



**CO<sub>2</sub>**

**СЕРИЯ «РАСТВОРЕННЫЙ CO<sub>2</sub>»:**

**Почему содержание  
CO<sub>2</sub> является  
критическим  
параметром процесса**



# Содержание

Аннотация.....	3
<b>1. Базовые сведения о CO<sub>2</sub> на примере клеточных культур.....</b>	<b>4</b>
1.1 Использование CO <sub>2</sub> для регулирования pH в буферных системах.....	5
1.1.1 Принцип действия бикарбонатной буферной системы.....	5
1.1.2 Регулирование pH за счет барботирования CO <sub>2</sub> .....	7
1.2 Сопутствующий продукт метаболизма клеточной культуры.....	8
1.3 Изменение pCO <sub>2</sub> и pH в ходе биопроцесса.....	9
1.3.1 Влияние взаимодействия лактата и pCO <sub>2</sub> на pH культуры .....	9
1.3.2 Как изменяются в процессе культивирования клеток pH, pCO <sub>2</sub> и VCD10	
<b>2. Содержание CO<sub>2</sub> – критический параметр процесса .....</b>	<b>12</b>
2.1 Общее воздействие на культуры: углекислого газа не должно быть слишком много или слишком мало.....	13
2.2 Специфическое воздействие в зависимости от типа культуры/ферментации	13
2.2.1 Клеточная культура (млекопитающих).....	13
2.2.2 Ферментация .....	14
<b>3. Мониторинг и регулирование содержания CO<sub>2</sub>     в режиме реального времени .....</b>	<b>15</b>
3.1 Соображения по стратегии регулирования.....	15
3.2 Продуктивность производства: увеличенная длительность фазы жизнеспособности и максимальный титр продукта .....	17
3.3 Повышение эффективности разработки: сокращение числа итераций при масштабировании в любую сторону .....	20
<b>4. Заключение .....</b>	<b>22</b>
Глоссарий.....	23
Список литературы .....	25



# Аннотация

Содержание растворенного углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ), согласно положениям процессно-аналитической технологии (PAT), является критическим параметром процесса (CPP) при производстве продуктов биофармацевтики. Оказывая воздействие на другие параметры, такие, например, как вне- и внутриклеточный водородный показатель pH, он влияет на различные пути метаболизма, связанные с ростом клеток или формированием продукта и определяющие его качество. Углекислый газ в повышенных концентрациях может, в частности, подавлять рост клеточных культур млекопитающих и снижать титр их продуктов (например, моноклональных антител или вирусов), а также ослаблять их терапевтическую эффективность (например, за счет моноклональных антител с нежелательными профилями гликозилирования). Слишком высокие концентрации  $\text{CO}_2$  также оказывают пагубное влияние на микробиологическую ферментацию. Для каждого конкретного биопроцесса содержание двуокиси углерода необходимо регулировать в режиме реального времени в пределах определенного диапазона. Как CPP, этот параметр должен контролироваться в режиме реального времени, поскольку он влияет на ключевые показатели эффективности (KPI) (например, плотность жизнеспособных клеток (VCD), титр продукта) и критические характеристики качества (CQA) (например, профили гликозилирования). В этом информационном материале подробно рассматривается комплексная роль, которую играет  $\text{CO}_2$  в биореакторе, и стратегии управления, которые можно использовать для достижения желаемого уровня его содержания на предшествующих этапах технологического процесса.

Данный материал состоит из трех частей. В первой части представлены базовые сведения и описано множество ролей, выполняемых  $\text{CO}_2$  в биопроцессе, и особенности изменений его содержания в ходе всего процесса. Во второй части дан анализ причин, по которым растворенный  $\text{CO}_2$  считается CPP для различных видов культур и процессов ферментации. Наконец, в третьей части представлен обзор методов регулирования содержания растворенного  $\text{CO}_2$  в реальном времени и объяснение того, как это может повысить эффективность биотехнологического процесса.

## Ключевые слова:

растворенный углекислый газ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , биопроцессы, регулирование pH, клеточные культуры млекопитающих, микробиологическая ферментация, клетки CHO, клетки Vero, микробные препараты, плотность жизнеспособных клеток (VCD), титр продукта, лактатное смещение, осмоляльность, PAT, критический параметр процесса, регулирование в режиме реального времени, CPP, KPI, CQA, моноклональные антитела (mAb), вакцины, гликозилирование.

# 1. Базовые сведения о CO<sub>2</sub> на примере клеточных культур

## CO<sub>2</sub> – компонент бикарбонатной буферной системы

- 1A** CO<sub>2</sub> образуется в среде с помощью бикарбонатной буферной системы (*NaHCO<sub>3</sub> уже присутствует в среде или вводится в нее с целью предотвращения уменьшения pH*)
- 1B** CO<sub>2</sub> вводится для поддержания необходимого уровня pH культуры (*CO<sub>2</sub> действует как кислота при контроле верхнего уровня pH с целью недопущения его превышения*)
- 2** CO<sub>2</sub>, образующийся в результате клеточного метаболизма

## Химическое равновесие реакции с CO<sub>2</sub>

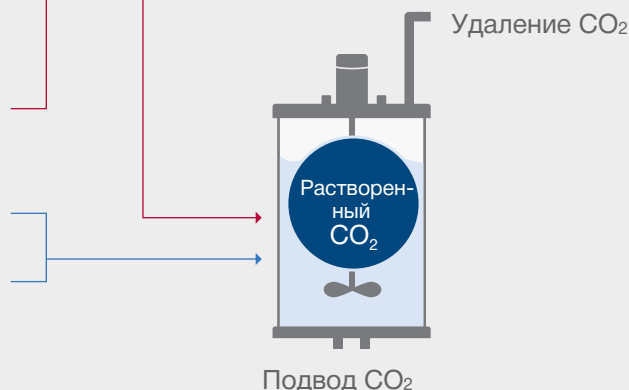


Рис. 1: Растворенный CO<sub>2</sub> в биореакторе клеточных культур. Образуется как за счет клеточного метаболизма, так и в результате работы буферной системы.

Углекислый газ (CO<sub>2</sub>) – важный компонент биопроизводства. Обычно его концентрация в биореакторе увеличивается в ходе биофармацевтического процесса. Это утверждение справедливо почти для всех аэробных биопроцессов как с участием клеточных культур животных, так и при микробиологической ферментации. Участвующие в подобных процессах организмы выделяют CO<sub>2</sub> в результате аэробного клеточного дыхания. Выделенный CO<sub>2</sub> при этом растворяется в рабочей среде биореактора. Растворенный CO<sub>2</sub> (DCO<sub>2</sub>) также обычно играет важную роль в культуральной буферной системе (см. рис. 1).

Из-за множества функций, выполняемых в биореакторе углекислым газом (CO<sub>2</sub>), его роль и особенности регулирования его содержания в биопроцессе более сложны для понимания, чем, например, роль и регулирование других параметров биопроцесса, например, содержания O<sub>2</sub>. Важно представлять себе, где проявляется участие CO<sub>2</sub>, чтобы понять, почему в рекомендациях PAT<sup>1</sup> он определяется как критический параметр процесса (CPP). Необходимо разъяснить реальное положение дел и, для начала, глубже разобраться в том, как CO<sub>2</sub> попадает в биореактор. В настоящем информационном материале этот сложный баланс обсуждается как для клеточных культур, так и для процесса ферментации, при этом первая часть материала посвящена преимущественно клеточным культурам.

# 1.1 Использование CO<sub>2</sub> для регулирования pH в буферных системах

## 1.1.1 Принцип действия бикарбонатной буферной системы

Для получения оптимальных результатов клеточным культурам требуется среда с очень узкой зоной допустимого изменения pH. Максимальная плотность жизнеспособных клеток и продуктивность достигаются только тогда, когда внутриклеточная жидкость (цитозоль) стабильна в пределах физиологического диапазона pH. Этот внутриклеточный показатель pH имеет тенденцию выравниваться с внеклеточным pH, обычно называемым показателем pH среды. Поэтому специалисты по инженерии биопроцессов стараются оптимизировать внутриклеточный pH, контролируя pH среды. Требуемое значение pH для среды биореактора обычно лежит в пределах 6,4–7,4, в то время как предельно допустимое отклонение часто составляет ± 0,1 pH (а иногда всего лишь ± 0,05). Оптимальное значение pH может варьироваться в зависимости от клеточной линии, целевого продукта и других факторов. Для обеспечения высокой точности поддержания значения pH в допустимых пределах, в биопроцессах используется буферная система. Лабораторные исследования обычно проводятся с промышленно выпускаемыми биологическими буферами, такими, например, как HEPES, в то время как в условиях производства обычно используются физиологические буферы на основе CO<sub>2</sub>/бикарбоната (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).<sup>2</sup> Буферная система на основе CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> чаще применяется из-за ее сходства с системой, которую естественным образом используют организмы для поддержания оптимального физиологического pH. Например, эта система присутствует в крови млекопитающих и служит для предотвращения неблагоприятных изменений pH в результате колебаний содержания газа, питательных веществ и метаболитов.

Бикарбонатная буферная система работает по принципу Ле-Шателье (см. рис. 2).

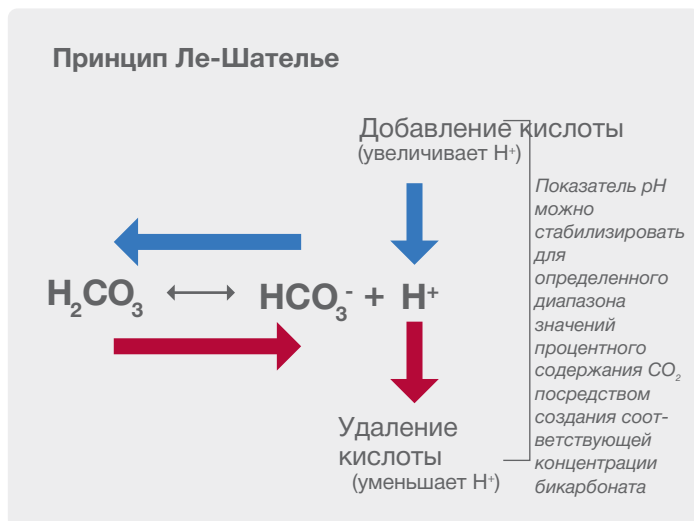
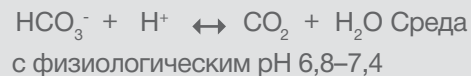


Рис.2: Принцип действия бикарбонатной буферной системы. Пример взят с сайта <https://www.phe-culturecollections.org.uk>.<sup>3</sup>

Почему содержание CO<sub>2</sub> является критическим параметром процесса?

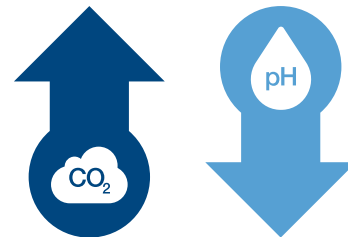
Повышенная кислотность среды свидетельствует об увеличении количества ионов водорода (H<sup>+</sup>). Свободные бикарбонат-ионы вступают в реакцию со свободными ионами H<sup>+</sup> с образованием углекислоты (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), смещая равновесие реакции (см. уравнение 1) вправо и стабилизируя значение pH.

### Уравнение реакции 1:



Исходя из вышеизложенного:

- увеличение количества бикарбонат-ионов ведет к увеличению значения pH среды;
- увеличение парциального давления CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) и, как следствие, увеличение DCO<sub>2</sub> ведет к снижению значения pH.



6,8 < Физиологический pH клеточной культуры < 7,4

Уравнение 1 и рис. 2 также показывают, что физиологический pH может поддерживаться при разных уровнях DCO<sub>2</sub> при условии, что количество NaHCO<sub>3</sub> в составе среды соответствует ожидаемым потребностям конкретных биопроцессов. Например, для достижения pH в обычно используемой для выращивания клеточных культур среде, например RPMI, при ожидаемой величине pCO<sub>2</sub> в реакторе 5% концентрация NaHCO<sub>3</sub> должна составлять 1,9–2,2 г/л. Для другой среды, например DMEM, допустимо номинальное значение pCO<sub>2</sub> до 10% при начальной концентрации NaHCO<sub>3</sub> до 3,6 г/л.<sup>4</sup> Вследствие этого, очень важно учитывать, что жесткого контроля pH недостаточно для обеспечения постоянства содержания CO<sub>2</sub>.

В водном растворе с pH 7 DCO<sub>2</sub> присутствует, в основном, в двух неорганических формах: в форме свободного водного диоксида углерода (CO<sub>2</sub> (водн.)) и в форме бикарбонат-иона (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Согласно закону Генри, растворимость CO<sub>2</sub> в водных растворах зависит от pCO<sub>2</sub> в паровой фазе над жидкостью.

## Уравнение закона Генри:

$$H_{\text{CO}_2} = \frac{C_{\text{CO}_2\text{L}}}{P_{\text{CO}_2}} \left[ \frac{\text{ммоль}}{\text{л бар}} \right]$$

Закон Генри помогает проиллюстрировать, почему  $\text{DCO}_2$  обычно выражается в единицах парциального давления  $\text{CO}_2$  ( $p_{\text{CO}_2}$ ), а не молекулярной концентрации.

