



(10) **DE 10 2020 002 256 A1** 2021.10.14

(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2020 002 256.1**
(22) Anmeldetag: **09.04.2020**
(43) Offenlegungstag: **14.10.2021**

(51) Int Cl.: **G01N 21/25 (2006.01)**
G01N 21/31 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01J 3/28 (2006.01)

(71) Anmelder:
**Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37079
Göttingen, DE**

(72) Erfinder:
**Hoehse, Marek, 37073 Göttingen, DE; Graf,
Alexander, 89073 Ulm, DE; Grimm, Christian,
37308 Heilbad Heiligenstadt, DE**

(74) Vertreter:
**Müller-Boré & Partner Patentanwälte PartG mbB,
80639 München, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

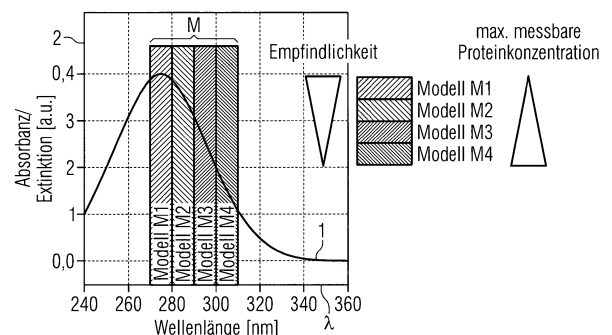
US	6 087 662	A
US	5 532 487	A
WO	01/ 02 088	A1

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Prozesssteuerung/-regelung auf Basis einer spektroskopischen Bestimmung unbestimmter Substanzkonzentrationen**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses (3), insbesondere eines Downstream-Bioprozesses, basierend auf der Vorhersage einer unbekanntem Konzentration von mindestens einer Substanz in einer Probe (5_a, 5_b) mittels Spektroskopie, insbesondere UV/vis-Spektroskopie, umfassend die Schritte: Erfassung (101) von Spektren (1) einer Mehrzahl von Konzentrationsproben, wobei mindestens zwei Konzentrationsproben mit unterschiedliche Konzentrationen der Substanz aufweisen; Generierung (102) mehrerer quantitativer Modelle (M) auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben, wobei die Modelle (M) jeweils eine Zuordnung zumindest einer spektralen Messgröße (2) der Spektren (1) zu Konzentrationen in Konzentrationsbereichen aufweisen, wobei die Konzentrationsbereiche zweier Modelle (M) nicht identisch sind; Erfassung (103) mindestens eines Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) der Probe (5_a, 5_b); Zuordnung (104) des Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) zu mindestens einem quantitativen Modell (M) der generierten quantitativen Modelle (M); Anwendung (105) des mindestens einen quantitativen Modells(M), welches dem Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) zugeordnet wurde, auf das Probenspektrum (1; 1_a, 1_b), um einen Vorhersagewert für die unbestimmte Konzentration zu ermitteln; und Steuern und/oder Regeln (108) des Prozesses (3) bezüglich mindestens eines Parameters auf Basis des Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Vorrichtung und ein Computerprogrammprodukt zum Bestimmen einer unbestimmten Konzentration von mindestens einer Substanz, insbesondere einer biologischen Substanz wie beispielsweise eines Proteins oder einer DNA in einer Probe mittels Spektroskopie, insbesondere mittels UV/vis-Spektroskopie oder mittels Infrarot-, Raman- und/oder Fluoreszenzspektroskopie.

[0002] Bevorzugt kann die Erfindung realisiert werden in der breiten Bioprozessindustrie, einschließlich der Bereiche von Umwelt-, Agrar- und Lebensmittelindustrie, Biokraftstoffe und Pharmazeutika.

[0003] In Reinigungsschritten, insbesondere in Downstream-Prozessen, die in der Regel zur Abtrennung und Reinigung von Fermentationsprodukten aus einer Fermentationsbrühe eines biotechnologischen Prozesses angewandt werden, sind Konzentrationen von Substanzen, insbesondere Protein- und DNA-Konzentrationen wichtige Parameter bzw. Größen, die in der gesamten Prozesskette verfolgt und immer wieder bestimmt werden müssen. Diese Bestimmung erfolgt meist offline, insbesondere als Stichprobe außerhalb des Behälters, in dem eine Fermentationsbrühe chemische und/oder biochemische Prozesse durchläuft und nicht in Echtzeit. Eine Fermentationsbrühe kann beispielsweise als biotechnologisches Medium verstanden werden, insbesondere als ein Produkt, das ein Medium sein kann, welches zumindest ein Protein und/oder ein Vaccin und/oder ein Hormon aufweist.

[0004] Die Bestimmung bzw. Messung der Konzentrationen von Substanzen erfolgt oft mittels optischer Spektroskopie, insbesondere mittels UV/vis-Absorptionsspektroskopie. In der Regel werden dazu die Moleküle der Substanz einer Probe der Fermentationsbrühe mit einzelnen, insbesondere im Wesentlichen vorher festgelegten diskreten Wellenlängen, die Anregungswellenlängen bzw. Anregungsfrequenzen entsprechen, angeregt und die Absorbanz bzw. Extinktion oder alternativ die Intensität wird bei diesen im Wesentlichen diskreten Anregungswellenlängen bestimmt, um die Konzentration zu ermitteln. Beispielsweise werden dazu oft schmalbandige Sensoren verwendet. Die Sensoren müssen jedoch nicht zwingend schmalbandig sein. Meistens ist die Anregung bei Sensoren im Wesentlichen schmalbandig wohingegen der Wellenlängenbereich relativ breit detektiert bzw. erfasst werden kann. In anderen Worten wird einerseits nur das schmalbandige Licht zur Anregung verwendet wird wohingegen der gemessene oder messbare Wellenlängenbereich relativ breit sein kann. Bei Spektrometern mit solchen Sensoren wird oft ein dispersives Element, wie beispielsweise ein Gitter, ein Prisma, etc. verwendet.

[0005] In Spektrometern, die dazu ausgelegt sind, spektrale Information zu erfassen, werden hingegen i.d.R. breitbandig emittierende Lichtquellen (auch breitbandige Lichtquellen genannt) und entsprechend breitbandig detektierende Sensoren (auch breitbandige Sensoren genannt) verwendet. Eine breitbandige Lichtquelle kann z.B. eine Deuterium-Lichtquelle oder eine Halogenlichtquelle sein.

[0006] In unterschiedlichen Stufen der Aufreinigung bzw. in unterschiedlichen Prozessschritten können sich die Substanz- insbesondere die Proteinkonzentrationen erheblich unterscheiden. Die Werte für Substanzkonzentrationen können beispielsweise zwischen etwa 0 und etwa 200 g/l variieren. Oft ist die Hardware, beispielsweise die Messzelle oder der Sensor nicht für alle Teilbereiche der erreichten Konzentrationen geeignet. Beispielsweise erlauben viele verfügbare Online Sensoren aufgrund des limitierten dynamischen Bereichs der Detektoren nur eine Bestimmung von Substanzkonzentrationen bis etwa 10 g/l. Hinzu kommt, dass die optische Weg- bzw. Pfadlänge je nach Konzentrationsbereich angepasst werden muss, um ggf. den Detektionsbereich verschieben zu können bzw. um auch andere Substanzkonzentrationen messen zu können. Somit kann ggf. nicht ein und dieselbe Hardware, insbesondere nicht dieselbe Messzelle für alle Anwendungen, insbesondere für alle Reinigungsschritte genutzt werden.

[0007] Darüber hinaus können UV-Sensoren oft eine erhebliche unerwünschte Kreuzempfindlichkeit zwischen DNA und Protein aufweisen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn eine Erhöhung der DNA-Konzentration zu einer vermeintlich höheren gemessenen Proteinkonzentration führt. Beispielsweise kann es vorkommen, dass eine Absorptionsbande für DNA mit einer Absorptionsbande für ein Protein überlappt. Da die Banden nicht isoliert vorliegen und mittels Sensoren nicht separat und unabhängig erfasst werden können, besteht das Problem oft darin, eindeutig zu unterscheiden und zu identifizieren, welche Substanzen (hier das Protein oder die DNA) sich in welchem Ausmaß bezüglich Konzentration verändert hat.

[0008] Es gibt Online-UV-Sensoren, die mit 1 oder 2 einzelnen Wellenlängenbereichen arbeiten (Optek, Pendotech), die aber bereits bei relativ niedrigen Proteinkonzentrationen gesättigt sind. In Spektrometern, die dazu ausgelegt sind, relativ breite spektrale Information zu erfassen, werden hingegen oft breitbandige Sensoren verwendet. Ein UV-Vis Spektrum kann entsprechend neben der Information typischer UV-Sensoren eine Vielzahl weiterer Anregungswellenlängen bzw. -frequenzen aufweisen. In anderen Worten kann ein Spektrum, das von einer Lichtquelle emittiert wird, durchaus breiter bzw. umfangreicher sein, als der Teil, der von dem Sensor gemessen bzw. erfasst wird. Dabei kommt es auf die Wahl Sen-

soren und der Lichtquelle(n) an. Solche UV/vis-Spektrometer können entsprechend ein oder etwa zwei (unter Umständen auch mehrere) Lichtquellen umfassen, die entsprechend ein oder zwei Anregungswellenlängen erzeugen. Entsprechend der Tatsache, dass z.B. zwei schmalbandig emittierende Lichtquellen verwendet werden können, können entsprechende Sensoren jeweils dazu ausgelegt sein in dem Wellenlängenbereich, das von Interesse ist, elektromagnetische Strahlung zu erfassen. So können UV-Sensoren wenige schmalbandige Anregungswellenlängen erfassen, insbesondere eine oder zwei, die jeweils etwa 10 nm in der Wellenlängenbreite aufweisen. Beispielsweise können die zentralen Wellenlängen, also die Wellenlängen, bei denen das Maximum liegt, bei etwa 250 nm und/oder etwa 280 nm liegen.

[0009] Es kann unter Umständen vorkommen, dass das Nutzsignal in die Sättigung läuft. Ein Problem, das sich durch die Sättigung ergibt ist das Verhalten der Absorbanz bei einer definierten Wellenlänge und einer festen optischen Weglänge. Diesem Zusammenhang liegt das Lambert-Beer-Gesetz zugrunde:

$$A = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

[0010] Wobei A der Absorbanz entspricht, I_0 der Intensität des einfallenden Lichtes entspricht, I der Intensität des Lichtes, welches die Probe passiert entspricht, ε_λ dem dekadischer Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge λ entspricht, c der Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz entspricht und d der Schichtdicke der Probe bzw. der Weglänge des Lichtes durch die Probe entspricht.

[0011] Das Problem der Sättigung tritt insbesondere bei hohen Absorbanzen A auf, da auf dem Messkanal die Intensität I bei hohen Konzentrationen c extrem klein wird und damit ggf. nicht mehr vom Rauschen des Detektors unterscheidbar ist. Daher geht bei hohen Konzentrationen c die Intensität I gegen null und damit wird A groß und das Verhalten des Nutzsignals A geht in einen nichtlinearen Sättigungsverlauf wegen des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) des Detektors.

[0012] Darüber hinaus können unterschiedliche Substanzen, insbesondere unterschiedliche Proteine Absorptionsbanden aufweisen, die jeweils im Wesentlichen zentriert um unterschiedliche Anregungswellenlängen ein Maximum aufweisen. In anderen Worten kann die zentrale Wellenlänge einer Absorptionsbande bzw. eines Absorptionsmaximums für verschiedene Proteine variieren. In der Regel passen die handelsüblichen UV/vis-Spektrometer die Anregungs- und/oder Detektionswellenlänge nicht an den aktuell zu messenden Substanzen insbesondere das aktuell zu messende Protein an. Somit unterliegt es

dem Zufall, ob ein Protein zufällig im Maximum oder in der Nähe des Maximums der Absorptionswellenlänge gemessen wird bzw. ob die Moleküle eines Proteins mit der Anregungswellenlänge angeregt werden, um das die Absorptionsbande des Proteins zentriert ist bzw. zu dieser Anregungswellenlänge ein Maximum aufweist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann die zuvor festgelegte Anregungswellenlänge jedoch jenseits des Wellenlängenbereichs liegen, bei dem die Absorptionsbande ein Absorptionsmaximum aufweist. Beispielsweise kann die zuvor festgelegte Anregungswellenlänge mit einem Flankenbereich einer Absorptionsbande überlappen.

[0013] Das Maximum ist insbesondere dann entscheidend bzw. relevant, wenn man zu geringeren Konzentrationen (kleinerer LOD) tendiert werden soll. Ein besseres Dynamikverhalten liegt jedoch meist auf der Flanke vor.

[0014] Ein Flankenbereich, also ein Wellenlängenbereich, für den die Absorption zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen um das Absorptionsmaximum abflacht, weist üblicherweise eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Änderungen in der Konzentration auf. Das Maß der Kreuzempfindlichkeit hängt darüber hinaus auch insbesondere von den wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ε_λ des Zielproteins und der Verunreinigungen (HCP) zusammen und deren Konzentrationsverhältnis. Aus diesem Grund werden oft Absorptionswerte von host cell Proteinen (HCPs) zusammen mit denen für Zielproteine erfasst (Kreuzempfindlichkeit ist nahe 100%) und eine Isolierung der jeweiligen Beiträge beider Absorptionswerte zur Analyse der jeweiligen Konzentration beider Substanzen ist kaum möglich.

[0015] Ein Ansatz, der dazu führt, dass ein breiter Bereich verschiedener Konzentrationen mittels UV/vis-Spektroskopie gemessen werden kann, umfasst eine reversible Änderung der optischen Weglänge durch eine Messzelle, welche die Probe beinhaltet. Dabei wird bei der Transmissionsmessung von UV/vis-Spektren eine Faser beweglich gestaltet, sodass die optische Weglänge reproduzierbar variiert werden kann (FlowVPE). Somit kann eine optische Weglänge auch weitaus kleinere Werte aufweisen als die bei UV-Sensoren übliche minimale Pfadlänge von etwa 1 mm. Auf diese Weise lassen sich auch Substanzkonzentration, insbesondere Proteinkonzentrationen über 100 g/l erfassen. Dieser Ansatz hat zur Folge, dass es bewegliche Teile in der Vorrichtung gibt und der Abstand zwischen den Fasern hoch präzise und reproduzierbar einstellbar sein muss. Kleinere Pfadlängen haben jedoch den Nachteil, dass hohe Konzentrationen meist mit hohen dynamischen Viskositäten einhergehen, was unter Umständen einen Nachteil für die Fluidik (inkl. Druckabfall, Scherströmungen etc.) darstellen kann.

[0016] Gemäß einem Aspekt besteht die Aufgabe in der Bereitstellung eines Verfahrens, einer Vorrichtung und einem Computerprogrammprodukt zur Bestimmung einer unbestimmten Konzentration von mindestens einer Substanz in einer Probe über einen großen Konzentrationsbereich.

[0017] Die Aufgabe wird durch den Gegenstand der jeweiligen Hauptansprüche gelöst.

[0018] Bevorzugte Ausführungsformen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

[0019] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Generierung quantitativer Modelle, insbesondere auf multivariater Datenanalyse. Wesentliche Konzepte multivariater Datenanalyse, wie beispielsweise PLS, OPLS, multivariate Kalibrierung, multivariate Prozessmodellierung, hierarchisches Modellieren usw. werden in dem Fachbuch „Multi- and Megavariate Data Analysis - Basic principles and Applications“ (3rd Edition) von L. Eriksson et al. detailliert beschrieben.

