

Процессно- аналитическая технология в фармацевтике

Показатели качества, критические параметры процесса и ключевые производственные индикаторы для биореакторов

Май 2018

Содержание

Составляющие процессно-аналитической технологии	3
Процессно-аналитическая технология для биофармацевтики	5
Типы культур и процессов ферментации	6
Методы мониторинга	8
Критические параметры процесса	10
Критические показатели качества и ключевые производственные индикаторы ...	14
Последняя информация по измерению VCD и TCD в потоке (реакторе)	17
Заключение	19
Список литературы	20

В центре внимания

Микропроцессорные датчики Arc для измерения pH и DO в потоке (биореакторе)	10
Примеры практического применения датчиков растворенного кислорода	11
Определение плотности клеток в потоке (биореакторе) в периодическом и перфузионном процессе производства моноклональных антител	16
Точное управление ферментацией культур клеток млекопитающих за счет мониторинга процесса в потоке (биореакторе)	18

Составляющие процессно-аналитической технологии

Инициатива развития процессно-аналитической технологии (РАТ) берет свое начало с директивных указаний Управления США по санитарному надзору за пищевыми продуктами и медикаментами (FDA)^[1], опубликованных в 2004 году. Она является частью более общей концепции «Правила организации производства и контроля качества в фармацевтике в 21 веке – Подход на основе анализа рисков»^[2]. Основная цель этой концепции состоит в снижении возможных рисков для здоровья населения, обусловленных процессами производства продуктов фармацевтики. Инициатива РАТ привела к созданию нормативно-правовой базы, призванной содействовать добровольному созданию и внедрению инноваций в области разработки, производства и обеспечения качества фармацевтической продукции. Она направлена на улучшение понимания и управления производственным процессом для обеспечения качества, закладываемого еще при разработке проекта. Качество должно быть «встроено» в продукт за счет знаний его особенностей и процесса его разработки и изготовления, а также производственных рисков и путей их снижения. Реализация технологии РАТ начинается с определения критических показателей качества (КПК) каждого продукта, после чего осуществляется систематический мониторинг соответствующих критических показателей процесса (КПП) и ключевых производственных индикаторов (КПИ), который позволяет автоматически удерживать их в заранее заданных пределах. Взаимосвязь КПК, КПП и КПИ дана в их определениях, представленных в литературе по технологии РАТ: ^{[3], [4]}

- Критический показатель качества (КПК): физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которое должно находиться в допустимых пределах или иметь определенное распределение для обеспечения необходимого качества продукта.
- Критический параметр процесса (КПП): параметр технологического процесса, изменения которого влияют на критический показатель качества и который поэтому должен контролироваться или регулироваться для обеспечения необходимого качества в данном процессе.
- Ключевой производственный индикатор (КПИ): показатель, отражающий результат работы каждого этапа производственного цикла. Показатели КПИ связаны с КПК и поэтому зависят также от КПП. Когда КПП остается в допустимых пределах, КПИ будет показывать, что каждый этап производства проходит правильно, а КПК конечного продукта будет также находиться в допустимом диапазоне.

Непосредственно определить КПК в процессе производства пока еще сложно. На этапах подготовки сырья и ферментации (далее – процесс ферментации) и выделения и очистки продукта (далее – процесс выделения) технологического цикла обычно осуществляется мониторинг КПП и КПИ, связанных с показателями качества. Для этой цели в технологии РАТ рекомендуется использовать следующий инструментарий.

- Многопараметрические инструменты для разработки технологии, сбора и анализа данных
- Анализаторы процесса (например, встраиваемые датчики или автоматизированные системы оперативного отбора и анализа проб)
- Средства управления процессом (например, программы статистического контроля производственных процессов)
- Средства непрерывного совершенствования и управления знаниями

Эти инструменты в различном сочетании могут использоваться для контроля работы как отдельных единиц оборудования, в том числе биореактора, так и производственного процесса в целом (например, ферментации или выделения). Анализаторы процесса – это средства измерения его параметров. Их выходные данные используются в различных целях, в том числе для создания однопараметрических механических моделей, выявления особенностей процесса или многофакторного анализа, например, с целью определения оптимальных параметров для производства продукта. В настоящем документе основное внимание уделено анализаторам процесса для биореактора. Дан общий обзор наиболее важных рабочих показателей и параметров процесса, а также приведены примеры правильного использования встраиваемых датчиков и работающего с ними оборудования. На рис. 1 представлен пример использования встроенных датчиков процесса.

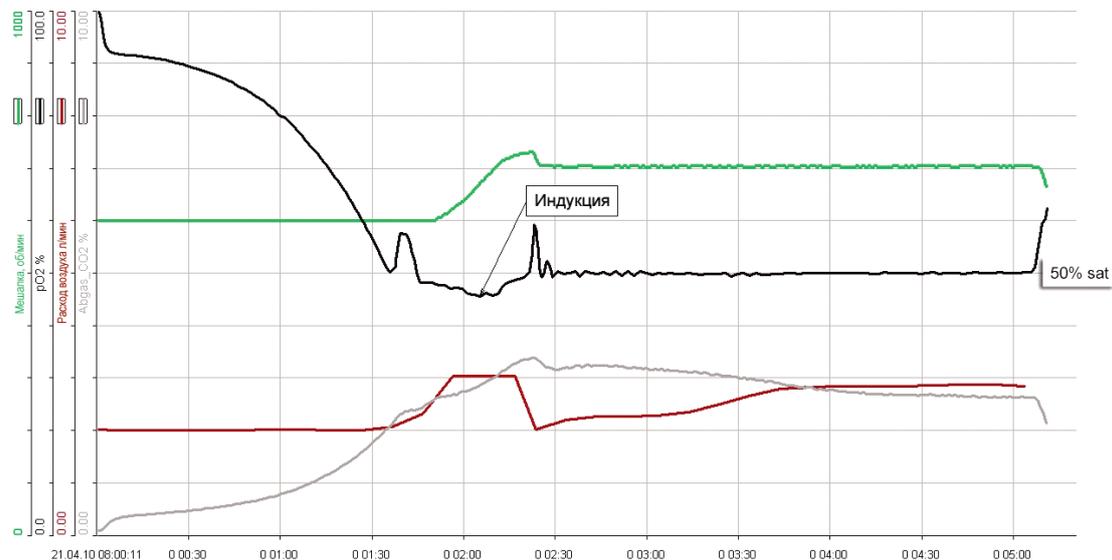
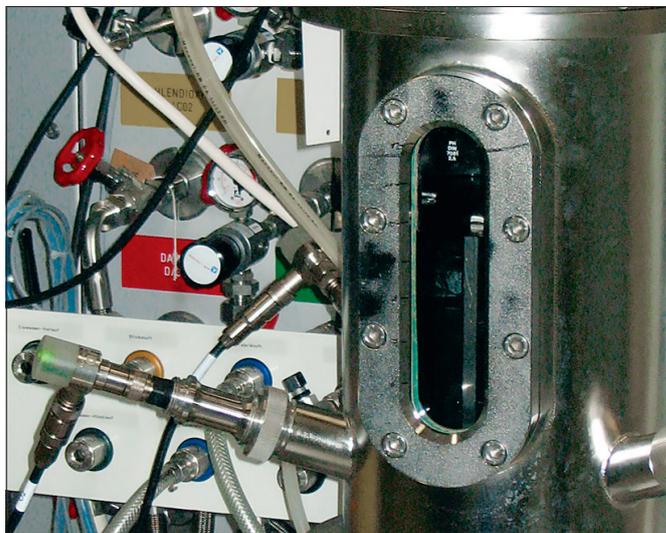
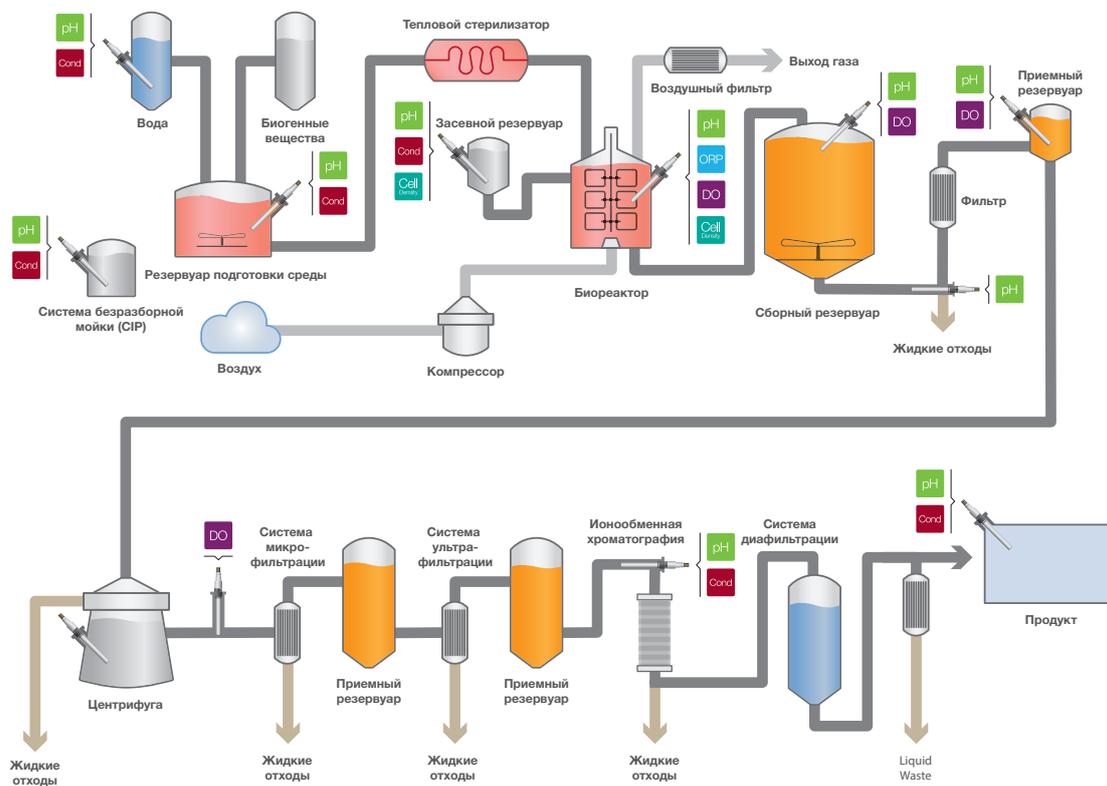


