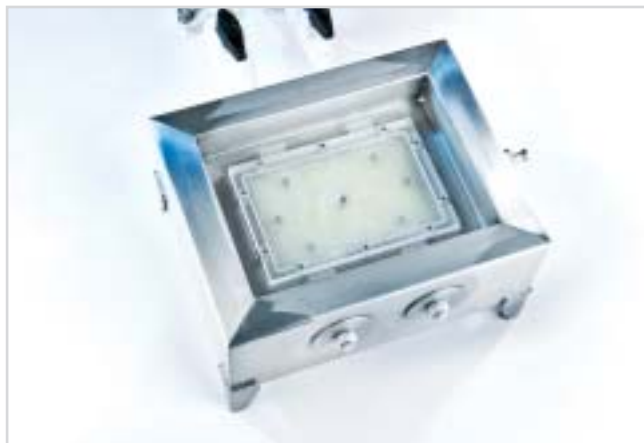




Установка ZETA LabFreeze Container



Установка ZETA LabFreeze Container
с замороженным ледяным блоком

Холодный расчет:

инновационная испытательная установка для оптимизации процессов при низкотемпературном хранении и транспортировке жидких фармацевтических продуктов



Автор:

Биргит Питтерман,
дипломированный инженер,
глава подразделения R + D,
ZETA Biopharma GmbH
Либих / Грац, февраль 2014 г.

Перевод:

Алексей Моисеев,
МВА, инженер,
директор по развитию,
ООО «ЦЕТА»

В биофармацевтическом производстве очень важную роль играют белки. Зачастую в борьбе с серьезными заболеваниями, такими как рак или псориаз, используют лекарственные препараты именно этого класса. По прогнозам, к 2018 г. 80 % новых, разрешенных к применению лекарств будут основаны на белках, произведенных с использованием биотехнологических методов. При этом важными проблемами являются хранение и транспортировка таких белков

Однако хранение биофармацевтических белков является очень трудной задачей применительно как к нерасфасованным балкам растворам, так и к высокочистым готовым лекарственным формам. Как правило, белки хранят в замороженном состоянии, что подразумевает их заморозку в буферном растворе в специальных криоконтейнерах до температур, достигающих иногда -70°C . В таком состоянии их можно хранить и транспортировать. Основная сложность данного подхода заключается в том, что до сих пор трудно было предсказать, как жидкость будет взаимодействовать с белком во время процесса замораживания, поэтому часто возникало значительное и непредсказуемое повреждение ценных белков.

Влияние процесса замораживания и оттаивания на качество белков определяется технологией замораживания и имеет большие отличия в зависимости от белковых веществ. Компания ZETA в сотрудничестве с исследовательским центром RCPE (The Research Center Pharmaceutical Engineering GmbH) изучает разновидности различных процессов, их влияние на формирование белковых агрегатов и активность белков после оттаивания. К тому же гораздо более точно, чем раньше, иллюстрируются физические процессы, происходящие во время процесса замораживания. Миграция жидкой и замороженной фаз, протекающая в этот период, и образование межфазного слоя между ними могут приводить к критическому стрессу белков [1]. Следую-

щим фактором стресса может стать матрица ледяных кристаллов водной фазы, которая в зависимости от их размера может инкапсулировать или вытеснять белок [2, 3].

Для того чтобы иметь возможность охарактеризовать и моделировать процессы замораживания, был создан лабораторный аппарат объемом 200 мл для осуществления данного процесса. Он оснащен автоматизированным термостатом и 7 температурными сенсорами. Этот аппарат использовали совместно с данными о динамике замораживания белков, а затем полученные результаты применяли для моделирования процесса с помощью CFD компьютерной симуляции. В дальнейшем полученная модель была проверена экспериментально. Для использования этих результа-

тов в производственных процессах необходимо было проверить модель еще и на пилотной установке, для чего был сконструирован аппарат объемом 700 мл для замораживания. Этот пилотный модуль был разработан по промышленным стандартам и оборудован различными портами, в которые можно устанавливать датчики температуры и pH, а также оптические датчики.

Предыстория проекта

Австрийская компания ZETA Biopharma вот уже много лет продолжает производить промышленные установки для замораживания активных фармацевтических ингредиентов. В ходе этой деятельности крупные фармацевтические компании выражали свою потребность в системах разных размеров для раз-

личных продуктов, что в свою очередь требовало более глубокого понимания процессов замораживания.

