

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. November 2007 (01.11.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2007/121887 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
*C12M 1/26* (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH**; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/003341

(81) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. April 2007 (17.04.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2006 019 242.7 21. April 2006 (21.04.2006) DE

(84) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder** (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BAYER TECHNOLOGY SERVICES GMBH** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (*nur für US*): **STEIGMILLER, Stefan** [DE/DE]; Hofstr. 61, 51061 Köln (DE). **TUPS, Hans** [DE/DE]; Don-Bosco-Str. 16, 51469 Bergisch Gladbach (DE). **SOMMER, Karsten** [DE/DE]; Am Flöthbach 6, 47839 Krefeld (DE). **DANSTEDT, Sonja** [DE/DE]; Bockholtstr. 24, 41460 Neuss (DE). **SCHIFFHAUER, Martin** [DE/DE]; Schimmelbuschstr. 4, 40699 Erkrath (DE). **SCHMIDT, Sebastian** [DE/DE]; Bahnhofstr. 73, 42781 Haan (DE). **KAULING, Jörg** [DE/DE]; Seelsheider Weg 20, 51069 Köln (DE). **BRAUN, Arndt** [DE/DE]; Friedrich-Bayer-Str. 2, 42327 Wuppertal (DE).

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** PROCESS ANALYSIS SYSTEM WITH STERILE SAMPLING OF MECHANICALLY-SENSITIVE MATERIAL FROM A BIOREACTOR

(54) **Bezeichnung:** PROZESSANALYSENSYSTEM MIT STERILER PROBENAHME VON MECHANISCH EMPFINDLICHEM MATERIAL AUS EINEM BIOREAKTOR

(57) **Abstract:** The invention relates to a sampling valve for sterile taking of samples containing mechanically-sensitive material from a bioreactor and a process analysis system with analytical stations, in particular, chromatographic systems, biosensors, cell determination devices, permitting an automated, sterile taking of a sample from a bioreactor and the gentle transport of the sample containing mechanically sensitive material, in particular, cells, to the analytical station.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Probenahmeventil zur sterilen Entnahme von Proben enthaltend mechanisch empfindliches Material aus einem Bioreaktor sowie ein Prozessanalyssystem mit Analysestationen insbesondere Chromatographiesysteme, Biosensoren, Zellbestimmungsgeräte, das eine automatisierte, sterile Entnahme einer Probe aus einem Bioreaktor und das schonende Transport der Probe enthaltend mechanisch empfindliches Material insbesondere Zellen zur Analysestation ermöglicht.

WO 2007/121887 A2



**Prozessanalysensystem mit steriler Probenahme von mechanisch empfindlichem Material aus einem Bioreaktor**

Die Erfindung betrifft ein Probenahmeventil zur Entnahme von Proben enthaltend mechanisch empfindliches Material aus einem Reaktor sowie ein Prozessanalysensystem mit Analysestationen insbesondere Chromatographiesysteme, Biosensoren, Zellbestimmungsgeräte, das eine automatisierte, sterile Entnahme einer Probe aus einem Reaktor und schonenden Transport der Probe enthaltend mechanisch empfindliches Material insbesondere Zellen zur Analysestation ermöglicht.

Die sterile Probennahme ist eine Standardprozedur bei Fermentationsprozessen. Sie ist der erste Arbeitsschritt auf dem Weg zur Probenanalyse, um den Zustand und die Qualität eines Bioprozesses und besonders der daraus hervorgehenden Produkte festzustellen bzw. nachzuweisen. Hierzu ist es bislang in vielen Fällen erforderlich, dass ein Laborant manuell eine Probe entnimmt. Nach der Probenauslieferung an eine zentrale Analysenstation erfolgen eine Probenvorbereitung, d.h. die Biomasseabtrennung und Aliquotierung, und schließlich die Analyse auf mehreren unterschiedlichen Analysegeräten. Die Analyseergebnisse werden zur Dokumentation der Produktqualität ausgedruckt und manuell in Datenbanken eingegeben und festgehalten. Außerdem werden entsprechend gekennzeichnete Rückstellmuster für spätere Nachweisverfahren bei tiefen Temperaturen eingelagert. Die Analyseergebnisse werden in der Qualitätssicherung geprüft, um das bei einem Bioprozess gewonnene Produkt freizugeben oder aufgrund von Qualitätsmängeln zu verwerfen. All diese Schritte sind sehr personalintensiv und verursachen demzufolge hohe Kosten. Die Steuerung und Regelung des Prozesses im Reaktor erfolgt üblicherweise nach manueller Eingabe der gewonnenen Analyseergebnisse. Eine komplette Automatisierung der Prozesssteuerung und Regelung ist daher nicht möglich.

Zur Reduzierung des Personalbedarfes sind inzwischen auf dem Markt zahlreiche automatisierbare Einzelkomponenten, z.B. sterile Probeentnahmeverrichtungen, Pipettiersysteme und Analyseautomaten verfügbar. Eine vollständige Automatisierung der Probenentnahme und -analyse scheitert jedoch am bisher ausschließlich durch Personaleinsatz durchführbaren Probentransport von der Produktionsstätte in ein separates Labor für die Qualitätskontrolle und dem dadurch hervorgerufenen Bruch in der Automatisierungskette. Desweiteren erhält man bei einer Laboranalyse keine zeitnahen Informationen, welche eine Steuerung des Prozesses erlauben würden.

Eine automatische Prozessanalyse, -steuerung und -regelung - insbesondere durch Prozesschromatographie - in der Chemie und im Polymerbereich, wo keine besonderen Anforderungen an Sterilität gestellt werden, ist in EP 1439472 A1 beschrieben. Die beschriebene Lösung erfüllt die Anforderungen der Behandlung von mechanisch empfindlichem Material insbesondere biologischem



Material und insbesondere von lebendigen Zellen nicht. Das beschriebene Prozessanalyzesystem ist für die meisten Bioapplikationen ungeeignet.

Eine Prozesschromatographie für Bioapplikationen ist in US 2004259241 A1 (Firma Groton Biosystems) beschrieben. Die beschriebene Vorrichtung zur Probenahme ist auf Bioreaktoren im Labormaßstab beschränkt, da nicht mit Dampf sterilisierbar, was in der Produktion die übliche Sterilisationsmethode ist. Ferner bietet die Firma Dionex Corporation den Prozess-Chromatographen DX-800 (Produktbroschüre „DX-800 Process Analyser, Process Analytical Liquid Chromatography“) an, der zur Prozesskontrolle von Bioapplikationen betrieben werden kann. Dieses System bietet eine automatisierte Chromatographie aber keine Probenahme an, das höchsten sterilen Anforderungen der Sterilisationstechnik an Bioreaktoren entspricht. Dieses System ist darüber hinaus auf die Analyse zellfreier Medien begrenzt. Beide Systeme sind auf die Bestimmung von mehreren Parametern konzipiert. Sie bieten jedoch keine integrierte Lösung einer Probenahme, insbesondere von scherempfindliches Material wie z.B. Zellen und auch keine Steuerung und Regelung eines Bioprozesses über die gewonnenen Daten, da wichtige Automatisierungseinheiten zur Anbindung an ein Prozessleitsystem fehlen.

Ein weiterer gemeinsamer Nachteil der beiden zuletzt beschriebenen Systeme für biotechnologische Applikationen ist neben der fehlenden Möglichkeit der Dampfsterilisation die Einschränkung, dass diese nur für die Probenvorbereitung für eine spezielle Bio-Chromatographie geeignet sind. Solche Systeme sind nicht flexibel auch für andere Analyseverfahren einsetzbar, sondern ausschließlich für die jeweils beschriebene Bio-Chromatographie verwendbar.

Probenahmeverrichtungen und insbesondere Probenahmeventile für Bioprozesse zur Entnahme von biologischem Material und insbesondere Zellen sind als Stand der Technik bekannt und einige sogar kommerziell erhältlich. z.B. WO 1990012972 A1 von der Firma Keofitt a/s beschreibt ein Probenahmeventil, das aus zwei Teilen – einem Ventilkörper, und einem Ventilkopf - besteht. Innerhalb des Ventilkörpers sind zwei Anschlüsse durch einen ringförmigen Kanal um eine Gummimembran verbunden. Diese Konstruktion ermöglicht es, das Ventil vor und nach der Verwendung zu sterilisieren. WO 2004044119 A1 von der Sartorius BBI Systems GmbH beschreibt ein kühlabes Probenahmeventil mit einem zylindrischen Strömungskanal und einen Stößel zur Sperrung der Strömungskanal, wobei die Wände des Probenahmeventils aus einem Material geringerer Stärke üblicherweise aus Metall, insbesondere Edelstahl sind, um eine schnelle Kühlung des Ventils z.B. nach einer Dampfsterilisation zu ermöglichen. WO 1990012972 A1 und WO 2004044119 A1 beschreiben den Transport der entnommenen Probe nicht. Nachteil der beiden o. g. Probenahmeventile aus WO 1990012972 A1 und WO 2004044119 A1 ist, dass beide Metall-Metall-Berührungsschnittstelle zwischen dem Kopf des Probenahmeventils und dem Bioreaktor aufwei-



sen, die bei einer Dampfsterilisation des Probenahmeventils eine lokale Erwärmung des Mediums im Bioreaktor verursacht, so dass am Ort der Probenahme vermehrt Zellenaggregate auftreten können (so genanntes Biofouling). Solche Aggregate, die auch im Normalbetrieb eines Bioreaktors entstehen, können beim Öffnen der beschriebenen Probenahmeventile aufgewirbelt werden und  
5 in das Ventil gelangen. Um Verstopfungen zu vermeiden, sind deshalb für den Transport der entnommenen Zellsuspension Transportleitungen mit relativ großen Durchmessern nötig. Außerdem wird das Volumen der Probe ausschließlich durch die Einstellung der Öffnungszeit des Probenahmeventils bestimmt. Die Lösung ermöglicht die präzise Aufnahme eines vordefinierten Volumens und insbesondere eines kleinen Volumens nicht. Darüberhinaus ist bisher kein Probentransport  
10 eines kleinen zellhaltigen Volumens über eine längere Strecke bekannt, ohne dass bei dem Transport diese Probe z.B. durch Sedimentation beim Transport bzw. Zerstörung von Zellen durch Scherung weiter verfälscht wird.

