



Damit **die Zelle** atmen kann

# Damit die Zelle atmen kann

Der  $k_L a$ -Wert ist der Schlüssel zur Charakterisierung des Bioreaktors

**Die Biopharma-Branche boomt. Immer neue Fortschritte bei Zell- und Immuntherapien bringen neue Medikamente hervor, die ein dynamisches Wachstum bei der Produktion von entsprechenden Medikamenten erzeugen. Besonders in den Vereinigten Staaten wächst die Zahl an Startups, die sich mit Biopharma-Produkten beschäftigt, rasant. Im Fokus der Produktion solcher Medikamente steht der Bioreaktor, beziehungsweise Fermenter. In diesem Behälter werden bestimmte Mikroorganismen, Bakterien, tierische oder pflanzliche Zellen unter möglichst optimalen Bedingungen kultiviert.**

Die Ansprüche für Bioreaktoren in der Pharma-Branche sind in den letzten Jahren stark gestiegen, um funktionsfähige Präparate mit höchster Effizienz herzustellen. Lange Zeit glich die Bestimmung von Prozessparametern innerhalb einer Zellkultur einer Blackbox: unzählige Faktoren haben Einfluss auf das Zellwachstum, konnten aber oftmals nicht zuverlässig ausgewertet werden. Einer der wichtigsten Parameter, für aerobe Prozesse; ist der volumetrische Sauerstofftransferkoeffizient ( $k_L a$ ). Eine dem Bedarf angepasste Sauerstoffversorgung ist essentiell für die Vitalität der Zellen, sowohl eine Unter- wie auch Überversorgung beeinflusst den Prozess negativ. Ein kürzlich entwickeltes System zur Bestimmung des  $k_L a$  Werts erweitert die bisherige Methodik: Von nun an sind Messungen für die  $k_L a$  Wertbestimmung an jedem beliebigen Punkt im Bioreaktor möglich. Diese liefern damit ein genaueres Bild von den Produktionsbedingungen als bisher. Besonderer Bonus für die Anlagenbetreiber: das System findet nicht nur Anwendung im Design neuer Bioreaktoren, sondern kann – ganz ohne strukturelle Änderungen – auch auf bestehende Anlagen angewendet werden.

Die Herausforderung einer Bioreaktor Charakterisierung und Optimierung besteht darin, dass diverse Prozessparameter nicht voneinander unabhängig geändert werden können. Möchte man zum Beispiel den  $k_L a$  Wert ändern, werden sich meist andere Prozessparameter – beispielsweise Mischzeit, Leistungseintrag, Wärmetransfer oder die CO<sub>2</sub> Austragsrate, mit ändern. Die ganzheitliche Betrachtung eines Reaktors ist somit die Basis für eine erfolgreiche Produktion.

Ziel der Kultivierung in einem Bioreaktor ist die Gewinnung von Zellen, Zellbestandteilen oder die Gewinnung von Stoffwechselprodukten. Diese werden als Wirkstoffe in der pharmazeutischen oder als Grundchemikalie in der chemischen Industrie verwendet. Umgekehrt lassen sich in Bioreaktoren chemische Verbindungen auch abbauen, beispielsweise bei der Abwasserreinigung in Kläranlagen. Historisch betrachtet sind Braukessel bei der Bierherstellung oder Gärungsbehälter für die Weinproduktion die ersten Bioreaktoren, die zum Einsatz kamen. Moderne Bioreaktoren erfüllen höchste Ansprüche hinsichtlich der Prozesssicherheit und werden in unterschiedlichsten Ausführungen von wenigen bis tausende Liter in der Industrie eingesetzt.

## Charakterisierungs- und Optimierungsstrategien für Bioreaktoren

Von Bioreaktoren wird erwartet, dass sie optimale Bedingungen für das Wachstum und die Produktbildung von Mikroorganismen oder Zellen bieten. Nur so kann eine optimale Qualität und maximale Produktausbeute sichergestellt werden. Die Auslegung des Bioreaktors für den optimalen Prozess stellt die Ingenieure jedoch aufgrund der komplizierten Zusammenhänge und Abhängigkeiten der Prozessparameter vor große Herausforderungen. Die Qualität der Wirkstoffe wird bereits durch den Upstream-Prozess maßgeblich beeinflusst, so dass das Design eines ausgereiften Bioreaktors einen großen Einfluss hat!

