etwa 120 Stunden auf nahezu 0 g/L abfällt und anschließend nicht mehr über 1,8 g/L anstieg. Parallel hierzu stieg die Laktatkonzentration (Abbildung 41C) bis auf einen Maximalwert von 4,9 g/L und verblieb bis zum Ende der Kultivierung auf diesem Niveau. Im Gegensatz dazu wies B072 ein ähnliches Profil wie B091 auf: Die Laktatkonzentration stieg zunächst bis etwa 120 Stunden auf etwas über 3 g/L an, blieb anschließend bis etwa 216 Stunden weitgehend stabil und sank danach bis zum Kultivierungsende auf 1 g/L ab.

Die Glutaminkonzentrationen (Abbildung 41B) verliefen in allen drei Bioreaktorläufen bis rund 200 Stunden nahezu identisch. Im weiteren Verlauf zeigte sich in B091 ein Anstieg auf etwa 4 mM, wohingegen in B071 und B072 Konzentrationen im Bereich von 2-3 mM erreicht wurden, die damit näher am definierten Sollbereich von 3 mM lagen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die unterschiedlichen Feeding-Strategien ist zu berücksichtigen, dass auch weitere Prozessparameter zwischen den Bioreaktorläufen variierten und nicht vollständig identisch waren (vgl. Tabelle 11).

Zusammenfassend konnte im Laufe der Prozessentwicklung im 10 L-Maßstab eine an die verwendete Zelllinie adaptierte Feeding-Strategie etabliert werden, wie im Bioreaktorlauf B091 demonstriert. Diese Anpassung führte zu einer deutlichen Steigerung der Prozessleistung (vgl. Abbildung 39).

4.5.5.2. Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 40 L-Maßstab

Nach erfolgreicher Etablierung des Bioreaktorprozesses in den 10 L-Maßstab (vgl. 4.5.5.1) wurden die Prozessbedingungen auf den 40 L-Maßstab übertragen. Die

aufgezeichneten Prozessparameter über die Kultivierungsdauer sind im Anhang in Abbildung 58 dargestellt.

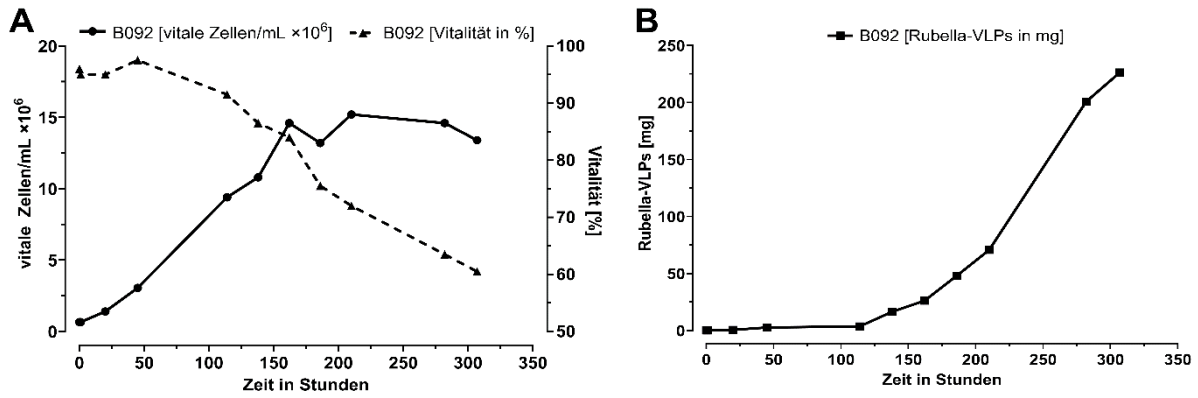


Abbildung 42: Upscaling des Bioreaktorprozesses in den 40 L-Maßstab.

Durchführung eines 40 L-Bioreaktorlaufs: B092 über eine Kultivierungsdauer von 307 Stunden. Die Prozessparameter sind Tabelle 12 zu entnehmen. A: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Zellzahl (Y-Achse links; vitale Zellen/mL×10^6; durchgezogene Linie) und Zellvitalität (Y-Achse rechts; in %; gestrichelte Linie). B: Bewertung des Prozesses hinsichtlich Rubella-VLP-Quantität im Zellkulturüberstand (in mg; über Rubella-FLIA ermittelt).

Aus Abbildung 42A ist ersichtlich, dass das Zellwachstum nach 162 Stunden das Maximum bei ca. 15 × 10^6 vitalen Zellen/mL erreicht und bis zum Ende der Kultivierung auf diesem Niveau verbleibt. Im Gegensatz dazu fällt die Zellvitalität ab diesem Zeitpunkt deutlich ab und erreicht zum Ende der Kultivierung 60,5 %.

Analog zu den Berechnungen in Kapitel 4.2.3 wurden die spezifische Wachstumsrate (μ) und die Generationszeit (t_d) für den 40 L-Bioreaktormaßstab ermittelt. Im Zeitraum 0–45 Stunden betrug $\mu = 0{,}0339$ h^{-1}, entsprechend einer Generationszeit von $t_d = 20{,}47$. Über den gesamten Zeitraum von 0–114 Stunden ergaben sich $\mu = 0{,}0241$ h^{-1} und $t_d = 28{,}77$ Stunden. Die gemessenen Wachstumsraten und Generationszeiten sind mit den Werten aus den Schüttelkolben-Kultivierungen direkt vergleichbar, liegen demnach weiterhin im publizierten Bereich für HEK293-Zellen ($\mu_{max} = 0{,}020 - 0{,}029$ h^{-1} [107]) und bestätigen die Übertragbarkeit der Kultivierungsbedingungen auf den 40 L-Maßstab.

Auffällig ist, dass die Menge an Rubella-VLPs im Zellkulturüberstand ab 210 Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden stark ansteigt – von 70,6 mg auf 200,6 mg (Abbildung 42B). Trotz der rapide sinkenden Zellvitalität konnte in den letzten 25 Stunden der Kultivierung ein weiterer Anstieg auf 226,2 mg Rubella-VLPs verzeichnet werden, was einer Erhöhung um knapp 13 % entspricht. Bezogen auf das

Zellkulturvolumen ergibt sich eine Produktausbeute von 5,8 mg Rubella-VLPs pro Liter Zellkultur.

Damit liegt die spezifische Ausbeute im 40 L-Maßstab unter den in den 10 L-Maßstab erzielten Werten. Im Bioreaktorlauf B072 wurden 6,2 mg/L erreicht (46,8 mg gesamt), während mit Bioreaktorlauf B091 10,2 mg/L quantifiziert werden konnten (76,8 mg gesamt). Im Vergleich dazu resultierten im 40 L-Maßstab insgesamt 226,2 mg Rubella-VLPs, was einer um 195 % höheren Gesamtausbeute als in B091 entspricht. Gleichzeitig lag die spezifische Ausbeute pro Liter Kulturvolumen im 40 L-Maßstab jedoch um 43 % niedriger als in B091. Auch im Vergleich zu B072 zeigte sich pro Liter eine leicht reduzierte Ausbeute (–6 %), während die absolute Produktmenge um 383 % höher war.

Die gemessenen Substrat- und Metabolitkonzentrationen (vgl. 3.2.8.7) wurden zu den Probenahmezeitpunkten über die Dauer der Kultivierung bestimmt und für Prozessanpassungen bezüglich Zugabe der Feed-Lösung und L-Glutamin unter Einstellung definierter Sollwerte für Glukose (4 g/L) und Glutamin (3 mM) verwendet. Da die Ergebnisse weitestgehend den in Abbildung 40 dargestellten Profilen des Bioreaktorlaufs B091 entsprechen, werden sie hier nicht erneut gezeigt. Der Transfer der an die verwendete Zelllinie adaptierten Feeding-Strategie in den 40 L-Bioreaktormaßstab verlief somit erfolgreich.

Nach der Ernte des Zellkulturüberstandes erfolgte zunächst ein Klärschritt mittels Zentrifugation, gefolgt von der Aufarbeitung über eine Antikörper-Affinitätschromatographie unter Einsatz der Produktionssäule 1-387 HiScale™ 50/20. Insgesamt wurden vier Chromatographieläufe durchgeführt, deren Elutionsfraktionen jeweils zu einer Gesamtfraktion (1450 mL mit 0,15 mg/mL = 217,5 mg) gepoolt wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Crossflow-Filtration mit Konzentrierungs- und Dialyseschritten in den definierten Lagerpuffer, wodurch eine Rubella-VLP-Charge resultierte. Die Quantifizierung mittels Bradford-Assay ergab eine Proteinkonzentration von 1,41 mg/mL in einem Gesamtvolumen von 140,7 mL, was einer Gesamtmenge von 198,4 mg entspricht. Erneute DLS-Messungen (vgl. Abbildung 34) und SDS-PAGE-Analysen (vgl. Abbildung 33) bestätigten auch in der finalen Charge eine homogene Partikelpopulation sowie eine geschätzte Reinheit von > 90 %. Die im Prozess erzielte Ausbeute entsprach damit 198,4 mg Rubella-VLPs. Ausgehend von einer eingesetzten Ausgangsmenge von 226,2 mg ergibt sich eine Gesamtausbeute von rund 88 % und damit ein Verlust von ca. 12 % über den gesamten Aufarbeitungsprozess.

4.6. Prozessanalytische Verfahren

4.6.1. Transmissionselektronenmikroskopie

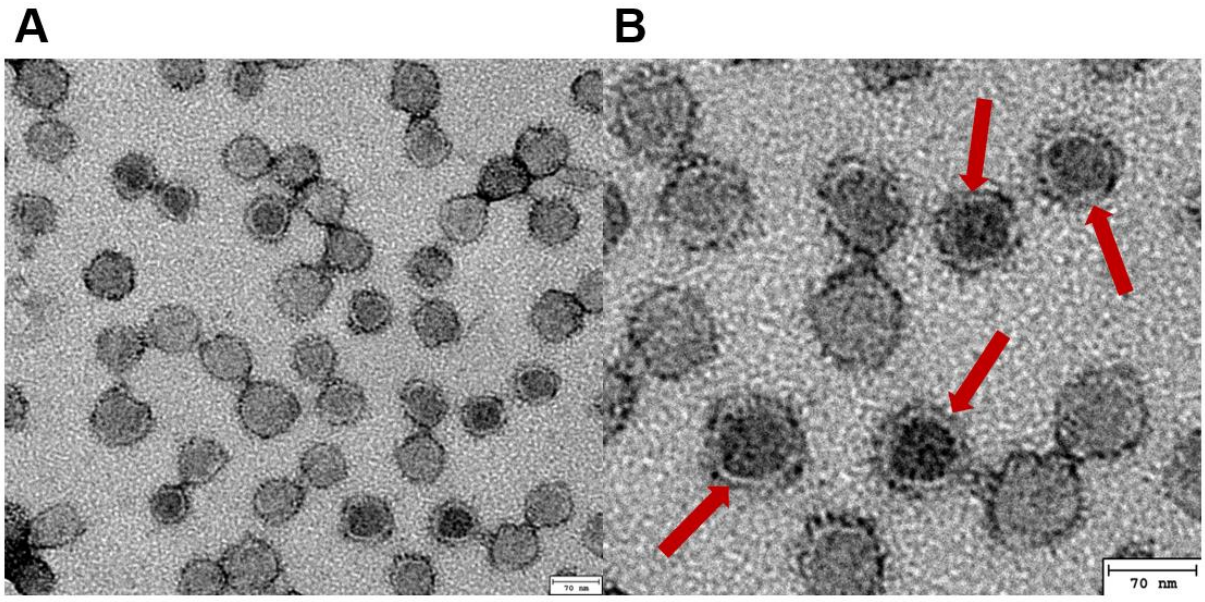


Abbildung 43: Transmissionselektronenmikroskopie.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der hergestellten Rubella-VLPs zur Charakterisierung der Partikelgröße und Form. A: Gesamtübersicht der Aufnahme. B: Ausschnitt der Gesamtübersicht, bei ausgewählten Partikeln wurde die Virushülle mit roten Pfeilen markiert. Uranylacetat als Negativkontrastmittel. Aufnahme unter Verwendung des Transmissionselektronenmikroskops JEOL, JEM-2100 bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV. Dargestellte Skalierung unten rechts = 70 µm.

Abbildung 43 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der hergestellten Rubella-VLPs. Die Partikel weisen einen geschätzten durchschnittlichen Durchmesser von 70-80 nm auf und liegen damit im typischen Größenbereich für Rubella-VLPs (50-150 nm) [19, 45, 86]. Sie erscheinen überwiegend in einer einheitlichen, sphärischen Form. Bei einzelnen Partikeln ist zudem eine Virushülle klar erkennbar, die in Abbildung 43B durch rote Pfeile hervorgehoben ist. Die Partikelgröße lag im Bereich der zuvor mittels DLS ermittelten durchschnittlichen Partikelgröße von 75,38 nm (±4,1 SD) (vgl. Abbildung 34) und bestätigt somit die Stabilität und Homogenität der hergestellten Rubella-VLPs.

4.6.2. Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F

Zur Untersuchung PTM der Rubella-VLPs, insbesondere des Vorhandenseins von N-gebundenen Glykosylierungen, wurde eine enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F durchgeführt (Abbildung 44).

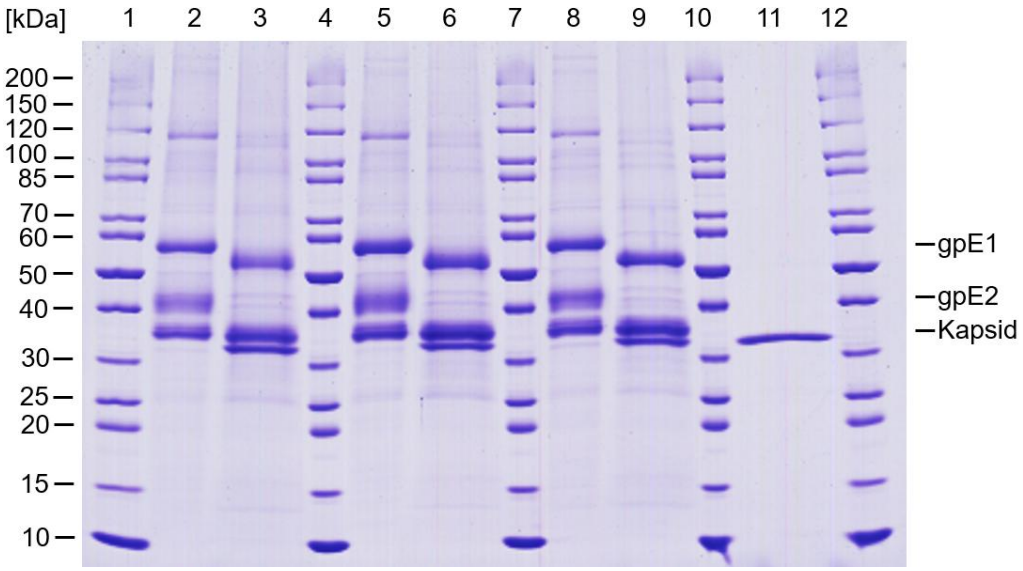


Abbildung 44: SDS-PAGE-Analyse zu Deglykosylierung von Rubella-VLPs mit PNGase F.

Gelbelegung der Proben: 1 = Proteinmarker, 2 = Rubella-VLP-Charge 1 vor Deglykosylierung (v.D.) (2 µg), 3 = Rubella-VLP-Charge 1 nach Deglykosylierung (n.D.) (2 µg), 4 = Proteinmarker, 5 = Rubella-VLP-Charge 2 v.D. (2 µg), 6 = Rubella-VLP-Charge 2 n.D. (2 µg), 7 = Proteinmarker, 8 = Rubella-VLP-Charge 3 v.D. (2 µg), 9 = Rubella-VLP-Charge 3 n.D. (2 µg), 10 = Proteinmarker, 11 = PNGase F, 12 = Proteinmarker.

MW PNGase F: ca. 36 kDa. MW Rubella Kapsidprotein: ca. 33 kDa; MW Rubella gpE2: ca. 42-47 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW Rubella gpE2: ca. 31 kDa; MW gpE1: ca. 56 kDa mit posttranslationalen Modifikationen, vorhergesagtes MW gpE1: ca. 51 kDa [19]. In vitro Transkription/Translation einer für die Rubella Strukturproteine kodierenden cDNA resultiert in einem 110 kDa Polyprotein [51].

Die erwarteten Molekulargewichte der Rubella-Strukturproteine liegen - abhängig von Glykosylierungen - bei etwa 35 kDa für das Kapsidprotein, 42-47 kDa für das gpE2 sowie ca. 56 kDa für das gpE1 [19]. Diese Proteinbanden konnten in den finalen Rubella-VLP-Chargen (Proben 2, 5, 8) auf den entsprechenden Höhen nachgewiesen werden. Nach der enzymatischen Behandlung mit PNGase F (Proben 3, 6, 9) zeigte sich eine deutliche Verschiebung der Banden für gpE2 und gpE1 zu niedrigeren Molekulargewichten (gpE2: ca. 35 kDa, gpE1: ca. 52 kDa). Dieses charakteristische Muster wurde als Hinweis auf eine erfolgreiche enzymatische Entfernung von N-gebundenen Glykosylierungen und damit als Bestätigung des Vorliegens von N-Glykosylierungen in allen untersuchten Rubella-VLP-Chargen interpretiert. Zusätzlich wurde in den deglykosylierten Proben eine Bande bei ca. 33 kDa detektiert, die nahe am theoretischen Molekulargewicht der eingesetzten PNGase F (ca. 36 kDa) liegt.

4.7. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie

Ausgewählte Rubella-VLP-Testchargen (Rubella-VLP 1 aus 40 L- Bioreaktorprozess, vgl. 4.5.5.2; Rubella-VLP 2 aus 10 L-Bioreaktorprozess, vgl. 4.5.5.1) wurden im Hinblick auf ihre Eignung für den Einsatz in der Humanserologie charakterisiert. Mittels FLIA und ELISA erfolgte die Untersuchung diagnostisch relevanter Eigenschaften der Rubella-VLPs im jeweiligen Testsystem. Im Vordergrund stand hierbei die Reaktivität gegenüber Rubella-spezifischen Antikörpern aus Humanseren. Diese stellen eine Voraussetzung für die Anwendung in entsprechenden serologischen Testsystemen dar. Weiterhin sollen die Sensitivität und Spezifität bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt. In den FLIA- und ELISA-Studien wurden die Proben aus Kapazitätsgründen und aufgrund des hohen Probenumfangs jeweils nur in Einzelbestimmung gemessen. Doppel- oder Wiederholungsmessungen wurden nicht durchgeführt. Die resultierenden Daten gelten auf Grundlage der etablierten in-house-Kontrollmessungen als methodisch zuverlässig.