Рис. 1 Пример измерения встроенными датчиками параметров процесса микробиологической ферментации в биореакторе. На графике представлены результаты мониторинга в режиме реального времени КПП – процентного содержания растворенного кислорода (черный график).

Процессно-аналитическая технология для биофармацевтики

процесс ферментации



процесс выделения

Рис. 2 Технологический цикл биофармацевтического производства. На рисунке показаны основные обычно контролируемые в режиме реального времени параметры – pH (зел.), ORP [ОВП] (голуб.), DO [содержание растворенного кислорода] (фиол.), Cond [электрическая проводимость] (красн.) и КПИ – Cell Density [плотность клеток] (бирюз.).

Технология производства продуктов биофармацевтики достаточно сложна^[5]. Эта сложность обусловлена гетерогенностью биопроцессов. В процессе ферментации гетерогенность возникает из-за наличия клеток, которые являются живыми организмами. При условии минимальных изменений окружающей среды они обеспечивают большой или меньший выход продукта с находящимся в допустимых пределах качеством. То есть, с достаточной для проявления ожидаемого лечебного эффекта биологической активностью подвергнувшихся конформации молекул. Характерная для процесса ферментации гетерогенность переходит и на этапы последующей очистки продукта в процессе его выделения.

В научной литературе^[6] уже имеется описание того, как применение ПАТ в таких сложных процессах может обеспечить существенное повышение эффективности на этапе ферментации за счет контроля соответствующих показателей (например, плотности жизнеспособных клеток). Применение ПАТ на этапе очистки и выделения приводит к повышению качества и чистоты конечного продукта (например, белка, вакцин и т.п.).

Общепризнано, что для правильного применения PAT необходимо переходить от процедур ручного отбора проб и лабораторных измерений к автоматическому управлению процессом^[7]. Поскольку даже минимальные изменения параметров технологического процесса оказывают существенное влияние на качество конечного продукта, управление ими в режиме реального времени сводит к минимуму риск снижения его выхода и чистоты. Осуществление мониторинга в режиме реального времени становится возможным благодаря применению датчиков, стойких к процедурам безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP), которые проводятся с целью снижения риска загрязнения продукта. Это уже используется для контроля основных КПП, таких например, как рН, содержание растворенного кислорода (DO) и диэлектрическая проницаемость (см. рис. 2). Разработаны более совершенные и стойкие в условиях CIP и SIP датчики, позволяющие непосредственно измерять значения КПИ, например, – общую плотность клеток (TCD) и плотность жизнеспособных клеток (VCD). Об этом будет сказано ниже.

Типы культур и процессов ферментации

Биореакторы представляют собой аппараты, используемые для выращивания клеток млекопитающих (например, CHO), микробных (например E. Coli) и дрожжевых или мелких растительных клеток (например клеток мхов). Эти клетки работают как маленькие фабрики, производящие нужные компоненты. В процессе ферментации они превращают питательные вещества типа глюкозы и аминокислот в ценные биофармацевтические препараты – вакцины, моноклональные антитела (мкАТ) и другие терапевтические белки. Такое разнообразие процессов делает применение PAT в биореакторе специфическим для конкретной используемой культуры и определенного типа процесса ферментации^[8].

Культура клеток млекопитающих

Моноклональные антитела и терапевтические белки производятся, в основном, посредством клеток млекопитающих, особенно если лечебный препарат должен восприниматься организмом человека.

Основные клеточные линии: CHO, ВНК и NSO-GS. Эти клетки демонстрируют скорость роста, обеспечивающую удвоение их числа каждые 24 часа. Это относительно невысокая скорость, и мониторинг и регулирование этого процесса упрощаются из-за увеличенной длительности рабочего цикла. Тем не менее, клетки млекопитающих имеют менее прочную оболочку по сравнению с микробными, поэтому они сильнее подвержены изменениям условий технологического процесса, которые требуется постоянно регулировать. Потери партий продукта из-за оборудования, не способного поддерживать необходимые условия в технологическом цикле, обходятся очень дорого^[9]. Неисправности оборудования – особенно в промышленных линиях – сопряжены с огромными финансовыми затратами и ведут к потере партий продукции, повторным исследованиям биопроцессов для удовлетворения требований регуляторных органов и прочим сопутствующим проблемам^[10]. По указанным причинам, технология PAT, с ее возможностью мониторинга в режиме реального времени и автоматического управления, обеспечивает существенное повышение эффективности биопроцессов с использованием клеток млекопитающих.