## Aktuelle FDA-Richtlinien und Quality by Design-Grundsätze für Bioreaktoren

Die Food and Drug Administration der USA (FDA) gibt Richtlinien zu Prinzipien und Ansätzen vor, die Hersteller zur Validierung von Herstellungsprozessen verwenden müssen: „Eine effektive Prozessvalidierung trägt wesentlich zur Sicherung der Arzneimittelqualität bei... jeder Schritt eines Herstellungsprozesses wird kontrolliert, um sicherzustellen, dass das Endprodukt alle Qualitätsmerkmale einschließlich der Spezifikationen erfüllt...“ Gemäß dieser Erklärung müssen einige anwendbare Auszüge aus den aktuellen FDA-Richtlinien ernsthaft berücksichtigt werden, um die gesetzlichen Anforderungen zu erfüllen. Da die FDA Richtlinien nur in bestimmten Ländern gelten, müssen andernorts die europäischen Richtlinien beachtet werden. Diese orientieren sich aber meist an der FDA oder umgekehrt.

„Ein erfolgreiches Validierungsprogramm hängt von Informationen und Erkenntnissen aus der Produkt- und Prozessentwicklung ab. Dieses Wissen und Verständnis ist die Grundlage für die Festlegung eines Ansatzes zur Steuerung des Herstellungsprozesses, der zu Produkten mit den gewünschten Qualitätsmerkmalen führt.

Die Hersteller sollten:

- die Quellen von Veränderungen in den Prozesseigenschaften verstehen
- das Vorhandensein und den Grad dieser Änderungen erkennen
- die Auswirkungen einer Veränderung im Prozess auf die Produkteigenschaften verstehen

Jeder Hersteller muss selbst beurteilen, ob er ein ausreichendes Wissen über seinen Prozess hat, um ein hohes Maß an Sicherheit in seinem Herstellungsprozess zu gewährleisten.

Ein tiefes Prozessverständnis ist die notwendige Voraussetzung für die Entwicklung und Optimierung der Produktionsanlagen, insbesondere des Bioreaktorsystems. Deshalb stellt jeder Parameter, der in einem Bioreaktor gemessen werden kann, einen entscheidenden Vorteil für ein besseres Verständnis des Prozesses dar.

<sup>1</sup>Von engl. upstream für stromaufwärts, in der Bioverfahrenstechnik verwendete Bezeichnung für alle Grundoperationen und Verfahrensschritte zur Vorbereitung von Fermentationsprozessen (z.B. Medien-vorbereitung, Sterilisation).

<sup>2</sup>Leitfaden für die Industrie, Prozessvalidierung: Allgemeine Grundsätze und Praktiken, Aktuelle Good Manufacturing Practices Revision 1, US Department of Health and Human Services FDA, CDER, CBER, CVM, <https://www.fda.gov/media/71021/download>, Januar 2011

<sup>3</sup>Leitfaden für die Industrie, Prozessvalidierung: Allgemeine Grundsätze und Praktiken, Aktuelle Good Manufacturing Practices Revision 1, US Department of Health and Human Services FDA, CDER, CBER, CVM, <https://www.fda.gov/media/71021/download>, Januar 2011

In diesem Whitepaper wird ein besonderer Fokus auf den volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizient, auch als  $k_L a$ -Wert oder volumetrischer Stoffübergangskoeffizient bezeichnet, gelegt, der als relevanter Parameter für die Charakterisierung des Bioreaktor-systems gilt.

### Die Bedeutung des $k_L a$ und warum er gemessen werden sollte

Die Sauerstofftransferate (OTR) und insbesondere der  $k_L a$ -Wert sind meist die entscheidenden Parameter für die Auslegung von Bioreaktoren. Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient  $k_L a$  wird als Maß für den Wirkungsgrad des Transports eines Gases von der Gasphase in die Flüssigphase verwendet. Bei biotechnologischen Prozessen gibt der  $k_L a$ -Koeffizient die Effizienz der Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in einem Bioreaktor an. Neben der Bestimmung der tatsächlichen Prozessparameter liefert eine Charakterisierung eines Bioreaktors hinsichtlich seines  $k_L a$ -Werts auch Erkenntnisse über das Scale up Verhaltens eines Up Stream Prozess (USP) und zeigt auch ein mögliches Optimierungspotential.

### Faktoren, die den $k_L a$ -Wert beeinflussen

Mathematisch gesehen beschreibt der  $k_L a$  wert die Sauerstofftransferate nach der in Abbildung 1 angeführten Formel. Hierbei bildet die Konzentrationsdifferenz zwischen Medium und Luftblase die Treibende Kraft.