4.7.1. FLIA-Studien

Hoch-positive Humanseren bezüglich Rubella-IgG- (Abbildung 45A) beziehungsweise Rubella-IgM- (Abbildung 45B) wurden im Rubella-FLIA unter Verwendung von Rubella-VLP 2 analysiert, um den darstellbaren Messbereich des Assays zu evaluieren. Die Analyse basierte auf einer 20-Punkt-Verdünnungsreihe (1:50-1:1.000.000) der getesteten Seren. Die Reaktivität von Rubella-VLP 2 mit den Rubella-spezifischen Antikörpern aus den Humanseren wurde über die MFI-Werte quantifiziert.

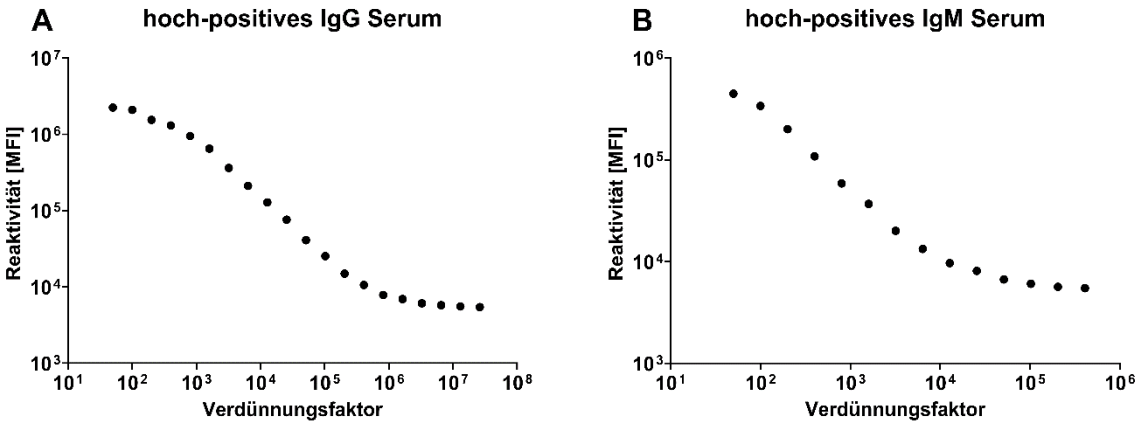


Abbildung 45: Analyse des FLIA-Messbereichs.

Ein hoch-positives IgG- (A) und ein hoch-positives IgM- (B) Humanserum wurden über einen breiten Bereich verdünnt und im Rubella-FLIA getestet. Hierfür erfolgte eine 20-Punkt-Verdünnungsreihe der Seren von 1:50-1:1.000.000 (x-Achse). Das gemessene mittlere Fluoreszenzsignal (MFI, y-Achse) repräsentiert die Reaktivität der Rubella-VLPs mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren.

Die Ergebnisse in Abbildung 45 belegen einen breiten dynamischen Messbereich mit mehr als vier Größenordnungen für die IgG-Analyse (A) sowie über drei Größenordnungen für die IgM-Analyse (B).

Zur Beurteilung der Reaktivität der Antigene (Rubella-VLP 1, Rubella-VLP 2, Referenzantigen) mit Rubella-spezifischen Antikörpern aus den untersuchten Studienseren wurden die gemessenen MFI-Werte in Abbildung 46 miteinander verglichen. Diese wurden als Maß für die Reaktivität des jeweiligen Antigens mit den spezifischen Antikörpern aus den Humanseren herangezogen. Die Studienseren wurden zuvor mithilfe eines Referenz-ELISAs vorbewertet und in Rubella-IgG-/IgM-positive und -negative Proben klassifiziert.

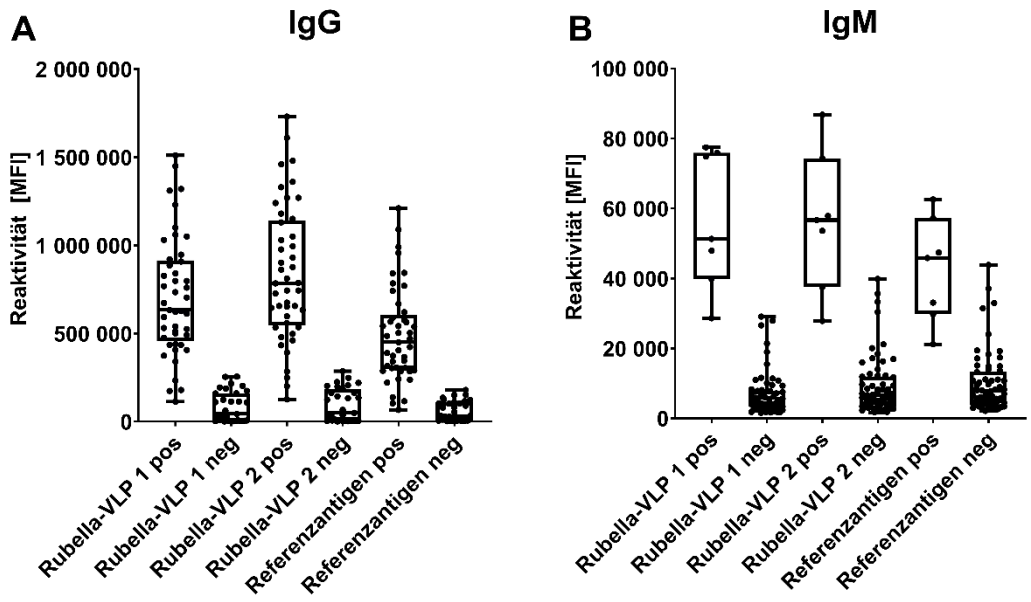


Abbildung 46: Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im FLIA.

Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im serologischen Testsystem FLIA. Das gemessene mittlere Fluoreszenzsignal (MFI, y-Achse) repräsentiert die Reaktivität der jeweiligen Antigene (x-Achse) mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren. A: Einsatz von 76 vorbewerteten Rubella-IgG-Humanseren, in welchen 45 als positiv (pos) und 31 als negativ (neg) für anti-Rubella-human-IgG-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden. B: Einsatz von 69 vorbewerteten Rubella-IgM- Humanseren, in welchen 7 als positiv (pos) und 62 als negativ (neg) für anti-Rubella-human-IgM-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden.

Zur Überprüfung, ob Rubella-IgG-positive Seren signifikant höhere MFI-Werte aufwiesen als Rubella-IgG-negative Seren (Abbildung 46A), wurde zunächst die Normalverteilung der Daten mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests (vgl. 3.2.10.3) geprüft. Für alle drei getesteten Antigene ergaben sich p-Werte > 0,05, womit keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung festgestellt wurde. Anschließend erfolgte ein t-Test (vgl. 3.2.10.5) für unabhängige Stichproben ($\alpha = 0,05$). Für Rubella-VLP 1, Rubella-VLP 2 und das Referenzantigen wurden jeweils $p < 0,001$ ermittelt, sodass die Mittelwerte der beiden Gruppen hochsignifikant voneinander abwichen.

Für die Rubella-IgG-negativen Seren zeigten sich niedrige mittlere MFI-Werte für alle drei Antigene. Die Mittelwerte betrugen 84362 (±86349 SD) für Rubella-VLP 1, 93732 (±93410 SD) für Rubella-VLP 2 und 60983 (±56812 SD) für das Referenzantigen. Diese Werte spiegeln die geringe oder fehlende Reaktivität der negativen Seren wider, was auf eine hohe Spezifität des Assays schließen lässt. Im Gegensatz dazu wiesen die Rubella-IgG-positiven Seren signifikant höhere MFI-Werte auf. Die Mittelwerte lagen bei 707192 (±338584 SD) für Rubella-VLP 1, 837696 (±386126 SD) für Rubella-VLP 2 und 488763 (±265148 SD) für das Referenzantigen. Dies entspricht einer etwa

acht- bis zehnfachen Signalsteigerung gegenüber den negativen Seren und belegt eine deutliche serologische Reaktivität der positiven Proben gegenüber allen getesteten Antigenen. Die hohen Standardabweichungen innerhalb der positiven Gruppe (zwischen 265148-386126 MFI) deuten auf eine interindividuelle Variabilität der Antikörpertiter in den untersuchten Seren hin.

Zwischen den Antigenen zeigten sich Unterschiede in der Reaktivität: Rubella-VLP 2 wies die höchsten MFI-Werte auf, gefolgt von Rubella-VLP 1 und dem nativen Rubella-Referenzantigen. Diese Tendenz deutet auf eine möglicherweise höhere Antigenität der Rubella-VLP 2 Charge hin.

Für den Rubella-IgM-FLIA (Abbildung 46B) wurde zunächst das ungleiche Stichprobenverhältnis berücksichtigt (7 positive IgM- und 62 negative IgM-Seren), das die Teststärke und Varianzeinschätzung potenziell beeinflussen kann. Die Verteilungen der MFI-Werte beider Gruppen wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests auf Normalverteilung geprüft. Für alle untersuchten Antigene (Rubella-VLP 1, Rubella-VLP 2, Referenzantigen) ergaben sich p-Werte > 0,05, sodass keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung festgestellt wurde ($\alpha = 0,05$). Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den Rubella-IgM-positiven und -negativen Seren erfolgte mittels Welch-t-Test für unabhängige Stichproben, da unterschiedliche Gruppengrößen und Varianzen vorlagen und dieses Testverfahren das Ungleichgewicht der Stichprobenumfänge berücksichtigt. Für alle drei Antigene wurden hochsignifikante Unterschiede der MFI-Mittelwerte beobachtet ($p < 0,001$). Die IgM-positiven Seren zeigten somit eine signifikant höhere Reaktivität gegenüber allen getesteten Antigenen. Das ungleiche Stichprobenverhältnis beeinflusste die Interpretation der Ergebnisse nicht maßgeblich.

Für die Rubella-IgM-negativen Seren zeigten sich niedrige mittlere MFI-Werte: 78920 (±64330 SD) für Rubella-VLP 1, 82410 (±70120 SD) für Rubella-VLP 2 und 68950 (±61280 SD) für das Referenzantigen. Im Gegensatz dazu lagen die Mittelwerte der Rubella-IgM-positiven Seren bei 365240 (±142570 SD) für Rubella-VLP 1, 398510 (±165240 SD) für Rubella-VLP 2 und 321880 (±129760 SD) für das Referenzantigen. Dies entspricht einer etwa vier- bis fünffachen Signalsteigerung gegenüber den negativen Seren und belegt eine deutliche serologische Reaktivität der positiven Proben gegenüber allen getesteten Antigenen. Zwischen den Antigenen zeigten sich auch hier Unterschiede in der Reaktivität. Rubella-VLP 2 wies, analog zum Rubella-

IgG-FLIA, die höchsten MFI-Werte auf, gefolgt von Rubella-VLP 1 und dem nativen Rubella-Referenzantigen.

Damit konnte statistisch bestätigt werden, dass Rubella-IgG- und Rubella-IgM-positive Seren signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten aufwiesen als die entsprechenden negativen Seren. Die beobachteten Signalunterschiede belegen die hohe Spezifität und Sensitivität des FLIA-Systems sowie die serologische Reaktivität der getesteten Rubella-Antigene. Somit wird die diagnostische Eignung des Rubella-IgG- und Rubella-IgM-FLIA-Testsystems unter Verwendung der rekombinanten Rubella-VLP-Chargen bestätigt. Die weiterführende Bewertung der diagnostischen Eigenschaften erfolgte mittels der ROC-Analyse (vgl. Abbildung 48), auf die in einem späteren Abschnitt eingegangen wird.

Zur Bewertung der Übereinstimmung zwischen den beiden Rubella-VLP-Chargen wurde eine Passing-Bablok-Regression (vgl. 3.2.10.1) zwischen Rubella-VLP 1 und Rubella-VLP 2 durchgeführt und durch den Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) ergänzt. Als Akzeptanzkriterium für die Regressionssteigung wurde 1 ± 0,3 definiert.

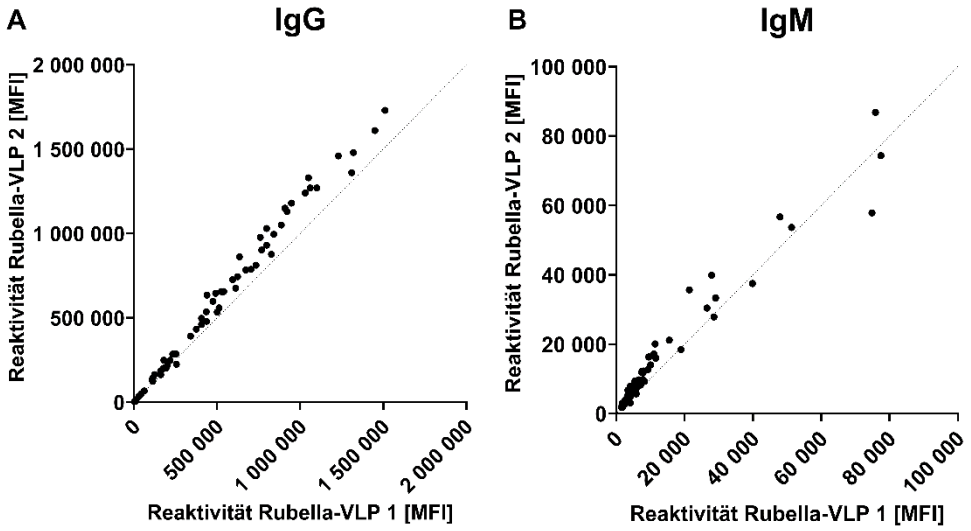


Abbildung 47: Passing-Bablok-Regression: Vergleich zweier hergestellter Rubella-VLP-Chargen mittels FLIA.

Das gemessene mittlere Fluoreszenzsignal (MFI) repräsentiert die Reaktivität der jeweiligen Antigene (x-Achse: Rubella-VLP 1, y-Achse: Rubella-VLP 2) mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren. Vergleich zweier unabhängig voneinander hergestellter Rubella-VLP-Chargen (Rubella-VLP 1, Rubella-VLP 2) im serologischem Testsystem FLIA. Statistische Analyse wurde mittels Passing-Bablok Regression durchgeführt (IgG: y = -254,6 + 1,181 × x, IgM y = 691,2 + 1,13 × x). Der Pearson Korrelationskoeffizient beträgt 0,995 für IgG (A) und 0,986 für IgM (B), die Steigung liegt bei 1,181 für IgG (A) und 1,13 bei IgM (B). A: Einsatz von 76 vorbewerteten Rubella-IgG-Humanseren, in welchen 45 als positiv und 31 als negativ für anti-Rubella-human-IgG-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden. B: Einsatz von 69 vorbewerteten Rubella-IgM-Humanseren, in welchen 7 als positiv und 62 als negativ für anti-Rubella-human-IgM-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden.

Für den IgG-Datensatz (Abbildung 47A) ergab die Passing-Bablok-Analyse eine Steigung von 1,181 mit einem 95 %-Konfidenzintervall (KI) von 1,155-1,208 sowie einen Achsenabschnitt von -254,6. Das 95 %-KI beschreibt den Bereich, in dem die wahre Regressionssteigung mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug r = 0,995, was auf eine nahezu perfekte lineare Beziehung zwischen beiden Datensätzen hinweist. Die Steigung lag vollständig innerhalb des definierten Akzeptanzbereichs, womit keine relevante proportionale Abweichung zwischen den beiden Rubella-VLP-Chargen nachgewiesen wurde. Die sehr hohe Korrelation unterstreicht die exzellente Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit der Messreihen.
Für den IgM-Datensatz (Abbildung 47B) wurde eine Steigung von 1,130 mit einem 95 %-KI von 1,033-1,275 und einem Achsenabschnitt von 691,2 ermittelt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient lag bei r = 0,986. Der Punktwert der Steigung erfüllt das Akzeptanzkriterium; das 95%-Konfidenzintervall liegt an der oberen Akzeptanzgrenze, überschreitet diese jedoch nicht. Dies weist auf eine etwas größere Unsicherheit der Schätzung im Vergleich zum IgG-Datensatz hin, was auf die geringere Zahl IgM-positiver Seren und die höhere Streuungsbreite der Messwerte zurückgeführt werden kann.
Insgesamt zeigen beide Datensätze eine hohe Übereinstimmung zwischen den Rubella-VLP-Chargen. Die Ergebnisse belegen eine robuste und reproduzierbare Herstellung der beiden Rubella-VLP-Chargen. Sowohl im IgG- als auch im IgM-FLIA liefern Rubella-VLP 1 und Rubella-VLP 2 über den gesamten Messbereich proportional vergleichbare Signale (Steigung nahe 1), was die Konsistenz und Stabilität des Produktionsprozesses bestätigt.

Für die weiterführende statistische Auswertung wurde eine ROC-Analyse (vgl. 3.2.10.2) unter Bezug auf die Vorbewertung der Humanseren mittels Referenz-ELISA durchgeführt. Die ROC-Analyse dient der Beurteilung der diagnostischen Leistungsfähigkeit des Rubella-VLP-basierten FLIA-Systems hinsichtlich seiner Eignung zur Differenzierung zwischen Rubella-IgG- bzw. Rubella-IgM-positiven und -negativen Humanseren. Ziel war die Charakterisierung des Assays im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität und Gesamtgenauigkeit für den Einsatz in der humanserologischen Diagnostik. Auf Grundlage der zuvor durchgeführten Passing-Bablok-Regression konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Rubella-

VLP-Chargen 1 und 2 nachgewiesen werden. Daher wird die ROC-Analyse visuell exemplarisch anhand der Rubella-VLP-Charge 1 dargestellt (Abbildung 48). Die Analyse erfolgte für beide Rubella-VLP-Chargen.