[0020] Die folgenden Aspekte lassen sich in unterschiedlichen Ausführungsformen, auch falls nicht explizit genannt, miteinander kombinieren, sofern sie sich nicht gegenseitig logisch ausschließen.

[0021] Gemäß einem Aspekt umfasst ein Verfahren zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses, insbesondere eines Downstream-Bioprozesses, basierend auf der Vorhersage einer unbekanntem bzw. unbestimmten Konzentration von mindestens einer Substanz in einer Probe bzw. in einem Medium mittels Spektroskopie, insbesondere mittels UV/vis-Spektroskopie, die Schritte:

Erfassung von Spektren, insbesondere von optischen Spektren, bevorzugt von Absorptionsspektren und/oder Anregungsspektren einer Mehrzahl von Konzentrationsproben wobei mindestens zwei Konzentrationsproben zueinander unterschiedliche Konzentrationen der Substanz aufweisen;

Generierung mehrerer quantitativer Modelle auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben, wobei die Modelle jeweils eine Zuordnung und/oder eine Auftragung zumindest einer spektralen Messgröße der Spektren zu Konzentrationen in Konzentrationsbereichen umfassen, wobei die spektrale Messgröße insbesondere eine Absorbanz und/oder eine Intensität der Spektren umfasst und wobei die Konzentrationsbereiche zweier Modelle nicht identisch sind, insbesondere überlappen zwei Konzentrationsbereiche oder grenzen aneinander an;

Erfassung mindestens eines Probenspektrums der Probe bzw. des Mediums; Zuordnung des Probenspektrums zu mindestens einem quanti-

tativen Modell der generierten quantitativen Modelle;

Anwendung des mindestens einen quantitativen Modells, welches dem Probenspektrum zugeordnet wurde, auf das Probenspektrum, um einen Vorhersagewert für die unbestimmte Konzentration zu ermitteln; und

Steuern und/oder Regeln des Prozesses bezüglich mindestens eines Parameters auf Basis des Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

[0022] Eine unbestimmte Konzentration betrifft vorliegend insbesondere eine unbekanntem oder noch nicht mittels Referenzanalytik ermittelte Konzentration. Die Vorhersage mittels des Verfahrens erzielt insbesondere eine Bestimmung der Konzentration.

[0023] Anders als in üblichen Verfahren, in denen lediglich Absorptionswerte zu diskreten Wellenlängen erfasst werden, können unter diesem Aspekt eine ganze Reihe bzw. ein Satz von Absorptionswerten zu einem Wellenlängenbereich aufgezeichnet werden. Insbesondere werden ganze Spektren, insbesondere Absorptions- oder Intensitätsspektren von Verdünnungsproben einer Verdünnungsreihe und einer Probe aufgezeichnet bzw. erfasst. In anderen Worten werden Spektren, beispielsweise ein Absorptionsspektrum statt einzelne Werte wie beispielsweise eine Absorbanz zu einer Anregungswellenlänge aufgezeichnet.

[0024] Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass eine einzige Messzelle mit einer konstanten optischen Weglänge für die Messungen verwendet werden kann. Insbesondere eignet sich eine Flusszelle mit konstanter optischer Weglänge. Besonders bevorzugt ist dabei eine Flusszelle, die eine Probenschichtdicke bzw. eine optische Weglänge bzw. eine Breite des Innenraums zwischen etwa 10 µm und etwa 10 cm, insbesondere zwischen etwa 15 µm und etwa 5 mm und besonders bevorzugt zwischen etwa 50 µm und etwa 3 mm aufweist. Eine besonders bevorzugte Probenschichtdicke liegt bei etwa 1 mm. Dies hat den Vorteil, dass eine oder mehrere Proben mit ein und derselben Messzelle mehrmals bzw. wiederholt untersucht werden kann.

[0025] Je nachdem, welcher Prozess überwacht werden soll, kann das Verfahren für das jeweilige zu untersuchende Medium umfassend die in Frage stehende Substanz adaptiert werden. Das Verfahren kann insbesondere Anwendung zur Überwachung eines Downstream-Prozesses finden. Alternativ oder zusätzlich kann das Verfahren auch Anwendung zur Überwachung einer Fermentation und/oder eines Upstream-Prozesses finden.

[0026] Bei einer Fermentation, die Teil eines Upstream-Prozesses sein kann, bietet sich beispielsweise an, die Fermentationsbrühe innerhalb eines Bioreaktors zu überwachen. Bei einem Downstream-Prozess bietet sich beispielsweise an, die zu trennende und/oder das zu reinigende Medium, beispielsweise die fermentierte Brühe mit dem Zielprotein und/oder der Ziel-DNA in einem Reinigungsschritt, beispielsweise vor, an, in und/oder hinter einer Filtrationsanlage und/oder einer Dialyseeinheit zu überwachen.

[0027] Beispielsweise kann das Verfahren besonders vorteilhaft zur Analyse eines Mediums, insbesondere eines fluiden Mediums in einem SU Bioreaktor ausgeführt werden, sofern ein Prozess in dem Bioreaktor überwacht werden soll. Ein solcher SU Bioreaktor, der beispielsweise einen SU Beutel und/oder einen anderen SU Behälter und/oder einen Schlauch mit Durchflussmesszelle, bevorzugt eine SU-Flusszelle aufweisen kann, beinhaltet insbesondere eine Fermentationsbrühe, die chemische und/oder biologische und/oder biochemische Prozesse durchläuft. Die Fermentationsbrühe wird anschließend im Downstream, bevorzugt bei der Aufreinigung überwacht. Zur Überwachung der Vorgänge bzw. Prozesse innerhalb des Behälters wird der Inhalt zeitlich wiederholt analysiert und/oder zeitweise permanent analysiert.

[0028] Ein Behälter kann dazu beispielsweise mit einem Sensor ausgestattet sein. Alternativ oder zusätzlich kann ein Behälter mit einer Bypassleitung oder Probenahmeleitung und einer Flusszelle ausgestattet sein. Alternativ oder zusätzlich kann an dem Behälter ein Wandungsvorsprung mit Messbereich angeordnet bzw. vorgesehen sein. An der Flusszelle und/oder an dem Wandungsvorsprung kann direkt oder indirekt ein Spektrometer angeordnet sein, welches dazu ausgelegt ist, wiederholt oder dauerhaft bzw. permanent Daten, insbesondere Absorptionmesswerte zu erfassen. So können über einen längeren Zeitraum, beispielsweise über viele Stunden Spektren erfasst werden, um die Prozesse über diesen Zeitraum zu verfolgen. Beispielsweise kann somit die Konzentration eines Proteins und/oder einer DNA verfolgt und/oder überwacht werden.

[0029] In einem System zur Produktaufreinigung, insbesondere zur Proteinaufreinigung können beispielsweise folgende Downstream-Schritte vorkommen:

1. Zellabtrennung (Clarification)
2. Product capture (bind & elute)
3. Polishing Schritte (Kationen- und/oder Anionenaustauschchromatographie und/oder Größenausschlusschromatographie)
4. Aufkonzentrierungen und/oder Pufferaustausch, wie z.B. Ultra- und/oder Diafiltration im Crossflow setup.

5. Abreicherung von Viren, durch einen Filtrationsschritt und/oder Inaktivierung von Viren z.B. durch pH-Shift oder UV-C Behandlung,...

6. Sterilfiltration

7. Füllprozesse (incl. Freeze and Thaw)

[0030] Darüber hinaus besteht ein Vorteil dieses Aspekts darin, dass verschiedene Substanzen bzw. Stoffe isoliert voneinander analysiert werden können, sofern deren Banden ihr lokales Absorptions- oder Intensitätsmaximum nicht bei identischen Wellenlängen aufweisen. Unterscheidet sich beispielsweise das Absorptionsmaximum eines „host cell proteins“ (HCPs) in seiner Anregungswellenlänge und/oder in seiner Form von dem des Zielproteins, so kann mittels der Erfassung eines gesamten Spektrums eine analytische Unterscheidung ermöglicht werden. Bei der Unterscheidung kommt es jedoch im Wesentlichen auch auf das Absorptionsspektrum im Vergleich zum Spektrum des Zielanalyten an. Insbesondere kommt es auf die Breite des Peaks, auf das Maximum und die Form des Peaks an. Eine Überlagerung mehrerer Proteinpeaks der HCPs können dann eine Struktur im Bereich der Proteinabsorption ergeben, die nicht zwingend einer Gauss-ähnlichen Absorptionsbande entspricht. Somit können sogenannte Kreuz-Empfindlichkeiten der Messmethode unterdrückt und/oder umgangen werden. Damit kann eine effektive Qualitätskontrolle des Mediums erfolgen, sodass möglichst genau bestimmt werden kann, wie hoch der jeweilige Anteil an beispielsweise HCP und/oder an Zielprotein in dem Medium vorliegt. Darauf basierend kann abgeschätzt werden, ob weitere Reinigungsschritte notwendig sind.

[0031] In anderen Worten erlaubt der genannte Aspekt insbesondere die Messung von im Wesentlichen kontinuierlichen Absorptionsspektren oder Absorptionsspektren umfassend diskrete Messpunkte, anstatt einer Messung von lediglich einzelnen Absorptionswerten bei im Wesentlichen singulären Wellenlängen oder einer Messung einzelner Absorptionswerte bei relativ schmalen Wellenlängenbereichen. Beispielsweise kann ein kontinuierliches Absorptionsspektrum zwischen einem Wellenlängenbereich von etwa 280 nm und etwa 750 nm erfasst werden, wohingegen eine übliches bekanntes Verfahren beispielsweise eine Messung zwischen etwa 310 nm und 320 nm erlaubt. Die Halbwertsbreite (FWHM - Full width at half maximum) kann bei LEDs relativ schmalbandig sein und beispielsweise etwa 10 nm betragen. Bevorzugt beruht die Absorptionsspektroskopie, insbesondere die UV Absorptionsspektroskopie und die entsprechenden Sensoren auf einer vergleichsweise breitbandigen Anregung bzw. auf einem breitbandig emittierten und entsprechend erfassten Spektrum. Lichtquellen können beispielsweise eine Deuterium-Lampe und/oder eine Xenonlampe und/oder eine oder mehrere LEDs darstellen.

[0032] Die Erfindung basiert auf dem Lambert-Beer-Gesetz. Insbesondere wird vermieden, dass bei fester Wellenlänge (bzw. bei wenigen vorher über die Lichtquelle oder Detektor / Filter auswählbaren Wellenlängen) die Pfadlänge variiert werden muss. Die Erfindung erlaubt hingegen, das gesamte Spektrum aufzuzeichnen und erlaubt damit die Möglichkeit, bei fester bzw. unveränderter Weglänge d das effektive ϵ zu wählen. Dies geschieht über die Auswahl der zu verwendenden Wellenlängen λ explizit oder per multivariatem Algorithmus.

[0033] Insbesondere erlaubt der genannte Aspekt die Überwachung des Systems unter Verwendung einer einzigen Flusszelle mit konstanter optischer Pfadlänge. Abhängig von dem zu messenden Konzentrationsbereich werden verschiedene multivariate Modelle (z.B. PLS mit Substanzkonzentration, insbesondere Proteinkonzentration als Zielgröße und den Absorptionswerten des jeweiligen Spektralbereichs als Eingangsgrößen) erstellt, die auf der Auswertung verschiedener Wellenlängenbereiche basieren. Diese können entweder selbst ausgewählt werden oder über einen Algorithmus ausgewählt und/oder verschieden gewichtet werden (z.B. mittels PLS/ Partial Least Square oder MLR/ Multiple Linear Regression), wobei die gewählten Wellenlängenbereiche durch die Absorbanz des Zielanalyten (z.B. DNA oder Protein) oder Änderung der Matrix beeinflusst werden. Insbesondere werden mindestens zwei nicht identische Teilbereiche insbesondere Anregungswellenlängen eines Bereichs nach dem Kriterium ausgewählt, ob die maximale Intensität der Absorptionsbande noch innerhalb des nutzbaren dynamischen Bereichs des Detektors liegt.

[0034] Insbesondere weisen die einzelnen Wellenlängenbereiche zu den für die Modelle gewählten Absorptionswerten unterschiedliche Empfindlichkeiten hinsichtlich der Detektion der Substanzkonzentration auf. Somit unterscheidet sich der dynamische Bereich je nach Modell. Analog gilt dasselbe für die erreichbare analytische Genauigkeit der Messung.

[0035] Bevorzugt umfassen die Spektren Absorptionsspektren und/oder Intensitätsspektren, wobei die Absorptionsspektren und/oder Intensitätsspektren eine eindeutige Zuordnung, insbesondere eine eindeutige Auftragung der spektrale Messgröße, beispielsweise des Absorptionswerts und/oder des Intensitätswerts, zu mehreren Wellenlängen, wobei vorzugsweise zumindest eine Teilmenge der Absorptionswerte oder Intensitätswerte, die den entsprechenden Wellenlängen zugeordnet sind, keine detektorseitige Sättigung aufweist. Die spektrale Messgröße kann insbesondere der Absorptionswert oder der Intensitätswert sein.

[0036] Eine detektorseitige Sättigung tritt dann auf, wenn keine konzentrationsabhängige Änderung des

Detektorsignals bei einer bestimmten Wellenlänge oder einem Wellenlängenbereich mehr auftritt.

[0037] Insbesondere kann auch eine separate Wichtung bzw. Gewichtung jeder Wellenlänge erfolgen. In dem Fall ist es in der Regel formal nicht erforderlich Wellenlängen zu selektieren. Eine Wichtung nahe 0 bewirkt im Wesentlichen dasselbe.

[0038] Ein Detektorsignal kann in einen Sättigungsbereich gehen, wenn die elektromagnetische Strahlung bei einer bestimmten Wellenlänge oder in einem Wellenlängenbereich eine zu hohe Intensität oder eine zu hohe Absorbanz aufweist, sodass dieser entsprechende Wert außerhalb des dynamischen Bereichs des Detektors liegt. In anderen Worten kann eine Sättigung in beide Richtungen der „Detektorfüllung“, also hinsichtlich eines „overflows“ oder eines „underflows“ erfolgen.

[0039] Bei der UV-Spektroskopie absorbiert die Probe im Falle einer Sättigung insbesondere zu viel Licht, sodass das am Detektor ankommende Licht nicht mehr vom Dunkelrauschen des Detektors unterschieden werden kann.

[0040] Sofern eine Sättigung erreicht wird, kann der Detektor keine Auflösung der Intensität oder der Absorbanz innerhalb des gesättigten Bereichs liefern. Beispielsweise kann dies der Fall sein, wenn eine sehr hohe Konzentration in einer Probe vorliegt und/oder eine hohe optische Weglänge durch eine sehr dicke Messzelle bedingt ist, sodass die absolute Anzahl von Molekülen, die mit dem Licht bzw. der elektromagnetischen Strahlung wechselwirken, besonders hoch ist. Zur Ermittlung der Abhängigkeit einer Absorbanz und/oder Intensität ist es günstig, wenn der zu untersuchende Wellenlängenbereich für alle zu untersuchenden Konzentrationen im Wesentlichen keine Sättigung aufweist, sodass die Unterschiede in der Absorbanz und/oder der Intensität aufgelöst und/oder die Abhängigkeit von der Konzentration einer Konzentrationsreihe ggf. dargestellt werden können. Sofern ein Wellenlängenbereich eine Sättigung erfährt, ist der Detektor blind für die eigentliche spektrale Messgröße, also die Absorbanz und/oder die Intensität.