**Наиболее распространенные единицы измерения парциального давления: мбар, кПа, мм рт. ст. или % насыщения. Единицы измерения в литературе по  $\text{CO}_2$  обычно различаются в зависимости от области: например, в литературе по биологии, как правило, используются единицы «мм рт. ст.» и «% насыщения». Для облегчения восприятия этого информационного материала, в глоссарий включена таблица перевода единиц измерения под названием «Растворенный  $\text{CO}_2$ ».**

Согласно закону Генри,  $p_{\text{CO}_2}$  влияет на обмен  $\text{CO}_2$  между внутриклеточной цитоплазмой (где происходят метаболические реакции) и внеклеточной средой. Большой градиент между  $p_{\text{CO}_2}$  в среде и во внутриклеточной цитоплазме вызовет приток  $\text{CO}_2$  в клетки и изменение внутриклеточного pH. Нарушение равновесия  $\text{CO}_2$  в цитозоле приводит к выходу внутриклеточного pH за пределы физиологического диапазона. Это нарушает картину метаболизма, приводя к снижению продуктивности или даже к апоптозу.

Парциальное давление  $\text{CO}_2$  в среде имеет решающее значение для благополучия клетки, поэтому также важно учитывать, что при его использовании в качестве компонента буферной системы на него влияют многие параметры биопроцесса. К ним относятся, в частности, степень минерализации среды, температура (см. рис. 3) и гидростатическое давление. Например, в крупных промышленных биореакторах гидростатическое давление в верхней и нижней части реактора сильно отличается. Для правильного представления о поведении  $\text{CO}_2$  в биореакторе все эти факторы необходимо учитывать.

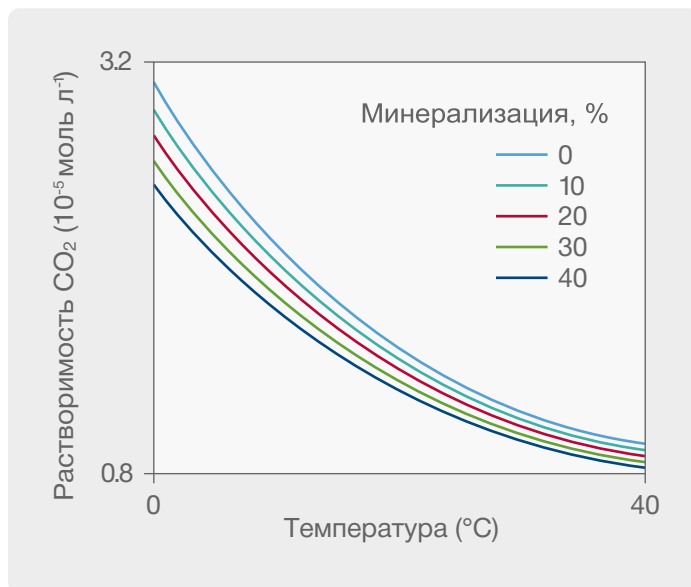


Рис. 3: Растворимость углекислого газа в воде при различных температурах. Данные из книги «Carbon Dioxide Sensing».<sup>5</sup>

## 1.1.2 Регулирование pH за счет барботирования CO<sub>2</sub>

Как было отмечено в предыдущем разделе, стабильное нахождение внутриклеточного pH в нужном диапазоне способствует росту культуры и выработке целевого продукта. Поддержание этого стабильного заданного значения pH в сложных условиях биореактора требует точно выверенной стратегии управления на всех этапах технологического процесса. В отсутствии такой стратегии среда имеет тенденцию к закислению. Для поддержания желаемого значения pH в состав всех сред входят буферные агенты. В этом разделе мы описываем, как работает буферная система в промышленных биопроцессах.

Для достижения желаемого значения pH, в начале биопроцесса в биореактор добавляется NaHCO<sub>3</sub> в определенной концентрации. В ходе биопроцесса буфер поддерживает оптимальное значение pH. В некоторых случаях буферная система регулируется добавлением кислот Бренстеда (например, HCl) – для понижения pH или оснований Бренстеда (например, NaOH) – для повышения pH. Это широко используемая методика поддержания постоянного pH в биореакторе, но она имеет потенциальные недостатки. Например, постоянное регулирование такими добавками увеличивает осмоляльность среды в ходе всего процесса.

Осмоляльность может влиять на каждый процесс по-разному, но принято считать, что она отрицательно сказывается на продуктивности культур (т.е. на конечном белковом титре).

В большинстве клеточных культур, выращиваемых с целью производства моноклональных антител (mAb) или вакцин, для преодоления этих недостатков вместо стандартной кислоты Бренстеда теперь используется буферная система на основе CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> может вводиться в биореактор тремя основными путями:

- подачей в паровую фазу над жидкостью;
- подачей в нижнюю часть реактора (барботаж); за
- счет его образования при добавлении NaHCO<sub>3</sub>.

DCO<sub>2</sub> используется для регулирования эффективности буфера и, в конечном итоге, pH среды, поэтому его необходимо добавлять в соответствующих количествах.

В случае добавления CO<sub>2</sub> уравнение 1 преобразуется в уравнение 2 (см. рис. 4 ниже):



Рис. 4: Биореактор с барботажной системой для нескольких газов.

## 1.2 Сопутствующий продукт метаболизма клеточной культуры

В дополнение к описанным выше процессам преднамеренного добавления  $\text{CO}_2$ , он также накапливается в биореакторе как сопутствующий продукт метаболизма клеточной культуры. Биостехиометрию этих реакций в культурах млекопитающих можно охарактеризовать двумя основными процессами. Первый процесс – это дыхание (потребление кислорода), в котором глюкоза окисляется с образованием основной молекулы для внутриклеточного обмена энергией – АТФ (уравнение 3, рисунок 5). Второй процесс – процесс, обеспечивающий рост клеток и выработку терапевтических белков, включая mAb (уравнение 4, рис. 6).

Оба метаболических процесса включают реакции глюкозы с кислородом и другими молекулами с образованием углекислого газа в качестве побочного продукта. Небольшая часть продуцируемого клетками в этих процессах  $\text{CO}_2$  повторно используется в процессах синтеза, таких, например, как образование жирных кислот или клеточной мембраны, но большая его часть выделяется из клетки в окружающую среду. Это приводит к постепенному увеличению количества растворенного  $\text{CO}_2$  в ходе всего процесса, если его не контролировать.



Рис. 5: Упрощенная схема аэробного дыхания клеток.



Рис. 6: Упрощенная схема глюкозно-лактатного метаболизма, роста клеток и выработки белка.



Эти реакции наглядно демонстрируют взаимосвязь между потреблением кислорода, плотностью жизнеспособных клеток, титром продукта, образованием углекислого газа и выработкой лактата. Таким образом, определение уровня растворенного кислорода и производимого/потребляемого  $\text{CO}_2$  имеет важное значение для оценки

правильности развития биопроцесса. Это особенно необходимо для точного определения таких параметров, как скорость усвоения кислорода (OUR), скорость образования двуокиси углерода (CER) и дыхательный коэффициент (RQ).<sup>6</sup>

## 1.3 Изменение $\text{pCO}_2$ и pH в ходе биопроцесса

Как уже говорилось,  $\text{CO}_2$  имеет многогранную связь с pH среды. Это типичный продукт клеточного дыхания и главный компонент буферных систем (оба способствуют повышенному образованию кислоты в растворе). Есть также и другие факторы, способствующие повышению кислотности среды, в частности лактат, который взаимодействует с  $\text{CO}_2$  и буферной системой, которые необходимо учитывать. В этом разделе рассматривается взаимное влияние этих факторов и ожидаемое поведение каждого параметра в ходе типичного процесса.

### 1.3.1 Влияние взаимодействия лактата и $\text{pCO}_2$ на pH культуры

Помимо  $\text{CO}_2$  и других продуктов, метаболизм глюкозы также приводит к выработке лактата, как показано на рисунке 6. Лактат интенсивно вырабатывается во время фазы роста и накапливается в биореакторе. Он действует как кислота Бренстеда,

образуя ионы  $\text{H}^+$  и уменьшая тем самым pH среды. Этот эффект уравнивается действием буферной системы, пока она имеет достаточный потенциал. В отсутствие нейтрализации накопление лактата станет токсичным для культуры.

Пока биопроцесс идет должным образом, клеточные культуры при входе в стационарную фазу начинают потреблять лактат собственной выработки в качестве дополнения или замены глюкозы как источника углерода. Такое изменение называется лактатным смещением и обычно считается положительным явлением. Это смещение предотвращает накопление лактата и одновременно снижает необходимое снабжение глюкозой. Этот ключевой момент также связан с увеличением продолжительности культивирования и титров конечного продукта.<sup>7</sup>

Если в процессе происходит лактатное смещение, оно обычно начинается, когда культура входит в стационарную фазу. Исследования показали, что повышенное  $\text{pCO}_2$  (по сравнению с

Лактатное смещение

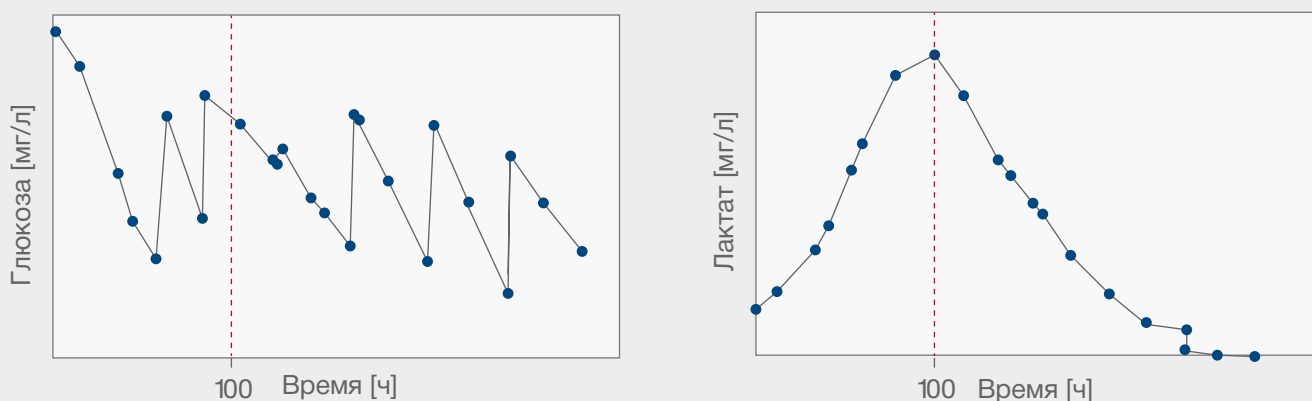
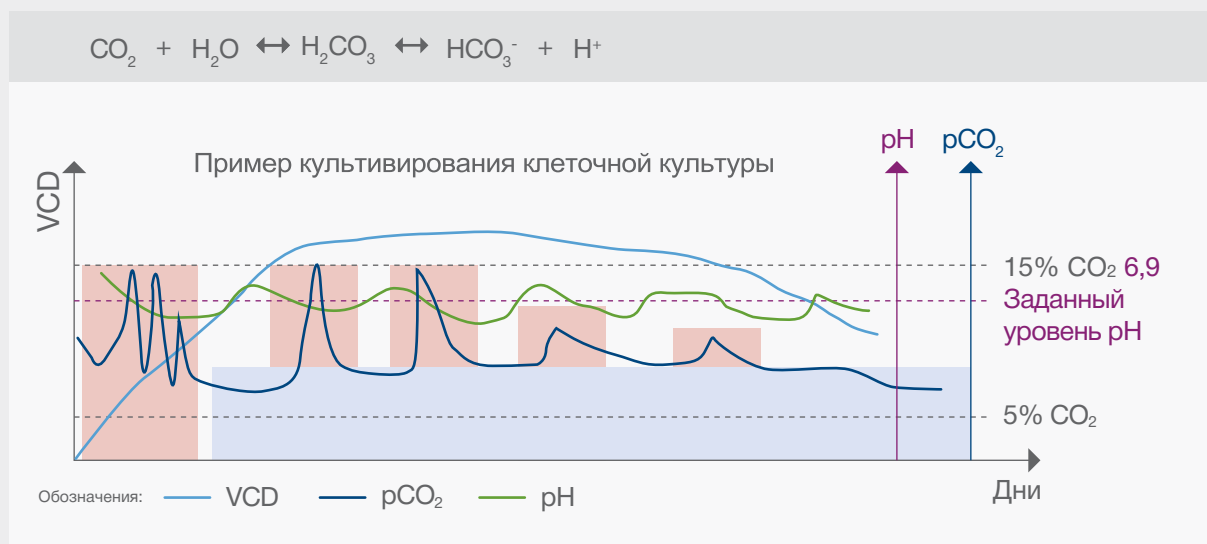


Рис.7: В здоровой клеточной культуре можно ожидать смещения потребления глюкозы на потребление лактата через определенное время; в данном примере оно составляет 100 часов.

