

Гидрофобные примеси как причина измеримых изменений физико-химических характеристик полксамера 188



Фрэнк Романски¹, Сандра Крёлл¹, Йохан Филип Хебештрайт¹, Тоня Джексон²

¹ BASF SE, Людвигсхафен (Германия)

² BASF Corporation, Флорхам Парк, Нью-Джерси (США)

Введение

В последние годы полксамеру 188 – неионогенному полимерному поверхностно-активному веществу (ПАВ) и широко применяемому фармацевтическому вспомогательному веществу, стали уделять повышенное внимание в связи с его важнейшей ролью в биотехнологическом производстве клеточных культур [1]. Данный ингредиент традиционно используют в фармацевтической отрасли в качестве солюбилизатора, увлажняющего агента, гелеобразующей матрицы, коллоидного стабилизатора и эмульгатора [1]. При традиционном применении в качестве фармацевтического вспомогательного вещества незначительные изменения от партии к партии и наличие следовых примесей, как правило, не оказывают существенного влияния на его свойства. Однако дело обстоит иначе в случае биотехнологического производства. Так, установлено, что коммерчески доступные формы полксамера 188 очень отличаются друг от друга, что, в свою очередь, значительно сказывается на жизнеспособности клеток [2 – 4]. Как следствие, для надежной оценки эффективности применения в биотехнологическом производстве одного лишь соответствия критериям официальных фармацевтических монографий недостаточно. Невзирая на изменчивость свойств и эффективности полксамера 188, существует длинный список публикаций о его примене-

нии в производстве клеточных культур [5, 6].

Механизм, лежащий в основе защиты от сдвиговых напряжений

Положительный эффект полксамера 188 в биологическом производстве клеток млекопитающих был впервые доказан в 90-х годах прошлого столетия в отношении клеток яичников китайского хомячка (CHO) [5, 6]. Несмотря на применение, как правило, в низких концентрациях (примерно 0,1 – 0,5% масса/масса), сегодня широко признана важ-

ность воздействия данного ПАВ на жизнеспособность клеток благодаря механизму защиты от сдвиговых напряжений. Один из потенциальных механизмов данного явления представлен на рис. 1.

На диаграмме отмечены некоторые из характерных участков типичного биореактора, особенно подверженные возникновению локальных усилий сдвига на контактирующих поверхностях (например, в случае с клеткой на поверхности пузырька, где жидкость граничит с воздухом). При всплывании пузырька к пенному слою на

