

Von klein nach groß

Fortschrittliche Bioreaktor-Technologie für valide Prozessentwicklung

Christian Kaiser, Claudia M. Hüther

Die Nutzung von Bioreaktoren im Technikums- und Produktionsmaßstab ist seit jeher für die kontrollierte Produktion von Biopharmazeutika etabliert. In der Prozessentwicklung und für Scale-down-Experimente ist der Einsatz von kleinen Benchtop-Bioreaktorsystemen unerlässlich. Seit einigen Jahren orientiert sich die messtechnische Ausrüstung sowie die verfahrenstechnische Gestaltung immer strikter an den Charakteristika der Produktionsanlagen und gewährleistet somit die Vergleichbarkeit zwischen Bioreaktoren in Labor- und Produktionsmaßstab.

Nahezu jedes traditionelle Pharmaunternehmen unterhält heutzutage auch biotechnologische Forschungsabteilungen. Die Leitlinien der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) geben zuverlässige Richtwerte, um die Herstellung rekombinanter Wirkstoffe von der Entwicklung bis hin zur Produktion zielgerichtet, schnell und einheitlich voranzutreiben.

Eine Vielzahl der biotechnologisch produzierten Therapeutika wird mithilfe von Mikroorganismen hergestellt. Neben dem klassischen Produzenten *Escherichia coli* werden vor allem auch Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* zur rekombinanten Herstellung von Biopharmazeutika verwendet. Im Vergleich zu tierischen bzw. humanen Zelllinien überzeugen diese mikrobiellen Expressionssysteme durch ihre einfache Kultivierung, kostengünstige Fermentationsmedien und kurze Prozesszeiten.

Eine präzise Kontrolle der Prozessparameter, umfangreiche Monitoringoptionen und fortschrittliche Softwarelösungen für adäquates Datenmanagement erlauben die

Identifizierung qualitätskritischer Merkmale während des Prozesslaufs. Fortschrittliche Benchtop-Bioreaktorsysteme sind somit ein hervorragendes Werkzeug, um die Leitlinien der Zulassungsbehörden, wie beispielsweise die Quality by Design Initiative (QbD) der FDA umzusetzen. Durch parallele Fermentationsansätze können Forscher bereits im Labormaßstab alle kritischen Prozessparameter (CPPs) en détail untersuchen und sparen damit sowohl Zeit wie auch Kosten ein. Wechselwirkungen einzelner Faktoren zueinander lassen sich dabei über statistische Versuchsplanung (Design of Experiment Approaches, DoE) und die Anwendung multivariabler Analysemethoden (MVA) strukturiert erfassen.

Automatisierte Prozessabläufe

Um optimale Produktausbeuten im Herstellungsprozess zu erzielen, nutzen Forscher der Richter-Helm Biologics parallele Benchtop-Bioreaktorsysteme von Dasgip für die Entwicklung geeigneter Prozessführungsstrategien. Als Expressionsorganismen für unterschiedlichste API (Active Pharmaceutical Ingredients) werden dabei sowohl rekombinante *E. coli* als auch *P. pastoris* eingesetzt. Während der Prozessentwicklung werden die Mikroorganismen üblicherweise in einem Drei-Phasen-Prozess zu hohen Zelldichten kultiviert, um eine maximale Produktakkumulation zu erreichen.