контрольными культурами с более низкими значениями  $pCO_2$ ) в реакторах периодического действия с подпиткой и без приводит к задержке или полному отсутствию этого смещения. В такой ситуации для поддержания нужного уровня pH накопление лактата необходимо постоянно компенсировать добавлением основания.<sup>27</sup> Непрерывное добавление основания увеличивает осмоляльность среды, что, как упоминалось выше, может привести к токсикологическому воздействию или снижению продуктивности. Другими словами, определение и контроль надлежащего уровня  $pCO_2$  в конкретном биопроцессе гарантирует, что лактатное смещение произойдет (или произойдет раньше), что в результате приведет к повышению продуктивности.

### 1.3.2 Как изменяются в процессе культивирования клеток pH, $pCO_2$ и VCD

Важнейшие роли pH и  $CO_2$  в биопроцессе сложны и взаимосвязаны<sup>8</sup>, прежде всего потому, что  $CO_2$  используется для регулирования pH. Это может привести к ложному предположению, что, регулируя pH, можно также держать под контролем  $CO_2$ . Из рисунка 8 видно, что это совсем не так. В этом типичном примере значение pH 9,10 поддерживается на уровне 6,9 с допустимым отклонением  $\pm 0,1$ . Однако кривая  $CO_2$  показывает значительные вариации, связанные с особенностями процесса. Рисунок 9 иллюстрирует взаимосвязь содержания  $CO_2$ , добавления основания и лактата с показателем pH среды.



#### Подача $CO_2$

В начале процесса культивирования среда имеет некоторые свойства основания:  $CO_2$  подается для понижения уровня pH до оптимального заданного значения.



#### Снижение содержания $CO_2$

Плотность жизнеспособных клеток (VCD) на стационарной стадии находится на максимуме. При большом значении VCD вырабатывается избыточное количество  $CO_2$ , и pH падает ниже заданной величины. Этот избыток должен быть нейтрализован подачей основания ( $NaHCO_3$ ) или путем выпуска  $CO_2$ . Подача  $CO_2$  необходима только в случае возрастания pH (пики на графике).

Рис. 8: Кривые изменения pH,  $pCO_2$  и VCD в клеточной культуре с периодической подпиткой при регулировании pH и только контроле  $pCO_2$ .

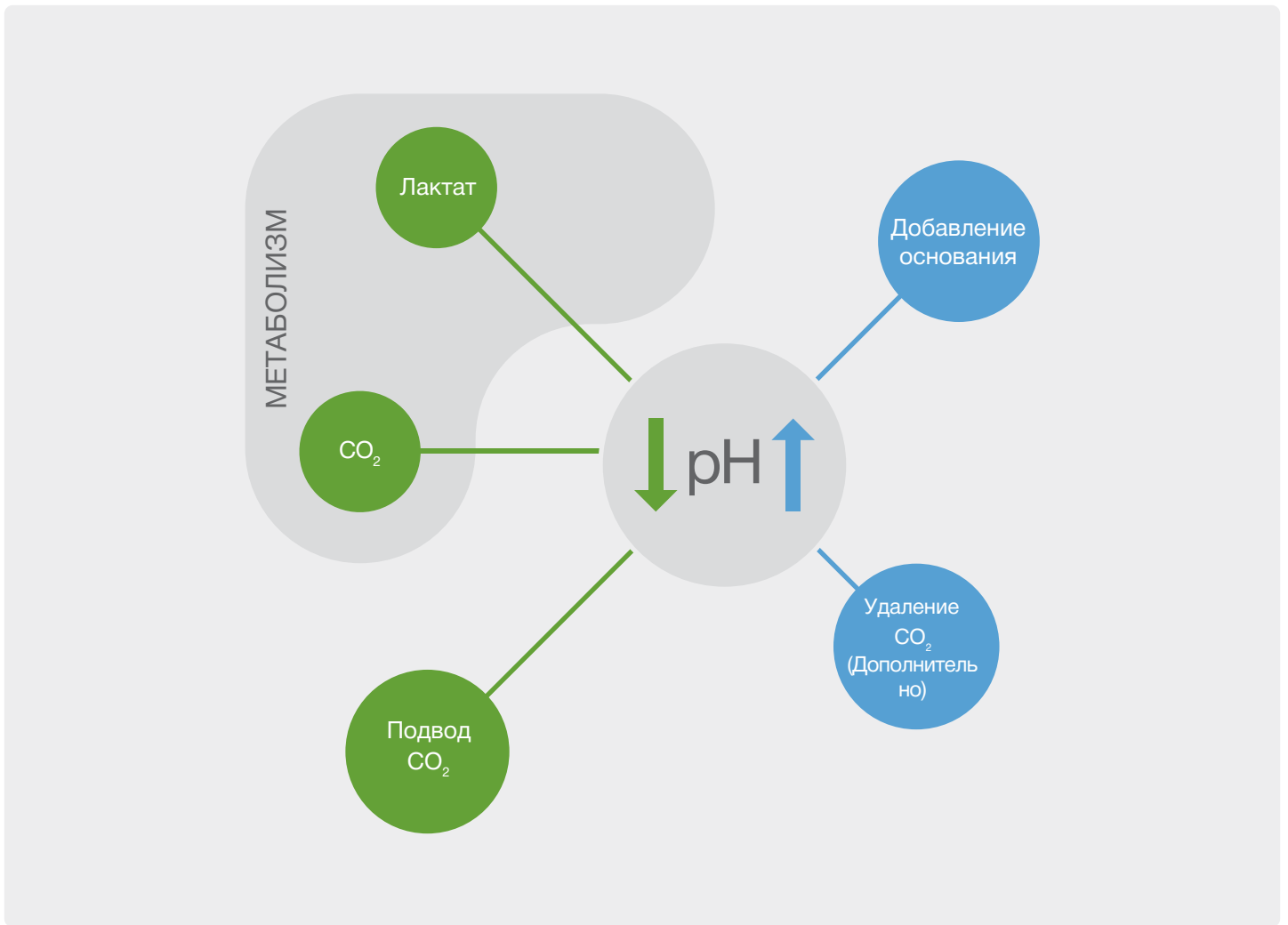


Рис. 9: Ключевые факторы воздействия на уровень pH клеточной культуры.

В этой части представлены подробные сведения, необходимые для понимания того, почему  $\text{DCO}_2$  является критическим параметром процесса. О нем будет идти речь и в части 2, а далее, в части 3, будут рассмотрены преимущества регулирования содержания  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени.

## 2. Содержание CO<sub>2</sub> – критический параметр процесса

Как было отмечено выше, изменение содержания CO<sub>2</sub> в ходе биопроцесса является индикатором благополучия клеточной культуры, но, в большей степени, его содержание – это критический параметр процесса (CPP). В соответствии с Инициативой развития процессно-аналитической технологии (PAT)<sup>1</sup> это означает, что pCO<sub>2</sub> (наряду с такими параметрами, как pH и температура) является актуальным параметром, который подлежит регулированию в биореакторе.<sup>11</sup> Критические параметры процесса оказывают прямое влияние на ключевые

показатели эффективности (KPI), такие как плотность жизнеспособных клеток, а также на критические характеристики качества (CQA) целевого продукта, например, на профили гликолизирования.<sup>33</sup> Как CPP, содержание CO<sub>2</sub> должно иметь определенные заданные показатели и определенный профиль для получения идеальной партии продукта, которую часто называют «золотой партией». В этой части мы рассмотрим, как это выглядит для разных случаев применения, и покажем, почему это так важно.

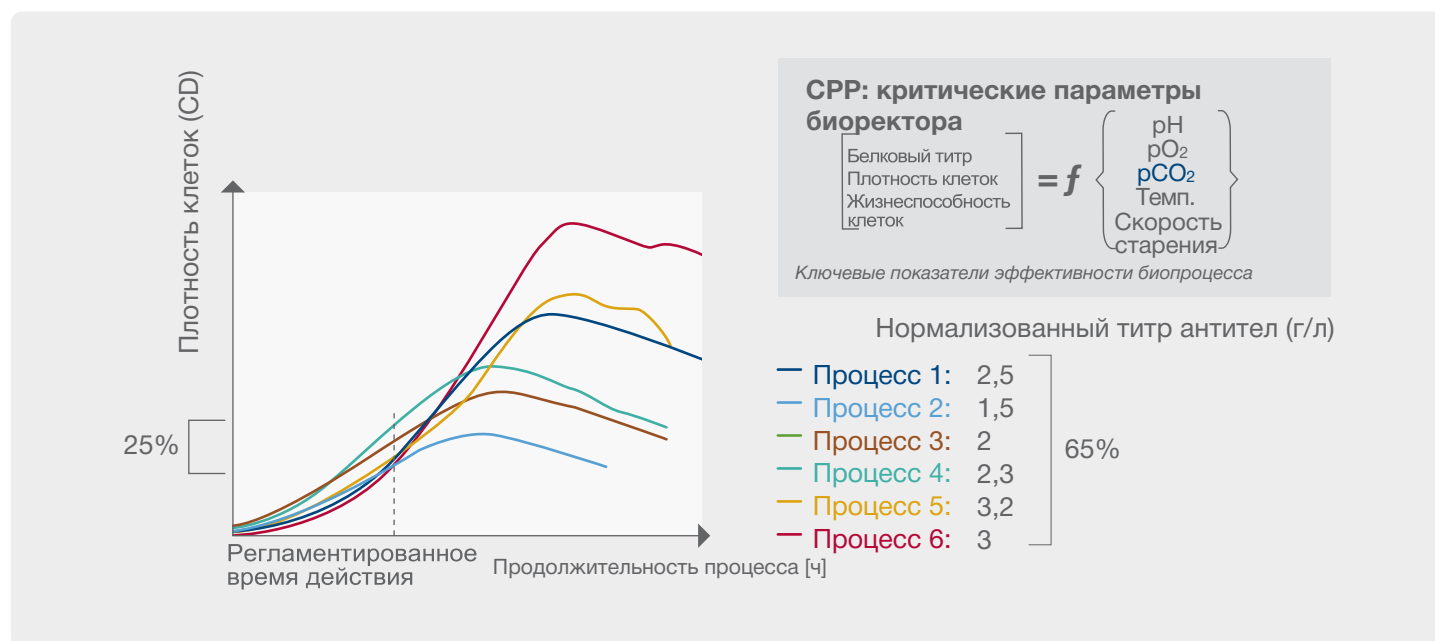


Рис. 10: Регламентированные в технологии PAT критические параметры процесса, влияющие на ключевые показатели эффективности биопроцесса.

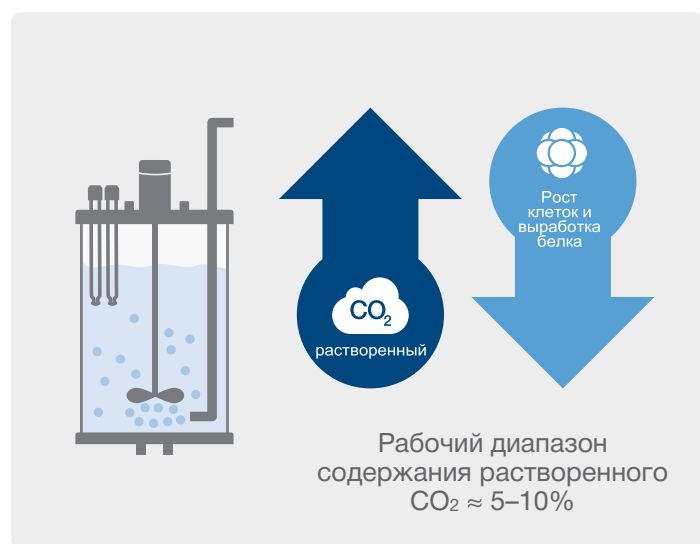


Рис. 11: Схематическая иллюстрация влияния наносящих вред жизнеспособности клеточных культур уровней pCO<sub>2</sub>. Данные из материалов WuXI Biologics: Understanding the Role of Dissolved O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>

on Cell Culture in Bioreactors.<sup>12</sup>

Почему содержание CO<sub>2</sub> является критическим параметром процесса?



## 2.1 Общее воздействие на культуры: углекислого газа не должно быть слишком много или слишком мало

Аналогично любым другим CPP биореакторов (например, DO, pH), слишком большое или слишком малое содержание CO<sub>2</sub> может представлять вред для биопроцесса. Механизм взаимодействия углекислого газа и клеток или микроорганизмов влияет на оптимальный диапазон, который отличается для разных типов культур. Это влияние и оптимальные рабочие диапазоны будут рассмотрены в следующих разделах.

Недостаток растворенного углекислого газа в технологическом процессе приводит к двум основным последствиям. Во-первых, система буферизации pH теряет свою буферную способность. Во-вторых, анаэробные реакции (образующие промежуточные продукты метаболизма), в которых в качестве реагента используется CO<sub>2</sub>, будут затруднены. Оба последствия негативно сказываются на жизнеспособности клеток и, в конечном итоге, на продуктивности биопроцесса. Из литературы известно, что этот нижний предел обычно существует при уровнях насыщения CO<sub>2</sub> ниже 5%.<sup>11</sup> Это может произойти, например, когда массоперенос не контролируется должным образом и удаляется или нейтрализуется слишком много CO<sub>2</sub>. Однако из-за наличия нескольких возможных источников CO<sub>2</sub> в биореакторе такое случается редко.