Der  $k_L a$  Wert, der beschreibt, wie gut Sauerstoff von einem in ein anders Medium übergeht, besteht eigentlich aus zwei Koeffizienten:

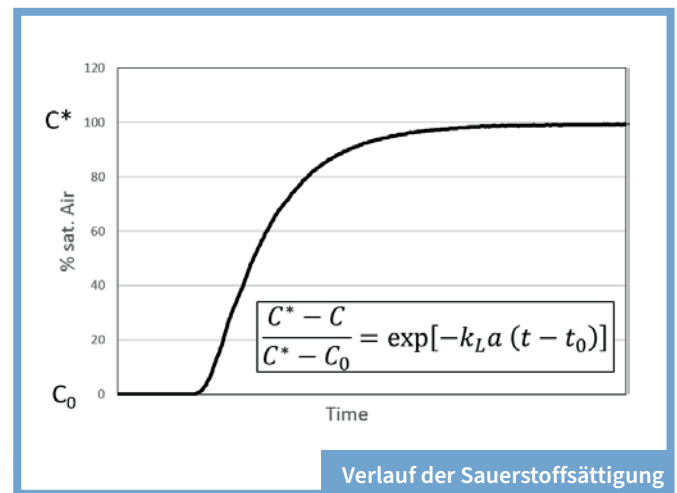
- 1 Der Stoffübergangskoeffizient  $k_L$ , der den Transport des Sauerstoffs und des Gases in die Flüssigphase beschreibt
- 2  $a$  ist die Gas-Flüssigkeitsaustauschfläche pro Flüssigkeitsvolumeneinheit.

Da es schwierig ist, den  $k_L$  und  $a$ -Wert getrennt zu messen, werden sie zu einem einzigen Parameter zusammengefasst. Diese Kombination macht den  $k_L a$ -Wert stark abhängig von den Prozessbedingungen wie in Abbildung 2 dargestellt. Neben den eigentlichen Prozessparametern spielen hier auch geometrische Parameter des Equipments und die Zusammensetzung des Nährmediums eine große Rolle.



Abhängigkeit von den Prozessbedingungen

Abbildung 2: Abhängigkeit von den Prozessbedingungen (4)



Verlauf der Sauerstoffsättigung

Abbildung 3: Verlauf der Sauerstoffsättigung

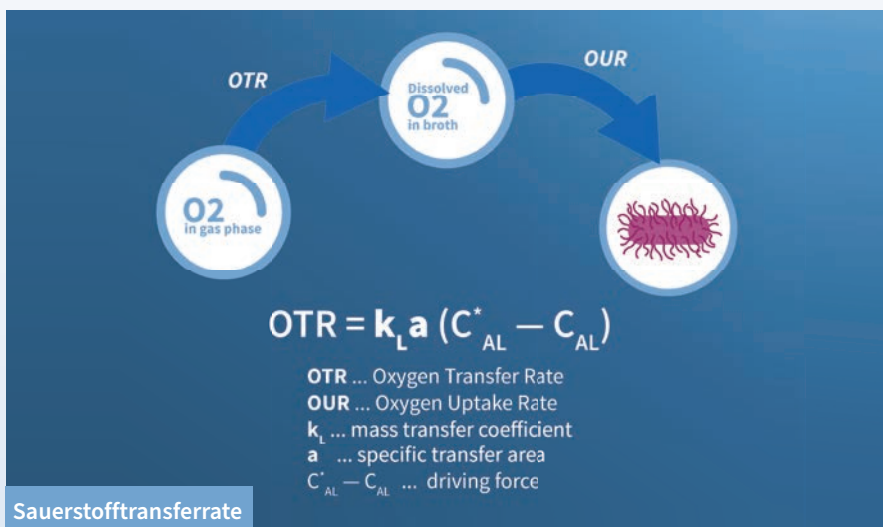
Es gibt verschiedene chemische, biologische und physikalische Methoden, den  $k_L a$ -Wert in Bioreaktoren zu messen. Es hat sich jedoch eine als Standard durchgesetzt da sie einfach in der Anwendung ist und genaue Werte liefert.

Beim klassischen Ansatz dieser „Dynamic Step Method (DSM)“, wird ein Sauerstoffsensoren im Sondenkranz des Behälters verwendet

und der Sauerstoffgehalt des Mediums gemessen. Die Charakterisierung erfolgt in Wasser, wobei jedoch alle flüssigen Medien verwendet werden können. Die Sauerstoffkonzentration des Mediums wird durch Entgasen mit Stickstoff auf null gesetzt. Anschließend wird wieder unter Prozessbedingungen begast (mit definierter Begasungsrate und Rührergeschwindigkeit)

Die Sauerstoffsonde misst dann den Sättigungsprozess, und der  $k_L a$ -Wert kann bestimmt werden.

