



N. Bolf*

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mjerenja i automatsko vođenje procesa
Savska cesta 16/5a, 10 000 Zagreb

Napredak u vođenju bioprocasa

Biofarmaceutska industrija okreće se naprednim mjerenjima, modeliranju i simulaciji. Potrebna joj je najbolja moguća regulacija i optimizacija za ostvarivanje proizvoda visoke i konzistentne kvalitete, kao i visokog prinosa.

Biofarmaceutska industrija jedna je od najbrže rastućih u 21. stoljeću. Biološki proizvedene terapije i lijekovi imaju veliku ulogu u produljenju očekivanog trajanja i kvalitete života. Trenutačno biofarmaceutska proizvodnja čini oko 20 % cjelokupnog farmaceutskog tržišta, ostvarujući na globalnoj razini godišnje prihode od preko 230 milijardi USD. U središtu je biokemijski proces u bioreaktoru u kojem postoji kontrolirano okruženje za optimalan rast stanica i/ili stvaranje proizvoda.



Slika 1 – Bioreaktori u proizvodnom pogonu za bioproizvodnju¹

Šaržna proizvodnja u bioreaktorima za nove biološke pripravke može potrajati deset ili više dana, a vrijednosti šarži dostižu 10 milijuna USD ili čak više. Shodno tome, gubitci zbog duljeg trajanja proizvodnje i propalih šarži mogu biti znatni. Pri tome su stanična kinetika, kao i dinamika procesa složeniji nego kod većine drugih procesa. Procesni inženjeri i operatori ne mogu posvetiti više tjedana za dijagnosticiranje i rješavanje nastalih problema, pogotovo tijekom provedbe šaržne proizvodnje.

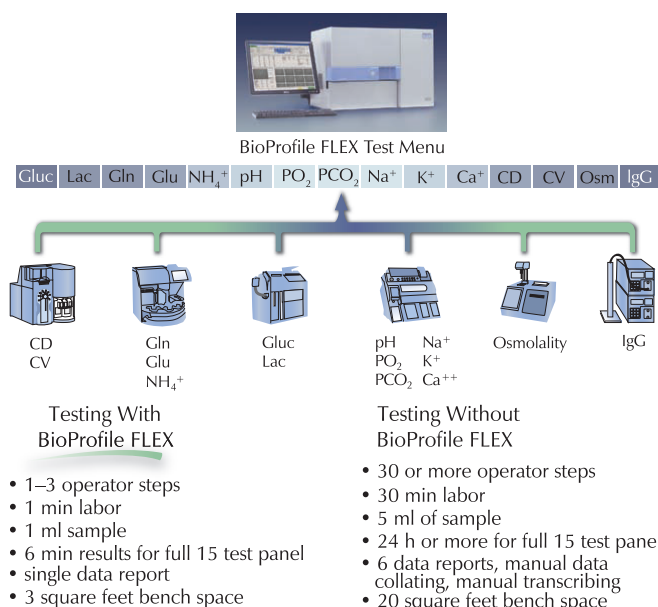
Zato je za ponovljivu šaržnu proizvodnju i maksimalne prinose ključno dobro automatsko vođenje procesa. Nepovoljni uvjeti tijekom proizvodnje moraju se prepoznati na vrijeme i odmah djelovati. Biofarmaceutska se industrija, stoga, sve više okreće novim, naprednim tehnikama mjerenja, kao i alatima za modeliranje i simulaciju da bi osigurali proizvode visoke i konzistentne kvalitete.