Культура микробных клеток

Некоторые рекомбинантные белки и вакцины производятся с помощью микробов, например, бактерий ^[11] и дрожжей ^[12]. Применение микробных клеток широко распространено благодаря их устойчивости и простоте культивирования.

По сравнению с клетками млекопитающих микробные клетки обычно имеют более короткое время ферментации, а также более высокую химическую и физическую стабильность белка. Число микробных клеток может увеличиваться вдвое за 20–30 минут, и именно поэтому такие КПП, как pH, DO, плотность клеток и скорость подачи среды должны измеряться с максимально возможной частотой. И здесь опять, для обеспечения, предусмотренного конструкцией качества необходима регулировка в режиме реального времени.

Тип процесса ферментации – периодический

Считается, что периодическая ферментация стала первым из технологических процессов, которые стали использоваться в биотехнологической отрасли. Микроорганизмы вводятся в среду для культивирования клеток в биореакторе, в состав которой были предварительно добавлены питательные вещества типа глюкозы, глутаминовой и других аминокислот и минералы. Полученная среда остается неизменной в течение всего процесса и не дополняется, не пополняется и не заменяется ни на каком этапе производства.

После начальной латентной фазы наступает фаза роста, во время которой количество микроорганизмов резко увеличивается. Далее, после наступления стационарной фазы с неизменным количеством клеток, популяция культуры уменьшается, переходя в фазу гибели. Сокращение популяции может быть связано с истощением питательной среды и накоплением токсичных веществ.

В этом случае технология PAT позволяет контролировать и менять в режиме реального времени критические показатели процесса, например, pH, DO и температуру.

Тип процесса ферментации – периодический с подпиткой

На протяжении десятков лет периодическая ферментация с подпиткой была наиболее широко используемым в биотехнологии производственным процессом [8]. Периодический процесс с подпиткой отличается от классического периодического тем, что, с целью стимулирования роста клеток, ввод питательных веществ осуществляется поэтапно. В биореактор вводится базовый объем среды, достаточный для поддержания начального роста клеток. Питательная среда добавляется в реактор по мере необходимости, чтобы восстановить объем питательных веществ, израсходованных при росте популяции клеток. Клетки и вырабатываемые ими вещества остаются в биореакторе до конца рабочего цикла. При такой технологической схеме можно автоматически управлять подачей питательной среды на основании данных о содержании питательных веществ или плотности жизнеспособных клеток.

Тип процесса ферментации – перфузионный

Термин «непрерывный биопроцесс» относится к технологиям, в которых используются перфузионные (непрерывные) процессы. В них реактор работает при определенном объеме и определенной концентрации клеток в течение 30–90 дней или более, в зависимости от используемой линии клеток. В этот период по мере роста клеток питательная среда постоянно обновляется, и из реактора удаляются вторичные

токсичные метаболиты. Перфузионная технология – один из самых современных методов выращивания клеточных культур. Несмотря на преимущества перфузионной технологии, вопросы нормативно-правового регулирования все еще являются препятствием для ее реализации: проблемы с определением понятия «партия» в непрерывном процессе усложняют процедуры выпуска продукции. Поэтому перфузионные процессы ферментации в еще большей степени, чем процессы других типов, требуют высокого качества оборудования и использования технологии PAT, призванных обеспечить правильность работы системы и возможность выполнения требований регулирующих органов.

Методы мониторинга

Согласно директивным указаниям по PAT^[1] и данным, имеющимся в научной литературе^[8], мониторинг критических параметров процесса и показателей качества может осуществляться разными методами (см. рис. 3). Хотя для мониторинга в режиме реального времени наиболее предпочтительны методы измерений в потоке (или в реальных условиях) и в байпасном канале, метод измерения у линии и лабораторный анализ могут использоваться для определения КПП, КПИ и даже КПК, точное измерение которых в биореакторе невозможно. Ниже представлены особенности этих методов.

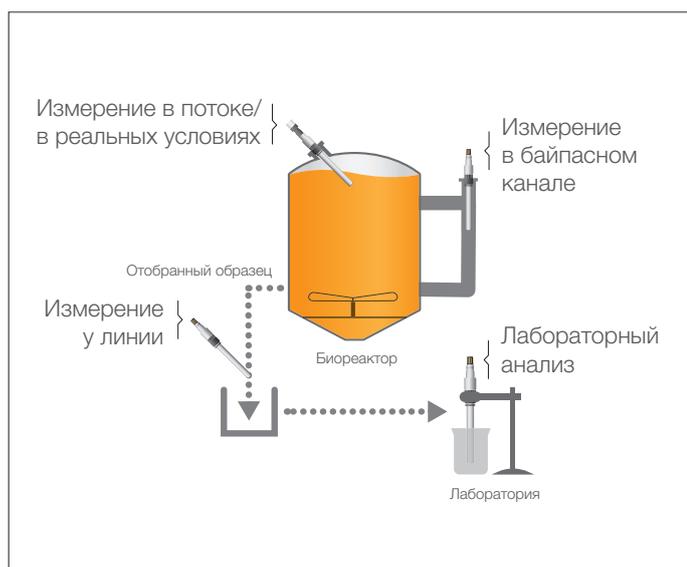


Рис. 3 Различные методы мониторинга параметров процесса, разрешенные директивой по PAT (2004 г.) и рекомендуемые в современной научно-технической литературе.

технологии PAT, если нет других возможностей исследования (например, анализ титрования продукта методом ВЭЖХ или масс-спектроскопия для определения качества продукта). В этих примерах организовать автоматическое управление не представляется возможным. Измерения в условиях лаборатории обычно используются для контроля и проверки точности измерительного оборудования, устанавливаемого в основной линии или в байпасном канале. Однако такие факторы, как колебания температуры и потеря газов, могут негативно сказаться на точности этих эталонных измерений.

Лабораторный анализ

Образец отбирается из реактора в стерильных условиях и после предварительной обработки (например, фильтрации или разведения) исследуется в лаборатории. Подготовка и обработка требуют строгого соблюдения стандартных операционных процедур (СОП) и привлечения квалифицированного персонала. При возникновении проблем на этапах подготовки образца точность результатов анализа падает. Наряду со сложностью выполнения ручных операций, главным недостатком лабораторного анализа является временная задержка получения результатов, что сокращает частоту проведения измерений. По этим причинам лабораторные измерения не могут быть отнесены к полноценной

Измерение у линии

В этом методе образец отбирается и исследуется в непосредственной близости от производственной линии либо оператором, либо с помощью автоматических пробоотборных устройств. Так же, как и в случае лабораторного анализа, для получения точных результатов должны быть обеспечены стерильные условия. Метод измерения у линии наиболее широко используется для определения параметров, значения которых не могут быть измерены в потоке или в байпасном канале.

Преимущества метода измерения у линии: меньшее время измерений (по сравнению с лабораторным методом) и возможность организации автоматического управления. Однако все равно оперативность получения результата может оказаться недостаточной для эффективного мониторинга культур с высокой скоростью роста (в том числе, микробиологических) в соответствии с концепцией технологии PAT.

Измерение в байпасном канале

В этом методе измерение проводится в байпасном канале, в который отводится часть основного потока с возможностью ее возвращения в биореактор. Измерение параметров образца осуществляется установленными в канале датчиками в автоматическом режиме. Преимущества этого метода: простота стерилизации и прямой доступ к образцу, находящемуся в стабильных условиях. Для реализации такого решения необходимо использовать биореактор специальной конструкции или доработать уже существующий. Повышенная сложность конструкции установки делает этот метод менее популярным по сравнению с мониторингом путем измерения в потоке. Но, тем не менее, это один из двух методов, позволяющих вести непрерывный мониторинг и управление в режиме реального времени.