До недавнего времени было очень мало сведений о физической динамике, происходящей в промышленных криогенных емкостях. До сих пор считается приемлемым мониторинг процесса, при котором используют только один температурный датчик [6]. Такой недостаток знаний часто приводит к тому, что масштабирование осуществляется путем проб и ошибок, а это является причиной возникновения неожиданных отличий в получаемых результатах при использовании новых масштабов процесса. Таким образом, задачей данного проекта было достижение фундаментального понимания физических явлений, происходящих во время процесса замо-



Отбор пробы из установки ZETA LabFreeze Container



Установка ZETA PilotFreeze Container с замороженным ледяным блоком



Установка ZETA PilotFreeze System

Диаграмма 1.
Результаты измерения температуры во время замораживания 200 мл раствора лактатдегидрогеназы LDH (100 мг / мл) и сравнение с результатами компьютерной CFD-симуляции. Непрерывные линии показывают результаты экспериментальных значений измерений, прерывистые линии того же цвета – данные симуляции температуры в те же моменты времени

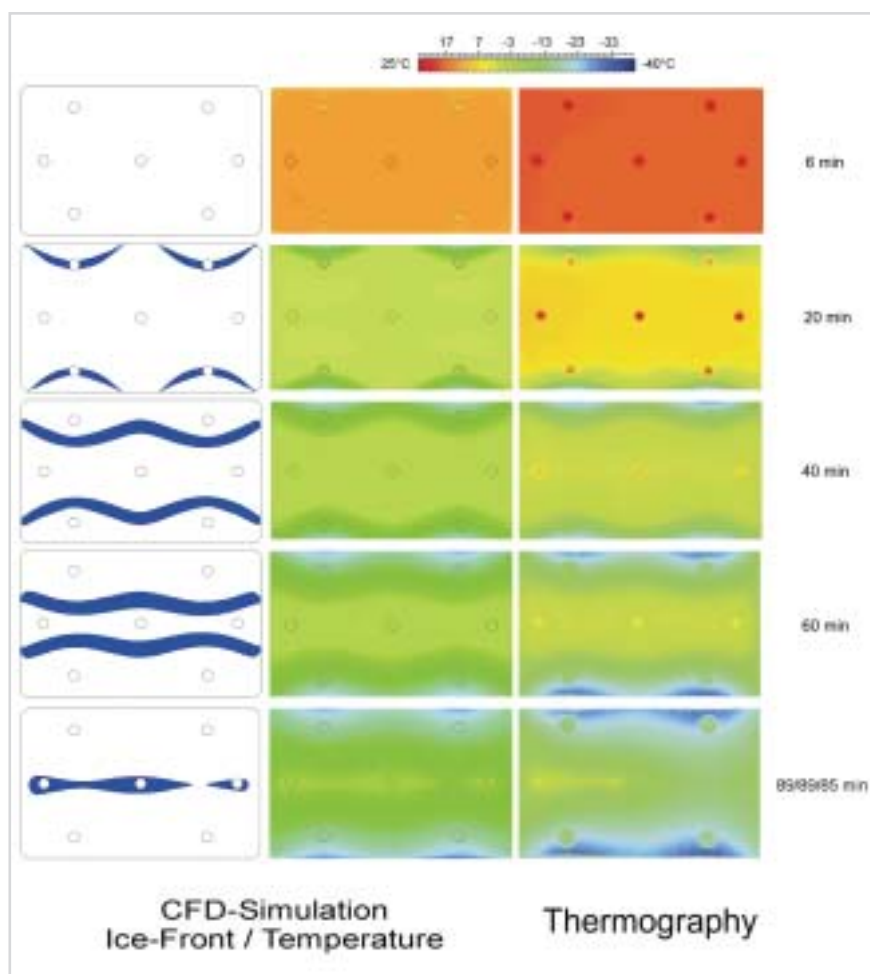
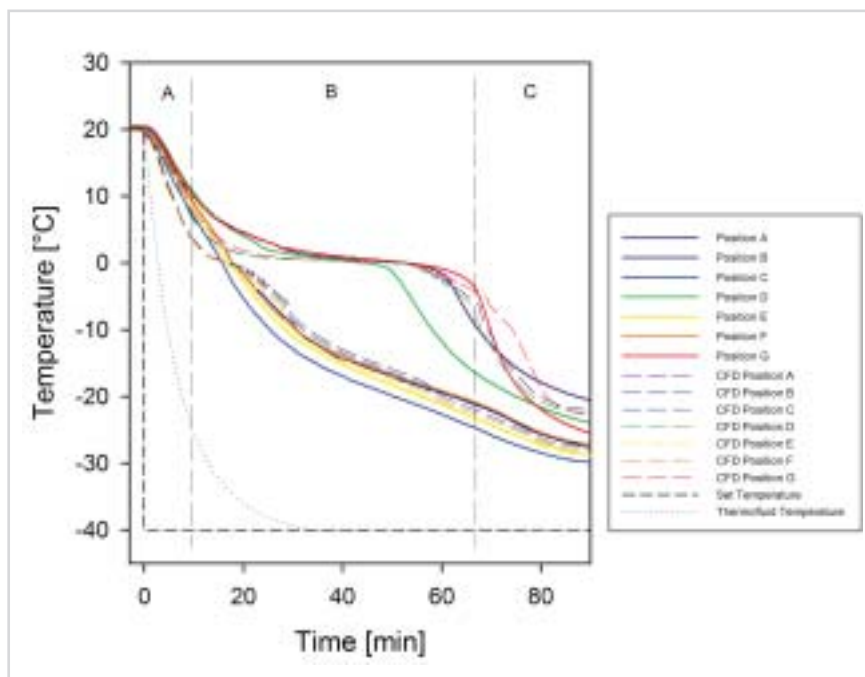