Napredak u mjerenjima

Danas već postoji velik broj *in-line* mjerenja s poboljšanim sondama za otopljeni kisik (engl. *dissolved oxygen* – DO), otopljeni ugljikov dioksid i biomasu. *In-line* ili *on-line* tehnike mjerenja obično se temelje na mjerenju mutnoće, dielektričnoj spektroskopiji (pri čemu se mjere dielektrična svojstva kao funkcije frekvencije) i blisko infracrvenoj (engl. *near infrared* – NIR) spektroskopiji. Tu su i *at-line* maseni spektrometri, iznimno moćan *Bioprofile Flex* analizator i brzi protein-kapljevinski kromatografi. Brza proteinska kapljevinska kromatografija (engl. *fast liquid protein chromatography* – FPLC ili *medium-pressure chromatography*) je metoda srednjotlačne kromatografije u kojoj postoji pumpa za regulaciju brzine kojom mobilna faza prolazi kroz stacionarnu fazu. FPLC je uvedena 1982. kao kapljevinska kromatografija brzog učinka. Od tada su razvijeni različiti sustavi srednjotlačne kromatografije.

Napredak donose i inferencijska mjerenja i, na temelju njih, bolje vođenje procesa. Sve to je podržano analizom radnih uvjeta i koncentracije koji daju indicaciju i predviđanje zdravlja stanica (engl. *cell health*), brzine rasta stanica (engl. *cell growth rate*), brzine odumiranja stanica (engl. *cell death rate*) i brzine proizvodnje.

Otopljeni kisik mjeri se *in-line* elektrodom prema ampermetrijskom načelu elektrokemijskog senzora. Kisik iz procesa prelazi membranu senzora. Ta membrana je selektivna prema mole-



Slika 2 – BioProfile FLEX sustav^{®2}

* Prof. dr. sc. Nenad Bolf
e-pošta: bolf@fkit.hr

kulama kisika, što znači da na katodu može prijeći samo kisik. Otopljeni kisik važno je mjeriti jer stanice pri niskom sadržaju otopljenog kisika brzo gube aktivnost i odumiru, što se modelira parametrom ograničenja u Michaelis-Mentenčinoj jednadžbi. Manje je poznato da problem može biti i vrlo visok sadržaj otopljenog kisika, što se u jednadžbi definira parametrom inhibicije. Dobra regulacija kisika bitna je za točno izračunavanje brzine unosa kisika (engl. *oxygen uptake rate* – OUR), što se pak primjenjuje za procjenu brzine rasta stanica, brzine stvaranja proizvoda i ukupnog volumnog koeficijenta prijenosa plin/kisik ($K_L a$).

Stanični metabolizam prati se putem brzine proizvodnje otopljenog ugljikova dioksida (engl. *CO₂ production rate* – CPR). Kod bioloških procesa ugljikov dioksid se podešava za regulaciju pH, pri čemu se povećanom koncentracijom ugljične kiseline snižava pH medija. Nakupljanje otopljenog ugljikova dioksida (engl. *dissolved carbon dioxide* – DCO₂) štetno je za stanice, a često se događa u velikim bioreaktorima s malim protokom plina i lošom regulacijom pH. DCO₂ se mjeri *in-line* potenciometrijskom Severinghausovom elektrodom (vidi okvir).

Mjerenjem mutnoće inferencijski se određuje ukupna masa stanica uključujući unutarstanični produkt. Mjerenje se temelji na Beer-Lambertovom zakonu. Prema tom zakonu količina svjetlosti koja se apsorbira u obojenom sloju otopine ovisi o debljini tog sloja (Lambertov zakon) i o množinskoj koncentraciji otopljene obojene tvari (Beerov zakon). Mutnoća se određuje mjerenjem intenziteta raspršene svjetlosti pod određenim kutom ili padom intenziteta svjetlosti u transmisiji.

Dielektrična spektroskopija mjeri aktivnu staničnu masu koja, nakon oduzimanja od ukupne mase stanica, daje masu mrtvih stani-

ca. Brzina promjene mase mrtvih stanica je brzina odumiranja ili lize. Promjena mutnoće pokazatelj je brzine rasta stanica i brzine nastajanja produkta potpomognute s faktorima OUR-a i prinosa kisika za rast, održavanje i formiranja produkta. Uz pomoć CPR-a poboljšava se proračun brzine stvaranja produkta. Mjerenje koncentracije glukoze i glutamina uz faktore prinosa također može poboljšati inferencijska mjerenja.