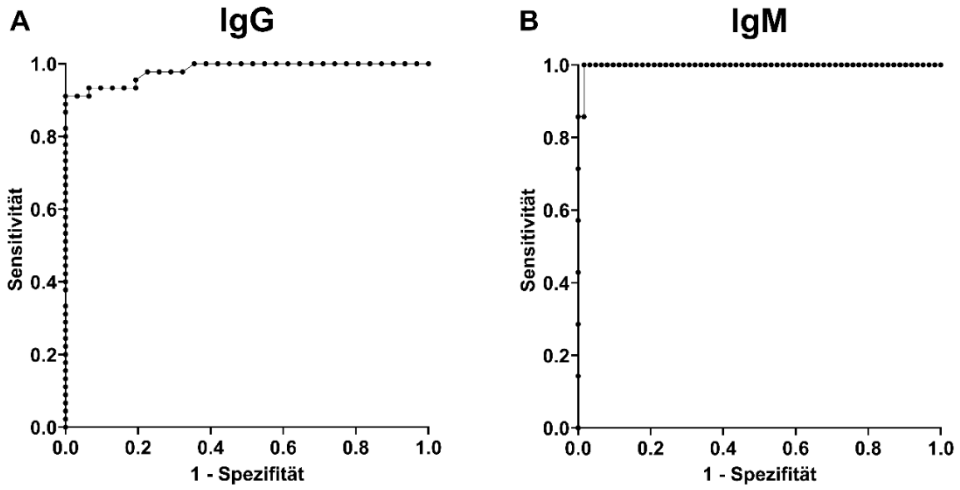


Abbildung 48: ROC Analyse FLIA.

ROC Analyse zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Rubella-VLP 1-basierten FLIA-Systems. AUC für IgG: 0,982 (A), AUC für IgM: 0,998 (B). A: Einsatz von 76 vorbewerteten Rubella-IgG-Humanseren, in welchen 45 als positiv und 31 als negativ für anti-Rubella-human-IgG-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden. B: Einsatz von 69 vorbewerteten Rubella-IgM-Humanseren, in welchen 7 als positiv und 62 als negativ für anti-Rubella-human-IgM-Antikörper mittels eines Referenz-ELISAs vorbewertet wurden.

Im IgG-FLIA wurden insgesamt 76 Humanproben untersucht, darunter 45 Rubella-IgG-positive und 31 Rubella-IgG-negative Proben. Die ROC-Analyse ergab eine Fläche unter der Kurve (area under curve, AUC) von 0,982 für die Rubella-VLP-Charge 1 und 0,985 für die Rubella-VLP-Charge 2 (Abbildung 48A). Beide Werte liegen im Bereich > 0,97 und weisen damit gemäß der Klassifikation nach [37] auf eine sehr hohe diagnostische Leistungsfähigkeit des Testsystems hin. Für Rubella-VLP 1 wurde ein 95 %-KI von 0,960 bis 1,004, für Rubella-VLP 2 ein 95 %-KI von 0,964 bis 1,006 ermittelt. Die Konfidenzintervalle liegen jeweils vollständig im Bereich nahe 1,0 und umfassen den Idealwert nur marginal, was auf eine sehr geringe Schätzunsicherheit und eine nahezu perfekte Trennschärfe zwischen positiven und negativen Seren hinweist. Damit wird statistisch bestätigt, dass der Rubella-VLP-basierte IgG-FLIA nahezu perfekt zwischen positiven und negativen Proben differenziert und eine ausgezeichnete diagnostische Präzision aufweist.

Im IgM-FLIA wurden 69 Humanseren analysiert, bestehend aus 7 Rubella-IgM-positiven und 62 Rubella-IgM-negativen Proben. Hier ergaben sich AUC-Werte von jeweils 0,998 für Rubella-VLP 1 und Rubella-VLP 2, was eine nahezu ideale

Trennschärfe (AUC ≈ 1,0) und damit eine hervorragende Eignung für den spezifischen IgM-Nachweis belegt (Abbildung 48B). Für Rubella-VLP 1 wurde ein 95 %-KI von 0,991 bis 1,004 berechnet, für Rubella-VLP 2 ein 95 %-KI von 0,967 bis 1,010. Diese engen Intervalle, die beide den Idealwert 1,0 einschließen, verdeutlichen die exzellente Klassifikationsgenauigkeit des IgM-FLIA. Beide Konfidenzintervalle zeigen, dass die Trennschärfe zwischen positiven und negativen Seren maximal ist und die Wahrscheinlichkeit einer Fehlklassifikation praktisch ausgeschlossen werden kann. Damit belegen die Ergebnisse eine sehr hohe diagnostische Sicherheit und präzise Reproduzierbarkeit des Testsystems auch im IgM-Nachweis.

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurde jeweils ein optimaler Cut-off festgelegt (vgl. 3.2.10.2). Dieser Schwellenwert definiert den Punkt auf der ROC-Kurve, an dem die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximiert wird (Youden-Index) und gewährleistet somit eine bestmögliche Trennschärfe zwischen positiven und negativen Seren bei gleichzeitiger Minimierung der Fehlklassifikationen. Seren mit grenzwertigen Ergebnissen im Referenz-ELISA wurden gemäß der in der IVD-Praxis üblichen Vorgehensweise von der Analyse ausgeschlossen.

Für den IgG-FLIA wurde bei der Rubella-VLP-Charge 1 ein Cut-off von 255174 MFI definiert, woraus sich eine Sensitivität von 91,1 % und eine Spezifität von 100 % ergaben. Für die Rubella-VLP-Charge 2 wurde der Schwellenwert auf 247306 MFI festgelegt, mit einer resultierenden Sensitivität von 95,6 % und Spezifität von 96,8 %.

Im IgM-FLIA lag der optimale Cut-off für die Rubella-VLP-Charge 1 bei 27945 MFI mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 98,4 %. Für die Rubella-VLP-Charge 2 wurde der Schwellenwert auf 35639 MFI festgelegt, was einer Sensitivität von 85,7 % und einer Spezifität von 98,4 % entspricht.

Die ermittelten Kennwerte verdeutlichen eine ausgeprägte Trennschärfe und Zuverlässigkeit des Rubella-VLP-basierten FLIA-Systems sowohl im IgG- als auch im IgM-Nachweis. Die nahezu perfekten AUC-Werte in beiden Analysen mit engen 95 %-KI nahe dem Idealwert 1,0 bestätigen die exzellente diagnostische Eignung der Rubella-VLPs, während die konsistent hohen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte die klinische Robustheit und Präzision des Testsystems belegen. Zudem unterstreichen die nahezu identischen AUC-Werte und sich überschneidenden Konfidenzintervalle der beiden VLP-Chargen die hohe Reproduzierbarkeit, Chargenkonstanz und statistische Robustheit des Herstellungsprozesses.

4.7.2. ELISA-Studien

Mittels ELISA-Technologie wurden ergänzende immunologische Charakterisierungen zur Bewertung der diagnostischen Eignung der Rubella-VLPs durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.9.2). Hierfür kamen insgesamt 70 Rubella-IgG-Humanseren (44 positiv, 26 negativ) sowie 72 Rubella-IgM-Humanseren (9 positiv, 63 negativ) zum Einsatz. Seren, die im Grenzbereich des ELISAs lagen, wurden gemäß der in der IVD-Praxis üblichen Vorgehensweise von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Reaktivität der Rubella-VLPs gegenüber Rubella-spezifischen Antikörpern aus den Studienseren wurde über die Extinktion bei 405 nm (OD_{405nm}) bestimmt und mithilfe der Analysesoftware SERION easyANALYZE ausgewertet. Durch die Titration standardisierter Referenzseren konnte eine Korrelation der gemessenen Extinktionswerte mit den entsprechenden Konzentrationsangaben in Units/mL hergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auf dieser Grundlage wurden die untersuchten Studienseren anhand der gemessenen OD_{405nm}-Werte in positive, negative und Grenzbereichsproben klassifiziert. Die diagnostische Eignung der Rubella-VLP-Charge 2 im ELISA wurde in Abbildung 49 im Vergleich mit dem Rubella-Referenzantigen sowie einer Mastercharge des SERION ELISA classic Röteln/Rubella Virus IgG/IgM dargestellt. Dieser Vergleich ermöglichte eine direkte Bewertung der Signalintensität der rekombinanten Rubella-VLPs im Verhältnis zu etablierten Referenzsystemen.

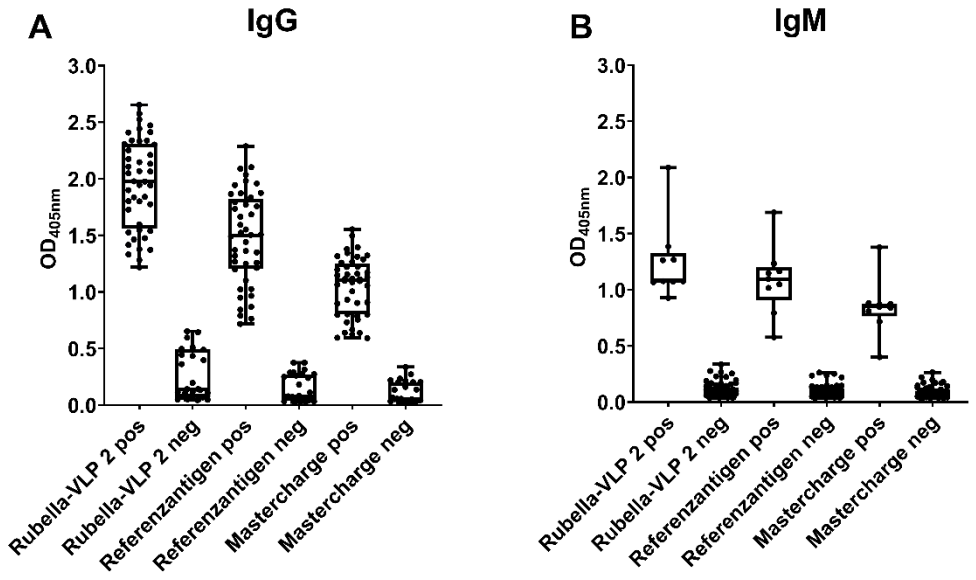


Abbildung 49: Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im ELISA.

Charakterisierung der diagnostischen Eignung von Rubella-VLPs im ELISA. Die gemessene optische Dichte (OD_{405nm}, y-Achse) repräsentiert die Reaktivität der jeweiligen Antigene (x-Achse) mit den spezifischen Antikörpern der getesteten Humanseren. Einsatz von 70 Rubella-IgG- (A) sowie 72 Rubella-IgM- (B) Humanseren. A: Von den IgG-Seren wurden 44 positiv (pos) und 26 negativ (neg) über die ELISA-Mastercharge bewertet. B: Von den IgM-Seren wurden 9 positiv (pos) und 63 negativ (neg) über die ELISA-Mastercharge bewertet.

Zur Beurteilung, ob Rubella-IgG-positive Seren im Vergleich zu Rubella-IgG-negative Seren signifikant höhere Extinktionswerte (OD_{405nm}-) zeigten (Abbildung 49A), wurde zunächst die Normalverteilung der Messwerte überprüft. Hierzu wurde der Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests (vgl. 3.2.10.3) angewendet. Für alle drei untersuchten ELISA-Testsysteme (Rubella-VLP 2, Rubella-Referenzantigen, ELISA-Mastercharge) ergaben sich p-Werte > 0,05, sodass keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung nachgewiesen wurde ($\alpha = 0,05$). Der anschließende Gruppenvergleich erfolgte mit dem Welch-t-Test (vgl. 3.2.10.5) für unabhängige Stichproben ($\alpha = 0,05$). Sowohl für Rubella-VLP 2, das Referenzantigen als auch die ELISA-Mastercharge wurden hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den Gruppen beobachtet.

Die Rubella-IgG-negativen Seren wiesen niedrige mittlere OD_{405nm}-Werte für alle drei Antigene auf. Die Mittelwerte betrugen 0,268 (±0,215 SD) für Rubella-VLP 2, 0,153 (±0,121 SD) für das Referenzantigen und 0,113 (±0,093 SD) für die Mastercharge. Diese geringen Signalintensitäten spiegeln eine sehr schwache Reaktivität wider und verdeutlichen die hohe Spezifität der Testsysteme.

Demgegenüber zeigten die Rubella-IgG-positiven Seren signifikant höhere Extinktionswerte. Die Mittelwerte lagen bei 1,954 (±0,397 SD) für Rubella-VLP 2, 1,471

(±0,412 SD) für das Referenzantigen und 1,049 (±0,259 SD) für die Mastercharge. Damit ergab sich eine sieben- bis neunfache Signalsteigerung im Vergleich zu den negativen Proben, was eine ausgeprägte serologische Reaktivität der positiven Seren gegenüber allen getesteten Antigenen belegt. Die hohen Standardabweichungen innerhalb der positiven Gruppen (zwischen 0,259 und 0,412 OD_{405nm}) deuten auf eine interindividuelle Variabilität der Antikörpertiter hin.

Im direkten Vergleich der Antigene zeigte sich, dass Rubella-VLP 2 die höchsten mittleren OD_{405nm}-Werte erzielte, gefolgt vom Referenzantigen und der Mastercharge. Dies deutet auf eine etwas höhere Antigenität der Rubella-VLP-Charge 2 hin.

Beim Rubella-IgM-ELISA (Abbildung 49B) wurde das ungleiche Stichprobenverhältnis zwischen positiven (n = 9) und negativen Seren (n = 63) berücksichtigt, das die Varianzeinschätzung und Teststärke potenziell beeinflussen kann. Die Überprüfung der Verteilungen der OD_{405nm}-Werte mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Tests ergab für alle untersuchten ELISA-Testsysteme (Rubella-VLP 1, Rubella-VLP 2, Referenzantigen) p-Werte > 0,05, sodass die Annahme der Normalverteilung beibehalten werden konnte ($\alpha = 0,05$). Zum Vergleich der Gruppen wurde aufgrund der unterschiedlichen Stichprobengrößen und Varianzen der Welch-t-Test eingesetzt, da dieses Verfahren robust gegenüber ungleichen Varianzen und Gruppengrößen ist. Für alle drei Antigene zeigten sich hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den Mittelwerten der OD_{405nm}-Werte der positiven und negativen Seren. Die IgM-positiven Proben wiesen somit eine signifikant höhere Reaktivität gegenüber allen getesteten Antigenen, während das ungleiche Stichprobenverhältnis die Ergebnisinterpretation nicht wesentlich beeinflusste.

Die IgM-negativen Seren zeigten niedrige OD_{405nm}-Werte mit Mittelwerten von 0,104±0,067 SD (Rubella-VLP 2), 0,093±0,055 SD (Referenzantigen) und 0,086±0,049 SD (Mastercharge). Demgegenüber lagen die Mittelwerte der IgM-positiven Seren bei 1,247±0,344 SD (Rubella-VLP 2), 1,085±0,305 SD (Referenzantigen) und 0,846±0,250 SD (Mastercharge). Dies entspricht einer zehn- bis zwölffachen Signalsteigerung im Vergleich zu den negativen Seren und weist auf eine starke serologische Reaktivität der Rubella-IgM-positiven Proben hin. Analog zur IgG-Analyse zeigte sich auch hier, dass Rubella-VLP 2 die höchsten mittleren OD_{405nm}-Werte aufwies, gefolgt vom Referenzantigen und der Mastercharge.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl Rubella-IgG-positive als auch Rubella-IgM-positive Seren signifikant höhere Extinktionswerte erzielten als die

entsprechenden negativen Proben. Die Ergebnisse belegen die hohe diagnostische Leistungsfähigkeit des Rubella-VLP-basierten ELISA-Systems, das sowohl durch eine ausgeprägte Spezifität als auch eine hohe Sensitivität charakterisiert ist. Die konsistenten, hochsignifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen unterstreichen die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Systems.
Für die weiterführende statistische Auswertung wurde eine ROC-Analyse (Abbildung 50) durchgeführt.

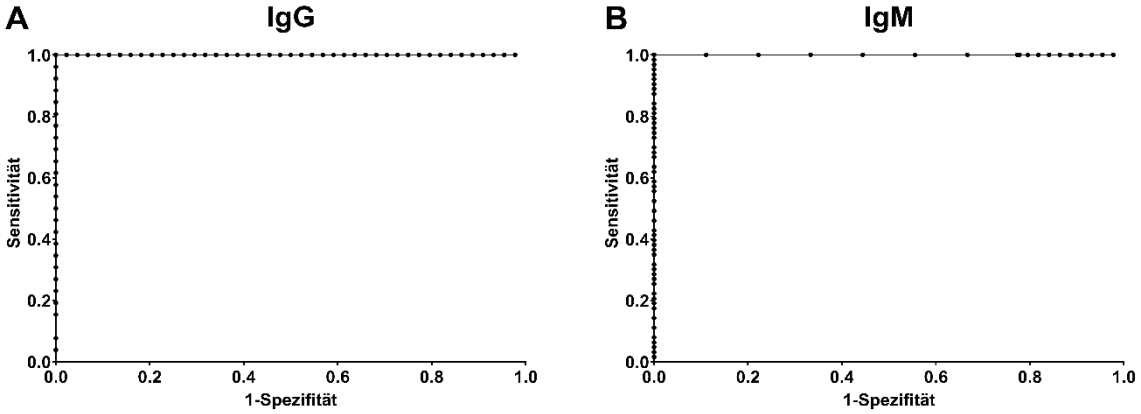


Abbildung 50: ROC Analyse ELISA.

ROC Analyse zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des Rubella-VLP 2-basierten ELISA. AUC für IgG: 1,0 (A), AUC für IgM: 1,0 (B). Einsatz von 70 Rubella-IgG- (A) sowie 72 Rubella-IgM- (B) Humanseren. A: Von den IgG-Seren wurden 44 positiv und 26 negativ über die ELISA-Mastercharge bewertet. B: Von den IgM-Seren wurden 9 positiv und 63 negativ über die ELISA-Mastercharge bewertet.

Die ROC-Analyse für den Rubella-VLP-basierten ELISA ergab aufgrund der klaren Trennung zwischen Rubella-IgG- (Abbildung 50A) und Rubella-IgM- (Abbildung 50B) positiven und negativen Seren eine AUC von 1,0. Damit erfolgte eine perfekte Klassifikation der Proben, bei der keine Überschneidung der OD_{405nm}-Werte beider Gruppen auftrat (vgl. Abbildung 49). In einem solchen Fall ist die ROC-Analyse statistisch nicht weiter diskriminativ, da die Trennschärfe des Tests bereits vollständig durch die deskriptiven Kennwerte (Sensitivität = 100 %, Spezifität = 100 %) beschrieben wird. Eine Schätzung der Konfidenzintervalle der AUC ist in diesem Fall nicht sinnvoll, da kein Streuparameter existiert. Zur Darstellung der diagnostischen Leistungsfähigkeit wurde daher auf eine Berechnung von 95 %-KIs für die AUC verzichtet. Der Befund zeigt, dass die Rubella-VLPs im ELISA eine maximale diagnostische Trennfähigkeit besitzen und eine vollständige Unterscheidung positiver und negativer Seren ermöglichen.

