

ОЦІНКА КРИТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ У БІОТЕХНОЛОГІЇ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ

С.М. Семенюк, В.Ю. Шибецький*, В.М. Поводзинський, С.І. Костик

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: v.shybetsky@gmail.com

Received 13 February 2018; Accepted 5 March 2018

Проблематика. Виробництво лікарських засобів визначеної якості, ефективності та безпечності ніколи не втрачало своєї актуальності. Сучасні системи забезпечення та керування якістю – належна виробнича практика – враховують існування критичних стадій та критичних параметрів процесу. Виробництво біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації відноситься до критичних стадій і потребує адекватних методик валідації процесів культивування в оригінальних ферментерах і ферментерах, у які внесені конструкційні зміни.

Мета. Метою дослідження є апробація методик оцінки гідродинамічної обстановки у ферментері з класичним перемішувальним пристроєм і специфічним перемішувальним пристроєм V-blade на модельних середовищах та різних імітаційних об'єктах, а також визначення залежності змін гідродинамічних характеристик від основних критичних параметрів процесу.

Методика реалізації. Гідродинамічна обстановка у ферментері характеризується специфічними параметрами потоків наявних фаз. Для визначення специфіки руху потоків запропоновано методи візуалізації та метод вирівнювання концентрації трасера – час гомогенізації.

Результати. Методами візуалізації, що проведені при швидкісній зйомці, було виявлено специфічні особливості потоків для різних перемішувальних пристроїв. Більш адекватним і зручним для оцінки гідродинамічної обстановки у ферментері при зміні факторів зовнішнього оточення виявився метод введення хімічного трасера й оцінки часу гомогенізації за зміною рН.

Висновки. Доведено можливість використання простої та легко відтворюваної методики для валідації ферментаційного обладнання при оцінці критичних стадій виробництва біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації. Показана висока ефективність мішалки V-blade порівняно з типовою конструкцією.

Ключові слова: біотехнологія; належна виробнича практика; критична виробнича стадія; ферментер; гідродинаміка; мішалка V-blade.

Вступ

Виробництво лікарських засобів, що повинні мати відповідну якість, безпечність та ефективність, сучасними прийомами біотехнології має базуватись на організації виробництва відповідно до вимог належної виробничої практики (НВП) – Good Manufacturing Practice. Як визначено у Настанові СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 “Лікарські засоби. Належна виробнича практика”, НВП є частиною системи забезпечення якості, яка гарантує, що лікарські засоби (ЛЗ) постійно виробляються і контролюються за стандартами якості, які відповідають її призначенню, а також відповідають вимогам реєстраційних документів (реєстраційному досьє) або специфікації на ЛЗ.

Одною зі специфічних умов НВП на стадії виробництва є те, що повинні бути виконані вимоги на етапі організації технологічного проце-

су, і це означає, що всі виробничі процеси мають бути чітко визначені, а критичні стадії виробничого процесу повинні пройти валідацію.

У цьому випадку *критична виробнича стадія* технологічного процесу є вимогою до випробувань, які слід підтримувати в межах заздалегідь встановлених критеріїв для забезпечення відповідності активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) своїм специфікаціям – НВП. Під *критичними виробничими стадіями* розуміють процеси, що мають значний вплив на кінцевий результат, тобто якість, безпеку та ефективність кінцевого продукту.

Але, на жаль, НВП (GMP) не містить методу визначення того, який процес є критичним.

Означені стадії виробництва представлені у Реєстраційному досьє – Модуль 3. Якість. Хімічна, фармацевтична та біологічна інформація про лікарські засоби, що містять хімічні та/або біологічні діючі речовини. Розділ. 3.2.Р.3.4. Контроль критичних стадій і проміжної продукції.

НВП вимагає того, щоб критичні виробничі стадії підлягали обов'язковому контролю стосовно *критичних параметрів процесу*, і до них відносять ті параметри моніторингу та контролю, зміна яких може вплинути на критичний показник, що характеризує якість АФІ.

Конкретика контролю виробництва полягає в тому, що в Реєстраційному досьє в розділі 3.2.S.2.2 “Опис виробничого процесу та його контролю” потрібно наводити критичні показники якості (Critical Quality Attribute – CQA), які своєю чергою є контрольованими і до яких належать фізичні, хімічні, біологічні чи мікробіологічні властивості або характеристики, що для забезпечення необхідної якості продукції мають знаходитися у відповідних межах і відповідному діапазоні.