Es bestand daher Bedarf, ein automatisches flexibles Prozessanalysesystem zur Steuerung und Regelung von Bioprozessen mit integrierter Anbindung an Automatisierungssysteme bereitzustellen,  
15 len, das eine Probenahme, schonenden Probetransport und Probevorbereitung kleiner Probevolumina, die mechanisch empfindliches Material wie biologisches Material und insbesondere lebendige Zellen enthalten, ermöglicht, in das eine klassische Biochromatographie und / oder weitere Analysatoren integriert werden können. Das Prozessanalysesystem sollte unter sterilen Bedingungen betrieben werden können und Ventile und Transportleitungen sollten möglichst mit Dampf sterilisierbar sein, ohne eine Erwärmung des Reaktormediums zu verursachen.  
20

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Probenahmeventil, das eine Probe eines definierten Volumens insbesondere von biologischem Material und insbesondere lebendiges Zellmaterial unter reduzierter mechanischer Beanspruchung insbesondere durch Scherkräfte entnehmen kann.

25 Eine besondere Ausführungsform des Probenahmeventils weist eine vorzugsweise zylindrische Probenkammer definierten Volumens begrenzt durch ein vorderes und ein hinteres Dichtelement auf. Üblicherweise wird das vordere Dichtelement durch eine Verbindungswelle betätigt. Vorzugsweise gleichzeitig werden das vordere Dichtelement in Richtung des Innenraums des Bioreaktors geöffnet und das hintere Dichtelement mit gegen die Probenkammer verschlossen. In diesem  
30 geöffneten Ventilzustand entweicht die in der Probenkammer eingeschlossene Luftblase in den Reaktor, wobei eine Probe definierten Volumens aus dem Bioreaktor in die Probenkammer einströmt. Das hintere Dichtelement begrenzt das Volumen der Probenahme und ermöglicht die Entnahme eines definierten Volumens. Die Verschlusskraft kann durch Vorspannung einer Feder, bevorzugt einer Spiralfeder, von einer Druckplatte über eine Verbindungsstange auf das hintere



Dichtelement übertragen werden, das über Flächenpressung mittels einer Abdichtvorrichtung, bevorzugt eines O-Rings, gegen einen Ventilschaft abdichtet. Die Vorspannung wird üblicherweise auf einen Differenzdruck zwischen Probenkammer und Reaktor von mindestens + 1.5 bar eingestellt. Unterdruck oder Vakuum im Bioreaktor führt bei der genannten Federvorspannung damit  
5 ebenso wenig zu einer unbeabsichtigten Ventilöffnung wie ein gegenüber dem Außendruck erhöhter Innendruck im Reaktor (z.B. beim Autoklavieren), der bei gleicher Krafrichtung die Verschlusskraft zusätzlich verstärken kann. Das Probenahmeventil wird vorzugsweise durch Betätigung eines Hubzylinders geöffnet. Nach Entlasten des Hubzylinders über eine Ansteuerung, das pneumatisch (Ansteuerung über Druckluft) oder elektrisch (über einen Impuls) bevorzugt pneu-  
10 matisch erfolgen kann, schließt das Ventil in Sekundenbruchteilen nach der Erteilung des Schließungsbefehls, diese geringe Verzögerung sichert das genaue Volumen der Probe. Zur sicheren Positionierung der Dichtflächen kann eine auf der Verbindungswelle montierte Führungstange dienen. Bei der Öffnung des Probenahmeventils wird eine gegen die Rückstellkraft der Feder gerichtete Druckkraft auf die Führungstange übertragen. Auf dieser Führungstange wird üblicher-  
15 weise eine Membran angebracht, welche zwischen zwei Halteplatten eingequetscht festgehalten werden kann. Die Druckkraft auf die Führungstange führt zur Auslenkung der Membran, die die Probenkammer und einen hinteren Ventilinnenraum hermetisch gegen die Umgebung abdichtet. Vorzugsweise besitzt der hintere Ventilinnenraum zur Verringerung der Membranbelastung einen gegenüber der Probenkammer vergrößerten Durchmesser.

20 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Probenahmeventil am Sondenkopf (der Öffnung zum Reaktor) von einem selbstreinigenden Filter geschützt, so dass keine größeren Aggregate in die Probenkammer und in die Transportleitung gelangen können. Die Weite der Poren dieses Filters beträgt üblicherweise 0,02 µm bis 2 mm vorzugsweise jedoch 0,45 µm bis 1 mm. In einer besonderen Ausführungsform des Probenahmeventils weist das Filter einen Hohlraum auf,  
25 die von einer Kappe um das vordere Dichtelement herum, im geschlossenen Zustand von innen gefüllt wird d.h. die Poren werden durch die Kappe von innen verschlossen. Die Kappe wird im geöffneten Zustand in Richtung des Reaktors herausgefahren, so dass sich ein geöffneter Bereich bildet.

Die Membran besteht vorzugsweise aus einem Material, welches gegenüber Wasserdampf beständig ist, bevorzugt EPDM, Silicone, HNBR bzw. PFR-Kunststoffe. Der Sondenkopf besteht vor-  
30 zugsweise aus einem für pharmazeutische Applikationen zugelassenen Kunststoff, bevorzugt aus PVDF, PEEK bzw. POM, welcher eine geringere Wärmeleitfähigkeit als Edelstahl besitzt und an dem Zellen besonders schlecht haften bleiben. So besteht keine Metall-Metall-Berührungsschnittstelle mit dem angeschlossenen Bioreaktor, so dass eine lokale Erwärmung des Bioreaktors und



Foulingschichten auf der Abdichtvorrichtung, welche bevorzugt ein O-Ring ist, während des Reinigungsprozesses z.B. bei einer Dampfsterilisierung vermieden werden kann.

Für häufige Probenahme ist ein kleines Entnahmevolumen unerlässlich. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Probenahmeventils können exakt definierte Entnahmevolumina von 2 mL bis 200 mL,  
5 bevorzugt zwischen 5 mL und 20 mL entnommen werden.

Das erfindungsgemäße Probenahmeventil wird üblicherweise analog zu Standardsonden z.B. mit Hilfe einer Verschraubung in genormte Fermenterstutzen eingebaut, bevorzugt mit dem Durchmesser von DN25, üblicherweise mit Hilfe einer Abdichtvorrichtung, bevorzugt mit einem so genannten O-Ring. Zur Verbesserung des Ablaufverhaltens der Probe und der zu einem späteren  
10 Zeitpunkt aufzugebenden Reinigungsflüssigkeiten ist ein abwärts geneigter Einbau des Probenahmeventils an die Bioreaktorwand vorteilhaft. Günstige Einbauwinkel liegen zwischen 0° und 90° zur Waagrechten, bevorzugt zwischen 1° und 15°.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Ventils kann die zylindrische Probenkammer selbst gegen die Stutzenachse geneigt angebracht werden, bevorzugt zwischen 1° und 15° zur  
15 Waagrechten.

Das erfindungsgemäße Probenahmeventil kann bei Bedarf temperiert werden, vorzugsweise wird hierfür das Probenahmeventil ummantelt und mit einem Peltier-Element temperiert.

Nach dem Schließen des Ventils wird der Weg zu einer angeschlossenen Transportleitung freigegeben. Die Probe wird anschließend als weitgehend zusammenhängender Pfropfen zum Zielort,  
20 z.B. einer Probenvorbereitungs- und /oder -analysestation, transportiert. Zum Probentransport werden üblicherweise Gas bzw. Flüssigkeit über eine Zugabeöffnung und einen Kanal eingeleitet und verdrängen dabei langsam die Probe aus der Probenkammer in einen hinteren Ventillinnenraum und zu einem Ablaufstutzen. Die Zugabeöffnung kann über ein Ventil, bevorzugt ein Rückschlagventil, geschützt werden.

25 Das Probenahmeventil wird üblicherweise an Transport- und Versorgungsleitungen, insbesondere Reinigungsleitungen, gekoppelt. Die Ankopplung erfolgt vorzugsweise durch autoklavier- und dampfsterilisierbare Schnellverschlusskupplungen, die im entkoppelten Zustand über einen Schließmechanismus verfügen, der die sterilen Innenflächen der beiden Kupplungsstücke vor Kontamination schützt.

30 Nach einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist zwischen dem Probenahmeventil und der Transportleitung ein Hahn integriert, bevorzugt ein Dreiwegehahn, mit dem eine Probe manu-



ell entnommen werden kann, der vorzugsweise einer Kontrolleinheit verfügt und dezentral angesteuert werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Prozessanalysesystem, dass mindestens eine Vorrichtung zur Entnahme einer Probe aus einem Reaktor, eine Probetransportvorrichtung und  
5 mindestens eine Probenanalysestation aufweist, welches ermöglicht, dass ein Volumen von Probenmaterial aus dem Reaktor entnommen und zur Analysestation transportiert wird, wobei das Probenmaterial eine Suspension von mechanisch empfindlichem, insbesondere scherempfindlichem Material ist, das reduzierter mechanischer Beanspruchung insbesondere reduzierten Scherkräften ausgesetzt wird. Bevorzugt ist das Volumen präzise definiert und / oder aggregatfrei.

10 Mechanisch empfindliches insbesondere scherempfindliches Material im Sinne der vorliegenden Erfindung ist insbesondere biologisches Material wie z.B. Zellen, Bakterien, einzellige Pilze wie Hefen, Viren, Agglomerate aus Proteinpräzipitaten, Proteinkristalle, native Proteine, Antikörper, Liposomen und insbesondere lebendige tierische und /oder pflanzliche Zellen.

Das Prozessanalysesystem weist üblicherweise mindestens eine Vorrichtung zur Probenahme und  
15 Probetransport verbunden mit mindestens einer Probenvorbereitungs- und / oder Probenanalysestation auf.

In einer besonderen Ausführungsform Prozessanalysesystem ist die Vorrichtung zur automatischen Probenahme ein erfindungsgemäßes Probenahmeventil.

Das erfindungsgemäße Prozessanalysesystem steuert üblicherweise mindestens eine Probenanalyse-  
20 station an und hat eine Anbindung an ein Automatisierungssystem, bevorzugt an ein Prozessleitsystem oder speicherprogrammierbare Steuerungen zur Führung, Steuerung und / oder Regelung des Prozesses in einem Reaktor und insbesondere Bioreaktor.

Vorzugsweise sind die Probenahme- und Probetransportvorrichtungen, die Probenvorbereitung sowie die Prozessanalysestation modular aufgebaut.