5. Diskussion

5.1. Upstream Processing

Die erfolgreiche stabile Transfektion des Rubella-VLP-Expressionsvektors in Vero- und HEK293T-Zellen sowie eine reproduzierbare, hohe und skalierbare Produktion des rekombinanten Zielproteins konnte durch den Einsatz lentiviraler Vektoren, wie in [29, 85] beschrieben, realisiert werden. Obwohl die erzielten Partikeltiter mit $4{,}64 \times 10^5$ IFU/mL unterhalb der für lentivirale Systeme typischen Werte zwischen 10^6 und 10^7 IFU/mL [85] lagen, erwies sich der Ansatz als effizient. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Arbeiten von [2, 85], in denen gezeigt werden konnte, dass große Transferplasmide - wie im vorliegenden Fall mit einer Gesamtgröße von 12,4 kb - häufig mit reduzierten Virustitern einhergehen. Erwartungsgemäß führte ein erhöhter MOI von MOI = 1 zu MOI = 10 zu einer gesteigerten Expressionsleistung der Rubella-VLPs von bis zu 30 %. Hierbei wurden weder negative Effekte auf die Zellvitalität beobachtet noch traten Einschränkungen hinsichtlich der Expressionsleistung auf. Dennoch sollte im Hinblick auf potenziell zytotoxische Effekte ein möglichst niedriger MOI angestrebt werden [85].

Die anschließende Antibiotikaselektion monoklonaler Zelllinien bestätigte die klonspezifische Variabilität der Expressionsleistung. Eine Produktivitätssteigerung um den Faktor 3,1 im Vergleich zur polyklonalen Ausgangszelllinie (2,3 µg/mL) verdeutlicht die Effektivität des angewandten SCC. Der Klon HEK293T RUBV #F2 zeigte dabei mit 7,1 µg/mL die höchste volumetrische Produktivität und wurde als Produktionszelllinie für die Prozessentwicklung ausgewählt. In [134] wurden Produktivitätssteigerungen monoklonaler Zelllinien gegenüber polyklonalen Populationen von bis zu Faktor zehn beschrieben, was die Relevanz einer gezielten Klonselektion für die Etablierung stabiler Expressionssysteme unterstreicht.

Der Einsatz eines induzierbaren Expressionssystems stellte einen zentralen Faktor für die erfolgreiche Zelllinienentwicklung dar, da so potenziell zytotoxische Effekte des exprimierten Zielproteins kontrolliert werden konnten. Frühere in-house-Analysen bestätigten, dass Rubella-Proteine eine nachteilige Wirkung auf die Zellvitalität entfalten können. Die gewählte Strategie minimierte dieses Risiko und trug somit maßgeblich zur Etablierung einer stabilen Zelllinie als Grundlage für die nachfolgende Prozessentwicklung bei.

Die Wahl der HEK293T-Zellen als Expressionssystem erwies sich als vorteilhaft, da diese Zelllinie als etabliertes Modell für komplexe posttranslationale Modifikationen gilt und entsprechend breit in der rekombinanten Proteinproduktion eingesetzt wird [67]. Die erfolgreiche Überführung der monoklonalen adhärenten HEK293T-Zelllinie in ein serumfreies Suspensionssystem markierte einen entscheidenden Fortschritt, da dies eine Hochzelldichtekultivierung in skalierbaren Bioreaktorsystemen ermöglichte, welche gängigerweise für die Bioprozessentwicklung zur Herstellung rekombinanter Proteine genutzt wird [67, 114]. Der direkte Vergleich der monoklonalen Klone zeigte deutliche Unterschiede in der Produktivität. Die volumetrische Produktivität der HEK293T RUBV #F2-Zellen (7,1 µg/mL) übertraf den leistungsschwächsten Klon HEK293T RUBV #G2 (3,8 µg/mL) um rund 87 %. Auch nach der Adaption der beiden leistungsstärksten Klone (#G04 und #F2) an serumfreie Suspensionsbedingungen blieben diese Unterschiede in der VLP-Produktion bestehen (vgl. Abbildung 8). Diese Befunde bestätigen die in [134] sowie in vorliegenden Ergebnissen beschriebene hohe Bedeutung klonspezifischer Eigenschaften für die Effizienz und Stabilität rekombinanter Produktionssysteme und stellen damit eine wesentliche Grundlage für die Entwicklung reproduzierbarer und skalierbarer Produktionsprozesse dar.

Die Ergebnisse der Suspensionskultur belegen eindeutig, dass eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit einen zentralen limitierenden Faktor für Wachstum und Produktbildung in HEK293T-Zellen darstellt. Die Implementierung einer gezielten, chemisch definierten Feeding-Strategie führte in der Schüttelkultur zu deutlichen Verbesserungen der Prozessleistung (vgl. Abbildung 9). Unter supplementierten Bedingungen stiegen die maximalen Zelldichten von 14×10^6 auf $19{,}5 \times 10^6$ vitale Zellen/mL (≈25 %). Gleichzeitig blieb die Vitalität über den Kultivierungsverlauf hinweg deutlich höher (60 % bei 14×10^6 vitale Zellen/mL zu 33 % bei $2{,}9 \times 10^6$ vitale Zellen/mL im nicht supplementierten Ansatz), was die hohe Sensitivität der Zelllinie gegenüber Nährstofflimitierungen bestätigt. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Arbeiten, die Glukose- und Glutamindefizite sowie Laktat- und Ammoniumakkumulationen als typische wachstumsbegrenzende Faktoren identifizieren [11, 60]. Die eingesetzte Feeding-Strategie orientierte sich an etablierten Fed-Batch-Protokollen für HEK293-Zellen [5, 16, 48]. Das Ziel hierbei lag auf der Einhaltung definierter Sollwerte für Glukose (4 g/L) und Glutamin (3 mM). Die Relevanz dieser Parameter spiegelt sich in Arbeiten wider, wonach erhöhte Ammoniumkonzentrationen – resultierend aus dem Glutamin-Metabolismus –

negative Effekte auf Wachstum und Produktivität ausüben [48, 123]. Die Implementierung der genannten Sollwerte führte zu einer Steigerung der Rubella-VLP-Ausbeute von 7,1 mg/L auf 8,8 mg/L (8,8 µg/mL), was die in [108] hervorgehobene zelllinienspezifische Komplexität der Feed-Optimierung unterstreicht.

Der Transfer dieser Strategie in den 1-L-Bioreaktor verlief erfolgreich. Die erzielten maximalen Zelldichten von 15 × 10^6 vitalen Zellen/mL und eine Produktivität von 7,7 mg/L (vgl. Abbildung 38) zeigen, dass die Feeding-Strategie grundsätzlich skalierbar ist. Der moderate Rückgang im Vergleich zur Schüttelkultur deckt sich mit Publikationen, die auf metabolische Veränderungen beim Scale-over in pH-geregelten Systemen hinweisen [100]. Im Gegensatz dazu offenbarte das direkte Upscaling in den 10 L-Maßstab (B071) deutliche Skalierungsgrenzen. Die maximalen Zelldichten lagen lediglich bei 3,7 × 10^6 vitalen Zellen/mL, begleitet von einer drastisch reduzierten Produktivität von 0,94 mg/L (vgl. Abbildung 39B). Das früh einsetzende Glukosedefizit ab 120 h, das selbst durch zusätzliche Feed-Zugaben nicht ausgeglichen werden konnte (vgl. Abbildung 41A), führte gleichzeitig zu einer ausgeprägten Laktatakkumulation (4,9 g/L). Diese Werte übersteigen die in der Schüttelkultur beobachteten Konzentrationen (1,2 ± 0,3 g/L; vgl. Abbildung 11) deutlich. Entsprechende Muster wurden bereits in [109] beschrieben, wo erhöhte Glukoseverbrauchsraten und Laktatakkumulationen nach dem Scale-over als zentrale Ursachen für reduzierte Prozessleistungen identifiziert wurden.

Die sukzessive Optimierung der Feeding-Strategie in B072 und B091 führte zu einer deutlichen Verbesserung der Stoffwechselsituation. Die engmaschige Kontrolle und Justierung von Glukose- und Glutaminkonzentrationen verhinderte eine übermäßige Glykolyse und damit eine starke Laktatanreicherung – ein Mechanismus, der auch in [69] beschrieben wird. In B091 reduzierte sich die Laktatkonzentration nach einem initialen Anstieg auf etwas über 3 g/L bis zum Kultivierungsende auf 1 g/L (vgl. Abbildung 41) und näherte sich somit den Werten aus den Schüttelkulturen (1,2 ± 0,3 g/L). Parallel blieb die Nährstoffversorgung über die gesamte Kultivierung stabil. Diese Anpassungen führten zu einer deutlichen Leistungssteigerung: Die maximale Zelldichte stieg von 3,7 × 10^6 (B071) auf 14,2 × 10^6 vitale Zellen/mL (B091), während die VLP-Ausbeute um den Faktor 11 von 0,94 mg/L auf 10,2 mg/L anstieg (vgl. Abbildung 39).

Weitere Prozessparameter erwiesen sich als entscheidende Stellschrauben. Die im DoE identifizierten Einstellungen, 37 °C, pH 7,2 ± 0,1, DO 40 %, 150 rpm und 0,8 ×

10^6 vitale Zellen/mL (vgl. 4.5.2), dienten als Ausgangspunkt, führten jedoch zu einer Produktivität an Rubella-VLPs von 4,1 mg/L und damit zu niedrigeren Werten als in der Schüttelkultur (8,8 mg/L). Ähnliche Beobachtungen wurden in [100] berichtet, wo pH-gesteuerte Bioreaktoren zu einem reduzierten Zellwachstum und geringerer Produktbildung führten. In dieser Arbeit getestete kontinuierliche CO_2-basierte pH-Führung (1 % CO_2 (v/v)) zeigte ebenfalls keine Vorteile (maximale Zelldichte 5,2 × 10^6 vitalen Zellen/mL; 3,1 mg/L Produktivität), sodass die pH-Optimierung weiter verfeinert wurde. Die Absenkung des pH-Sollwerts auf 7,1 ± 0,2 im 1 L-Maßstab verbesserte die Prozessleistung deutlich (Zelldichten bis 15 × 10^6 vitalen Zellen/mL; Produktivität 7,7 mg/L). Im 10 L-Maßstab zeigte sich jedoch, dass zusätzlich zur pH-Optimierung (pH-Sollwert: 7,05 ± 0,20) eine Erhöhung der Begasungsrate (bis 7,5 SLPM) notwendig war, um die Sauerstoffversorgung sicherzustellen. Unter diesen Bedingungen stabilisierte sich der pH-Wert innerhalb der ersten 120 Kultivierungsstunden bei etwa 6,87, was mit dem von [69] beschriebenen metabolischen Shift hin zu einem Co-Metabolismus von Glukose und Laktat übereinstimmt. Diese optimierten Bedingungen führten in B091 zu einer Produktivität von 10,2 mg/L bei 14,2 × 10^6 vitalen Zellen/mL; im 40 L-Bioreaktor (B092) wurden vergleichbare Zelldichten erreicht, wenngleich die Produktivität mit 5,8 mg/L niedriger ausfiel. Da metabolische Parameter und Zelldichten vergleichbar waren, deutet dies auf skalenabhängige Veränderungen der Mischvorgänge oder Sauerstoffgradienten hin.

Der erfolgreiche Transfer vom Schüttelkolben über 1 L- und 10 L- bis in den 40 L-Maßstab demonstriert insgesamt die Robustheit des entwickelten Prozesses. Die Wachstumsraten ($\mu = 0{,}02562$ h^{-1} in der Schüttelkultur und $\mu = 0{,}0241$ h^{-1} im 40 L-Bioreaktor) lagen im Rahmen der für HEK293-Zellen typischen Werte ($\mu_{max} = 0{,}020 - 0{,}029$ h^{-1} [107]). Auch die volumetrische Produktivität (5–10 µg/mL) entsprach bekannten Bereichen für die VLP-Produktion (0,3–100 µg/mL [98]). Der identifizierte optimale Erntezeitpunkt (312 Stunden) lag innerhalb des aus der Schüttelkultur abgeleiteten Fensters von 250–350 Stunden und unterstützt die in [113] beschriebenen Vorteile hinsichtlich Prozessstabilität, proteolytischer Integrität und Prozessökonomie.

5.2. Downstream Processing

Die klassischen Methoden zur Aufarbeitung von VLPs, darunter insbesondere die Ultrazentrifugation, sind hinsichtlich Skalierbarkeit und Zeitaufwand klar limitiert [55]. Alternative Ansätze wie Größenausschlusschromatographie [84], PEG-Fällungen [52, 55] und Ionenaustauscherchromatographie [52, 128], die beispielsweise für Rotavirus-VLPs [84] und Norovirus-VLPs [52] beschrieben worden sind, wurden in eigenen Vorexperimenten zur Reinigung von Rubella-VLPs aus Zellkulturüberständen evaluiert, führten jedoch nicht zu ausreichender Reinheit und Ausbeute. Da diese Methoden häufig nur in Kombination mehrerer Verfahren eine zufriedenstellende Aufarbeitung ermöglichen, unterstreicht dies die Notwendigkeit eines effizienten und skalierbaren Verfahrens zur Isolierung von VLPs aus komplexen Zellkulturüberständen.

Vor diesem Hintergrund bietet die Affinitätschromatographie eine vielversprechende Alternative, da sie eine selektive Isolierung der VLPs ermöglicht und – wie in [132] beschrieben – das Potenzial besitzt, Zielproteine in einem einzigen Chromatographieschritt mit hoher Reinheit zu gewinnen. Analog dazu wurden HIV-1 gag-VLPs in [93] über eine Heparin-Affinitätschromatographie und His-getaggte SARS-CoV-2-VLPs über Ni-NTA-Chromatographie aufgearbeitet [77]. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Konstruktion des Expressionsvektors bewusst auf einen Affinitätstag verzichtet, da dessen Zugänglichkeit nach der Assemblierung der VLPs als kritisch eingeschätzt wurde.

Ein zentraler Schritt der Entwicklung des Downstream-Prozesses war die Etablierung einer antikörperbasierten Affinitätschromatographie. Die Auswahl geeigneter Liganden zur Immobilisierung basierte auf internen FLIA-Bindungsstudien (vgl. 4.3.1.1), in denen Bindungseigenschaften, Selektivität und Elutionsverhalten für Rubella-VLPs systematisch charakterisiert wurden. Die Ergebnisse offenbarten deutliche Unterschiede in den Bindungskinetiken der getesteten Antikörper sowie eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Elutionsbedingungen. Mab1 erwies sich dabei sowohl unter sauren (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5) als auch unter basischen Bedingungen (0,1 M Triethanolamin, pH 11,5) als geeignet und wurde deshalb für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Wie in [132] hervorgehoben, stellt die Auswahl geeigneter Elutionsbedingungen einen entscheidenden Schritt in der Entwicklung antikörperbasierter Affinitätsprozesse dar, da harsche Bedingungen die Struktur und Funktion des gebundenen Antikörpers sowie des Zielproteins beeinträchtigen können.

Die detaillierte Charakterisierung der gereinigten Rubella-VLPs (vgl. 5.3 und 5.4) bestätigte, dass die gewählten Bedingungen deren funktionelle Eigenschaften nicht negativ beeinflussten. Die etablierten Elutionsbedingungen ermöglichten eine nahezu vollständige Elution der Rubella-VLPs, ohne die Funktionalität des Liganden oder des Zielproteins zu beeinträchtigen. Die Durchführung von mehr als 60 Chromatographieläufen mit einer konstanten Reinheit von > 90 % aus SDS-PAGE abgeschätzt, bestätigte sowohl die Robustheit als auch die Reproduzierbarkeit des Systems. Damit wurden Reproduzierbarkeiten erzielt, die mit den in [8] beschriebenen stabilen Antikörper-Antigen-Zyklen (> 50 Zyklen) vergleichbar sind, und verdeutlichen die Stabilität der gewählten Liganden-Matrix-Interaktion über zahlreiche Prozesszyklen hinweg.

Die Bedeutung der Ligandenwahl wurde durch extern durchgeführte Bestimmungen der kinetischen Parameter bestätigt (vgl. 4.3.1.1). Mab1 (k_a = 1,3 × 10^5 $M^{-1}s^{-1}$; k_d = 4,6 × 10^{-3} s^{-1}; K_D = 3,6 × 10^{-8} M) und Mab2 (k_a = 8,1 × 10^4 $M^{-1}s^{-1}$; k_d = 2,7 × 10^{-4} s^{-1}; K_D = 3,3 × 10^{-9} M) lagen im Bereich typischer monoklonaler Antikörper (k_a = 10^4-10^6 $M^{-1}s^{-1}$; k_d = 10^{-5}-10^{-3} s^{-1}; K_D = 10^{-6}-10^{-13} M) [61], während Mab3 unter den verwendeten Bedingungen keine Bindung zeigte. Obwohl Mab2 mit einer geringeren Dissoziationsrate (k_d = 2,7 × 10^{-4} s^{-1}) eine stabilere Bindung aufwies als Mab1, führte dies in der Praxis zu unvollständigen Elutionen. Mab1 hingegen ermöglichte eine vollständige und rasche Dissoziation, weshalb dieser Antikörper als optimaler Ligand ausgewählt wurde. Die hohe Spezifität des Antikörpers wurde durch eine Negativkontrolle mit Chikungunya-VLPs bestätigt.

Ein weiterer wesentlicher Entwicklungsschritt betraf die Auswahl der Chromatographiematrix. Fünf Matrices, darunter „NHS-Activated Sepharose™ High Performance“ und „NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow“, wurden hinsichtlich Immobilisierungseffizienz, Bindekapazität, Reproduzierbarkeit, Skalierbarkeit, Reinheit und Kosten evaluiert. Während die Immobilisierungseffizienz des Antikörpers vergleichbar war (vgl. Abbildung 20), zeigte die High-Performance-Matrix eine um 41 % größere Elutionspeakfläche (vgl. Abbildung 21), was auf eine höhere Bindekapazität und Elutionseffizienz hinweist. Dies stimmt mit Berichten überein, die matrixbedingte Unterschiede in Porenstruktur, Partikelgröße und Oberflächeneigenschaften als bestimmende Faktoren der Reinigungsleistung hervorheben [27, 97, 125]. Beispielhaft wurden in [81] für verschiedene Protein-A-Matrices Unterschiede der DBC_{10} von bis zu 119 % beschrieben. Trotz höherer Kosten erwies sich die „NHS-Activated

Sepharose™ High Performance“ als beste Option, da sie einen hohen Immobilisierunggrad (> 95 %) und eine robuste Prozessführung über mehr als 60 Zyklen ermöglichte.

