

Prozessbegleitende DNA-Analytik

Geregelte Zweiphasenströmung für Lab-on-a-Chip-Anwendungen

Dr. Dorothee M. Runge und Thomas Heinze*)

Präzise arbeitende Dosierpumpen sind Voraussetzung zur automatisierten Analyse im Bereich des Biomanufacturing und dienen so der Verbesserung der Produktqualität sowie der Senkung von Herstellungskosten im Produktionsprozess von Impfstoffen und Medikamenten.

Die Prozessanalytik nutzt klassische chemische, physikalische und mathematische Techniken und Methoden als Werkzeuge, um eine zeitnahe Erfassung kritischer Parameter in Produktions- und Umweltprozessen zu ermöglichen. Der Einsatz solcher Werkzeuge ist besonders attraktiv für die chemische und pharmazeutische Produktion, aber ebenso von Interesse für physikalische und biologische Vorgänge, Landwirtschaft, Lebensmittelproduktion und Medizin. Das Ziel ist in allen Fällen die zeitnahe Bereitstellung der für den Prozess relevanten Daten und Informationen, um präventiv eine optimale Produktqualität zu gewährleisten.

Im Bereich der weißen Biotechnologie setzen sich bioanalytische Methoden zunehmend durch.

Ziel: zeitnahe Analyseergebnisse

Zur Überwachung der Produktion im Bereich Biomanufacturing, wie z.B. der Herstellung von Impfstoffen und Medikamenten, sind in der Regel komplexe molekularbiologische Methoden notwendig, die Ergebnisse jedoch oft nur stark zeitverzögert liefern. Ein Ziel ist es, durch Automatisierung, Miniaturisie-

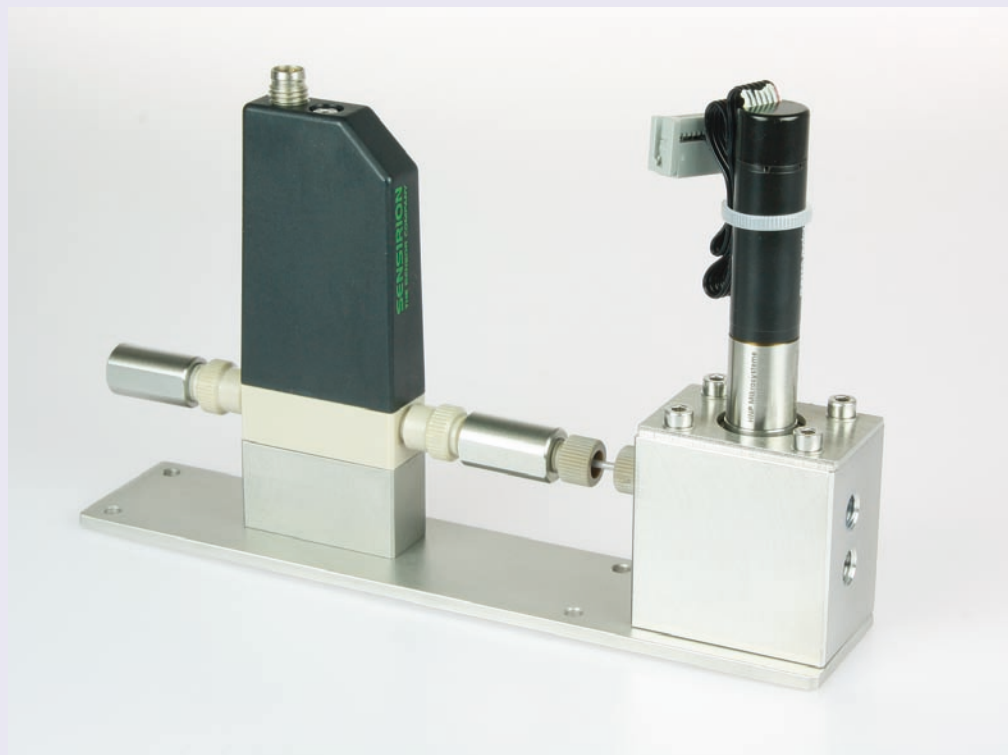


Bild 1: Kombination eines Funktionsmoduls bestehend aus Aufnahmeblock, Filter und Bypass mit Mikrozahnpumpe mzs-2521 und Durchflusssensor zur Erzeugung einer volumenstromgeregelten Zweiphasenströmung für eine kontinuierliche, prozessbegleitende PCR.