У сучасному реєстрі лікарських засобів значне місце посідають імунобіологічні препарати, які відповідно до НВП відносяться до *біологічних лікарських препаратів*, якими вважаються ті, у яких діюча речовина (АФІ) є біологічною речовиною. Своєю чергою біологічною речовиною є та речовина, що виробляється біологічним джерелом або екстрагується з нього.

Згідно з Настановою СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 “Лікарські засоби. Належна виробнича практика” до біологічних лікарських препаратів відносять імунологічні лікарські препарати (вакцини, токсини, сироватки або препарати алергенів) і препарати, що отримані біотехнологічними прийомами:

- технологією рекомбінантної ДНК;
- при контрольованій експресії генів, що кодують біологічно активні білки у прокариотів та еукаріотів, у т.ч. трансформовані клітини ссавців;
- методи гібридоми і моноклональних антитіл.

Відповідно до вимог НВП виробництво біологічних АФІ для людини реалізується культивуванням клітин та ферментацією і, в загальному випадку, проводиться при використанні біологічних агентів (БА), якими є клітини та природні або рекомбінантні мікроорганізми.

Існують суттєві відмінності у критичних параметрах процесу виробництва біологічних АФІ і АФІ із синтетичної сировини. На відміну від АФІ, синтезованих у хімічному процесі, за участі синтетичної сировини, АФІ біологічного походження, що отримані “за допомогою культивування клітин або ферментації з використанням природних або рекомбінантних мікроорганізмів”, знаходяться в зоні впливу значної кількості факторів зовнішнього оточення.

Для адекватного розуміння, які фактори визначають зовнішнє оточення, і аналізу можливості впливу на результати культивування їх можна згрупувати у такі блоки:

1. Фактори на етапі проведення підготовчих робіт технологічного та санітарно-гігієнічного призначення:

- проведення мийки і робіт з дезінфекції та стерилізації (стерилізація гострою паром, підготовка та стерилізація газів у повітряних фільтрах тонкого очищення тощо);
- перевірка і технічне забезпечення асептики (герметизація обладнання, герметизація відкритих трубних закінчень, монтаж парових затворів, використання багатоходових вентилів, використання мембранних вентилів і паровідвідників, використання галоїдних течешукачів тощо).

2. Фактори на етапі виробничого культивування:

- фізичні чинники (інтенсивність гідравлічних/гідродинамічних процесів, процеси масо- і теплообміну);
- хімічні чинники (зміна складу живильного середовища – сорбція/метаболізм поживних речовин і утворення метаболітів, що призводить до зміни концентрації взаємодіючих фаз, тощо);
- біологічні чинники (можлива зміна фенотипічних ознак БА, можливість контамінації, зміна конфірмаційної структури АФІ тощо);
- технологічні чинники (відбір проб, підживлення, титрування, регулювання рівня піни, підведення і відведення газової фази).

У Наставі 42-3.5:2016 “Лікарські засоби. Валідація процесів” *валідація процесу (Process Validation)* визначається як “документоване підтвердження того, що процес, який відбувається в межах встановлених параметрів, може здійснюватися ефективно та з відтворюваними результатами і призводить до отримання лікарського препарату, що відповідає заздалегідь встановленим специфікаціям і показникам якості”.

Валідація заснована на проведенні випробувань у реальних виробничих умовах з необхідним числом повторень для забезпечення достовірності отриманих результатів. Тому вона є найбільш складним і дорогим процесом, що вимагає значних ресурсів підприємства.

Виявлення критичних процесів виробництва дає змогу саме на них зосередити насамперед людські та фінансові ресурси. Це дає можливість отримати кращі результати за менших витрат.

Наведена аргументація визначає, що стадія культивування/ферментації є критичною стадією зі значною кількістю впливових зовнішніх чинників, і цей факт обумовлює цілий блок супутніх процедур, найбільш суттєвою з яких є валідація технологічних процедур.

Метою нашого дослідження є вирішення проблеми стосовно валідаційних процедур для стадії культивування, що не можуть бути реалізовані в умовах культивування, зважаючи на їх високу вартість, тому оцінка впливовості факторів зовнішнього оточення повинна проводитись на модельних середовищах для оцінки інтенсивності *гідродинамічних* процесів і процесів масопередачі.

Матеріали і методи

Оцінка гідродинамічного режиму роботи ферментера. Специфічною особливістю етапу культивування БА є те, що він реалізується в штучно створених умовах, при цьому в нас є можливість керувати факторами зовнішнього оточення при збереженні стабільності фенотипу БА. Серед таких найбільш популярних факторів зовнішнього впливу можна відзначити зміну гідродинамічних параметрів, які своєю чергою визначають інтенсивність процесів масо- та теплопереносу [1].