25 Die Probenvorbereitungsstation beinhalten üblicherweise Probenventile, Reservoiren, Büretten, Ventile, Ventilinseln, Dosierventile und dergleichen, die durch Transportleitungen miteinander verbunden sind und die Behandlung der Probe in ein oder mehreren Schritten ermöglichen. Durch entsprechende Ansteuerung der einzelnen Module von einer Steuereinheit wird die automatische Probenvorbereitung durchgeführt und kontrolliert. Vorzugsweise weist das Prozessanalysesystem  
30 mindestens eine Probenvorbereitungsstation auf. Dort werden die zur Verwendung der Probe für die Analyse erforderlichen Schritte durchgeführt, wie z.B. Verdünnung, Zugabe von internem Standard, Zugabe von Stabilisatoren (z.B. Glycerin), Marker oder Detergens, Temperierung bevor-



zugt Kühlung auf 4 bis 37°C, pH-Werteinstellung, Strippen, Umpufferung, Filtration oder Derivatisierung. Diese Schritte werden vollautomatisiert durchgeführt und mit mehreren Sensoren überwacht bzw. gesteuert. Als Sensoren sind z.B. pH-Elektrode, Leitfähigkeitssonde, Sensoren zur Messung der optischen Dichte, Trübung, Druck, Temperatur, Fluss genannt.

- 5 Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beinhaltet das Prozessanalyse-  
system und insbesondere die Probenvorbereitungsstation einen sensorgesteuerten Test der Probe, der unter-  
sucht, ob sich die Eigenschaften der Probe (z.B. Zelldichte) mit dem im vorgegebenen Arbeitsab-  
lauf und insbesondere den Benutzungsanweisungen eines benötigten Analysators kompatibel ist.  
Ist z.B. die Zelldichte zu hoch, so kann ein Analysator verstopfen. Außerdem kann die Zelldichte  
10 außerhalb des Messbereiches des Analysators liegen. In diesem Fall wird die Probe sensorgesteu-  
ert so lange verdünnt, bis eine zuverlässige Quantifizierung der Probe möglich ist. Ist im umge-  
kehrten Fall die Zelldichte zu niedrig für eine Quantifizierung, so wird sensorgesteuert ein Proben-  
aufkonzentrierungsprogramm gestartet.

- Vorzugsweise weist die Probenvorbereitungsstation ein zentrales Sammelgefäß auf, in dem ein Sen-  
15 sor zur Überwachung der Probe integriert ist, um die Aufarbeitung der Probe in der Probenvorberei-  
tungsstation zu regeln und/oder zu steuern. Ist die Probe sehr verdünnt, wird ein Aufkonzentration-  
sprogramm gestartet, bei zu hoher Konzentration wird ein Verdünnungsschritt eingeleitet. So wird  
verhindert, dass Messungen von Proben oder Aliquoten durchgeführt werden, die außerhalb des  
Messbereichs, der Spezifikationen und/oder des validierten Bereichs der Analysestation liegen.

- 20 Vorzugsweise kann diese Art der Probenvorbereitung dazu verwendet werden, die Probe so vorzubereiten,  
dass eine exakte Analyse in einem Analysator im empfindlichsten Messbereich durchgeführt  
werden kann. Dies erlaubt eine empfindlichere Bestimmung von Parametern über eine größere Kon-  
zentrationsspanne der Probe und somit eine verbesserte Steuerung von Bioprozessen.

- Vorzugsweise sind die Probenahmeverrichtung sowie die Probenanalysestationen über Transport-  
25 leitungen mit den Probenvorbereitungstationen verbunden. Dadurch wird ein modular aufgebautes  
und integriertes System zur Entnahme der Proben, Transport der Proben, zur Probenvorbereitung  
und zur Probenanalyse geschaffen. Dieser modulare Aufbau hat insbesondere den Vorteil, dass die  
automatische Probenvorbereitung für unterschiedliche Analysatoren ohne großen Aufwand konfi-  
gurierbar ist.

- 30 In einer besonderen Ausführungsform des Prozessanalyse-  
systems wird die Probe in einer Aliquotierungsstation in mehrere Aliquote aufgeteilt. Diese Aliquote durchlaufen entweder nacheinander  
eine Probenvorbereitungsstation, alternativ werden sie parallel in mehrere Probenvorbereitungssta-  
tionen transportiert und werden dort unterschiedlich aufbereitet. In einer weiteren Ausführungs-



form des Prozessanalysesystems wird die Aliquotierung nach der Probearbeitung wie z.B. Filtration, Dekantierung, Konzentration oder Verdünnung durchgeführt.

Vorzugsweise weist das Prozessanalyssystem eine zentrale Probearbeitungsstation auf, die die Aliquote nacheinander durchlaufen.

- 5 Nach der Probearbeitung wird die Probe bzw. die Aliquote in die verschiedenen Probenanalysestationen durch die Transportleitungen transportiert.

Vorzugsweise verfügt das Prozessanalyssystem über eine Selbstüberwachung, die die Eigenschaften der Probe, bevorzugt Temperatur, Druck, pH-Wert, Fluss, optische Dichte, Leitfähigkeit, Trübung, in mindestens einen der verschiedenen Module erfasst und überwacht.

- 10 In einer besonderen Ausführungsform des Prozessanalysesystems wird der Transport der Probe und insbesondere Fluss, optische Dichte oder Trübung in den Transportleitungen überwacht und kontrolliert, um eine Verstopfung der Leitungen zu verhindern.

- Vorzugsweise ist das Prozessanalyssystem so konstruiert, dass es sich bei einem Stromausfall oder einer Betriebsstörung in einem sicheren Zustand fährt, der verhindert, dass der Inhalt von angeschlossenen Bioreaktoren kontaminiert wird.
- 15

- Die Probenanalysestation kann verschiedene Probenanalysegeräte (Analysatoren) wie z.B. Zellzähler, Biosensoren, Spektroskopiesysteme, Chromatographiesysteme wie HPLC-, Ionen-, Affinitäts- und/oder Gelpermeations-Chromatographiesysteme aufweisen, die zur Untersuchung der Probe bzw. Aliquote dienen. Die Analyseergebnisse werden über eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) übertragen und beispielsweise über einen Feldbus an eine Automatisierungseinheit (z.B. ein Prozessleitsystem) übermittelt. Dieses kann dann den Prozess entsprechend steuern und/oder regeln. Die Dokumentation wird gemäß den Anforderungen der Qualitätssicherung durchgeführt.
- 20

- In einer besonderen Ausführungsform führt das Probenanalysegerät biochemische Analyse von Reaktionsprodukten bzw. Nebenkomponenten durch. Reaktionsprodukte sind in der Regel die herzustellenden Proteine, während Beispiele für Nebenkomponenten Zellzustandsparameter wie Vimentin, Laktatdehydrogenase oder DNA darstellen.
- 25

In einer besonderen Ausführungsform des Prozessanalysesystems werden Biosensoren für die Kontrolle von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten wie Glukose und Laktat eingebaut.

- 30 Für die biochemische Analyse, werden bevorzugt an biofunktionelle Oberflächen wie z.B. an Mikrotiterplatten-, Glas-, Biosensor-, Bead- oder Magnetbeadoberflächen biologische, chemische



oder biochemische Erkennungselemente wie z.B. DNA, RNA, Aptamere, Rezeptoren gebunden, an die ein Analyt beim Nachweis mittels einer Erkennungsreaktion spezifisch bindet. Eine weit verbreitete Methode stellt hier die ELISA Methode dar. Die biochemische Analyse mittels biochemischer Erkennungselemente kann jedoch auch in homogenen Formaten in Lösung wie z.B. im Rahmen der homogenen zeitaufgelösten Fluoreszenz (HTRF) erfolgen. Hierbei werden die biochemischen Erkennungselemente mit signalgenerierenden Molekülen wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen oder Nanopartikeln gekoppelt.

Beispiele für Erkennungsreaktionen sind die Bindung von Liganden an Komplexe, die Komplexbildung von Ionen, die Bindung von Liganden an (biologische) Rezeptoren, Membranrezeptoren oder Ionenkanäle, von Antigenen oder Haptenen an Antikörper (Immunoassays), von Substraten an Enzyme, von DNA oder RNA an bestimmte Proteine, von Aptameren oder Spiegelmeren an ihre Targets, die Hybridisierung von DNA/RNA/PNA oder anderen Nukleinsäure-Analoga (DNA-Assays) oder die Prozessierung von Substraten durch Enzyme. Im Rahmen von DNA-Assays kann vorteilhaft die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) besonders bevorzugt die Methode der kinetischen PCR verwendet werden. Als Signalverstärkung für Immunoassays kann vorteilhaft die Methode der Immuno-PCR eingesetzt werden.

Beispiele für nachzuweisende Analyten sind DNA, RNA, PNA, Nukleinsäure-Analoga, Enzymsubstrate, Peptide, Proteine, potentielle Wirkstoffe, Medikamente, Zellen, Viren.

Beispiele für Erkennungselemente, an die die nachzuweisenden Analyten binden, sind DNA, RNA, PNA, Nukleinsäure-Analoga, Aptamere, Spiegelmere, Peptide, Proteine, Komplexbildner für Metalle/Metallionen, Cyclodextrine, Kronenether, Antikörper oder deren Fragmente, Anticaline, Enzyme, Rezeptoren, Membranrezeptoren, Ionenkanäle, Zelladhäsionsproteine, Ganglioside, Mono- oder Oligosaccharide.

Werden an die biofunktionelle Oberfläche des biochemischen Detektionssystems verschiedene Erkennungselemente räumlich voneinander getrennt gebunden, so kann eine große Zahl von Erkennungsreaktionen mit einer zu untersuchenden Probe zeitgleich durchgeführt werden. Diese sogenannten Arraytechnologien sind sowohl für die Nukleinsäurecharakterisierung als auch zur Bestimmung von Proteinen mit Antikörperarrays bekannt und können zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe eingesetzt werden.