[0041] Bevorzugt umfassen die quantitativen Modelle zumindest ein globales Modell umfassend mehrere Untermodelle, die einander nicht überschneiden.

[0042] Beispielsweise kann ein globales Modell Werte von etwa 0 g bis etwa 150 g aufweisen. Mögliche lokale Modelle Werte von etwa 2 g bis etwa 10 g von etwa 10 g bis etwa 50 g und von etwa 30 g bis etwa 80 g aufweisen. Ein Untermodell muss nicht zwingend einen gemeinsamen Grenzwert mit dem globalen Modell haben. Grenzwerte können zwar identisch sein, allerdings ist dieser Fall eine Ausnahme.

[0043] Ein globales Modell erlaubt einer Prozesseinheit, eine grobe Abhängigkeit zwischen der spektralen Messgröße eines Spektrums und verschiedenen Konzentrationsbereichen einzuschätzen. Die Untermodelle können im Wesentlichen relativ grob gestaffelte Konzentrationsbereiche umfassen, die auf immer kleiner werdende Bereiche eingegrenzt werden. Die Untermodelle eines globalen Modells können z.B. gestaffelt sein in einen ersten Bereich von etwa 0 g/l bis etwa 5 g/l, in einen zweiten Bereich von etwa 0 g/l bis etwa 25 g/l und in einen dritten Bereich von etwa 0 g/l bis etwa 75 g/l.

[0044] Untermodelle müssen jedoch nicht zwingend bei 0 starten. Dies kann ggf. sogar ungünstig sein, da der Modellbereich in dem Fall unnötig breit gehalten werden muss. Wenn der Prozessschritt z.B. Konzentrationen von etwa 50 bis etwa 75 g enthält, wird ein optimales Modell einen etwas größeren Bereich enthalten (z.B. 45-80 g/l).

[0045] Bevorzugt umfassen die quantitativen Modelle jeweils zumindest ein individuell ausgewähltes Untermodell.

[0046] Ein Untermodell kann einen beliebigen Konzentrationsbereich umfassen. Insbesondere können mehrere Untermodelle mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationsbereichen erstellt werden. Dabei können sich zumindest zwei Konzentrationsbereiche im Wesentlichen überlappen, im Wesentlichen aneinander angrenzen und/oder voneinander beabstandet sein. Ein Untermodell kann insbesondere eine echte Teilmenge (z.B. mit einem eingeschränktem y-Bereich) der übergeordneten Modellspektrenmenge sein.

[0047] Bevorzugt umfassen die quantitativen Modelle hierarchisch organisierte Modelle entsprechend zumindest einer ersten Hierarchiestufe und einer zweiten Hierarchiestufe, wobei insbesondere die erste Hierarchiestufe ein globales Modell umfasst und die zweite Hierarchiestufe ein lokales Modell umfasst.

[0048] In einer ersten Hierarchiestufe erlaubt ein globales Modell der Prozesseinheit und/oder dem Verwender, eine grobe Abhängigkeit zwischen der spektrale Messgröße eines Spektrums und verschiedenen Konzentrationsbereichen beispielsweise automatisch bzw. automatisiert zu erkennen und/oder einzuschätzen. Die Untermodelle können im Wesentlichen relativ grob gestaffelte Konzentrationsbereiche umfassen, die auf immer kleiner werdende Bereiche eingegrenzt werden. Die Untermodelle eines globalen Modells können z.B. gestaffelt sein in einen ersten Bereich zwischen etwa 0 g/l und 5 g/l, in einen zweiten Bereich zwischen etwa 0 g/l und 25 g/l und in einen dritten Bereich zwischen etwa 0 g/l und 75 g/l.

[0049] In einer zweiten Hierarchiestufe erlaubt ein lokales Modell der Prozesseinheit und/oder dem Verwender, eine feiner aufgelöste Abhängigkeit zwischen der spektralen Messgröße eines Spektrums und verschiedenen Konzentrationsbereichen zu erkennen und/oder einzuschätzen, insbesondere automatisch bzw. automatisiert zu erkennen. Die Untermodelle können im Wesentlichen relativ fein gestaffelte Konzentrationsbereiche umfassen. Die Untermodelle eines lokalen Modells können z.B. gestaffelt sein in einen ersten Bereich zwischen etwa 0 g/l und 5 g/l, in einen zweiten Bereich zwischen etwa 5 g/l und 25 g/l und in einen dritten Bereich zwischen etwa 25 g/l und 75 g/l. Insofern grenzen die Konzentrationsbereiche eines lokalen Modells im Wesentlichen aneinander an.

[0050] Bevorzugt umfasst die Zuordnung des Probenspektrums zu mindestens einem quantitativen Untermodell eine Abschätzung auf Basis ermittelter und insbesondere auf Basis angezeigter Daten, insbesondere auf Basis angezeigter Spektren.

[0051] Eine schnelle unkomplizierte Abschätzung, beispielsweise „per Hand“ und/oder anhand einer groben Näherung kann ein erstes näherungsweise Ergebnis liefern, das im Anschluss beispielsweise mittels Fit verifiziert und/oder präzisiert werden kann.

[0052] Die Abschätzung durch den Verwender tritt insbesondere allein bei der Auswahl der Submodelle ein. D.h. in einem Beispiel kann der Anwender sich für das Modell 0-50 g/l entscheiden, weil zum Messzeitpunkt z.B. ein Gehalt von etwa 40 g/l erwartet wird. Alternativ kann eine Klassifizierung über PLS-DA oder SIMCA erfolgen oder euklidische Distanzen oder Mahalanobis Distanz zwischen Modell- und aktuellen Spektren ermittelt werden. Daraus ergibt sich, zu welchem der Modelle - basierend auf verschiedenen Konzentrationsbereichen - das aktuelle Spektrum am besten passt.

[0053] Bevorzugt erfolgt die Zuordnung des Probenspektrums zu mindestens einem quantitativen Modell (M) mittels euklidischer Distanz und/oder Mahalanobis und/oder PLS-DA und/oder SIMCA erfolgt.

[0054] Eine Zuordnung des Probenspektrums zu mindestens einem quantitativen Modell mittels euklidischer Distanz und/oder Mahalanobis und/oder PLS-DA und/oder SIMCA hat den Vorteil, dass präzise Vorhersagen über die Konzentration einer Substanz in einem Medium bzw. in einer Probe getroffen werden können. Genauigkeiten der Konzentrationsvorhersage erreicht. In der Anwendung können manche Prozesse einen sehr großen Bereich an Proteinkonzentrationen aufweisen, die bevorzugt abgedeckt werden sollten. Ggf. kann es sein, dass die Modellbereiche zu klein sind und infolgedessen kann ein Um-

schalten zwischen den Modellen innerhalb eines Prozesses erforderlich

[0055] Die Genauigkeit der Vorhersage hängt insbesondere vom Bereich des Modells ab. Ggf. kann es sein, dass dieser Bereich zu klein im Verhältnis zum Fehler der Referenz ist und infolgedessen kann ein Algorithmus nicht ermitteln, welche Wellenlängen zur Bestimmung der Analytkonzentration erforderlich sind. Ggf. kann es auch sein, dass der Bereich zu groß ist und infolgedessen werden nicht immer die höchsten sein, welcher ggf. einen Sprung in der Vorhersage bewirken kann.

[0056] Bevorzugt erfolgt das Steuern und/oder Regeln bezüglich des mindestens einen Parameters und der Parameter umfasst mindestens einen aus den folgenden Parametern: eine Ventilschaltung, eine Pumpensteuerung, einen Medienfluss, einen Mediendruck, einen Gasdruck, einen pH-Wert, einen Filtrierungsschritt, einen Fraktionierungsschritt, eine Zeitsteuerung, eine Prozesszeiteinstellung, eine Temperatur, eine Ionenkonzentration, einen Chromatographie-Schritt.

[0057] Die Prozesssteuerung, an die der Vorhersagewert weitergegeben wird, kann auf Basis des ermittelten Vorhersagewertes auf den Prozess in gewünschtem Maße Einfluss nehmen. Somit lässt sich ein Prozess effizient basierend auf einem bestimmten Vorhersagewert steuern und/oder regeln. Die Rückkopplung kann insbesondere dazu dienen, den Prozess effizienter zu gestalten und/oder das Produkt bzw. die Substanz besonders schonend zu gewinnen und/oder vor einer möglichen Denaturierung und/oder Beschädigung durch unerwünschte Werte der Prozessparameter zu bewahren. Die Prozessparameter, auf die beispielsweise Einfluss genommen werden kann können die besagten umfassen: eine Ventilschaltung, einen Flussdruck, einen Gasdruck, einen pH-Wert, einen Filtrierungsschritt, einen Fraktionierungsschritt, eine Zeitsteuerung, eine Prozesszeiteinstellung, eine Temperatur, eine Ionenkonzentration bzw. eine Salzkonzentration bzw. einen Titer, einen Gradienten, einen Chromatographie-Schritt.

[0058] Bevorzugt erfolgt die Erfassung des mindestens einen Probenspektrums der Probe online bzw. in Echtzeit, insbesondere während eines bzw. während des Prozesses und das Steuern und/oder Regeln erfolgt bevorzugt auch während des Prozesses als unmittelbare Folge des ermittelten Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

[0059] Eine Echtzeitüberwachung erlaubt der Prozesseinheit und/oder dem Verwender und/oder einer automatisierten Apparatur ein sofortiges Eingreifen in die Prozessparameter auf Basis des ermittelten Vorhersagewertes bzw. auf Basis der ermittelten Konzentration der in Frage stehenden Substanz. Ein so-

fortiges Eingreifen in den Prozess erlaubt insbesondere, das Regeln und/oder Steuern des Prozesses. In anderen Worten kann eine Rückkopplung derart erfolgen, dass mindestens ein Prozessparameter auf Basis des ermittelten Konzentrationswertes mindestens einer Substanz kontrolliert und/oder gesteuert und/oder geregelt wird. Es wird damit auch ggf. vermieden, dass eine Stichprobe von dem Medium entnommen und ex situ gemessen werden muss. Die Probe bzw. das Medium kann in situ, insbesondere während eines Prozesses innerhalb einer Anlage, beispielsweise innerhalb eines Fermentationsbehälters und/oder innerhalb einer Downstream Anlage, beispielsweise vor und/oder hinter einer Chromatographie-Einheit erfolgen.

[0060] Bevorzugt erfolgt die Generierung quantitativer Modelle mittels multivariater Modellerstellung, insbesondere mittels einer multivariaten Regressionsmethode wie bevorzugt mittels multiple linear Regression (MLR), und/oder partial least squares (PLS) und/oder orthogonal partial least squares (OPLS).

[0061] Eine multivariate Regressionsmethode erlaubt ein effizientes automatisiertes Ermitteln bzw. Erstellen von Modellen mit einer hohen Präzision. Parameter, die bei der Automatisierung erwünschte Bedingungen bestimmen, beispielsweise Maximal- und/oder Minimalwerte für Prozessparameter, können durch die Prozesseinheit und/oder den Verwender vorgegeben werden. Der Prozess kann somit auch in Abwesenheit eines Verwenders in Echtzeit automatisiert bzw. automatisch überwacht werden.

[0062] Insbesondere wird mindestens ein Teilbereich, insbesondere einzelne Wellenlängen der Spektren der Mehrzahl der Konzentrationsproben durch eine Gewichtung abgeschwächt oder ausgeschlossen.

[0063] Beispielsweise wird mindestens ein Teilbereich, insbesondere einzelne Wellenlängen der Spektren der Mehrzahl der Konzentrationsproben und bevorzugt Teilbereiche, für die eine Sättigung der Spektren eintritt, für die Anwendung auf das Probenspektrum durch eine Gewichtung abgeschwächt und insbesondere ausgeschlossen.

[0064] Durch die Gewichtung beispielsweise um einen Faktor (Faktoren in diesem Beispiel normiert auf 1), der sehr viel kleiner als 1 ist, beispielsweise für Werte, die kleiner als etwa 0,1, insbesondere kleiner als etwa 0,05 und bevorzugt kleiner als etwa 0,01 sind, kann ausgeschlossen werden, dass unerwünschte Daten, beispielsweise Absorptionswerte, für die eine Sättigung eintritt, automatisch aber unerwünscht in die Erstellung eines Modells und/oder die Ermittlung der Konzentration einer Substanz eingehen. Dies kann auch der Fall sein für Konzentrationsbereiche, für die eine Absorbanz bei einer Wel-

lenlänge eine Abhängigkeit von der Konzentration aufweist, die stark von einer linearen Konzentration abweicht. Ebenfalls können Konzentrationsbereiche und/oder Wellenlängen betroffen sein, bei denen die Absorbanz eine besonders niedrige Sensibilität gegenüber der Konzentrationsänderung aufweist. Eine Gewichtung kann beispielsweise automatisch erfolgen auf Basis vorgegebener Kriterien und/oder von der Prozesseinheit und/oder dem Verwender vorbestimmt werden. Für die Erstellung von Modellen ist es besonders bevorzugt, eine lineare Abhängigkeit der Absorbanz von der Konzentration einer Konzentrationsreihe zu berücksichtigen bzw. zu bevorzugen, da somit die Vorhersage bzw. Bestimmung bzw. Abschätzung der Konzentration besonders präzise erfolgen kann.

[0065] Bevorzugt wird bzw. werden mindestens ein Teilbereich, insbesondere einzelne Wellenlängen der Spektren der Mehrzahl der Konzentrationsproben, bevorzugt Teilbereiche für die eine lineare Abhängigkeit zwischen Wellenlängen und Messwerten vorliegen, für die Anwendung auf das Probenspektrum stärker gewichtet, wobei die Gewichtung manuell oder mittels eines Algorithmus, insbesondere Faktoranalyse, factor loadings bzw. PLS loadings, Regressionen in PLS und/oder OPLS erfolgt.

[0066] Für die Erzeugung von Modellen ist es besonders vorteilhaft, Bereiche, für die eine lineare Abhängigkeit der Absorbanz von der Konzentration einer Konzentrationsreihe zumindest näherungsweise besteht, stärker zu gewichten. Die Vorhersage auf Basis einer linearen Abhängigkeit der Konzentration kann besonders präzise erfolgen.

[0067] Bevorzugt erfolgt die Erfassung einer Vielzahl von Proben-Messwerten bei einer einzigen im Wesentlichen identischen Spaltbreite einer oder mehrerer Messzelle/n.

[0068] Das Beibehalten einer einzigen Messzelle ermöglicht der Prozesseinheit und/oder dem Verwender eine besonders effiziente Bestimmung der Konzentration, da der Austausch von Hardware, insbesondere von Messzellen verringert ggf. vollständig vermieden werden kann. Die Umstände unter denen gemessen wird, sind somit konstant und es werden Variationen der Messkonfigurierung und daraus resultierende fehlerhafte Einstellungen vermieden. Beispielsweise kann das reversible Einstellen einer Messzelle auf eine bestimmte Schichtdicke mit Fehlern behaftet sein. Darüber hinaus wird ein zusätzlicher Verfahrensschritt oder werden mehrere zusätzliche Verfahrensschritte, die das Einstellen der Schichtdicke umfassen, vermieden, was das Verfahren besonders effizient macht.