Як правило, формування зовнішнього оточення реалізується у біологічних реакторах – ферментерах різних конструкцій [2–4]. Конструювання ферментера/біореактора базується на оптимізації факторів зовнішнього впливу з метою досягнення високої ефективності з напрацювання цільового продукту – АФІ [5, 6].

У роботі була поставлена задача дослідження гідродинамічного становища у ферментері на модельному середовищі як методу валідації інтенсивності перемішування.

Як об'єкт дослідження були вибрані мішалка V-blade [1] і типова шестилопатева турбінна мішалка відкритого типу, що встановлені у ферментер запатентованої конструкції (Пат. Україна № 116783U. Апарат для культивування клітин, опубл. 12.06.2017, Бюл. 11/2017; Пат. Україна № 116784U. Апарат для культивування клітин, опубл. 12.06.2017, Бюл. 11/2017) (рис. 1).

Для створення фізичної моделі мішалки V-blade і типової шестилопатевої турбінної мішалки відкритого типу було проведено математичне моделювання гідродинамічних процесів ферментера ідеального змішування.

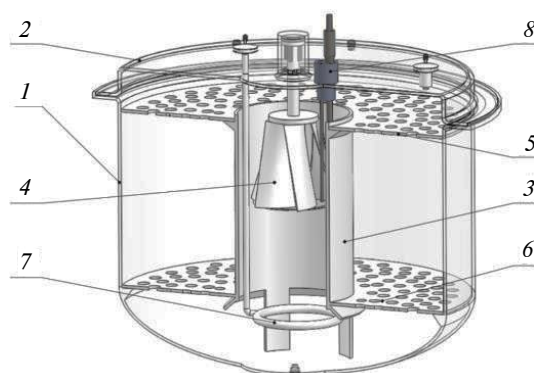


Рисунок 1: Конструкція ферментера/біореактора: 1 – корпус; 2 – кришка; 3 – циркуляційна труба; 4 – перемішувальний пристрій V-blade; 5 – верхня решітка; 6 – нижня решітка; 7 – барботер; 8 – датчики контролю

Моделювання ферментера і перемішувального пристрою. Для моделювання гідродинаміки ферментера використовується k - ϵ модель турбулентності.

Щоб замкнути турбулентність, необхідно визначити зв'язок між напруженнями за Рейнольдсом і параметрами усередненого потоку. Цей зв'язок визначають за допомогою різних моделей турбулентності.

У цих моделях покладають певні припущення, на основі яких вводиться достатня кількість рівнянь, що дає змогу знайти всі невідомі. Одним із таких припущень є введення турбулентної в'язкості, яке вперше здійснив Ж. Буссінеск (1877 р.).

Турбулентну динамічну в'язкість вводять по аналогії з динамічною в'язкістю:

$$-\overline{\rho u_i' u_j'} = \mu_t \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right).$$

Далі перейдемо безпосередньо до отримання стандартної k - ϵ моделі турбулентності з двох рівнянь, яка нарізі розглядається як стандартна модель для опису турбулентності та розв'язання інженерних задач. У цій моделі вводяться два важливих поняття – генерація P і дисипація ϵ . Фізичний сенс генерації турбулентності P полягає в породженні нових вихорів і пульсацій, які й утворюють турбулентність. Дисипація ϵ , навпаки, являє собою розсіювання великих вихорів на менші, призводить до усереднення течії та зменшення турбулентності. Два рівняння переносу дають змогу розглядати турбулентність у просторі й часі. Ця модель є напівемпіричною і спирається на феноменологічний підхід та результати, отримані дослідним шляхом.

Виконавши деякі алгебричні перетворення і помноживши на u_j , рівняння

$$\rho \left(\frac{\partial \overline{u_i}}{\partial t} + \overline{u_i} \frac{\partial \overline{u_i}}{\partial x_j} \right) = \rho \overline{g_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} (\overline{\sigma_{ij}} - \rho \overline{u_i' u_j'})$$

можна звести до такого вигляду:

$$\begin{aligned} \partial_t \overline{u_i' u_j'} + \overline{u_k} \partial_k \overline{u_i' u_j'} = & -\frac{1}{\rho} (\overline{u_j' \partial_i p} + \overline{u_i' \partial_j p}) - \\ & - 2\nu \overline{\partial_k u_i' \partial_k u_j'} - \overline{\partial_k u_k' u_i' u_j'} - \\ & - \overline{u_k' u_j' \partial_k u_i} - \overline{u_j' u_k' \partial_k u_i} + \nu \nabla^2 \overline{u_i' u_j'}. \end{aligned} \quad (1)$$