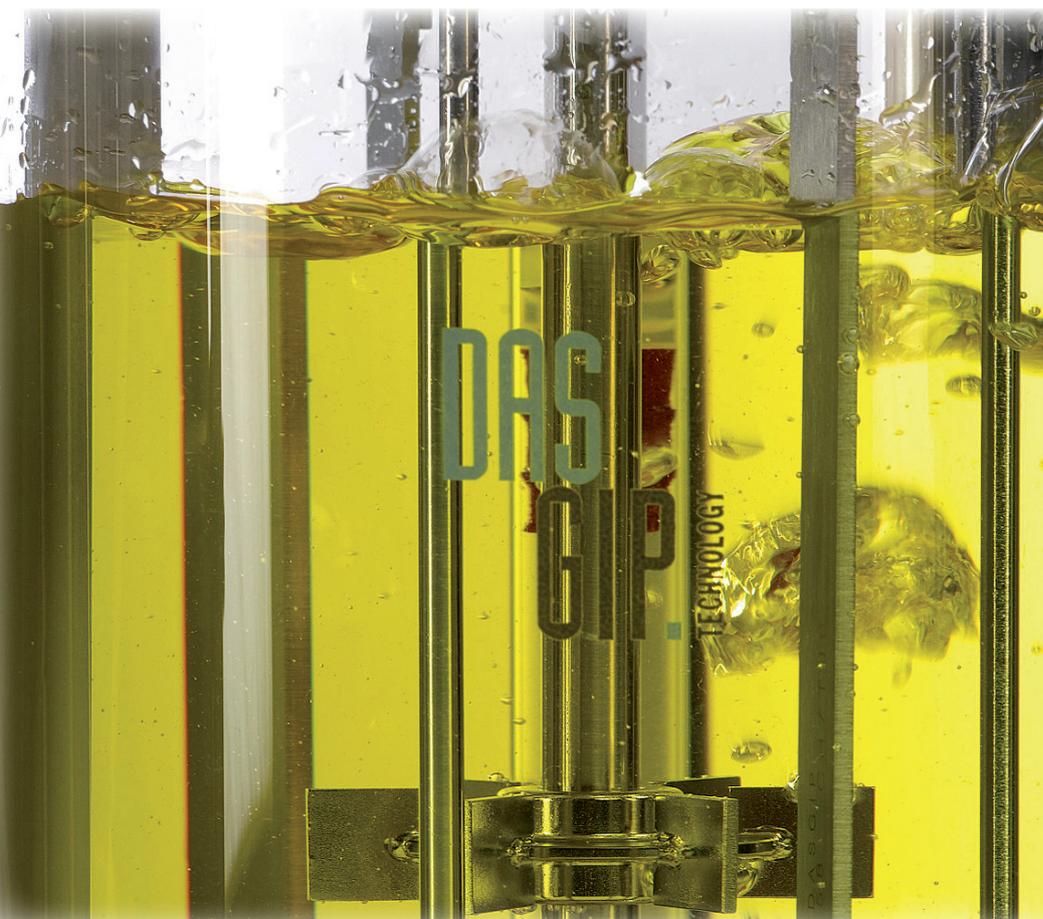
Die kontrollierte Fermentation im Bioreaktorsystem ermöglicht über die integrierte Steuerungssoftware die Automatisierung verschiedenster prozessrelevanter Abläufe. Alle Prozessregler (z. B. pH, pO₂, Temperatur, Begasungsraten) können über alle Prozessparameter und Schaltzeiten getriggert werden. Damit ist eine automatisierte prozessverlaufsabhängige Reglerkontrolle ermöglicht. Gekoppelt an definierte Sollwerte, die Zeit oder andere Prozessparameter können einzelne Regler an- und ausgeschaltet und programmierte Profile aktiviert werden.

Über die editierbare DO-Kaskade (DO: gelöster Sauerstoff) kann so beispielsweise über die Rührerdrehzahl, die Begasungsrate und die Gasmischung von Luft und Sauerstoff eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen während des Fermentationslaufs gewährleistet werden.

Präzise Regelung

Insbesondere in der Hochzelldichte-Fermentation bietet die kontrollierte Gasmi-

Autoren: Dr. Christian Kaiser, Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG, Hamburg; Claudia M. Hüther, DASGIP GmbH, Jülich



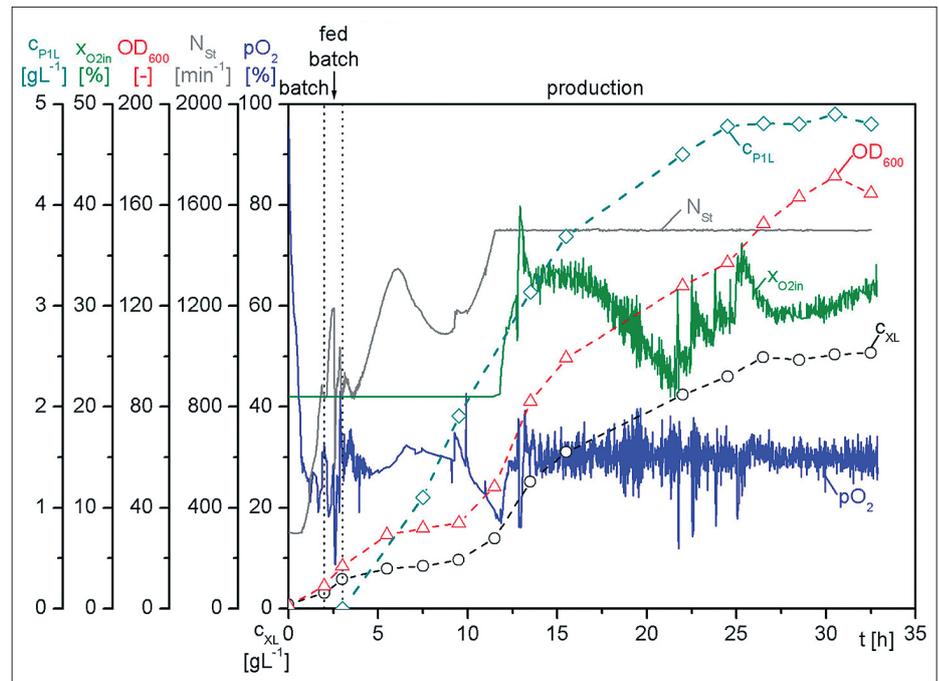
schung weitere Optimierungsmöglichkeit. Bei hohen Wachstumsraten treten insbesondere in der späten Fed-Batch-Phase vermehrt Sauerstofflimitierungen auf, die sich nicht durch die Anpassung der Rührergeschwindigkeit kompensieren lassen.