*) HNP Mikrosysteme GmbH, Juri-Gagarin-Ring 4, 19370 Parchim, Tel. 03871/451-318, E-Mail: info@hnp-mikrosysteme.de.

rung und optimale Integration zeitnah Ergebnisse zu erhalten, die Rückschlüsse auf den Produktionsprozess und die Produktqualität zulassen. Bei der Herstellung von Impfstoffen im Fermenter oder Wave bag steht die Überwachung der Synthese des gewünschten Produktes bis zur maximal möglichen Konzentration im Vordergrund. Gleichzeitig stellt der Fermentationsprozess mit seinen komplexen und vielfältigen Inhaltsstoffen eine Herausforderung an den gezielten Nachweis des gewünschten Produktes dar.

Der Nachweis geringster Produktmengen mit hoher Spezifität kann durch Einsatz der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) erfolgen, die die genetische Information aus Viren oder Zellen vervielfältigt, um in den nachweisbaren Konzentrationsbereich zu gelangen. Dazu wird das Enzym DNA-Polymerase verwendet. Der Begriff „Kettenreaktion“ beschreibt die Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgangsmaterials erfolgt.

Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Bei der Impfstoffproduktion wird z.B. Virus-DNA aus dem Fermenter als Probenmaterial genutzt. Im Falle der prozessbegleitenden Analytik wird mit Hilfe der PCR die Zunahme an Impfstoff (z.B. Viren) über die Produktionszeit verfolgt und die Produktion gezielt dann gestoppt, wenn die maximale Ausbeute erreicht ist.

Das Gesamtkonzept

Die Entwicklungsarbeit richtet sich auf die Bereitstellung eines automatisierten Analysensystems auf der Basis integrierter mikrosystemtechnischer Module für die DNA-Extraktion und Amplifikation im kontinuierlichen Fluss. Diese Aufgabe soll mit der sterilen Entnahme der Probe aus dem zu überwachenden Fermentationsprozess und mit einer an den Amplifikationschip gekoppelten Detektionseinheit zur Bestimmung der produzierten Wirkstoffmenge kombiniert werden. Dafür werden zu definierten Zeiten homogene Proben aus dem Fermenter entnommen, die DNA isoliert und anschließend der PCR zugeführt, welche kontinuierlich auf einem Bio-Chip durchgeführt wird.

Die DNA wird mit den für die PCR benötigten Chemikalien verdünnt und in Form einer Zweiphasenströmung mit einem Trennmedium in den PCR-Chip gefördert. Diese Art der Probenverar-

beitung ermöglicht ein kontinuierliches, prozessbegleitendes Monitoring mit einer Zeitverzögerung im Bereich bis zu maximal einer Stunde. Zur Erzeugung der Zweiphasenströmung ist die äußerst genaue Dosierung sowohl des Trägermediums als auch der DNA/PCR-Lösung notwendig. Diese anspruchsvolle Dosieraufgabe wird mit zwei Mikrozahnringspumpen mzt-2521 aus der Niederdruckreihe der HNP Mikrosysteme GmbH gelöst. Die Volumenströme der Pumpen werden jeweils mittels eines Durchflusssensors kontrolliert und bei Abweichung vom Sollwert nachgeregelt.

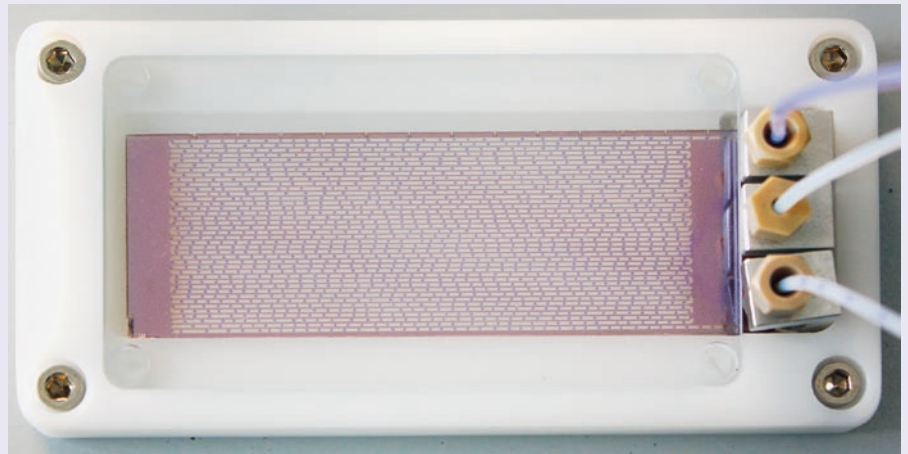


Bild 2: Zweiphasenströmung aus wässriger Phase und Trennmedium in einem PCR-Chip.

Mit einem definierten Volumenstrom von wenigen $\mu\text{l}/\text{min}$ wird die im Zweiphasenstrom fragmentierte Probe kontinuierlich über die verschiedenen Temperaturzonen des Chips gefördert und so die Virus-DNA vervielfältigt, bis sie durch eine Detektionseinheit quantifizierbar ist. Das Ergebnis dieser Analyse ermöglicht die Abbildung der Konzentrationszunahme des Medikaments/ Impfstoffs im Fermenter.

