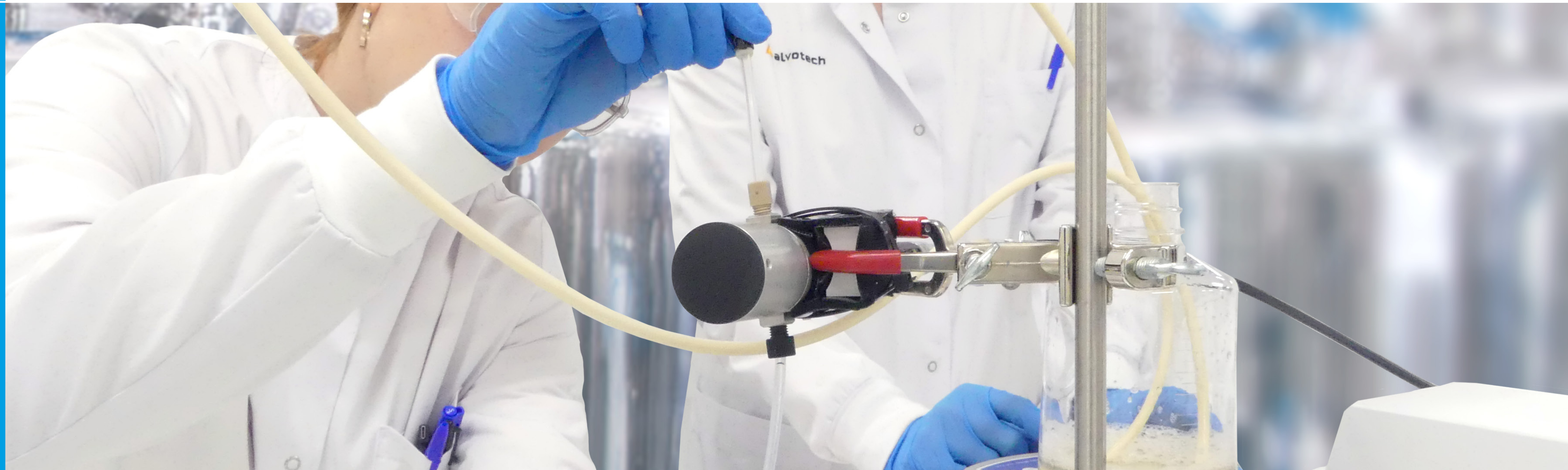


Raman-Messung von Biosimilars in Downstream-Prozessen

Erfolgsstory Alvotech prüft den Proteinreinigungsprozess während der Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF)



Herausforderungen und Ergebnisse

Herausforderungen beim Kunden

Bei Downstream-Prozessen kommt es zu schnellen Änderungen der Zusammensetzung. Für die Prozessentwicklung in der Downstream-Phase wird daher eine Prozessanalysetechnologie (PAT) benötigt, die kleinere Volumina und kürzere Zykluszeiten zulässt. Effizienzsteigerungen für Downstream-Anwendungen ließen jedoch lange auf sich warten. Das lag an mehreren technologischen Herausforderungen, z. B. der Abhängigkeit von extraktiven Analyseverfahren für die Messung der Zusammensetzung, langsamen Reaktionszeiten, unzureichenden Nennbereichen, Hintergrundstörungen und weiteren Faktoren. Durch die Intensivierung der Upstream-Prozesse werden die Reinigungsschritte komplexer und erfordern daher um so mehr innovative Lösungen im Downstream.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Raman-Spektroskopiesysteme von Endress+Hauser verbessern die Downstream-Verarbeitung (DSP) für die Produktion von Biosimilars, denn sie ermöglichen eine präzise Echtzeitüberwachung des Proteinreinigungsprozesses während der Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF). Dies bietet folgende Vorteile:

- **Kosteneinsparungen:** Geringere Kosten für Arbeitskräfte, Pufferlösungen und Offline-Analysen führen zu erheblichen Einsparungen
- **Kürzere Verarbeitungszeit:** Überwachung und Anpassung des UF-/DF-Prozesses in Echtzeit vermeidet Pausen im Prozess und rationalisiert die Betriebsabläufe.
- **Prozessoptimierung:** Sofort verfügbare Analyseergebnisse ermöglichen proaktive Entscheidungsfindung und steigern die Gesamteffizienz.