Гораздо чаще в биореакторе присутствует слишком много CO<sub>2</sub>. Когда его концентрация слишком высока, он оказывает токсическое действие на клеточные культуры и ферментацию, что отрицательно сказывается на жизнеспособности клеток и титре конечного продукта.<sup>13</sup> Буферная система поддерживает pH среды на физиологическом уровне, компенсируя избыток углекислого газа, но только в соответствии со своими возможностями. При их превышении метаболизм клеток замедляется и в конечном итоге перестает функционировать, что приводит к апоптозу клеток. Увеличение емкости буферной системы путем добавления основания (например, NaHCO<sub>3</sub>) для компенсации этого избытка также повышает общую осмоляльность среды. Как уже отмечалось, повышенная осмоляльность также оказывает пагубное влияние на жизнеспособность клеток и титр продукта, поэтому применять основание следует с осторожностью. Каждый биопроцесс имеет определенную толерантность, но 20%-ное насыщение является типичным токсическим уровнем для культур млекопитающих.

Степень чувствительности и допустимые уровни CO<sub>2</sub> широко варьируются в зависимости от типа культуры (животная или бактериальная) и случая применения, но общим для всех процессов является наличие оптимального уровня CO<sub>2</sub>, превышение или недостижение которого может представлять вред.<sup>14</sup>

## 2.2 Специфическое воздействие в зависимости от типа культуры/ферментации

Культуры клеток (такие как CHO или Vero), как правило, более чувствительны к высокому значению pCO<sub>2</sub>, чем процессы бактериальной ферментации<sup>15</sup>, но все биопроцессы имеют уровень DCO<sub>2</sub>, который может быть в самом худшем случае токсичным или, как минимум, неблагоприятным для обеспечения необходимой продуктивности.

Следует отметить, что не только существуют огромные различия между клеточными культурами и бактериальной ферментацией, но даже разные штаммы одного и того же типа клеток имеют разные оптимальные уровни содержания CO<sub>2</sub>. В табл. 1 приведены общие ограничения для различных типов организмов, полученные в результате анализа существующей литературы. В следующем разделе обобщены литературные данные о влиянии CO<sub>2</sub> на жизнеспособность культуры/процесс ферментации и, где это возможно, продуктивность (титр/качество продукта).

### 2.2.1 Клеточная культура (млекопитающих)

Культуры клеток млекопитающих обычно используются для производства терапевтических белков или вакцин. К примеру, клетки яичника китайского хомячка (CHO) часто используются для производства моноклональных антител (mAb), в то время как клетки Vero (из эпителия почек африканской зеленой обезьяны) позволяют получать множество вакцин. Некоторые культуры показали снижение скорости роста на 60% при 30%-ном насыщении углекислым газом (300 мбар), что значительно превышает оптимальный уровень.<sup>15</sup> Что касается конкретно клеток CHO, эксперименты показали снижение жизнеспособности клеток перфузионных культур на 20%. Другие исследования показывают аналогичные эффекты в культурах клеток гибридомы.<sup>15</sup> Опубликованы также недавние исследования влияния CO<sub>2</sub> на рост культуры для T-клеточной терапии.<sup>16</sup> В этих случаях уровни CO<sub>2</sub> всего лишь в 20% демонстрируют негативное влияние как на жизнеспособность, так и на метаболизм.

В целом, разные уровни CO<sub>2</sub> оказывают влияние на удельную продуктивность.<sup>17</sup> Показано, что значения pCO<sub>2</sub> выше оптимальных могут вызывать почти 70%-ное снижение титра протеина. Что касается качества продукта или терапевтического эффекта, повышенные уровни HCO<sub>3</sub> (необходимые для буферизации увеличения содержания CO<sub>2</sub>) оказывают пагубное влияние на важные CQA, например, содержание глюканов снижается на 40%.<sup>27</sup>

## 2.2.2 Ферментация

### Бактерии

Как и клетки млекопитающих, бактерии также страдают от повышенного уровня растворенного углекислого газа. Однако бактерии более устойчивы к повышенным концентрациям CO<sub>2</sub>, поэтому вредное воздействие, в основном, ограничивается снижением скорости их роста. Например, скорость роста *Bacillus subtilis* подавляется на 40% при 17% pCO<sub>2</sub>. Показано, что *E. Coli* имеет значительно более низкую скорость преобразования глюкозы в биомассу, когда аэрирующая среда биореактора содержит 20%-ный избыток CO<sub>2</sub>.<sup>15</sup> Когда DCO<sub>2</sub> увеличивается до 30%, максимальная скорость роста снижается на 30%, и при ферментации образуется в два раза больше ацетата. Зависимость между pCO<sub>2</sub> и ростом также наблюдалась в культурах *S. glutamicum*, когда они использовались для производства L-лизина: в герметичных биореакторах, когда диапазон CO<sub>2</sub> составлял от примерно от 20% до 80%, скорость роста падала примерно на 40%.

В случае бактериальной ферментации есть еще один важный аспект, связанный с содержанием CO<sub>2</sub>, как критическим параметром процесса (CPP). Когда при бактериальной ферментации (например, *E. Coli*) в качестве источника углерода используются простые молекулы, такие как глюкоза, простые молекулы поглощаются очень быстро, чтобы свести к минимуму образование вредного побочного продукта ацетата. Поглощение идет настолько быстро, что прямого мониторинга глюкозы недостаточно для организации автоматической подачи. Вместо этого необходимо использовать косвенный KPI, такой как скорость выделения углерода (CER).<sup>18</sup> Прямое определение DCO<sub>2</sub>, которое требуется для точной оценки CER, является необходимым условием для автоматизации биопроцессов с бактериями.

### Дрожжи

Дрожжевые культуры менее чувствительны к высокому уровню pCO<sub>2</sub> по сравнению с используемыми в биопроцессах клетками животных и бактериями. Тем не менее, при уровне CO<sub>2</sub> 50% наблюдается сильное падение роста почти на 40%. Было обнаружено, что культуры *S. Cerevisiae* делятся намного медленнее при pCO<sub>2</sub> на уровне 50% (500 мбар). Такой высокий уровень CO<sub>2</sub> также связан с большим количеством этанола, побочного продукта метаболизма, который тоже угнетает рост. Даже в этом случае снижение роста достигает 25% только тогда, когда pCO<sub>2</sub> превышает 60% (600 мбар). Следует отметить, что пагубное влияние на рост наблюдалось в основном у аэробных культур.<sup>19</sup> Анаэробные культуры проявляют очень слабый эффект при высоком pCO<sub>2</sub>.

В процессах с участием дрожжей параметр DCO<sub>2</sub> важен для правильного расчета дыхательного коэффициента (RQ). RQ отражает распределение между дыханием и другими реакциями, в которых выделяется O<sub>2</sub> и поглощается CO<sub>2</sub>. RQ можно использовать для описания метаболизма культуры. RQ около 1 указывает на оксидативный

**Табл. 1. Средние токсические уровни pCO<sub>2</sub> для различных культур**

Тип культуры	Излишне высокое значение pCO <sub>2</sub>	Средние токсические уровни pCO <sub>2</sub> *
 Клеточная культура млекопитающих	<p>Снижение скорости роста почти на 60%</p> <p>Снижение белкового титра почти на 70%</p> <p>Снижение качества продукта почти на 50%</p>	>20% (>200 мбар) (> 30% при непрерывном культивировании)
 Бактерии	Снижение скорости роста почти на 40%	> 30% (150/300 мбар)
 Дрожжи	Снижение скорости роста почти на 25%	> 50% (500 мбар) Может выживать и адаптироваться даже при более высоком уровне растворенного CO <sub>2</sub>
 Грибы	Снижение содержания антибиотика почти на 36%	> 15% (150 мбар)

\* Получено из данных научной литературы, на которую есть ссылки в тексте, и подробно описано в литературе из списка в конце настоящего информационного материала.

(аэробный) рост на глюкозе, RQ более 1 характеризует метаболизм переполнения (также аэробный), а RQ менее 1 указывает на поглощение этанола.<sup>20</sup>

## Грибы

В процессах с участием грибов торможение роста может наблюдаться до уровня насыщения  $\text{CO}_2$  8% (80 мбар), хотя это значение может быть и выше, например, для *Penicillium chrysogenum*. Механизмы этого торможения еще полностью не определены, но они могут быть связаны с вмешательством в синтез веществ-предшественников в процессе метаболизма. Это, в свою очередь, отражается на продуктивности. Слишком большое значение  $p\text{CO}_2$  отрицательно сказывается на веществах-предшественниках пенициллина и, следовательно, препятствует выработке этого антибиотика. То же самое наблюдалось с культурами *Acremonium chrysogenum*, используемыми для получения Cephalosporin C. В этом случае культивирование при уровне  $\text{DCO}_2$  выше 15% ведет к снижению выработки антибиотиков почти на 36%.<sup>15</sup>

Описанные выше отрицательные воздействия неоптимальных уровней содержания  $\text{CO}_2$  наглядно иллюстрируют, почему параметр  $\text{DCO}_2$  имеет критически важное значение и что существует необходимость в его точном мониторинге и регулировании. Фактически, регулирование параметра  $\text{DCO}_2$  – это не просто средство защиты от описанных выше пагубных токсических эффектов, а это также инструмент для оптимизации биопроцессов. Подробно об этом будет сказано в следующей части.

# 3. Мониторинг и регулирование содержания $\text{CO}_2$ в режиме реального времени

Теперь должно быть ясно, какова роль  $\text{CO}_2$  в биопроцессах и почему так важно определить оптимальный профиль изменения содержания  $\text{CO}_2$  для каждого процесса. Чтобы в максимальной степени использовать преимущества этого профиля и избежать пагубных последствий нарушения оптимальных условий, необходимо контролировать и регулировать содержание  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени, в идеале – прямо на месте/в ходе процесса.<sup>21</sup> Непрерывный мониторинг  $\text{CO}_2$  может помочь немедленно выявить возникшие в биопроцессе проблемы (например, изменения метаболизма, загрязнения), а автоматическая система регулирования гарантирует, что уровень  $\text{CO}_2$  будет оставаться оптимальным на протяжении всего процесса. В этой части будут рассмотрены соображения относительно стратегии управления и подробно описаны существенные преимущества мониторинга и регулирования уровня  $\text{DCO}_2$  в реальном времени, в том числе обеспечивающие более высокий выход продукта и более эффективное масштабирование производства.

## 3.1 Соображения по стратегии регулирования

Чтобы объяснить преимущества, которые обеспечивает возможность регулирования уровня  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени, важно отметить следующий момент: *не существует единой универсальной стратегии, которая подошла бы для всех биопроцессов*. Другими словами, не существует одного значения  $p\text{CO}_2$  или одной стратегии регулирования, которые были бы оптимальны для культивирования любых клеток или осуществления ферментации. Следует отметить различия между заданными уровнями  $\text{CO}_2$  для двух разных стратегий подачи (для процессов с периодической подпиткой и непрерывных (перфузионных)).

### ■ Процессы с периодической подпиткой (или просто периодические)

В настоящее время это наиболее распространенный тип биопроцессов для культивирования клеток и ферментации. В отсутствие регулирования уровня  $\text{CO}_2$  в этих процессах очень сильно варьируются в зависимости от масштаба производства. Промышленные биореакторы, как правило, имеют достаточно большие объемы, обычно исчисляемые тысячами литров. В больших объемах отношение площади поверхности к объему снижается и способствует уменьшению массопереноса, что приводит к большому накоплению  $\text{CO}_2$  в них.

В проходящих в таких условиях биопроцессах вредное воздействие проявляется при уровне  $p\text{CO}_2 \approx 5\%$ . Среда здесь обычно требует более низкой емкости буферной системы, чем в перфузионном реакторе.

### ■ Перфузионные процессы

Они начинают все чаще применяться при производстве биопродукции с использованием клеточных культур. Обычно в перфузионных реакторах используются среды с высокой буферной емкостью. Высокая плотность клеток и длительное время накопления  $\text{CO}_2$  требуют обеспечения производства при уровне  $p\text{CO}_2$  в растворе до 30%.

Для каждого случая должен быть определен оптимальный заданный уровень. Далее важное значение приобретает выбор стратегии его регулирования. Когда в биопроцессе имеется риск накопления  $\text{CO}_2$  до вредного или даже токсического уровня, необходимо разработать стратегию его нейтрализации или удаления из среды. Это сложная задача, поскольку параметры процесса массообмена, такие, например, как коэффициент  $K_LA$ , определяются и используются сначала для оптимизации переноса кислорода, а затем массопереноса  $\text{CO}_2$ .

CO<sub>2</sub> имеет в 20 раз большую растворимость в водных средах, чем O<sub>2</sub>, и поэтому требует другого подхода. В противном случае оптимизация переноса кислорода будет противоречить требованиям по регулированию уровня CO<sub>2</sub>. Например, при добавлении для оптимального массообмена кислорода, для увеличения общей площади поверхности обмена используется барботер, создающий маленькие пузырьки газа. В то время как наиболее эффективный барботаж/отвод CO<sub>2</sub> происходит при подаче газа более крупными пузырькам. Поскольку двойные барботеры редко применяются в биореакторах (например, один для воздуха и один для N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>), особенно в промышленных, без организации правильного регулирования существует риск накопления CO<sub>2</sub> до недопустимого уровня.