Измерение в потоке или в реальных условиях

Этот метод предполагает проведение измерений с помощью датчиков, встроенных непосредственно в биореактор. Сигналы с датчиков в режиме реального времени поступают в системы автоматического управления на базе ПЛК / АСУТП. Измерение в потоке позволяет вести мониторинг всех основных параметров технологического процесса: pH, ОВП (окислительно-восстановительного потенциала), содержания растворенного кислорода, растворенного CO₂ (DCO₂), температуры и диэлектрической проницаемости.

Использование датчиков измерения в потоке и в байпасном канале – наилучшее решение для реализации технологии PAT.

Они должны обеспечивать высокую точность измерений без вмешательства оператора в течение всего рабочего процесса, который может идти несколько недель или даже месяцев. Поэтому, чтобы гарантировать высокую надежность и точность измерений, следует соблюдать правила эксплуатации и регламент обслуживания датчиков. Во избежание погрешностей или потери сигнала необходимо регулярно проводить их профилактическое обслуживание, в том числе, калибровку и очистку. Датчики должны быть в состоянии выдерживать многократные циклы безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP). Продолжительное время работы при температурах 120–130 °C не должно влиять на их характеристики.

Критические параметры процесса

Контроль критических физических и химических параметров процесса обычно ведется с помощью датчиков измерения в потоке и байпасном канале или анализаторов процесса у линии. В этом разделе дано подробное описание каждого параметра. Примеры реального применения приведены во вставках «В фокусе внимания» 1 и 2.

pH

Самый классический пример применения технологии PAT для биопроцессов – поддержание уровня pH культуры на заданном уровне на основании сигналов электрохимического датчика, установленного в потоке. Сигнал датчика используется для автоматической подачи базовой среды или кислоты (или контроля содержания CO₂ при культивации клеток млекопитающих). Рабочий диапазон зависит от конкретной рабочей среды.

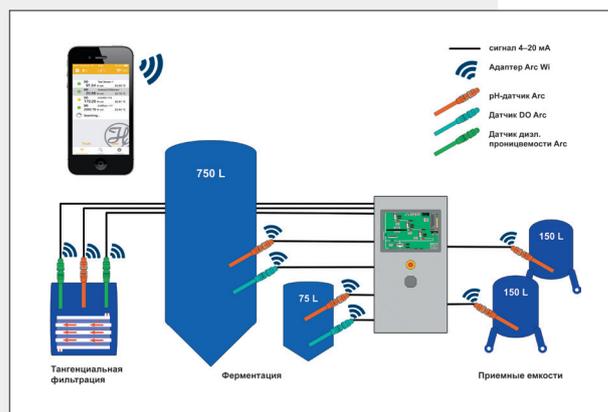
Например, значение pH для клеток млекопитающих варьируется в пределах 6,8–7,4, тогда как для других, например, клеток насекомых, оптимальное значение pH находится в районе 6,3. Точный контроль этого параметра критически важен. Погрешности при измерении pH обычно весьма негативно сказываются на объеме выпуска продукции, особенно при производстве в промышленных масштабах^[7]. Поддержание уровня pH в допустимом рабочем диапазоне влияет на жизнеспособность клеток и качество конечного продукта. Пример последнего утверждения – прямое влияние уровня pH на лечебный эффект мкАТ: слишком низкий показатель pH оказывает негативное влияние на профиль гликолизирования белков, что ведет к снижению их биологической активности^[20]. Профиль гликолизирования – один из важнейших КПК при производстве моноклональных антител.



В ФОКУСЕ ВНИМАНИЯ 1 Микропроцессорные датчики Arc для измерения pH и DO в основной линии

Эффективность, надежность, компактность и высокая точность управления процессом – требования, предъявляемые компанией GEA Diessel GmbH к средствам мониторинга работы ферментационной установки. Всем этим требованиям полностью соответствуют датчики Hamilton Arc[A]. В этом процессе измерение значений pH и уровня растворенного кислорода осуществляется как в первичном, так и в главном ферментере.

- Оптический сенсор растворенного кислорода VisiFerm DO Arc был выбран из-за небольших размеров и низких расходов на обслуживание. Оптический чувствительный элемент не подвержен влиянию колебаний давления и не требует времени на поляризацию при запуске.
- Уровень pH измеряется датчиком EasyFerm Plus Arc. Герметичный источник опорного напряжения и малая погрешность измерений, сохраняющаяся после проведения многочисленных циклов стерилизации, делают его идеально подходящим для применения в процессах ферментации.
- Все датчики Arc имеют встроенный сверхминиатюрный трансмиттер, позволяющий передавать результаты измерений, данные о процедурах безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP), о состоянии датчика, а также о сроке службы по беспроводной связи в специальное приложение для управления датчиками Hamilton ArcAir.



Наиболее распространенные датчики pH представляют собой электрохимические сенсоры в виде комбинированных стеклянных электродов, которые рассчитаны на многократное автоклавирование и выдерживают многочисленные циклы безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP). Существуют также и альтернативные средства измерения pH, например оптические датчики, однако они имеют ограниченный диапазон измерений, могут быть обеззаражены только гамма-излучением и отличаются существенной погрешностью, которая не позволяет гарантировать необходимую точность измерений.

Уровень растворенного кислорода

Уровень растворенного кислорода (DO или pO₂) – еще один критический параметр процесса. С целью поддержания жизнеспособности клеток в биореактор подается обычный или обогащенный кислородом воздух. Кислород служит для клеточного дыхания и способствует ускоренному росту клеток. Следует отметить, что уровень DO можно регулировать в более широком диапазоне, чем pH; при этом значительного влияния на интенсивность роста клеток и качество конечного продукта не происходит. Типичные значения уровня насыщения растворенным кислородом для аэробных культур находятся в диапазоне от 30 до 40%. Значения DO, лежащие ниже этого диапазона, приводят к снижению жизнеспособности клеток, а находящиеся выше него способствуют окислению конечного продукта.

Существует два типа наиболее широко применяющихся сенсоров DO для



В ФОКУСЕ ВНИМАНИЯ 2 Примеры практического применения датчиков растворенного кислорода

■ Стабильная точность измерений при многократных циклах безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP)

Интенсивность роста клеток и выход белка напрямую связаны с концентрацией растворенного кислорода. Roche Pharmaceuticals использует оптические сенсоры VisiFerm DO из-за их высокой прочности и устойчивости, позволяющей им надежно работать в производственных процессах компании^[9]. Каждый сенсор стерилизуется в течение 25 минут при температуре 121 °C с последующей промывкой дистиллированной водой. Данная процедура проводится несколько раз в неделю. По отзывам Roche, за время работы ухудшения характеристик датчика и снижения точности измерений не наблюдалось.

■ Технология Arc помогает предотвращать простои и обеспечивает надежное управление процессом ферментации

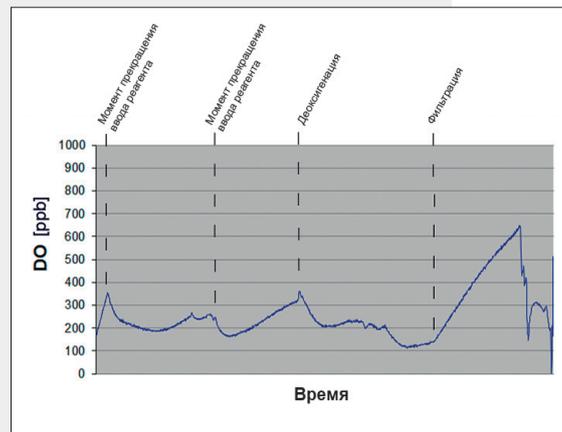
Британская компания Albiomedix специализируется на выпуске дрожжевых грибов *Saccharomyces*, использующихся при производстве рекомбинантных белков^[9].