„Eine der Stärken der Raman-Spektroskopie ist ihre Vielseitigkeit. Bei der Inline-Anwendung in UF-/DF-Prozessen transformiert sie die Abläufe, denn sie ermöglicht es, in Echtzeit Proteinaggregation zu erkennen und Konzentrationsänderungen zu überwachen. Dies verbessert nicht nur die Prozesssteuerung, sondern ist auch ein Game Changer für die Optimierung der Effizienz von Bioprozessen, die Sicherstellung einer erstklassigen Produktqualität und regulatorische Compliance.“

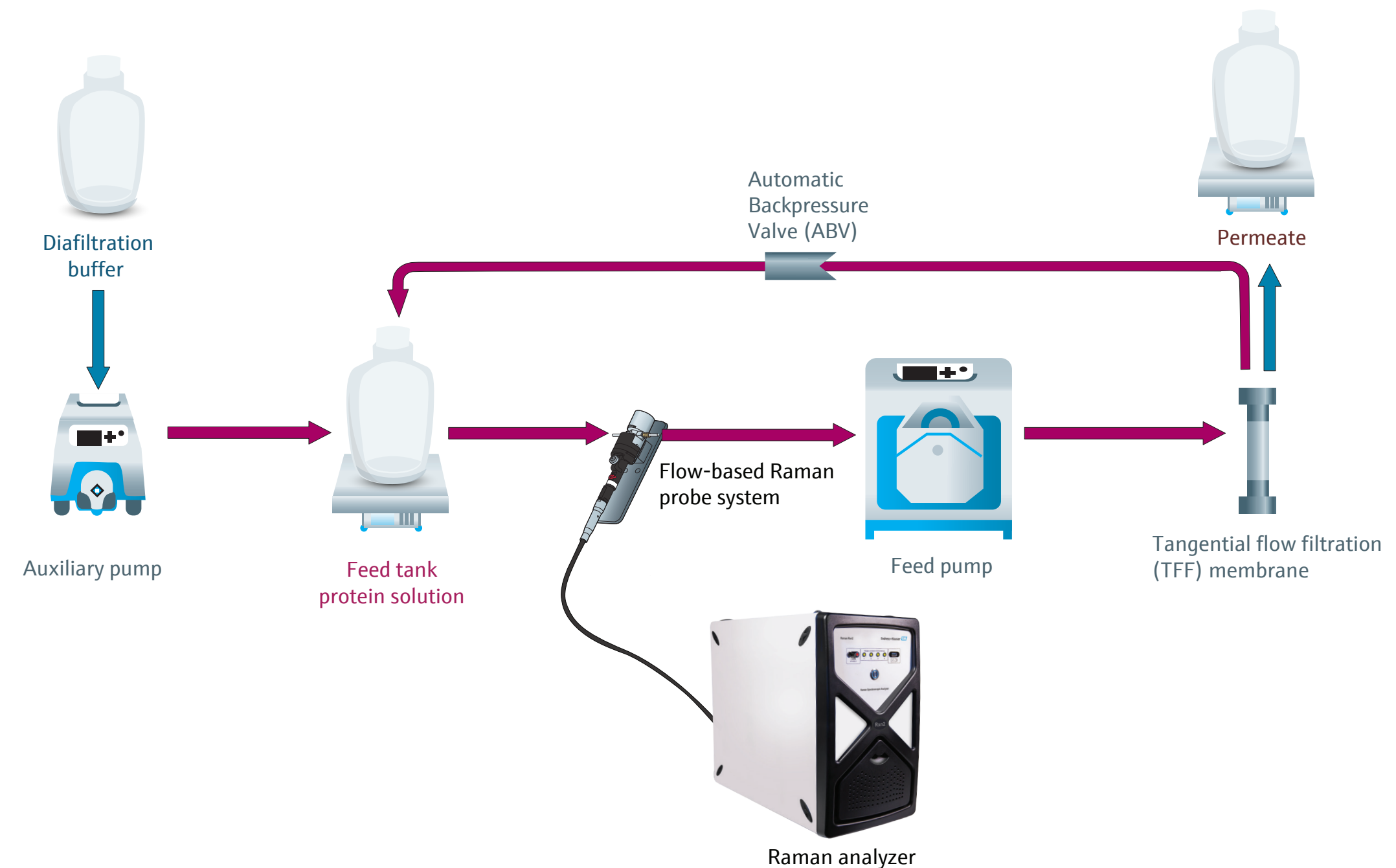
Adrianna Milewska, PhD,
PAT Lead
Alvotech

Kurz erklärt: UF/DF-Prozesse im Downstream

Bei Bioprozessen umfasst die UF/DF-Phase im Downstream üblicherweise folgende Schritte:

1. Im ersten Konzentrationsschritt wird die Proteinlösung mithilfe von Ultrafiltrationsmembranen konzentriert. In dieser Phase werden überschüssige Salze, kleine Moleküle und Wasser entfernt, um eine höher konzentrierte Proteinlösung zu erhalten.
2. Der Diafiltrationspuffer wird kontinuierlich zugegeben, während kleine Moleküle wie Lösungsmittel, Ionen und Wasser durch Ultrafiltration entfernt werden. Ziel dieses Schritts ist es, den Prozesspuffer gegen einen Puffer der endgültigen Rezeptur auszutauschen und kleine Verunreinigungen wie Ionen auf akzeptable Werte zu reduzieren.
3. Anschließend wird ein zweiter Konzentrationsschritt durchgeführt, um die gewünschte Protein-Endkonzentration zu erreichen. Diese Schritte sind in einen einzigen Prozess (UF/DF) integriert, der den Wirkstoff effektiv konzentriert und den Puffer austauscht, bevor zur Fill-and-Finish-Phase gewechselt wird.

