

Technológia és termék fejlesztés, innováció (BMEVEMBM402)

2. Rész: Process Analytical Technology és Bioanalitika

2016. november



BALLAGI ANDRÁS, PhD.

Tudományos szaktanácsadó
Richter Gedeon NyRT.



Címzetes egyetemi tanár
Gyógyszertechnológiai Modell Laboratórium
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi
Egyetem

Tartalom

- **Mi a Process Analytical Technology - PAT?**
- **A PAT helye a QbD-ben?**
- **A kockázatok és azok minimalizálása**
- **A PAT szerepe a kockázatok csökkentésében**
- **PAT eszközök és alkalmazásuk biotechnológiai rendszerekben**
- **A PAT használata a CPP-k ellenőrzésére és szabályozására**
- **A PAT egyszerűsített használata a PCA használatával**

PAT – Process Analytical Technology

Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Veterinary Medicine (CVM)
Office of Regulatory Affairs (ORA)

Pharmaceutical CGMPs
September 2004

„The Agency considers PAT to be a system for

- designing,
- analyzing, and
- controlling

manufacturing through timely measurements (i.e., during processing) of critical quality and performance attributes of raw and in-process materials and processes, with the goal of ensuring final product quality.”

„A hatóság a PAT rendszert arra szánja, hogy

**megtervezzé,
analizálja,
és szabályozza**

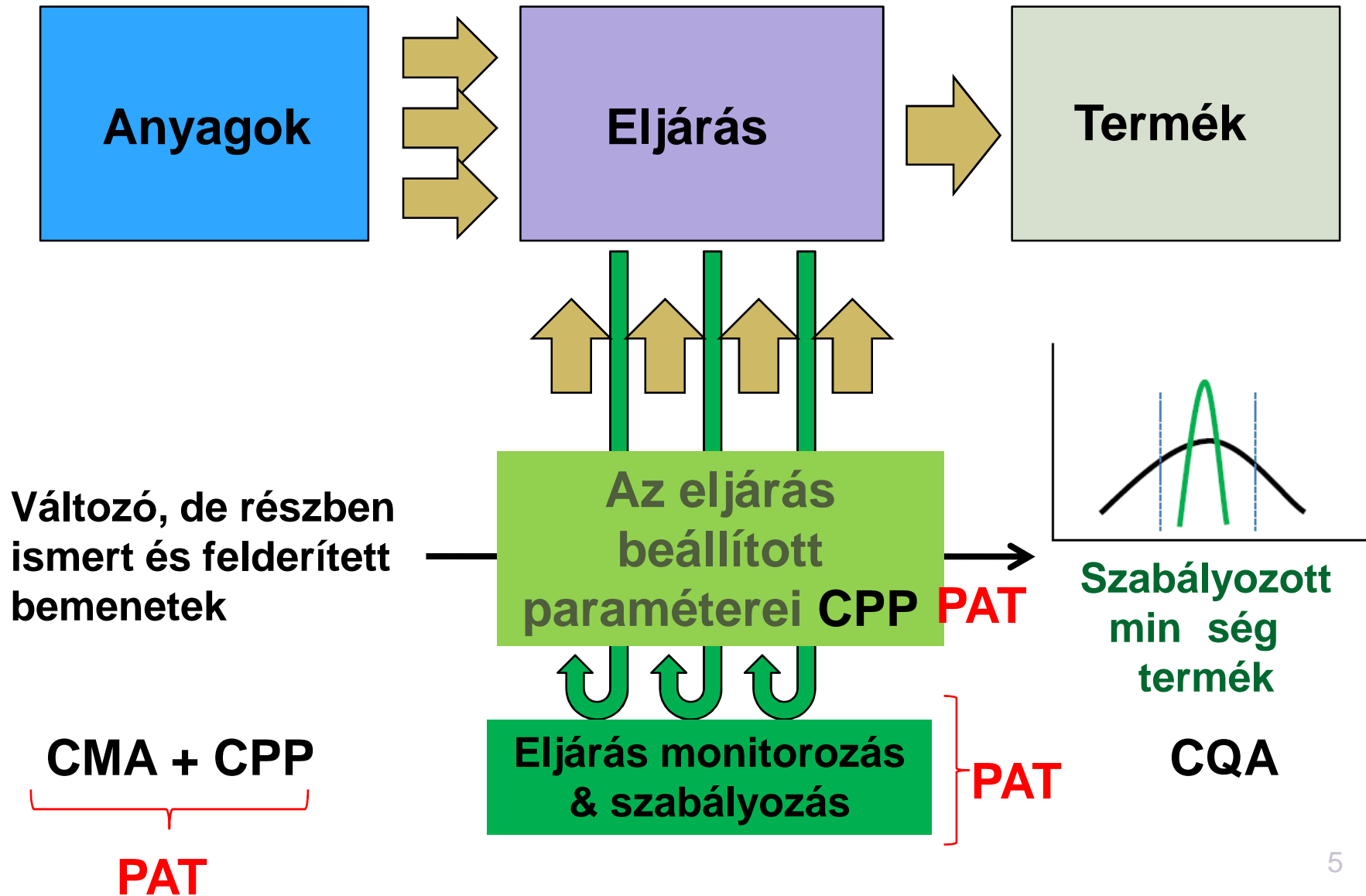
a termelést azonos idej (termelés alatti) mérésekkel , melyek a nyersanyagoknak és az eljárásnak a **kritikus min ségi és teljesítménybeli paramétereire** irányul abból a célból, hogy biztosítsa a **végtermék min ségét.**

Egy másik definíció ...

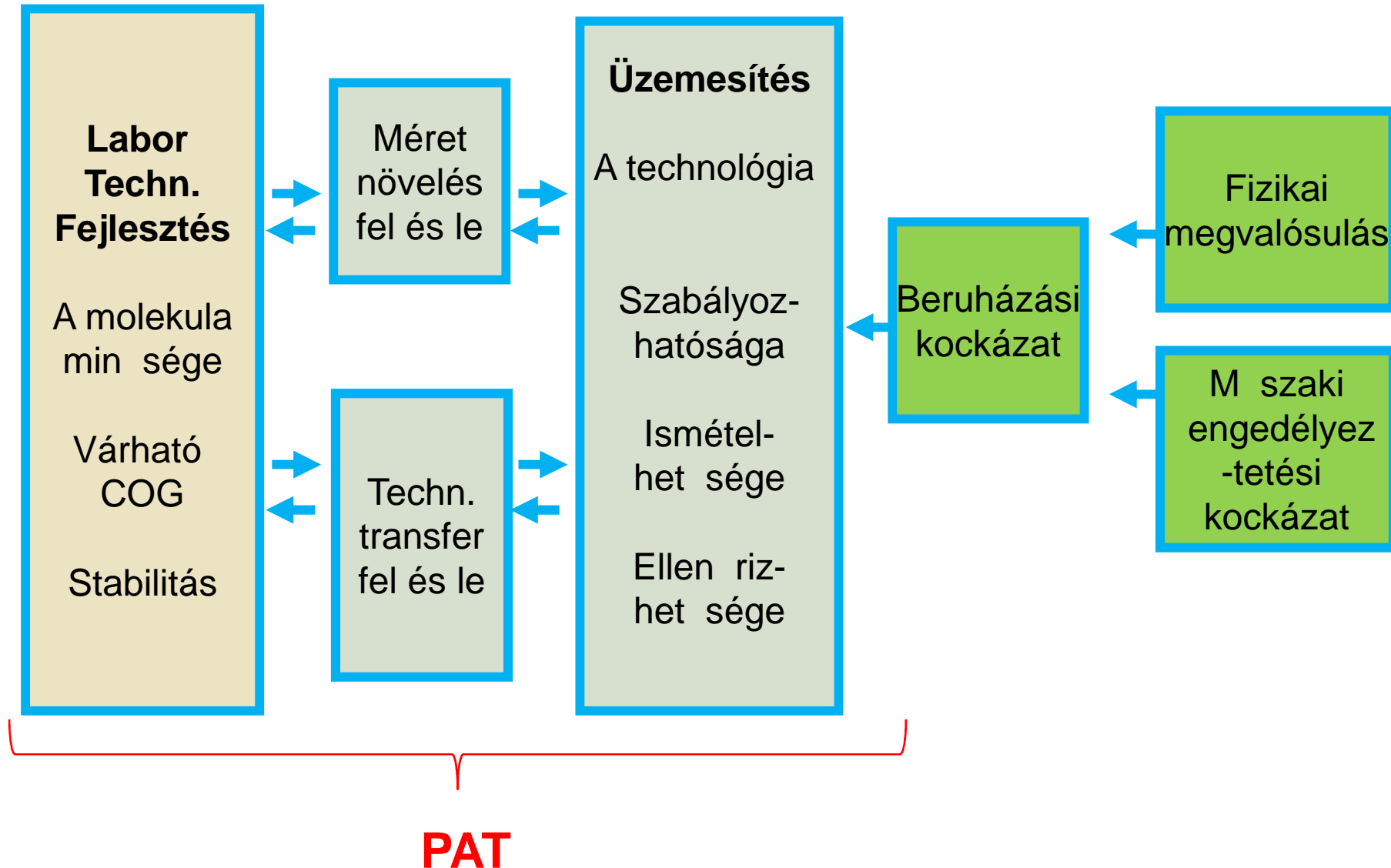
**PAT – a QbD-ben kit zött célok
megvalósításának eszköze!**

**Folyamatelemz és szabályozó technológia,
melynek célja a jól kézben tartott, robusztus,
kis változékonyságot mutató termelési
folyamat megvalósítása.**

A PAT helye a QbD-ben



Technológiai kockázatok amelyekben a PAT segíthet



Példa a Mab technológia léptéknövelhet ségére

20 FRIDAY - SUNDAY, AUGUST 10 - 12, 2007

THE WALL STREET JOURNAL.