Средняя продолжительность периодического производственного процесса с подпиткой составляет примерно 5 дней. За это время содержание растворенного кислорода снижается с 98% до заданного расчетного уровня, в том числе с использованием данных оптического сенсора VisiFerm DO. Точковый сигнал датчика (4–20 мА) передается встроенным в него сверхминиатюрным трансмиттером в систему управления биотехнологическим процессом. Состояние датчика и реальные измеренные значения легко контролируются в любое время через приложение Hamilton ArcAir.



■ Сенсор VisiPro DO Ex для измерения низких концентраций растворенного кислорода во взрывоопасных зонах (ATEX)

Производитель активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) Medichem пользуется оптическими сенсорами растворенного кислорода [D]. Высокая чувствительность соединений серы к растворенному кислороду требует наличия датчика, способного надежно осуществлять измерения при концентрациях в несколько сотен ppb. В данном производственном процессе датчики растворенного кислорода размещались в потенциально взрывоопасной среде, поэтому они должны были быть сертифицированы для применения в этих условиях. Оптический сенсор во взрывобезопасном исполнении VisiPro DO Ex имеет малое время отклика и более прост в обслуживании, чем полярографические сенсоры. Встроенный сверхминиатюрный трансмиттер передает токовый сигнал 4–20 мА по протоколу HART прямо в систему управления технологическим процессом, что упрощает интеграцию сенсора.



биотехнологических процессов: полярографические и оптические. В полярографических сенсорах используется гальванический элемент (или элемент Кларка). Сенсоры этого типа появились на рынке первыми, но они обладают целым рядом недостатков: высокая стоимость обслуживания, большое время подготовки к использованию и ошибки измерений, обусловленные загрязнением CO_2 и другими газами. Оптические сенсоры DO, работающие по новейшей технологии гашения люминесценции, постепенно вытесняют полярографические и сегодня считаются самыми подходящими для проведения измерений в потоке.

Уровень растворенного углекислого газа

Уровень растворенного CO_2 (DCO_2 или pCO_2) – параметр, мониторинг которого осуществляется из-за его влияния на показатель pH при культивировании клеток млекопитающих и синтезе жирных кислот. Достаточно высокий уровень растворенного углекислого газа интенсифицирует рост клеток и способствует сокращению выработки вторичных метаболитов. Содержание углекислого газа оказывает особенно сильное влияние в процессах культивирования клеток (в частности – клеток млекопитающих) и должно поддерживаться в пределах 5–10%. Датчики измерения DCO_2 в технологических процессах, работающие по электрохимическому принципу, используются уже много лет. Их отличительная особенность – большие расходы на техобслуживание, требующееся для обеспечения достаточной точности измерений.

Содержание O_2 и CO_2 до и после реактора

В некоторых биотехнологических процессах, например, в процессах получения антибиотиков из дрожжевых культур, жизнеспособность клеток контролируется по целому ряду косвенных показателей, в том числе – скорости поглощения кислорода (СПК) и скорости выделения углекислого газа (СВУГ). В качестве показателя жизнеспособности культуры используется соотношение между содержанием O_2 и CO_2 на входе в реактор и количеством выделившихся газов, измеренном после фильтра. Количество выделившихся газов можно определить у линии масс-спектрометрами или с помощью датчиков в байпасном канале, измеряющих электрические параметры и поглощение в ИК-диапазоне. Такие измерения, в основном, проводятся для микробиологических культур, когда другие виды измерений выполнить достаточно сложно и они дают недостаточно достоверные результаты.

Питательные вещества и метаболиты

Надлежащий мониторинг концентрации питательных веществ (или субстратов), а также измерение содержания вторичных метаболитов очень важны, особенно для периодических процессов с подпиткой и перфузионных процессов, поскольку порядок подпитки можно регулировать прямо во время процесса. В биотехнологических процессах основным источником углерода служат глюкоза и глицерин, а источником азота – глутамин и другие аминокислоты. В процессе ферментации эти вещества расходуются, зато образуются метаболиты – лактат, ацетат и аммиак. Неоптимальные стратегии подпитки могут приводить к образованию избыточных вторичных метаболитов, снижающих жизнеспособность клеток и выход конечного продукта. Например, накопление лактата в культурах клеток млекопитающих уже давно признано фактором, замедляющим рост клеток и образование рекомбинантного белка^[13]. Поэтому регулирование подачи питательных веществ имеет первостепенное значение (наряду с контролем pH, DO и температуры) для оптимизации производственного процесса.

В датчиках измерения в потоке и в байпасном канале обычно используются методы молекулярной спектроскопии, в том числе – в ближней ИК-области спектра и рамановской. Это методы измерения, предполагающие использование вторичного эталона. В них для калибровки с использованием статистического многофакторного анализа требуются автономные измерения эталона. Точность измерения, обеспечиваемая этими методами, сильно зависит от условий осуществления биопроцесса и точности результатов лабораторных измерений для калибровки. Опубликованных исследований, в которых была бы показана возможность использования одинаковых общих калибровок на базе многофакторного анализа для прогнозирования с достаточной точностью хода процессов с различными клетками, не существует^[7]. По этим причинам указанные методы считаются слишком трудоемкими и дорогими для успешного применения в условиях производства.

Сложность выполнения таких измерений объясняет, почему метод измерения у линии и лабораторный анализ по-прежнему наиболее часто используются для мониторинга содержания питательных веществ и метаболитов, хотя они и не полностью соответствуют концепции технологии PAT. Это оборудование может использовать различные технологии измерения: анализ методом ВЖХ, применение чувствительного к глюкозе электрода или другие виды биохимического анализа. Эти анализаторы могут работать в полуавтоматическом или полностью автоматическом режиме. Они обычно требуют применения отдельных устройств стерильного отбора проб, а измерительный цикл занимает достаточно длительный промежуток времени (минуты)^[14]. Однако, по указанным причинам, они остаются единственным доступным вариантом измерения содержания питательных веществ среды и вторичных метаболитов.

Температура, давление и ОВП

Температура – один из важнейших и хорошо контролируемых параметров биотехнологического процесса. Ее значение в этих процессах, включая циклы стерилизации, обычно поддерживается с высокой точностью в диапазоне от 0 до 60 °C. Для измерения температуры в биореакторах используется целый ряд приборов, работающих на разных принципах, в том числе – термисторы и резистивные и биметаллические термометры^[8].

Также для оптимизации процессов ферментации может осуществляться контроль и других физических и химических КПП, например, давления и ОВП. Давление является очень важным параметром управления, поскольку оно влияет не только на ход технологического процесса, но и на безопасность производства. В большинстве случаев

оно определяет концентрацию растворенных в жидкой фазе газов, в частности – DO and DCO₂. Наиболее распространенные приборы для его измерения – пьезоэлектрические и наполненные мембранные датчики.

Мониторинг окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) дает информацию о концентрации окисляющихся или восстанавливающихся молекул. Измеренное значение ОВП является важным параметром, помогающим лучше понять кинетику процесса и оптимизировать выход продукта ферментации, например, клеток млекопитающих. Как и в случае pH-датчиков, наиболее распространенным вариантом для мониторинга в потоке является комбинация эталонного и измерительного электрода.