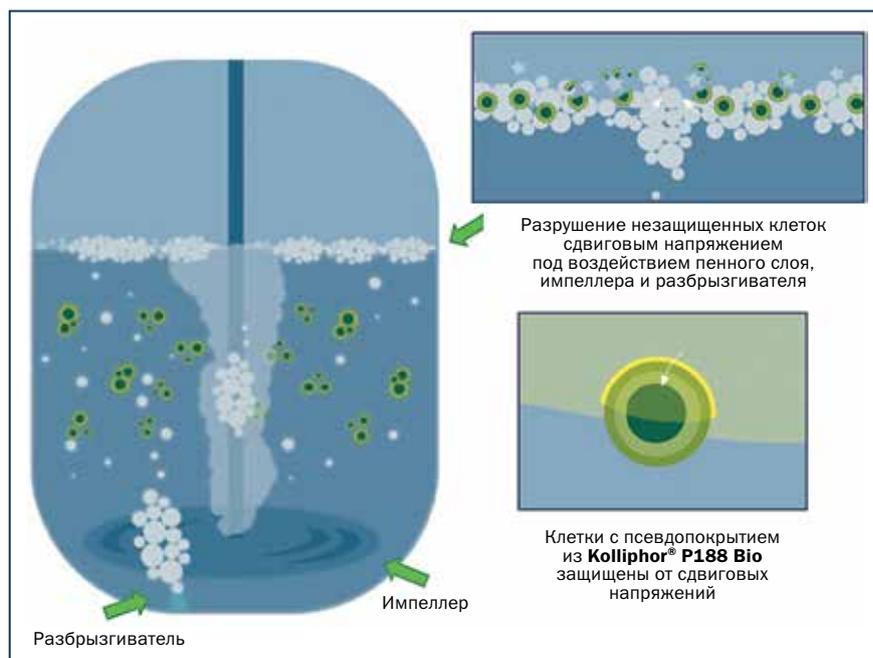


Рис. 1. Объяснение защитных свойств Kolliphor® P188 Bio от сдвиговых напряжений

поверхности биореактора, где он лопаются, возникающие локальные механические стрессы могут вызвать лизис клетки [4]. Предполагается, что добавление достаточного количества полоксамера 188 предотвращает указанное явление благодаря избирательной адсорбции, обусловленной высокой коллоидной схожестью, к поверхности контакта между клеткой и средой. Данное сильное взаимодействие приводит к образованию псевдопокрытия на поверхности между клеткой и средой с последующей минимизацией ущерба, вызванного локальными напряжениями сдвига, и поддержанием высокой жизнеспособности клеток в процессе биотехнологического производства [3, 4].

Понимание физико-химических характеристик ПАВ

Коллоидную систему определяют как многофазную систему, содержащую по крайней мере одно ПАВ, стабилизирующее дисперсную систему. Как правило, незначительные изменения в содержании следовых примесей не оказывают существенного воздействия, поскольку состав ПАВ обычно не ограничен одним видом молекул, а зачастую представлен смесью веществ с широким спектром молекулярных масс, димеров, тримеров и следовых продуктов синтеза (во многих случаях получаемых из продуктов природного происхождения с естественной изменчивостью) [7]. Полоксамер 188 представляет собой неионогенное ПАВ, получаемое путем анионной полимеризации пропилена оксида с этилена оксидом; это приводит к образованию молекул с единым центральным гидрофобным блоком (ППО), к которому примыкают два хвостовых гидрофильных блока (ПЭО). В результате данное вспомогательное вещество имеет номинальный уровень изменчивости. Полоксамер 188 производится в соответствии с требованиями фармацевтических монографий и обладает физико-химическими характеристиками, указанными в таблице 1 [4].

Следует отметить, что указанная в таблице молекулярная масса полимера ссылается на одиночное значение, полученное из гидроксильного числа. Полоксамер, однако, характеризуется широким спектром молекулярных масс, лучше представленных данными эксклюзионной хроматограммы (рис. 2).

Полоксамеры проявляют интересные физико-химические свойства в водных растворах. В частности, они быстро растворяются в холодной воде, обладают низкой вязкостью и ньютоновским реологическим поведением. Однако повышение температуры приводит к образованию мицелл, упорядоченных мицеллярных структур или даже термореверсивных гелей в зависимости от температуры и/или концентрации [8]. Данный механизм изображен на рис. 3.

Эти уникальные свойства дают возможность изучить сложное поведение полоксамеров в водной среде.

Таблица 1

Характеристика	Значение
Средняя молекулярная масса	7680 – 9510
Содержание этилена оксида	79,9 – 83,7% (по массе)
Значение pH (10% масса/масса)	5,0 – 7,5
Критическая концентрация мицеллообразования	$4,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л

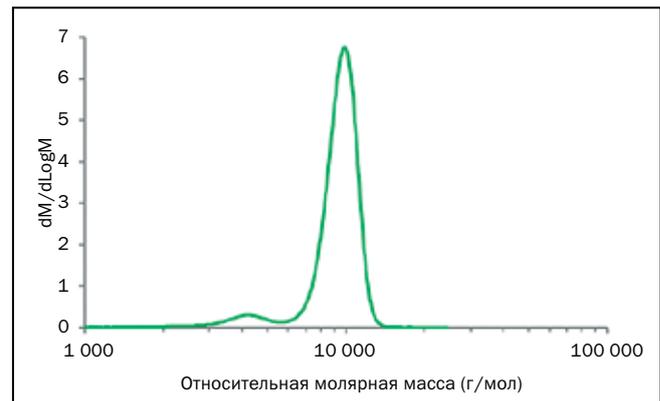


Рис. 2. Диаграмма молекулярно-массового распределения серии полоксамера 188 (Kolliphor® P188 Bio), полученная путем эксклюзионной хроматографии



Рис. 3. Схема образования мицелл полоксамера в зависимости от температуры и концентрации [8]

Гидрофобные примеси как причина изменчивости свойств и эффективности P188 и необходимость в использовании специальных методов выявления