MONEY & INVESTING

Genzyme plant hits snag

Drug for rare disease is popular, but U.S. blocks key factory

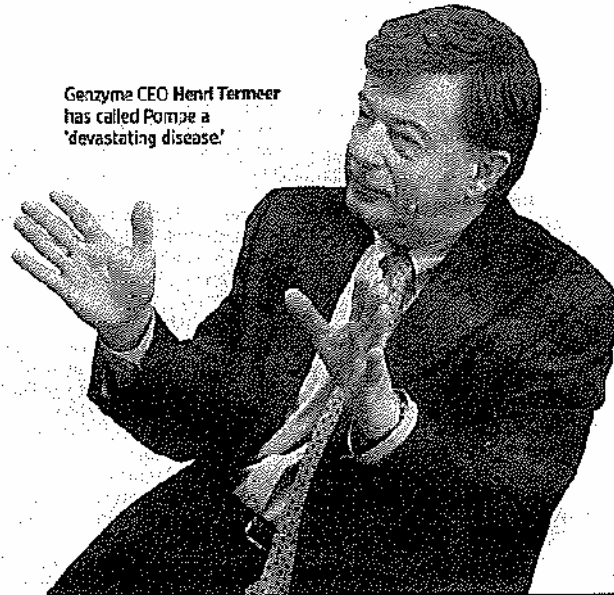
By DAVID ARMSTRONG, AND GEETA ANAND

It usually is good news when a biotechnology company reports strong demand for one of its new and expensive drugs.

But in the case of Genzyme Corp., the rising use of its treatment for Pompe disease, a rare and sometimes fatal enzyme disorder, is creating unexpected problems that is making some investors skittish.

The U.S. company says it can't meet demand for the drug, called Myozyme, because the U.S. Food and Drug Administration has refused to approve a Boston factory where the company is hoping to produce the bulk of the medicine. That means Genzyme isn't allowed to sell the drug from the factory to U.S. patients. FDA an-

Genzyme CEO Henri Termeer has called Pompe a 'devastating disease.'



AP/WIDE

SHARE PRICE

Genzyme Corp. (GENZ)

Midday Thursday: \$61.55

Change closed of 2007: up 10%

Genzyme has offered few details on why the FDA balked at approval. The problem, according to a person familiar with the matter, is that the company can't produce a version of Myozyme at its large Boston plant that is the same as that produced by the much lower-output bioreactors in nearby Framingham, Massachusetts, that were used in clinical trials and have been supplying the U.S.

The FDA requires companies to

The difference in the Myozyme being produced at the two Genzyme facilities concerns the amount of a carbohydrate attachment that is believed to be key to the drug being absorbed by skeletal muscle cells, according to the person familiar with the matter.

Genzyme last month pulled its FDA application to manufacture in

A kockázatok számszerűsítése és kezelése

Klasszikus kockázati paraméterek a kockázat mennyiségi meghatározásához

Paraméter név	Angol név	Definíció
Hatás erősség	Impact, Severity	Mi történik, ha a hatás bekövetkezik?
Elfordulás	Probability	Mi a valószínűsége a hatás bekövetkezésének?
Észlelhetőség	Detectibility	Könnyen lehet mérni a hatást?

Ennek megfelelően a kockázat csökkentésének módszerei

- 1. A kockázat kvantifikálása, számszerűsítése**
- 2. A Pareto elv* szerinti vizsgálata**
- 3. Ellenintézkedések és a kockázat minimalizálása**
Hatás erősség és elfordulás csökkentése **PAT!**
Észlelhetőség maximalizálása **PAT!**

* A **Pareto-elv**, más néven a **80–20 szabály** kimondja, hogy számos jelenség esetén a következmények 80%-a az okok mindössze 20%-ára vezethető vissza.

A PAT segítségével megvalósítható RTF (Right in First Time) célkitűzés elnyei

- Biztosítja a **minőséget**
- Növeli a **beszállítás** megbízhatóságát
- Csökkenti a **költségeket**
- Csökkenti a **beruházást**
- Csökkenti a **ciklusidőt**
- Növeli a **kapacitás kihasználást**
- Átalakítja a szervezet működését az **utólag reagálóból** (reactive) elre **gondoskodóvá** (proactive) a megalapozott **előrejelzések** (prediction) segítségével

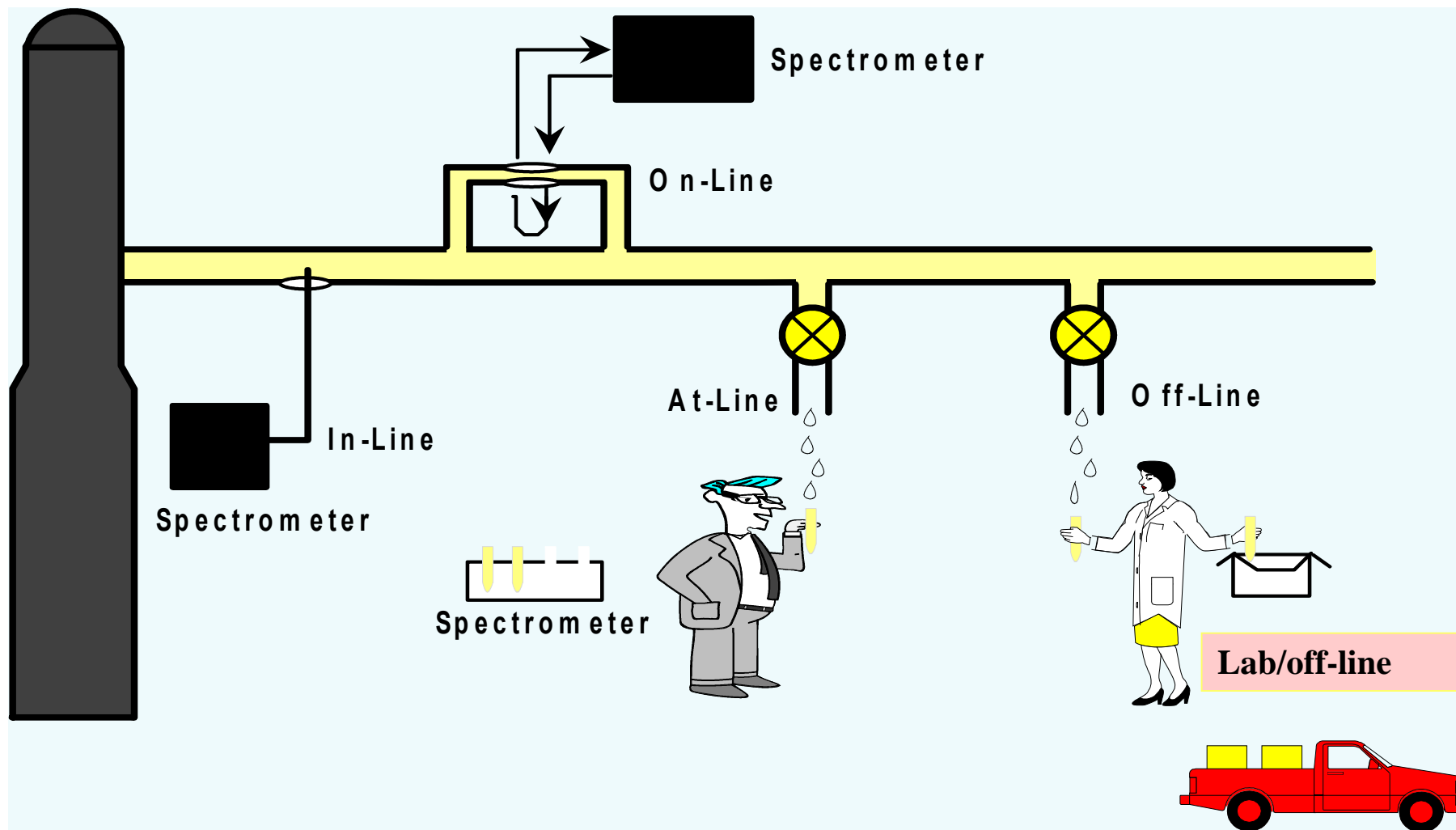
A PAT további előnyei

- Az eljárás **fejlesztése gyorsabb** lehet, mert a tudás az eljárásról mélyül.
- Lehetőseget ad bizonyos **flexibilitásra** a törzskönyvezés után is, amíg a PAT által kezelt paraméterek értékei a Design Space-en belül vannak.
- **Folyamatos validálás**
- A „desired state”- 6 σ folyamat \longrightarrow 6 σ végtermék, minimális végső QC-vel, **kevesebb hatásági ellenőrzés**
- **Termékfelszabadítás** a termelési folyamat megfelelőseége alapján (real-time release, parametric release)