Das Upscaling von der 1 mL- bis zur 178 mL-Produktionssäule verlief erfolgreich. Neben der Übertragung der dynamischen Bindekapazität wurden Einflüsse der Flussgeschwindigkeit und der Temperatur systematisch untersucht. Die Prozessführung bei Raumtemperatur führte zu schmaleren Elutionsprofilen und höheren Produktkonzentrationen (vgl. Abbildung 24), während optimierte Flussraten die Bindekapazität und damit die Ausbeute um bis zu 24 % steigerten (vgl. Abbildung 26). Die resultierende DBC_{10} von 0,4–0,5 mg Rubella-VLPs/mL Matrix liegt zwar unter Werten typischer IgG-Prozesse (bis 55 mg/mL [115]), entspricht jedoch annähernd denen anderer VLP-Systeme, beispielsweise 1,43 mg/mL für HBsAg-VLPs [40]. Diese Ergebnisse bestätigen die Abhängigkeit der DBC von Matrixeigenschaften sowie Größe und Komplexität der Zielproteine [7, 96] und belegen die Praxistauglichkeit des Verfahrens. Die erzielten kurzen Prozesszeiten ermöglichen zudem die effiziente Reinigung von Rubella-VLPs aus 40 L-Bioreaktoren.

Die abschließende Crossflow-Filtration mit Konzentrierungs- und Dialyseschritten gewährleistete eine effiziente Überführung der VLPs in den vorgesehenen Lagerpuffer mit einer Gesamtausbeute von 88 %. Dieser Wert liegt im Bereich optimierter IgG-Herstellungsprozesse (~90 %) [105], obgleich VLPs aufgrund ihrer Größe und Struktur höhere verfahrenstechnische Anforderungen stellen. Zum Vergleich: Ein etablierter Downstream-Prozess für HIV-1 Gag-eGFP VLPs erreichte eine Gesamtausbeute von 38 % [62].

Ein weiterer entscheidender Schritt im DSP war die Umstellung des Elutionspuffers von 0,1 M Glycin-HCl pH 2,5 auf 0,1 M Triethanolamin pH 11,5 im mittleren Maßstab (Säule 1-375, HiScale™ 16/20). Grundlage hierfür waren DLS-Untersuchungen zum Screening geeigneter Lagerpuffer (vgl. 4.4.3), in denen ein 50 mM Carbonatpuffer pH 10,0 / 20 % (w/v) Saccharose als optimal identifiziert wurde. Saure Elutionsfraktionen führten bei der Dialyse in basische Puffer vermehrt zu Aggregation. Anhand von Vorversuchen konnte der isoelektrische Punkte der VLPs von ca. pH 5,0 abgeschätzt werden, wodurch sich das Aggregationsverhalten beim Übergang vom sauren ins basische Milieu erklären lässt. Die Umstellung auf basische Elution ermöglichte eine vollständige Elution sowie eine aggregatfreie Probe mit 100 % Homogenität (vgl. Abbildung 34) und einer geschätzten Reinheit > 90 % (vgl. Abbildung 33). Diese

Ergebnisse bestätigen die erfolgreiche Etablierung eines robusten und skalierbaren Herstellungs- und Reinigungsprozesses für Rubella-VLPs.

5.3. Prozessanalytische Verfahren zur Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles

Die frühzeitige Implementierung des Rubella-spezifischen FLIA erwies sich als ein zentraler Erfolgsfaktor der gesamten Prozessentwicklung. Der Assay ermöglichte bereits in frühen Entwicklungsphasen eine zuverlässige Quantifizierung der Rubella-VLPs direkt aus unaufgereinigten Zellkulturüberständen. Im linearen Messbereich von 0,2–5 µg/mL wurde eine relative Messunsicherheit von < 5 % erreicht und selbst im erweiterten Bereich von 0–100 µg/mL blieb sie < 10 %. Durch geeignete Verdünnungsschritte konnten zudem höhere Rubella-VLP-Konzentrationen zuverlässig in den optimalen Messbereich überführt werden. Diese analytische Leistungsfähigkeit war insbesondere für die Bewertung der Expressionsleistung bei variierenden MOIs sowie für das SCC von entscheidender Bedeutung, da die Identifikation hochproduzierender Klone eine präzise und robuste VLP-Detektion erforderte. Damit bildete der FLIA eine wesentliche Grundlage für die Etablierung einer stabilen monoklonalen Produktionszelllinie. Auch in den nachfolgenden Entwicklungsphasen – einschließlich der Optimierung der zelllinienadaptierten Feeding-Strategie sowie der Entwicklung des DSP – erwies sich die zuverlässige Rubella-VLP-Quantifizierung als essenziell. Insgesamt ermöglichte die frühe Integration des FLIA eine zielgerichtete und datenbasierte Prozessentwicklung.

DLS-Messungen ergaben eine mittlere Partikelgröße von 75,4 nm (±4,1 SD) (vgl. Abbildung 34). Die hergestellten Rubella-VLPs lagen in dem für Rubella-VLPs typischen Größenbereich von 50–150 nm [19, 45, 86] und bestätigten die erfolgreiche Assemblierung der Strukturproteine Kapsidprotein, gpE1 und gpE2. Die ermittelten Werte korrespondieren zudem gut mit den aus der Literatur bekannten Größen nativer Rubella-Viren (~70 nm) [19], was die Validität der DLS-Daten in Bezug auf elektronenmikroskopische Referenzstrukturen weiter unterstützt (vgl. Abbildung 43). Die Daten stehen auch im Einklang mit Erkenntnissen aus anderen VLP-Systemen, in denen gezeigt wurde, dass Prozess- und Kultivierungsbedingungen – darunter pH-Wert, Temperatur und Gelöstsauerstoff – strukturelle Eigenschaften und damit die Integrität von VLPs beeinflussen können [49, 98, 99, 129]. Zu diesen Einflussfaktoren zählen ebenfalls PTM. Für die hier untersuchten Rubella-VLPs konnten N-gebundene

Glykosylierungen an gpE1 und gpE2 eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 44). Der funktionelle Einfluss von Glykosylierungen ist dokumentiert, beispielsweise in [106]. Deglykosylierung der SARS-CoV-2-Rezeptorbindungsdomäne und des Membranproteins führten zu einer deutlichen Reduktion der IgG-Bindungssensitivität im ELISA (95 % zu 65 %). Eine entsprechende funktionelle Analyse wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Die kombinierte Anwendung von DLS, Elektronenmikroskopie und SDS-PAGE ermöglichte eine umfassende Charakterisierung der Rubella-VLPs. Die konsistenten Ergebnisse dieser Methoden bestätigten sowohl die Homogenität als auch die strukturelle Stabilität der VLPs. Das Fehlen nachweisbarer Aggregate unterstreicht die hohe Produktqualität und reflektiert zugleich eine robuste Prozessführung sowie die Eignung der eingesetzten analytischen Methoden zur VLP-Charakterisierung.

Neben der Bestimmung der Partikelgröße ermöglichten die DLS-Messungen die Detektion potenzieller Aggregate während der Lagerung sowie die Identifikation geeigneter Lagerpuffer und -bedingungen. Die hohe Stabilität der Rubella-VLPs im gewählten Lagerpuffer zeigte sich selbst nach zehn Einfrier- und Auftauzyklen, unterschiedlichen Lagertemperaturen, sowie nach einer kurzzeitigen Temperaturbelastung bis 70 °C (vgl. 4.4.3.1). Darüber hinaus blieb die diagnostische Eignung der Rubella-VLPs unter sämtlichen getesteten Lagerbedingungen im FLIA (für IgG und IgM) mit einem kleinen Humanseren-Panel vollständig erhalten (vgl. 4.4.3.2). Die Standardlagerung bei –80 °C gewährleistet somit eine langfristige Stabilität und Sicherung der Produktqualität für zukünftige Anwendungen in der Humanserologie.

5.4. Diagnostische Charakterisierung der Rubella Virus-like Particles für den Einsatz in der Humanserologie

Die hergestellten Rubella-VLPs zeigten in serologischen Testsystemen (FLIA und ELISA) eine ausgeprägt hohe Reaktivität gegenüber Rubella-spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern aus Humanseren. Besonders hervorzuheben ist die deutliche Trennschärfe zwischen positiven und negativen Seren, die in beiden Assayformaten klar ausgeprägt war. Im direkten Vergleich mit einem nativen Rubella-Referenzantigen konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass die Rubella-VLPs funktionell gleichwertig einsetzbar sind (vgl. Abbildung 46 und Abbildung 49).

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Rubella-VLP-Chargen aus dem 10 L- und 40 L-Bioreaktorprozess im FLIA bestätigt die Reproduzierbarkeit sowohl des USP als auch des DSP im Hinblick auf die diagnostische Anwendung. Die Passing-Bablok-Regression ergab für die IgG-Daten einen Korrelationskoeffizienten von r = 0,995 und für IgM von r = 0,986 (vgl. Abbildung 47), womit keine signifikanten Chargenunterschiede nachweisbar waren. Geringfügige Abweichungen in den Signalintensitäten der Chargen 1 und 2 könnten auf Unterschiede in den PTM, insbesondere Glykosylierungen, zurückzuführen sein – ein Effekt, der bereits in [106] für die SARS-CoV-2-Rezeptorbindungsdomäne und das Membranprotein als relevanter Einflussfaktor auf die serologische Erkennung beschrieben wurde. Potenzielle Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen der 10 L- und 40 L-Bioreaktoren könnten ebenfalls zu Variationen in PTM und dadurch zu veränderten Antikörperreaktivitäten führen. Allerdings zeigten die Analysen der N-gebundenen Glykosylierungen von gpE1 und gpE2 keine visuellen Unterschiede zwischen beiden Chargen (vgl. Abbildung 44).

Die erzielten diagnostischen Kennzahlen belegen die Leistungsfähigkeit der Rubella-VLPs in serologischen Testsystemen. Im Rubella-VLP-basierten FLIA lagen Sensitivität und Spezifität im IgG-Assay bei > 91,1 % bzw. > 96,8 % und im IgM-Assay bei > 85,7 % bzw. > 98,4 % (vgl. Abbildung 48). Die ausgeprägte Trennschärfe zwischen positiven und negativen Gruppen bestätigt die diagnostische Eignung der VLPs, selbst bei hoher Standardabweichung der MFI-Werte innerhalb der Gruppen. Diese Variabilität spiegelt die Zusammensetzung des eingesetzten Serum-Panels wider, das ein breites Spektrum von stark negativ bis stark positiv abdeckte und somit eine robuste Bewertung der diagnostischen Leistungsfähigkeit ermöglichte.

Besonders hervorzuheben ist die Trennschärfe im Rubella-VLP-basierten ELISA, in dem eine vollständige Unterscheidung zwischen positiven und negativen Rubella-IgG- und IgM-Seren erzielt wurde (vgl. Abbildung 49). Abhängig vom Einsatzgebiet existieren unterschiedliche Mindestanforderungen an serologische Assays: Für SARS-CoV-2-Antikörpertests empfiehlt die WHO Sensitivitäten ≥ 90 % und Spezifitäten ≥ 97 % [64], während für HIV-Antikörpertests Sensitivitäten > 99 % und Spezifitäten > 98 % gefordert werden [122]. Vor diesem Hintergrund bewegen sich die erzielten Leistungsparameter der Rubella-VLP-basierten Assays auf einem sehr hohen diagnostischen Niveau. Besonders die exzellenten IgM-ELISA-Ergebnisse sind klinisch relevant, da die frühe Detektion akuter Rötelninfektionen und damit die IgM-

Diagnostik von zentraler Bedeutung ist [120]. Die Ergebnisse stimmen zudem mit Studien überein, die die Eignung von VLPs aufgrund ihrer virusähnlichen Oberflächenstruktur für serologische Assays hervorheben, beispielsweise für Zika-VLPs, Dengue-VLPs, West-Nil-VLPs [117] und SARS-CoV-2-VLPs [43, 117]. Diese Parallelen untermauern die prinzipielle Eignung von VLPs als diagnostische Antigene. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Robustheit und Reproduzierbarkeit des Rubella-VLP-Herstellungsprozesses nicht nur über quantitative Prozessdaten und umfangreiche analytische Charakterisierung bestätigt wurde, sondern auch durch die exzellente diagnostische Leistungsfähigkeit der generierten VLPs im serologischen Einsatz belegt werden konnte.

6. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein robuster, skalierbarer, reproduzierbarer und ökonomischer Herstellungsprozess für Rubella-VLPs etabliert, der sich durch eine hohe Prozessstabilität und Effizienz im USP und DSP auszeichnet. Die Struktur der gereinigten Rubella-VLPs entspricht der aus der Literatur. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sie diagnostisch vollwertig einsetzbar sind. Damit steht ein alternativer, sicherer und ökonomischer Ansatz für die Produktion rekombinanter diagnostischer Rubella-Antigene zur Verfügung, der unabhängig von infektiösem Material ist und unmittelbar zur Verbesserung der Röteln-Serologie beiträgt. Eine Implementierung dieser Rubella-VLPs in regulierte In-vitro-Diagnostika erscheint daher realistisch. Ein besonderer methodischer Fortschritt wurde durch die Implementierung einer antikörperbasierten Affinitätschromatographie erzielt. Die hohe Selektivität, Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit dieses Ansatzes unterstreichen die industrielle Relevanz des entwickelten Verfahrens. Gleichwohl bestehen Optimierungspotenziale hinsichtlich der vergleichsweise geringen dynamischen Bindekapazität. Perspektivisch bieten kontinuierliche Zwei-Säulen-Chromatographieprozesse sowie der Einsatz KI-gestützter Analysesoftware vielversprechende Ansatzpunkte. Letztere könnte auf Basis historischer Prozessdaten und Literaturinformationen zur datengetriebenen Prozessoptimierung beitragen, indem sie geeignete Arbeitspunkte identifiziert und potentielle Stellschrauben zur Steigerung der Produktivität sichtbar macht. Darüber hinaus ergeben sich zahlreiche Weiterentwicklungsoptionen in der Bioprozessentwicklung. Dazu zählen der Einsatz alternativer Bioreaktorsysteme und Prozessführungsstrategien, die verstärkte Integration kontinuierlicher prozess-analytischer Technologien zur Echtzeitüberwachung und -steuerung sowie der Einsatz mathematischer Modelle oder dynamischer DoE-Konzepte zur systematischen Reduktion experimenteller Aufwände. Um Schwankungen in der Nährstoffversorgung künftig weiter zu minimieren, erscheinen kontinuierliche Supplementierungsstrategien auf Basis in situ erfasster Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen vielversprechend. Solche Konzepte könnten einen Schritt in Richtung teilautonomen oder autonomen Prozessoptimierungen ermöglichen. Der für Rubella-VLPs entwickelte Bioprozess bietet die Möglichkeit einer erleichterten Übertragung auf andere Zielproteine und könnte als Modell für die Etablierung VLP-basierter diagnostischer Antigene im Allgemeinen dienen.

7. Literatur

1. Akoglu H (2018) User's guide to correlation coefficients. Turk J Emerg Med 18(3):91–93. doi:10.1016/j.tjem.2018.08.001
2. al Yacoub N, Romanowska M, Haritonova N, Foerster J (2007) Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. J Gene Med 9(7):579–584. doi:10.1002/jgm.1052
3. Antony J (2014) Design of Experiments for Engineers and Scientists. Elsevier
4. Baukmann S, Hengelbrock A, Katsoutas K, Stitz J, Schmidt A, Strube J (2025) Digital Twin for Upstream and Downstream Integration of Virus-like Particle Manufacturing. Processes 13(7):2101. doi:10.3390/pr13072101
5. Baukmann S, Hengelbrock A, Katsoutas K, Stitz J, Schmidt A, Strube J (2025) Platform Process for an Autonomous Production of Virus-like Particles. ACS Omega 10(4):3917–3929. doi:10.1021/acsomega.4c09694
6. Bellani CF, Ajeian J, Duffy L, Miotto M, Groenewegen L, Connon CJ (2020) Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. Front Nutr 7:575146. doi:10.3389/fnut.2020.575146
7. Bergander T, Nilsson-Välimaa K, Oberg K, Lacki KM (2008) High-throughput process development: determination of dynamic binding capacity using microtiter filter plates filled with chromatography resin. Biotechnol Prog 24(3):632–639. doi:10.1021/bp0704687
8. Beyer NH, Hansen MZ, Schou C, Højrup P, Heegaard NHH (2009) Optimization of antibody immobilization for on-line or off-line immunoaffinity chromatography. J Sep Sci 32(10):1592–1604. doi:10.1002/jssc.200800702
9. Blain GC (2014) Revisiting the critical values of the Lilliefors test: towards the correct agrometeorological use of the Kolmogorov-Smirnov framework. Bragantia 73(2):192–202. doi:10.1590/brag.2014.015
10. Brown MB, Forsythe AB (1974) Robust Tests for the Equality of Variances. Journal of the American Statistical Association 69(346):364. doi:10.2307/2285659
11. Butler M (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol 68(3):283–291. doi:10.1007/s00253-005-1980-8