Die Detektion der Erkennungsreaktion des biochemischen Detektionssystems kann durch Anwendung optischer, elektrischer, mechanischer oder magnetischer Signalwandlungsverfahren erfolgen. Besonders bevorzugt sind optische Methoden wie Chemoluminiszenz, Elektrochemoluminiszenz, Absorptionsdetektion eines enzymatisch induzierten Farbumschlags, Fluoreszenzdetektion eines



enzymatisch induzierten Umsatzes eines fluorogenen Substrats, Alpha Screen oder homogene zeit-  
aufgelöste Fluoreszenz. Alpha Screen steht für eine homogene Detektionsmethode, bei der an ei-  
nem ersten Bead lichtinduzierter Singlet-Sauerstoff produziert wird, der nach Diffusion zu einem  
zweiten Bead, das über eine biochemische Bindungsreaktion an das erste Bead gekoppelt ist, die-  
ses zur Chemoluminiszenz anregt.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist die Integration eines Autosamplers eingebaut,  
welcher Proben sammelt und kühlt.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung spiegelt sich dieser modulare Aufbau  
auch in dem Steuerungsprogramm des Prozessanalysesystems wider. In der Steuereinheit des Sys-  
tems ist vorzugsweise für jedes Modul eine Treibersoftware mit Vorortbedienung in einer dezent-  
rale Steuer- und Versorgungseinheit hinterlegt. Auf diese Treibersoftware greift das Steuerungs-  
programm der Automatisierungseinheit zu, um nach einem vom Nutzer vorgegebenen Arbeitsab-  
lauf die Schritte der sterilen Probenentnahme, der automatischen Probenvorbereitung, Analyse und  
Reinigung vorzunehmen. Durch die Steuer- und Versorgungseinheit wird die Zufuhr von Druck-  
luft, Dampf, Reinigungsflüssigkeiten und Transportflüssigkeiten an das Probenahmeventil durch  
die Versorgungs- und Transportleitungen gewährleistet und geregelt.

In einer besonderen Ausführungsform des Prozessanalysesystems werden mehrere Reaktoren ins-  
besondere Bioreaktoren angesteuert, die unabhängig von einander operieren. Jede Probenahmever-  
richtung kann dezentral über eine eigene Steuerungseinheit und somit unabhängig angesteuert wer-  
den. Des weiteren ist es möglich, mehrere Reaktoren, die mit unterschiedlichen Zelllinien arbeiten  
und verschiedene Produkte produzieren, mit einem einzigen Prozessanalysesystem und somit be-  
sonders kostengünstig zu betreiben, da ein ausgeklügeltes Reinigungsmanagement die gegenseitige  
Kontamination der einzelnen Reaktoren verhindert. Das Prozessanalysesystem verfügt über eine  
dezentrale Automatisierungseinheit mit Vorortbedienung an jedem Probenahmeverrichtung, die  
über alle gängigen Bussysteme an die zentrale SPS gekoppelt sind. Damit lassen sich problemlos  
einzelne Einheiten ab- und zuschalten.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Ablauf des Steue-  
rungsprogramms durch vom Nutzer definierbare Parameter festgelegt. Beispielsweise kann der  
Nutzer über eine grafische Nutzerschnittstelle eines üblichen Personalcomputers zur Verfügung  
stehende Module und von diesen auszuführende Aktionen auswählen. Dadurch können in tabella-  
rischer Form Ablaufsequenzen für die Probenentnahme, Probenvorbereitung und Probenanalyse  
mit Hilfe der Module definiert werden.



Die diesen Ablauf beschreibenden Parameter werden dann von einem PC exportiert und an die Steuereinheit des Regelungssystems übertragen. Dort legen diese Parameter den Programmablauf des Steuerungsprogramms fest. Die Parameter bestimmen also die Reihenfolge in der das Steuerungsprogramm einzelne Treiberprogramme aufruft sowie auch die Steuerungsparameter, die das Steuerungsprogramm an die Treibersoftware übergibt, um ein bestimmtes Modul zu einer bestimmten Aktion zu veranlassen.

Von besonderem Vorteil ist hierbei, dass zur Festlegung eines Programmablaufs des Steuerungsprogramms kein Computerexperte erforderlich ist, da der Programmablauf in intuitiver Art und Weise über die grafische Benutzerschnittstelle durch Auswahl von Modulen und den durchzuführenden Aktionen erfolgen kann. Insbesondere kann so ein Laborant oder Techniker die zuvor von ihm manuell durchgeführten Schritte über die grafische Benutzerschnittstelle beschreiben und verfolgen. Diese Beschreibung dient dann als Parametrierung für das Steuerungsprogramm, sodass dieses die jeweils erforderliche Treibersoftware in der benötigten Reihenfolge anspricht.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung dient als Steuereinheit eine Automatisierungskomponente, wie beispielsweise eine Simatic S7 der Firma Siemens AG. Eine solche Automatisierungskomponente ist für den störungsfreien Dauereinsatz in einer industriellen Umgebung ausgelegt und kann daher nicht wie ein üblicher PC „abstürzen“. Von besonderem Vorteil ist hierbei, dass der PC, mit Hilfe dessen der Benutzer den Ablauf eingibt, und die Steuereinheit beim Betrieb des Systems voneinander getrennt werden können. D. h. nachdem die Parameter, die den Programmablauf festlegen, vom PC an die Steuereinheit übertragen worden sind, kann der PC von der Steuereinheit getrennt werden. Dadurch ist ein Betrieb der Steuereinheit unabhängig vom PC möglich.

Ein weiteres Element des erfindungsgemäßen Prozessanalysesystems ist die Transportvorrichtung, deren Aufgabe ist, die empfindliche Probe eines definierten Volumens von der Probenahmevorrichtung zu der Vorbereitung bzw. Analysestation sanft, ohne Verstopfung und verlustfrei weiterzuleiten.

Die Transportvorrichtung weist üblicherweise Transportleitungen, und mindestens ein System zu sanften Beschleunigung der Probe bzw. Aliquote durch die Transportleitungen.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Transportvorrichtung zum Transport von Suspensionen enthaltend mechanisch empfindlichem Material und insbesondere von lebendigen Zellen, umfassend Transportleitungen und mindestens ein System zur Beschleunigung der Probe bzw. Aliquote durch die Transportleitung aus mindestens zwei Büretten, wobei die Büretten mit folgenden Schritten betrieben werden:



- a) eine erste Bürette wird aufgezogen,
- b) kurz bevor die erste Bürette am Anschlag angekommen ist, wird eine zweite Bürette aufgezogen und übernimmt den Transport, wobei die Probe weder eine zusätzliche Beschleunigung noch einen kurzen Zwischenstopp erfährt,
- 5 c) die erste Bürette wird von den Transportleitungen abgekoppelt und wieder entspannt, so dass sie wieder zur Verfügung steht,
- d) Schritte a) bis c) werden wiederholt.

Bevorzugt werden die Büretten mit mindestens einer Ventilinsel an die Transportleitungen verbunden, wobei die Büretten und Ventilinsel vom Automatisierungssystem angesteuert werden, so dass  
10 eine exakte Einstellung der Transportgeschwindigkeit gewährleisten wird.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass bei einem üblichen Durchmesser der Transportleitung von 0,5 bis 3 mm vorzugsweise jedoch 1 bis 2 mm eine exakt eingestellten bevorzugt konstant gehaltene Transportgeschwindigkeit von 1 bis 10 m/min vorzugsweise jedoch auf 2,5 bis 3,5 m/min einen schonenden Proben-transport von biologischem Material und insbesondere lebendi-  
15 gem Zellmaterial ermöglicht. Erlaubte Variation der Transportgeschwindigkeit ist 30%, bevorzugt maximal 2%.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnte der Transport von biologischem Material und insbesondere von lebendigem Zellmaterial aus mehreren Reaktoren über eine längere Strecke bei geringeren Variation der Transportgeschwindigkeit, ohne Unterbrechung und somit besonders schonend  
20 und verlustfrei durch die Leitungen erreicht. Dies wurde für Hydridomazellen und SF9-Insektenzellen gezeigt. Bei Suspensionen von mechanisch empfindlichem Material und insbesondere von lebendigen Zellen ist die Einhaltung einer definierten Transportgeschwindigkeit bevorzugt, da das Material bei zu großer Transportgeschwindigkeit z.B. wegen Scherkräften zerstört wird und bei zu kleiner Transportgeschwindigkeit in der horizontal verlegten Leitung sedimentieren könnte. Der Transport erfolgt vorzugsweise pneumatisch oder mit Flüssigkeiten.  
25

In einer besonderen Ausführungsform gewährleisten die Büretten auch die Aliquotierung der Probe.

Ist die Analyse einer zellfreien Probe erwünscht, kann die Zellabtrennung über Filtration durch Anpassung der Porenweite des Filters direkt am Sondenkopf des Probenahmeventils erfolgen. Alternativ kann die Probe in der Vorbereitungsstation filtriert oder in einem Gefäß aufgefangen werden, um dort zu sedimentieren. Nach der Sedimentation kann aus dem Überstand eine zellarme  
30



Probe entnommen, filtriert und einem Analysator zugeführt werden. Eine filterlose und somit wartungsarme Alternative ist der Proben transport mit einer Geschwindigkeit von  $<1$  m/min. Bei Leitungen, die länger als 5 m sind, sedimentieren beim Transport sämtliche Zellen in der Leitung, so dass in einem Probengefäß eine zellfreie Probe aufgefangen werden kann, die für eine Weiterverarbeitung nicht weiter filtriert werden muss.

Vorzugsweise können die Transportleitungen temperiert werden, bevorzugt mit einem Peltier-Element, auf eine Temperatur zwischen  $0^{\circ}\text{C}$  und  $100^{\circ}\text{C}$ , bevorzugt zwischen  $4^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$ . Alternativ wird eine Temperierung über eine beheizte Doppelmantelleitung realisiert.

Vorzugsweise weist die Proben transportvorrichtung zwei Büretten auf, die jeweils durch eine Ventilinsel an die Transportleitungen angebunden sind, die wiederum an einem oder mehreren Probenahmeventil, die Vorbereitungs- bzw. Analysestationen und Quellen für Luft bzw. Transport- und / oder Reinigungsflüssigkeiten angebunden sind.

Vorzugsweise weisen die Transportleitungen mindestens eine Kontrolleinheit auf, die insbesondere Fluss, Druck, optische Dichte oder Trübung in den Transportleitungen überwacht und kontrolliert, um eine Verstopfung der Leitungen zu verhindern.