Abbildung 1: Sauerstofftransferate



Sauerstofftransferate

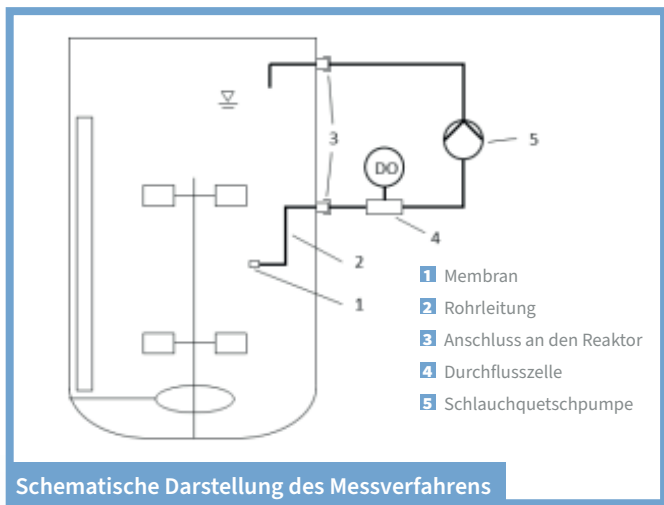
<sup>4</sup>F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreaktor Scale-up und Sauerstofftransferate in mikrobiellen Prozessen: Ein Überblick, Biotechnol. Adv. 27 (2009) 153-176. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.10.006

Abbildung 4: Hochgeschwindigkeits-PO2-Sensor



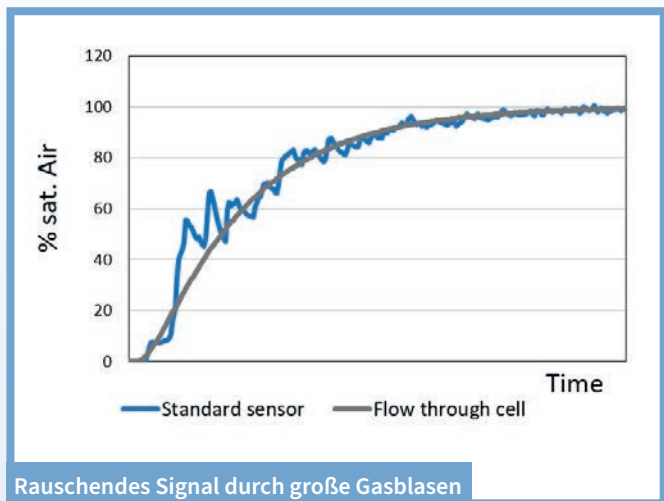
Hochgeschwindigkeits-PO2-Sensor

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Messverfahrens



Schematische Darstellung des Messverfahrens

Abbildung 6: Rauschendes Signal durch große Gasblasen



Rauschendes Signal durch große Gasblasen

Der traditionelle Ansatz zur Messung des  $k_L a$ -Wertes ist relativ einfach und wird daher auch am häufigsten verwendet. Bei diesem Verfahren zeigen sich allerdings drei entscheidende Nachteile:

- 1 Da der Sensor im bestehenden Sondenkranz positioniert ist, bietet er nur einen einzigen und stationären Messpunkt direkt an der Behälterwand.
- 2 Für die  $k_L a$ -Messung ist nur der in der Flüssigphase gesättigte Sauerstoff relevant. Die Sensoren können jedoch nicht zwischen Sauerstoff in Flüssigkeit und Sauerstoff in der Gasphase unterscheiden. Somit stören die Gasphasen im Behälter die Messung des Sauerstoffgehalts der Flüssigkeit.
- 3 Der Ansatz berücksichtigt keinen auftretenden „Zonierungseffekt“ und gibt daher kein genaues Bild von der tatsächlichen Sauerstoffversorgung im Reaktor wieder.

Um die Standardmethodik zu erweitern und zu verbessern, forscht der Anlagenbauer für Pharmazie und Biotechnologie Zeta im österreichischen Graz, wie sich der  $k_L a$ -Messprozess präziser und effizienter gestalten lässt.