По данным недавно опубликованного научного сотрудничества установлено, что наличие следовых количеств гидрофобных примесей оказывает значительное влияние на жизнеспособность клеток [3, 4]. Это объясняется тем, что гидрофобные примеси приводят к нарушению механизма, лежащего в основе защиты от сдвиговых напряжений. Также доказано, что гидрофобные примеси могут быть обнаружены с помощью обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). На рис. 4 представлено сравнение стандартной изменчивости

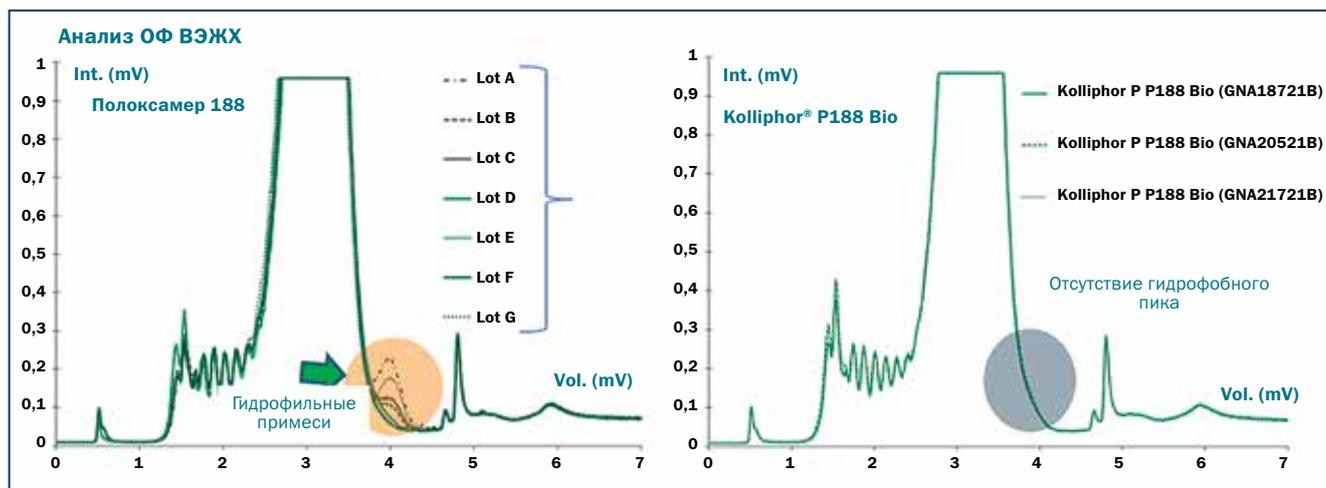


Рис. 4, 5. Сравнение полоксамеров 188, пригодных и непригодных для использования с клеточными культурами. Непригодный для культивирования клеток продукт (изображение слева) содержит гидрофобные примеси в следовых, но поддающихся обнаружению количествах

полоксамера 188 с продуктом Kolliphor® P188 Bio, специально разработанного для клеточных культур. В последнем случае очевидно отсутствие гидрофобных примесей [3, 4].

В то время как влияние гидрофобных примесей на культивирование клеток очевидно, нет достаточно полного представления о причине столь незначительного воздействия примесей на физико-химические свойства материала. В данном исследовании представлены результаты оценки влияния следовых и более значительных количеств гидрофобных примесей на коллоидные и физико-химические свойства материала.

Влияние примесей на физико-химические свойства P188

Согласно недавним публикациям, применение статических методов определения поверхностного натяжения способно дать представление о незначительных изменениях в содержании гидрофобных примесей [9]. В частности, было доказано, что высокоочищенный полоксамер 188 обладает наиболее высоким статическим поверхностным натяжением, и добавление гидрофобных примесей приводит к общему снижению натяжения. По-

добный эксперимент был проведен с применением Kolliphor® P188 Bio и измерением статического поверхностного натяжения при добавлении возрастающего количества гидрофобных примесей (рис. 6). В данной серии экспериментов использовали исходный раствор полоксамера 188 в концентрации 0,1% масса/масса, к которому добавляли гидрофобные примеси в различных массовых

долях; каждый раствор затем разбавляли в 50 мл сверхчистой воды MilliQ, после чего статическое поверхностное натяжение измеряли в зависимости от концентрации.