Диаграмма 2.
Сравнение данных CFD-симуляции с термографическими результатами измерения температуры во время замораживания 200 мл раствора BSA

раживания, и использование этих знаний при проектировании систем для различных пользователей. С целью реализации данной задачи было разработано специальное сочетание симуляторных моделей, экспериментальных тестов, а также новых наработок при проектировании систем. Извлеченные уроки позволят в будущем точнее прогнозировать ход процесса.

Научную поддержку трехлетней разработки этого экспериментального аппарата осуществлял Исследовательский центр фармацевтического инжиниринга K1, расположенный в г. Грац (RCPE), под руководством профессора Йоханнеса Кхинаста (Prof. Johannes Khinast). Компания ZETA Biopharma совместно с RCPE разработала оборудование и процессы в соответствии с современными принципами встроенного качества QbD.

Подробности планирования эксперимента и разработки процесса

Проект дал фундаментальное представление о процессах, происходящих во время замораживания фармацевтических белков. Механистически изучали эффекты, которые влияют на стабильность референсных белков в зависимости от интенсивности замораживания, температуры и объема. Ре-



Установка промышленного масштаба ZETA Freeze & Thaw System объемом 300 L

зультаты такого изучения позволяют создавать криоёмкости, разрабатываемые индивидуально с учетом специфики конкретного заказчика, что гарантирует высочайший уровень качества фармацевтических продуктов.

В одном из экспериментов для того, чтобы задать CFD-параметры, выполняли первоначальные термографические измерения, а затем исследовали предсказуемость качества модели в зависимости от температуры и условий криоцентрирования. В модуль заморозки были установлены 7 температурных датчиков для записи профиля температуры в растворе во время процесса замораживания.

На диаграмме 1 изображены кривые зависимости температуры от времени для 200 мл раствора LDH концентрации 100 мкг / мл, а также температура теплоносителя и заданная температура. После начальной стадии охлаждения

(phase A) начинается фаза кристаллизации, которая сопровождается температурным плато (phase B). Далее следует результат высвобождаемой теплоты кристаллизации в комбинации с постоянным охлаждением.

На диаграмме 2 дополнительно показаны температурные профили, полученные в результате компьютерной CFD-симуляции. Отмечено хорошее соответствие между результатами компьютерной симуляции и данными экспериментального определения температуры [1].

С помощью метода инфракрасной термографии удалось визуализировать процесс замораживания во время параллельного измерения температуры на поверхности раствора белка. Сравнение этих результатов с данными, полученными после CFD-симуляции, помогло верифицировать пограничные условия CFD-модели. На диа-

грамме 1 представлены результаты симуляции после оптимизации модели и экспериментальные данные термографии раствора BSA, который охлаждали до температуры $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ [1].

Чрезвычайно важной частью информации для оптимизации процесса замораживания в промышленных масштабах является идентификация зон внутри емкости, где замораживание происходит в последнюю очередь.

В отличие от лабораторной заморозки, использованной в этом проекте, в модулях промышленного масштаба, как правило, невозможно осуществлять визуальную инспекцию замораживаемых растворов. Поэтому для создания надежной системы мониторинга процесса очень важно правильно разместить температурные датчики. Также в текущем наборе экспериментов исследователи обнаружили асимметричное заморажива-

ние. Это означает, что для правильного планирования работы модуля замораживания необходимы точные знания о механизме этого процесса.