[0069] Gemäß einem Aspekt umfasst eine Vorrichtung zum Steuern und/oder Regeln eines Prozes-

ses, insbesondere eines Downstream-Bioprozesses, basierend auf der Vorhersage einer unbestimmten Konzentration von mindestens einer Substanz in einer Probe bzw. einem Medium mittels Spektroskopie, insbesondere UV/vis-Spektroskopie:

Mindestens eine Schnittstelle zum Erhalt von Spektren einer Mehrzahl von Konzentrationsproben der mindestens einen Substanz und von mindestens einem Probenspektrum der Probe bzw. des Mediums;

Mindestens eine Einheit zur

Generierung quantitativer Modelle auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben,

Zuordnung des Probenspektrums zu mindestens einem quantitativen Modell der generierten quantitativen Modelle; und

Anwendung des mindestens einen quantitativen Modells, welches dem Probenspektrum zugeordnet wurde, auf das Probenspektrum, um einen Vorhersagewert für die unbestimmte Konzentration zu ermitteln;

Mindestens eine Prozesseinheit zum Steuern und/oder Regeln des Prozesses bezüglich mindestens eines Parameters auf Basis des Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

[0070] Bevorzugt umfasst die Vorrichtung ein Spektrometer zur Erfassung der Spektren der Mehrzahl von Konzentrationsproben der mindestens einen Substanz und/oder des mindestens einen Probenspektrums der Probe.

[0071] Gemäß einem Aspekt umfasst ein Computerprogrammprodukt computerlesbare Befehle, die bei der Ausführung des Programms durch ein geeignetes computergestütztes System dieses veranlassen, die Schritte des Verfahrens nach dem obigen Aspekt oder einer der Ausführungsformen auszuführen.

[0072] Alle optionalen und bevorzugten Merkmale der Aspekte, Beispiele und Ausführungsformen des Verfahrens können entsprechend mit der Vorrichtung und/oder dem Computerprogrammprodukt kombinierbar sein. Infolgedessen ergeben sich die entsprechenden Vorteile und technischen Effekte, die hierin genannt sind.

[0073] Insbesondere kann die Erfindung realisiert werden mit Single-Use (SU)- bzw. Einweg-Systemen, umfassend beispielsweise SU Downstream-Elemente, SU Fermentationsbehälter, SU Beutel, SU Behälter mit jeweils einem Wandungsvorsprung, welcher einen Spalt und Fenster umfasst, durch welche der Inhalt des Behälters spektroskopisch in situ, also im Behälter in Echtzeit analysiert werden kann. Bevorzugt können auch tube lines mit SU Durchflusszelle verwendet werden, welche auch in Kombinati-

on oder direkter Verbindung zu SU Behältern stehen können.

[0074] Im Folgenden werden einige Ausführungsbeispiele näher beschrieben, wobei die Erfindung nicht auf die beschriebenen Ausführungsbeispiele beschränkt sein soll.

[0075] Einzelne Merkmale, die in einer bestimmten Ausführungsform beschrieben werden, können beliebig kombiniert werden, vorausgesetzt, sie schließen einander nicht aus. Darüber hinaus sind verschiedene Merkmale, die in den beispielhaften Ausführungsformen zusammen bereitgestellt werden, nicht als die Erfindung einschränkend anzusehen.

Figurenliste

Fig. 1 ist eine schematische Darstellung einer beispielhaften Prozessüberwachung für einen Downstreamprozess;

Fig. 2 ist eine Darstellung eines beispielhaften Spektrums einer Proteinbande mit markierten Wellenlängenbereichen zu verschiedenen Modellen;

Fig. 3 ist eine Darstellung einer beispielhaften Auftragung von Absorptionswerten der in **Fig. 2** dargestellten beispielhaften Proteinbande entsprechend von unterschiedlichen Konzentrationsproben gegen die entsprechende Konzentration bei drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen;

Fig. 4 ist eine Darstellung einer beispielhaften Auftragung von Absorptionswerten unterschiedlicher Konzentrationsproben gegen die entsprechende Konzentration bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen;

Fig. 5 ist eine schematische Darstellung eines beispielhaften Verfahrens zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses; und

Fig. 6 zeigt die beispielhafte Vorhersage gegenüber dem Referenzwert für DNA.

[0076] **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung einer beispielhaften Prozessüberwachung für einen Downstreamprozess **3**. Die Prozessüberwachung wird in diesem Beispiel mittels eines UV/vis Spektrometers **4** verwirklicht. Bei den beiden in der **Fig. 1** gezeigten Darstellungen von UV/vis Spektrometern **4** kann es sich auch lediglich um ein einziges UV/vis Spektrometer **4** handeln. Das zumindest eine UV/vis Spektrometer **4** ist an eine Auswerteeinheit angeschlossen bzw. gekoppelt. Die Auswerteeinheit **9** umfasst vorliegend einen Rechner mit einem Desktop bzw. einer Ausgabeeinheit bzw. einen Bildschirm **9a**, auf dem die gemessenen Spektren **1_a**, **1_b** angezeigt bzw. dargestellt werden können. Die Auswerteeinheit **9** kann eine Schnittstelle zum Erhalt von Spektren umfassen,

wie zum Beispiel eine Schnittstelle zum Anschluss eines Datenkabels. Zusätzlich oder alternativ kann auch das UV/vis Spektrometer **4** eine Schnittstelle zum Erhalt von Spektren umfassen, sodass die Daten beispielsweise von einem Gerät und/oder einer Auswerteeinheit **9** und/oder einem Datenträger abgegriffen werden können.

[0077] Ein aufzureinigendes Medium **5_a** kann eine erste Messzelle **7a** durchlaufen bevor es die Aufreinigungseinheit **6** passiert bzw. durchläuft. Die erste Messzelle **7a** erlaubt dem der Prozesseinheit und/oder dem Verwender ein erstes Spektrum **5_a** von dem Medium aufzunehmen. Die erste Messzelle **7a** umfasst insbesondere eine Flusszelle. Das Medium **5_a** kann in diesem Schritt insbesondere eine oder mehrere zu überwachende Substanzen umfassen. Darüber hinaus kann das Medium **5_a** insbesondere Verunreinigungen bzw. Substanzen, die von dem Medium **5_a** getrennt werden sollen, umfassen. Beispielsweise kann das Medium **5_a** HCPs umfassen, welche von dem Medium **5_a** abgetrennt bzw. getrennt bzw. isoliert werden sollen. Der Bildschirm **9_a** in **Fig. 1** stellt beispielhaft ein Spektrum **1_a** insbesondere ein Absorptionsspektrum des aufzureinigenden Mediums **5_a** dar, welches zwei Banden **a**, **b** aufweist. Die erste Bande **a** kann beispielsweise von der Verunreinigung hervorgerufen werden und die zweite Bande **b** kann beispielsweise von der Zielsubstanz, beispielsweise dem Zielprotein hervorgerufen werden. Alternativ zu der ersten Messzelle **7a** kann das aufzureinigende Medium **5_a** auch innerhalb eines Behälters untersucht werden. Beispielsweise kann ein Spektrum **1_a** von dem aufzureinigenden Medium **5_a** zumindest teilweise innerhalb eines Fermentationsbehälters aufgenommen bzw. gemessen bzw. erfasst werden.

[0078] Das Medium **5_a** durchläuft hinter der ersten Messzelle **7a** eine Aufreinigungseinheit **6**. Die Aufreinigungseinheit **6** kann beispielsweise folgende Verfahren zur Reinigung bzw. Trennung ermöglichen: Filtration, Chromatographie, insbesondere Säulenchromatographie und/oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Elektrophorese, Extraktion, Fällung, Sedimentation, Zentrifugieren und/oder Dialyse etc. Die Aufreinigungseinheit **6** ist insbesondere dazu ausgelegt, das Medium **5_a** von Verunreinigungen und/oder unerwünschten Substanzen zu isolieren bzw. zu trennen, sodass das Medium **5_b** nach durchlaufen der Aufreinigungseinheit **6** zumindest die unerwünschte Substanz, beispielsweise HP-Cs, im Wesentlichen nicht mehr umfasst. Das im Wesentlichen aufgereinigte Medium **5_b** umfasst hingegen nur noch erwünschte Substanzen, wie beispielsweise Zielmoleküle, insbesondere Zielproteine und/oder Salze, insbesondere Puffersubstanzen.

[0079] Das zumindest teilweise aufgereinigte Medium **5_b** verlässt nach dem Schritt der Aufreinigung die

Aufreinigungseinheit **6** und passiert bzw. durchläuft eine weitere Messzelle 7b. Es kann sich alternativ auch um die erste Messzelle 7a handeln, insbesondere kann es sich um die erste gereinigte Messzelle 7a handeln, jedoch ist es bevorzugt, dass das aufgereinigte Medium **5_b** eine nicht identische weitere bzw. zweite Messzelle 7b passiert, da es ggf. in der ersten Messzelle 7a mit den Verunreinigungen kontaminiert werden könnte. Bei der zweiten Messzelle 7b kann es sich jedoch um ein identisches Modell der ersten Messzelle 7a handeln.

[0080] Wenn das Medium in, insbesondere durch die weiteren Messzelle 7b fließt oder sich zumindest zweitweise darin befindet, kann ein weiteres Spektrum **1_b** von dem UV/vis Spektrometer **4** erfasst werden. Der Bildschirm **9a** in **Fig. 1** stellt beispielhaft ein Spektrum **1_b** insbesondere ein Absorptionsspektrum des zumindest teilweise aufgereinigten Mediums **5_b** dar, welches im Wesentlichen nur noch die Bande b aufweist. Die erste Bande a, die noch im ersten Spektrum **1_a** sichtbar war und die beispielsweise von der Verunreinigung hervorgerufen wurde ist zumindest nicht mehr sichtbar in dem angezeigten Spektrum **1_b** des aufgereinigten Mediums **5_b**. Die zweite Bande b, die beispielsweise von der Zielsubstanz, beispielsweise von dem Zielprotein hervorgerufen wird, ist jedoch noch sichtbar. Dies indiziert, dass die Substanz, die die erste Bande a erzeugt, größtenteils von dem Medium **5_b** in der Aufreinigungseinheit **6** getrennt wurde.

[0081] An und/oder in den Messzellen 7a, 7b sind jeweils zwei optische Lichtleiter **8** angeordnet. Dabei kann in einen der beiden optischen Lichtleiter **8**, beispielsweise von der Seite des UV/vis Spektrometers eine elektromagnetische Strahlung gekoppelt werden, welche auf der Seite der Messzelle 7a, 7b aus dem optischen Lichtleiter **8** austritt und die Messzelle 7a, 7b zumindest teilweise passiert, sodass ein optischer Lichtleiter **8** auf der Gegenseite der jeweiligen Messzelle 7a, 7b die transmittierte elektromagnetische Strahlung zumindest teilweise erfassen kann und diese zumindest teilweise an das UV/vis Spektrometer **4** senden bzw. leiten kann.

[0082] Alternativ kann die Prozessüberwachung auch an und/oder in einem Behälter erfolgen. Beispielsweise kann mindestens ein optischer Lichtleiter an und/oder in einen Fermentationsbehälter geführt werden, sodass dieser mittels eingekoppeltem Licht das Medium in dem Fermentationsbehälter anregen kann und/oder das Licht, das zumindest einen Teil des Mediums passiert bzw. durchlaufen und ggf. angeregt hat, einfangen bzw. zu einem Detektor bzw. einem Sensor leiten kann. Die Überwachung kann einerseits zumindest teilweise in situ und/oder ex situ erfolgen. In anderen Worten können Elemente, die zur Überwachung ggf. benötigt werden, wie Sensoren und/oder Lichtleiter in den Innenraum des Fer-

mentationsbehälters hineinragen und insbesondere in direktem physischen Kontakt mit dem Medium, insbesondere der Fermentationsbrühe stehen (in situ), und/oder von außen, beispielsweise an einem Fenster mit optischem Zugang zum Innenraum angeordnet sein, sodass ein direkter physischer Kontakt mit dem Medium vermieden werden kann (ex situ).

[0083] Die Messzellen 7a, 7b weisen insbesondere eine im Wesentlichen konstante optische Pfadlänge bzw. Dicke auf. Die optische Pfadlänge des Lichtes bzw. die Dicke der Messzelle 7a, 7b kann zwischen etwa 100 nm und etwa 10 cm, insbesondere zwischen etwa 500 nm und etwa 5 mm und besonders bevorzugt zwischen etwa 800 nm und etwa 3 mm liegen.

[0084] **Fig. 2** ist eine Darstellung eines beispielhaften Spektrums einer Proteinbande mit markierten Wellenlängenbereichen zu verschiedenen Modellen. Die Absorbanz **2** ist zwischen etwa 240 nm und etwa 360 nm gegen die Wellenlänge λ aufgetragen und somit ergibt sich das Spektrum **1**, insbesondere das Absorptionsspektrum für eine Bande, die ihr lokales Maximum in etwa zwischen 270 nm und 280 nm hat und zu beiden Seiten eine abfallende Flanke zeigt. Die Absorptionsbande wird hervorgerufen durch ein beispielhaftes Protein.

[0085] Die Erfindung basiert auf der Messung bzw. Erfassung Absorptionsspektren statt einzelner Wellenlängen und/oder Wellenlängenbereiche. Dabei befindet sich während der Messung ein Medium in einer Messzelle, beispielsweise in einer Flusszelle, die eine im Wesentlichen konstante Dicke zwischen etwa 100 nm und etwa 10 cm, insbesondere zwischen etwa 500 nm und etwa 5 mm und besonders bevorzugt zwischen etwa 800 nm und etwa 3 mm, beispielsweise von etwa 1mm aufweist.

[0086] Abhängig von dem zu messenden Konzentrationsbereich werden verschiedene multivariate Modelle erstellt, die auf der Auswertung verschiedener Wellenlängenbereiche basieren. Die Modelle können dabei beispielsweise auf PLS basieren, wobei die Konzentration eines vorbestimmten Proteins als Zielgröße festgelegt ist und die Absorptionswerten des jeweiligen Spektralbereichs als Eingangsgrößen dienen.

[0087] Die Wellenlängenbereiche können entweder selbst per Hand ausgewählt werden und/oder über einen Algorithmus bestimmt und/oder unterschiedlich gewichtet werden. Dabei können alle gewählten Wellenlängenbereiche durch die Absorbanz des Zielanalyten (z.B. DNA oder Protein), dem vorzugsweise linearen Bereich der Detektorantwort oder der Änderungen der Matrix, z.B. durch Partikelstreuung oder Änderungen der Pufferzusammensetzung, beeinflusst werden.

[0088] In der **Fig. 2** sind einzelne Wellenlängenbereiche angedeutet, die jeweils einem Modell **M1**, **M2**, **M3**, **M4** zugeordnet sind. Beispielsweise liegt der Wellenlängenbereich, der dem Modell **M1** zugeordnet ist, etwa zwischen 270 nm und 280 nm. Der Wellenlängenbereich, der dem Modell **M2** zugeordnet ist, liegt zwischen etwa 280 nm und 290 nm. Der Wellenlängenbereich, der dem Modell **M3** zugeordnet ist, liegt zwischen etwa 290 nm und 300 nm und der Wellenlängenbereich, der dem Modell **M4** zugeordnet ist, liegt zwischen etwa 300 nm und 310 nm.