Integration von Raman-Technik in den UF/DF-Prozess



Herkömmliche UF/DF-Systeme sind im Allgemeinen in der Lage, Systemdrücke, Durchflussraten sowie Nährstoff- und Permeatvolumen zu überwachen. Ein UF/DF-System mit integrierter Raman-Sonde könnte jedoch zur Inline-Überwachung der Monomer- und Aggregatwerte sowie der Konzentration von Pufferhilfsstoffen genutzt werden.

- **Anfängliche Konzentrationsphase:** Das Volumen im Nährstoffbehälter nimmt ab, da Wasser, kleine Moleküle und Ionen durch die TFF-Membran (Tangentialflussfiltration) herausgefiltert werden. Das Protein kann die Membran nicht passieren und wird daher im System zurückgehalten.
- **Diafiltrationsphase:** Das Volumen im Nährstoffbehälter wird durch kontinuierliche Zugabe des Diafiltrationspuffers bei gleichzeitigem Herausfiltern des Prozesspuffers auf konstantem Niveau gehalten.
- **Abschließende Konzentrationsphase:** Der Puffer im Nährstoffbehälter ist jetzt vollständig gegen den Diafiltrationspuffer ausgetauscht. Die Proteinlösung kann nun auf den gewünschten Wert konzentriert werden.

Einschränkungen von Downstream- Bioprocessen bei UF/DF

Alvotech wollte Lösungen für mögliche Einschränkungen des Prozesses im Zusammenhang mit TFF-Verfahren (Tangentialflussfiltration) testen, die während der UF/DF auftreten können. Sie betreffen u. a.:

- **Produktqualität und Effektivität:** Aggregationsrisiken, die die Qualität monoklonaler Antikörper beeinträchtigen und dadurch die Pharmakokinetik und therapeutische Wirksamkeit beeinflussen.
- **Patientensicherheit:** Aggregate können Immunreaktionen auslösen; dies unterstreicht die Bedeutung minimaler Mengen im Endprodukt für die Patientensicherheit.
- **Prozesssteuerung und -optimierung:** Die Echtzeitüberwachung von Aggregation bei der TFF ermöglicht es, Probleme rasch zu erkennen, die Prozessbedingungen in Entwicklungsphasen schneller zu optimieren und Anpassungen im Downstream zu minimieren.
- **Produktverlust und Ausbeute:** TFF-Überwachung verhindert Aggregatbildung, verringert Verluste und maximiert die Produktausbeute in Downstream-Prozessen.

- **Konsistente Herstellung:** Die Konsistenz von Charge zu Charge ist entscheidend für Sicherheit und Wirksamkeit von Biopharmazeutika. Nur so ist ein zuverlässiger Herstellungsprozess garantiert.
- **Wirtschaftliche Überlegungen:** Die frühzeitige Erkennung von Aggregationen minimiert die Kosten durch den geringeren Bedarf an zusätzlichen Tests und weniger Wartezeiten.
- **Regulatorische Compliance:** Strenge Richtlinien schreiben eine umfassende Überwachung von Biopharmazeutika für die Zulassung und Vermarktung vor.

Diese Einschränkungen können zu Unsicherheiten bei Messungen im Prozess führen und erfordern häufige manuelle Anpassungen. Diese Anpassungen kosten wertvolle Zeit und Ressourcen und können die Qualität und Wirksamkeit des Produkts beeinträchtigen.



Unsere Lösung

Alvotech hat sich für Endress+Hauser entschieden, um die Inline-Raman-Spektroskopie bei der Prozessentwicklung im Upstream und Downstream zu testen. Das ausgewählte Raman-System ist auf Durchflüsse im Downstream zugeschnitten. Es arbeitet mit Signalverstärkung und rausch- armer Technologie, um schnellere Ergebnisse zu liefern. Es besteht aus folgenden Komponenten:

- Raman-Rxn2-Analysator
- Rxn-10-Sonde
- Raman Flow Assembly

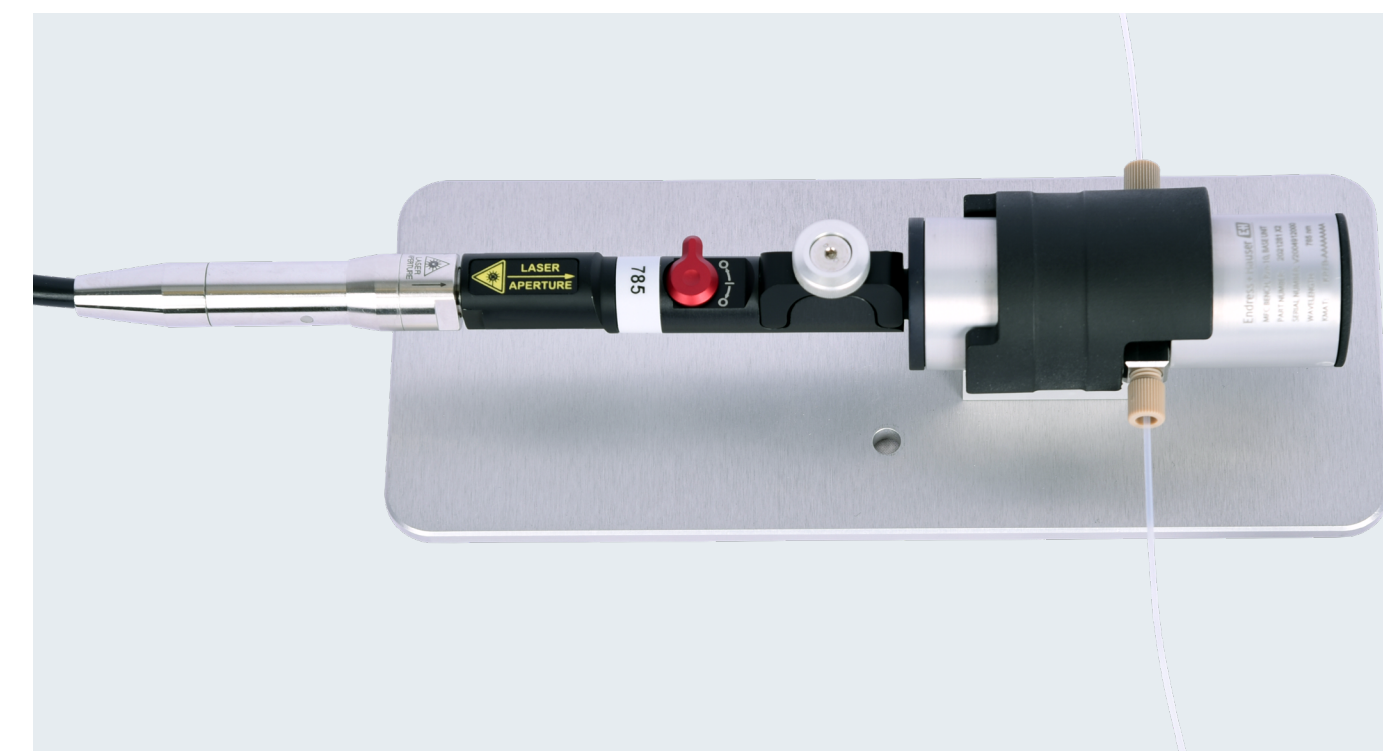
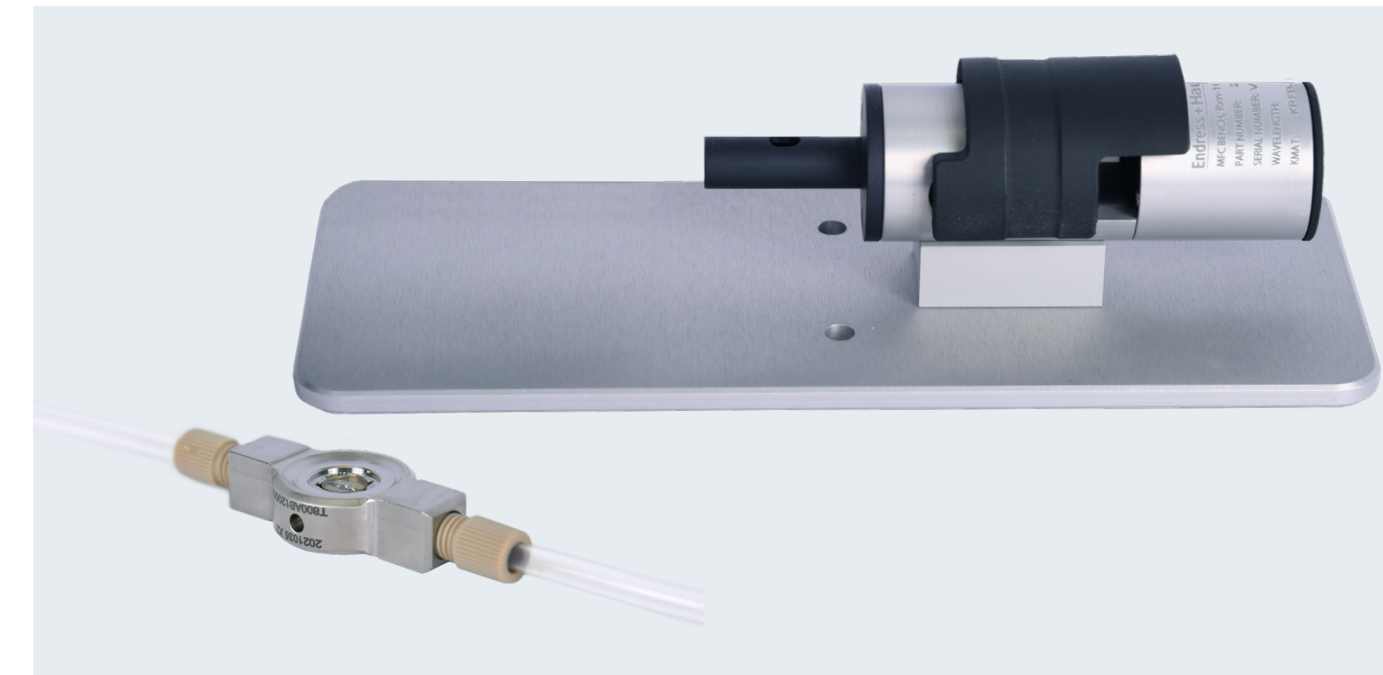
Bei der Raman Flow Assembly handelt es sich um ein Spezialwerkzeug für biopharmazeutische Labore und die Prozessentwicklung in Reinigungs- und Perfusionsräumen. Es bietet das Potenzial für eine Skalierung bis zur cGMP-Herstellung.