A PAT eszközei (PAT tools)

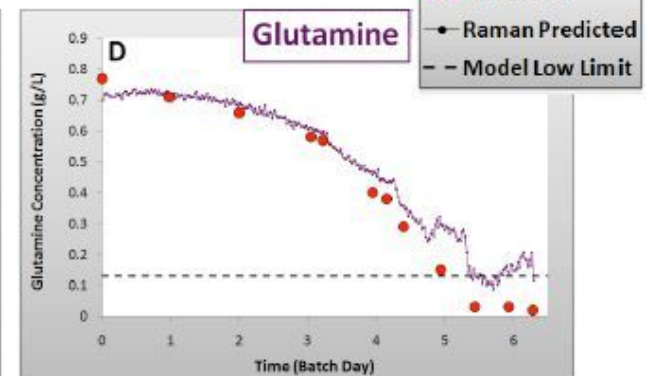
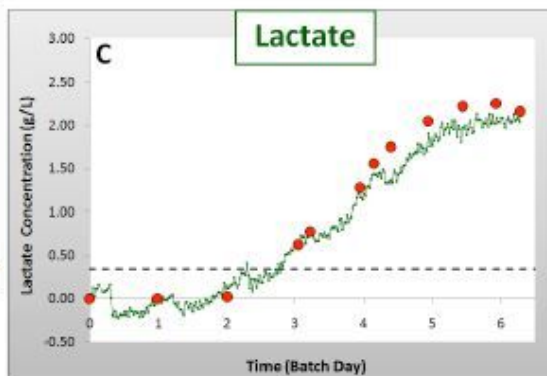
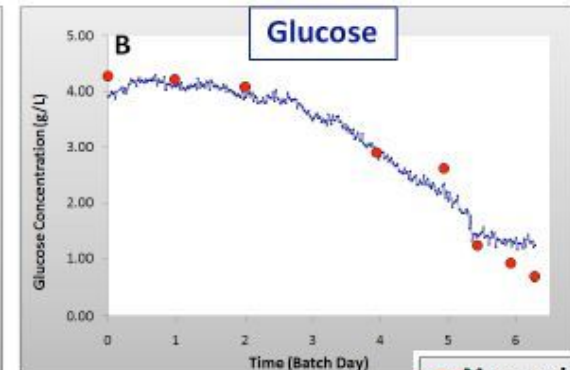
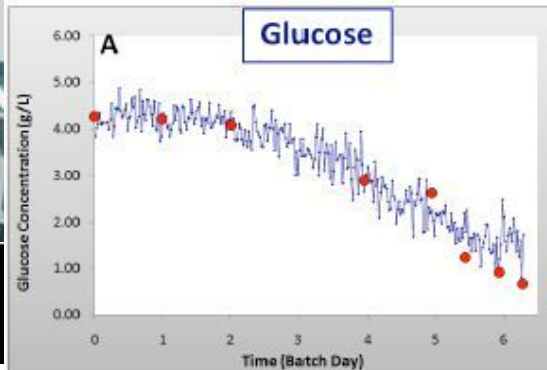
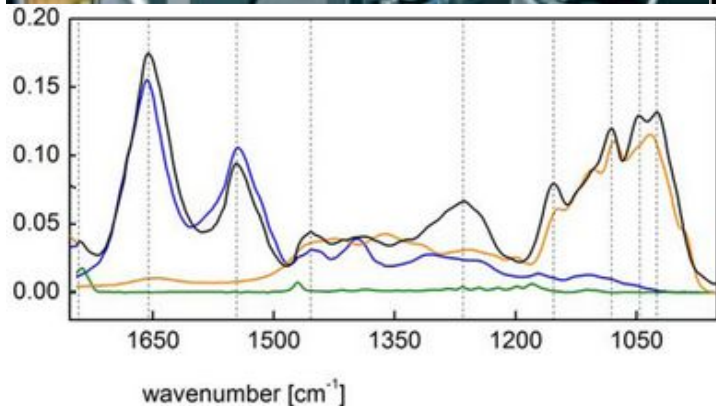
Eszköz kategória	Módszer
Statisztikai és matematikai módszerek	DoE (Design of Experiment) Mintázat felismerés (Pattern recognition) Sokváltozós adatelemzés (MVA), PCA, PLC.
Analitikai eszközök (real time)	NIR, Raman, HPLC, oldott oxigén, CO2, pH, stb.
Szoftver támogatás	Matlab Excel SIMCA
Kontroll technológia	Feedback, feedforward, real-time adaptive, model predictive control

Az eljárások monitorozása (PAT analitikai eszközök)

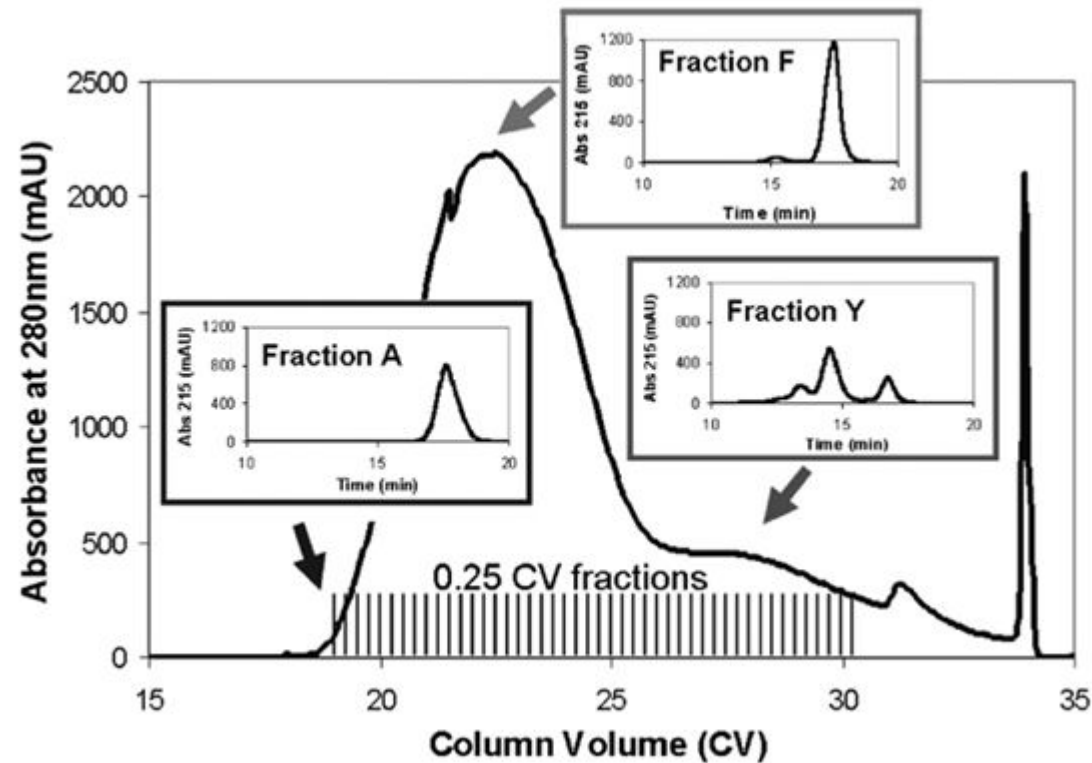


A NIR és a Raman módszer elnyei a upstreamben történő PAT alkalmazásban

- Azonos idej információ (real-time analysis)
- Steril környezet (non-invasive)
- Zártkör szabályzás
- Az eljárás jobb megismerésének lehetősége
- Biztosabb egyenletesebb termék