Normalne zdrave životinjske stanice imaju relativno stalnu veličinu sfernih stanica. Kako stanice prolaze kroz prirodnu fazu smrti koja se naziva apoptoza, njihovi oblici postaju nepravilni i smanjuju se. Dielektrična spektroskopija tvrtke *Fogale biotech* koristi *in-line* sondu kojom se provode nasumična mjerenja između frekvencija 0,1 i 15 MHz, pa se primjenom nelinearne metode najmanjih kvadrata dobiva cijeli frekvencijski spektar. Rezultirajući pikovi i područja beta disperzije permisivnosti na različitim frekvencijama mogu se primijeniti za procjenu volumena, veličine i homogenosti stanice, kao i integriteta membrane.

Mjerenje koncentracije izvora energije, hranjivih tvari i toksičnih nusproizvoda omogućuje bolju regulaciju dotoka supstrata tijekom šaržne sekvence, pa čak i regulaciju ključnih koncentracija. Tako npr. nakupljanje glukoze i glutamina može uzrokovati prekomjernu proizvodnju nusprodukata laktata i amonijaka. Oni štetno djeluju na zdravlje stanica i mogu inhibirati njihov rast. Takve efekte može se modelirati primjenom parametara inhibicije za te komponente u Michaelis-Mentenčinim jednadžbama.

Proizvodnja amonijaka također zahtijeva dodavanje natrijeva bikarbonata za regulaciju pH koji uzrokuje visok osmotski tlak u stanici. Preniska koncentracija glukoze i glutamina može također smanjiti rast stanica i predstavlja ograničavajuće parametre za te komponente u Michaelis-Mentenčinim jednadžbama. Prekursori stanične apoptoze, poput metabolizirane aminokiseline i nikotinamid adenin dinukleotida + vodika (NAD + H), također se mogu mjeriti. Bliskom infracrvenom spektroskopijom (NIR) određuju se kemijske skupine iz apsorpcijskih pojasa u srednjem infracrvenom spektru koje su posebno jake. To se može postići bez pripreme uzorka, umetanjem sonde od optičkih vlakana u procesni prostor. Za slanje signala do udaljenog analizatora (npr. fotometrijskog NIR-a) upotrebljavaju se optički kablovi.

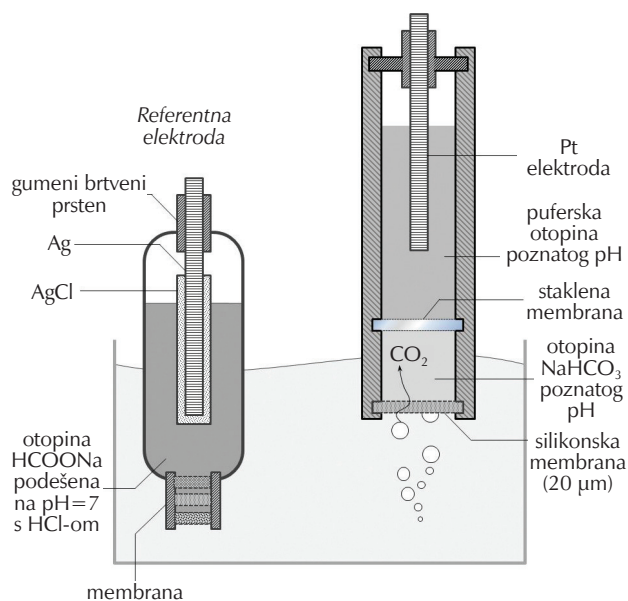
Na temelju mjerenja koncentracije kisika, ugljikova dioksida i dušika u izlaznom toku plina mogu se izračunati OUR, CPR i respiracijski koeficijent (engl. *respiration quotient* – RQ), što može biti pokazatelj nenormalnih radnih uvjeta. Nadalje, mjerenje koncentracija svih komponenti u mediju, uključujući glukozu, glutamin, glutamat, laktat, amonijak, natrij i kalij s rezolucijom od 0,01 g l⁻¹ uz mjerenje gustoće i promjera stanica, aktivnosti stanica i osmolalnosti pruža praktički cjelovitu sliku zdravlja stanica.