Предпосылки для успешности проекта

Проект стал успешным благодаря тому, что данные прогнозирования, полученные после симуляции, совпали с результатами экспериментов. Это послужило началом к механистическому пониманию процесса замораживания. Такие механистические знания создают базис для рациональной оптимизации и масштабирования процесса.

Успех совместного проекта обусловлен преимущественно такими тремя основополагающими элементами, как:

- экспертиза в предметной области и прикладная технология;
- хорошо формализованные структуры управления проектами;
- гармоничная атмосфера и командная работа с вовлечением всех участников проекта.

Для успешного сотрудничества в таком сложном окружении недостаточно только одного из этих элементов. Как правило, при проведении фундаментальных исследований и коммерческих разрабо-

ток фокусируют внимание на разных целях, поэтому соединение их в одном проекте зачастую является очень сложной задачей.

Заключение и важные выводы для будущей практики

Криозффекты проявляются как во время замораживания, так и во время размораживания растворов белков. Величины этих эффектов и их последствия могут существенно отличаться для разных продуктов и зачастую проявляются в потере активности белков. Помимо этого инактивированная фракция белка может образовывать примеси в продукте, которые потом нужно будет удалять, используя дополнительные дорогостоящие стадии очистки. В некоторых случаях чрезмерно выраженный криозффект может даже привести к полной потере партии.

Но если известны механизмы продукт-специфичных криозффектов, то им можно противодействовать при конструировании аппаратуры и использовании соответствующих методик процессов. Это означает, что ZETA может внести свой эффективный вклад как в разработку процессов на предприятии заказчика, так и в уменьшение потерь продукта. Благодаря использованию лабораторных и пилотных систем за-

мораживания ZETA можно прогнозировать поведение растворов протеинов при различных условиях процесса. Полученные результаты станут основой при конструировании оборудования и разработке процессов промышленного масштаба. Совместно с заказчиком с помощью этого способа можно оптимизировать процесс замораживания для промышленного применения.

Описываемый проект существенно улучшил точность прогнозирования процессов при разработке новых методов. До этого существовало только небольшое число эмпирических исследований по распределению фармацевтических белков в замороженном состоянии. В ходе данного проекта впервые стало возможным предсказать это распределение с использованием компьютерной симуляции и внести рациональные предложения в целях улучшения конструкции процессного оборудования.

Результаты дальнейших экспериментальных исследований позволили не только провести валидацию моделируемого метода, но и сделать вывод, что качество продукта напрямую зависит от методики процесса. Разработанную методику можно эффективно использовать для существенного уменьшения расходов при масштабировании процессов с одновременным улучшением качества продукта. Команда исследователей разработала новые способы мониторинга качества продукта непосредственно в процессе замораживания. Раньше существовала возможность определять качество продукта только после оттаивания в жидкой фазе, но не в замороженном состоянии. ■

Список литературы:

1. Roessl U., Jajcevic D., Leitgeb S., Khinast J. G., Nidetzky B. 2013. Characterization of a laboratory-scale container for freezing protein solutions with detailed evaluation of a freezing process simulation. *Pharm. Biot.* DOI 10.1002/jps.2381 4.
2. Singh S, Kolhe P, Wang W, Nema S. 2009. Large-scale freezing of biologics; a practitioner's review. part one: fundamental aspects. *Bioprocess Int.* 7 (9) 32 – 44.
3. Kreilgaard L, Jones LS, Randolph TW, Frokjaer S, Flink JM, Manning MC, Carpenter JF. 1998. Effect of tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor xiii. *J Pharm Sci.* 87 (12)1597 – 1603.
4. Kuelzto L, Wang W. 2008. Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *J Pharm Sci.* 97 (5)1801 – 1812.
5. Singh SK, Kolhe P, Wang W, Nema S. 2009. Large-scale freezing of biologics; a practitioner's review. part two: practical advice. *Bioprocess Int.* 7 (10) 34 – 42.
6. Singh SK, Nema S. 2010. Freezing and thawing of protein solutions. In Jameel F, Hershenson S, editors. *Formul Process Dev Strateg Manuf Biopharm.* John Wiley & Sons. 625 – 675.



Контактная информация:

ООО «ЦЕТА»
Россия, 129626, г. Москва,
пр-т Мира, д. 104, стр. 2, оф. 30
+ 7 (495) 721-39-41
russia@zeta.com
www.zeta.com