Die Prozesskette der integrierten Nukleinsäure-Analytik ist im Wesentlichen abhängig von einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom, dessen kennzeichnende physikalische Parameter Druck, Temperatur und Strömungsgeschwindigkeit sind. Zur Erzeugung der Zweiphasenströmung wurden verschiedene Systemkonfigurationen und Regelstrategien getestet.

Ungeregelte Zweiphasenströmung

In einem ersten Ansatz wurden zwei Pumpenmodule bestehend aus Mikrozahnringspumpe, Filter und Rückschlagventil eingesetzt, um mittels getakteter Medienförderung eine Zweiphasenströ-

mung zu erzeugen. Dazu wurde die Probe, eine wässrige Lösung, kontinuierlich, das Trägermedium, z.B. Tetradekan oder Silikonöl, diskontinuierlich gefördert. Zur Aufrechterhaltung einheitlicher Abstände zwischen den Probenabschnitten wurde bei zunehmendem Füllgrad des Chips eine aufwendige Anpassung der Förderdrehzahlen erforderlich.

Bei der unregelmäßigen Erzeugung von Zweiphasenströmungen führen Änderungen der physikalischen Parameter zu einer Veränderung der Phasenlängen der zwei geförderten Medien und

zu Veränderungen der Fließgeschwindigkeit, der nur mit einer komplexen Anpassung der Förderdrehzahlen entgegengewirkt werden kann. Damit erweist sich dieser Ansatz als ungeeignet für den praktischen Einsatz.

Volumenstromgeregelte Zweiphasenströmung

In einem zweiten Ansatz wurde ein volumenstromgeregeltes Fördersystem bestehend aus zwei Funktionsmodulen mit Mikrozahnringspumpe, Filter und Rückschlagventil entwickelt. Die Überwachung der Pumpen erfolgte jeweils mittels eines Volumenstromsensors. Dieses System ermöglicht die Erzeugung einer stabilen Zweiphasenströmung über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen entsprechend den Anforderungen eines Fermentationsprozesses.

Die Regelung des Volumenstroms bei der Erzeugung und Aufrechterhaltung der Zweiphasenströmung wirkt der Veränderung der Druckverhältnisse im Amplifikationschip – bedingt durch unterschiedlichen Füllgrad, verschiedene Anteile der beiden Medien im Chip über die Zeit und Viskositätsänderungen