Критические показатели качества и ключевые производственные индикаторы

Мониторинг КПП обеспечивает возможность поддерживать критические показатели качества и ключевые производственные индикаторы в заданных пределах. Собранные данные процесса используются в случае необходимости для анализа причин неполадок или для исследования характеристик процесса с целью проектно-экспериментального планирования (например, для увеличения или уменьшения масштаба установки). Принципы технологии PAT лучше всего реализуются, когда имеется возможность максимально частого прямого измерения КПК и КПИ, о чем более подробно будет сказано ниже.

Качество продукта и титр продукта

Основное назначение биореактора – производство как можно большего количества продукта с качеством, достаточным для его применения в лечебных целях. Качество и выход продукта крайне важны, поскольку последний часто требует дальнейшей очистки на последующих этапах технологического процесса, что может привести к его изменениям или потерям.

Как уже отмечалось выше, наиболее важными продуктами биофармацевтического производства являются моноклональные антитела, рекомбинантные белки и другие типы терапевтических белков (например, вакцины). Поэтому в КПК биопроцесса обычно учитываются такие определяющие качество белка показатели, как профили гликолизирования или распределение по размеру молекул^[4]. Наиболее часто используемый для биореакторов КПИ – суммарный белковый титр или, в ряде случаев, титр для конкретного типа белка (например, IgG).

Наиболее многообещающие результаты измерения титра и качества продукта в потоке получены с использованием методов спектроскопии, которые имеют те же ограничения, что и измерения содержания питательных веществ и метаболитов. Так же, методы ВЭЖХ, масс-спектрометры, ЯМР, флуоресцентная микроскопия или микроскопия сверхвысокого разрешения, капиллярно-электрофорезные или биохимические анализаторы, устанавливаемые у линии или использующиеся при лабораторном анализе часто рассматриваются в качестве наиболее надежных решений для количественной оценки значений вышеупомянутых КПК и КПИ в биореакторе^[14]. Но и здесь трудности организации стерильного отбора проб и их анализа накладывают ограничения на показатели качества и производственные индикаторы в отношении соответствия установленным для технологии PAT нормативам.

Общая плотность клеток и плотность жизнеспособных клеток

Другие ключевые производственные индикаторы, успешно используемые при измерениях в потоке (внутри биореактора), – общая плотность клеток (TCD) и плотность жизнеспособных клеток (VCD). TCD показывает общее количество клеток в биореакторе, а VCD – число жизнеспособных клеток (живых и способных производить продукт). Величина VCD коррелирует с выходом конечного продукта и, поэтому, имеет очень важное значение.

За прошедшие годы разработаны различные методы лабораторных измерений^[8].

Общую плотность клеток, как и плотность жизнеспособных клеток, можно измерить с помощью лабораторных автоматизированных систем подсчета клеток. Основным недостатком этих методов является достаточно большая длительность процедур отбора проб, что не позволяет оперативно и безопасно отслеживать рост клеток в соответствии с нормативами технологии PAT. По этой причине в течение ряда лет было предпринято несколько попыток найти технологии, подходящие для проведения точных и воспроизводимых измерений в режиме реального времени.

Одни технологии определения плотности клеток в реальном времени основаны на методах молекулярной спектроскопии, другие – на измерении косвенных показателей (например, на алгоритмах оценки скорости поглощения кислорода (СПК) и выделения углекислого газа (СВУГ)). Все подобные технологии требуют применения многопараметрического анализа данных (MVDA) для осуществления специальных калибровок, выполнение которых достаточно трудоемко.

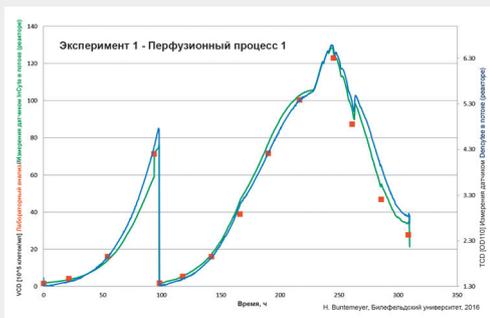
Наиболее достоверные результаты получаются при измерении оптической мутности клеточной взвеси в процессе микробиологической ферментации при пропускании излучения с длиной волны, лежащей в ближнем ИК-диапазоне, или при использовании емкостных датчиков для определения жизнеспособности клеток (особенно актуально для культур клеток млекопитающих). На сегодня наиболее распространенными методами определения в реальном времени TCD и VCD являются измерение мутности и диэлектрической проницаемости. Такие датчики соответствуют требованиям гигиенических стандартов и могут успешно работать после многократного автоклавирования и частого проведения циклов безразборной мойки (CIP) и стерилизации паром (SIP). Примеры практического применения описанных технологий приведены во вставках «В фокусе внимания» 3 и 4, а также в следующем разделе.



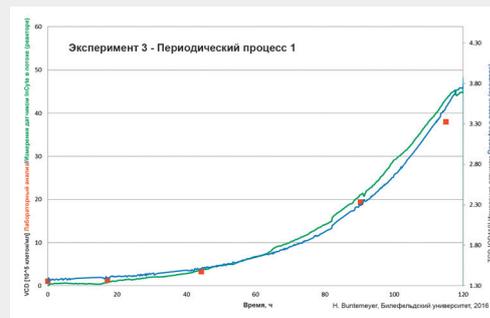
В ФОКУСЕ ВНИМАНИЯ 3 Определение плотности клеток в потоке (реакторе) в периодическом и перфузионном процессе производства моноклональных антител

Мониторинг таких КПИ, как общая плотность клеток и плотность жизнеспособность клеток, сегодня можно осуществлять с помощью датчиков, устанавливаемых в потоке (в реакторе). Анализ этих индикаторов позволяет в реальном времени регулировать подачу питательных веществ в соответствии со скоростью роста клеточных культур. Научно-исследовательская группа по культивированию клеток Билефельдского университета провела проверку точности измерений датчиков Incyte и Dencytee (датчиков Hamilton VCD и TCD, соответственно) в периодическом и перфузионном процессах получения мкАТ из клеток CHO[E]. Испытания продемонстрировали следующие достоинства этих датчиков.

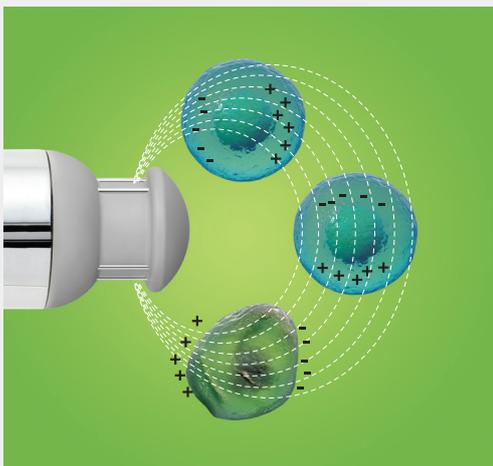
- Высокая точность измерения параметров клеточного роста, позволяющая оперативно управлять процессом в режиме реального времени.
- Получение более полного представления о физиологии клеток за счет одновременного измерения TCD и VCD.
- Надежность и стабильность измерений в продолжительных ферментационных процессах.