В случае раствора полоксамера в концентрации 0,1% очевидно, что различия между поверхностным натяжением растворов с разным содержанием примесей не столь существенны. Кроме того, поверхностное натяжение раство-

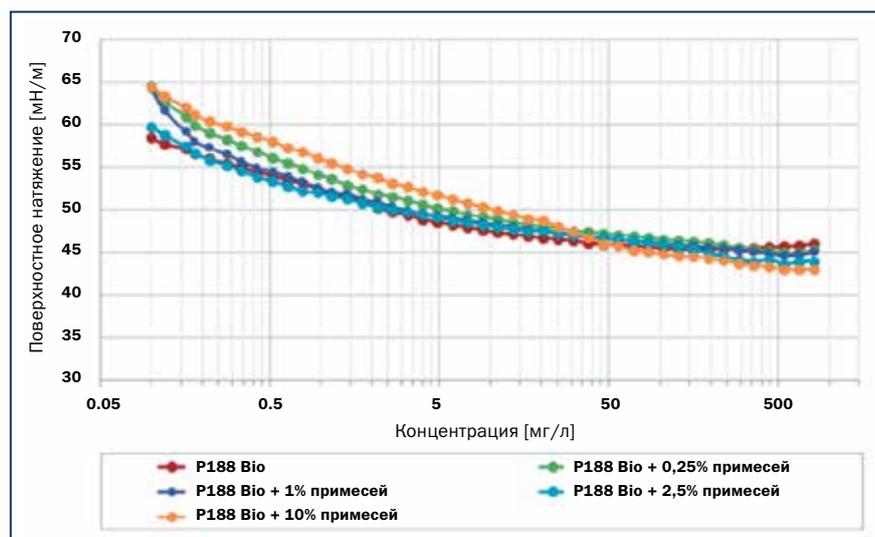


Рис. 6. Статическое определение поверхностного натяжения раствора полоксамера 188 в начальной концентрации 0,1%, содержащего гидрофобные примеси в концентрации 0,25, 1, 2,5 и 10% масса/масса

ра чистого полоксамера 188 не является самым высоким, но оно возрастает при повышении концентрации гидрофобных примесей при низких концентрациях полимера. При повышении концентрации полимера наблюдается инверсия тенденции с точкой пересечения при концентрации, равной приблизительно 50 мг/л. Измерения были повторно проведены с использованием исходного раствора в более высокой концентрации (1% масса/масса). Результаты представлены на рис. 7.

При начальной концентрации 1% масса/масса становится более очевидно, что чистый раствор полоксамера 188 не обладает наиболее высоким поверхностным натяжением. Следовые и более значительные количества гидрофобных примесей повышают поверхностное натяжение при низкой концентрации раствора, в то время как при более высоких концентрациях наблюдается обратная тенденция. Одним из возможных объяснений этого может быть то, что при низких концентрациях раствора при наличии гидрофобных веществ раствор менее насыщен на поверхности, контактирующей с воздухом, в результате чего наблюдается более высокое поверхностное натяжение. Парадоксальным представляется тот факт, что раствор чистого гидрофобного вещества проявляет явно более низкое поверхностное натяжение во всем диапазоне испытания.

В попытке разъяснить, имеет ли место коллоидное или физическое сцепление гидрофобных структур с полоксамером 188, был проведен ряд измерений мицелл с использованием одной из известных гидрофобных примесей. Результаты, представленные на рис. 8, отображают данные фотонной корреляционной спектроскопии неразбавленного образца с различными отношениями концентрации полоксамера 188 к концентрации гидрофобной примеси.