Die Raman Flow Assembly umfasst:

- Eine wiederverwendbare Optik (Micro Flow Bench), die mit einer Rxn-10-Sonde verbunden ist. Sie hat keinen Produktkontakt und ist präzise auf bestimmte Flow Cell- und Probenbedingungen abgestimmt.
- Eine Micro Flow Cell mit Schnittstelle zur Micro Flow Bench, in der die Probe fließen kann. Die Micro Flow Cell kann mit zugelassenen Verfahren sterilisiert werden. Sie eignet sich entweder zur Wiederverwendung oder wird nach Gebrauch entsorgt.

Komponenten von Micro Flow Cell und Flow Bench (oben); Raman Flow Assembly, verbunden mit einer Rxn-10-Sonde (unten)

Raman-Rxn2-Analysator



Vorschau der Raman-Daten

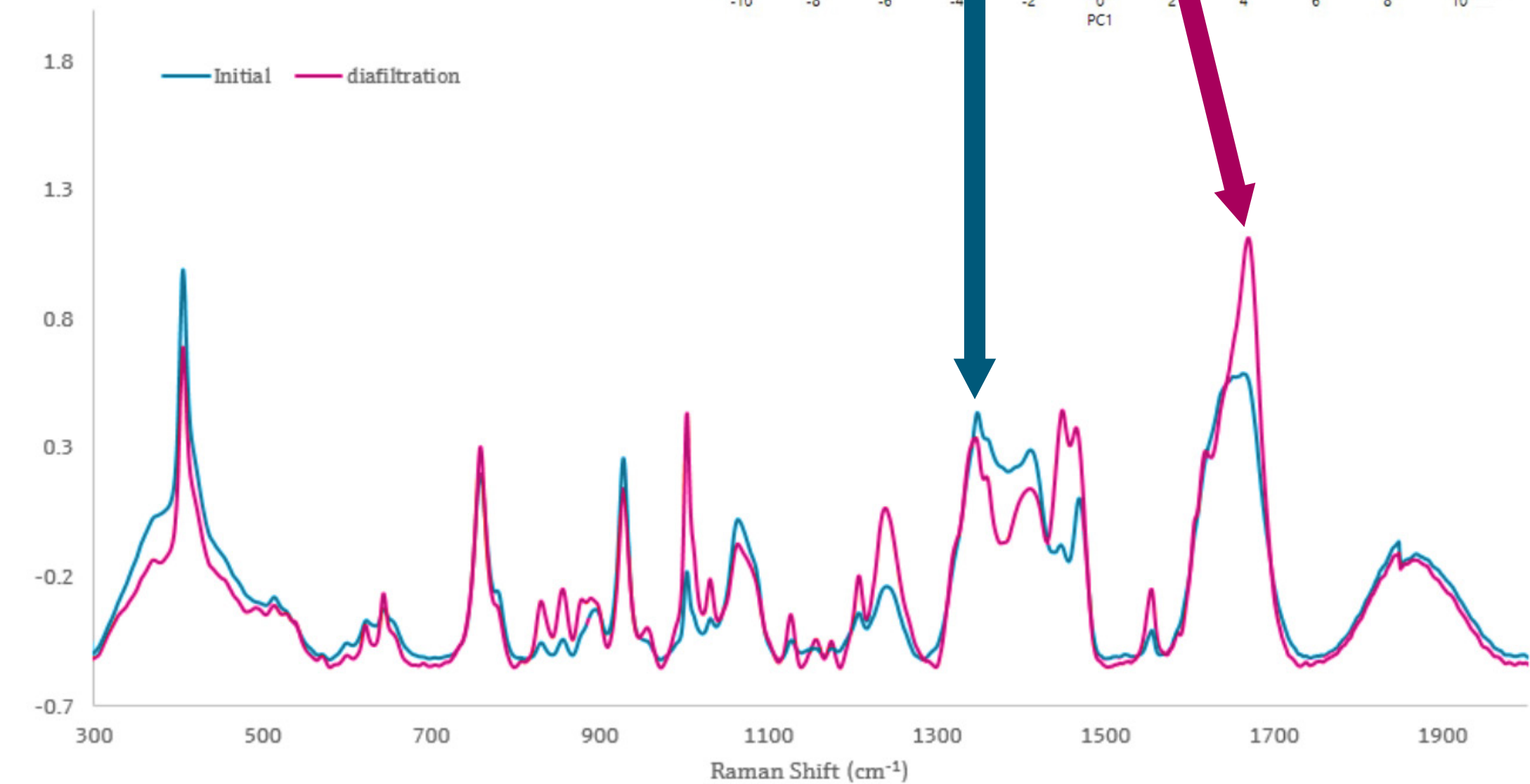
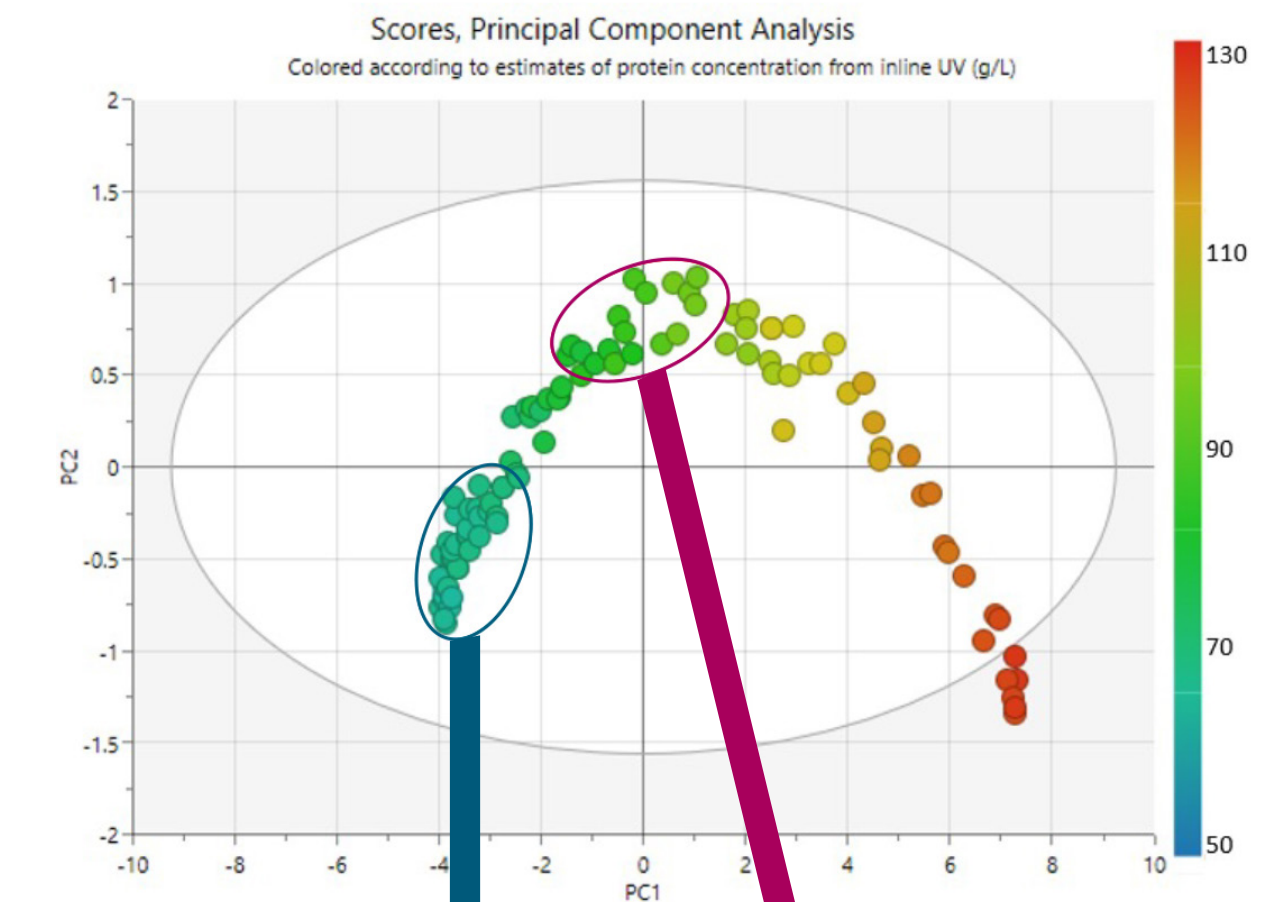
Raman-Inline-Messungen während UF/DF unterstützen die Optimierung und Steigerung der Effizienz in der biopharmazeutischen Produktion.