12. Carvalho SB, Silva RJS, Sousa MFQ, Peixoto C, Roldão A, Carrondo MJT, Alves PM (2022) Bioanalytics for Influenza Virus-Like Particle Characterization and Process Monitoring. Front Bioeng Biotechnol 10:805176. doi:10.3389/fbioe.2022.805176
13. Chan YH (2003) Biostatistics 104: correlational analysis. Singapore Med J 44(12):614–619
14. Chaye HH, Mauracher CA, Tingle AJ, Gillam S (1992) Cellular and humoral immune responses to rubella virus structural proteins E1, E2, and C. Journal of Clinical Microbiology 30(9):2323–2329. doi:10.1128/jcm.30.9.2323-2329.1992
15. Chen M-H, Icenogle JP (2004) Rubella virus capsid protein modulates viral genome replication and virus infectivity. Journal of Virology 78(8):4314–4322. doi:10.1128/JVI.78.8.4314–4322.2004
16. Chin CL, Goh JB, Srinivasan H, Liu KI, Gowher A, Shanmugam R, Lim HL, Choo M, Tang WQ, Tan AH-M, Nguyen-Khuong T, Tan MH, Ng SK (2019) A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. Sci Rep 9(1):16768. doi:10.1038/s41598-019-53391-z
17. Clarke DM, Loo TW, McDonald H, Gillam S (1988) Expression of rubella virus cDNA coding for the structural proteins. Gene (65):23–30
18. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR (2018) Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics 10(2). doi:10.3390/pharmaceutics10020057
19. Das PK, Kielian M (2021) Molecular and Structural Insights into the Life Cycle of Rubella Virus. Journal of Virology 95(10). doi:10.1128/JVI.02349-20
20. Demirden SF, Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS (2024) Animal Cell Lines as Expression Platforms in Viral Vaccine Production: A Post Covid-19 Perspective. ACS Omega 9(15):16904–16926. doi:10.1021/acsomega.3c10484
21. Dubé M, Rey FA, Kielian M (2014) Rubella virus: first calcium-requiring viral fusion protein. PLoS Pathog 10(12):e1004530. doi:10.1371/journal.ppat.1004530
22. Dübel S, Breitling F, Frenzel A, Jostock T, Marschall ALJ, Schirrmann T, Hust M (2019) Rekombinante Antikörper. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
23. DuBois RM, Vaney M-C, Tortorici MA, Kurdi RA, Barba-Spaeth G, Krey T, Rey FA (2013) Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1. Nature 493(7433):552–556. doi:10.1038/nature11741

24. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. Mol. Cell. Biol. 7(1):379–387. doi:10.1128/mcb.7.1.379
25. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Journal of Virology (Vol. 72, No. 11):8463–8471
26. Durand S, Cimarelli A (2011) The inside out of lentiviral vectors. Viruses 3(2):132–159. doi:10.3390/v3020132
27. Dutta S, Bose K (2022) Protein Purification by Affinity Chromatography. In: Bose K (Hrsg) Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins. Springer Nature Singapore, Singapore, S 141–171
28. Edwards E, Livanos M, Krueger A, Dell A, Haslam SM, Mark Smales C, Bracewell DG (2022) Strategies to control therapeutic antibody glycosylation during bioprocessing: Synthesis and separation. Biotechnol Bioeng 119(6):1343–1358. doi:10.1002/bit.28066
29. Elegheert J, Behiels E, Bishop B, Scott S, Woolley RE, Griffiths SC, Byrne EFX, Chang VT, Stuart DI, Jones EY, Siebold C, Aricescu AR (2018) Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. Nat Protoc 13(12):2991–3017. doi:10.1038/s41596-018-0075-9
30. Fuenmayor J, Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Gòdia F (2018) Transient gene expression optimization and expression vector comparison to improve HIV-1 VLP production in HEK293 cell lines. Appl Microbiol Biotechnol 102(1):165–174. doi:10.1007/s00253-017-8605-x
31. Gama-Norton L, Botezatu L, Herrmann S, Schweizer M, Alves PM, Hauser H, Wirth D (2011) Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells. Hum Gene Ther 22(10):1269–1279. doi:10.1089/hum.2010.143
32. Garbutt M, Law LMJ, Chan H, Hobman TC (1999) Role of Rubella Virus Glycoprotein Domains in Assembly of Virus-Like Particles. Journal of Virology 73(5):3524–3533
33. Ghasemi A, Zahediasl S (2012) Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. Int J Endocrinol Metab 10(2):486–489. doi:10.5812/ijem.3505

34. Grangeot-Keros L, Enders G (1997) Evaluation of a New Enzyme Immunoassay Based on Recombinant Rubella Virus-Like Particles for Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Rubella Virus. Journal of Clinical Microbiology 35(2):398–401
35. Green EA, Hamaker NK, Lee KH (2023) Comparison of vector elements and process conditions in transient and stable suspension HEK293 platforms using SARS-CoV-2 receptor binding domain as a model protein. BMC Biotechnol 23(1):7. doi:10.1186/s12896-023-00777-7
36. Greenland S, Senn SJ, Rothman KJ, Carlin JB, Poole C, Goodman SN, Altman DG (2016) Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. Eur J Epidemiol 31(4):337–350. doi:10.1007/s10654-016-0149-3
37. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000) Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med 45(1-2):23–41. doi:10.1016/S0167-5877(00)00115-X
38. Gupta R, Arora K, Roy SS, Joseph A, Rastogi R, Arora NM, Kundu PK (2023) Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. Front Immunol 14:1123805. doi:10.3389/fimmu.2023.1123805
39. Hajian-Tilaki K (2013) Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med 4(2):627–635
40. Han X, Zhang Y, Zhang Y, Sun Z, Chen Q, Zhang L, Meng H, Yu R, Zhang C, Liu Y (2025) Implementation of a nanobody-liganded affinity resin for improving the production of recombinant HBsAg-VLP in large scale. J Chromatogr A 1746:465785. doi:10.1016/j.chroma.2025.465785
41. Hashemi K, Ghahramani Seno MM, Ahmadian MR, Malaekeh-Nikouei B, Bassami MR, Dehghani H, Afkhami-Goli A (2021) Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles. Sci Rep 11(1):19851. doi:10.1038/s41598-021-98706-1
42. He H (2013) Vaccines and Antiviral Agents. In: Romanowski V (Hrsg) Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications. InTech
43. Hirschberg S, Bauer H, Kamhieh-Milz J, Ringel F, Harms C, Eddin OK, Pruß A, Hanack K, Schulze-Forster K (2022) SARS-CoV-2 Virus-like Particles (VLPs)

Specifically Detect Humoral Immune Reactions in an ELISA-Based Platform. Antibodies (Basel) 11(4). doi:10.3390/antib11040076

44. Hobman TC, Lundstrom ML, Gillam S (1990) Processing and intracellular transport of rubella virus structural proteins in COS cells. Virology 178(1):122–133. doi:10.1016/0042-6822(90)90385-5
45. Hobman TC, Lundstrom ML, Mauracher CA, Woodward L, Gillam S, Farquhar MG (1994) Assembly of Rubella Virus Structural Proteins into Virus-like Particles in Transfected Cells. Virology (202):574–585
46. Holzhauser T, Schuler F, Dudek S, Kaul S, Vieths S, Mahler V (2020) Rekombinante Allergene, Peptide und Virus-like Particles in der Immuntherapie von Allergien. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 63(11):1412–1423. doi:10.1007/s00103-020-03231-7
47. Huzly D, Hanselmann I, Neumann-Haefelin D, Panning M (2016) Performance of 14 rubella IgG immunoassays on samples with low positive or negative haemagglutination inhibition results. J Clin Virol 74:13–18. doi:10.1016/j.jcv.2015.11.022
48. Karengera E, Robotham A, Kelly J, Durocher Y, Crescenzo G de, Henry O (2018) Concomitant reduction of lactate and ammonia accumulation in fed-batch cultures: Impact on glycoprotein production and quality. Biotechnol Prog 34(2):494–504. doi:10.1002/btpr.2607
49. Kim HJ, Cho SY, Park M-H, Kim H-J (2018) Comparison of the size distributions and immunogenicity of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles produced in insect and yeast cells. Arch Pharm Res 41(5):544–553. doi:10.1007/s12272-018-1024-4
50. Kim TK (2015) T test as a parametric statistic. Korean J Anesthesiol 68(6):540. doi:10.4097/kjae.2015.68.6.540
51. Knipe DM, Howley PM (Hrsg) (2007) Fields Virology, 5. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins
52. Koho T, Mäntylä T, Laurinmäki P, Huhti L, Butcher SJ, Vesikari T, Kulomaa MS, Hytönen VP (2012) Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography. J Virol Methods 181(1):6–11. doi:10.1016/j.jviromet.2012.01.003

53. Kreitmayer D, Gopireddy SR, Aki Y, Nonaka K, Urbanetz NA, Gutheil E (2023) Scale-up analysis of geometrically dissimilar single-use bioreactors. Biotechnol Bioeng 120(11):3381–3395. doi:10.1002/bit.28529
54. Kumar D, Roy SS, Rastogi R, Arora K, Undale A, Gupta R, Arora NM, Kundu PK (2023) VLP-ELISA for the Detection of IgG Antibodies against Spike, Envelope, and Membrane Antigens of SARS-CoV-2 in Indian Population. Vaccines (Basel) 11(4). doi:10.3390/vaccines11040743
55. Ladd Effio C, Wenger L, Ötes O, Oelmeier SA, Kneusel R, Hubbuch J (2015) Downstream processing of virus-like particles: single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction. J Chromatogr A 1383:35–46. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.007
56. Ladd Effio C, Baumann P, Weigel C, Vormittag P, Middelberg A, Hubbuch J (2016) High-throughput process development of an alternative platform for the production of virus-like particles in Escherichia coli. J Biotechnol 219:7–19. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.12.018
57. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259):680–685. doi:10.1038/227680a0
58. Lavado-García J, Zhang T, Cervera L, Gòdia F, Wuhrer M (2022) Differential N- and O-glycosylation signatures of HIV-1 Gag virus-like particles and coproduced extracellular vesicles. Biotechnol Bioeng 119(5):1207–1221. doi:10.1002/bit.28051
59. Law LM, Duncan R, Esmaili A, Nakhasi HL, Hobman TC (2001) Rubella virus E2 signal peptide is required for perinuclear localization of capsid protein and virus assembly. Journal of Virology 75(4):1978–1983. doi:10.1128/JVI.75.4.1978-1983.2001
60. Liste-Calleja L, López-Repullo J, Lecina M, Cairó JJ (2013) Preliminary studies of cell culture strategies for bioprocess development based on HEK293 cells. BMC Proc 7(S6). doi:10.1186/1753-6561-7-S6-P52
61. Liu S, Zhang H, Dai J, Hu S, Pino I, Eichinger DJ, Lyu H, Zhu H (2015) Characterization of monoclonal antibody's binding kinetics using oblique-incidence reflectivity difference approach. MAbs 7(1):110–119. doi:10.4161/19420862.2014.985919

62. Lorenzo E, Miranda L, Gòdia F, Cervera L (2023) Downstream process design for Gag HIV-1 based virus-like particles. Biotechnol Bioeng 120(9):2672–2684. doi:10.1002/bit.28419
63. Lothert K, Dekevic G, Loewe D, Salzig D, Czermak P, Wolff MW (2021) Upstream and Downstream Processes for Viral Nanoplexes as Vaccines. Methods Mol Biol 2183:217–248. doi:10.1007/978-1-0716-0795-4_12
64. Ma X, Li Z, Whelan MG, Kim D, Cao C, Yanes-Lane M, Yan T, Jaenisch T, Chu M, Clifton DA, Subissi L, Bobrovitz N, Arora RK (2022) Serology Assays Used in SARS-CoV-2 Seroprevalence Surveys Worldwide: A Systematic Review and Meta-Analysis of Assay Features, Testing Algorithms, and Performance. Vaccines (Basel) 10(12). doi:10.3390/vaccines10122000
65. Macek B, Forchhammer K, Hardouin J, Weber-Ban E, Grangeasse C, Mijakovic I (2019) Protein post-translational modifications in bacteria. Nat Rev Microbiol 17(11):651–664. doi:10.1038/s41579-019-0243-0
66. Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Analytical Biochemistry 180(2):195–204. doi:10.1016/0003-2697(89)90115-2
67. Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R, Varley PG, Hatton D, Grassi L, Svensson T, Nielsen J, Rockberg J (2020) Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. Sci Rep 10(1):18996. doi:10.1038/s41598-020-76137-8
68. Mangala Prasad V, Klose T, Rossmann MG (2017) Assembly, maturation and three-dimensional helical structure of the teratogenic rubella virus. PLoS Pathog 13(6):e1006377. doi:10.1371/journal.ppat.1006377
69. Martínez-Monge I, Albiol J, Lecina M, Liste-Calleja L, Miret J, Solà C, Cairó JJ (2019) Metabolic flux balance analysis during lactate and glucose concomitant consumption in HEK293 cell cultures. Biotechnol Bioeng 116(2):388–404. doi:10.1002/bit.26858
70. Matsunaga R, Ujiie K, Inagaki M, Fernández Pérez J, Yasuda Y, Mimasu S, Soga S, Tsumoto K (2023) High-throughput analysis system of interaction kinetics for data-driven antibody design. Sci Rep 13(1):19417. doi:10.1038/s41598-023-46756-y

71. Melissa Cina (2024) Optimierung des Produktionsprozesses von rekombinanten virusähnlichen Partikeln (VLPs) in eukaryotischen Zellen. Masterarbeit, Hochschule Esslingen:1–69
72. Metz SW, Thomas A, White L, Stoops M, Corten M, Hannemann H, Silva AM de (2018) Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. Virol J 15(1):60. doi:10.1186/s12985-018-0970-2
73. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF (2017) Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. Semin Immunol 34:123–132. doi:10.1016/j.smim.2017.08.014
74. Montgomery DC (2020) Design and Analysis of Experiments. Wiley
75. Moser AC, Hage DS (2010) Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. Bioanalysis 2(4):769–790. doi:10.4155/bio.10.31
76. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272(5259):263–267. doi:10.1126/science.272.5259.263
77. Naskalska A, Dabrowska A, Szczepanski A, Jasik KP, Gromadzka B, Pyrc K (2021) Functional Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Virus-Like Particles From Insect Cells. Front Microbiol 12:732998. doi:10.3389/fmicb.2021.732998
78. Neuss A, Steimann T, Tomas Borges JS, Dinger R, Magnus JB (2025) Scale-up of CHO cell cultures: from 96-well-microtiter plates to stirred tank reactors across three orders of magnitude. J Biol Eng 19(1):5. doi:10.1186/s13036-024-00475-8
79. Nold V, Junghans L, Bisgen L, Drerup R, Presser B, Gorr I, Schwab T, Knapp B, Wieschalka S (2022) Applying intensified design of experiments to mammalian cell culture processes. Eng Life Sci 22(12):784–795. doi:10.1002/elsc.202100123
80. Noranate N, Takeda N, Chetanachan P, Sittisaman P, A-Nuegoonpipat A, Anantapreecha S (2014) Characterization of chikungunya virus-like particles. PLoS One 9(9):e108169. doi:10.1371/journal.pone.0108169
81. Osuofa J, Husson SM (2023) Comparative Evaluation of Commercial Protein A Membranes for the Rapid Purification of Antibodies. Membranes (Basel) 13(5). doi:10.3390/membranes13050511
82. Passing H, Bablok (1983) A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear

regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. J Clin Chem Clin Biochem 21(11):709–720. doi:10.1515/cclm.1983.21.11.709

83. Passing H, Bablok W (1984) Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. J Clin Chem Clin Biochem 22(6):431–445. doi:10.1515/cclm.1984.22.6.431
84. Peixoto C, Sousa MFQ, Silva AC, Carrondo MJT, Alves PM (2007) Downstream processing of triple layered rotavirus like particles. J Biotechnol 127(3):452–461. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.08.002
85. Perry C, Rayat ACME (2021) Lentiviral Vector Bioprocessing. Viruses 13(2). doi:10.3390/v13020268
86. Petrova EK, Dmitrieva AA, Trifonova EA, Nikitin NA, Karpova OV (2016) The key role of rubella virus glycoproteins in the formation of immune response, and perspectives on their use in the development of new recombinant vaccines. Vaccine 34(8):1006–1011. doi:10.1016/j.vaccine.2016.01.010
87. Puarattana-Aroonkorn S, Tharakaraman K, Suriyawipada D, Ruchirawat M, Fuangthong M, Sasisekharan R, Artpradit C (2024) Rapid and Scalable Production of Functional SARS-CoV-2 Virus-like Particles (VLPs) by a Stable HEK293 Cell Pool. Vaccines (Basel) 12(6). doi:10.3390/vaccines12060561
88. Pushko P, Pumpens P, Grens E (2013) Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. Intervirology 56(3):141–165. doi:10.1159/000346773
89. Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM (2011) Influence of glutamine on transient and stable recombinant protein production in CHO and HEK-293 cells. BMC Proceedings 5 Suppl 8(Suppl 8):P35. doi:10.1186/1753-6561-5-S8-P35
90. Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, Hacker DL, Wurm FM (2011) Influence of glutamine on transient and stable recombinant protein production in CHO and HEK-293 cells. BMC Proceedings (5(Suppl 8):P35):1–3
91. Ramazi S, Zahiri J (2021) Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database (Oxford) 2021. doi:10.1093/database/baab012

92. Rathore AS, Peruri V, Auclair JR (2024) Challenges in the Analytical Characterization of VLPs Through HPLC-Based Methods. LCGC Int.:14–18. doi:10.56530/lcgc.int.gp3972j6
93. Reiter K, Aguilar PP, Wetter V, Steppert P, Tover A, Jungbauer A (2019) Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography. J Chromatogr A 1588:77–84. doi:10.1016/j.chroma.2018.12.035
94. Resende CAA, Ribeiro AJ, Gandra IB, Silva KA, Da Lopes LS, Barcelos ICDS, Couto CAP, Faria MT de, Pereira SP, Xavier SR, Machado JM, Da Paz MC, Chaves AT, Coelho EAF, Giunchetti RC, Chávez-Fumagalli MA, Dutra WO, Gonçalves AAM, Galdino AS (2024) Recombinant proteins as promising antigens applied to the immunodiagnosis of Chagas disease: a scoping review. Front Microbiol 15:1420226. doi:10.3389/fmicb.2024.1420226
95. Rich RL, Myszka DG (2000) Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. Curr Opin Biotechnol 11(1):54–61. doi:10.1016/s0958-1669(99)00054-3
96. Roberts JA, Kimerer L, Carta G (2020) Effects of molecule size and resin structure on protein adsorption on multimodal anion exchange chromatography media. J Chromatogr A 1628:461444. doi:10.1016/j.chroma.2020.461444
97. Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, Pekarek A, Walters M, Lott S, Hage DS (2020) Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1157:122332. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122332
98. Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM (2010) Virus-like particles in vaccine development. Expert Rev Vaccines 9(10):1149–1176. doi:10.1586/ERV.10.115
99. Roldão A, Silva AC, Mellado M, Alves PM, Carrondo M (2017) Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications Comprehensive Biotechnology. Elsevier, S 633–656
100. Román R, Farràs M, Camps M, Martínez-Monge I, Comas P, Martínez-Espelt M, Lecina M, Casablancas A, Cairó JJ (2018) Effect of continuous feeding of CO2 and pH in cell concentration and product titers in hIFNγ producing HEK293 cells: Induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate. J Biotechnol 287:68–73. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.10.005