Digitalni blizanci ubrzavaju istraživanja

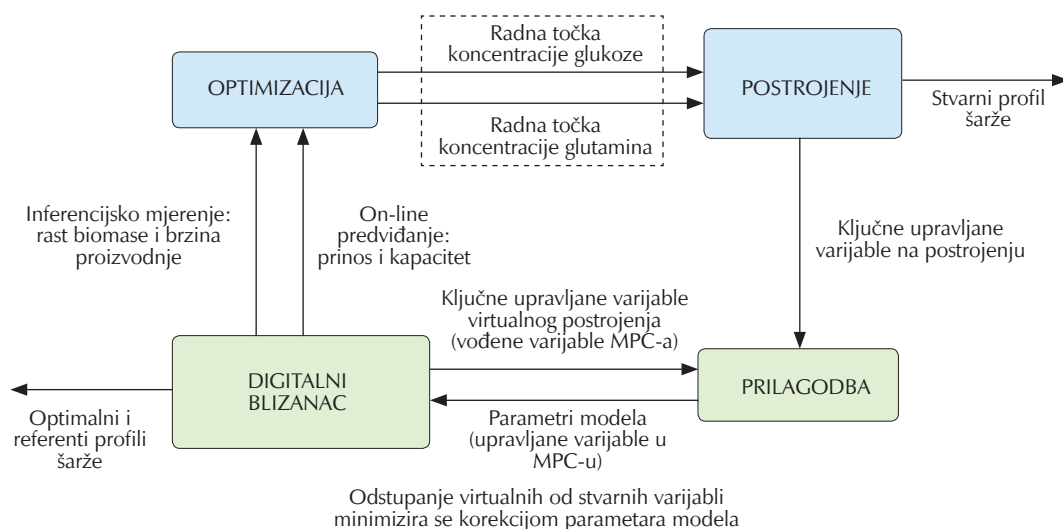
Biofarmaceutska proizvodnja obično se temelji na laboratorijskim i istraživanjima u pilot-pogonima. Čak je i u njima uzak prostor za ispitivanje jer je trajanje ciklusa šarže iznimno dugo – posebno za nove biološke pripravke (npr. 10 dana kod bioreaktora za stanice sisavaca). Vrijeme dolaska na tržište mora se svesti na minimum kako bi se zaštitila patentna prava na visokovrijedne proizvode.

Jedan od načina rješavanja tih vremenskih ograničenja je izrada digitalnog blizanca proizvodnog procesa. Eksperimentiranje je nekad bilo ograničeno na rane faze istraživanja i razvoja, ali u novije vrijeme napredak u kinetičkom modeliranju omogućio je lako podešavanje parametara modela tako da se profili šarže u digitalnom blizancu dobro podudaraju s onima u laboratoriji i u postrojenju. Modeli procesa, analitika podataka, inferencijska mjerenja i analiza strategije vođenja procesa primjenom digitalnog blizanca donose inovacije, kao i podršku u održavanju performansi tijekom proizvodnje.

Severinghausova elektroda je modificirana staklena elektroda koja mjeri CO₂. Razvili su je John W. Severinghaus i A. Freeman Bradley 1958. Pri mjerenju se primjenjuje staklena elektroda osjetljiva na CO₂ u okolnom filmu otopine bikarbonata prekrivenog tankom plastičnom membranom propusnom za ugljikov dioksid, ali nepropusnom za vodu i elektrolitičke otopine. Tlak ugljikova dioksida uzorka plina ili kapljevine uravnotežuje se kroz membranu. NaHCO₃ reagira s CO₂. Reakcija mijenja pH koji se mjeri i time određuje sadržaj CO₂.



Slika 3 – Severinghausova elektroda³



Slika 4 – Automatizirana prilagodba parametara modela povećava pouzdanost usporedbom upravljanih varijabli (izlaza regulatora) u digitalnom blizancu s onima u stvarnom postrojenju uz mogućnost optimizacije⁴

Takvi digitalni blizanci omogućuju brzo i slobodno eksperimentiranje, pa se npr. desetodnevna šarža može simulirati i analizirati u 30 minuta, pri čemu se analizira cijeli ciklus, od hipoteze i provedbe eksperimenata pa sve do analize i interpretacije rezultata.