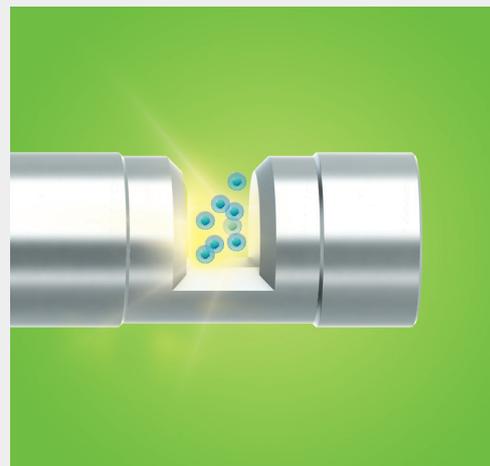
Сравнительные результаты измерений плотности клеток в перфузионном процессе.



Сравнительные результаты измерений плотности клеток в периодическом процессе.



Incyte представляет собой датчик емкостного типа. В переменном электрическом поле жизнеспособные клетки ведут себя как миниатюрные конденсаторы. Заряд этих миниатюрных конденсаторов измеряется датчиком и регистрируется как диэлектрическая проницаемость (емкость на единицу длины)



Принцип работы датчика Dencytee – измерение мутности клеточной взвеси при пропускании излучения с длиной волны, лежащей в ближней инфракрасной области спектра. Все частицы и молекулы, рассеивающие излучение этого диапазона, могут быть обнаружены, а эти данные коррелируют с общей плотностью клеток в суспензии.

Последняя информация по измерению VCD и TCD в потоке (реакторе)

Возможность точного и надежного измерения TCD и VCD в реакторе делает их наиболее важными ключевыми производственными индикаторами для биореактора. Это утверждение согласуется с увеличением количества публикаций по биофармацевтике, часть из которых представлена ниже.

4-й симпозиум BioProScale 2016

На прошедшем в Берлине симпозиуме «Интенсификация биотехнологических процессов за счет применения процессно-аналитической технологии (PAT) и принципов планируемого качества» Институт Макса Планка из Магдебурга представил стендовый доклад^[15] по средствам онлайн-мониторинга периодических и полностью или частично перфузионных процессов культивирования клеток для производства вакцин. В сообщении было заявлено, что данные, полученные с датчиков диэлектрической проницаемости и мутности, могут успешно использоваться для мониторинга культивирования клеток и ручного и автоматического управления перфузионными культурами.

Цюрихский университет прикладных наук (ZHAW)

Недавнее исследование, проведенное в Цюрихском университете прикладных наук, показало, что для определения VCD в системах PAT наиболее подходят измерения диэлектрической проницаемости^[16]. В экспериментах плотность жизнеспособных клеток измерялась расположенными в биореакторе датчиками, не требующими разведения образца и поэтому позволяющими получить результат более оперативно, чем при измерениях у линии или при лабораторном анализе. Такие емкостные датчики обеспечивают измерения, достаточно надежные для использования их результатов в системах автоматизированного управления.

ESACT 2017

Множество стендовых докладов по измерениям TCD и VCD в потоке (биореакторе) было представлено на конференции 2017 года Европейского общества по технологии животных клеток (ESACT) в Лозанне, Швейцария.

Слишком высокое содержание питательных веществ может привести к накоплению метаболитов и, следовательно, к недостаточно эффективному развитию клеточных культур. Компания Boehringer Ingelheim California представила доклад^[17] по использованию емкостного датчика для измерения VCD и управления процессом в режиме реального времени. В качестве альтернативы применявшемуся ранее болюсному вливанию была разработана методика автоматической подачи с контролем уровня VCD.

- Французский национальный центр научных исследований на базе Университета Лозанны^[18], в соответствии с принципами технологии PAT, ведет мониторинг ферментации клеток CHO при производстве моноклональных антител с использованием установленных в биореакторе датчиков плотности. Этот метод позволяет вести измерения в реальном времени и немедленно регистрировать возникновение критических условий.
- Компания Zoetis Spain^[19] представила примеры, иллюстрирующие возможность использования датчиков диэлектрической проницаемости и мутности для измерения плотности клеток на различных этапах наращивания клеточной биомассы как в обычных биореакторах, так и в биореакторах отдельного применения.





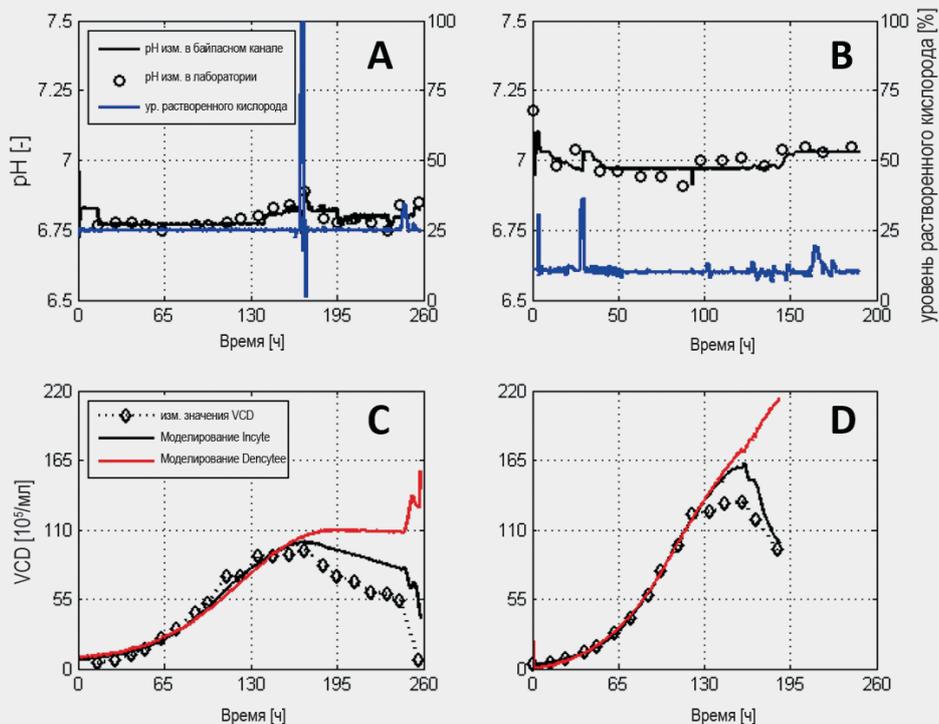
В ФОКУСЕ ВНИМАНИЯ 4 Точное управление ферментацией культур клеток млекопитающих за счет мониторинга процесса в потоке (биореакторе)

Культуры клеток млекопитающих используются для производства различных рекомбинантных белков клинического применения, таких например, как вакцины, антитела или лекарства. В Венском технологическом университете^[F] (TU Wien) установили, что точный контроль параметров – pH, концентрации растворенного кислорода и плотности клеток – напрямую влияет на качество и выход продукта.



- На росте клеток сказываются даже небольшие колебания каждого параметра процесса, поэтому наилучшим решением является проведение измерений в реальном времени.
- Результаты измерения в потоке (биореакторе) не только дают более точные данные о процессе, но и лучше коррелируют с жизнеспособностью и развитием клеток.

Мониторинг и управление процессом осуществляется с помощью оптического датчика Dencytee (TCD) и датчика измерения диэлектрической проницаемости (VCD). Оба датчика позволяют отслеживать параметры биотехнологического процесса в фазе экспоненциального роста клеток, которая может продолжаться более 130 часов. Работать с датчиками очень просто, при этом они не требуют проведения калибровки в ходе процесса.