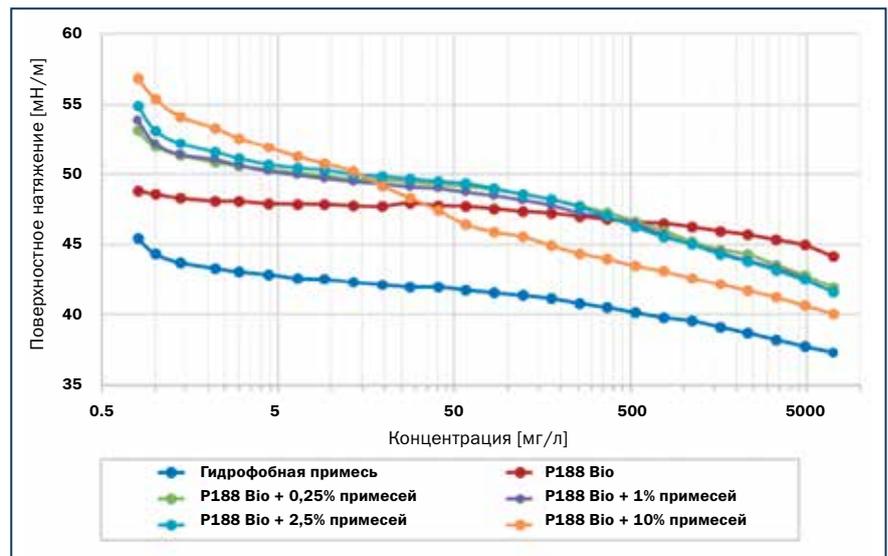


Рис. 7. Статическое определение поверхностного натяжения раствора полоксамера 188 с добавлением гидрофобных примесей в концентрации 0,25, 1, 2,5 и 10% масса/масса и чистого гидрофобного вещества при начальной концентрации 1%

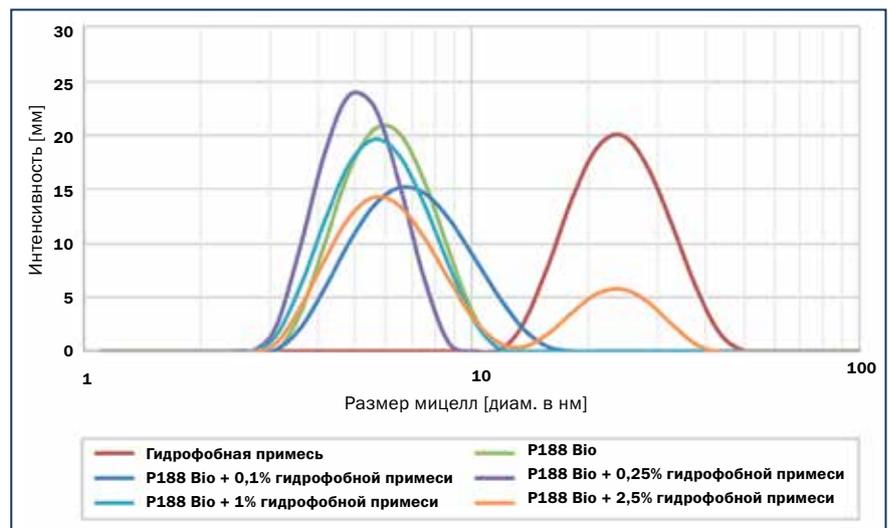


Рис. 8. Определение размеров мицелл полоксамера 188 с помощью метода фотонной корреляционной спектроскопии как при наличии гидрофобных примесей в различных низких концентрациях, так и при их полном отсутствии

Результаты данных измерений свидетельствуют о том, что гидрофобные вещества в низких концентрациях не приводят к образованию смешанных мицелл, а, скорее, обособленных, более крупных мицелл в пределах 20 – 30 нм, отличающихся от мицелл полоксамера 188, размеры которых в основном менее 10 нм. Полученные ре-

зультаты были дополнены измерениями при более высоких концентрациях гидрофобной примеси (рис. 9).

Вновь очевидно образование обособленных мицелл вместо смешанных; это различие имеет важное значение, поскольку одним из возможных объяснений причины нарушения защитного