Позначимо кінетичну енергію турбулентності $k = 0,5 \overline{u_i' u_i'}$ і підставимо в рівняння (1), покладаючи $i = j$:

$$\begin{aligned} \partial_t k + \overline{u_k} \partial_k k = & -\frac{1}{\rho} \partial_i \overline{u_i p} - \overline{\nu \partial_k u_i' \partial_k u_i'} - \\ & - \frac{1}{2} \overline{\partial_k u_k' u_i' u_i'} - \overline{u_i' u_k' \partial_k u_i} + \nu \nabla^2 k. \end{aligned} \quad (2)$$

Другий доданок правої частини (2), за визначенням, є дисипацією:

$$\varepsilon = \overline{\nu \partial_k u_i' \partial_k u_i'}, \quad (3)$$

у той час як четвертий доданок правої частини виразу (2), включаючи мінус, за визначенням – генерація:

$$P = -\overline{u_i' u_k' \partial_k u_i}. \quad (4)$$

Далі робиться допущення, що

$$-\partial_j \left(\frac{1}{2} \overline{u_j' u_i' u_i'} - \frac{1}{\rho} \overline{u_i p} \right) \approx \partial_j (\nu_T \partial_j k). \quad (5)$$

Враховуючи (3)–(5), рівняння (1) можна записати в такому вигляді:

$$\frac{1}{\rho} \partial_t k + \overline{u_j} \partial_j k = P - \varepsilon + \partial_j \left(\left(\nu + \frac{\nu_T}{\sigma_k} \right) \partial_j k \right), \quad (6)$$

що відображає залежність кінетичної енергії k від гідродинамічних параметрів системи. σ_k – параметр, що забезпечує потрібну розмірність для доданка з ν_k . Зазвичай покладається $\sigma_k = 1$. Рівняння для дисипації ε аналітично не виводиться і просто записується по аналогії з (6):

$$\partial_t \varepsilon + \overline{u_j} \partial_j \varepsilon = \frac{C'_{1\varepsilon} P - C'_{2\varepsilon} \varepsilon}{T} + \partial_j \left(\left(\nu + \frac{\nu_T}{\sigma_\varepsilon} \right) \partial_j \varepsilon \right), \quad (7)$$

де $T = k/\varepsilon$ забезпечує потрібну розмірність, а константи $C'_{1\varepsilon}$, $C'_{2\varepsilon}$, σ_ε вводяться, оскільки форма рівняння (7) лише передбачається, а не виводиться аналітично.

На підставі математичного моделювання були отримані параметри мішалки, що була виготовлена як просторова модель. Мішалки V-blade і турбінна 6-лопатева відкрита були надруковані на 3D-принтері (рис. 2). Використовувався друк за технологією пошарового накладання розплавленої полімерної нитки (Fused Deposition Modeling – FDM). Принцип друку полягає в тому, що нитка з поліетилентерефталату (PET) нагрівається до розплавленого стану і пошарово формується задана конструкція шляхом екструзії (PET).

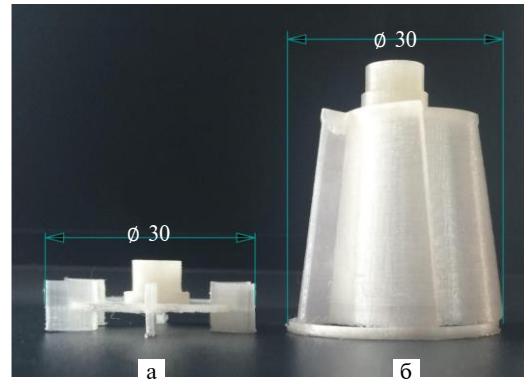


Рисунок 2: Надруковані на 3D-принтері мішалки: (а) турбінна шестилопатева відкрита; (б) V-blade

Дослідження потоків двофазової системи проводились на лабораторній установці (рис. 3).