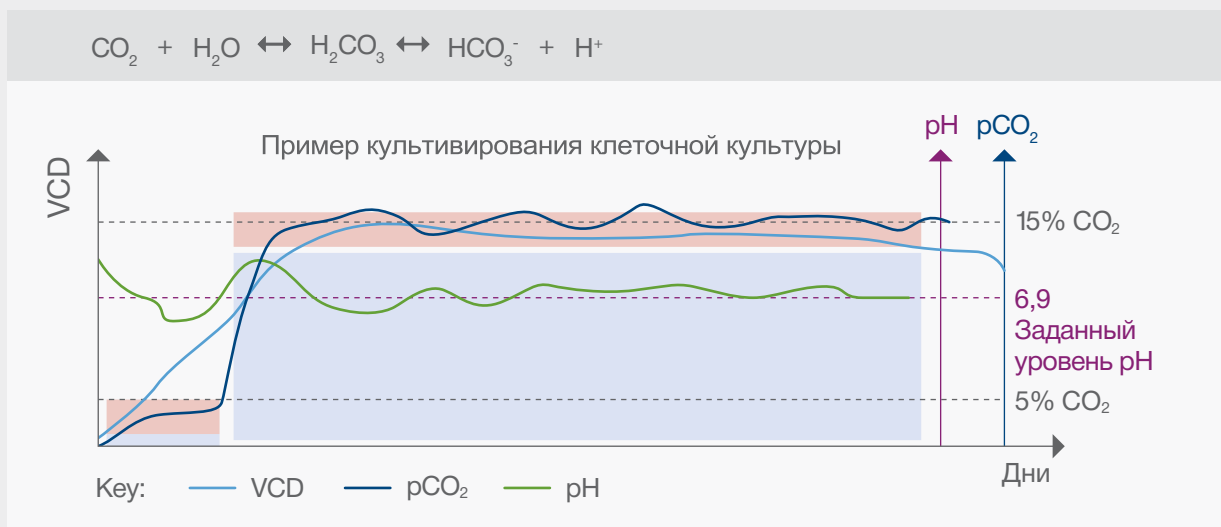
Таким образом понятно, что при определении оптимальной стратегии регулирования содержания CO<sub>2</sub> важно учитывать все оказывающие влияние на биопроцесс факторы. Краткий перечень основных факторов:

- Клеточный штамм (например, допустимое отклонение pCO<sub>2</sub>)

- Состав среды (например, состав буферного агента, питательной среды)
- Тип биопроцесса/биореактора (например, периодический, периодический с подпиткой, перфузионный)
- Тип барботера (например, одинарный или двойной, крупные или мелкие пузырьки)
- Производительность/объем биореактора

Каждая комбинация этих факторов требует определения конкретного оптимального уровня pCO<sub>2</sub> и стратегии его регулирования. Однако общим для всех биопроцессов является тот факт, что для обеспечения максимальной производительности требуется регулирование уровня CO<sub>2</sub> в режиме реального времени.

Иллюстрация преимуществ использования регулирования уровня CO<sub>2</sub> представлена на рис. 12. По сравнению с вариантом без регулирования уровня CO<sub>2</sub> (см.рис. 8), процесс с его регулированием имеет значительно более продолжительную продуктивную фазу при максимальном значении VCD. График также показывает, что более жесткий контроль CO<sub>2</sub> позволяет более точно регулировать pH. <sup>9,28</sup> Это будет дополнительно показано с примерами в следующих разделах 3.2 и 3.3.



#### Подача CO<sub>2</sub>

В начале процесса культивирования среда имеет слабые свойства основания: CO<sub>2</sub> пропускается через среду для понижения уровня pH до оптимального заданного значения. В стационарной фазе содержание CO<sub>2</sub> поддерживается на заданном уровне в режиме реального времени, как и значение pH. В этом случае регулирования нет большого разброса значений CO<sub>2</sub> и pH, они контролируются и устанавливаются с высокой точностью.



#### Снижение содержания CO<sub>2</sub>

В стационарной фазе значение VCD максимально, и удаление требуется только для точной подстройки. В то же время, благодаря стабильному поддержанию уровня pH и pCO<sub>2</sub>, культура в одной и той же партии сохраняет максимальную плотность VCD в течение более длительного периода.

Фигура 12: Пример изменения pH, pCO<sub>2</sub> и VCD в партии подпиткой клеточной культуры в процессе с периодической подпиткой при регулировании уровней pH и pCO<sub>2</sub>.



## 3.2 Продуктивность производства: увеличенная длительность фазы жизнеспособности и максимальный титр продукта

Оптимизация заданного значения  $\text{CO}_2$  и стратегии регулирования в режиме реального времени для каждого биопроцесса повышает его продуктивность и, следовательно, должна выполняться на этапах НИОКР и выпуска ТД. Доказано, что точный контроль уровня  $\text{CO}_2$  существенно повышает продуктивность биотехнологических процессов. Например, в одном исследовании изучались две эквивалентные

культуры в периодическом режиме с подпиткой, одна с регулированием  $\text{pCO}_2$  на уровне 10%, а другая с накоплением  $\text{CO}_2$  до уровня 20%.<sup>9</sup> Регулирование  $\text{CO}_2$  привело к повышению продолжительности продуктивной фазы и более высокому титру белка (рис. 13), даже при эквивалентной точности контроля  $\text{pH}$  ( $6,85 \pm 0,05$ ).

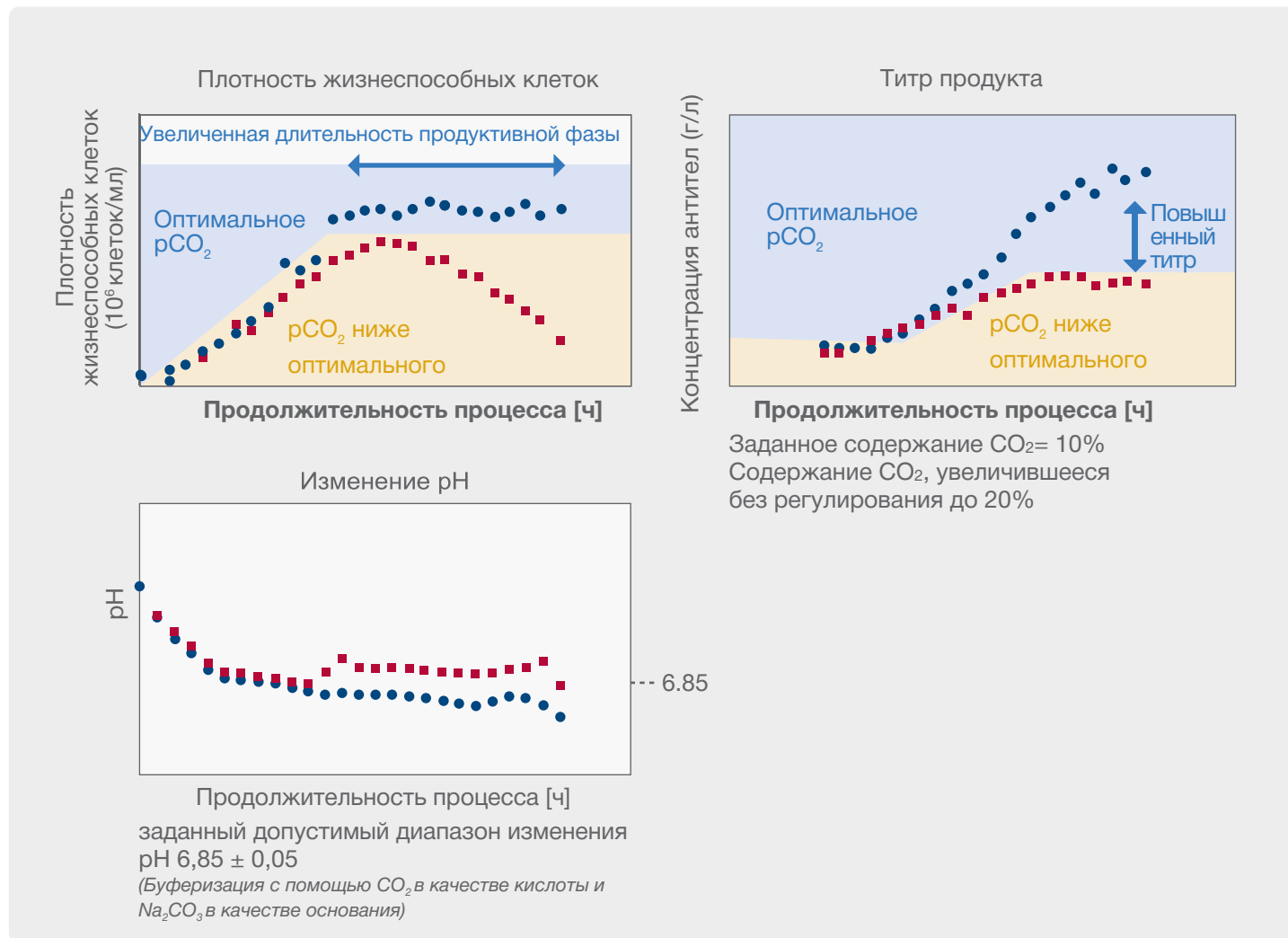


Рис. 13: Влияние  $\text{pCO}_2$  на примере периодического процесса культивирования клеток CHO с подпиткой: оригинальное совместное исследование, опубликованное Институтом биохимической инженерии Университета Штутгарта и Boehringer Ingelheim Pharma GmbH.<sup>9</sup>

Показано, что одного лишь регулирования pH недостаточно для обеспечения максимальной эффективности процесса. В сочетании со специальными возможностями измерения и регулирования уровня  $\text{CO}_2$  продуктивность может быть увеличена. По мере роста признания важности регулирования уровня  $\text{CO}_2$ , компании осуществляют прогрессивные мероприятия, чтобы с выгодой использовать этот момент в своих производственных процессах.

Как отмечалось выше, во избежание повышения осмоляльности уровень  $\text{CO}_2$  следует регулировать, по возможности, без добавления кислот и оснований. Один из примеров такого подхода – подача и удаление исключительно  $\text{CO}_2$ . Этот метод описан Roche в патенте на способ повышения продуктивности производства рекомбинантного белка за счет встроенной системы регулирования уровня  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени.<sup>22</sup> Этот подход проиллюстрирован на рис. 14:

в нем применен двухкаскадный пропорционально-интегральный дифференциальный регулятор (ПИД-регулятор), использующий сигналы обратной связи от встроенного датчика  $\text{pCO}_2$  для регулирования подачи/удаления  $\text{CO}_2$  с помощью микропоточного контроллера (MFC) с использованием  $\text{N}_2$  в качестве вытесняющего газа. Мониторинг и регулирование уровня  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени не только снизили изменчивость параметров процесса, но и подняли его продуктивность в плане повышения белкового титра.<sup>22</sup> Этот патент, в частности, описывает снижение чувствительности клеток к таким событиям, как лактатные пики после введения болюса через регулирование уставки  $\text{CO}_2$ , что в конечном итоге приводит к повышению белкового титра на 50% по сравнению с данными контрольных экспериментов. В других стратегиях регулирования содержания растворенного  $\text{CO}_2$ , в дополнение к стратегии подачи/удаления, реализована обратная связь с встроенным датчиком для управления двигателями, отвечающими за скорость перемешивания.<sup>23</sup>