[0089] Die einzelnen Wellenlängenbereiche weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten hinsichtlich der Detektion der Analytkonzentration bzw. der Konzentration der in Frage stehenden Substanz auf. Beispielsweise weist das Modell 1, das dem Wellenlängenbereich zugeordnet ist, in das das Maximum der Absorptionsbande fällt, eine besonders hohe Empfindlichkeit auf verglichen mit den anderen Modellen. Die Modelle, die den Wellenlängenbereichen zugeordnet sind, die im Wesentlichen in der Flanke der Absorptionsbande liegen, zeigen von Modell 2 nach Modell 4 hin jeweils eine abnehmende Empfindlichkeit im Vergleich zueinander. In anderen Worten gilt für die hier gezeigte Einteilung der Modelle, dass die Empfindlichkeit mit zunehmender Wellenlänge abnimmt. Somit unterscheidet sich der dynamische Bereich je nachdem, welches Modell **M1**, **M2**, **M3**, **M4** gewählt ist. Ähnliches gilt für die erreichbare analytische Genauigkeit der Messung.

[0090] Verglichen mit dem Trend der Empfindlichkeit verhält es sich genau anders herum mit der absolut messbaren Konzentration einer Substanz. Das Modell 1, das dem Wellenlängenbereich zugeordnet ist, in das das Maximum der Absorptionsbande fällt, weist ein geringes Potential auf, hohe Konzentrationen nachzuweisen. Hingegen steigt dieses Potential mit zunehmender Wellenlänge im vorliegenden Fall. Die Modelle, die Wellenlängen am Rand der Flanke der Bande zugeordnet sind, zeigen eine besonders hohe Fähigkeit, hohe Konzentrationen anzudeuten.

[0091] Basiert das Modell auf den Wellenlängen mit der höchsten Absorbanz bzw. dem Maximum einer Bande, so hat dieses Modell die höchste Empfindlichkeit, allerdings ist die obere Detektionsgrenze bereits bei geringen Substanzkonzentrationen schnell erreicht. Das Modell **M4** basiert hingegen hauptsächlich auf Wellenlängenbereichen, welche in der Flanke der Bande liegen. Somit ist die Empfindlichkeit geringer, dafür können jedoch weitaus höhere Substanzkonzentrationen gemessen werden. Insbesondere erreicht das Maximum einer Absorptionsbande bei schon relativ geringen Konzentration wegen der hohen Empfindlichkeit sehr hohe Werte, die insbesondere den dynamischen Bereich eines Sensors bzw. Detektors überschreiten.

[0092] In anderen Worten weisen die einzelnen Wellenlängenbereiche unterschiedliche Empfindlichkeiten hinsichtlich der Detektion der Analytkonzentration auf. Somit unterscheidet sich der dynamische Bereich je nach Modell, das gleiche gilt für die erreichbare analytische Genauigkeit der Messung. **Fig. 2** veranschaulicht dies. Es zeigt beispielhaft eine Absorptionsbande von einem Protein bzw. einer Proteinspezies. Basiert das Modell im Kern auf den Wellenlängen mit der höchsten Absorption, so hat dieses Modell die höchste Empfindlichkeit, allerdings ist die obere Detektionsgrenze bereits bei geringen Proteinkonzentrationen schnell erreicht. Das Modell 4 basiert hingegen hauptsächlich auf Wellenlängenbereichen, welche in der Flanke der Bande liegen. Somit ist die Empfindlichkeit geringer, dafür können jedoch weitaus höhere Proteinkonzentrationen gemessen werden.

[0093] Dies wird auch in den unterschiedlichen linearen Bereichen der verschiedenen Modelle deutlich. **Fig. 4** zeigt die Absorbanz bzw. Absorption zweier Proteinbanden bei verschiedenen Konzentrationen. Die Bande bei 224 nm ändert sich weitaus stärker mit steigender Proteinkonzentration als die 280er Bande (und hat damit eine höhere Empfindlichkeit). Dafür ist der lineare Bereich bei der 280er Bande weitaus größer.

[0094] In **Fig. 3** ist gezeigt, wie sich die Absorbanz der Modelle basierend auf verschiedenen Wellenlängenbereichen einer einzigen Bande bei sich ändernden Proteinkonzentrationen verhält.

[0095] Anhand der jeweiligen Auftragungen der Absorptionswerte **2** zu jeweils bestimmten Wellenlängen λ in Abhängigkeit der Konzentration wird die zuvor beschriebene Abhängigkeit beschrieben in den folgenden Figuren **Fig. 3** und **Fig. 4** beschrieben.

[0096] **Fig. 3** ist eine Darstellung der Auftragung von Absorptionswerten **2** der in **Fig. 2** dargestellten Proteinbande für jeweils unterschiedliche Konzentrationen c bei drei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die in **Fig. 2** dargestellte Proteinbande entspricht jedoch nur einer einzigen ausgewählten Konzentration. In anderen Worten ist die Absorption **2** gegen die Substanzkonzentration c für verschiedene Wellenlängenbereiche der Proteinbande mit dem Maximum bei etwa 280 nm aufgetragen. In **Fig. 3** ist insbesondere dargestellt, wie sich die Absorbanz **2** dreier Modelle basierend auf verschiedenen Wellenlängenbereichen einer einzigen Bande bei sich ändernden Substanzkonzentrationen c verhält.

[0097] Die drei Modelle, die hinsichtlich der **Fig. 3** beispielhaft gewählt wurden, sind Wellenlängenbereichen zugeordnet, die jeweils den Wert von etwa 300 nm, 290 nm und 280 nm umfassen. Die erfassten benachbarten Datenpunkte eines Modells wurden jeweils mit einer linearen Verbindungslinie ver-

bunden. Insbesondere eignen sich Modelle in Bereichen, die im Wesentlichen lineare Abhängigkeiten zwischen Absorbanz **2** und Konzentration c zeigen, für die zuverlässige Vorhersage von unbestimmten Konzentrationen. Wie aus der Darstellung in **Fig. 3** sichtbar wird, weisen die Wellenlängenbereiche bzw. die Modelle unterschiedliche im Wesentlichen lineare Bereiche auf.

[0098] Beispielsweise zeigt die Auftragung für etwa 300 nm einen linearen Bereich über eine besonders breite Konzentration c , und zwar zwischen etwa 0 g/l und 150 g/l. Der gesamte Bereich kann zur Vorhersage einer unbestimmten Konzentration herangezogen werden, wenngleich die Sensitivität bzw. Empfindlichkeit dieser Wellenlänge gegenüber der Konzentration c vergleichsweise mit den anderen Modellen nicht hoch ist. Die Auftragung für etwa 290 nm zeigt eine hohe Sensitivität im Vergleich mit der Auftragung für etwa 300 nm. Der lineare Bereich innerhalb dem zuverlässige Vorhersagen getroffen werden können, endet jedoch bereits für Werte ab etwa 50 g/l. Die Auftragung für 280 nm zeigt eine vergleichsweise hohe Sensitivität gegenüber Veränderungen in der Konzentration, allerdings ist lediglich der Konzentrationsbereich unterhalb von etwa 10 g/l linear. Hinsichtlich des in **Fig. 2** dargestellten Spektrums liegt der Wert von etwa 280 nm relativ nahe am Maximum, wohingegen die anderen beiden Werte von etwa 290 nm und 300 nm im Bereich der abfallenden Flanke des Spektrums **1** liegen.

[0099] In anderen Worten gilt, dass je nachdem, welches Modell gewählt wurde, verschieden große lineare Bereiche zur Auswertung herangezogen werden können. Die drei dargestellten Modelle haben unterschiedliche Empfindlichkeiten, insbesondere bei niedrigen Substanzkonzentrationen. Das Modell für 280 nm zeigt die höchste Empfindlichkeit und somit auch Messgenauigkeit bei niedrigen Substanzkonzentrationen, dafür besitzt das Modell bei 300 nm einen weitaus größeren linearen Bereich bis 150 g/l Protein. Auf diese Weise ist es möglich, verschiedenen Anwendung gerecht zu werden, beispielsweise die Überwachung einer DNA-Konzentration und/oder die Konzentration verschiedener Proteine, wobei die Hardware beibehalten werden kann und insbesondere keine Variation der optischen Pfadlänge vorausgesetzt wird.

[0100] **Fig. 4** ist eine Darstellung der Auftragung von Absorptionwerten zweier beispielhafter Banden bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen für unterschiedliche Konzentrationen. In anderen Worten zeigt die **Fig. 4** die jeweilige Absorbanz zweier Proteinbanden bei verschiedenen Konzentrationen. Die Bande bei 224 nm ändert sich weitaus stärker mit steigender Substanzkonzentration als die Bande bei 280 nm und hat damit eine höhere Empfindlichkeit.

Dafür ist der lineare Bereich bei der Bande bei 280 nm weitaus größer.

[0101] **Fig. 5** ist eine schematische Darstellung eines beispielhaften Verfahrens **100** zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses. Das Verfahren beginnt mit dem Schritt **101**, in dem eine Mehrzahl von Spektren einer Konzentrationsreihe einer bestimmten Substanz, deren Konzentration in einem Medium bzw. in einer Probe bestimmt werden soll. Beispielsweise kann es sich bei dem zu trennenden Protein um ein Protein der Photosynthese handeln. Beispielsweise kann eine Verdünnungsreihe gestaffelte Konzentrationsbereiche umfassen. Insbesondere können die Konzentrationen einer Substanz für vorbestimmte Bereiche in konstanten Abständen liegen, wobei die die konstanten Abstände bereichsweise vergrößern und/oder verkleinern können. Zusätzlich oder alternativ können die Abstände zumindest für einen Bereich auch nicht konstant gewählt sein. Ein solches Beispiel einer Konzentrationsreihe ist im Folgenden gegeben: 100 mg/l; 400 mg/l; 700 mg/l; 1g/l; 1,5 g/l; 2 g/l; 2,5 g/l; 5 g/l; 7,5 g/l; 10 g/l; 20 g/l; 30 g/l; 40 g/l; 50 g/l; 75 g/l; 100 g/l; 150 g/l usw.

[0102] Bevorzugt umfasst die Konzentrationsreihe lediglich die zu bestimmende Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen gelöst in einem geeigneten im Wesentlichen physiologischen Lösungsmittel, insbesondere in einer wässrigen Pufferlösung, beispielsweise in einer Phosphatgepufferten Salzlösung oder einem TBS-Puffer. Ggf. kann die Lösung auch ein Detergens und/oder ein Zusatz einer anderen Substanz zur Verhinderung einer möglichen Denaturierung der Substanz umfassen.

[0103] Für die Erfassung der Spektren der Konzentrationsreihe wird insbesondere eine Messzelle mit einer konstanten Spaltbreite bzw. Probenschichtdicke verwendet. Alternativ können zwei optische Lichtleiter mit einem konstanten Abstand zumindest teilweise innerhalb eines Behälters, in dem sich das Medium zumindest teilweise befindet, angeordnet sein, wobei ein Nichtleiter dazu ausgelegt ist, Licht bzw. elektromagnetische Strahlung in das Medium zu emittieren und der andere Lichtleiter dazu ausgelegt ist, die transmittierte Strahlung zumindest teilweise aufzunehmen und an eine Auswerteeinheit und/oder das UV/vis Spektrometer weiterzuleiten.

[0104] Für jede Konzentrationsprobe der Konzentrationsreihe wird jeweils mindestens ein Spektrum, insbesondere in einem Bereich zwischen etwa 200 nm und 700 nm erfasst.

[0105] Anhand der Spektren der Konzentrationsreihe, bei der üblicherweise Absorptionswerte gegen die Wellenlänge aufgetragen werden, werden im Schritt **102** geeignete Modelle für verschiedene Konzentrationsbereiche erstellt. Insbesondere werden multiva-

riate Modelle erstellt, bevorzugt mittels partial least square (PLS) Regression, orthogonal PLS (OPLS) Regression und vergleichbaren Regressionskonzepten.

[0106] Insbesondere können hierarchische Modelle gewählt werden, wobei jedes Modell einen bestimmten Konzentrationsbereich abdeckt. Für hierarchische Modelle gilt in der Regel, dass die Präzision für niedrige Konzentrationen hoch ist und bei höheren Konzentrationen abnimmt und demzufolge ggf. Modellfehler auftreten können.

[0107] Das Verfahren **100** bietet zwei kombinierbare Optionen, und zwar Option A, ein globales Modell und Option B, ein lokales Modell. Das globale Modell der Option A umfasst die beispielhaften Untermodelle und zwar Modelle **M1**, **M2** und **M3**, jeweils basierend auf Spektren gemessen beispielsweise zwischen etwa 0 g/l und 5 g/l, zwischen etwa 0 g/l und 25 g/l und zwischen etwa 0 g/l und 75 g/l. Zusätzlich oder alternativ kann auch ein lokales Modell angewandt werden. Das lokale Modell der Option B umfasst die beispielhaften Untermodelle und zwar Modelle **M4**, **M5** und **M6**, jeweils basierend auf Spektren gemessen beispielsweise zwischen etwa 0 g/l und 5 g/l, zwischen etwa 5 g/l und 25 g/l und zwischen etwa 25 g/l und 75 g/l. Der wesentliche Unterschied zwischen Option A und Option B besteht darin, dass für Option B, die Modelle **M4**, **M5** und **M6** nicht alle bei etwa 0 g/l beginnen, sondern lediglich das erste Modell **M4**.

[0108] Optional kann ein hierarchisches Modell gewählt werden, das ein globales Modell (Option A) über einen gesamten Konzentrationsbereich (beispielsweise zwischen etwa 0 g/l und 75 g/l) umfasst und eine oberste Hierarchie darstellt und weitere Untermodelle **M4**, **M5**, **M6** (Option B) für einzelne Konzentrationsbereiche (beispielsweise gestaffelt zwischen etwa 0 g/l und 75 g/l).

[0109] Untermodelle basieren in der Regel jeweils auf nicht-gesättigten Spektren bzw. Spektralbereichen, welche beispielsweise mittels eines OPLS/PLS Algorithmus, und/oder mittels Auftragung der Absorbanz gegen die Konzentration der relevanten Wellenlängen ermittelt wird. In anderen Worten ist das Ziel eines Modells insbesondere, auf nicht gesättigten Spektralbereichen aufzubauen. Dies trifft sowohl auf das globale Modell als auch auf die Untermodelle zu. Insbesondere erfolgt eine Bestimmung des linearen Bereiches jeder Auftragung bezüglich jeder gewählten Wellenlänge, auf die eine Entscheidung folgt, ob die gewählte Wellenlänge eines Modells für einen bestimmten Konzentrationsbereich angewendet werden kann. Im linearen Bereich ist die Steigung des Detektorsignals bei Konzentrationsänderungen in der Regel maximal. Oberhalb des linearen Bereiches nimmt die Steigung sukzessive ab, bis es im

Wesentlichen keine Änderung des Detektorsignals bei weiterer Konzentrationserhöhung gibt. Der nicht-lineare Bereich kann weiterhin ausgewertet werden, allerdings ist in diesem Bereich die Vorhersagegenauigkeit geringer und es liegt eine höhere Komplexität des Modells vor, beispielsweise aufgrund von zusätzlichen Hauptkomponenten. Standard MVDA Verfahren stellen in der Regel multilineare Verfahren dar und daher können diese Nichtlinearitäten bzw. nicht linearen Bereiche nicht optimal modelliert werden. Deshalb eignen sich insbesondere lineare Bereiche der Auftragung zur Bestimmung einer unbestimmten Konzentration einer Substanz.