Die Sterilität ist für eine zuverlässige, länger dauernde Fermentation von außerordentlicher Bedeutung. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Prozessanalyse systems besteht darin, dass das Probenahmeventil zusammen mit dem Reaktor insbesondere Bioreaktor autoklaviert werden kann und dessen Versorgungsleitungen durch Sterilverbindungen verschlossen werden. Bevorzugt wird außerdem die Vorrichtung zur Probenahme und Proben transport mit Wasserdampf, sterilisiertem Wasser oder sterilisierenden Lösungen gereinigt. Nach der Analyse werden üblicherweise das Probenahmeventil und die Transportleitung bevorzugt mit Wasserdampf gespült und auf Temperaturen üblicherweise zwischen  $100$  bis  $135^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um eventuelle Zellreste zu entfernen und das System zu sterilisieren und reinigen. Alternativ kann die Reinigung auch mit sterilem Wasser oder sterilisierender Spüllösung erfolgen. Anschließend wird üblicherweise sterile, trockene Luft durch das Probenahmeventil und die Leitung gefördert, um das Proben transport-System abzukühlen und zu trocknen. Vorzugsweise weist das Probenahmeventil am hinteren Ventilinnenraum zusätzlich einen angebrachten Hilfsstutzen auf, der zur besseren in-situ Reinigbarkeit des Probenahmeventils dient. Durch den Hilfsstutzen kann sichergestellt werden, dass sich keine für die Reinigung ungünstige Luftblase und damit ein Totraum im oberen Teil des hinteren Ventilinnenraums bildet.

Nach dem Transport der Probe und deren Analyse und Dokumentation werden üblicherweise die Vorrichtung zur Probenahme und Proben transport und insbesondere das Probenahmeventil und Transportleitung gründlich mit Clean-in-place-Medien gereinigt und mit steriler Luft getrocknet.



Wichtig ist ein ausreichendes Nachspülen mit entmineralisiertem Wasser beim letzten Clean-in-place- bzw. Sterilisation-in-place-Reinigungsgang, um einer Belagbildung auf den produktberührten Flächen beim anschließenden Trocknungsprozess vorzubeugen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht eine vollautomatisierte Probenanalyse inklusive steriler  
5 Probenahme, -transport, -vorbereitung und -analyse unter Sterilbedingungen mit Integration der gewonnenen Analysenwerte durch direkte Anbindung an ein Prozessleitsystem und/oder eine SPS zur Regelung und Steuerung des Prozesses. Insbesondere werden die Entnahme kleiner, definierter Probevolumen und schonender Transport insbesondere von zellenhaltigen Proben, ggf. Zellseparation und Flüssigprobenvorbereitung und -analyse gewährleistet. Die vorliegende Erfindung ermög-  
10 licht eine flexible Gestaltung der Arbeitsabläufe und eine automatische Anpassung der Probenvorbereitung bzw. Aliquotierung an die Anforderungen sowohl der Arbeitsabläufe als auch an die im System verfügbaren Analysatoren.

Ein großer Vorteil des hier beschriebenen Prozessanalysensystems für Bioprozesse besteht außerdem darin, dass mehrere Bioreaktoren angesteuert werden können, die unabhängig voneinander  
15 operieren. Jedes Ventil kann dezentral und somit unabhängig angesteuert werden. Des Weiteren ist es vorstellbar, mehrere Reaktoren, die mit unterschiedlichen Zelllinien arbeiten und verschiedene Produkte produzieren, mit einem einzigen Prozessanalysensystem und somit besonders kostengünstig zu betreiben, da ein ausgeklügeltes Reinigungsmanagement die gegenseitige Kontamination der einzelnen Bioreaktoren verhindert.

20 Dies ist eine deutlich kostengünstigere, flexiblere und sicherere Alternative zu den bisher sich auf dem Markt befindlichen Systemen, da in einer zentralen „Intelligenz“ verschiedene Proben von mehreren Bioreaktoren gesammelt, verarbeitet und ausgewertet werden, und nicht für jeden einzelnen Bioreaktor ein teures Analysensystem zur Verfügung gestellt werden muss. Zudem ist durch integrierte Automatisierungseinheiten die Regelung und Steuerung von Bioprozessen mög-  
25 lich.

### **Abbildungen:**

Folgende Abbildungen illustrieren die Erfindung ohne sie zu begrenzen.

Fig. 1a: Probenahmeventil in geöffnetem Zustand an einem Bioreaktor

Fig. 1b: Probenahmeventil in geschlossenem Zustand an einem Bioreaktor

30 Fig. 2: Seitenansicht des Probenahmeventils im geöffneten Zustand

Fig. 3a: abwärts geneigter Einbau des Probenahmeventils



- Fig. 3b: waagrecht Einbau des Probenahmeventils mit gegen die Stutzenachse geneigter Probenkammer
- Fig. 3c: 90° abwärts geneigter Einbau des Probenahmeventils
- Fig. 4: Anschluss mehrerer Bioreaktoren an eine zentrale Analysenstation
- 5 Fig. 5: Proben transport, -vorbereitung und -analyse sowie Steuerung und Regelung eines Bioprozesses
- Fig. 6: Ablaufschema



**Bezugzeichen:**

1. Bioreaktor
2. Probenahmeventil
3. Probenkammer
- 5 4. Transportleitung
5. moderater Gasdruck
6. zusammenhängender Pfropfen
7. Zielort
8. Bürette
- 10 9. Rückstellproben
10. Probenanalyse
11. Datenausgabe und Datenbankablage
12. Rechnersystem
13. Automatisierungssystem
- 15 14. genormter Fermenterstutzen
15. Feder
16. vorderes Dichtelement
17. hinteres Dichtelement
18. Verbindungswelle
- 20 19. Membran
20. Halteplatte
21. Druckplatte
22. Hubzylinder
23. Abdichtvorrichtung
- 25 24. Zugabeöffnung
25. Ablaufstutzen
26. Hilfsstutzen
27. Verschraubung
28. Abdichtvorrichtung
- 30 29. Abdichtvorrichtung
30. Abdichtvorrichtung
31. Zulaufkanal
32. Sondenkopf
33. Ansteuerung
- 35 34. auf Verbindungswelle montierte Führung
35. Ventil



- 36. hinterer Ventilinnenraum
- 37. Schnellverschlusskupplung
- 38. Kupplungsstücke
- 39. Filter
- 5 40. Abdichtvorrichtung
- 41. Kappe
- 42. Ventilschaft
- 43. Poren
- 44. Dreiwegehahn
- 10 45. Probenahmeventil
- 46. dezentrale Steuer- und Versorgungseinheit
- 47. dezentrale Vor-Ort-Steuerung der Handprobe
- 48. zentrale Automatisierungseinheit
- 49. Kontrolleinheit
- 15 50. Handprobe
- 51. Bürette 1
- 52. Bürette 2
- 53. zentrales Sammelgefäß
- 54. Sonde
- 20 55. Rührer
- 56. Zellzahlbestimmungsgerät
- 57. Analysator 1
- 58. Analysator 2
- 59. Chromatographiesystem
- 25 60. Biosensor
- 61. Abfallgefäß
- 62. Filter
- 63. Druckluft
- 64. Wasser
- 30 65. Reinigungsmedium
- 66. Transportmedium
- 67. Dampferzeuger
- 68. Ventil
- 69. Ventil
- 35 70. Aliquotierung



Fig.1a zeigt das in einen Bioreaktor (1) eingebaute geöffnete Probenahmeventil (2) mit einer Probenkammer (3) definierten Volumens, in die die Probe bei Ventilöffnung zunächst einströmt. Das hintere Dichtelement (17) begrenzt das Volumen der Probenahme und ermöglicht die Entnahme eines kleinen, definierten Volumens. Das vordere Dichtelement (16) verhindert, dass weitere Flüssigkeit aus dem Bioreaktor in das Probenahmeventil strömen kann. Nach dem Schließen des Ventils (Fig.1b) wird der Weg zu einer angeschlossenen Transportleitung (4) freigegeben. Die Probe wird anschließend als weitgehend zusammenhängender Pfropfen (6) zum Zielort (7), einer zentralen Probenvorbereitungs- und /oder -analysestation, transportiert. Die bevorzugte Verwendung zweier Büretten (8) erlaubt durch geeignetes Zusammenspiel eine kontinuierliche Transportgeschwindigkeit und somit besonders schonenden und verlustfreien Transport durch die Leitung. Die Zellsuspension wird in einem Probengefäß gesammelt. Anschließend erfolgen dort die verschiedenen Maßnahmen zur Probenanalyse (10), wie z.B. die Aliquotierung, die Zellseparation, die Anwendung verschiedener Analyseverfahren oder das Verschließen, Kennzeichnen und Einfrieren der Rückstellproben (9). Nach Abfrage der Messergebnisse erfolgt schließlich eine der Qualitätssicherung gerechten Datenausgabe und Datenbankablage in einem Rechnersystem (12). Dann werden die Analyseergebnisse an ein Automatisierungssystem (13) übergeben.

Wie an dem Ausführungsbeispiel in Fig. 2 gezeigt, wird das Probenahmeventil (2) analog zu Standardsonden mit Hilfe einer Verschraubung (27) in genormte Fermenterstutzen (14) mit dem Durchmesser von DN25 eingebaut. Die Abdichtung des Probenahmeventils (2) innerhalb des Stutzens erfolgt über eine Abdichtvorrichtung (29), bevorzugt ein so genannter O-Ring. Das Probenahmeventil (2) ist im energielosen Zustand zum Reaktorraum mit einem abdichtenden, hinteren Dichtelement (16) geschlossen. Die Verschlusskraft wird durch Vorspannung der Feder (15), bevorzugt einer Spiralfeder, von der Druckplatte (21) über die Verbindungsstange (18) auf das hintere Dichtelement (17) übertragen. Das hintere Dichtelement (17) dichtet über Flächenpressung mittels einer Abdichtvorrichtung (30), bevorzugt eines O-Rings, gegen den Ventilschaft (42) ab. Bei einer Öffnung des Ventils durch Betätigung des autoklavierbaren Hubzylinders (22) wird eine gegen die Rückstellkraft der Feder (15) gerichtete Druckkraft auf die Führungsstange (18) übertragen. Auf dieser Führungsstange (18) ist eine Membran (19) angebracht, welche zwischen zwei Halteplatten (20) eingequetscht ist. Die Druckkraft auf die Führungsstange führt zur Auslenkung der Membran (19), die die Probenkammer (3) und den hinteren Ventillinnenraum (36) hermetisch gegen die Umgebung abdichtet. Gleichzeitig werden das vordere Dichtelement (16) in Richtung des Innenraums des Bioreaktors geöffnet und das hintere Dichtelement (17) gegen die zylindrische Probenkammer (3) verschlossen und durch eine Abdichtvorrichtung (40) abgedichtet. In diesem geöffneten Ventilzustand entweicht die in der Probenkammer (3) eingeschlossene Luftblase in den Bioreaktor (1), wobei eine Probe definierten Volumens aus dem Bioreaktor in die Probenkammer (3) einströmt. Am Sondenkopf (32) wird das Probenahmeventil von einem selbst reinigenden Filter