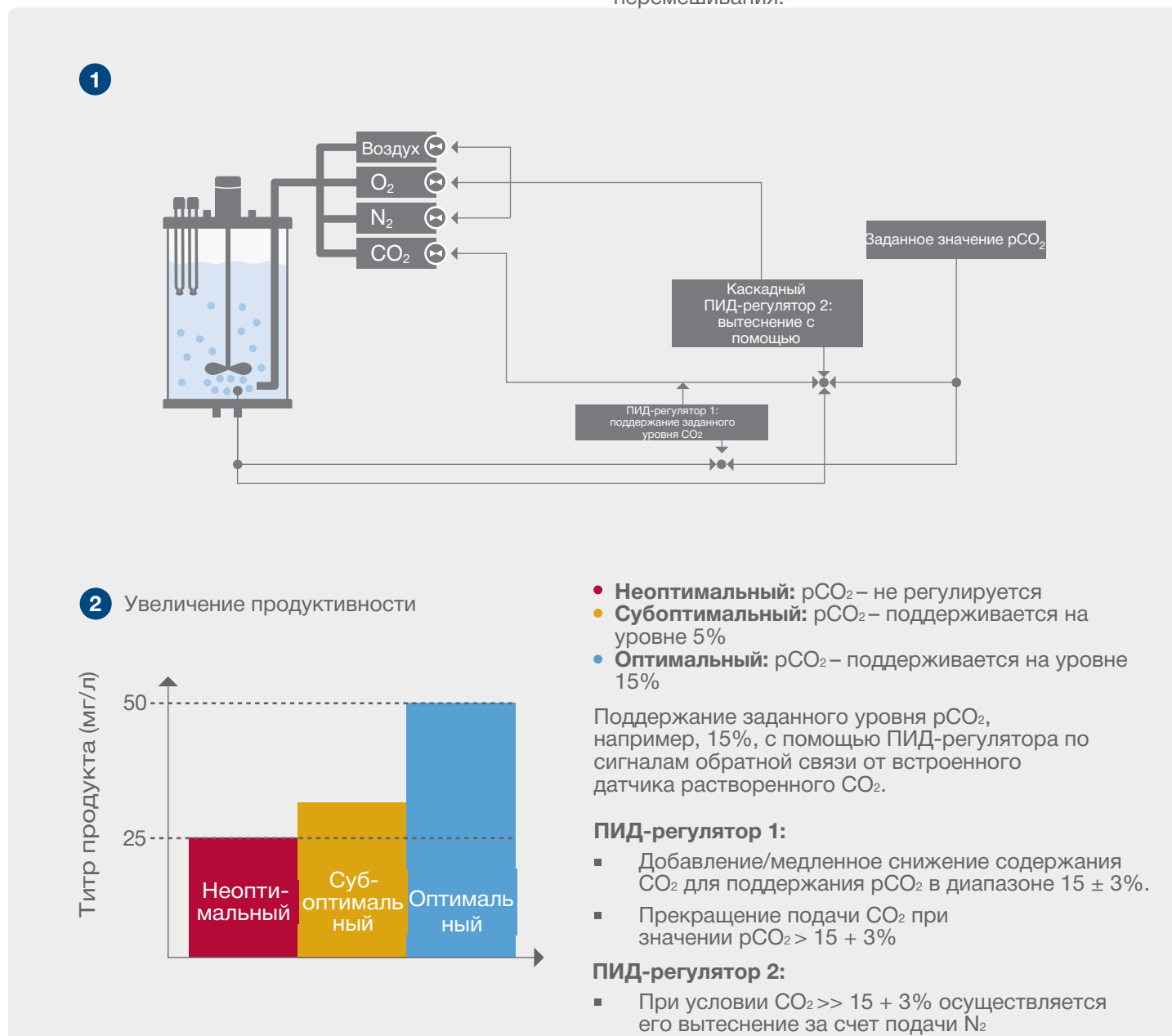


Рис. 14: Повышение титра продукта в процессе с периодической подпиткой с клетками CHO за счет мониторинга и регулирования уровня  $\text{pCO}_2$  непосредственно в ходе процесса. Оригинальный источник: European Patent Office Application 09719289.2.<sup>22</sup>

Автоматический мониторинг и регулирование уровня  $\text{CO}_2$  с помощью оптимизированной стратегии барботажа/удаления значительно повысили эффективность биопроцесса в каждом из этих случаев. При регулировании и мониторинге удалось избежать приводящих к физическим повреждениям концентраций  $\text{DCO}_2$  при достижении максимальной плотности жизнеспособных клеток. Воспроизводимость от партии к партии может быть улучшена, особенно при больших объемах или длительных процессах. В некоторых недавних публикациях специально подчеркивается возможность использования исключительно барботажных газов для регулирования pH (без необходимости применения кислот или щелочей) в установках любого масштаба – от лабораторных до промышленных.<sup>24</sup>

**Продуктивность биопроцесса можно увеличить за счет выбора оптимальной стратегии регулирования уровня растворенного  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени.**

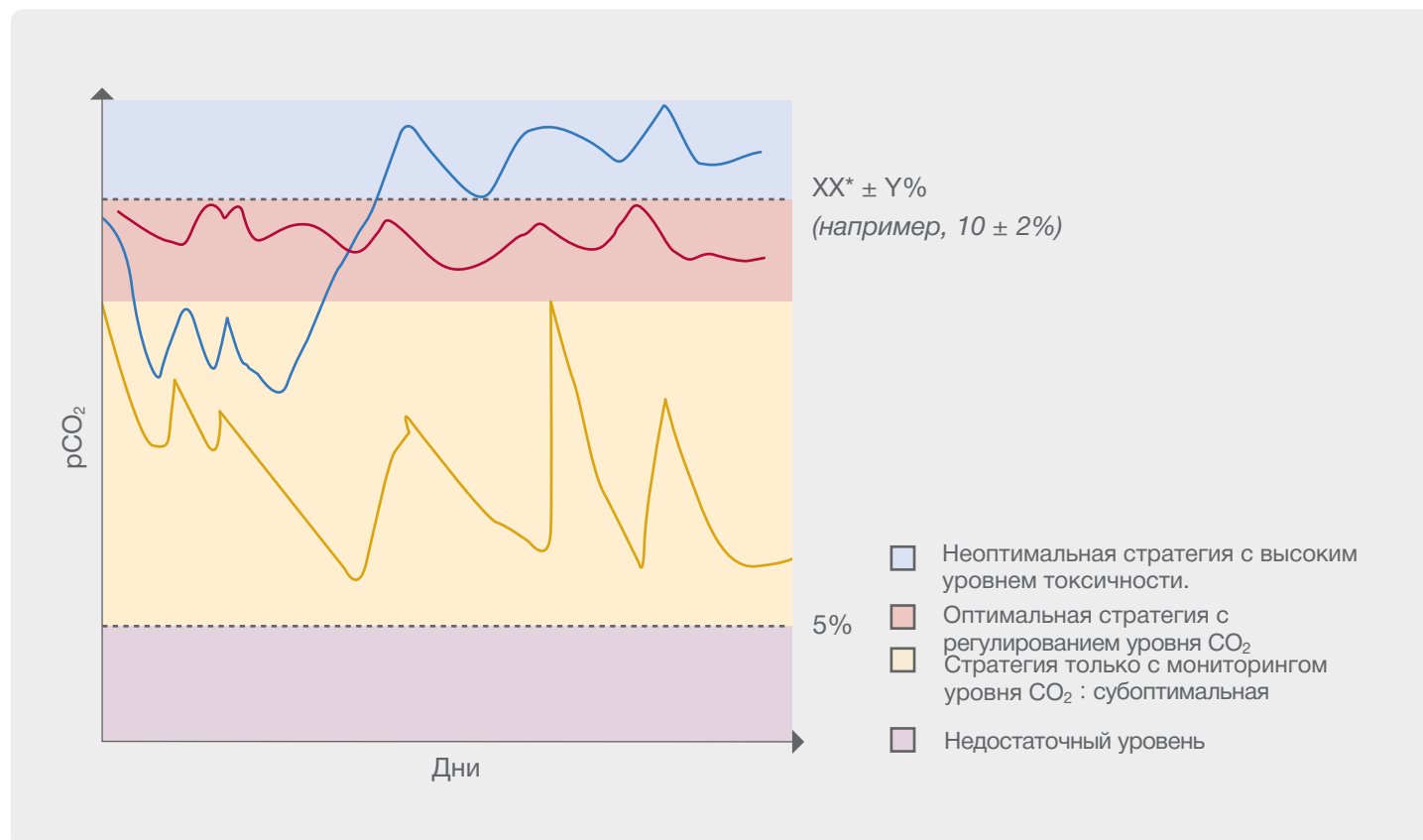


Рис. 15: Упрощенный пример использования регулирования уровня  $\text{pCO}_2$  в режиме реального времени для максимального повышения продуктивности биопроцесса.

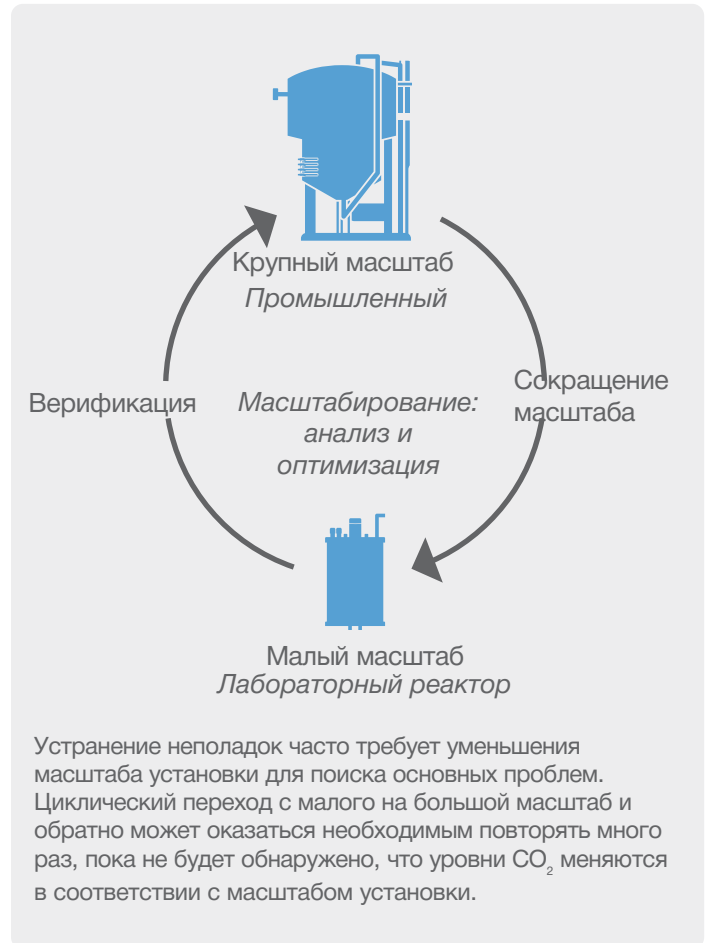
### 3.3 Повышение эффективности разработки: сокращение числа этапов последовательной обработки при масштабировании в любую сторону

Хотя преимущества регулирования уровня  $\text{CO}_2$  очевидны, существуют серьезные проблемы с обеспечением согласованности концентрации  $\text{CO}_2$  на этапе разработки и на этапе промышленного производства.<sup>25</sup> Без измерения и регулирования уровня  $\text{DCO}_2$  в режиме реального времени на этапе разработки такая согласованность редко достигается во время итераций увеличения/уменьшения масштаба при переходе от лабораторной к промышленной установке и наоборот (рис. 16).<sup>26</sup>  $\text{CO}_2$  легче удаляется в масштабе лабораторного образца из-за меньшего отношения площадь поверхности/жидкость и гидростатического давления.<sup>27</sup> В небольших биореакторах большая часть  $\text{DCO}_2$  удаляется поверхностной аэрацией. В крупных промышленных биореакторах отношение площади поверхности жидкости к объему меньше, что требует применения других стратегий удаления  $\text{CO}_2$ .<sup>28</sup> Без корректировки стратегии для крупномасштабных установок  $\text{CO}_2$  будет иметь тенденцию к накоплению, особенно у дна биореактора.

Поэтому, чтобы обеспечить правильное масштабирование без вредного накопления углекислого газа, необходимо определить соответствующий  $K_LA$  для  $\text{CO}_2$  и контролировать его значение в режиме реального времени (см. рис. 17). Такие расхождения при масштабировании могут вызвать значительные изменения в ходе биопроцесса, например, изменения лактатного смещения, что, в конечном итоге, может привести к значительным различиям в значениях KPI (например, титра) и CQA (например, профилей гликозилирования) биопроцесса.

При мониторинге и регулировании уровня  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени процессы в реакторах разных масштабов имеют дополнительный CPP, который можно поддерживать согласованным (или «правильно масштабируемым») на протяжении всего процесса (см. рис. 18). Такое согласование сокращает время и затраты на эксперименты при увеличении и уменьшении масштаба установки, связанные с анализом присутствия  $\text{CO}_2$  и его многосторонним воздействием.