[0110] Ein Datensatz zur Modellierung umfasst eine Vielzahl an Spektren von Proben mit bekanntem Analytgehalt (z.B. Protein). Eingangsgrößen sind eine Vielzahl von Intensitäten bei verschiedenen Wellenlängen (X-Werte) sowie Referenzwerte, wie beispielsweise Proteingehalt bzw. -Konzentration (Y-Werte). Der Algorithmus findet Korrelationen im multivariaten Raum der X-Werte, die dem Verlauf der Y-Werte entsprechen. Es wird insbesondere auf das Fachbuch „Multi- and Megavariate Data Analysis - Basic principles and Applications“ (3rd Edition) von L. Eriksson et al. verwiesen, in dem (insbesondere 4. Kapitel) eine ausführliche Einführung zur Modellierung, insbesondere mittels PLS zu finden ist.

[0111] Im folgenden Schritt **103** wird eine Online-Messung bzw. eine Echtzeitmessung mindestens eines Probenspektrums einer Probe bzw. eines Mediums erfasst, das insbesondere die zu bestimmende Substanz umfasst. Der Begriff Online-Messung bzw. Echtzeitmessung bezieht sich auf den Umstand, dass das Medium bzw. die Probe unmittelbar vor und/oder nach und/oder während eines Prozesses untersucht wird, sodass dynamisch bzw. unmittelbar auf Basis der ermittelten Konzentration der Substanz auf ein oder mehrere Prozessparameter Einfluss genommen werden kann.

[0112] Im Schritt **104** wird das Probenspektrum, das in Schritt **103** aufgenommen wurde in mindestens ein geeignetes Modell eingeordnet bzw. diesem zugeordnet. Mögliche Methoden zur Klassifizierung umfassen z.B. PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), SIMCA-Berechnungen (Soft Independent Modeling of Class Analogy) der euklidischen Distanzen oder ein Dendrogramm. Das Probenspektrum wird mit den Spektrensätzen der einzelnen Modelle verglichen und eine Einordnung nach bestem Fit bzw. nach bestem Fitergebnis getroffen. In anderen Worten werden insbesondere zumindest ein, bevorzugt jedoch mehrere Absorptionswerte eines Probenspektrums mit den entsprechenden Absorptionswerten der Spektren verschiedener Modelle verglichen.

[0113] Zusätzlich oder alternativ kann die Einordnung auch auf Prozesswissen bzw. bekannten Pro-

zessparametern basieren, z.B. auf bekannten Konzentrationsbereichen des Prozessschrittes.

[0114] Das Probenspektrum ergibt sich insbesondere aus einer Messung, insbesondere aus einer online Messung im Prozess. Ein optimal anzuwendendes Modell kann insbesondere ausgewählt werden. Ein Kriterium kann beispielsweise die zu erwartende Konzentration der Probe darstellen. Der Anwender kann aufgrund des Prozesses demzufolge relativ grob einordnen, ob die Konzentration der Probe beispielsweise bei etwa 15 g/l oder bei etwa 150 g/l liegt, allerdings kann eine feine Einordnung nur mittels des entsprechend gewählten Modells erfolgen. Es kann also unter Umständen ohne zutreffendes Modell nicht abgeschätzt werden, ob die Konzentration bei etwa 12 g/l, 15 g/l oder 17 g/l liegt. Ein geeignetes Modell wäre beispielsweise ein Modell zwischen 5 und 20 g/l.

[0115] Im Schritt **105** wird das Modell auf das Probenspektrum angewandt, um die unbekannte Konzentration der Substanz im Wesentlichen zumindest näherungsweise zu bestimmen bzw. vorherzusagen. Anschließend wird der Vorhersagewert bzw. der bestimmte der Konzentration der Substanz von der Recheneinheit im Schritt **106** ausgegeben und in Schritt **107** an die Prozesssteuerung weitergegeben bzw. gesandt. Auf Basis des ermittelten Konzentrationswertes kann somit die Prozesssteuerung, an die dieser Wert weitergegeben wird, im Schritt **108** auf den Prozess in gewünschtem Maße Einfluss nehmen. Somit lässt sich ein Prozess basierend auf einem bestimmten Vorhersagewert steuern und/oder regeln.

[0116] In anderen Worten wird im Schritt **104** ein aktuelles Spektrum bzw. ein Probenspektrum zu einem passenden Modell zugeordnet. Unter Zuhilfenahme des gewählten Modells wird unter Schritt **105** die aktuelle bzw. die zu bestimmende Konzentration der Substanz bestimmt. Unter Schritt **106** wird der ermittelte Wert für die Konzentration der Substanz an ein Interface bzw. an eine Schnittstelle ausgegeben und im Schritt **107** an eine Kontrolleinheit weitergegeben. Auf Basis des ermittelten Konzentrationswertes kann die Prozesssteuerung, die den Vorhersagewert erhält, im Schritt **108** auf den Prozess, insbesondere auf einen oder mehrere Prozessparameter in gewünschtem Maße Einfluss nehmen.

[0117] Die Modellierung, insbesondere die Generierung mehrerer quantitativer Modelle auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben unterscheidet sich ausdrücklich von einer üblichen Kalibrierung. Eine typische Kalibrierung kann beispielsweise im Wesentlichen auf einer linearen Regression zwischen einer Wellenlänge und einer Proteinkonzentration basieren. Eine lineare Regression basiert im Wesentlichen auf einem Fit bzw. einer Abgleichsrechnung mit einem linearen Modell. Eine Kalibrierung kann auch auf nicht linearen Modellen basieren. Die hier be-

schriebene Modellierung basiert hingegen insbesondere auf PLS-Modellen.

[0118] Insbesondere basieren PLS-Modelle („Partial Least Squares“) auf den Hauptkomponenten zweier Matrizen X und Y. Dabei sollen für die Matrizen X und Y jeweils die Hauptkomponenten getrennt berechnet werden, um ein Regressionsmodell zwischen den Einträgen bzw. Scores der Hauptkomponenten (und nicht den Originaldaten) zu erstellen. Die Matrix X wird dazu in eine Matrix T (die „Score“-Matrix) und eine Matrix P' (die „Loadings“-Matrix) plus einer Fehlermatrix E zerlegt. Die Matrix Y wird in die Matrizen U und Q und den Fehlerterm F zerlegt. Diese zwei Gleichungen können als die „äußeren Beziehungen“ bezeichnet werden. Das Ziel von PLS ist es, insbesondere die Norm von F zu minimieren und gleichzeitig eine Korrelation zwischen X und Y zu erhalten, in der die Matrizen U und T wie folgt in Beziehung zueinander gesetzt werden: $U = BT$. Diese Gleichung kann auch als die „innere Beziehung“ bezeichnet werden.

[0119] Die Steuerung kann insbesondere Ventile und Pumpen aufweisen. Andernfalls kann das entsprechende gesammelte Volumen verworfen werden, insbesondere, wenn es Verunreinigungen aufweist. Darüber hinaus können mittels entsprechender Zugaben von Substanzen Änderungen hinsichtlich des pH-Wertes, der Leitfähigkeit, der Konzentration und/oder anderer Parameter erzielt werden und insbesondere können diese und/oder andere Parameter geregelt werden.

[0120] Mit dem Begriff Spektrum ist im Wesentlichen das Absorptionsspektrum gemeint. Der Begriff kann sich jedoch auch auf ein Intensitätsspektrum beziehen, sofern keine Absorptionsspektroskopie betroffen ist. Dies ist beispielsweise der Fall für die Raman Spektroskopie, bei keine Absorbanz von Licht, sondern Licht mit einer „verschobenen“ Wellenlänge gemessen wird, ausgelöst durch die inelastische Streuung von Licht an Molekülen. Ohne auf die UV/vis Spektroskopie beschränkt zu sein, beziehen sich die vorliegenden Ausführungsformen jedoch im Wesentlichen auf die dadurch erzeugten Absorptionsspektren.

[0121] Es werden vorliegend auch hauptsächlich Absorptionsbanden von Proteinen dargestellt und diskutiert. Jedoch kann die Erfindung auch auf allen anderen Substanzen, insbesondere Molekülen basieren, die mittels der Molekülspektroskopie untersucht werden können.

[0122] Der Begriff „Probe“ begrenzt sich nicht auf eine Stichprobe, die ex-situ also außerhalb eines Behälters, beispielsweise außerhalb eines Bioreaktors untersucht werden kann. Vielmehr bezieht sich der Begriff Probe auf das Medium, insbesondere eine Flüssigkeit, ein Gas, einen Feststoff und/oder ein be-

liebigen Gemisch daraus, welches die Substanz umfasst und sich während der Messung im Wesentlichen innerhalb des Behälters befindet. Die Messung der Probe erfolgt insbesondere in-situ, also im Wesentlichen innerhalb des Behälters, in dem auch der Prozess erfolgt. Insbesondere wird die Probe auch nicht verworfen sondern verbleibt im Wesentlichen mit dem gesamten Medium in dem Behälter und bleibt ggf. allen weiteren Prozessschritten ausgesetzt. Eine Probe ist ggf. kein identisches Medium. Das heißt, mit Probe kann das Medium gemeint sein, die zufälligerweise in die Messzelle, beispielsweise in eine Flusszelle, gelangt und dort analysiert wird. Die Moleküle und oder Atome müssen nicht zwingend bei jeder Messung einer dauerhaften Überwachung dieselben sein, vielmehr bestimmt sich die Probe bei jeder Messung durch Zufall. Bei Messung in Behältern ist die Probe insbesondere repräsentativ zum Bulk. Bei einer Messung in Schlauchleitungen ist die Probe insbesondere repräsentativ zur Menge in dem entsprechenden Schlauchbereich.

[0123] Host cell proteins (HCPs) können prozessbedingte Verunreinigungen sein, die von der Wirtszelle (host cell), die zur Herstellung von biopharmazeutischen Proteinen verwendet wird, exprimiert werden. Die Hostzelle kann einerseits HCPs exprimieren oder sie besteht andererseits selbst aus HCPs, die bei Zellaufschluss oder Zelltod frei gesetzt werden. Während des Reinigungsprozesses wird üblicherweise der Großteil der HCPs entfernt (insbesondere > 99%). Gegebenenfalls können die restlichen HCP-Mengen jedoch in den Produkten verbleiben, wie unter anderem monoklonale Antikörpern (mAbs), Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs), therapeutische Proteine, Impfstoffe und andere proteinbasierte Biopharmazeutika.

[0124] Ein UV/vis-Spektrometer, das dazu ausgelegt ist, im Wesentlichen spektrale Information zu erfassen, kann eine breitbandige Lichtquelle aufweisen. Andererseits kann ein im Wesentlichen breitbandiges Emissionsspektrum auch durch den Einsatz mehrerer schmal- und/oder breitbandig emittierender Lichtquellen erzeugt werden. Ein Beispiel für eine im Wesentlichen breitbandig emittierende Lichtquelle ist eine Deuterium-Lampe (D₂-Lampe) oder eine Halogen-Lampe.

[0125] Der Begriff „schmalbandig“ hinsichtlich des Emissionsspektrums einer LED-Lichtquelle bezieht sich auf Lichtquellen, die elektromagnetische Strahlung emittieren mit einer FWHM (spektrale Halbwertsbreite) von Werten, die kleiner als etwa 50 nm, insbesondere kleiner als etwa 30 nm und besonders bevorzugt kleiner als etwa 15 nm sind. Beispielsweise ist eine Lichtquelle mit einer FWHM von etwa 10 nm eine schmalbandige Lichtquelle. Oft wird eine oder werden mehrere schmalbandig emittierende Lichtquellen verwendet, um die Extinktion und ent-

sprechend eine Konzentration eines ganz bestimmten Stoffs zu ermitteln, der bei einer ganz bestimmten Wellenlänge elektromagnetische Strahlung absorbiert. Ein Beispiel für eine Verwendung mehrerer solcher Lichtquellen basiert auf zwei Lichtquellen mit jeweils einer FWHM von etwa 10 nm, die jeweils maximale Emissionswerte bzw. Peakwellenlängen bei etwa 250 nm und etwa 280 nm aufweisen.

[0126] Entsprechend der gewählten Lichtquelle und des entsprechenden Emissionsspektrums, egal ob schmal- oder breitbandig emittierend, kann der Sensor ausgewählt werden, um zumindest einen Teil des Emissionsspektrums erfassen zu können. In anderen Worten ist es sinnvoll, dass das Emissionsspektrum der Lichtquelle sich mit dem sensitiven Bereich des Sensors überschneidet, insbesondere zu mehr als etwa 50 % und bevorzugt zu mehr als etwa 70 %.

[0127] Auch Sensoren können insbesondere Sensorelemente mit unterschiedlichen sensitiven Wellenlängenbereichen aufweisen, die dazu ausgelegt sind, in jeweils in zueinander nicht identischen Wellenlängenbereichen elektromagnetische Strahlung erfassen zu können.

[0128] Die Lichtquelle bzw. Lichtquellen, egal ob schmal- oder breitbandig emittierend, ist bzw. sind bevorzugt dazu ausgelegt in einem Wellenlängenbereich elektromagnetische Strahlung zu emittieren, die für den Menschen sichtbar ist, also zwischen etwa 380 nm und etwa 780 nm und im UV-Bereich liegt, also zwischen etwa 10 nm und etwa 380 nm.

[0129] Alternativ oder zusätzlich kann die Lichtquelle auch dazu ausgelegt sein, elektromagnetische Strahlung im Infrarot-Bereich, also zwischen etwa 780 nm und etwa 50 µm zu emittieren.

[0130] Der Sensor kann, wie bereits beschrieben auf den Emissionsbereich abgestimmt sein.

[0131] Im Folgenden werden weitere Ausführungen und Merkmale in anderen Worten genannt, wobei diese Merkmale insbesondere kombinierbar mit vorherigen Merkmalen sind.

[0132] Ein beispielhaftes Verfahren zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses kann wie folgt ablaufen:

1. Detektion von UV-Vis Spektren einer Konzentrationsreihe
2.
 - a. Erstellung von auf verschiedenen Wellenlängenbereichen beruhenden Modellen, dabei wird die höchste Konzentration einer Probe innerhalb eines Modells durch die maximale Absorbanz in dem entsprechenden Wellenlängenbereich bestimmt (Modell 1 mit Fokus auf 224 nm beinhaltet

tet nur die Proben von 0-2 g/l, Modell 5 mit Fokus auf 300 nm beinhaltet alle Proben zwischen 0 und 200 g/l

b. Alternativ zu 2a können auch zunächst verschiedene Kalibrationsdatensätze aus der Konzentrationsreihe erstellt werden. Aus denen werden dann über statistische Methoden (z.B. PLS) verschiedene Modelle erstellt. In diesem Fall wird der Algorithmus die Wellenlängenbereiche für jeden Kalibrationsdatensatz neu festlegen (und wird so bei Modellen mit hohen Proteinkonzentrationen hauptsächlich Wellenlängen in der Flanke der Proteinbande auswählen (und auch die Bande bei 224nm nicht verwenden)

3. Online Messung im Prozess

4. Klassifizierung des online Spektrums mit den Modellen und Auswahl des am besten passendsten Modell. Hierbei können Algorithmen wie PLS-DA oder die Berechnung der euklidischen oder Mahalanobis Distanz oder SIMCA eingesetzt werden

5. Anwendung des Modells auf das online Spektrum

6. Alternativ zu 4 und 5 ist bei jeder unit operation der benötigte Messbereich klar. Mit diesem Wissen kann auch das valide Modell selbst ausgewählt werden.