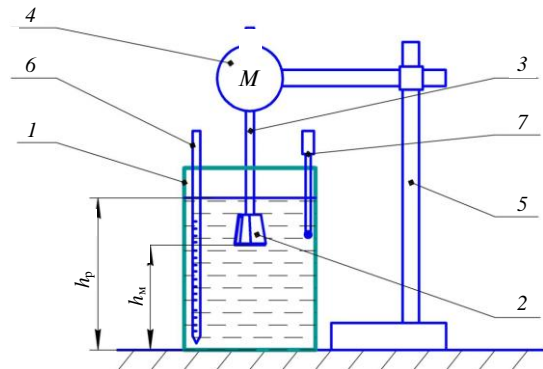


Рисунок 3: Схема експериментальної установки – перемішувального пристрою спеціальної конструкції: 1 – ферментер, 2 – перемішувальний пристрій V-blade, 3 – вал перемішувального пристрою, 4 – електродвигун із регульованою частотою обертання вала, 5 – штатив, 6 – пристрій для вводу трасера, 7 – датчик рН-метра; h_m – висота від дна ємності до мішалки, h_p – висота рідини в ємності

У реактор вводились відмінні від рідини за густиною засоби візуалізації. Як засоби візуалізації було взято контрастні рідини та пластівці полімеру, за густиною близькі до густини біомаси.

Результати

На початку перемішування мішалкою V-blade формуються висхідні потоки з дна ємності, одночасно відбувається відкидання об'ємів рідини по периферії мішалки. При чому чим менші оберти мішалки, тим довше формуються висхідні потоки, але навіть на великій відстані від дна (180 мм) і при малих обертах ($2,03 \text{ c}^{-1}$) спостерігається всмоктування об'ємів рідини в нижній частині та перерозподіл їх у верхній.

На рис. 4 показаний ефект створення вихорів контрастної рідини.

На рис. 5 спостерігається яскраво виражений насосний ефект, який характеризує здатність перемішувального пристрою до інтенсивної гомогенізації вмісту реактора. Цей перемішувальний пристрій забезпечує всмоктування рідини з центральної нижньої частини апарата й перерозподіл їх у верхній частині.

Оцінка часу гомогенізації для різних конструкцій перемішувальних пристроїв проводилася з метою виявлення доступного методу для

валідації ферментерів і порівняльної оцінки двох типів перемішувальних пристроїв.

Гідродинамічні параметри ферментера, такі як розподіл градієнтів швидкості потоків взаємодіючих фаз, насосний ефект мішалки, час циркуляції та час перемішування системи (час гомогенізації), можуть слугувати основою для порівняльної оцінки роботи різних типів реакторів. Тому дослідження (візуальні, якісні, кількісні) мають важливе значення у валідації процесів та обладнання при їх експлуатації.

Час гомогенізації визначається часом, необхідним для досягнення заданого ступеня однорідності з моменту початку перемішування неоднорідного середовища або з моменту подачі в апарат (при працюючій мішалці) компонентів, які відрізняються від наявних у ферментері [7].

Гомогенізація як результат процесу перемішування характеризується зміною поля концентрацій однієї речовини в іншій.

В умовах проведення дослідження був використаний електронний рН-метр, електрод якого знаходився в апріорно визначеній застійній зоні – у “слабкій точці”. Він реєстрував зміни рН за відповідні проміжки часу від початку введення в об'єм робочого середовища рідини кислотного або лужного трасера до сталих значень рН. Цей проміжок часу був нами визначений як час гомогенізації, або час повного змішування.

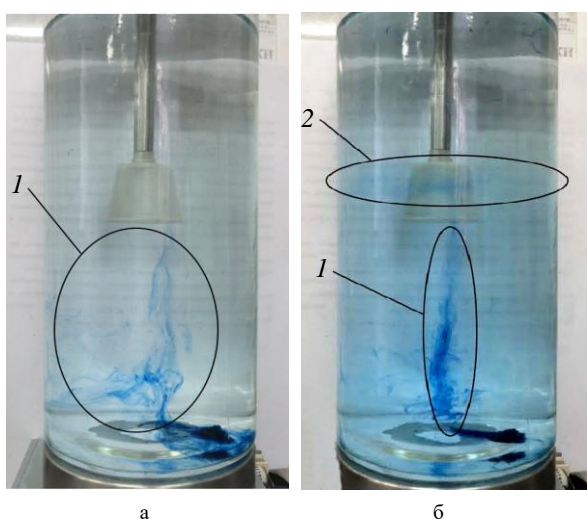


Рисунок 4: Візуалізація потоків, створюваних мішалкою V-blade ($h_m = 120 \text{ мм}$, швидкість обертання – $3,73 \text{ c}^{-1}$): (а) 10 с від початку перемішування: 1 – область формування висхідних потоків; (б) 20 с від початку перемішування: 1 – сформований висхідний потік, 2 – радіальні потоки по периферії мішалки