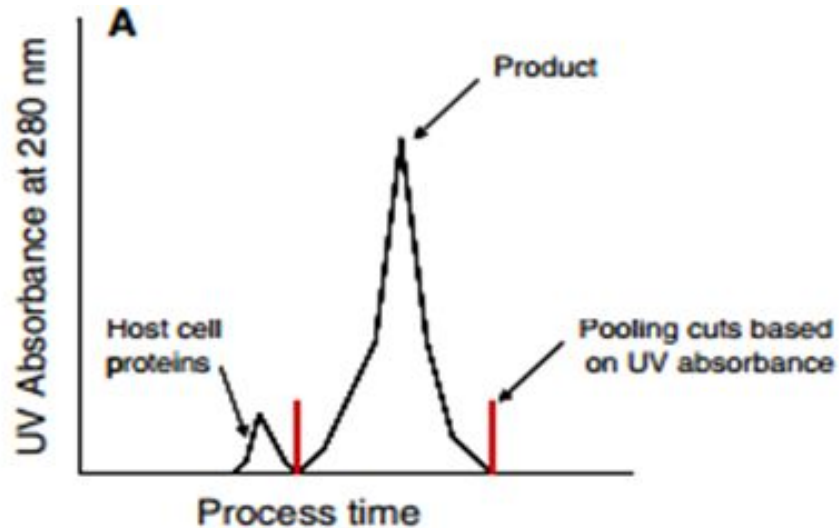


Példa a PAT downstream-ben való alkalmazására

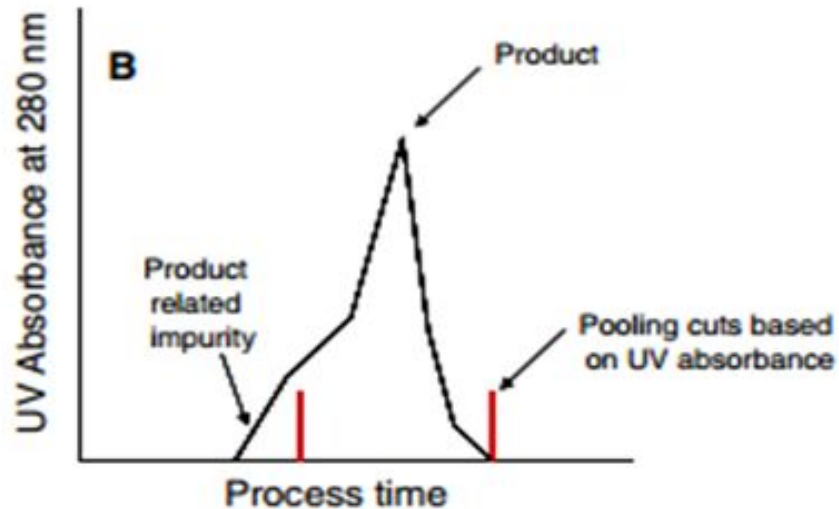


PAT alkalmazása a down-stream folyamatban. A külön szedett frakciókat on-line HPLC készülék analizálja, és az eredmény alapján automatikusan történik a jó frakciók összeöntése

A PAT alkalmazása downstreamben



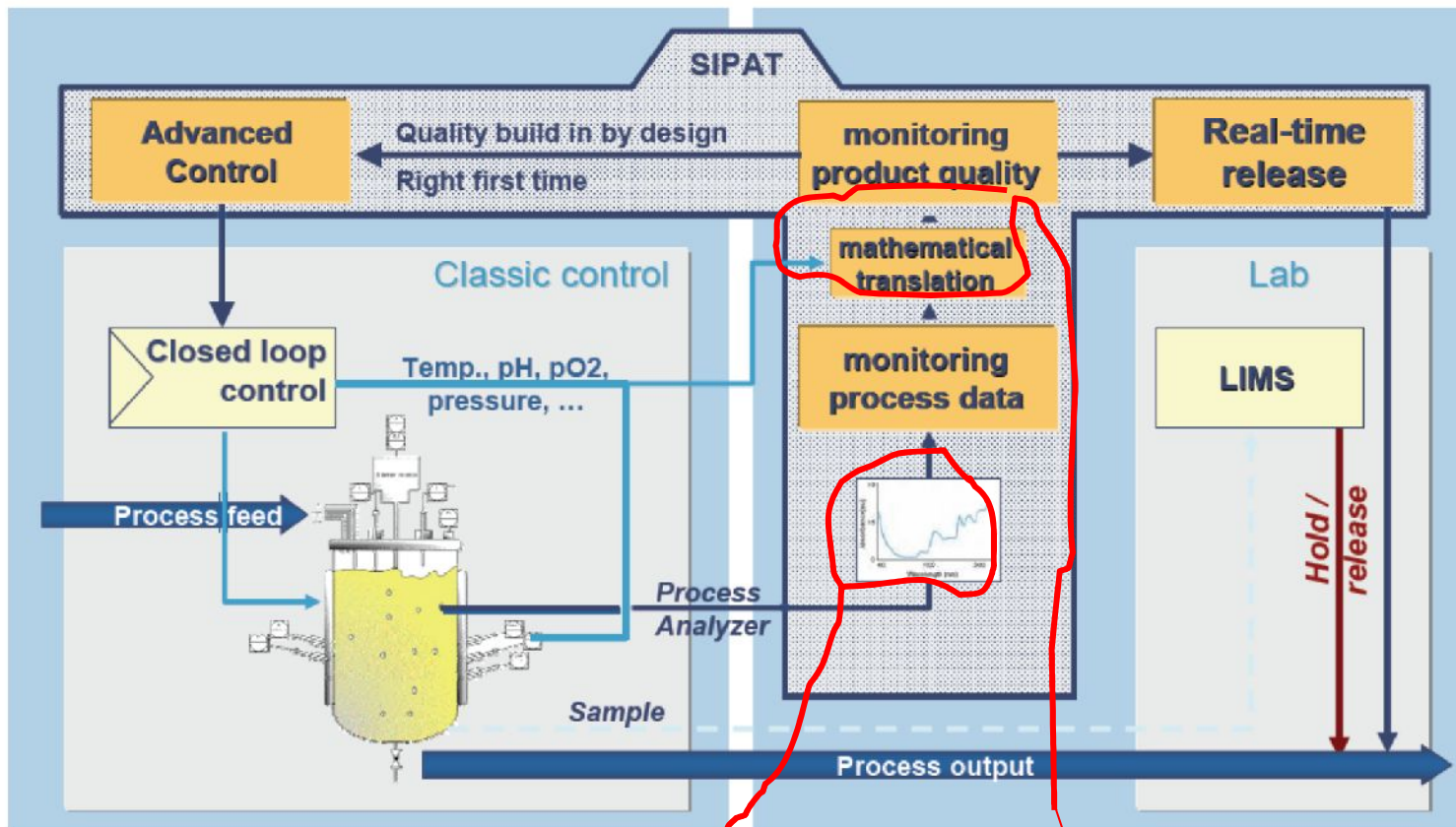
A külön szedett frakciókban UV elnyelés alapján (280 nm) állapítják meg a termék gazdasejt fehérjét l való elválását.



- A. Alapvonalig történ elválasztás
- B. Nem teljes elválasztás, a HCP és a termék egy része átfed .

PAT egy biotechnológiai rendszerben

A PAT a CPP-k monitorozásával és szabályozásával biztosítja a CQA-k kívánt értékét