(39) geschützt, so dass keine größeren Aggregate in die Probenkammer (3) und in die Transportleitung (4) gelangen können. Dieser Filter (39) umgibt einen Teil des Sondenkopfs und verhindert, dass Aggregate ins Ventil gelangen. Die Weite der Poren (43) des Filters beträgt dabei 0,5 mm bis 2 mm, bevorzugt 1mm. Zur Entnahme zellfreier Proben kann eine Filterfläche mit einer Porenweite von 0,02-2  $\mu\text{m}$ , bevorzugt 0,45  $\mu\text{m}$  eingesetzt werden. Eine Kappe (41) ist im geöffneten Zustand in Richtung des Fermenters herausgefahren, so sich ein geöffneter Bereich bildet. Einige Poren (43) sind als weiße Kästchen dargestellt, durch die aus allen Richtungen eine Probe in das Ventil gelangen kann. Nach Entlasten des Hubzylinders (22) über eine Ansteuerung (33), welche pneumatisch erfolgt, schließt das Ventil. Dabei wird die Kappe (41) in Richtung des Ventils bewegt und füllt von innen den Hohlraum des Filters (39), d.h. die Poren (43) sind durch die Kappe (41) von innen verschlossen. Zur sicheren Positionierung der Dichtflächen dient die auf der Verbindungswelle montierte Führung (34). Zum Probentransport wird Gas bzw. Flüssigkeit über die Zugabeöffnung (24) und einen Zulaufkanal (31) eingeleitet und verdrängt dabei langsam die Probe aus der Probenkammer (3) in den hinteren Ventilinnenraum (36) und zum Ablaufstutzen (25). Die Zugabeöffnung wird über ein Ventil (35), bevorzugt ein Rückschlagventil, geschützt. Der am hinteren Ventilinnenraum (36) zusätzlich angebrachte Hilfsstutzen (26) dient der besseren in-situ Reinigbarkeit. Der hintere Ventilinnenraum (36) besitzt zur Verringerung der Membranbelastung einen gegenüber der Probenkammer (3) einen vergrößerten Durchmesser. Durch den Hilfsstutzen (26) wird sichergestellt, dass sich keine für die Reinigung ungünstige Luftblase und damit ein Totraum im oberen Teil des hinteren Ventilinnenraums (36) bilden. Zum Probentransport wird die Probe unter Gasdruck bzw. mit einer Flüssigkeit über einen Ablaufstutzen (25) in die Transportleitung (4) geleitet.

Fig. 3a zeigt eine bevorzugte Ausführungsform mit abwärts geneigtem Einbau des Probenahmeventils (2) an die Bioreaktorwand.

Fig. 3b zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Ventils, wobei die zylindrische Probenkammer (3) selbst gegen die Stutzenachse geneigt angebracht wird.

Fig. 3c zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Ventils mit einem 90° abwärts geneigtem Einbau des Probenahmeventils (2) an der Bioreaktorwand.

Fig. 4 zeigt eine Möglichkeit der Ankopplung des Probenahmeventils an das Leitungssystem, bestehend aus Versorgungs-, Reinigungs- und Transportleitung durch autoklavier- und dampfsterilisierbare Schnellverschlusskupplungen (37), die im entkoppelten Zustand über einen Schließmechanismus verfügen, der die sterilen Innenflächen der beiden Kupplungsstücke (38) vor Kontamination schützt. Die Probe wird in eine zentrale Probenvorbereitungs- und/oder Probenanalysestation (7) transportiert. Außerdem können mehrere Bioreaktoren angesteuert werden können, die un-



abhängig von einander operieren. Jedes Ventil kann dezentral und somit unabhängig angesteuert werden.

Fig. 5 zeigt eine zentrale Probenvorbereitungs- und/oder Probenanalysestation, aus Gründen der Übersichtlichkeit nur mit einem Probennahmesystem (45). Versorgungsleitungen sind als durchgezogene Linien, Ansteuerung von Komponenten ist mit gestrichelten Linien dargestellt. Die Pfeile auf diesen Linien geben dabei die Richtung der Kommunikation an. Das Prozessanalyzesystem verfügt über eine dezentrale Steuer- und Versorgungseinheit (46) mit dezentraler Vorortbedienung (47) an jedem Probennahmesystem. Diese kommuniziert über eine zentrale Automatisierungseinheit (48). Die dezentrale Steuer- und Versorgungseinheit (46) regelt die Zufuhr von Druckluft, Dampf, Reinigungsflüssigkeiten und Transportflüssigkeiten. In der Transportleitung zwischen dem Probennahmesystem (2) und einem Dreiwegehahn (44) ist eine Kontrolleinheit (49) integriert. Der Dreiwegehahn (44) erlaubt eine manuelle Probenentnahme (50). Zwei Büretten (51, 52) werden vom Automatisierungssystem angesteuert, um den Transport und die Aliquotierung (70) der Probe zu gewährleisten. Die Probe wird in ein zentrales Sammelgefäß (53) transportiert. Dort charakterisiert eine Sonde (54) die Probe, ein Rührer (55) ist zusätzlich integriert. Es wird ein Signal an das Automatisierungssystem übertragen, um zu entscheiden, ob die Probe für eine weitere Aufarbeitung verdünnt, aufkonzentriert oder unbehandelt weiter verwendet werden kann. Aus dem Sammelgefäß heraus wird die Probe auf verschiedene Analysatoren verteilt: eine unfiltrierte Probe wird in ein Zellzahlbestimmungsgerät (56) oder in Analysator 1 (57) untersucht. Ein anderer Teil der Probe durchläuft einen Filter (62) und wird auf Analysator 2 (58), eine Chromatographie (59) und/oder an einen Biosensor (60) verteilt. Alle Analysatoren (56-60) sind an ein Abfallgefäß (61) angeschlossen, die Anbindung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Analysatoren sind in ihrer Anzahl und Anordnung beliebig kombinierbar. Sind für verschiedene Analysatoren unterschiedliche Vorbereitungsschritte nötig, so kann die Probe im zentralen Sammelgefäß (53) für jeden einzelnen Analysator entsprechend vorbereitet werden. Alle Messwerte werden an das Automatisierungssystem übergeben, um den Bioprozess zu regeln und/oder steuern. Alle Proben werden in einem Abfallgefäß (61) gesammelt.

Fig. 6 zeigt ein Flussdiagramm. Nach der Probenentnahme aus dem Bioreaktor wird die gesamte Probe schonend in ein zentrales Sammelgefäß transportiert. In einer Voruntersuchung charakterisiert ein Sensor die Probe. Bei einer zu hohen Konzentration wird ein sensorgesteuertes Probenverdünnungsprogramm gestartet. Dies wird so lange wiederholt, bis die Probe sich im gewünschten Konzentrationsbereich befindet. Danach wird das Probenvorbereitungsprogramm gestartet und die Probe in den verschiedenen Analysatoren gemessen. Die Analyseergebnisse werden an ein Prozessleitsystem übergeben. Nach Abschluss aller Messungen werden die Dampfsterilisation und



die Reinigung des Ventils und der Leitungen gestartet. Das Prozessleitsystem verwendet die Analysenergebnisse zur Nachregelung des Prozesses.



**Beispiele:**

Folgende Beispiele belegen die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Probeanalysesystems ohne das System auf diese Anwendung zu begrenzen.

**Beispiel 1**

- 5 Aus einem Bioreaktor wurde mit Hilfe des erfindungsgemäßen Probeventils eine 12 ml Probe von SF9-Insektenzellen entnommen und durch einen Schlauch (1,5 mm Innendurchmesser, 10 m Länge) mit einer Geschwindigkeit von 3 m/min in dem Probeanalysesystems nach Fig. 5 transportiert. Eine Probe wurde per Hand aus dem Bioreaktor entnommen und vermessen, eine Probe wurde mit dem Probenahmeventil entnommen, von der Probetransportvorrichtung in transportiert und vermessen. Mit Hilfe des Analysators CEDEX (Firma Innovatis) wurde dort ermittelt, dass der Anteil der lebenden zu abgestorbenen Zellen vor und nach dem Transport gleich war. Darüber hinaus wurde in der Zellbestimmungsstation (56) mit dem Hilfe des Analysators CEDEX festgestellt, dass der Wiederfindungsrate der Zellen >90% betrug. Hiermit wurde die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Probeanalysesystems zur Entnahme und Transport von lebendigen Zellen bewie-
- 10
- 15 sen.

**Beispiel 2**

- Aus einem Bioreaktor wurde mit Hilfe des erfindungsgemäßen Probeventils eine 10 ml Probe von Hybridomazellen entnommen, welche Antikörper zur Bekämpfung von Tumoren produzieren, und durch einen Schlauch (1,5 mm Innendurchmesser, 5 m Länge) mit einer Geschwindigkeit von 3
- 20 m/min in dem Probeanalysesystems nach Fig. 5 transportiert. Eine Probe wurde per Hand aus dem Bioreaktor entnommen und vermessen, eine weitere Probe wurde mit dem Probenahmeventil entnommen, von der Probetransportvorrichtung in das Prozessanalysesystem transportiert und vermessen. Mit Hilfe des Analysators CEDEX (Firma Innovatis AG) wurde dort ermittelt, dass der Anteil der lebenden zu abgestorbenen Zellen vor und nach dem Transport gleich war. Darüber hinaus wurde in der Zellbestimmungsstation (56) mit dem Hilfe des Analysators CEDEX fest-
- 25 gestellt, dass der Wiederfindungsrate der Zellen >95% betrug. Hiermit wurde die Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Probeanalysesystems zur Entnahme und Transport von lebendigen Zellen bewiesen.