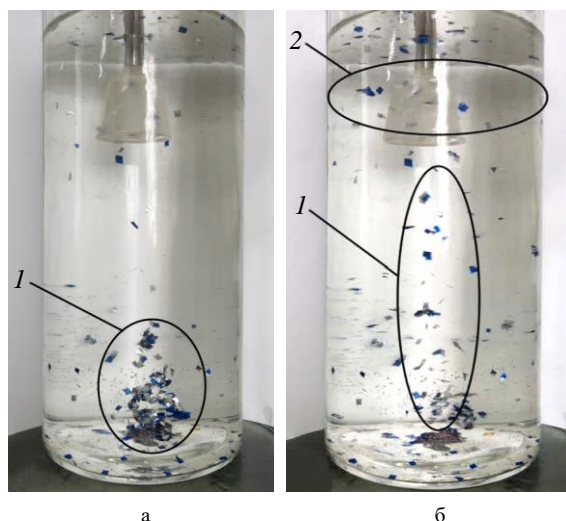


Рисунок 5: Візуалізація потоків, створюваних мішалкою V-blade ($h_m = 180 \text{ мм}$, швидкість обертання – $2,23 \text{ c}^{-1}$): (а) 57 с від початку перемішування: 1 – область формування висхідних потоків; (б) 63 с від початку перемішування: 1 – сформований висхідний потік, 2 – радіальні потоки по периферії мішалки

Обговорення

Результатом проведення дослідження методом оцінки швидкості зміни рН є залежність часу перемішування від висоти розміщення мішалки відносно днища апарата або від відстані відносно перемішувального пристрою. Область з мінімальним часом гомогенізації свідчить про наявність зони з максимальною інтенсивністю перемішування. Методика має низку переваг порівняно з іншими – простота реалізації, точність отриманих даних, безпечність тощо.

У результаті проведених нами досліджень були отримані графічні інтерпретації процесу (рис. 6–8).

Відкрита турбінна мішалка є типовим імперером у ферментерах із введенням енергії механічними перемішувальними пристроями. Порівняння цієї конструкції з іншими новітніми конструкціями є методом коректної оцінки створеної гідродинамічної обстановки у ферментері. При цьому візуалізація потоків рідинної фази є перспективним методом оцінки взаємодіючих фаз у ферментері (див. рис. 4, 5). Ця методика оцінювання процесу перемішування не потребує складного оснащення і дає змогу наочно оцінити гідродинаміку ферментера.

Наведені результати дослідження мішалки V-blade (див. рис. 4, 5) наочно демонструють, що вона забезпечує створення циркуляційного контуру за рахунок всмоктування дисперсної фази з центральної нижньої частини апарата і перерозподіл її у верхній частині. Такий всмоктувальний ефект дає змогу унеможливити формування застійних зон і формування джерела контамінації у ферментері.

Порівняння типового перемішувального пристрою – відкритої турбінної мішалки – та мішалки V-blade за різних швидкостей обертання вала перемішувального пристрою (рис. 6–8) показало, що досліджувана мішалка має низку переваг, а саме: потік в осьовому напрямку більш виражений, ніж у турбінній мішалці, при збереженні радіальної і тангенційної складових; висока всмоктувальна здатність при підйомі твердих частинок з дна ємності. Це дає змогу оцінити її як ефективний засіб для попередження утворення застійних зон у ферментері.

Більша ефективність гомогенізації досягнута за низьких швидкостей обертання мішалки, що є суттєвою перевагою такої конструкції мішалки у виробництві біологічних АФІ при використанні еукаріотичних БА.

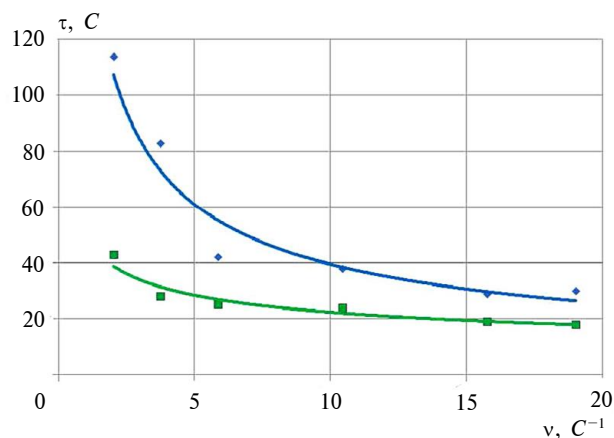


Рисунок 6: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 150 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