Istraživači sve više shvaćaju vrijednost i fleksibilnosti malih sustava za automatsko vođenje šarži u laboratoriju ili pilot-postrojenju, pri čemu se uvelike smanjuje trajanje ciklusa i varijabilnost. Prelazak iz laboratorija na pilot-postrojenje do proizvodnog pogona sustava za vođenje je brz, što uvelike ubrzava validaciju.

Postoje relacije koje omogućuju postavljanje parametara za robusnu i pouzdanu procjenu utjecaja temperature, pH i koncentracije na brzinu rasta stanica i brzinu proizvodnje. Te relacije mogu se podudarati s oblikom i pikovima nesimetričnih krivulja rasta stanica i brzine stvaranja proizvoda prikazanih u odnosu na temperaturu i pH pomoću tri parametra.

U tom modelu optimalna temperatura ili pH za faze rasta i proizvodnje predstavljaju radne točke (zadane vrijednosti) temperature ili pH uključujući i promjene tijekom pojedinih fazi šarže. Potrebno je još definirati minimalne i maksimalne temperature. Lista parametara modela je minimalna i lako se postavlja na temelju bioloških opažanja.

To je ogroman napredak s obzirom na tradicionalne Arrheniusove relacije za temperaturu i Villadsen-Nielsenove jednadžbe za pH za koje parametre treba postaviti s velikom preciznošću. Opća Michaelis-Menteničina jednadžba, koja se pokazala korisnom za modeliranje unutarstanične dinamike, može modelirati efekte ograničenja i inhibicije. Jednadžbe povezuju makroskopski i mikroskopski kinetički put.

Te jednadžbe omogućavaju da se isti poopćeni kinetički model primjenjuje na sve vrste stanica. Prije toga su stanice kvasca (npr. kod proizvodnja etanola), gljivične stanice (npr. kod proizvodnje antibiotika), bakterijske stanice (npr. jednostavni proteini) i stanice sisavaca (npr. složeni proteini) zahtijevali svoje posebne relacije koje se, uglavnom, nisu mogle primijeniti na druge vrste stanica i proizvoda.

Teorijski dinamički modeli u literaturi razvijeni su pretežito za šaržne procese i nisu obuhvaćali dinamiku sustava za vođenje. Dinamički modeli u digitalnom blizancu mogu simulirati kontinuirani kao i šaržni način rada pri čemu mogu obuhvatiti i dinamiku mjerenja i izvršnih elemenata (npr. ventila i pumpi za doziranje).

Prediktivno vođenje

Upravljane varijable u prediktivnom vođenju primjenom modela procesa (engl. *model-based control* – MPC), s automatskom prilagodbom modela, parametri su modela (npr. kinetički parametri). Razvoj MPC-a za prilagodbu znatno je brži od stvarnog MPC-a na postrojenju. To daje velik prostor za usvajanje znanja o procesu bez ometanja proizvodnje u pogonu. Prilagođavanje se provodi bez utjecaja na stvarno postrojenje jer se upravljane varijable samo očitavaju s postrojenja. Važno je da digitalni bliznac postrojenja ima iste radne točke (zadane vrijednosti) i parametre regulatora kao i na stvarnom postrojenju, a simulacija započinje s izlazima regulatora koji su inicijalizirani u skladu sa stvarnim procesom.