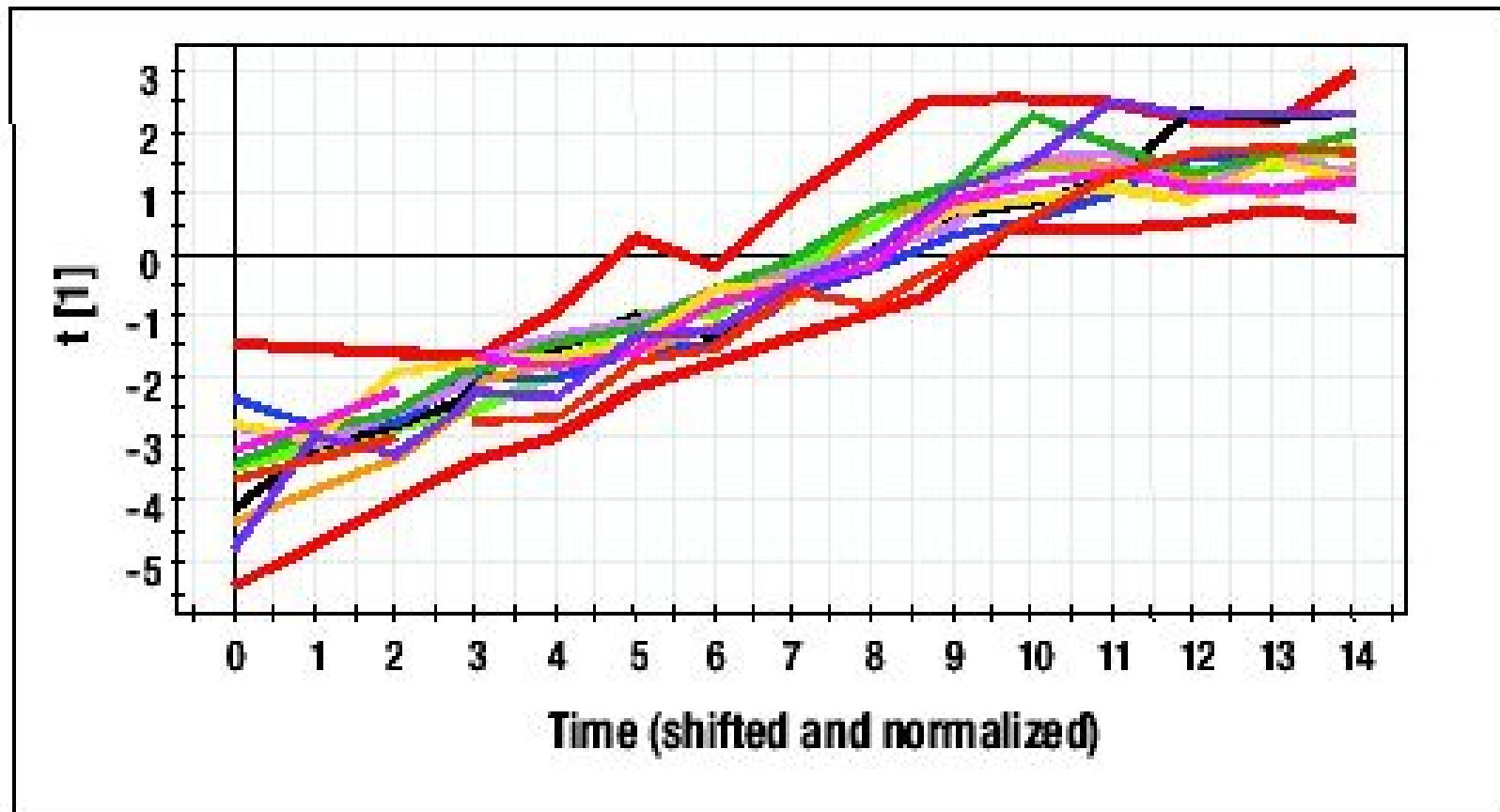


e.g. NIR spektrum

Multi Variate Analysis
Principal Componen-sek meghatározása

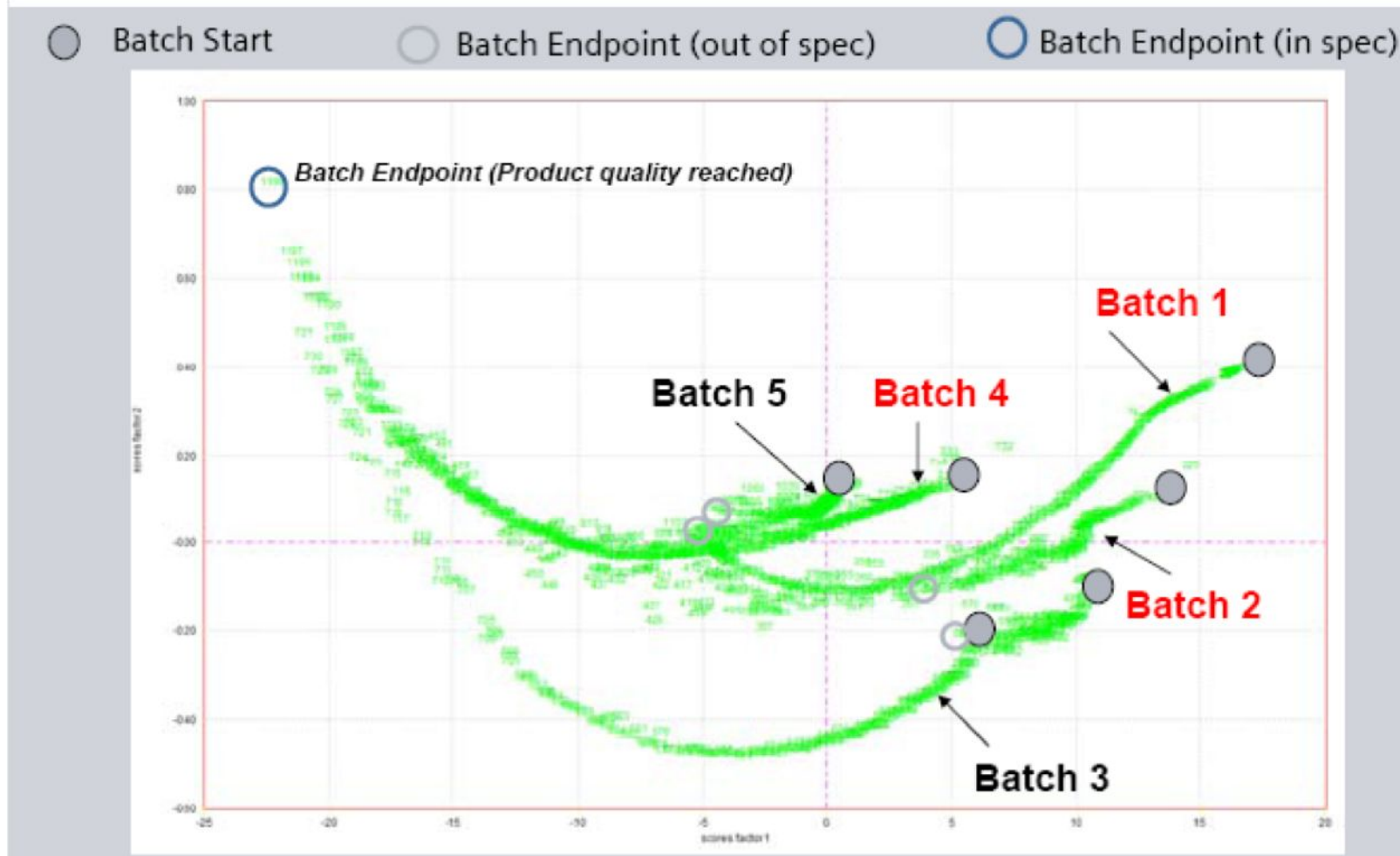
PCA – egy PC az idő függvényében

Az eljárás ismételt vizsgálata a több paraméterből egyesített egy „principal komponens” időbeli változása alapján. Egy 2 literes és egy 2000 literes emlős sejt tenyésztés együttes vizsgálata



PCA – két PC alkalmazása

Az eljárás ismételhet ségének vizsgálata a több paraméterb l egyesített két „principal komponens” által meghatározott térben



PAT mérnök állásajánlat

Process Analytical Technology Engineer II

YOUR TASKS AND RESPONSIBILITIES

The primary responsibility of this role, as Process Analytical Technology Engineer is to use quantitative analysis in conjunction with scientific and engineering knowledge in order to support PAT group with monitoring and understanding of the manufacturing bioprocesses. This position will be a part of the PAT Engineering group that leads the selection and implementation of process analytical technologies and provides support for the entire manufacturing process.

- Work within PAT team, Operations and Manufacturing Sciences to support activities and projects in the areas of: (a) bioprocess monitoring, (b) root cause analysis, (c) process understanding and (d) process improvement
- Data collection and organization
- Development of tools/applications for process monitoring
- Statistical analyses (inferential, descriptive, experimental design and multivariate data analysis)
- Numerical computations
- Develop mathematical models for bioprocesses
- Develop, propose and implement technical solutions in the aforementioned areas
- Provide technical assessments based on data analysis and process knowledge
- Write technical reports

WHO YOU ARE

Ph.D. in Engineering or Science with 0 years of experience

Phone +1 877 229-3727

www.career.bayer.us

Reference Code

0000102068

Bayer is an Equal Opportunity
Employer
Minorities / Females / Protected
Veterans / Disabled





Bioanalitika:

a szemünk, amivel a biomolekulákat látjuk

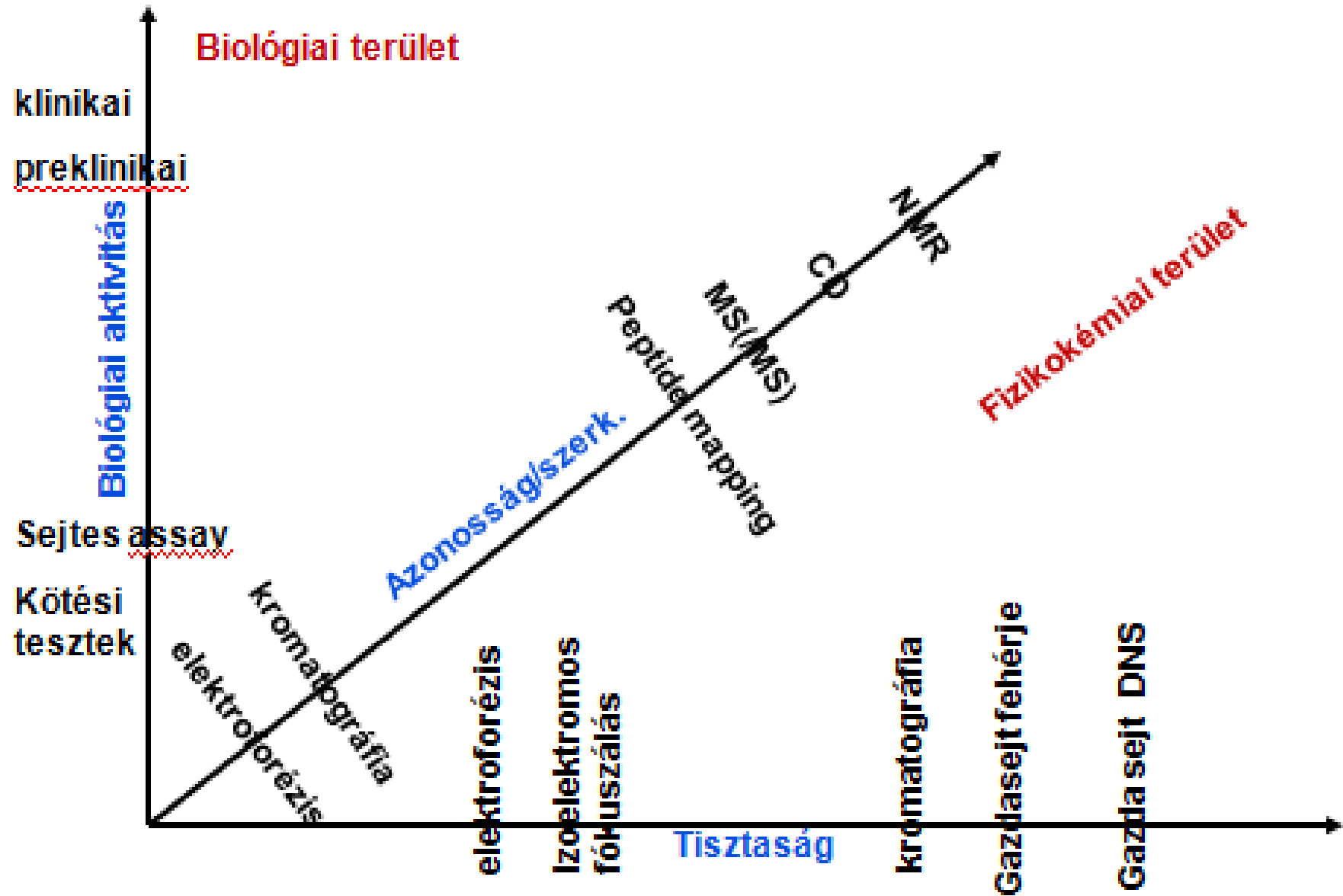
Analitikai célok

Analitikai célok	Kinek készül ?
Jellemzés	Fejleszt k, hatóság
Technológiai kialakítás a célmolekulához igazodóan	Fejleszt k, hatóság
A gyártás állandóságának biztosítása	Gyártók, hatóság
A stabilitás ellen rzése és bizonyítása	Fejleszt k, gyártók, hatóság

Vizsgálandó rekombináns fehérje tulajdonságok

Információk	Tulajdonság	Megjegyzés
Szerkezeti információk	Intakt fehérje szerkezeti azonosság	Primer, szekunder, terciér, quaterner
	Glikán profil	cukormintázat
Tisztasági információk	Tisztaság	A célfehérje %-az össz fehérjében
	Szennyezésprofil	HCP, HCDNA, kismol. (gyártás eredet szenny.)
	Töltésvariánsok	Termék eredet szennyezés
	Aggregáció	Termék eredet szennyezés
	Oxidáció	Termék eredet szennyezés
Mennyiségi információk	Koncentráció, mennyiség	
Biológiai aktivitás	Sejtekre való hatás, fehérjékhez való kötődés	In vitro (labortesztek) In vivo (állatok és klinika)

Biológikumok analízise ortogonális módszerekkel

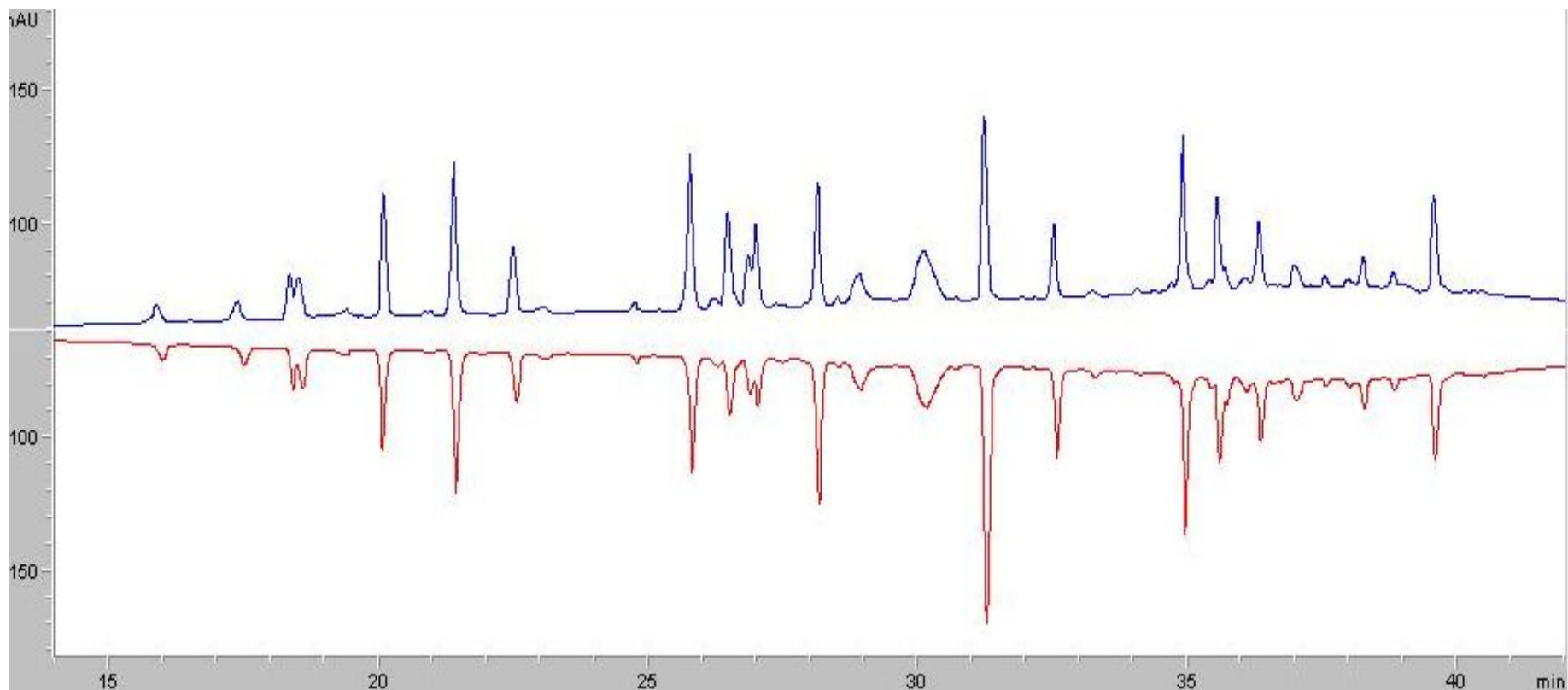


Fehérje szerkezet vizsgálatok

Szerkezeti szintek	Vizsgált tulajdonság	Módszer
Primer szerkezeti vizsgálati módszerek	Aminosav sorrend	LC-MS/MS, Peptide mapping, Intakt tömeg, izoelektromos pont meghatározás
Másodlagos szerkezeti vizsgálati módszerek (α -hélix, β red , rendezetlen)	Formák arányának megállapítása	Cirkuláris Dikroizmus, Hidrofób tul. vizsg. kromatográfiával, H atomok iránya NMR-el , Fehérje kitekeredés DSC-vel,
Harmadlagos szerkezeti vizsgálati módszerek	A helixek és red k egymáshoz való elhelyezkedése	Fluoreszcens spektroszkópia, NMR, DSC, Hidrofób krom.
Negyedleges szerkezeti vizsgálati módszerek	Több polipeptid lánc kapcsolódása és egymáshoz való helyzete	Reduktív és non-reduktív SDS-PAGE

Fehérjetérképezés, peptide mapping – primer szerkezet

Minta és referencia minta (fehérjék) összehasonlítása RP-HPLC-vel proteolitikus emésztést követően:

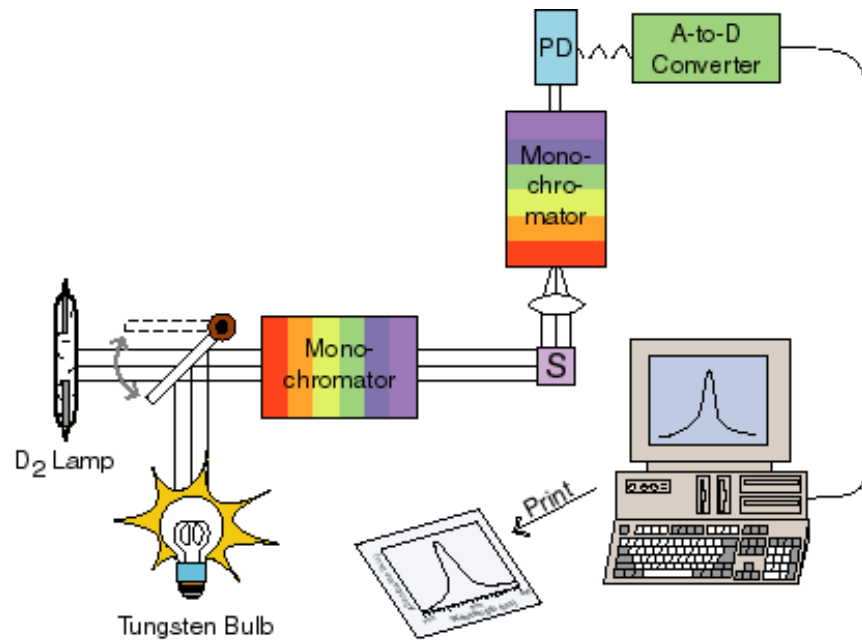


Oszlop: YMC ODS-AQ 5 μ m, 100 x 2,1 mm; 60 °C

A eluens: 0.5 ml TFA + 950 ml H₂O + 50 ml AcN

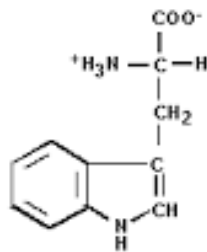
B eluens: 0.5 ml TFA + 50 ml H₂O + 950 ml AcN

Fluorescens spektroszkópia – szekunder és terciér szerkezet

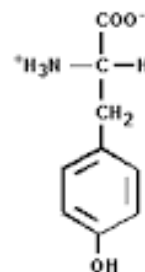


Fluorescence Spectrophotometer

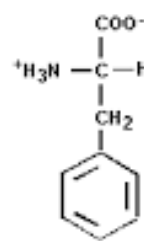
Nem csak a triptofán...



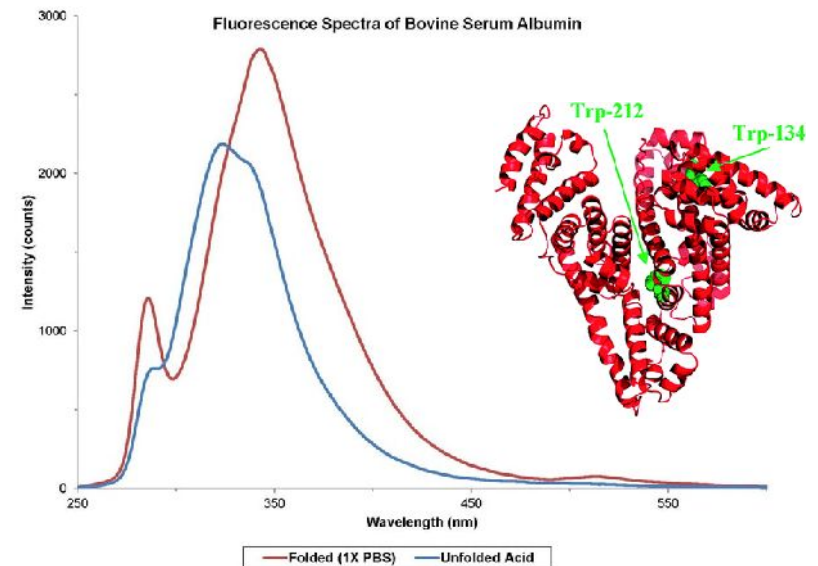
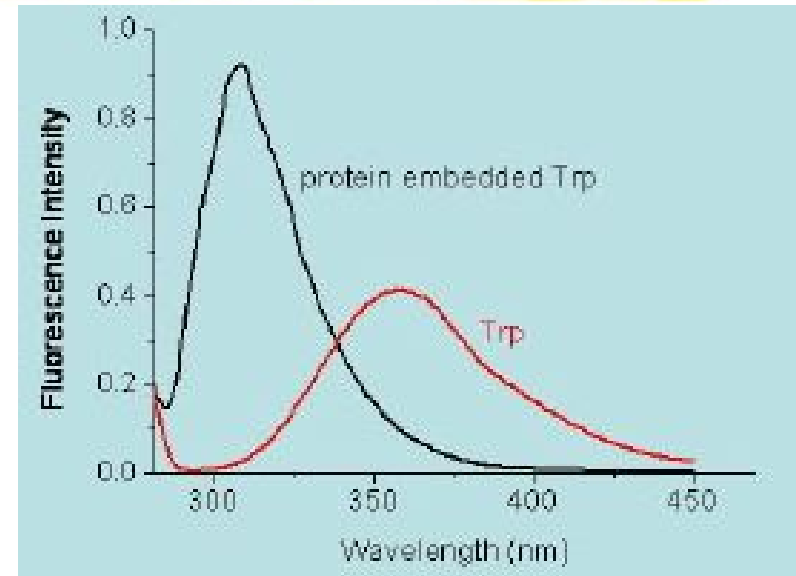
Tryptophan



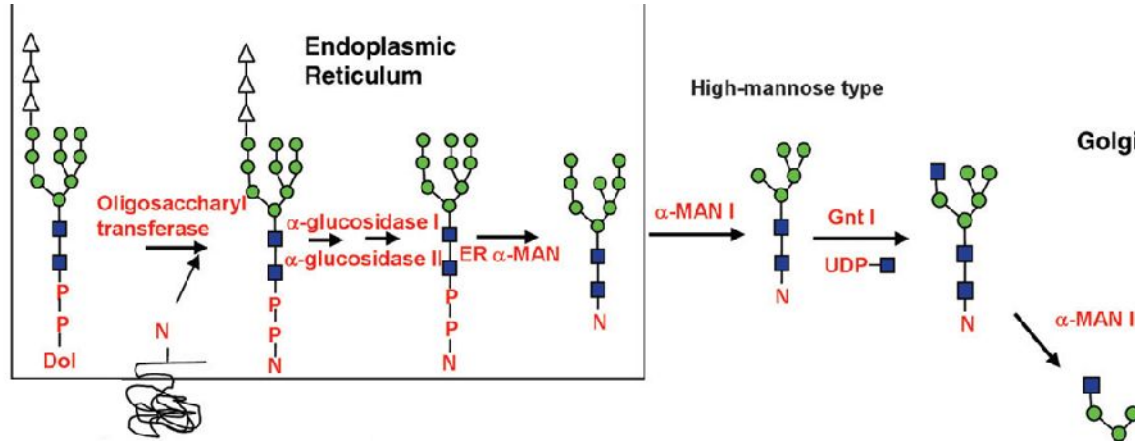
Tyrosine



Phenylalanine

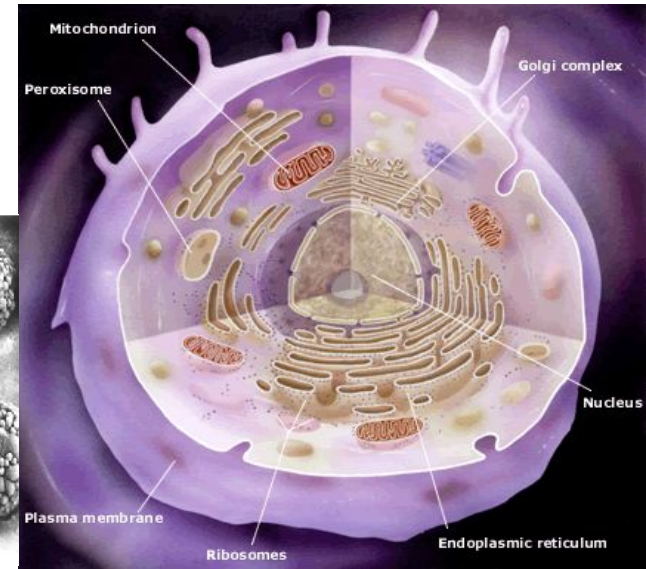
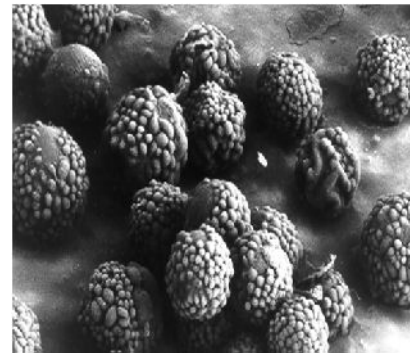
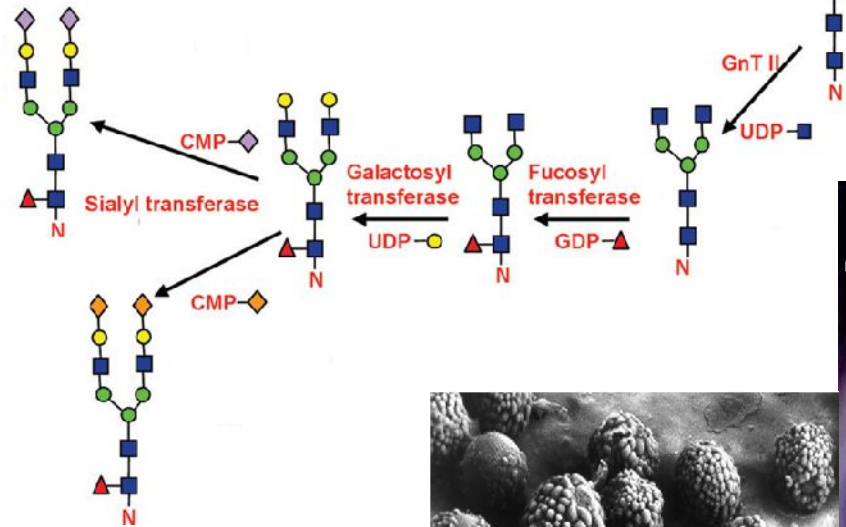