[0133] Gleichzeitig wird durch die Erfassung des kompletten UV-Vis Spektrums eine Kreuzempfindlichkeit zwischen DNA und Protein verringert oder vermieden und es kann gelingen, HCPs und Zielprotein getrennt zu erfassen. **Fig. 6** zeigt die Vorhersage gegenüber dem Referenzwert für DNA bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Die Färbung der einzelnen Punkte entspricht den verschiedenen Proteingehalten der Probe. Der Modellfehler ist trotz der stark unterschiedlichen Proteinkonzentrationen akzeptabel. Die Kreuzempfindlichkeit ist gering.

[0134] Im Downstream Prozess sind Protein- und DNA-Konzentrationen in der Regel wichtige Parameter, die in der gesamten Prozesskette immer wieder bestimmt werden. Diese Bestimmung erfolgt konventionell meist offline durch die Messung der UV-Vis Absorbanz mit der Anregung einzelner Wellenlängen (z.B. mit schmalbandig emittierenden LEDs).

[0135] Abhängig vom Prozessschritt unterscheiden sich die Proteinkonzentrationen erheblich (0-200 g/l), weshalb die Proben konventionell meist nur in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen werden können. Verfügbare Online Sensoren erlauben aufgrund des limitierten dynamischen Bereichs (Bereich innerhalb dem im Wesentlichen keine Sättigung auftritt) der Detektoren z.B. eine Bestimmung von Proteingehalten bis etwa 10 g/l. Dabei muss die optische Pfadlänge je nach Konzentrationsbereich geändert

werden, um ggf. den Detektionsbereich erweitern zu können. Somit kann nicht ein und dieselbe Hardware für alle Anwendungen genutzt werden. Weiterhin zeigen bestehende UV-Sensoren eine erhebliche Kreuzempfindlichkeit zwischen DNA und Protein. Eine Erhöhung der DNA Konzentration führt somit auch zu einem höheren gemessenen Proteingehalt.

[0136] Es sei jedoch erwähnt, dass auch auf übliche Weise ein Sensor bis Konzentrationen von etwa 50 g/l detektieren kann, wenn die Pfadlänge entsprechend verkleinert wird. Es muss also vorab entschieden werden, ob eine höhere Empfindlichkeit und ein limitierter Konzentrationsbereich oder einen breiteren Konzentrationsbereich und geringere Empfindlichkeit erzielt werden soll. Dies wird dann vorab durch die Wahl der Pfadlänge festgelegt. Das erfindungsgemäße Verfahren hat hingegen den Vorteil, dass ohne Änderung der Hardware im Nachhinein entschieden werden kann, ob eine hohe Empfindlichkeit oder einen höheren Konzentrationsbereich oder höhere Konzentrationen generell gemessen werden soll.

[0137] Wie oben bereits erwähnt, gibt es in konventionellen Systemen Online-UV-Sensoren, die mit 1 oder 2 einzelnen Wellenlängenbereichen arbeiten (Optek, Pendotech), die aber bereits bei relativ niedrigen Proteinkonzentrationen gesättigt sind und deshalb einen geringen dynamischen Bereich aufweisen (siehe „Classic UV meter maxed out“ in FlowVPE.pptx). Die Wellenlänge der Absorbanz verschiedener Proteine kann variieren. Bestehende Systeme passen die Anregungs- und/oder Detektionswellenlänge i.d.R. nicht an das aktuell zu messende Protein an bzw. die Anregungswellenlänge muss vorab definiert werden und kann nicht ad hoc softwareseitig je nach Applikation geändert werden. Somit kann das Protein ggf. zufällig im Maximum der Absorptionswellenlänge gemessen werden (höchste Empfindlichkeit), weitaus häufiger wird es aber vorkommen, dass die Anregungsstrahlung in der Flanke der Proteinabsorption liegt (geringere Empfindlichkeit). Aus demselben Grund werden host cell Proteine (HCPs) i.d.R. zusammen mit dem Zielprotein erfasst (Kreuzempfindlichkeit ist nahe 100%). Bei der konventionellen Messung kann nur in dem Fall, dass sich die Absorptionsmaxima und/oder die Bandenbreite oder Bandenform der HCPs vom Zielprotein unterscheiden, die Erfassung des gesamten Spektrums eine analytische Unterscheidung ermöglichen.

[0138] Hinsichtlich diesen Umstandes wurde alternativ bei der UV-Transmissionsmessung zuvor auch eine Faser beweglich gestaltet, sodass die Pfadlänge reproduzierbar variiert werden kann und auch weitaus kleiner als die bei UV-Sensoren übliche minimale Pfadlänge von beispielsweise etwa 1 mm gewählt werden kann. Auf diese Weise lassen sich auch Proteinkonzentrationen über 100 g/l erfassen. Allerdings muss der Abstand zwischen den Fasern hoch präzise

und reproduzierbar einstellbar sein. Weiterhin ist eine Umsetzung aufgrund der komplexen Messanordnung nur unter Umständen auf den Einsatz in Single-Use Systemen übertragbar.

[0139] Das hierin beschriebene Verfahren zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses basiert insbesondere auf der Messung von kompletten Absorptionsspektren - statt einzelner Wellenlängenbereiche - bevorzugt unter Verwendung einer Flusszelle mit konstanter optischer Pfadlänge. Eine bevorzugte Flusszellendicke bzw. Probenschichtdicke liegt bei etwa 1 mm. Abhängig vom zu messenden Konzentrationsbereich werden insbesondere verschiedene multivariate Modelle (z.B. PLS mit Protein als Zielgröße und den Absorptionswerten des jeweiligen Spektralbereichs als Eingangsgrößen) erstellt, die auf der Auswertung verschiedener Wellenlängenbereiche bestehen.

[0140] Diese Wellenlängenbereiche können entweder selbst ausgewählt werden oder wobei alle gewählten Wellenlängenbereiche durch die Absorbanz des Zielanalyten (DNA oder Protein) beeinflusst werden.

[0141] Die Erfindung erlaubt eine präzise Bestimmung von Konzentrationen für DNA und/oder Proteine. Dabei werden insbesondere Absorptionsspektren (anstelle von Werten bei diskreten Wellenlängen) in einer Zelle bei einer konstanten optischen Pfadlänge von beispielsweise etwa 1 mm erfasst. Insbesondere erfolgt eine Zusammenstellung eines Datensatzes zu einem Konzentrationsbereich und ein Generieren multivariater Modelle hinsichtlich der Ergebnisse innerhalb verschiedener Wellenlängenbereiche. Ausgewählte Wellenlängenbereiche zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber DNA und/oder Protein. Einzelne Wellenlängenbereiche haben unterschiedliche Empfindlichkeiten. Der Dynamikbereich (dynamic range) ist unterschiedlich.

[0142] In **Fig. 2** ist Modell 1 beispielsweise der Absorbanz bei höchster Empfindlichkeit zugeordnet, wobei der Dynamikbereich entsprechend begrenzt ist. Modell 4 wird bei reduzierter Empfindlichkeit erzeugt, aber der zu verwendende Konzentrationsbereich kann ausgedehnt werden. Die Bestimmung der Konzentrationswerte erfolgt durch Vergleich der gesammelten Daten mit vorab festgelegten Modellen.

[0143] Dies erlaubt eine besonders einfache Bestimmung von Protein- und DNA-Konzentrationen im Downstream-Prozess und ermöglicht, die in der Praxis stark variierenden Konzentrationsbereiche von DNA und Protein zu erfassen. Darüber hinaus erlaubt die Erfindung die Vermeidung der üblicherweise erforderlichen Verdünnung der Proben bei der Messung hinsichtlich des begrenzten Dynamikbereichs des Sensors. Darüber hinaus kann die Kreuzemp-

findlichkeit bei der Messung zwischen DNA und Protein reduziert bzw. vermieden werden.

Bezugszeichenliste

1	Optisches Spektrum
1_a	Optisches Spektrum von Probe während Prozess vor Aufreinigung
1_b	Optisches Spektrum von Probe während Prozess nach Aufreinigung
2	Absorptionwert(e)
3	Prozess, beispielsweise Downstreamprozess
4	UV/vis Spektrometer
5_a	Medium bzw. Probe im Prozess vor Aufreinigung
5_b	Medium bzw. Probe im Prozess nach Aufreinigung
6	Aufreinigungseinheit
7	Messzelle
8	Optischer Lichtleiter
9	Auswerte-/Recheneinheit
9a	Desktop bzw. Bildschirm
100	Verfahren nach einer Ausführungsform
101	Aufnahme von Spektren einer Konzentrationsreihe
102	Erstellung mehrerer Modelle für einzelne Konzentrationsbereiche
103	Online Messung: Aufnahme eines Probenspektrums während des Prozesses
104	Einordnung des Probenspektrums in ein geeignetes Modell
105	Anwendung des Modells auf das Probenspektrum
106	Ausgabe Vorhersagewert
107	Weitergabe des Vorhersagewertes an Prozesssteuerung
108	Geänderte Prozesskontrolle auf Basis der Vorhersage
λ	Wellenlänge
M₁₋₆	Modelle

Patentansprüche

1. Verfahren zum Steuern bzw. Regeln eines Prozesses (3), insbesondere eines Downstream-Bioprozesses, basierend auf der Vorhersage einer unbekanntem Konzentration von einer oder mehreren Substanzen in einer Probe (5_a, 5_b) mittels Spektroskopie,

insbesondere UV/vis-Spektroskopie, umfassend die Schritte:

Erfassung (101) von Spektren (1) einer Mehrzahl von Konzentrationsproben, wobei mindestens zwei Konzentrationsproben zueinander unterschiedliche Konzentrationen der einen oder der mehreren Substanzen aufweisen;

Generierung (102) mehrerer quantitativer Modelle (M) auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben, wobei die Modelle (M) jeweils eine Zuordnung zumindest einer spektralen Messgröße (2) der Spektren (1) zu Konzentrationen in Konzentrationsbereichen aufweisen, wobei die Konzentrationsbereiche zweier Modelle (M) nicht identisch sind;

Erfassung (103) mindestens eines Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) der Probe (5a, 5b);

Zuordnung (104) des Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) zu mindestens einem quantitativen Modell (M) der generierten quantitativen Modelle (M);

Anwendung (105) des mindestens einen quantitativen Modells(M), welches dem Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) zugeordnet wurde, auf das Probenspektrum (1; 1_a, 1_b), um einen Vorhersagewert für die unbestimmte Konzentration zu ermitteln; und

Steuern und/oder Regeln (108) des Prozesses (3) bezüglich mindestens eines Parameters auf Basis des Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spektren eine eindeutige Zuordnung der spektralen Messgröße (2) zu mehreren Wellenlängen (λ) umfasst und vorzugsweise zumindest eine Teilmenge der spektralen Messgröße (2), die den entsprechenden Wellenlängen (λ) zugeordnet ist, keine detektorseitige Sättigung aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die quantitativen Modelle (M) zumindest ein globales Modell (M) umfassen.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die quantitativen Modelle (M) hierarchisch organisierte Modelle (M) entsprechend zumindest einer ersten Hierarchiestufe und einer zweiten Hierarchiestufe umfassen, wobei insbesondere die erste Hierarchiestufe ein globales Modell umfasst und die zweite Hierarchiestufe mindestens ein lokales Modell umfasst.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zuordnung des Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) zu mindestens einem quantitativen Modell (M) mittels euklidischer Distanz und/oder Mahalanobis und/oder PLS-DA und/oder SIMCA erfolgt.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Steuern und/oder Regeln bezüglich des mindestens einen Parameters erfolgt und der Parameter mindestens einen aus den folgenden Parametern umfasst: eine Ventilschaltung,

eine Pumpensteuerung, einen Medienfluss, einen Mediendruck, einen Gasdruck, einen pH-Wert, einen Filtrierungsschritt, einen Fraktionierungsschritt, eine Zeitsteuerung, eine Prozesszeiteinstellung, eine Temperatur, eine Ionenkonzentration, einen Chromatographie-Schritt.

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Erfassung des mindestens einen Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) der Probe (5a, 5b) in- oder online erfolgt und das Steuern und/oder Regeln bevorzugt auch während des Prozesses erfolgt als unmittelbare Folge des ermittelten Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Generierung quantitativer Modelle (M) mittels multivariater Modellerstellung, insbesondere mittels multivariater Regression wie bevorzugt mittels MLR, und/oder PLS und/oder OPLS erfolgt.

9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Teilbereich, insbesondere einzelne Wellenlängen (λ) der Spektren (1) der Mehrzahl der Konzentrationsproben durch eine Gewichtung abgeschwächt oder ausgeschlossen werden.

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Teilbereich, insbesondere einzelne Wellenlängen (λ) der Spektren (1) der Mehrzahl der Konzentrationsproben, bevorzugt Teilbereiche für die eine lineare Abhängigkeit zwischen Wellenlängen (λ) und Messwerten vorliegen, für die Anwendung auf das Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) stärker gewichtet werden, wobei die Gewichtung manuell oder mittels eines Algorithmus, insbesondere Faktoranalyse Regressionen in PLS und/oder OPLS.

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Erfassung einer Vielzahl von Proben-Messwerten bei einer einzigen im Wesentlichen identischen Spaltbreite einer oder mehrerer Messzelle/n erfolgt.

12. Vorrichtung zum Steuern und/oder Regeln eines Prozesses, insbesondere eines Downstream-Bioprozesses (3), basierend auf der Vorhersage einer unbestimmten Konzentration von mindestens einer Substanz in einer Probe (5a, 5b) mittels Spektroskopie umfassend

Mindestens eine Schnittstelle zum Erhalt von Spektren einer Mehrzahl von Konzentrationsproben der mindestens einen Substanz und von mindestens einem Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) der Probe (5_a, 5_b);
Mindestens eine Einheit zur
Generierung quantitativer Modelle (M) auf Basis der Spektren der Konzentrationsproben,

Zuordnung des Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) zu mindestens einem quantitativen Modell (M) der generierten quantitativen Modelle (M); und

Anwendung des mindestens einen quantitativen Modells (M), welches dem Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) zugeordnet wurde, auf das Probenspektrum (1; 1_a, 1_b), um einen Vorhersagewert für die unbestimmte Konzentration zu ermitteln;

Mindestens eine Prozesseinheit zum Steuern und/oder Regeln des Prozesses bezüglich mindestens eines Parameters auf Basis des Vorhersagewertes für die unbestimmte Konzentration.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, ferner umfassend ein Spektrometer (4) zur Erfassung der Spektren der Mehrzahl von Konzentrationsproben der mindestens einen Substanz und/oder des mindestens einen Probenspektrums (1; 1_a, 1_b) der Probe (5_a, 5_b).

14. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, ferner umfassend eine Messzelle, insbesondere eine Einweg-Messzelle, die dazu ausgelegt ist, die Probe (5_a, 5_b) mit der Substanz aufzunehmen und zu leiten und an der das mindestens eine Probenspektrum (1; 1_a, 1_b) erfasst werden kann.

15. Computerprogrammprodukt, umfassend computerlesbare Befehle, die bei der Ausführung des Programms durch ein geeignetes computergestütztes System dieses veranlassen, die Schritte des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 auszuführen.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

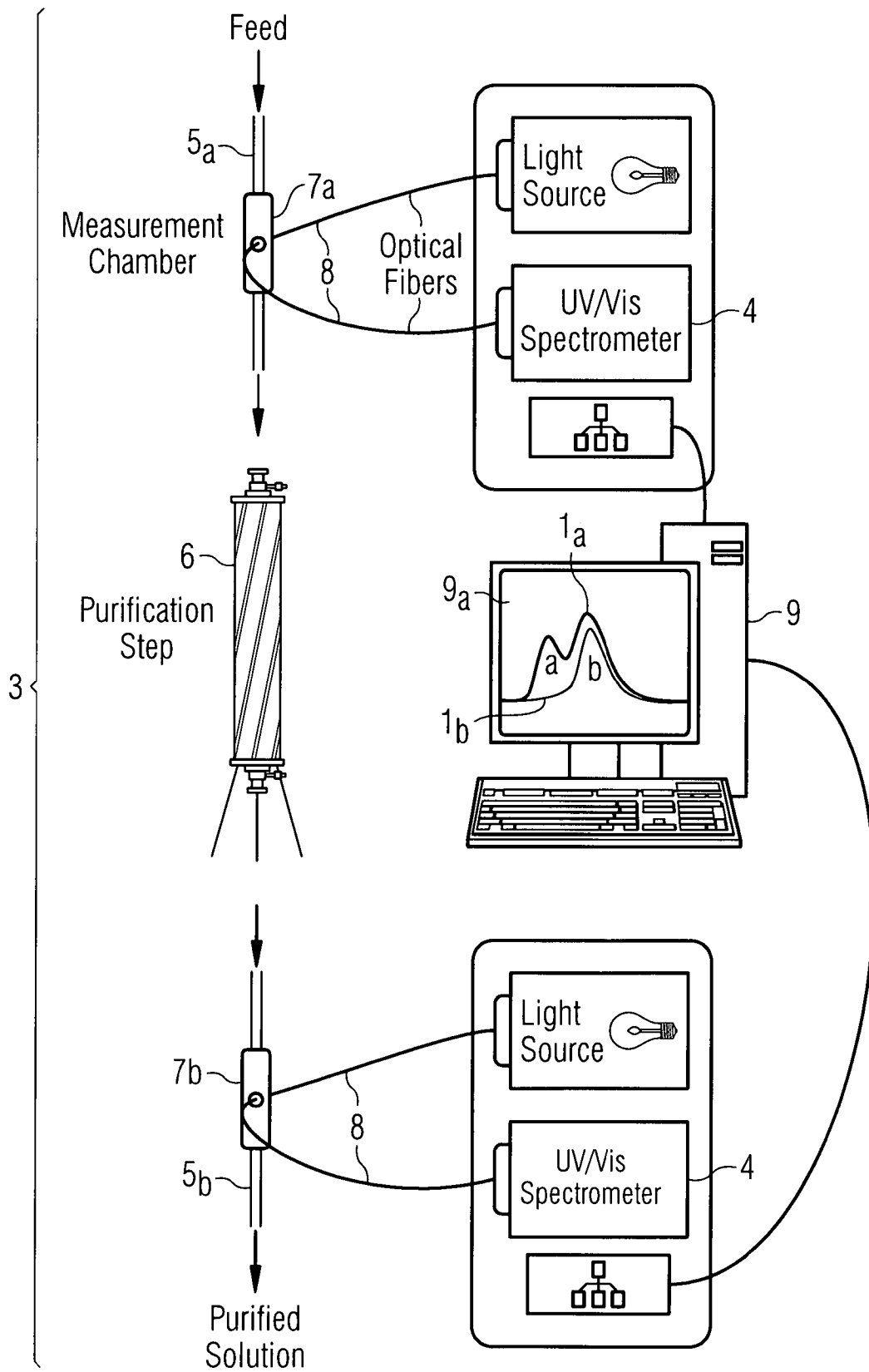


FIG 2

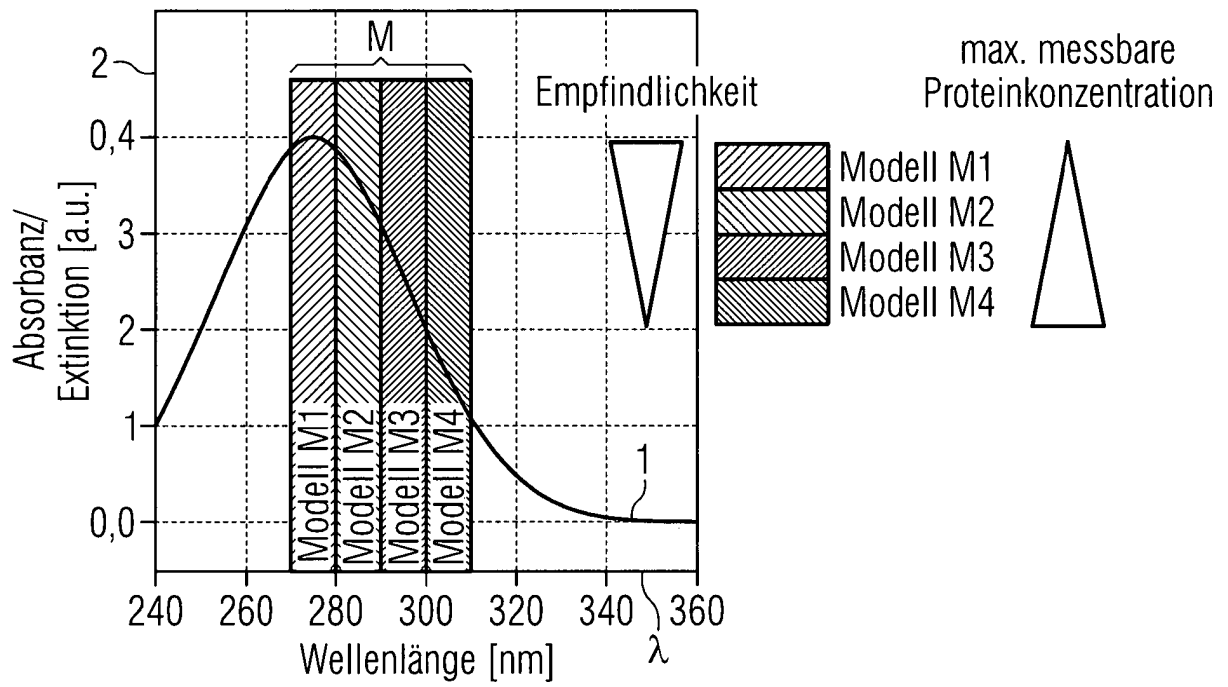


FIG 3

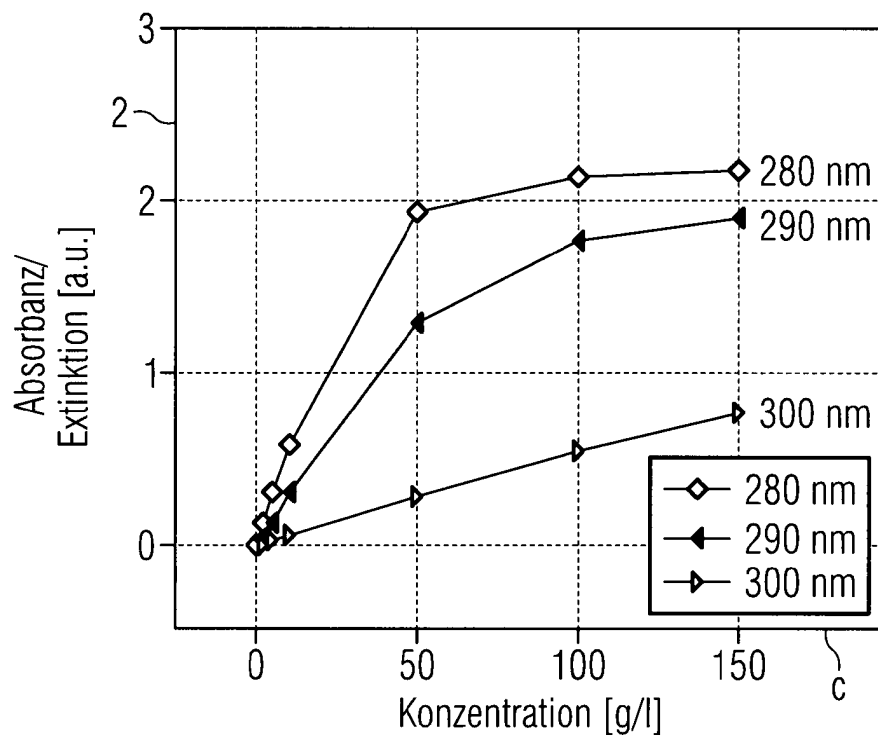


FIG 4

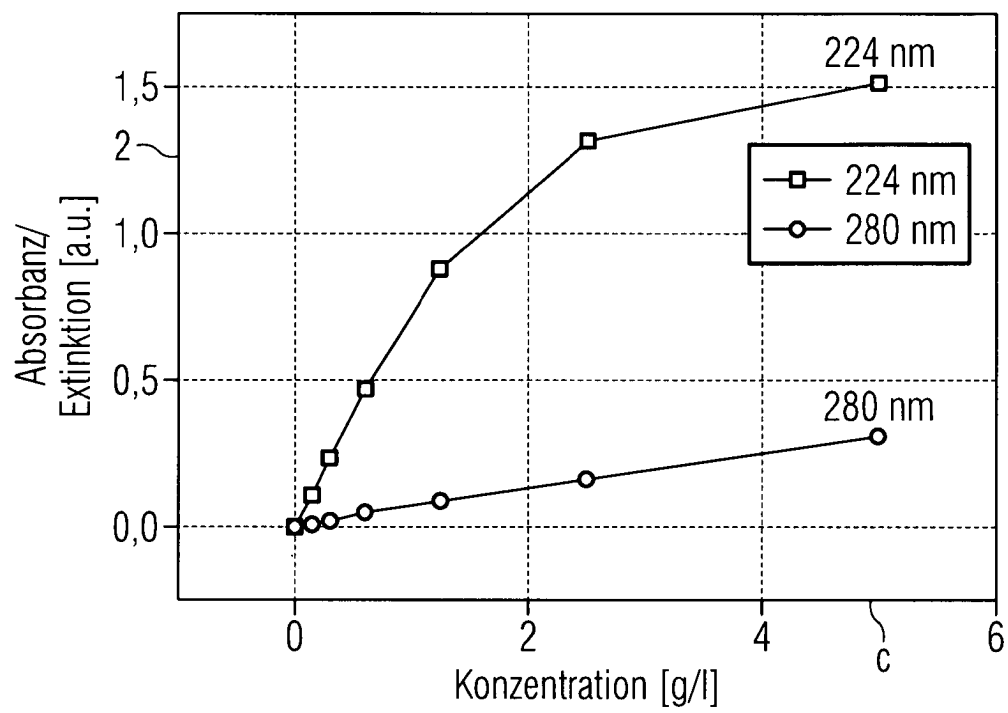


FIG 5

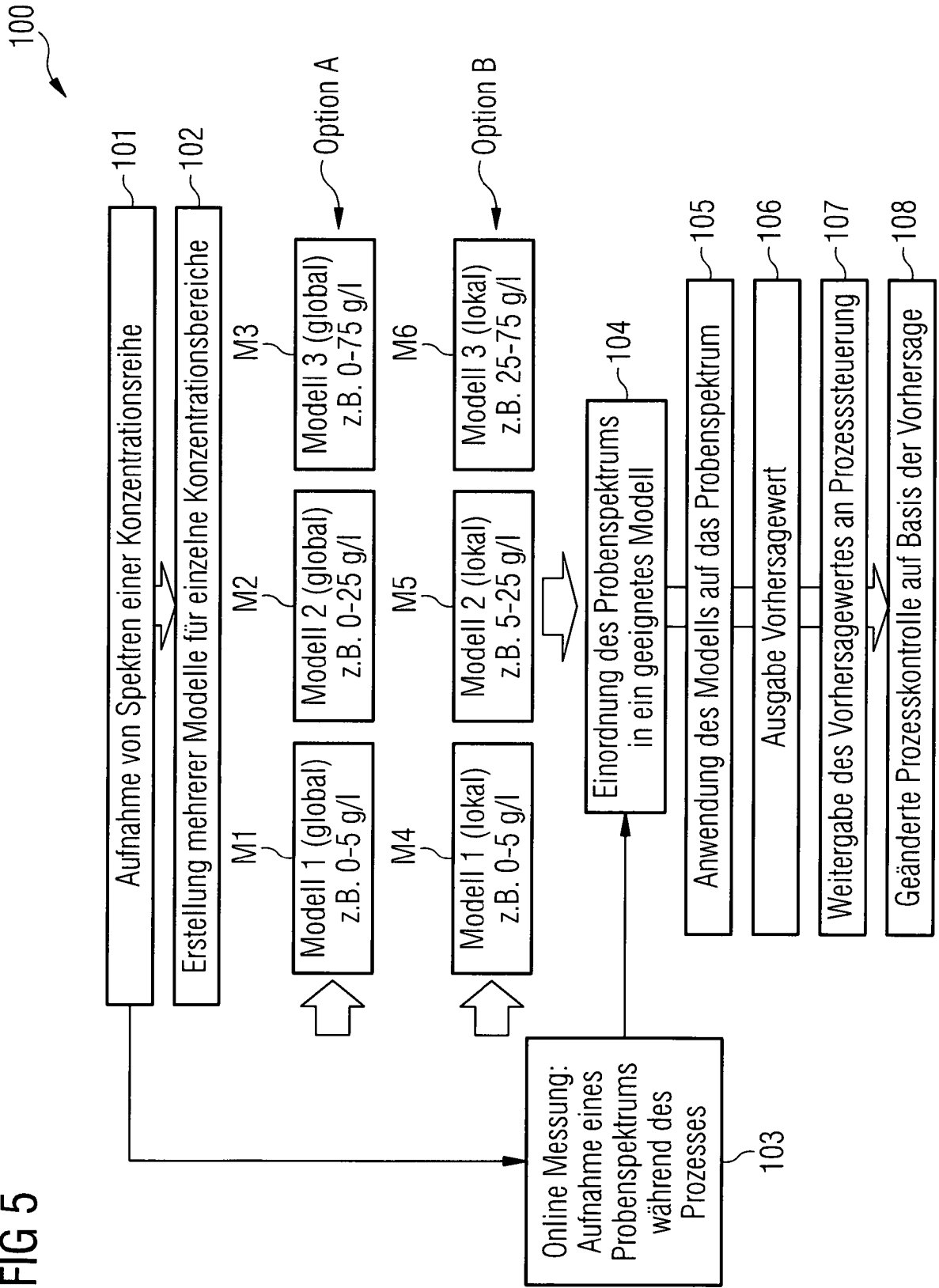


FIG 6