Mit der Standard-Vorverarbeitung hat die Raman-Spektroskopie gezeigt, dass sie in der Lage ist, den Prozessfortschritt insgesamt zu verfolgen. Dies geschieht anhand von mehreren Markern im gesamten Fingerabdruck und einer starken Abweichung während der Diafiltration.

Um die Beiträge der Proteinaggregation zu bestimmen, ist danach eine weitere Datenanalyse mit chemometrischer Modellierung erforderlich. Nach ihrem Abschluss liefert dieser Analyse ein schnelles Feedback und ermöglicht so ein besseres Prozessverständnis, kürzere Prozesszeiten, schnelle Anpassungen und Kostensenkungen. Zudem wird sichergestellt, dass das Endprodukt strenge Qualitätsstandards erfüllt.

Die Überlagerung der Raman-Spektren in der Diafiltrationsphase zeigt starke, gut aufgelöste Peaks, die mit proteinspezifischen Wechselwirkungen übereinstimmen. Die rechts abgebildete Überlagerung der Spektren wurde aus den Durchschnittsspektren in den eingekreisten Bereichen des oberen Diagramms im Scores-Raum erstellt. Die blauen Spektren stellen Raman-Verschiebungen während der anfänglichen Konzentration und die magentafarbenen Spektren stellen Verschiebungen während der Diafiltration dar.

In einem lokalisierten Cluster im Scores-Raum der Hauptkomponentenanalyse werden Hinweise auf proteinspezifische Konformationsänderungen beobachtet. Dort waren mehrere Proben genommen worden.



Vorteile von Echtzeitmessungen

Mit dem Raman-System von Endress+Hauser verfügt Alvotech über Echtzeitüberwachung, die eine schnelle Prozessoptimierung und präzise Steuerung des Proteinreinigungsprozesses unterstützen.

Durch die direkte Integration einer Raman Flow Cell in UF/DF-Prozesse ist es möglich, Aggregationen zu erkennen und die Proteinkonzentration kontinuierlich zu überwachen.

Der sofortige Zugriff auf Inline-Raman-Daten mit einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis erleichtert die Entwicklung eines prädiktiven Modells auf Basis von Konzentrationsdaten. Diese Daten werden sowohl mit Inline- als auch von At-line-UV-Absorptionsspektrometern sowie mit Offline-Größenausschlusschromatographie (SEC) ermittelt. Diese optimierte Anordnung maximiert die Proteinreinigung und führt zu erheblichen Zeit- und Kosteneinsparungen.

Inline-Rxn-10-Sonde, verbunden mit einer Raman Flow Assembly, bei der Überwachung der Proteinreinigung während der UF/DF

Vorteile

Der Echtzeitzugriff auf genaue Inline-Raman-Prozessmessungen bietet folgende Möglichkeiten und damit verbundene Vorteile:

- **Prädiktive Modellierung:** Entwicklung und Integration von prädiktiven Modellen auf Basis von Inline-Raman-Daten für proaktive Entscheidungsfindung und Prozessanpassungen zur Optimierung der Ergebnisse.
- **Aggregationserkennung:** Inline-Erkennung von Proteinaggregation mithilfe der Raman Flow Cell-Technologie und prädiktiver Modelle, wodurch Risiken frühzeitig erkannt und reduziert werden können.
- **Kürzere Verarbeitungszeit:** Wegfall von Wartezeiten im Zusammenhang mit Offline-Hochleistungs (HP)-SEC-Analysen; dies unterstützt einen kontinuierlichen Betrieb und steigert die Produktivität.
- **Weniger manuelle Eingriffe:** Minimierung der erforderlichen manuellen Anpassungen nach dem Prozess; dies optimiert die Abläufe und verbessert die Genauigkeit der Endkonzentration.
- **Echtzeitüberwachung:** Kontinuierliche Überwachung der Konzentration von Protein und Pufferhilfsstoff.