Заключение

Использование технологии PAT в биотехнологических процессах предполагает мониторинг критических показателей качества (КПК), критических параметров процесса (КПП) и ключевых производственных индикаторов (КПИ). Для обеспечения управления процессом в режиме реального времени измерение наиболее важных параметров должно проводиться в потоке (биореакторе). Результаты этих непрерывно проводящихся измерений служат также ценным материалом для анализа причин неполадок или исследования характеристик процесса с целью его масштабирования в ту или иную сторону.

В табл. 1 приведены наиболее важные КПП, КПК и КПИ для биореактора, а также применимые методы измерений, их точность и ограничения.

Наиболее важные КПП, позволяющие реализовать управление в режиме реального времени, – pH, DO и температура. Измерение других параметров, например, содержания DCO₂, питательных веществ и метаболитов, можно с достаточной точностью и достоверностью выполнить только у линии или в условиях лаборатории, что делает эти параметры непригодными для применения с целью управления процессом в реальном времени. Что касается КПК и КПИ, то следует отметить, что показатели, связанные с качеством и титром продукта, очень важны, но, тем не менее, их тоже очень сложно измерить в потоке с приемлемой точностью. Вывод: мониторинг в реальном времени важнейших КПП и измерение в потоке значений TCD и VCD сегодня обеспечивают максимальные возможности использования технологии PAT для регулирования выхода и качества продукта в биореакторе.

Таблица 1 Показатели КПП, КПК и КПИ для биореактора в потоке/в биореакторе

		Метод измерения для PAT		Альтернативные методы	
		В потоке/в биореакторе	Измерение в байпасном канале	Измерение у линии и лабораторный анализ	
Критические параметры процесса	pH	◆	◆	●	
	DO	◆	◆	●	
	DCO ₂	●	●	●	
	Температура	◆	◆	■	
	Выделение O ₂ /CO ₂	■	◆	◆	
	Содержание питательных веществ: глюкозы, глутамина...	●	●	◆	
	Содержание метаболитов: лактата, аммиака...	●	●	◆	
Критические показатели качества	Качество продукта (например, гликозилизация белка)	▲	▲	◆	
Ключевые производственные индикаторы	Титр продукта	●	●	◆	
	Общая плотность клеток	◆	◆	◆	
	Плотность жизнеспособных клеток	◆	◆	◆	

Доступность различных методов мониторинга по данным научных публикаций представлена с указанием точности и надежности соответствующих измерений.

◆ Точность, надежность и повторяемость измерений достаточно хороши для осуществления управления процессом

● Точность, надежность и повторяемость измерений обычно недостаточны для управления процессом

▲ Метод недоступен

■ Не требуется

Список литературы

- [1] U.S. Department of Health and Human Services (2004): *Guidance for Industry. PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. Rockville.
- [2] FDA, *Pharmaceutical cGMPs for the 21st century - A risk based approach; Final Report, September 2004*
- [3] M. Mitchell, *Determining Criticality-Process Parameters and Quality Attributes*, *BioPharm International*, Volume 26, Issue 12, 2013
- [4] S. Haigney, *QbD and PAT in Upstream and Downstream Processing*, www.processdevelopmentforum.com, August 5, 2013
- [5] Rakhi B. Shah et al., *Application of PAT in Biotech Drug Substance Manufacturing*, *Biotechnology and BioProcessing*, Series Vol 33, Pages 3-4, 2012
- [6] C. Undey, D. Low et al., *PAT applied in Biopharmaceutical Process Development and Manufacturing*, CRC Press, 2012
- [7] A. V. Carvalho, V. M. Saucedo, *Process Analytical Technology Advances and Applications in Recombinant Protein Cell Culture Processes*, *Biotechnology and BioProcessing*, Series Vol 33, Pages 93-126, 2012
- [8] M. Pohlscheidt, M. Jenzsch et al.: *Bioprocess and Fermentation Monitoring*. In: *Upstream Industrial Biotechnology: Equipment, Process Design, Sensing, Control and cGMP Operations*, Volume 2, First Edition, Edited by Michael C. Flickinger, John Wiley & Sons., 2013
- [9] E. S. Langer, R. A. Rader *Continuous Bioprocessing and Perfusion: Wider Adoption Coming as Bioprocessing Matures*, *BioProcessing Journal*, p. 50-55, Spring 2014
- [10] W. S. Langer, *Average Batch Failure Rate Worsens*, *Genetic Engineering & Biotechnology News*, Vol. 36, No. 17, 01 October 2016
- [11] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in microbial systems*, Editorial, *Frontiers in Microbiology*, Volume 5, Article 341, 8 July 2014
- [12] G. Melmer, G. Gellissen, G. Kunze, *Recombinant Vaccine Production in Yeast*, *BioPharm International*, Volume 2008, Issue 1, 02 January 2008
- [13] M.M. St. Amand, P.G. Millili et al. *Strategic Vision for Integrated Process Analytical Technology and Advanced Control in Biologics Manufacturing*, Series Vol 33, Pages 9-28, 2012
- [14] W. Whitford, C. Julien, *Analytical Technology and PAT*, Supplement *Bioreactors Chapter 3*, *BioProcess International*, p. 32-41, January 2007
- [15] D. Vazquez-Ramirez, A. Nikolay et al., *Online-monitoring tools in batch and (semi-)perfusion cultivations for vaccine production*, Abstracts from 4th *BioProScale Symposium*, Berlin 2016
- [16] M. Kaufmann, G. Fideles Agne, *Messung der Biomassenkonzentration in einem modularen System für die on-line Prozesskontrolle* Vertraulich, Semesterarbeit, ZHAW Department life sciences und facility management Institut für Chemie und Biotechnologie, 2017
- [17] D. T. Monteil, P.M. Cheng, et al., *A PAT application for the monitoring of viable cell density and automating feeding strategies in mammalian cell cultures for improved performance*, *ESACT 2017 poster's abstracts*, www.esact2017.com, 2017
- [18] M. Li, B. Ebel, et al., *Online and real-time control of CHO cell specific growth rate throughout cultures in bioreactor*, *ESACT 2017 poster's abstracts*, www.esact2017.com, 2017
- [19] L. Garcia, S. Juanola, et al. *Strategies to optimize cell growth and scale up the process using a new single use bioreactor system*, *Ambr 250*, *ESACT 2017 poster's abstracts*, www.esact2017.com, 2017
- [20] B. C. Mulukutla, A. Yongky, S. Grimm et al., *Multiplicity of Steady States in Glycolysis and Shift of Metabolic State in Cultured Mammalian Cells*, *PLoS One*; 10(3): e0121561., 25 March 2015

Материалы указанных ссылок во вставках «В фокусе внимания» можно скачать на сайте www.hamiltoncompany.com

- [A] M. Culina, C. Brokamp, *More functionality, lower costs, better usability with the Arc system*, Ref. 695099, 2012
- [B] C. Miscenic, *Oxygen Measurement in Fermentation with VisiFerm DO*, Ref. 695098, 2013
- [C] M. Williamson, *VisiFerm DO in the production of recombinant proteins*, Ref. 695170, 2017
- [D] J. Garcia, M. Benito, *Dissolved oxygen quantification in a product sensitive to it*, Ref. 695218, 2016
- [E] H. Büntemeyer, A. Schmidt, *Real-time Cell Density Measurement for PAT Applications*, Ref. 695234, 2017
- [F] K. Kandra, P. Kroll, M. Brunner, P. Wechselberger, C. Herwig *Online Monitoring of CHO Cell Culture*, Ref. 695172, 2014

000 «Диаэм»

Москва

ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7 (383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7 (923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7 (843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemerovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