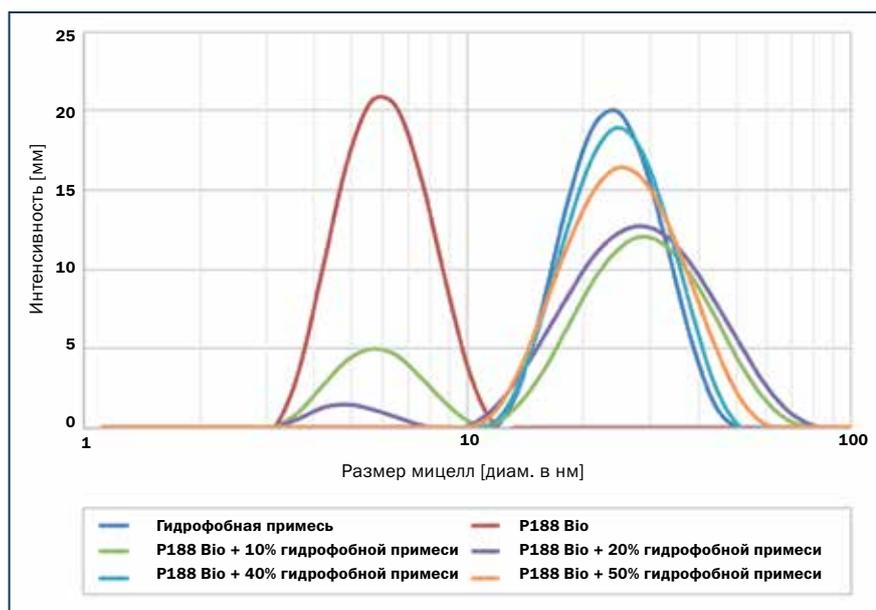


Рис. 9. Определение размеров мицелл полксамера 188 с помощью фотонной корреляционной спектроскопии как при наличии различных высоких концентраций гидрофобных примесей, так и при их полном отсутствии

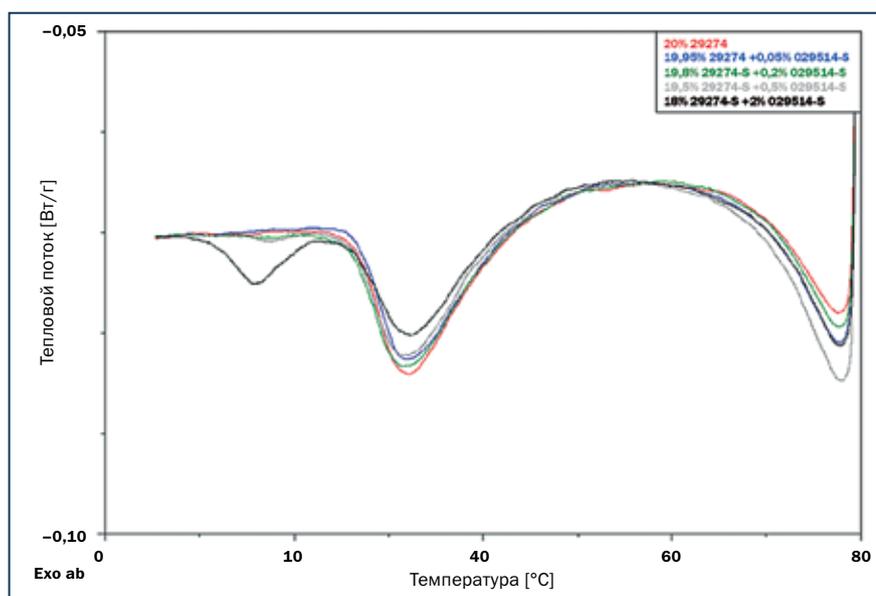


Рис. 10. ДСК-измерения полксамера 188 (красная кривая), содержащего различные концентрации гидрофобной примеси: 0,05% (синяя), 0,2% (серая) и 2% (черная). Лишь высокие концентрации (2% масса/масса) вызывают поддающиеся обнаружению нарушения коллоидного поведения

механизма могло быть вмешательство гидрофобных структур в поведение и стабилизирующее действие полксамера 188. Однако результаты тестирования подтверждают, что гидрофобные

структуры не оказывают прямого воздействия на коллоидное поведение полксамера 188, а, скорее, образуют обособленный конкурирующий комплекс. Это также свидетельствует о том, что собствен-

но механизм взаимодействия с клетками состоит во вмешательстве посредством «модели замещения», заключающейся в предпочтительном взаимодействии гидрофобных структур с поверхностями раздела между жидкой средой и воздухом (рис. 6 и 7) и жидкой средой и клеткой (рис. 8 и 9). В результате псевдопокрытие из полксамера 188 вокруг клеток млекопитающих замещается примесями, что приводит к снижению защиты от сдвиговых напряжений (рис. 1).

Для изучения эффектов полксамеров в растворах был также проведен термический анализ с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Например, при высоких концентрациях полксамеров (10 – 20% масса/масса) наблюдается реверсивное гелеобразование, что подтверждает наличие ряда фазовых переходов при ДСК-анализе. При повышении температуры чистого раствора наблюдается образование упорядоченной мицеллярной системы, сопровождающееся потреблением энергии; затем происходит гелеобразование, которому соответствует небольшой и часто незаметный пик. Для углубления понимания указанного поведения результаты ДСК-измерений при скорости нагрева 5 К/мин [10] приведены на рис. 10.