101. Ruxton GD (2006) The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. Behavioral Ecology 17(4):688–690. doi:10.1093/beheco/ark016

102. Schuck P (1996) Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport. Biophys J 70(3):1230–1249. doi:10.1016/S0006-3495(96)79681-9

103. Schwaminger SP, Zimmermann I, Berensmeier S (2022) Current research approaches in downstream processing of pharmaceutically relevant proteins. Curr Opin Biotechnol 77:102768. doi:10.1016/j.copbio.2022.102768

104. Schwarz B, Douglas T (2015) Development of virus-like particles for diagnostic and prophylactic biomedical applications. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 7(5):722–735. doi:10.1002/wnan.1336

105. Schwarz H, Gomis-Fons J, Isaksson M, Scheffel J, Andersson N, Andersson A, Castan A, Solbrand A, Hober S, Nilsson B, Chotteau V (2022) Integrated continuous biomanufacturing on pilot scale for acid-sensitive monoclonal antibodies. Biotechnol Bioeng 119(8):2152–2166. doi:10.1002/bit.28120

106. Schwarze M, Volke D, Rojas Echeverri JC, Schick R, Lakowa N, Grünewald T, Wolf J, Borte S, Scholz M, Krizsan A, Hoffmann R (2024) Influence of Mutations and N-Glycosylation Sites in the Receptor-Binding Domain (RBD) and the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Variants of Concern on Antibody Binding in ELISA. Biology (Basel) 13(4). doi:10.3390/biology13040207

107. Seidel S, Maschke RW, Mozaffari F, Eibl-Schindler R, Eibl D (2023) Improvement of HEK293 Cell Growth by Adapting Hydrodynamic Stress and Predicting Cell Aggregate Size Distribution. Bioengineering (Basel) 10(4). doi:10.3390/bioengineering10040478

108. Shen CF, Tremblay S, Sabourin-Poirier C, Burney E, Broussau S, Manceur A, Rodenbrock A, Voyer R, Loignon M, Ansorge S, Gilbert R (2022) Culture media selection and feeding strategy for high titer production of a lentiviral vector by stable producer clones cultivated at high cell density. Bioprocess Biosyst Eng 45(8):1267–1280. doi:10.1007/s00449-022-02737-5

109. Shen CF, Rodenbrock A, Lanthier S, Burney E, Loignon M (2024) Optimization of Culture Media and Feeding Strategy for High Titer Production of

an Adenoviral Vector in HEK 293 Fed-Batch Culture. Vaccines (Basel) 12(5). doi:10.3390/vaccines12050524

110. Smith MT, Hawes AK, Bundy BC (2013) Reengineering viruses and virus-like particles through chemical functionalization strategies. Curr Opin Biotechnol 24(4):620–626. doi:10.1016/j.copbio.2013.01.011

111. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophys Rev 8(4):409–427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6

112. Strober W (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr Protoc Immunol 111:A3.B.1-A3.B.3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111

113. Subedi GP, Johnson RW, Moniz HA, Moremen KW, Barb AW (2015) High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension. J Vis Exp (106):e53568. doi:10.3791/53568

114. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK (2021) HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. Front Bioeng Biotechnol 9:796991. doi:10.3389/fbioe.2021.796991

115. Tereshin MN, Melikhova TD, Eletskaya BZ, Ksenofontova OB, Pantyushenko PV, Berzina MY, Ivanov I, Myagkikh IV, Stepanenko VN (2024) Affinity Resins for the Isolation of Immunoglobulins G Obtained Using Biocatalytic Technology. Int J Mol Sci 25(3). doi:10.3390/ijms25031367

116. Thompson CM, Petiot E, Mullick A, Aucoin MG, Henry O, Kamen AA (2015) Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. BMC Biotechnol 15:31. doi:10.1186/s12896-015-0152-x

117. Tsai W-Y, Driesse K, Tsai J-J, Hsieh S-C, Sznajder Granat R, Jenkins O, Chang G-J, Wang W-K (2020) Enzyme-linked immunosorbent assays using virus-like particles containing mutations of conserved residues on envelope protein can distinguish three flavivirus infections. Emerg Microbes Infect 9(1):1722–1732. doi:10.1080/22221751.2020.1797540

118. Vicente T, Roldão A, Peixoto C, Carrondo MJT, Alves PM (2011) Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. J Invertebr Pathol 107 Suppl:S42-8. doi:10.1016/j.jip.2011.05.004

119. Walker JM (2009) The Protein Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ

120. Wandinger K-P, Saschenbrecker S, Steinhagen K, Scheper T, Meyer W, Bartelt U, Enders G (2011) Diagnosis of recent primary rubella virus infections: significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. J Virol Methods 174(1-2):85–93. doi:10.1016/j.jviromet.2011.04.001
121. World Health Organization (2007) Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection (WHO/IVB/07.01)
122. World Health Organization (2024) Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services
123. Xie L, Miao J, Li X, Yi X, Chu J (2019) Regulation of the pyruvate metabolism node by monogene and polygene engineering of HEK-293 cells. RSC Adv 9(61):35760–35770. doi:10.1039/C9RA07418J
124. Xu S, Hoshan L, Jiang R, Gupta B, Brodean E, O'Neill K, Seamans TC, Bowers J, Chen H (2017) A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion. Biotechnol Prog 33(4):1146–1159. doi:10.1002/btpr.2489
125. Xue A, Fan S (2022) Matrices and Affinity Ligands for Antibody Purification and Corresponding Applications in Radiotherapy. Biomolecules 12(6). doi:10.3390/biom12060821
126. Yang D, Singh A, Wu H, Kroe-Barrett R (2017) Determination of High-affinity Antibody-antigen Binding Kinetics Using Four Biosensor Platforms. J Vis Exp (122). doi:10.3791/55659
127. Ye M, Wilhelm M, Gentschev I, Szalay A (2021) A Modified Limiting Dilution Method for Monoclonal Stable Cell Line Selection Using a Real-Time Fluorescence Imaging System: A Practical Workflow and Advanced Applications. Methods Protoc 4(1). doi:10.3390/mps4010016
128. Zaveckas M, Snipaitis S, Pesliakas H, Nainys J, Gedvilaite A (2015) Purification of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein using ion-exchange monolith chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 991:21–28. doi:10.1016/j.jchromb.2015.04.004
129. Zeltins A (2013) Construction and characterization of virus-like particles: a review. Mol Biotechnol 53(1):92–107. doi:10.1007/s12033-012-9598-4
130. Zhang L, Schwarz H, Wang M, Castan A, Hjalmarsson H, Chotteau V (2021) Control of IgG glycosylation in CHO cell perfusion cultures by GReBA

mathematical model supported by a novel targeted feed, TAFE. Metab Eng 65:135–145. doi:10.1016/j.ymben.2020.11.004

131. Zhao Q, Modis Y, High K, Towne V, Meng Y, Wang Y, Alexandroff J, Brown M, Carragher B, Potter CS, Abraham D, Wohlpart D, Kosinski M, Washabaugh MW, Sitrin RD (2012) Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. Virol J 9:52. doi:10.1186/1743-422X-9-52

132. Zhao M, Vandersluis M, Stout J, Haupts U, Sanders M, Jacquemart R (2019) Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? Vaccine 37(36):5491–5503. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.090

133. Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das AT (2006) Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. Gene Ther 13(19):1382–1390. doi:10.1038/sj.gt.3302780

134. Zitzmann J, Schreiber C, Eichmann J, Bilz RO, Salzig D, Weidner T, Czermak P (2018) Single-cell cloning enables the selection of more productive Drosophila melanogaster S2 cells for recombinant protein expression. Biotechnol Rep (Amst) 19:e00272. doi:10.1016/j.btre.2018.e00272

Anhang

Übersicht der verwendeten Bedienungsanleitungen

Tabelle 18: Übersicht Bedienungsanleitungen.

Übersicht der Bedienungsanleitungen mit jeweiligem Verwendungszweck für die Verweise im Fließtext mit Formulierungen wie „nach Herstellerangaben“ oder Ähnlichem.

Nummerierung	Verwendungszweck	Bezeichnung Bedienungsanleitung
1	Affinitätschromatographie	HiTrap NHS-activated HP,1 ml and 5 ml, Cytiva, Instructions for Use, 71700600 AY 10/2020
2	Affinitätschromatographie	GoBio Mini ACT, Bio-Works, Instruction, IN 45 400 010 BA
3	Affinitätschromatographie	NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Pre-activated media, Cytiva, Instructions for Use, 71500014 AE V:5 07/2020
4	Bestimmung IFU/mL lentiviraler Partikel	Lenti-X™ GoStix™ Plus Protocol-At-A-Glance, Takara Bio, (021121), 2021
5	Lentivirales Vektorsystem	Lenti-X™ Tet-One™ Inducible Expression Systems User Manual, Takara Bio, Cat. Nos. 631844, 631847 (011118), 2015
6	Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F	PNGase F Protocol, Denaturing Conditions, New England Biolabs, 2014.

Plasmidkarte pLVX-TetOne-Puro

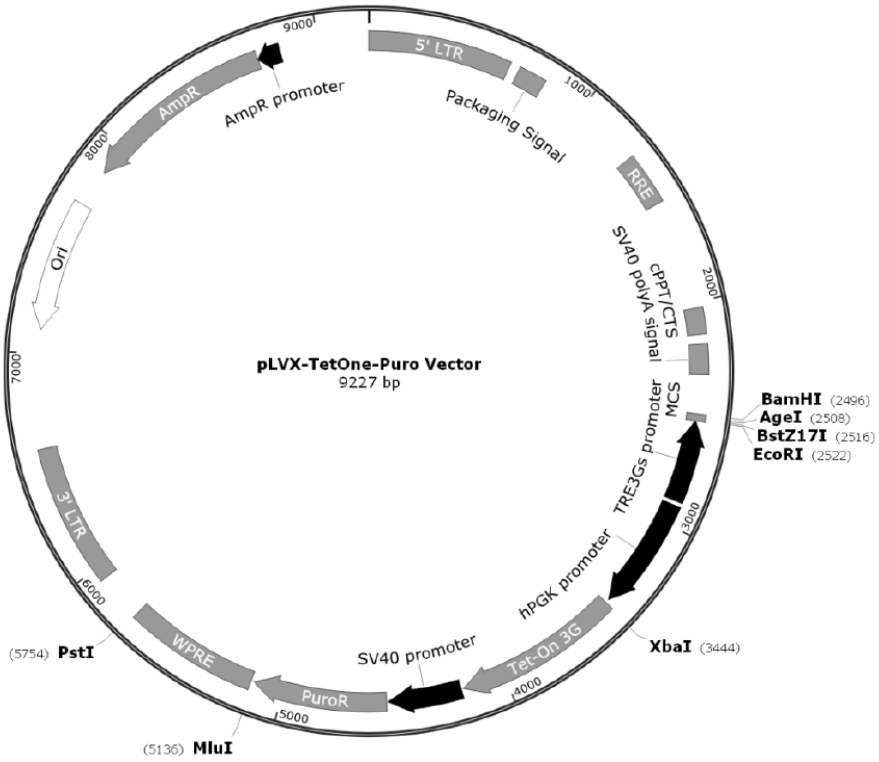


Abbildung 51: Plasmidkarte pLVX-TetOne-Puro aus Bedienungsanleitung 5 (Tabelle 18).

Screening der Puffer- und Lagerbedingungen für Rubella Virus-like Particles nach dem Chromatographieprozess

Tabelle 19: Puffer für das Screening der Lagerbedingungen von Rubella-VLPs.

Übersicht der eingesetzten Formulierungen für das Screening der Lagerpuffer für Rubella-VLPs nach dem Chromatographieprozess.

Puffernummer	Pufferbezeichnung	Pufferzusammensetzung	pH-Wert
1)	10x NTE	1 M NaCl	7,4
		0,5 M TRIS	
		0,01 M EDTA	
2)	1x NTE	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
3)	1x NTE + 5 % (w/v) Saccharose	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
		5 % (w/v) Saccharose	
4)	1x NTE + 10 % (w/v) Saccharose	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
		10 % (w/v) Saccharose	
5)	1x NTE + 20 % (w/v) Saccharose	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
		20 % (w/v) Saccharose	
6)	Neutralisation	1 M HEPES	8,0
		0,15 M NaCl	
7)	1x NTE + 0,25 M NDSB/PPS	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
		0,25 M NDSB/PPS	
8)	1x NTE + 0,5 M NDSB/PPS	0,1 M NaCl	7,4
		0,05 M TRIS	
		0,001 M EDTA	
		0,5 M NDSB/PPS	
9)	Glycin-HCl	0,1 M Glycin	2,5
10)	Glycin-HCl	0,1 M Glycin	3,5
11)	Glycin-HCl	0,1 M Glycin	4,5
12)	Glycin-HCl	0,1 M Glycin	5,5
13)	Glycin-HCl	0,1 M Glycin	6,5
14)	Dialysepuffer nativ	0,05 M HEPES	8,0
		150 mM NaCl	
		10 % (v/v) Glycerin	
15)	Dialysepuffer Arginin	0,05 M HEPES	10,0
		150 mM NaCl	
		10 % (v/v) Glycerin	
		0,2 M L-Arginin	
16)	Dialysepuffer 0,2 M Prolin	0,05 M HEPES	7,4
		150 mM NaCl	
		10 % (v/v) Glycerin	
		0,2 M L-Prolin	

Puffernummer	Pufferbezeichnung	Pufferzusammensetzung	pH-Wert
17)	Dialysepuffer 1 M Prolin	0,05 M HEPES	7,4
		150 mM NaCl	
		10 % (v/v) Glycerin	
		1 M L-Prolin	
18)	Dialysepuffer 2 M Prolin	0,05 M HEPES	7,4
		150 mM NaCl	
		10 % (v/v) Glycerin	
		2 M L-Prolin	
19)	Carbonatpuffer 1	0,05 M Na_2CO_3	n.a.
		0,05 M $NaHCO_3$	
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
20)	Carbonatpuffer 2	0,1 M Na_2CO_3	n.a.
		0,025 M $NaHCO_3$	
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
21)	Carbonatpuffer 3	0,05 M Na_2CO_3	n.a.
		0,1 M $NaHCO_3$	
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
22)	Carbonatpuffer 4	0,05 M Na_2CO_3	n.a.
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
23)	Carbonatpuffer 5	0,1 M Na_2CO_3	n.a.
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
24)	Carbonatpuffer 6	0,05 M $NaHCO_3$	n.a.
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
25)	Carbonatpuffer 7	0,1 M $NaHCO_3$	n.a.
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
26)	Carbonatpuffer 8	55 % (v/v) Carbonatpuffer 5	10,0
		45 % (v/v) Carbonatpuffer 7	
27)	Carbonatpuffer 9	55 % (v/v) Carbonatpuffer 4	10,0
		45 % (v/v) Carbonatpuffer 6	
28)	Carbonatpuffer 9	90 % (v/v) Carbonatpuffer 9	10,0
	+ 10 % (v/v) Glycerin	10 % (v/v) Glycerin	
29)	Carbonatpuffer 9	80 % (v/v) Carbonatpuffer 9	10,0
	+ 20 % (v/v) Saccharose	20 % (w/v) Saccharose	
30)	Phosphatpuffer 1	0,05 M NaH_2PO_4	n.a.
		0,05 M Na_2HPO_4	
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	
31)	Phosphatpuffer 2	0,05 M Na_3PO_4 $12H_2O$	n.a.
		0,1 M Na_2HPO_4	
		0,15 M NaCl	
		0,1 % (v/v) ProClin950	

Aufzeichnungen von Bioprozessparametern der Bioreaktorläufe

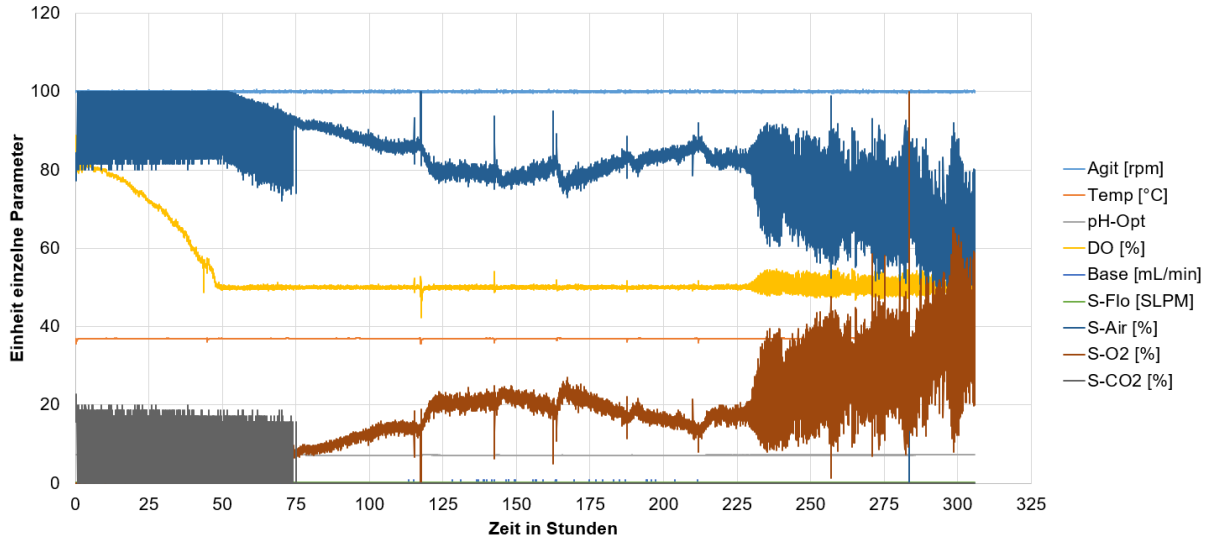


Abbildung 52: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 1.

Bioreaktorlauf Versuch 2 aus Screening der Bioreaktorprozessparameter mittels DoE. Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,2 ± 0,1; DO-Wert: 50 %; Rührerdrehzahl: 100 rpm; Begasungsrate: 0,04-1,00 SLPM; Inokulationsdichte: 0,4 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit jeweiliger Parameter, orange: DO [%], hellgrau: pH-Wert, dunkelblau: Begasung Luft, braun: Begasung O_2, dunkelgrau: Begasung CO_2, hellblau: Rührerdrehzahl [rpm], rot: Temperatur [°C], grün: Begasungsrate [SLPM], blau: Basezugabe [mL/min].