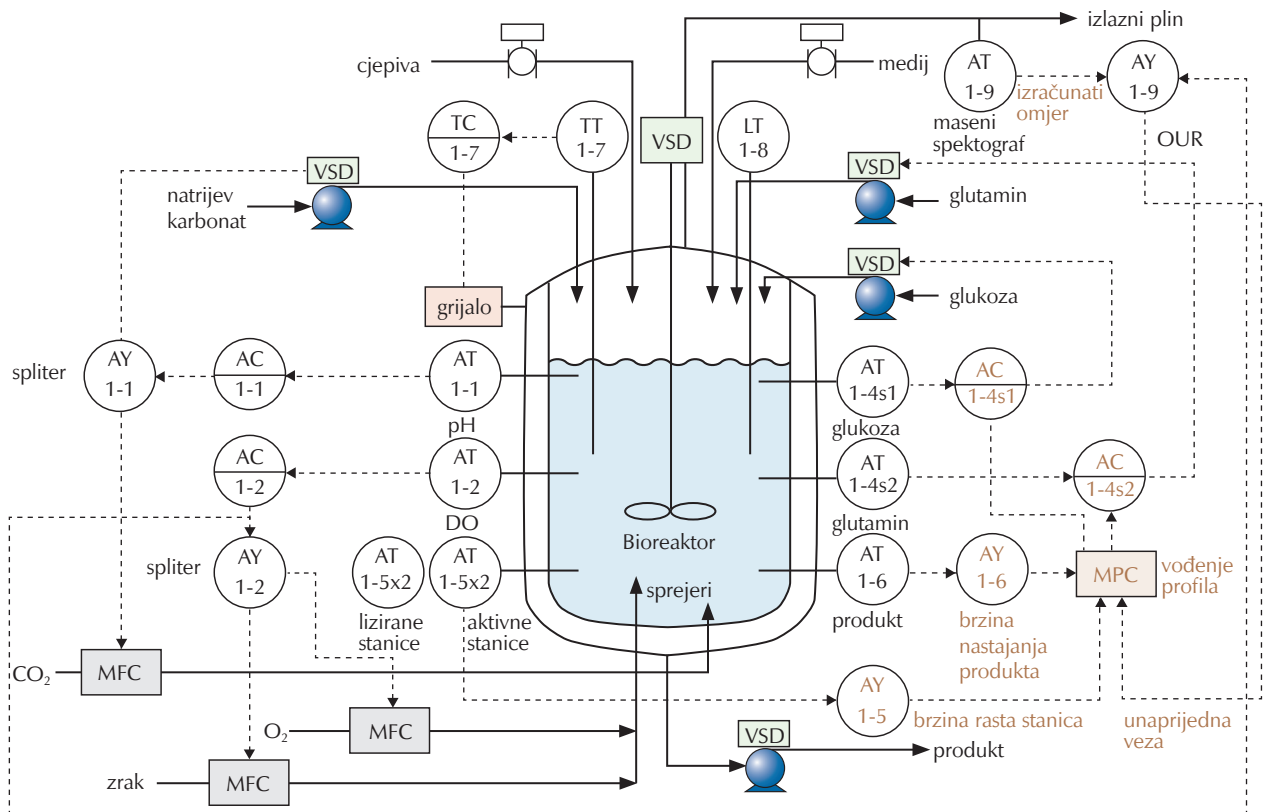
Optimizirane radne točke iz MPC-a s inferencijskim mjerenjima rasta i brzine proizvodnje imaju savjetodavnu ulogu i ne utječu na rad postrojenja. Izračunate radne točke primjenjuju se za automatsko optimiziranje postrojenja ako i kada se pokaže da su točne i pouzdanije od MPC-a koji se oslanja na inferencijska mjerenja izračunata na temelju *on-line* i *at-line* analiza.

Mogućnosti za optimizaciju

Optimizacija rada bioreaktora može se provesti konfiguriranjem dodatnih regulacijskih krugova (npr. regulacije koncentracije glukoze i glutamina) primjenom proširenog PID regulatora da bi se uklonio problem kašnjenja mjernih signala (zbog spore analize) i dodavanjem bloka za izračunavanje brzine promjene i buduće vrijednosti koncentracije.

Najbolje rješenje za regulacijske krugove u kojima je potreban brz odziv i brzo djelovanje pri pojavi poremećaja je PID regulator. MPC je bolji od standardnog PID-a ako postoje veće interakcije među regulacijskim krugovima, procesna ograničenja, stalni poremećaji i složena dinamika procesa. MPC je manje osjetljiv na ograničenja u razlučivosti mjerenja i mjerni šum. Najbolja rješenja često kombiniraju PID regulatore za čvrstu regulaciju radnih uvjeta i MPC za optimiranje radnih točaka.