#### Erweiterte Methodik zur $k_L a$ -Messung an jedem beliebigen Punkt

ZETA hat ein neues Verfahren entwickelt, das die Verwendung eines Sauerstoffsensors (Abbildung 4) beinhaltet, der sich innerhalb einer Durchflusszelle außerhalb des Bioreaktors befindet. Wie in Abbildung 5 gezeigt, wird der eigentliche Messpunkt im Behälter mit einer Rohrleitung erreicht. Von dieser Position wird mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe ein repräsentativer Probenstrom aus dem Behälter und durch die Durchflussmesszelle geleitet. Die Rohrleitung, die Messpunkt und Messzelle verbindet, kann durch jeden Standardstutzen eines Behälters geführt werden. Somit sind keine baulichen Änderungen am Behälter selbst notwendig.

Zusätzlich ist an der Spitze der Rohrleitung eine Membran befestigt, die sämtliche Gasblasen aus dem Probenstrom entfernt um eine störungsfreie Messung zu ermöglichen.

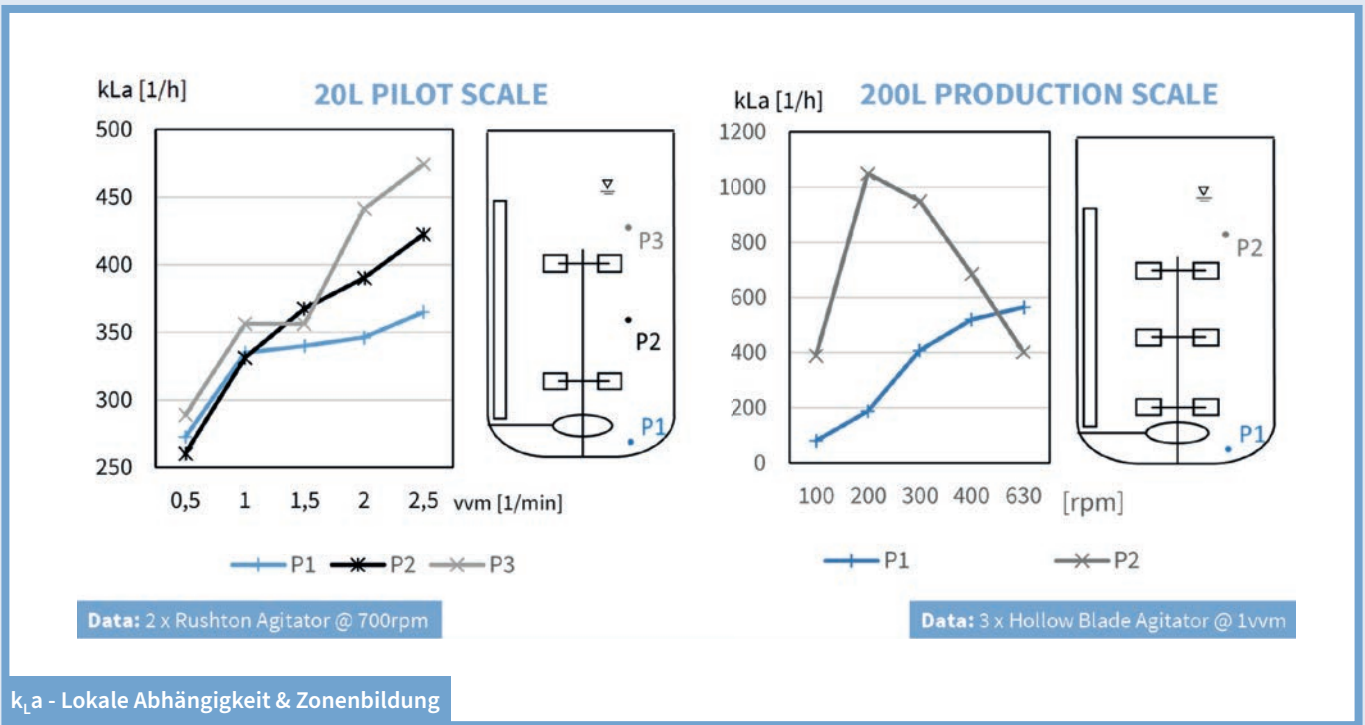
Die Sauerstoffverteilung des gesamten Bioreaktors kann mit diesem System abgebildet und charakterisiert werden. So lassen sich alle „Zonierungseffekte“ identifizieren.

Ein Vergleich der Standardmethodik mit der Durchflusszelle zeigt ein deutliches Rauschen beim Signal des Standardsensors (Abbildung 6). Dies ist auf die Störung des Sensors durch Luftblasen im Behälter zurückzuführen.

Die Bedeutung einer ortsunabhängigen Messmethode wird in Abbildung 7 (nächste Seite) veranschaulicht. Die Messungen in einem Labor und Produktionsreaktor zeigen deutlich, dass der Sauerstofftransfer an unterschiedlichen Positionen im Behälter unterschiedlich gut funktioniert.