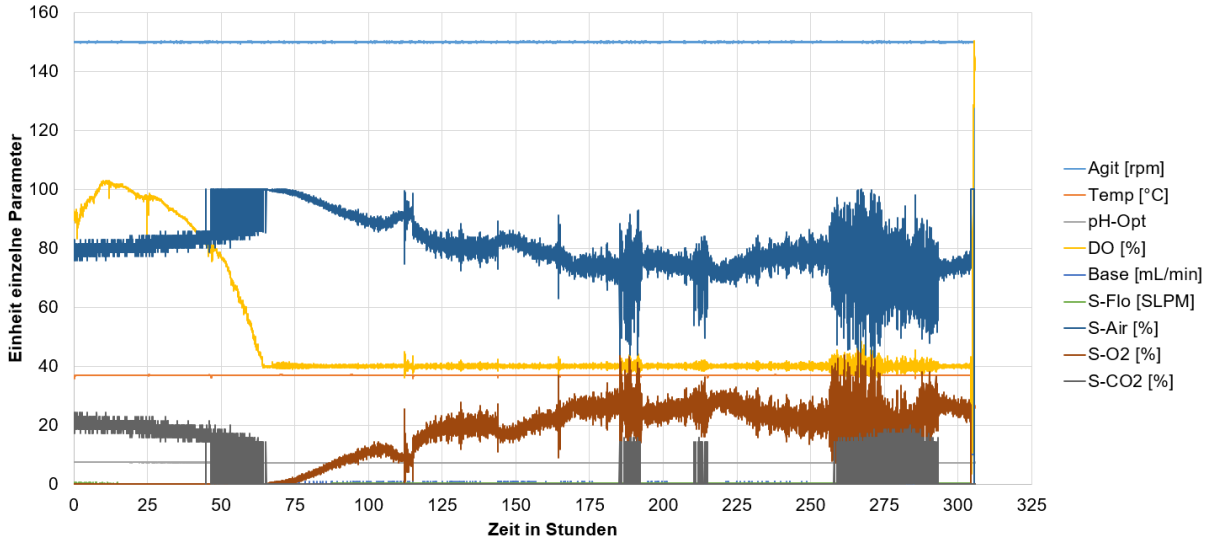


Abbildung 53: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 2.

Bioreaktorlauf Versuch 2 aus Screening der Bioreaktorprozessparameter mittels DoE. Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,2 ± 0,1; DO-Wert: 40 %; Rührerdrehzahl: 150 rpm; Begasungsrate: 0,04-1,00 SLPM; Inokulationsdichte: 0,4 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit jeweiliger Parameter, orange: DO [%], hellgrau: pH-Wert, dunkelblau: Begasung Luft, braun: Begasung O_2, dunkelgrau: Begasung CO_2, hellblau: Rührerdrehzahl [rpm], rot: Temperatur [°C], grün: Begasungsrate [SLPM], blau: Basezugabe [mL/min].

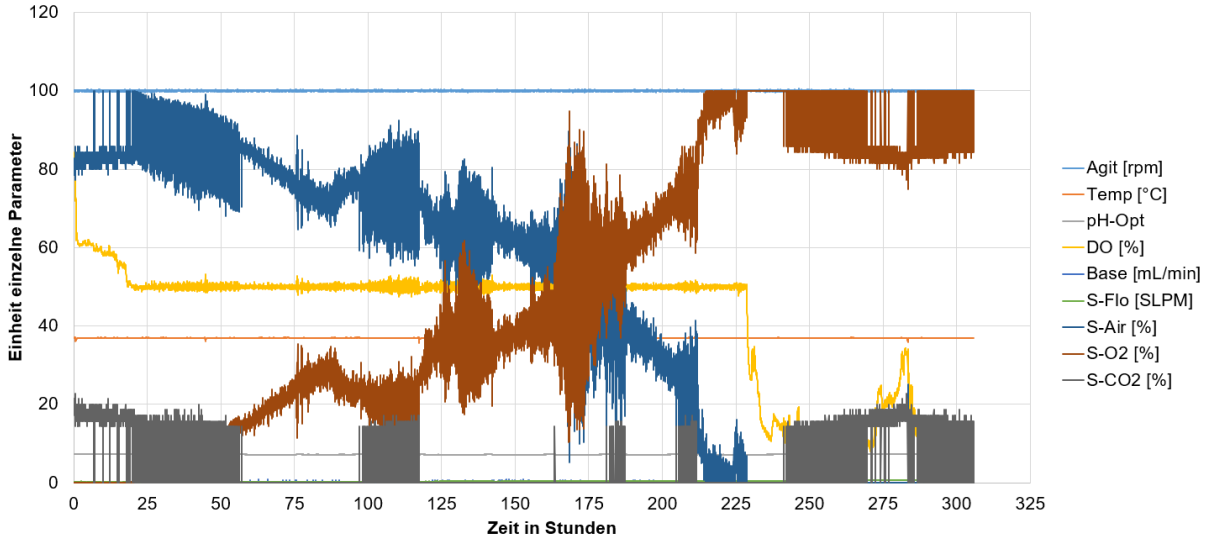


Abbildung 54: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 3.

Bioreaktorlauf Versuch 3 aus Screening der Bioreaktorprozessparameter mittels DoE. Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,2 ± 0,1; DO-Wert: 50 %; Rührerdrehzahl: 100 rpm; Begasungsrate: 0,04-1,00 SLPM; Inokulationsdichte: 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit jeweiliger Parameter, orange: DO [%], hellgrau: pH-Wert, dunkelblau: Begasung Luft, braun: Begasung O_2, dunkelgrau: Begasung CO_2, hellblau: Rührerdrehzahl [rpm], rot: Temperatur [°C], grün: Begasungsrate [SLPM], blau: Basezugabe [mL/min].

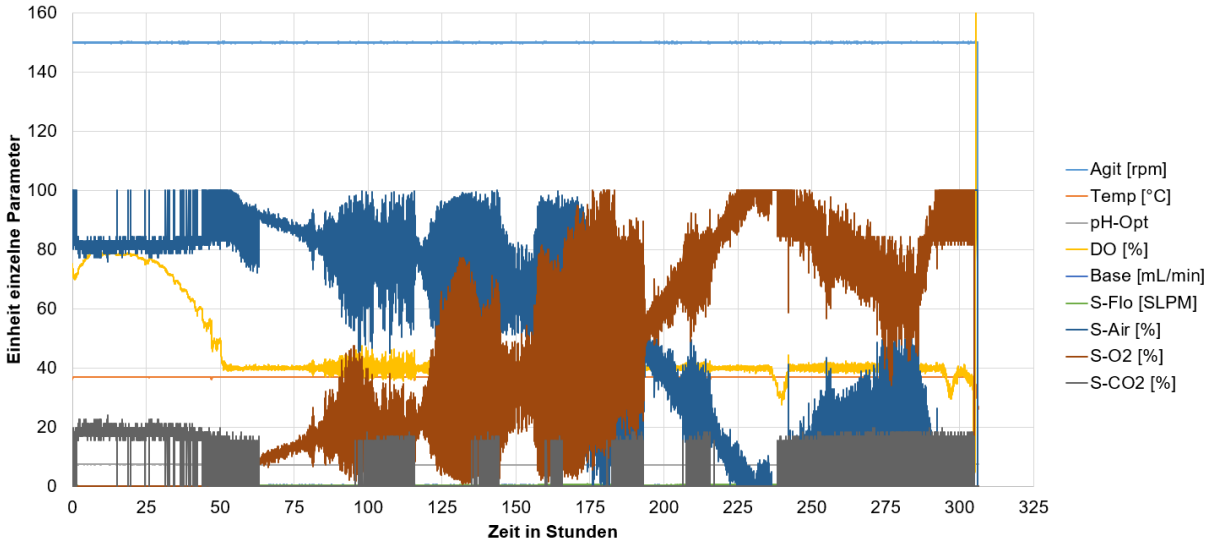


Abbildung 55: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf Versuch 4.

Bioreaktorlauf Versuch 4 aus Screening der Bioreaktorprozessparameter mittels DoE. Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,2 ± 0,1; DO-Wert: 40 %; Rührerdrehzahl: 150 rpm; Begasungsrate: 0,04-1,00 SLPM; Inokulationsdichte: 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit jeweiliger Parameter, orange: DO [%], hellgrau: pH-Wert, dunkelblau: Begasung Luft, braun: Begasung O_2, dunkelgrau: Begasung CO_2, hellblau: Rührerdrehzahl [rpm], rot: Temperatur [°C], grün: Begasungsrate [SLPM], blau: Basezugabe [mL/min].

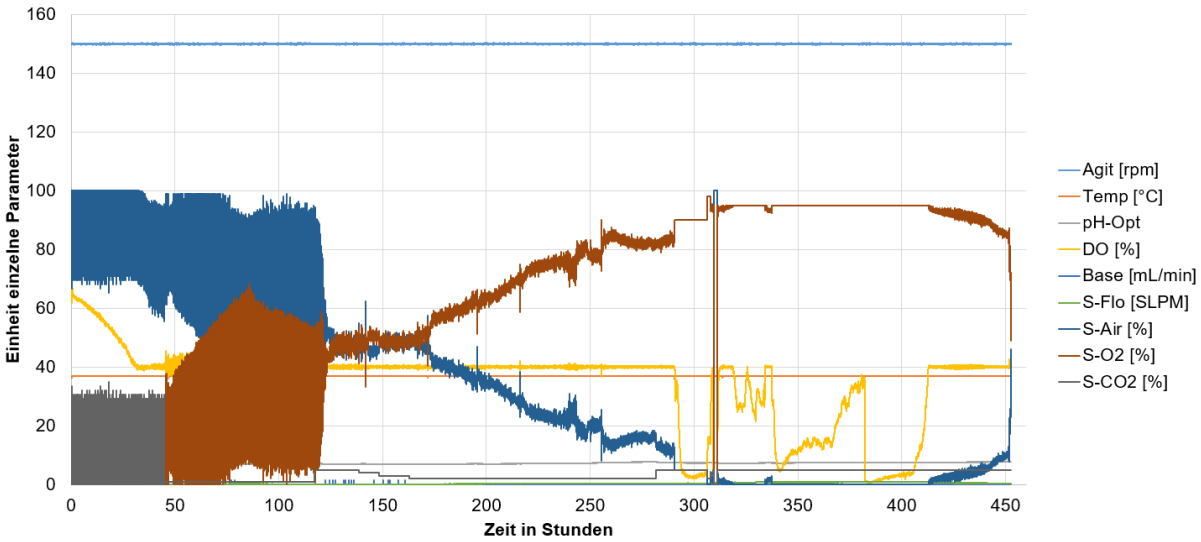


Abbildung 56: Aufzeichnung der Bioreaktorprozessparameter von 1 L-Bioreaktorlauf zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes.

Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,1 ± 0,2; DO-Wert: 40 %; Rührerdrehzahl: 150 rpm; Begasungsrate: 0,04-1,00 SLPM; Inokulationsdichte: 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL. pH Regelung ab 48 Stunden über Variation der prozentualen CO_2-Zufuhr. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit der jeweiligen Parameter, rot: DO [%], blau: pH-Wert, pink: Begasung Luft, grün: Begasung O_2, orange: Begasung CO_2, dunkelblau: Rührerdrehzahl [rpm], lila: Temperatur [°C], schwarz: Begasungsrate [SLPM].

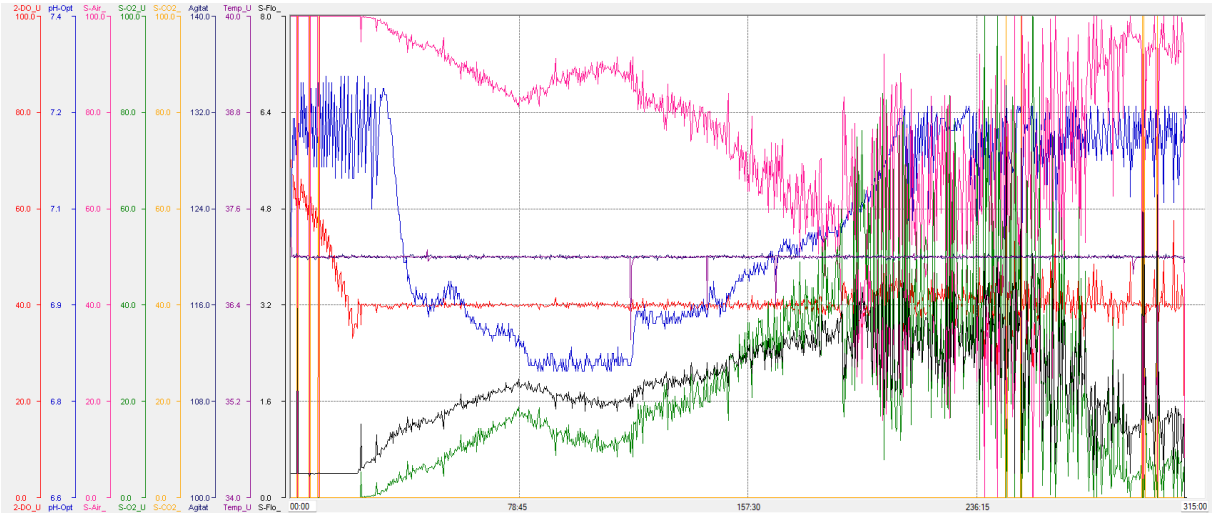


Abbildung 57: Aufzeichnung der Bioprozessparameter von 10 L-Bioreaktorlauf B091.

Prozessparameter: 37 °C; pH-Wert: 7,05 ± 0,2; DO-Wert: 40 %; Rührerdrehzahl: 120 rpm; Begasungsrate: 0,4-7,5 SLPM; Inokulationsdichte: 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit der jeweiligen Parameter, rot: DO [%], blau: pH-Wert, pink: Begasung Luft, grün: Begasung O_2, orange: Begasung CO_2, dunkelblau: Rührerdrehzahl [rpm], lila: Temperatur [°C], schwarz: Begasungsrate [SLPM].

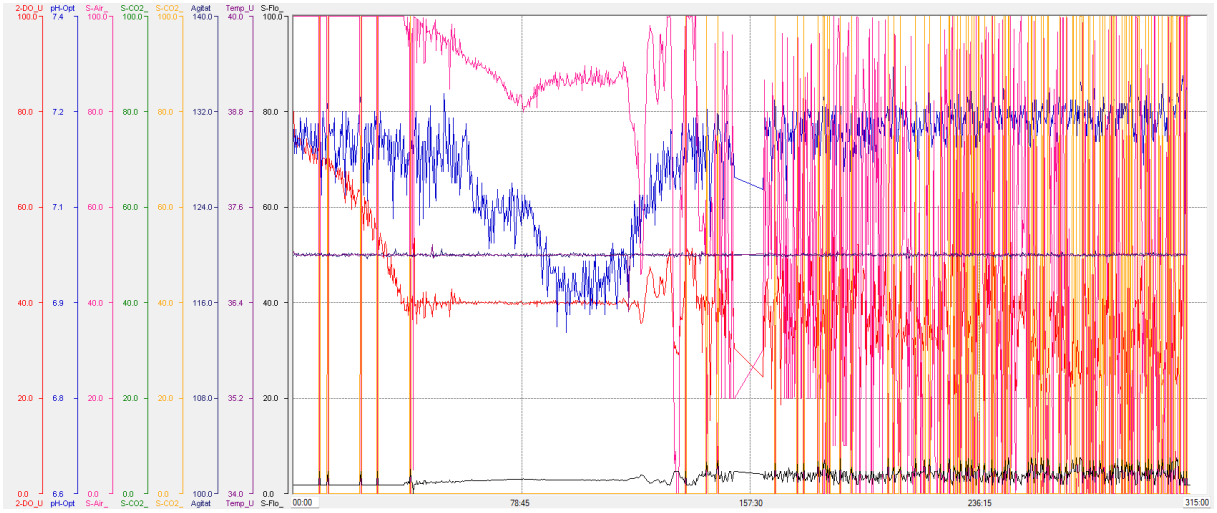


Abbildung 58: Aufzeichnung der Bioprozessparameter von 40 L-Bioreaktorlauf B092.

Prozessparameter: 37 °C, pH-Wert: 7,05 ± 0,2, DO-Wert: 40 %, Rührerdrehzahl: 120 rpm, Begasungsrate: 1,8-7,5 SLPM, Inokulationsdichte: 0,8 × 10^6 vitale Zellen/mL. X-Achse: Zeit in Stunden, Y-Achse: Einheit der jeweiligen Parameter, rot: DO [%], blau: pH-Wert, pink: Begasung Luft, grün: Begasung O_2, orange: Begasung CO_2, dunkelblau: Rührerdrehzahl [rpm], lila: Temperatur [°C], schwarz: Begasungsrate [SLPM].

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne ihre Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Hemberger, Herrn Prof. Dr. Markus Sauer und Herrn Prof. Dr. Franz Cemic für die wissenschaftliche Betreuung, ihre freundliche Unterstützung sowie die wertvollen Anregungen. Durch ihre Betreuungszusage konnte die Forschungsarbeit in Kooperation mit der Institut Virion\Serion GmbH realisiert werden.

Der Geschäftsführung der Institut Virion\Serion GmbH danke ich für die finanzielle Förderung, ohne die dieses Projekt nicht hätte durchgeführt werden können.

Für die äußerst angenehme Zusammenarbeit, den kollegialen Austausch und zahlreiche inspirierende Diskussionen gilt mein aufrichtiger Dank meinen Vorgesetzten im Unternehmen Institut Virion\Serion GmbH. Ihre Unterstützung war für den Fortschritt dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Ebenso danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen, deren aufmunternde Worte, Humor und tatkräftige Unterstützung bei gemeinsamen Arbeiten mir stets neue Motivation verliehen haben.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, Ermutigung und Unterstützung danken. Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Louisa Graf, deren Liebe, Vertrauen und unerschütterliche Zuversicht mir in allen Phasen dieser Arbeit die Kraft gegeben hat, dieses Projekt erfolgreich abzuschließen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der entsprechenden Satzung der federführenden Hochschule niedergelegt sind und die mir ausgehändigt wurde, eingehalten.

Ort, Datum	Unterschrift