Durch den Einsatz einer Dasgip MX4 Gasmischstation zur präzise regulierten Sauerstoffanreicherung der Zuluft konnten optische Dichten von > 160 mit *E. coli* und > 450 mit *P. pastoris* bei präzise geregelter pO_2 -Wert erreicht werden. Dieses ermöglicht auch im 1-l-Labormaßstab die Gewährleistung reproduzierbarer Ergebnisse in Hochzell-dichte-Kultivierungen. Im bakteriellen System erfolgte dabei innerhalb von 24 h eine Proteinakkumulation von mehr als 4,5 g/l. Mit der langsamer wachsenden Hefe wurden rund 4 g/l API nach 85 h exprimiert.

Da sich die im 1-l-Labormaßstab erzielten Ergebnisse verlässlich auf größere Systeme bis 1000 l übertragen lassen, ist ein systematisches Screening und eine fundierte Prozessentwicklung im Multifermetersystem möglich. Aufgrund des Einsatzes einer präzise arbeitenden Gasmischstation können dabei, im Gegensatz zur einfachen Luftbegasung, durch parallele Fermentationen im Benchtop-Maßstab substanziell Entwicklungszeit sowie Energie-, Material und Personalkosten gespart werden.

Intelligente Software

Systematisches Screening nach optimalen Prozessparametern ist nicht nur von entscheidender Bedeutung, um maximale Produktausbeuten zu erreichen, sondern liefert zudem wichtige Hinweise auf die Robustheit des späteren Produktionsprozesses. DoE-Ansätze zur statistischen Versuchsplanung ermöglichen die schnelle und damit kostengünstige Evaluierung verschiedenster Versuchsansätze, um die optimalen Prozesse zu ermitteln. Intelligente Datenmanagement-Software wie die Dasware Suite ermöglichen neben der automatisierten Durchführung von DoE auch die systematische Datenanalyse und konsistente Daten-



Prozessverlauf der Fed-Batch-Fermentation eines rekombinanten, hitzeinduzierten *E. coli* in einem 1-l-Bioreaktorsystem mit Gasmix Station MX 4 zur Luft/O₂-Begasung (37 °C, pH=7); pO_2 : relativer Gelöstsauerstoffpartialdruck; N_{St} : Rührerdrehzahl; OD_{600} : optische Dichte (600 nm); X_{O2in} : molarer Anteil von Sauerstoff im eingeleiteten Gas; CP_{1L} : Konzentration des rekombinanten therapeutischen Proteins



Parallele Bioreaktorsysteme für die Prozessentwicklung

speicherung. Sie unterstützt somit Prozessentwicklung im Einklang mit den Leitlinien der Zulassungsbehörden.

Die stetige Weiterentwicklung der Bioreaktor-Technologien sowohl in der Reaktor- und Regler-Hardware als auch der Steuerungs- und Datenmanagement-Software beschleunigen die Entwicklung biotechnologischer Herstellungsprozesse nachhaltig. Mit steigender Präzision der messtechnischen Ausrüstung lassen sich komplexe

Bioprozesse fortwährend miniaturisiert darstellen. Mithilfe von Analysesoftware können diese Small-Scale-Prozesse bereits während der Bioprozessentwicklung so evaluiert werden, dass die Ergebnisse eindeutige und verlässliche Vorhersagen auf den Einfluss einzelner Kultivierungsparameter auf den späteren Produktionsprozess zulassen.

Halle 4.2, Stand L15

DASGIP

www.vfmz.net/3037960