Die vorstehend beschriebene neue Methode zur Messung des  $k_L a$ -Wertes bringt wertvolle Erkenntnisse, wie bei der Wirkstoffproduktion bereits in der Designphase, aber ebenso in bestehenden Prozessen und Anlagen signifikante und nachhaltige Verbesserungen erzielt werden können. ZETA kann nach intensiver Forschung und





$k_L a$  - Lokale Abhängigkeit & Zonenbildung

Entwicklung auf derzeit laufende Industrieprojekte der Praxis verweisen, die jetzt umgesetzt werden. Drei Anwendungsgebiete haben sich hier hauptsächlich gezeigt.

**Anwendung für die  $k_L a$ -Messung („to be“-Modell)**

**Das  $k_L a$ -basierte Scale-Up-Verfahren:** Die Leistungsfähigkeit von Mikroorganismen ist stark von den Bedingungen und der Nährstoffversorgung im Reaktor abhängig. Die Prozessbedingungen für diese Umgebung werden oft im Labormaßstab definiert. Die Herausforderung besteht darin, sicherzustellen, dass die Bedingungen in allen anderen für die Produktion erforderlichen Maßstäben die gleichen sind wie im Labormaßstab.

Die geometrischen Eigenschaften der Ausrüstung (z.B. H/D-Verhältnis, d/D-Verhältnis) bilden die Grundlage für einen klassischen Scale-Up-Ansatz. Die Prozessbedingungen werden dann aufgrund der Ähnlichkeit der Ausrüstung als ähnlich angenommen.

Bei einem  $k_L a$ - oder prozessbasierten Scale up sind die Prozessbedingungen die Grundlage für die Auslegung der Anlage. Da nicht alle Prozess-

bedingungen gleich skaliert werden können, werden die kritischsten Prozessparameter, beispielsweise  $k_L a$ , Leistungsaufnahme, Mischzeit, Wärmeübertragung, Scherrate, als Grundlage für das Scale-Up evaluiert.

Abbildung 8 zeigt die Charakterisierung für ein klassisches Scale-up im Vergleich zu einem  $k_L a$ -basierten Scale-up. Die Messungen wurden an den Betriebspunkten eines einer Reaktorreihe für Zellkulturen vom Labor bis zum Produktionsmaßstab (4L-2500L) durchgeführt. Der  $k_L a$ -Wert wurde hier als Maßstab gewählt, die Leistungsaufnahme war der andere kritische Parameter, der überwacht werden sollte.