**Patentansprüche**

1. Probenahmeventil zur Entnahme einer Probe eines definierten Volumens aus einem Bioreaktor unter reduzierter mechanischer Beanspruchung der Probe umfassend eine Probenkammer definierten Volumens, ein vorderes Dichtelement und ein hinteres Dichtelement, wobei das  
5 vordere Dichtelement über eine Verbindungswelle in Richtung des Innenraums des Bioreaktors geöffnet und gleichzeitig das hintere Dichtelement gegen die Probenkammer verschlossen wird.
2. Probenahmeventil gemäß Anspruch 1, wobei das Probenahmeventil durch die Betätigung eines Hubzylinders geöffnet wird.
- 10 3. Probenahmeventil gemäß Anspruch 2, wobei der Hubzylinder pneumatisch oder elektrisch angesteuert wird.
4. Probenahmeventil gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei eine Verschlusskraft durch eine Feder, bevorzugt eine Spiralfeder von einer Druckplatte über eine Verbindungswelle auf das hintere Dichtelement übertragen wird.
- 15 5. Probenahmeventil gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zur sicheren Positionierung der Dichtelemente auf der Verbindungswelle eine Führungsstange montiert ist.
6. Probenahmeventil gemäß Anspruch 5, wobei an der Führungsstange eine Membran angebracht ist.
7. Probenahmeventil gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Probenahmeventil an der  
20 Öffnung zum Innenraums des Reaktors durch einen selbstreinigenden Filter vor dem Eindringen größerer Aggregate geschützt ist.
8. Probenahmeventil gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das definierte Volumen 2 bis 200 mL beträgt.
9. Prozessanalyzesystem , umfassend eine Vorrichtung zur Entnahme einer Probe aus einem  
25 Reaktor, eine Probetransportvorrichtung gegebenenfalls eine Aliquotisierungs- und/oder Probevorbereitungsstation und mindestens ein Probenanalysegerät, vorzugsweise Zellzahlbestimmungsgeräte, Chromatographiesysteme, Biosensoren, dadurch gekennzeichnet, dass Vorrichtung zur Entnahme einer Probe ein Probenahmeventil gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 ist.



10. Prozessanalyzesystem gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es an ein Automatisierungssystem, bevorzugt an ein Prozessleitsystem oder eine speicherprogrammierbare Steuerung zur Führung, Steuerung und/oder Regelung des Prozesses in einem Reaktor angebunden ist.
- 5 11. Prozessanalyzesystem nach einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Prozessanalyzesystem über eine Selbstüberwachung verfügt.
12. Prozessanalyzesystem nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Selbstüberwachung die Eigenschaften der Probe mit den Anforderungen der Analysestation vergleicht und eine Vorbereitung der Probe steuert.
- 10 13. Prozessanalyzesystem nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Proben-transportvorrichtung zum Transport von Suspensionen enthaltend mechanisch empfindlichem Material und insbesondere von lebendigen Zellen, Transportleitungen und mindestens ein System zur Beschleunigung der Probe bzw. Aliquote durch die Transportleitung aus mindestens zwei Büretten umfasst, wobei die Büretten mit folgenden Schritten betrieben werden:
- 15 a) eine erste Bürette wird aufgezogen,
- b) kurz bevor die erste Bürette am Anschlag angekommen ist, wird eine zweite Bürette aufgezogen und übernimmt den Transport, wobei die Probe weder eine zusätzliche Beschleunigung noch einen kurzen Zwischenstopp erfährt,
- 20 c) die erste Bürette wird von den Transportleitungen abgekoppelt und wieder entspannt, so dass sie wieder zur Verfügung steht,
- d) Schritte a) bis c) werden wiederholt, wobei die Probe bzw. Aliquote bei einem Durchmesser der Transportleitung von 0.5 bis 3 mm mit einer vordefinierten Transportgeschwindigkeit von 1 bis 10 m/min befördert wird.
- 25 14. Verwendung des Prozessanalyzesystems nach einem der Ansprüche 8 bis 13 zur Steuerung von einem oder mehreren unabhängig voneinander operierenden Reaktoren insbesondere Bioreaktoren mit unterschiedlichen Zelllinien.
15. Prozessanalyzesystem nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Probenanalysegerät biochemische Analyse von Reaktionsprodukten bzw. Nebenkomponenten durchführt.
- 30



16. Verfahren zum Transport Suspensionen enthaltend mechanisch empfindlichem Material und insbesondere von lebendigen Zellen, wobei der Transport durch eine Probetransportvorrichtung beinhaltend Transportleitungen und mindestens ein System zur Beschleunigung der Probe bzw. Aliquote durch die Transportleitung aus mindestens zwei Büretten stattfindet, wobei die Büretten mit folgenden Schritten betrieben werden:
- 5
- a. eine erste Bürette wird aufgezogen,
  - b. kurz bevor die erste Bürette am Anschlag angekommen ist, wird eine zweite Bürette aufgezogen, die den Transport übernimmt, wobei die Probe weder eine zusätzliche Beschleunigung noch einen kurzen Zwischenstopp erfährt,
  - 10 c. die erste Bürette wird von den Transportleitungen abgekoppelt und wieder entspannt, so dass sie wieder zur Verfügung steht,
  - d. Schritte a) bis c) werden wiederholt, wobei die Probe bzw. Aliquote bei einem Durchmesser der Transportleitung von 0.5 bis 3 mm mit einer vordefinierten Transportgeschwindigkeit von 1 bis 10 m/min befördert wird.



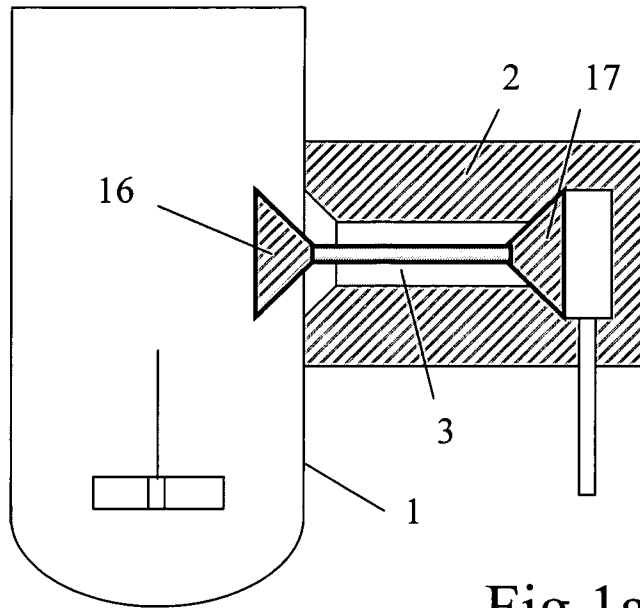
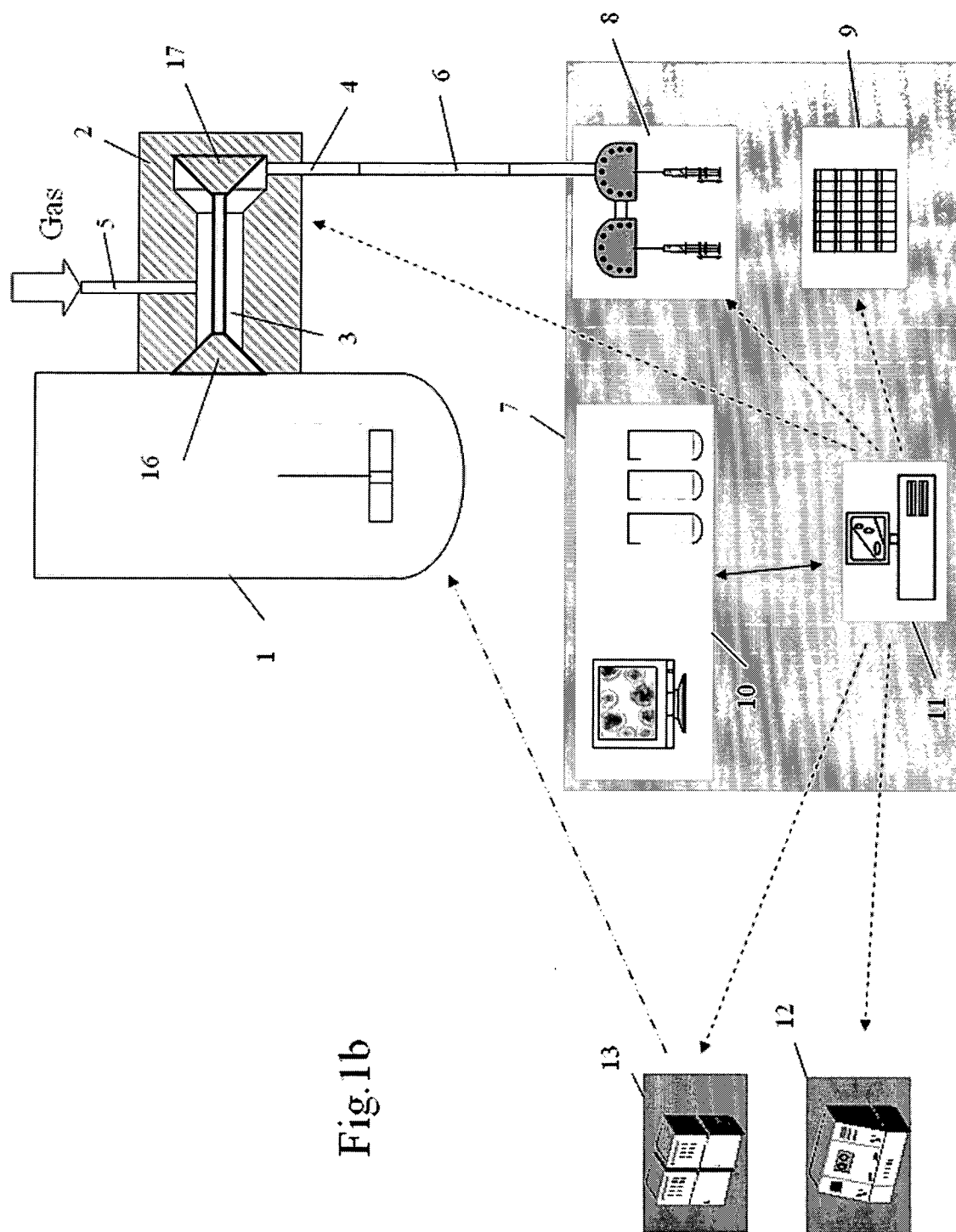