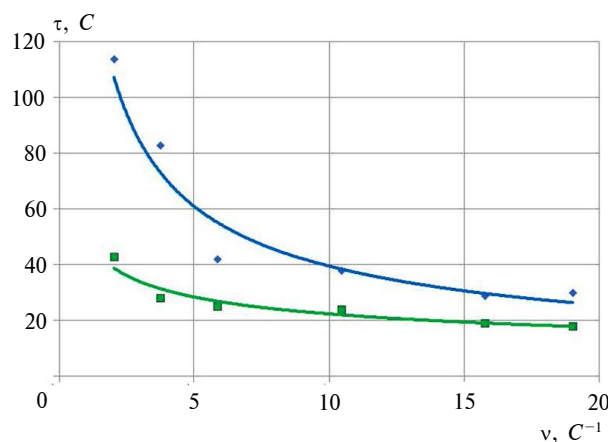


Рисунок 7: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 110 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

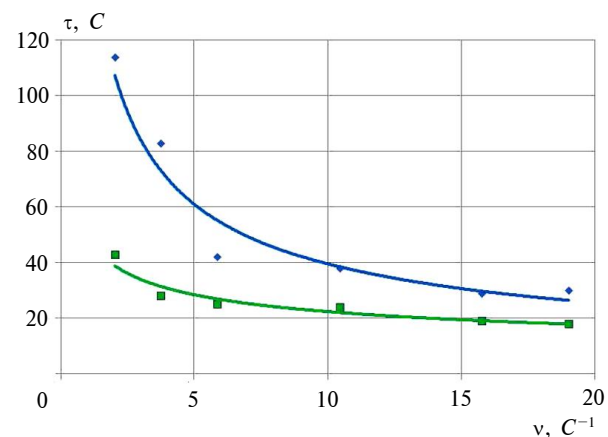


Рисунок 8: Графік залежності часу гомогенізації для мішалок V-blade і турбінної від кількості обертів при h_m 65 мм: \blacklozenge – V-blade, \blacksquare – турбінна

Висновки

Проведення досліджень гідродинаміки та масопередачі на модельних середовищах з метою валідації ферментаційного обладнання для біотехнологічних процесів виробництва АФІ дає змогу отримати надійні результати при оцінці біотехнологій АФІ на стадії культивування в межах критичних параметрів процесу. Доведена можливість використання простої та легко відтворюваної методики для валідації ферментаційного обладнання при оцінці критичних стадій виробництва біологічних лікарських засобів способами культивування клітин або при використанні класичної ферментації.

Показана висока ефективність мішалки V-blade порівняно з відомими типовими конструкціями.

Гідродинамічні параметри ферментера, такі як розподіл градієнтів швидкості потоків взаємодіючих фаз, насосний ефект мішалки, час циркуляції та час перемішування системи (час гомогенізації), можуть слугувати основою для порівняльної оцінки роботи різних типів реакторів. Тому дослідження (візуальні, якісні,

кількісні) мають важливе значення у валідації процесів та обладнання при їх експлуатації.

Цей напрям досліджень і методичні підходи дають змогу ефективно валідувати біотехнології виробництва АФІ біологічних ЛЗ.

Методики візуалізації та оцінки гідродинамічних параметрів процесу з використанням хімічного трасера є досить універсальними і можуть бути використаними як на етапі дослідження, так і у валідаційних процедурах виробничого процесу.

Важливим лімітуючим параметром при культивуванні, як відомо, є напруження зсуву, величина якого пропорційна динамічній в'язкості рідини і швидкості зсуву потоку. Для можливості використання мішалки V-blade необхідно встановити цей параметр, однак експериментально його визначити на разі неможливо. Тому планується проведення комп'ютерного моделювання цього пристрою в середовищі ANSYS, що дасть можливість отримати дані по величині та розподілу швидкостей зсуву потоку залежно від різних режимів роботи перемішувального пристрою та встановити значення напружень зсуву.