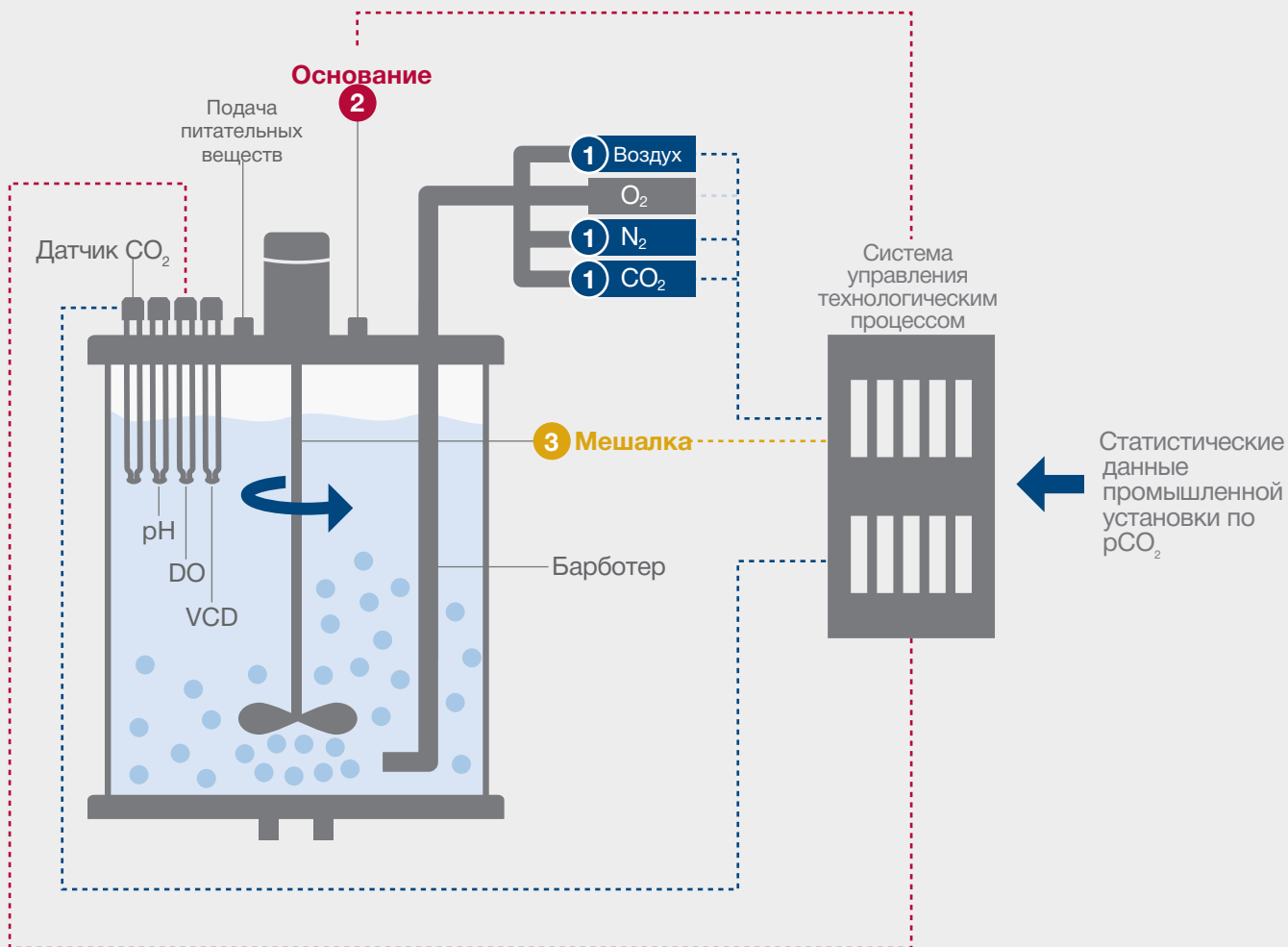
**Регулирование уровня  $\text{CO}_2$  в режиме реального времени обеспечивает идеальное воспроизведение оптимального профиля изменения содержания  $\text{CO}_2$ , что позволяет осуществлять переход от лабораторного к промышленному масштабу и наоборот с максимальной эффективностью.**



Устранение неполадок часто требует уменьшения масштаба установки для поиска основных проблем. Циклический переход с малого на большой масштаб и обратно может оказаться необходимым повторять много раз, пока не будет обнаружено, что уровни  $\text{CO}_2$  меняются в соответствии с масштабом установки.

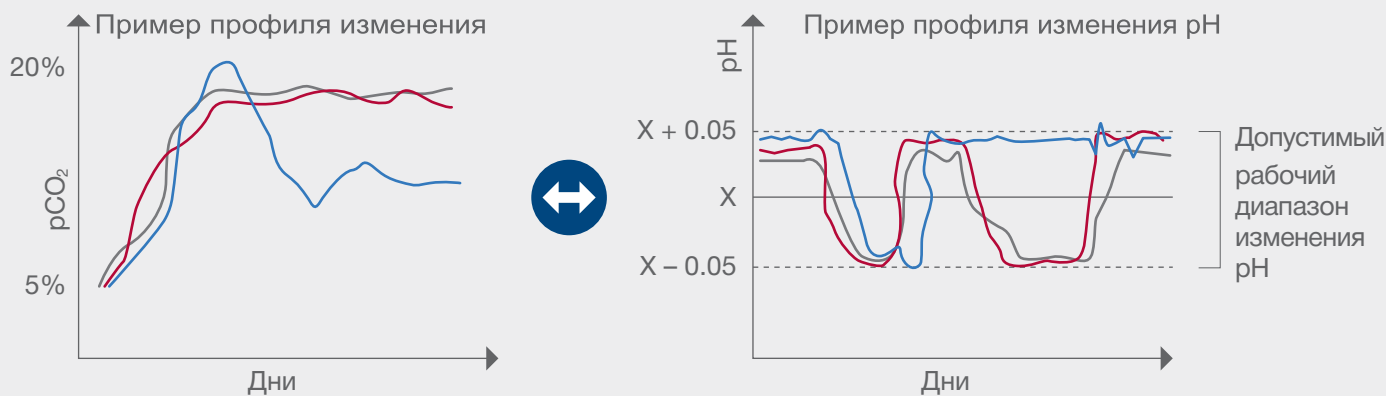
*Рис. 16: Традиционный подход к выравниванию характеристик установок разного масштаба состоит в последовательном повторении целого ряда экспериментов по масштабированию вверх/вниз с последующим анализом полученных результатов. Он в огромной степени влияет на срок вывода продуктов на рынок, особенно таких востребованных, как вакцины, моноклональные антитела и клеточные препараты для терапии.*





- 1 Воздух или N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:удаление (+Воздух или N<sub>2</sub>); добавление (+CO<sub>2</sub>)
- 2 Добавление CO<sub>2</sub>/основания для регулирования уровня рН (CO<sub>2</sub> – в качестве кислого газа, NaHCO<sub>3</sub> или
 
$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2 \text{H}^+$$
- 3 Повышение интенсивности перемешивания позволяет удалить больше CO<sub>2</sub> из биореактора.

Рисунок 17: Упрощенный пример настройки лабораторного биореактора для имитации профиля рСО<sub>2</sub> производственного.



- Профиль изменения  $pCO_2/pH$  на этапе НИОКР без регулирования уровня  $CO_2$  (объем реактора 3 л) (Требуются дополнительные исследования – потери времени)
- Профиль изменения  $pCO_2/pH$  на этапе НИОКР при регулировании уровня  $CO_2$  (объем реактора 3 л) (Дополнительные исследования не требуются – экономия времени)
- Профиль изменения  $pCO_2/pH$  в промышленном реакторе (12000 л)

**Рисунок 18:** Сравнение профилей изменения  $pCO_2/pH$  при переходе на меньший масштаб с регулированием  $pCO_2$  в режиме реального времени и без регулирования. В случае с регулированием регулировка лабораторного биореактора осуществлялась таким образом, чтобы сохранялся тот же профиль изменения  $DCO_2$ , что и у промышленного реактора. Пример взят из оригинальной работы, представленной на конгрессе ESACT 2019.<sup>27</sup>

## 4. Заключение

$CO_2$  выполняет важную роль во всех биопроцессах. Это одновременно и продукт, и реагент метаболических процессов, а также компонент наиболее часто используемых буферных систем, таких, например, как бикарбонатные. Также показано, что это важный фактор изменения потребления лактата.

Будучи критическим параметром процесса (CPP), выполняющим так много важных функций в биопроцессе, содержание  $DCO_2$  должно иметь собственное заданное значение и определенную стратегию регулирования, позволяющую поддерживать его на заданном уровне в реакторе любого масштаба. Так же, как и для pH и DO, мониторинг и автоматическое регулирование уровня  $CO_2$  в режиме реального времени необходимы для оптимального протекания биопроцессов как в научно-исследовательских лабораторных реакторах, так и в промышленных установках. Обнаружено, что при таком подходе

в ходе производства биопродукции обеспечивается более высокая плотность жизнеспособных клеток, более высокая продолжительность фазы роста и более высокий выход продукта при сохранении ожидаемого уровня качества. Непрерывный мониторинг и регулирование уровня  $CO_2$  в ходе всего процесса также позволяет сократить количество этапов последовательной отработки при масштабировании в любую сторону для оптимизации производственного процесса.

Для получения возможности воспользоваться всеми преимуществами, описанными в этом информационном материале, требуется надежная, точная и, желательно, рентабельная технология измерения уровня  $CO_2$  в режиме реального времени. Обзор широко используемых технологий измерения уровня  $CO_2$  – автономных, у производственной линии или непосредственно в потоке – будет представлен в следующей части серии информационных материалов «Растворенный  $CO_2$ ».

# Глоссарий

Определения для этого глоссария взяты из информационных материалов Hamilton Whitepapers<sup>А, В</sup> или руководящих указаний PAT, если не указано иное.

## Тип биопроцесса – Периодический

Считается, что именно периодические процессы стали первыми использоваться в биофармацевтической промышленности, преимущественно для осуществления ферментации. 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.

## Тип биопроцесса – Периодический с подпиткой

Периодический биопроцесс с подпиткой является доминирующим типом процесса как для клеточных культур, так и для микробной ферментации. 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 биопроцесса – 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.

## Кислота и основание Бренстеда

В теории Бренстеда – Лоури кислоты и основания определяются по способу их взаимодействия друг с другом, что позволяет сделать обобщения более общего характера. Определение выражается в виде уравнения равновесия:



С кислотой HA уравнение можно символически записать следующим образом:

Знак равновесия ( $\rightleftharpoons$ ) используется потому, что реакция может идти как в прямом, так и в обратном направлении. Кислота HA может потерять протон и превратиться в сопряженное с ней основание A<sup>-</sup>. Основание B может присоединить протон и стать его сопряженной кислотой, HB<sup>+</sup>. Большинство реакций между кислотами и основаниями протекают быстро, поэтому компоненты реакции обычно находятся в динамическом равновесии друг с другом.

## Скорость выделения углекислого газа (CER)

Этот параметр относится к CQ, выделяемому клеточной культурой или в результате микробиологической ферментации (моль/л ч). CER рассчитывается путем вычитания постепенного накапливающегося пула неорганического углерода (соответствующего постепенному образованию NaHCQ) из CTR<sup>29</sup>

$$\text{CER} = \text{CTR} - \text{Постепенно накапливающийся пул неорганического углерода}$$

Почему содержание CO<sub>2</sub> является критическим параметром процесса?

## Критический параметр процесса (CPP)

Критический параметр процесса определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (PAT). Это параметр технологического процесса, изменения которого влияют на критический показатель качества (CQA) и который поэтому должен контролироваться или регулироваться для обеспечения необходимого качества в данном процессе.

*Примеры CPP: pH, содержание растворенного кислорода и CO<sub>2</sub>*

## Критический показатель качества (CQA)

Критический показатель качества определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (PAT). Это физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристика, которое должно находиться в допустимых пределах или иметь определенное распределение для обеспечения необходимого качества продукта.

*Примеры CQA: профили гликолизирования моноклональных антител. Если профили гликозирования некорректны, то сворачивание белков происходит не так, как требуется, что ведет к потере терапевтического эффекта.*

## Скорость переноса углерода (CTR)

Скорость переноса углерода соответствует скорости перехода CO<sub>2</sub> в биореакторе из газовой в жидкую фазу (моль/л ч).

## Растворенный CO<sub>2</sub>

Уровень растворенного CQ (или DCQ<sub>2</sub>) – критический параметр биопроцесса. Повышенный уровень растворенного углекислого газа вреден и может подавлять рост клеток и снижать выработку метаболитов, таких, например, как моноклональные антитела (mAb). Уровень растворенного CQ обычно характеризуется парциальным давлением CQ (pCQ). При анализе процессов величина pCQ может выражаться в различных единицах. Для облегчения сравнения данных поставщиков и научно-технической литературы ниже представлена таблица соотношений наиболее распространенных единиц измерения pCQ

Единицы измерения pCO <sub>2</sub>	мбар	кПа	мм рт. ст.	об.%*
мбар	1	0,1	0,750	0,1
кПа	10	1	7,50	1
мм рт. ст.	1,33	0,133	1	0,13
об.%	10	1	7,5	1

\* При температуре 25 °C и атмосферном давлении P = 1013 мбар

## Растворенный O<sub>2</sub>

Уровень растворенного кислорода (DO или pO<sub>2</sub>) – еще один критический параметр биопроцесса. 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.

## Европейское общество по технологии животных клеток (ESACT)

Это общество, объединяющее ученых, инженеров и прочих специалистов, работающих с клетками животных, с целью облегчения обмена опытом между европейскими и международными исследователями и способствования развитию клеточных систем и производных от них.

## Управление США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA)

FDA несет ответственность перед правительством США за защиту здоровья населения, обеспечивая безвредность, эффективность и безопасность лекарств для человека и ветеринарных препаратов.

## K<sub>L</sub>A

K<sub>L</sub>A соответствует объемному коэффициенту массопереноса кислорода или CO<sub>2</sub> биореактора и является одним из параметров, характеризующих его.

## Ключевой показатель эффективности (KPI)

Критический параметр процесса определяется в соответствии с терминологией процессно-аналитической технологии (PAT). Ключевой показатель эффективности (KPI) отражает результат работы каждого этапа производственного цикла. Показатели KPI связаны с CQA и поэтому зависят также от CPP. Когда CPP остается в допустимых пределах, KPI будет показывать, что каждый этап производства осуществляется правильно, а CQA конечного продукта будет также находиться в допустимом диапазоне.