Fig.1a







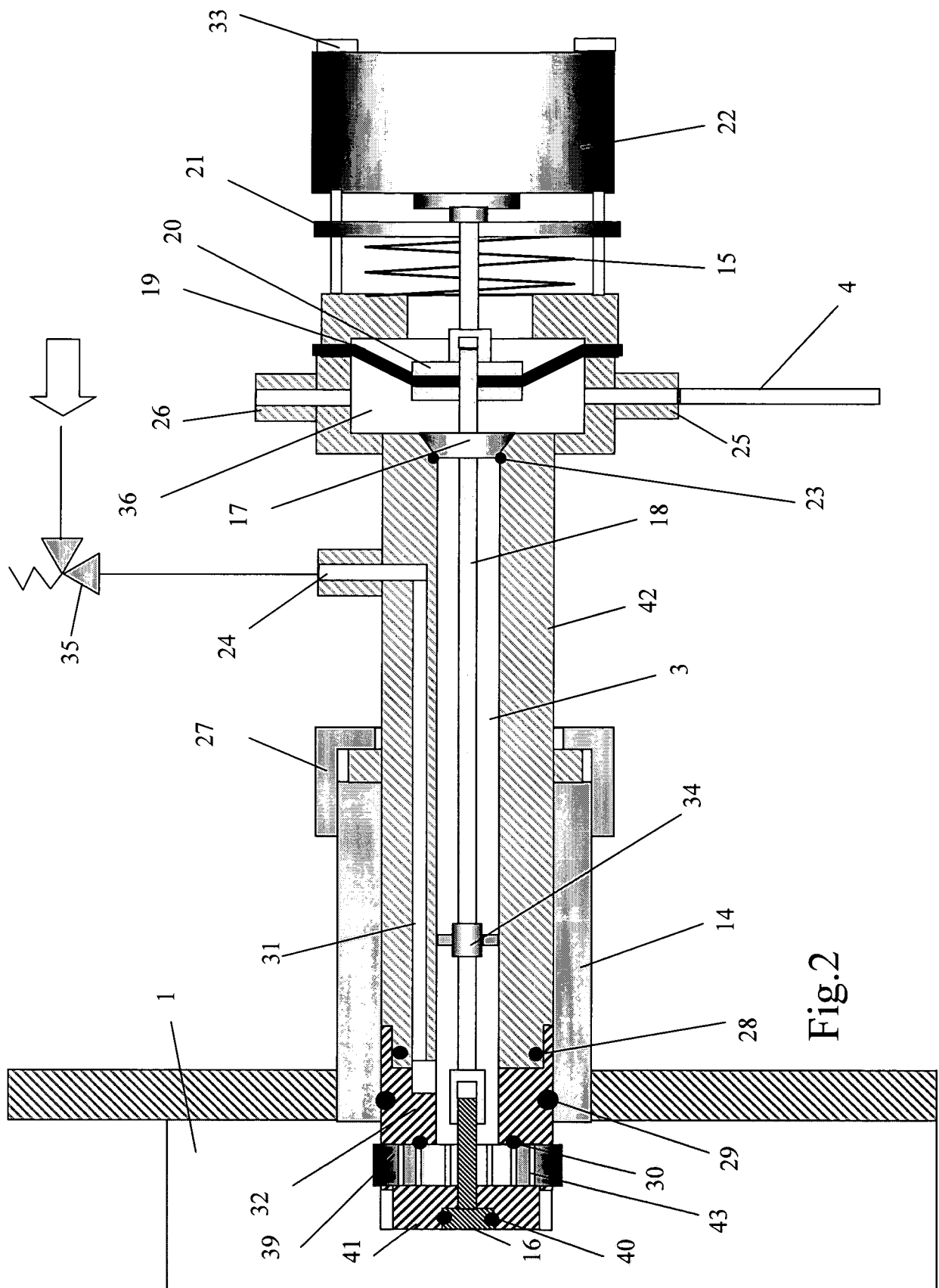


Fig. 2



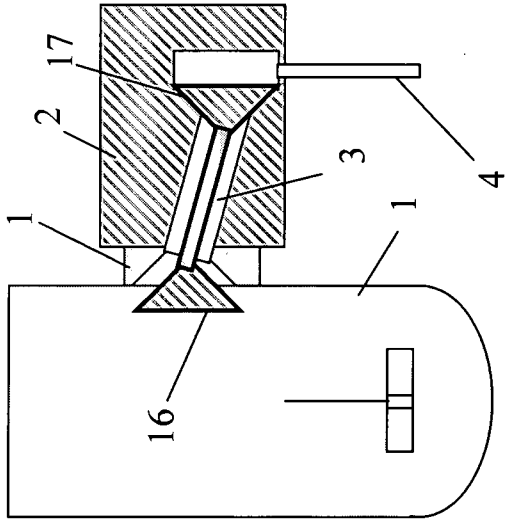
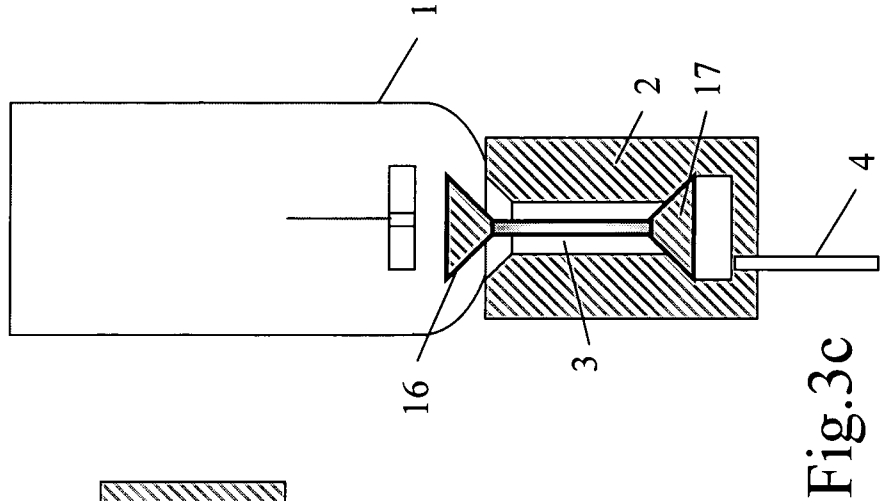


Fig. 3c

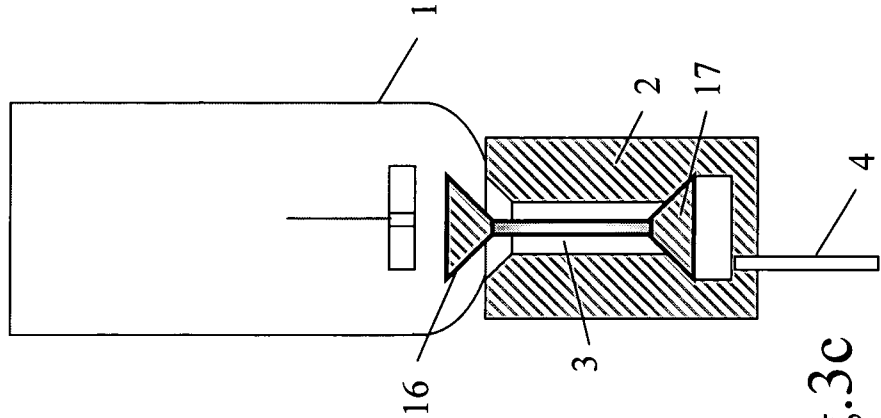




Fig. 4

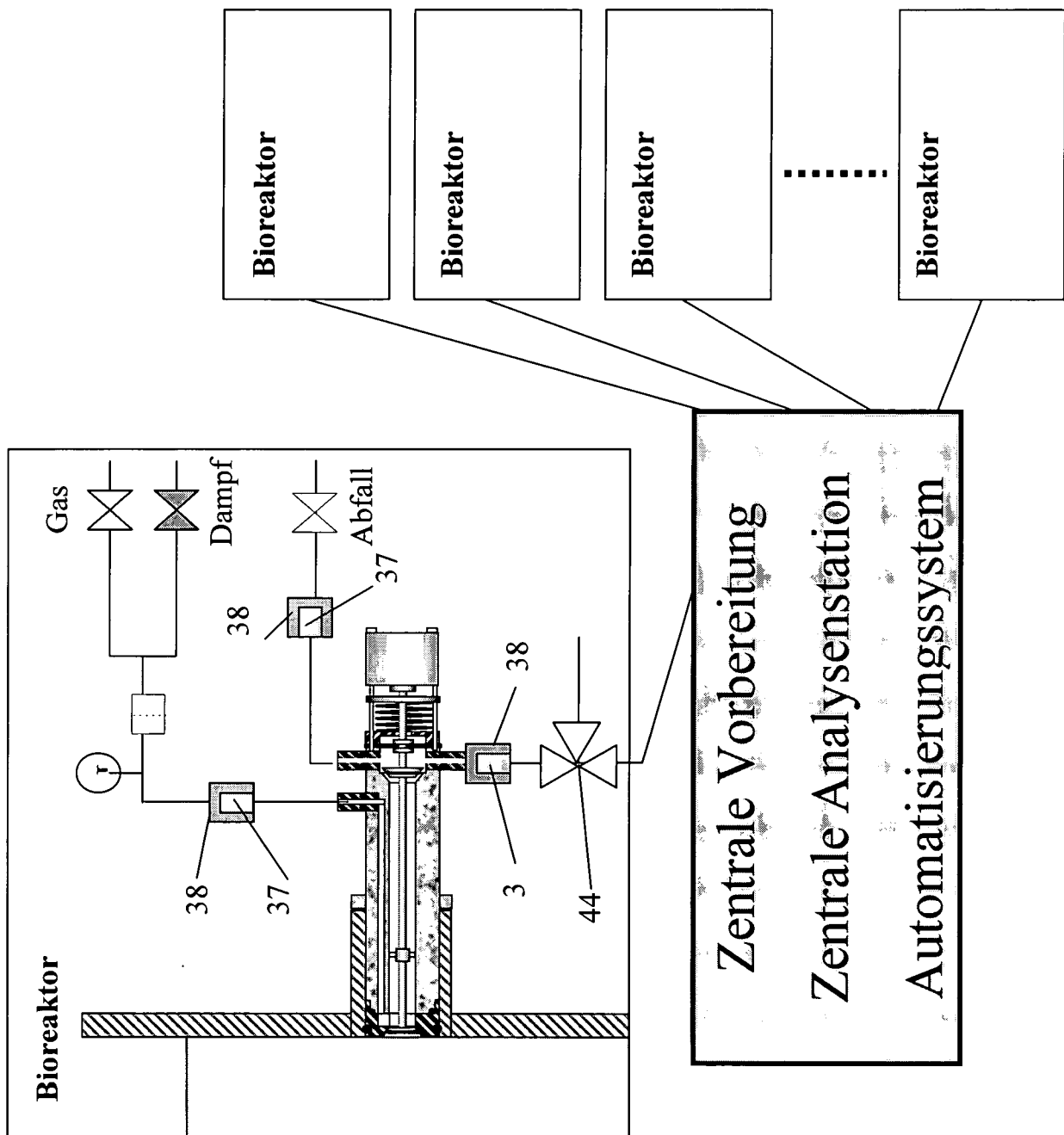




Fig. 5