References

- [1] Shybetskiy V, Semeniuk S, Kostyk S. Design of construction and hydrodynamic modeling in a roller bioreactor with surface cultivation of cell cultures. *ScienceRise*. 2017;7:53-9. DOI: 10.15587/2313-8416.2017.107176
- [2] Zhao F, Ma T. Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng*. 2005;91(4):482-93. DOI: 10.1002/bit.20532
- [3] Chawla M, Bodnar C, Sen A, Kallos M, Behie L. Production of islet-like structures from neonatal porcine pancreatic tissue in suspension bioreactors. *Biotechnol Prog*. 2006;22(2):561-7. DOI: 10.1021/bp050261i
- [4] van der Velden-de Groot C. Microcarrier technology, present status and perspective. *Cytotechnology*. 1995 Jan;18(1-2):51-6. DOI: 10.1007/bf00744319
- [5] Arora M. Cell culture media: A Review. *Mater Methods*. 2013;3:175. DOI: 10.13070/mm.en.3.175
- [6] Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P. *Cell and tissue reaction engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
- [7] Zakomorny D, Kytovy M, Shybetskiy V, Povodzinsky V, Kostyk S. Hydrodynamics of fermenter with multi-shaft stirrer. *ScienceRise*. 2016;5(2):65. DOI: 10.15587/2313-8416.2016.69451

С.М. Семенюк, В.Ю. Шибецкий, В.М. Поводзинский, С.И. Костик

ОЦЕНКА КРИТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ

Проблематика. Производство лекарственных средств определенного качества, эффективности и безопасности никогда не теряло своей актуальности. Современные системы обеспечения и управления качеством – надлежущая производственная практика – учитывают существование критических стадий и критических параметров процесса. Производство биологических лекарственных средств способами культивирования клеток или при использовании классической ферментации относится к критическим стадиям и нуждается в адекватных методиках валидации процессов культивирования в оригинальных ферментерах и аппаратах, в которые внесены конструкционные изменения.

Цель. Целью исследования является апробация методик оценки гидродинамической обстановки в ферментере с классическим перемешивающим устройством и специфическим перемешивающим устройством V-blade на модельных средах и на различных

имитационных объектах, а также определение зависимости изменения гидродинамических характеристик от основных критических параметров процесса.

Методика реализации. Гидродинамическая обстановка в ферментере характеризуется специфическими параметрами потоков взаимодействующих фаз. Для определения специфики движения потоков предложены методы визуализации и метод выравнивания концентрации трассера – время гомогенизации.

Результаты. Методами визуализации, проведенными при скоростной съемке, были выявлены специфические особенности потоков для различных перемешивающих устройств. Более адекватным и удобным для оценки гидродинамической обстановки в ферментере, при изменении факторов внешнего окружения, оказался метод ввода химического трассера и оценки времени гомогенизации по изменениям pH.

Выводы. Доказана возможность использования простой и легко воспроизводимой методики для валидации ферментационного оборудования при оценке критических стадий производства биологических лекарственных средств способами культивирования клеток или при использовании классической ферментации. Показана высокая эффективность мешалки V-blade по сравнению с обычной конструкцией.

Ключевые слова: биотехнология; надлежущая производственная практика; критическая производственная стадия; ферментер; гидродинамика; мешалка V-blade.

.....
S.M. Semenyuk, V.Yu. Shybetsky, V.M. Povodzinsky, S.I. Kostyk

ASSESSMENT OF CRITICAL PARAMETERS OF THE CULTIVATING PROCESS IN BIOTECHNOLOGY OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

Background. The production of medicines of a certain quality, efficiency, and safety has never lost its relevance. Modern quality assurance and quality management systems – Good manufacturing practice – take into account the existence of critical stages and critical process parameters. The production of biological drugs by cell culture methods or using classical fermentation refers to the critical stages and they need adequate methods of validating the cultivation processes in the original fermenters and equipment to which structural changes have been made.

Objective. The aim of the study is to test the methods for evaluating the hydrodynamic situation in a fermenter with a classic mixer and a specific V-blade mixer, in model environments and on various imitation objects, and to determine the dependence of the change in hydrodynamic characteristics on the main critical parameters of the process.

Methods. The hydrodynamic situation in the fermenter is characterized by specific parameters of the flows of the existing phases. To determine the specificity of the flows, methods of visualization and a method for equalizing the tracer concentration, the homogenization time, are proposed.

Results. The visualization methods carried out during high-speed photography revealed specific flow characteristics for various mixing devices. More adequate and convenient for assessing the hydrodynamic situation in the fermenter, with changing environmental factors, was the introduction of a chemical tracer and an estimate of the homogenization time from the pH changes.

Conclusions. The possibility of using a simple and easily repeatable technique for the validation of fermentation equipment in assessing critical stages in the production of biological medicines by cell culture methods or using classical fermentation has been proved. The high efficiency of the V-blade agitator is shown in comparison with the conventional design.

Keywords: biotechnology; good manufacturing practice; critical production stage; fermenter; hydrodynamics; V-blade mixer.