MPC-om se mogu optimizirati bioreaktori sa stanicama sisavaca održavajući brzinu rasta stanica i brzinu stvaranja proizvoda na zadanim vrijednostima budući da šarža napreduje manipulacijom koncentracija glukoze i glutamina. Brzinu rasta predstavlja nagib profila koncentracije stanica, a brzinu nastajanja produkta nagib profila koncentracije produkta. *On-line* i *at-line* analizatori



Slika 5 – Optimizacija rasta stanice i brzine nastanka proizvoda manipulacijom koncentracija glukoze i glutamina s preventivnom korekcijom na temelju brzine unosa kisika (OUR) (MFC – regulator masenog protoka (engl. mass flow controller); VSD – pumpa/miješalica promjenjive brzine (engl. variable speed drive); AC-1, AC-2, AC1-4s1 i AC1-4s2 – prilagođeni PID regulatori)⁴

mjere te koncentracije izravno ili inferencijski ili pak na temelju proračuna modela u digitalnom blizancu. Potreba za glukozom i glutaminom drastično se mijenja kako stanice prolaze kroz fazu rasta i nastajanja produkta. OUR izračunat na temelju analize sadržaja kisika u izlaznom plinu, upravljanog protoka i protoka dodatnog kisika može dati unaprijedni (engl. *feedforward*) signal za predviđanje promjene brzine rasta stanica. Na slici 5 prikazana je primjena MPC-a u kojem se optimizacija provodi proračunom,

pri čemu se računaju buduće vrijednosti brzine rasta stanica i stvaranja produkta.

Zaključno, bolji rad i pouzdanost bioreaktora ostvaruju se kvalitetnim istraživanjem i razvojem, pažljivim projektiranjem procesa i operacija, kao i odabirom prikladnog sustava za vođenje. To je danas lakše ostvariti zbog pojave jednostavnijih, ali i sofisticiranijih mjernih metoda, digitalnih blizanaca i razvoja naprednog vođenja procesa.

Literatura

- URL: https://www.manufacturingchemist.com/news/article_page/Rentschler_to_expand_single-use_manufacturing_capacities/99178 (2. 4. 2020.).
- URL: https://www.tecom-as.com/wp-content/uploads/2016/07/166-BioProfile-FLEX-12pg-9_9.pdf (2. 4. 2020.).
- URL: <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/respiratory-system/Chapter%20423/principles-measuring-pco2-severinghaus-electrode> (2. 4. 2020.).
- G. K. McMillan, R. Fazeem, C. Stuart, Bioreactor control breakthroughs: Biopharma industry turns to advanced measurements, simulation and modeling, *Control*, Feb. '20, URL: <https://www.controlglobal.com/articles/2020/bioreactor-control-breakthroughs-biopharma-industry-turns-to-advanced-measurements-simulation-and-modeling/> (2. 4. 2020.).
- URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Dielectric_spectroscopy (2. 4. 2020.).
- URL: <https://www.bio-rad.com/de-at/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF#1> (2. 4. 2020.).
- J. W. Severinghaus, A. E. Bradley, Electrodes for blood pO₂ and pCO₂ determination, *J. Appl. Physiol.* **13** (1958) 515–520, doi: <https://doi.org/10.1152/jappl.1958.13.3.515>.
- URL: <https://quizlet.com/112893362/carbon-dioxide-measurement-flash-cards/> (2. 4. 2020.).
- G. K. McMillan, At the IIoT Crossroads, *Control*, Feb. '19, str. 36, URL: <https://www.controlglobal.com/articles/2019/at-the-iiot-crossroads/> (2. 4. 2020.).
- G. K. McMillan, Wireless – Overcoming challenges of PID control & analyzer applications, *InTech*, UR: <https://www.isa.org/link/wireless/> (2. 4. 2020.).