*Примеры KPI: плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность культуры, титр продукта*

## Лактатное смещение

Лактат обильно продуцируется в биопроцессе во время фазы экспоненциального роста, тогда как его чистое потребление часто наблюдается, когда рост клеток переходит в стационарную фазу. Такой сдвиг в метаболизме от выработки к потреблению принято называть «лактатным смещением», и это положительное явление, поскольку оно способствует оптимальной продуктивности процесса<sup>26</sup>

## Минимальная питательная среда (MEM)

MEM (Minimal Essential Medium) - это синтетическая среда для культивирования клеток, разработанная Гарри Иглом и впервые обнародованная в 1959 году в журнале Science, которая может использоваться для поддержания клеток в тканевой культуре. В ее основе 6 солей и глюкоза, описанные в солях Эрла в 1934 году: (хлорид кальция, хлорид калия, сульфат магния, хлорид натрия, фосфат натрия и бикарбонат натрия), с добавлением 13 незаменимых аминокислот и 8 витаминов: тиамин (витамин B1), рибофлавин (витамин B2), никотинамид (витамин B3), пантотеновая кислота (витамин B5), пиридоксин (витамин B6), фолиевая кислота (витамин B9), холин и миоинозитол (изначально известный как витамин B8).

## Питательная среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)

Первоначально среда DMEM была предложена в 1959 году Дульбекко и Фоггом, как среда Игла с «четырёхкратной концентрацией аминокислот и витаминов». В коммерческую версию этой среды внесены дополнительные изменения, подробно описанные ниже.

## RPMI 1640 (среда RPMI)

RPMI 1640, также известная как среда RPMI, представляет собой среду для выращивания клеточных культур. Среда RPMI 1640 была разработана в Roswell Park Memorial Institute (откуда и получила свое название) в 1966 году Джорджем Э. Муром, Робертом Фернером и Х. Эддисоном Франклином. Это модификация среды МакКоя 5А (или RPMI 1630), которая была изначально разработана для поддержки лимфобластоидных клеток в суспензионных культурах, но также может поддерживать и широкий спектр адгезивных клеток.

## Мониторинг/измерение у производственной линии

Измерение, при котором образец отбирается, изолируется и анализируется в непосредственной близости от технологического потока.

## Мониторинг/измерение в потоке (in-situ)

Измерение, при котором образец не удаляется из технологического потока и которое может быть инвазивным или неинвазивным.

## Мониторинг/измерение в оперативном режиме

Измерение, при котором образец выводится из производственного процесса и может быть возвращен в технологический поток.

## Мониторинг/измерение в лабораторных условиях

Образец отбирается из реактора в стерильных условиях и после предварительной обработки (например, фильтрации или разведения) проходит исследование в лаборатории.

## Осмоляльность

Осмоляльность – это термин, используемый для описания осмотического давления раствора, например, всей питательной среды клеточной культуры. Осмоляльность культуральной среды должна быть аналогична осмоляльности естественной среды клеток in vivo.

Осмоляльность среды для культивирования клеток для большинства клеточных линий позвоночных находится в узком диапазоне от 260 до 320 МОСМ/кг<sub>31</sub>

## Скорость переноса кислорода (OTR)

Скорость переноса кислорода соответствует скорости перехода CO<sub>2</sub> в биореакторе из газовой в жидкую фазу (моль/л ч).

## Скорость усвоения кислорода (OUR)

Этот параметр относится к кислороду, поглощаемому клеточной культурой или при микробиологической ферментации (моль/л ч).

## Процессно-аналитическая технология (PAT)

Руководящие материалы по процессно-аналитической технологии выпущены в 2004 году FDA. Они предназначены для описания нормативной базы, которая будет стимулировать добровольную разработку и внедрение инновационных решений в области фармацевтики, производство и обеспечение необходимого качества.

## Дыхательный коэффициент (RQ)

Дыхательный коэффициент представляет собой количество молей углекислого газа, выделяемого на моль кислорода, потребляемого клеточной культурой в ходе биопроцесса. Это косвенный, но довольно быстрый способ определения нехватки субстрата в питательной среде<sup>28</sup>. Он выражается следующим образом:

$$RQ = CER/OUR$$

## Увеличение/уменьшение масштаба

Увеличение и уменьшение масштаба – это термины, относящиеся к переводу биопроцесса со стадии НИОКР на стадию опытного образца или промышленной установки (увеличение масштаба) или наоборот (уменьшение масштаба). Экспериментальные и промышленные реакторы обычно сильно отличаются по устройству от лабораторных. Увеличение объема биореактора при масштабировании снижает OTR и влияет на CER, что дополнительно приводит, например, к более медленному обнаружению DO. Если алгоритмы ПИД-регулирования рассчитаны на меньший масштаб установки, реакция будет неточной. Коэффициент массопереноса для кислорода, K<sub>L</sub>A, должен оставаться постоянным в процессе масштабирования, чтобы можно было точно предсказать величину OTR или CER. Для настройки алгоритмов регулирования содержания растворенного кислорода требуется проводить частые пробные запуски.

# Список литературы

1. U.S. Department of Health and Human Services: Guidance for Industry. PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. Rockville, 2004.
2. J. Michl, K. C. Park, P. Swietach, Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems, *Communications Biology*, Volume 2, Article number: 144, 2019.
3. J. Cooper, CO<sub>2</sub> concentration and pH control in the cell culture laboratory, <https://www.phe-culturecollections.org.uk>, Public Health England, Article published in 2019.
4. <https://www.lgcstandards-atcc.org>, American Type Culture Collection Non-profit Organization, FAQs “How does the sodium bicarbonate-carbon dioxide system buffer the pH of cell culture medium?”, Article updated in 2014.
5. D. Möller, M. Deckter, J. Zosel, W. Oelssner, Carbon Dioxide in General, Wiley-VCH, Carbon Dioxide Sensing: p. 7–44, 2019.
6. A. W. Nienow, Mass Transfer and Mixing Across the Scales in Animal Cell Culture, Springer, Animal Cell Culture: p. 137–167.
7. M. Brunner, P. Doppler, T. Klein, C. Herwig, J. Fricke, Elevated pCO<sub>2</sub> affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes, *Engineering in Life Science 00*: p. 1–11, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2017.
8. W.-S. Hu, M. C. Oberg, pH Control in Cell Culture. Marcel Dekker, Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology, Chapter 16, Monitoring and control of animal cell bioreactors: biochemical engineering considerations, 1990.
9. M. Becker, L. Junghans, A. Teleki, J. Bechmann, R. Takors, The Less the Better: How Suppressed Base Addition Boosts Production of Monoclonal Antibodies With Chinese Hamster Ovary Cells, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 7 Article 76, 2019.
10. V. Konakovsky, C. Clemens, M. M. Müller, J. Bechmann, M. Berger, S. Schlatter, C. Herwig, Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness, *MDPI, Bioengineering*: pg. 3, 5, 2016.
11. R. Pörtner, Bioreactors for Mammalian Cells, Springer, Animal Cell Culture: p. 89–135.
12. WuXi Biologics, Understanding the Role of Dissolved O<sub>2</sub> & CO<sub>2</sub> on Cell Culture in Bioreactors, <https://www.wuxibiologics.com/two-minute-tuesday-videos/> – Two Minute Tuesday, 2016.
13. S. S. Mostafa 1, X-Gu, Strategies for improved DCO<sub>2</sub> removal in large-scale fed-batch cultures, *Wiley, Biotechnology Progress*: p. 45–51, 2003.
14. H. Bühler, R. Bucher, Application of electrochemical sensors, Dissolved Carbon Dioxide, *Bioprocess Technology*: p. 158–167, 1990.
15. B. Blombach, R. Takors, CO<sub>2</sub> – Intrinsic product, essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 3, Article 108, <http://www.frontiersin.org/>, 2015.
16. V. Wiegmann, A. Amini, C. Bernal, Using the AppliFlex ST to Investigate the Effect of CO<sub>2</sub> Concentration on the Expansion of T-cells, <https://www.applikon-biotechnology.com>, 2019.
17. M. Brunner, J. Fricke, P. Kroll, C. Herwig, Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO<sub>2</sub>, and pCO<sub>2</sub>) on CHO batch performance and critical quality attributes, Springer, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, October 2016.
18. A. V. Carvalhal, V. M. Saucedo, PAT in Recombinant Protein Cell Culture Processes in PAT Applied in Biopharmaceutical Process Development and Manufacturing, CRC Press: p. 114–116, 2012.
19. B. R. Gibson, S. J. Lawrence, J. P. R. Leclaire, C. D. Powell, K. A. Smart, Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, *FEMS Microbiol Rev* 31: p. 535–569, 2007.
20. H. Sundström, Analytical tools for monitoring and control of fermentation processes (Thesis), Department of Bioprocess Technology School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2007.
21. R. N. Pattison, J. Swamy, B. Mendenhall, C. Hwang, B. T. Frohlich, Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiber optic chemical sensor, *Wiley, Biotechnology Progress* 16: p. 769–774, 2000.
22. D. Eisenkraetzer, J. Gaetgens, A. Jockwer, C. Klinger, T. Noll, B. Bezdek-suess, Method for producing recombinant proteins with a constant content of pCO<sub>2</sub> in the medium, European Patent Office, Application 09719289.2, Bulletin 2013/01.
23. B. Madsen, J. Cobia, N. Jones, Continuous Process Performance Enhancements for 50 L to 500 L SingleUse Bioreactors: A Technical Comparison of Performance Characterization, Cell Culture, and Scale-Up Modeling, Thermo Fisher Scientific, <http://thermofisher.com/sut>, 2018.
24. L. Hoshan, R. Jiang, J. Moroney, A. Bui, X. Zhang, T. Hang, S. Xu, Effective Bioreactor pH Control Using Only Sparging Gases, Wiley, <http://wileyonlinelibrary.com>, November 2018.
25. C. He, P. Ye, H. Wang, X. Liu, F. Li, A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up, *Elsevier, Biochemical Engineering Journal*, Volume 141, p. 173–181, 2019.
26. J. Glassey (coordinator), General framework for data representation with small batch numbers, across process scales, EU-Horizon 2020 - Marie Curie ITN project BIORAPID, Ref. Ares(2017)3271006 - 29/06/2017
27. L. Junghans, M. Löffler, F. Krause, T. Wucherpennig, S. Minning, K. Schwab, Mimicking industrial scale CO<sub>2</sub> profiles in CHO small scale processes, 26<sup>th</sup> ESACT Meeting, Copenhagen, 2019.
28. S. Rameez, Establishing improved O<sub>2</sub> supply, lower DCO<sub>2</sub> built up and pH control in large scale Single-Use BioReactors (SUBR), 45<sup>th</sup> ACS National Meeting & Exposition, New Orleans, <https://www.slideshare.net/kbibipharma/establishing-improved-o2-supply-lower-dco2-built-up-and-ph-control-in-large-scale-singleuse-bioreactors>, 2013.
29. S. Winckler, R. Krueger, T. Schnitzler, W. Zang, R. Fischer, M. Biselli, A sensitive monitoring system for mammalian cell cultivation processes: a PAT approach, Springer, *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013.
30. F. Zagari, M. Jordan, M. Stettler, H. Broly, F. M. Wurm, Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity, *New Biotechnology*, Volume 30, Issue 2, 25: p. 238–245, Elsevier, January 2013.
31. <https://www.lgcstandards-atcc.org>, American Type Culture Collection Non-profit Organization, FAQs “Osmolality”, Article published in 2012.
32. A.K. Srivastava, S. Gupta, *Comprehensive Biotechnology*, Academic Press, 2011.
33. F. C. Castillo, B. Cooney, H. L. Levine, *Biopharmaceutical Manufacturing Process Validation and Quality Risk Management*, ISPE, <https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/may-june-2016>, 2016.

Публикации Hamilton, упомянутые в настоящем документе, доступны для скачивания на сайте [www.hamiltoncompany.com](http://www.hamiltoncompany.com).

- A. Процессно-аналитическая технология в фармацевтике. Показатели качества, критические параметры процесса и ключевые показатели эффективности для биореакторов, REF. 695237, 2018.
- B. Проблемы измерения с помощью оптических датчиков растворенного кислорода, REF. 111001451, 2019.



**000 «Диаэм»**

**Москва**

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

**[www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru)**

**С.-Петербург**

+7 (812) 372-6040  
[spb@dia-m.ru](mailto:spb@dia-m.ru)

**Новосибирск**

+7 (383) 328-0048  
[nsk@dia-m.ru](mailto:nsk@dia-m.ru)

**Воронеж**

+7 (473) 232-4412  
[vrn@dia-m.ru](mailto:vrn@dia-m.ru)

**Йошкар-Ола**

+7 (927) 880-3676  
[nba@dia-m.ru](mailto:nba@dia-m.ru)

**Красноярск**

+7 (923) 303-0152  
[krsk@dia-m.ru](mailto:krsk@dia-m.ru)

**Казань**

+7 (843) 210-2080  
[kazan@dia-m.ru](mailto:kazan@dia-m.ru)

**Ростов-на-Дону**

+7 (863) 303-5500  
[rnd@dia-m.ru](mailto:rnd@dia-m.ru)

**Екатеринбург**

+7 (912) 658-7606  
[ekb@dia-m.ru](mailto:ekb@dia-m.ru)

**Кемерово**

+7 (923) 158-6753  
[kemerovo@dia-m.ru](mailto:kemerovo@dia-m.ru)

**Армения**

+7 (094) 01-0173  
[armenia@dia-m.ru](mailto:armenia@dia-m.ru)