При достижении температуры выше 35 °C потребление энергии вызвано образованием упорядоченной мицеллярной системы [10]. Вскоре после этого при температуре приблизительно 40 °C полксамер 188 образует гель путем незначительного перехода с минимальной, практически незаметной затратой энергии. По данным диаграммы видно, что наличие гидрофобных примесей не нарушает гелеобразующее поведение и, кроме того, наблюдается появление второго пика в результате образования дополнительных мицеллярных структур (как показано на предыдущих диаграммах). На основа-

нии этого можно сделать вывод о том, что гидрофобные примеси действуют как самостоятельные структуры в среде клеточной культуры. Таким образом, нарушение механизма защиты от сдвиговых напряжений возникает в результате более высокого сходства гидрофобных примесей к поверхности раздела между жидкой средой и воздухом и между жидкой средой и клетками, что делает клетки более уязвимыми к местным высоким сдвиговым напряжениям и последующему лизису.

Заключение

- Следовые количества гидрофобных примесей в составе полоксамера 188 могут оказывать значительное негативное

влияние на его защитное воздействие от сдвиговых напряжений в биотехнологическом производстве – применение Kolliphor® P188 Bio позволяет избежать указанного риска.

- Статическое поверхностное натяжение раствора полоксамера 188 зависит от наличия гидрофобных примесей. На данное явление влияет как концентрация полоксамера, так и отношение количества примесей к содержанию полоксамера 188.
- Гидрофобные примеси не приводят к образованию смешанных мицелл; наоборот, они действуют независимо, образуя собственные самоагрегирующиеся структуры, что доказано

данными анализов ДСК и гелеобразования.

- Как свидетельствуют приведенные в данном исследовании результаты, причиной низкой эффективности типа полоксамера 188, неприемлемого для клеточных культур, является предпочтительная адсорбция гидрофобных примесей на границах раздела между жидкой средой и воздухом и между жидкой средой и клетками с последующим нарушением структуры псевдопокрытия и механизма защиты полоксамера 188 от сдвиговых напряжений.
- В качестве гидрофобных примесей могут выступать любые ПАВ, способные адсорбироваться на поверхности раздела фаз (клетки жидкой среды и/или жидкой среды-воздуха) более успешно, чем полоксамер 188. Гидрофобные примеси не взаимодействуют и не влияют на специфические физико-химические свойства полоксамера 188. ▣

Список литературы:

1. Rowe R., Sheskey P. J., Quinn M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th edition.
2. Chalmers J. J. et al. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2015, 10, 94 –102.
3. Guth F., Staal B., Jackson T. *Kolliphor® P188 Bio: A new era in shear protection*.
4. Guth F. et al. *Development of an improved poloxamer 188 to minimize risk in biologic manufacturing*, BPI Europe Conference 2017.
5. Murhammer D. W. et al. *Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection*. *Biotechnology Progress*, 1990, 6, 391 –397.
6. Wu J. *Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives*. *Journal of Biotechnology*, 1995, 43, 81 –94.
7. Sech T. et al. *Оценка условий хранения и процедуры обработки полиоксил касторового масла в качестве источника потенциальных критичных свойств материала, относящихся к аспектам качества через разработку (Quality by Design)*, APV Conference 2018.
8. Reintjes T. *Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers – Solubilizer Compendium*, October 2011.
9. Chang D. et al. *Investigation of interfacial properties of pure and mixed poloxamers for surfactant-mediated shear protection of mammalian cells*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 156 (2017) 358 –365.
10. Artzner et al. *Interactions between poloxamers in aqueous solutions: micellization and gelation studied by differential scanning calorimetry, small angle x-ray scattering and rheology*, *Langmuir* 23 (2007) 5085 –5092.



По вопросам сотрудничества или технологической поддержки в России и СНГ просим обращаться по телефону:

+7 (495) 231–72–00,
pharma-solutions-rus@basf.com



По вопросам сотрудничества в Украине просим обращаться к ООО ТК «АВРОРА»:

Украина, 04112, г. Киев,
 ул. Дегтяревская, 62
 Тел./факс: +380 (44) 594–87–77
info@tc-aurora.com