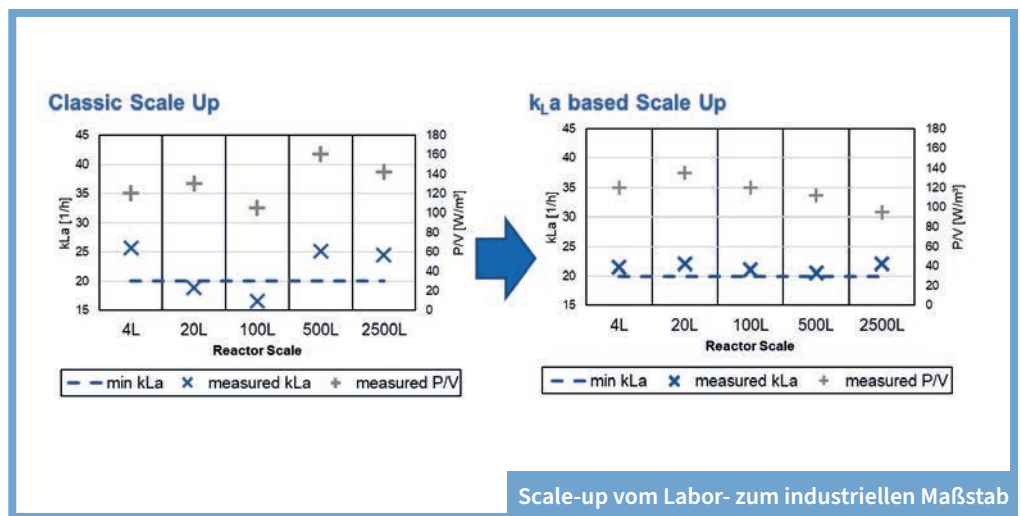


Abbildung 8: Scale-up vom Labor- zum industriellen Maßstab

Der klassische Ansatz zeigt eine Abweichung der  $k_L a$ -Werte für die verschiedenen Produktionsgrößen. Durch Variation der Rührwerksdrehzahl (Leistungsaufnahme) und der Begasungsrate (Sauerstoffversorgung) kann der OTR auf den definierten Wert eingestellt werden. Alle anderen Prozessparameter ändern sich dann systemabhängig. Die Herausforderung, mehr als einen Prozessparameter über den gesamten Skalierungsbereich so konstant wie möglich zu halten, ist nicht zu unterschätzen. ZETA gibt eine Leistungsgarantie des Bioreaktors für eine optimale Auslegung des Bioreaktors in Kombination mit idealen Prozessbedingungen. Die Leistungsparameter können dann während des Factory Acceptance Tests (FAT) oder Site Acceptance Tests (SAT) überprüft werden.

### Reaktoroptimierung:

Obwohl der  $k_L a$ -Wert von vielen Faktoren abhängig ist, werden die meisten von ihnen durch die Lebensbedingungen des Mikroorganismus (z.B. Medienzusammensetzung, Temperatur, Druck) definiert. Durch Design und Charakteristik des Bioreaktors kann man jedoch sehr gut den  $k_L a$ -Wert beeinflussen. Der Sparger in Kombination mit dem Rührwerk des Reaktors ist für die Verteilung der Gasblasen im Reaktor verantwortlich. Sowohl die Konstruktion und Position des Spargers, als auch das Design der verwendeten Rührorgane haben einen großen Einfluss auf die Fähigkeit des Systems, Gas in der Flüssigphase zu dispergieren.

Abbildung 9 zeigt die Charakterisierung eines Pilotbioreaktors mit unterschiedlichen Rührwerk- und Sparger Konfigurationen, bei unterschiedlichen Rührwerksgeschwindigkeiten und einer konstanten Begasungsrate. Eine intelligente Kombination aus Sparger und Rührwerk ermöglicht die Optimierung des  $k_L a$ -Wertes bei gleicher Leistungsaufnahme.

Trotz der hohen Sauerstoffdurchsätze garantiert ZETA niedrigste Scherraten. So lässt sich ein optimales Bioreaktor-Design passend zum Prozess und den Spezifikationen des Kunden entwickeln.

Dieses Knowhow lässt sich auch bei bestehenden Systemen zur Verbesserung und Nachrüstung des Rührwerks- oder Sparger-Designs verwenden.

### Scale-down – Von der Produktion ins Labor:

Bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe kann die Forschung auf nahezu uneingeschränkte Mittel und Methoden zurückgreifen. Die Produktion von solchen Pharmazeutika ist jedoch sehr stark reguliert und orientiert sich an bereits validierten Prozessen.

Somit macht bereits bei der Entwicklung ein Blick in die Produktion Sinn. Auf Grund der Erfahrung aus bestehenden Reaktoren kann so eine Vorhersage für die Prozessparameter getroffen werden und somit hinterfragt ob die entwickelten Mikroorganismen auch großtechnisch produziert werden können.

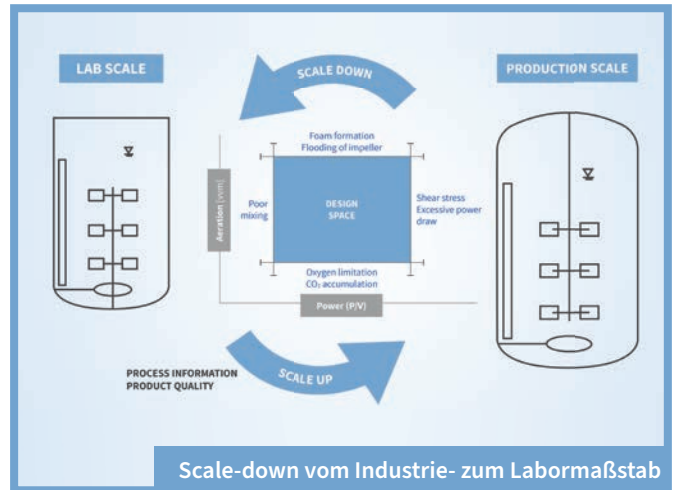


Abbildung 10: Scale-down vom Industrie- zum Labormaßstab

### Eine andere Anwendung eines Scale downs ist

Vollständig charakterisierte Rührkesselreaktoren im großtechnischen Maßstab sind die Grundlage für entsprechend ausgelegter MSAT-Anlagen, die die mechanische Grundlage für Dehnungs-, Medien- und Prozessverbesserungen bilden.