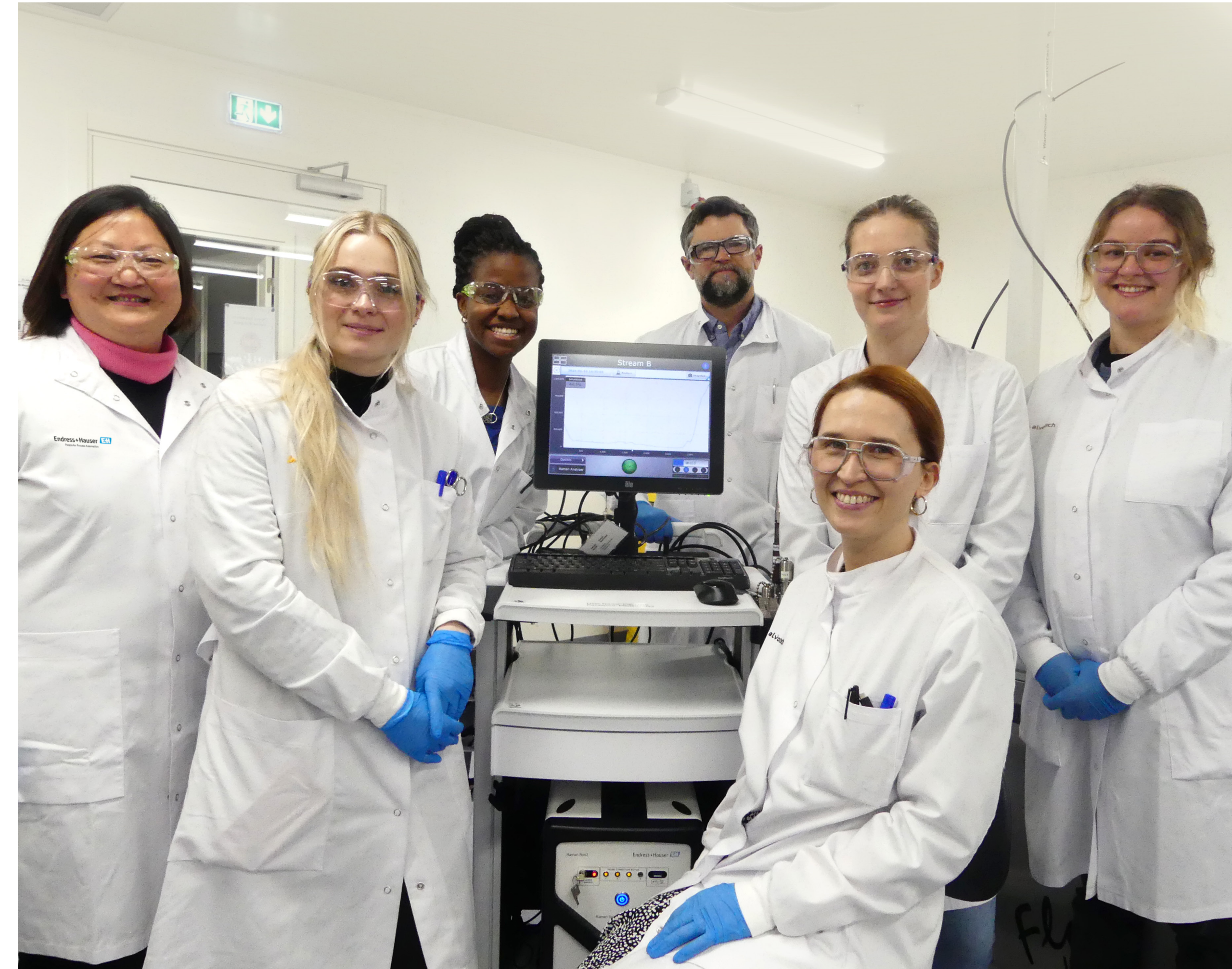
Fazit

In der biopharmazeutischen Industrie bieten die jüngsten Fortschritte in der Raman Flow Cell-Technologie Lösungen für die geforderte Geschwindigkeit von Downstream-Prozessen. Diese Technologie optimiert die Raman-Datensammlung für kleinvolumige Proben mit geringer Trübung. Alvotech hat mithilfe des Raman-Systems von Endress+Hauser wertvolle Erkenntnisse über die Proteinverarbeitung bei UF-/DF gewonnen. Diese verbesserte Überwachung kann die Effizienz von Bioprozessen steigern, Zykluszeiten verkürzen und die Produktqualität für den Produktionsbetrieb des Unternehmens verbessern.



„Downstream-Prozesse werden oft durch lange Wartezeiten auf Offline-Ergebnisse fragmentiert. Das bremst die Zeitpläne in der Entwicklung aus. Die Implementierung der Inline-Raman Flow Cell in die Betriebsabläufe ist ein vielversprechender Ansatz für höhere Effizienz, der die Entwicklungsdynamik im Downstream effektiv verändert.“

Julia Karitas Helgadottir
DSP Scientist
Alvotech



Über Alvotech

Alvotech ist ein integriertes biopharmazeutisches Unternehmen mit Hauptsitz in Reykjavik, Island, das in der Entwicklung und Produktion hochwertiger Biosimilar-Arzneimittel im globalen Maßstab tätig ist. Es hat sich zur Aufgabe gemacht, die Gesundheit und Lebensqualität von Patienten weltweit zu verbessern und den Zugang zu bewährten Behandlungsmethoden für verschiedene Krankheiten zu verbessern.



www.de.endress.com

CS01902C/11/DE/01.24