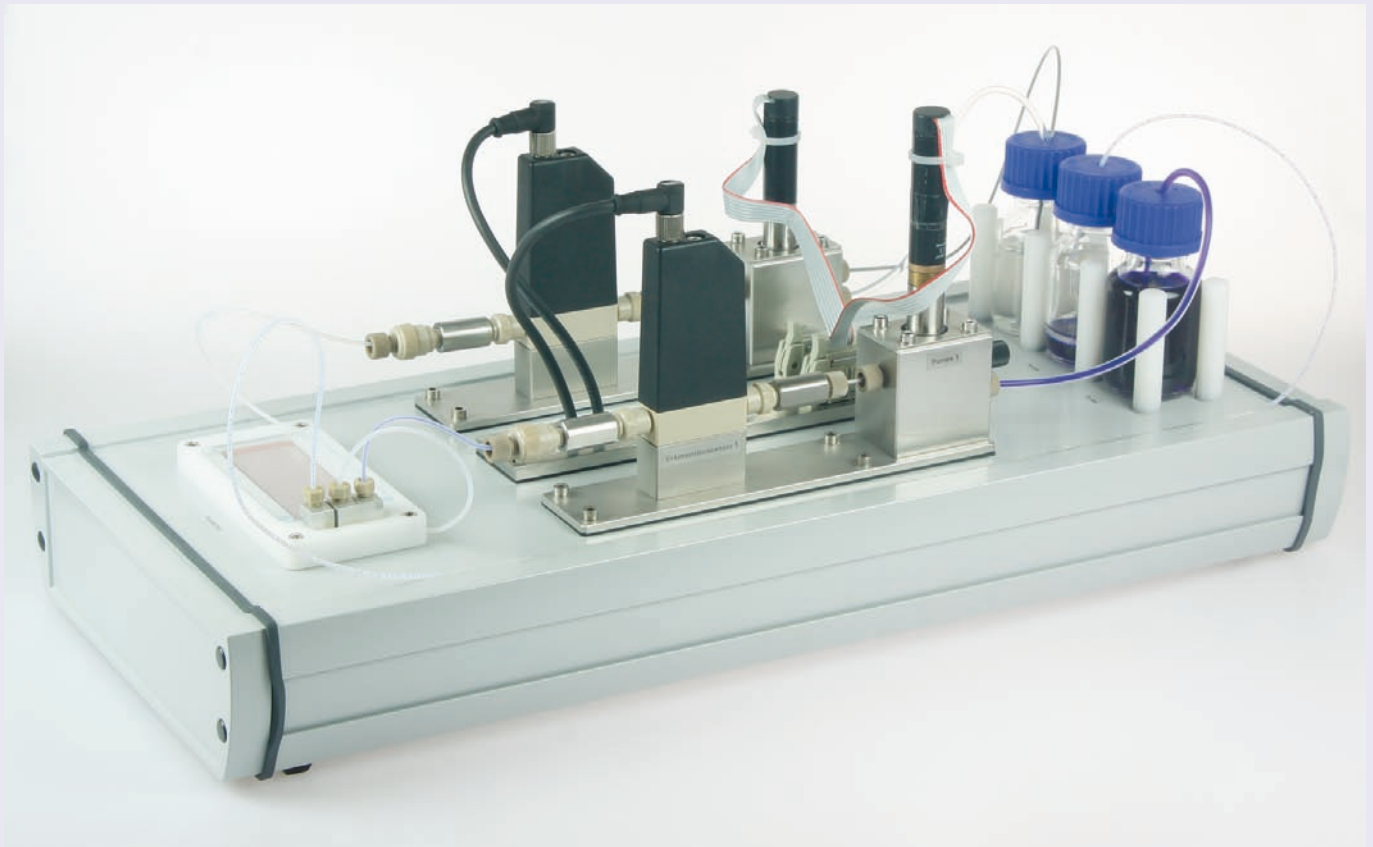


Bild 3: Aufbau zur Erzeugung einer volumenstromgeregelten Zweiphasenströmung zur Durchführung einer kontinuierlichen, prozessbegleitenden PCR.

durch unterschiedliche Temperaturzonen – entgegen.

Wie bei allen empfindlichen Prozessen sind der passende Versuchsaufbau und die Auswahl geeigneter Komponenten entscheidend für eine erfolgreiche Durchführung. Bei der beschriebenen Methode stellt sich die Auswahl der geeigneten Dosierpumpe als essenziell heraus. Die verwendeten Mikrozahnringpumpen zeichnen sich durch hohe Leistungsfähigkeit, hohe Präzision und geringe Pulsation aus. Die geringe Pulsation ist für die Erzeugung der Zweiphasenströmung besonders wichtig, da nur so ein kontinuierlicher Strom über längere Zeiträume aufrechterhalten werden kann.

Kompakte Systemlösung

Die Integration von Mikrozahnringpumpen in Funktionsmodule bietet kompakte Lösungen, die je nach Aufgabe mehr oder weniger komplex ausfallen können. Die einfachste Kombination ist die eines Filterelements und einer Mikrozahnringpumpe in einem Aufnahmeblock, der mit geringem Aufwand in komplexe Abläufe integriert werden kann. Die nächste Stufe ist die Integration eines 2/2-Wegeventils, mit dem

die nahezu rückstoßfreie Absperrung der Fluidleitung erfolgt. Dieses Funktionsmodul bestehend aus Filter, Pumpe und Ventil ist besonders gut für hochgenaue Pipettieraufgaben geeignet.

Für die Förderung kleinster Volumenströme ist ein weiteres Funktionsmodul mit Filter und Bypass vorgesehen. Der integrierte Volumenstromteiler teilt das Medium in einen Haupt- und Nebenstrom auf, wobei nur der deutlich kleinere Nebenstrom von wenigen $\mu\text{l}/\text{h}$ zur Analyse verwendet wird. Zur Überwachung von kleinsten Volumenströmen lässt sich dieses Funktionsmodul mit einem Durchflusssensor ausstatten und somit eine hohe Prozesssicherheit gewährleisten.

Durch die Kombination von Probenahmegegeräten mit direktem Kontakt zum Bioreaktor mit geeigneten Offline-Probenaufbereitungs- und Analyseinstrumenten können auch komplexe Analyseaufgaben gelöst werden. Offline-Analytik reduziert sich nahezu auf die Analysezeit, wodurch gewonnene Parameter mit geringer Zeitverzögerung zur Prozesssteuerung herangezogen werden können. Dabei werden neue Methoden der Prozesssteuerung und Qualitätssicherung biotechnologischer Prozesse im Sinne der PAT-Initiative (process analytical technology in-

itiative) der FDA möglich. PAT-Systeme sehen die zeitnahe Analyse kritischer Qualitätsparameter vor, damit sowohl die Produktqualität verbessert als auch die Herstellungskosten gesenkt werden können.

Danksagung:

Die dargestellten Versuchsergebnisse wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 16SV3528 gefördert.

Mikropumpen-Modul **» 49**

HNPM, Parchim,
Tel. 03871/451-300, Fax 451-333,
www.hnp-mikrosysteme.de