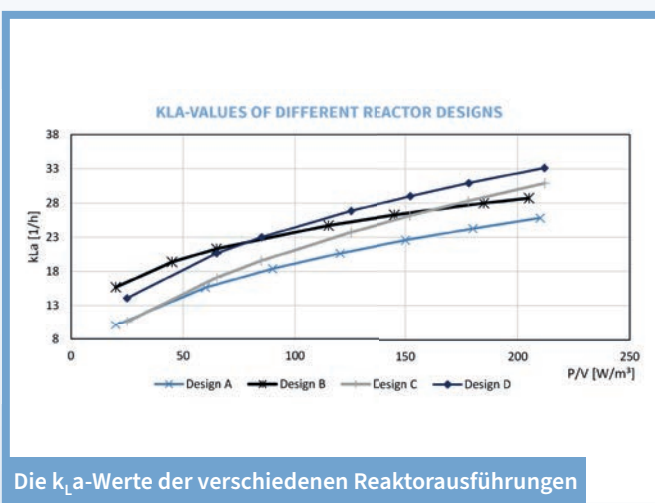
Da ZETA standartmäßig alle Anlagen die sie bauen auch charakterisieren, können sie auf einen großen Pool an validierten Daten zurückgreifen. Mit Hilfe von Modellen und CFD Simulationen können so die Ingenieurarbeiten rund um die Skalierung und Nachrüstung von Bioreaktorsystemen unterstützt werden.

### Fazit

Die Auslegung von Bioreaktoren ist im Anlagenbau ein komplexes Thema. Die biotechnologische Herstellung von Arzneimitteln und das damit verbundene Arbeiten mit lebenden Organismen stellt eine besondere Herausforderung dar. Über zwei Schlüsselfaktoren lässt sich maximale Produktausbeute in diesem System erreichen: molekulargenetische Modifizierung und optimale Wachstumsbedingungen für die Zellkultur. Eine der wichtigsten Voraussetzungen dafür ist eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, insbesondere Sauerstoff, damit die Zellatmung optimal ablaufen kann.

Die Herausforderung der Pharmakonzerne liegt darin, ihre Mikroorganismen und deren Abhängigkeit zu den Prozessparametern zu erforschen um die optimalen Wachstumsbedingungen zu definieren. Die Aufgabe der Anlagenbauer ist, diese Bedingungen dann zu realisieren. Nur wenn beide Seiten eng zusammenarbeiten kann ein optimaler Prozess realisiert werden.

Abb. 9: Die  $k_L a$ -Werte der verschiedenen Reaktorausführungen



Die  $k_L a$ -Werte der verschiedenen Reaktorausführungen

Neben der Aufrechterhaltung der Zellvitalität müssen produktionstechnische Anforderungen wie die Reproduzierbarkeit des Prozesses und die daraus resultierende Qualität von Charge zu Charge gewährleistet sein. Für das Prozess- und Anlagendesign ist ein tiefes Verständnis und genaue Kenntnis der Auswirkungen der Einflussfaktoren auf das Wachstum der Zellen unerlässlich, insbesondere im Hinblick auf die Skalierbarkeit vom Labor- bis zum Produktionsmaßstab (und zurück).

Dem Sauerstoff als Nährstoff kommt eine besondere Bedeutung zu. Er wird in einer Gasphase dem Prozess zugeführt und muss gelöst werden, um dem Organismus zur Verfügung zu stehen. Der  $k_L a$ -Wert ist ein wesentlicher Parameter für diese Skalierbarkeit.

Dementsprechend wurde ein Schwerpunkt auf die Erforschung des  $k_L a$ -Wertes und wie man ihn beeinflussen und kontrollieren kann, gelegt.

Der  $k_L a$ -Wert ist der Schlüssel zur Blackbox „Bioreaktor“. Als attraktives Planungsinstrument bildet die Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes die Grundlage für ein optimiertes Bioreaktor-Design und die Prozessverbesserung. Faktoren, deren Einfluss auf Wachstum und Produktbildung bisher nicht quantifiziert werden konnten, können nun genau bestimmt und für den Prozess berücksichtigt werden.

Das von ZETA vorgestellte neue Verfahren trägt wesentlich zur Entwicklung verbesserter Upstream-Prozesse, einer verbesserten Produktqualität und -sicherheit sowie einer höheren Produktausbeute bei und bildet die Grundlage für die Umsetzung der Quality-by-Design-Prinzipien.



**Dipl.-Ing. Florian Krainer**  
Process Engineer &  
Project Development  
florian.krainer@zeta.com  
www.zeta.com/kLa