A glikoziláció: pl. Mab glikoziláció



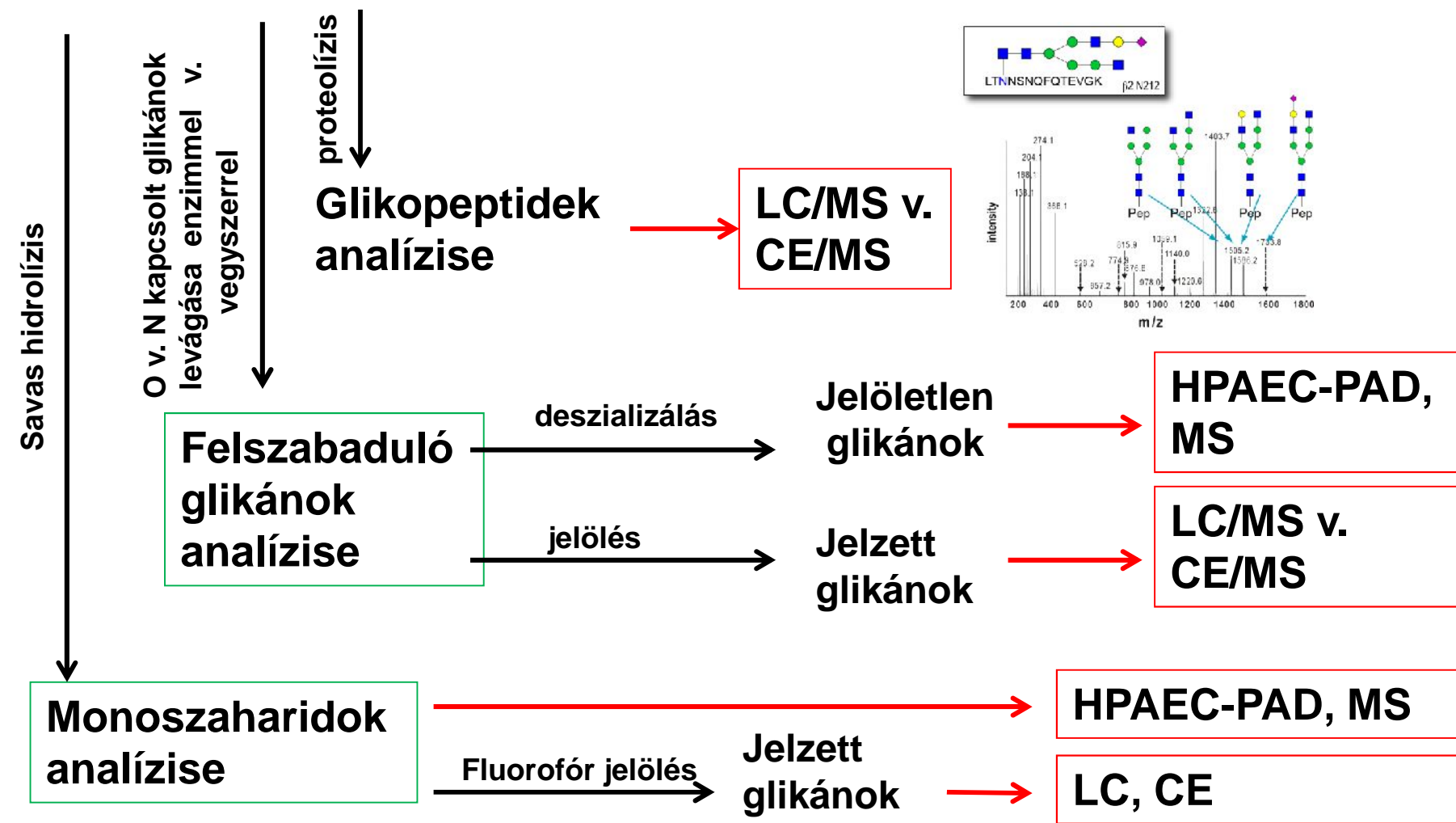
A glikoziláció helye: Asn, Ser, Thr, (Lys)

- △ Glc
- Man
- GlcAc
- ▲ Fuc
- ◇ NANA
- ◆ NGNA
- Gal



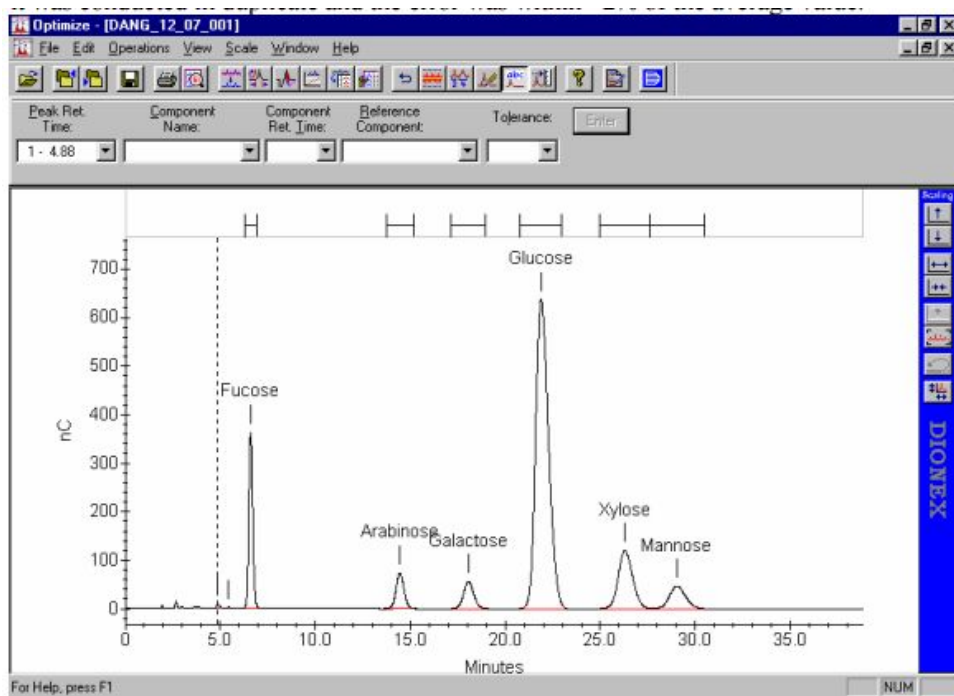
Glikán analízis

Ép glikoproteinek analízise → **MS, CE, IEX-HPLC, SEC-HPLC, SDS-PAGE**



Glikán analízis

HPAEC-PAD: High-performance-anion-exchange-chromatography with pulsed amperometric detection

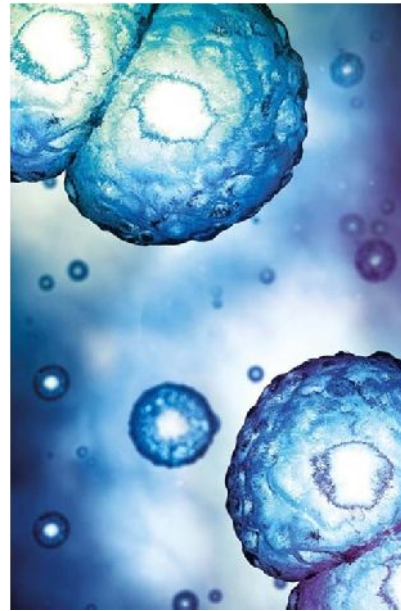


Speciális, nagyon kis szemcsés anioncserél gyanta.

A pulzáló amperometrius detektálás lényege: három lépéses hullámszer potenciálváltozás 1 mp-en belül, arany elektródon. Az amperometriás detektálást anódos és katódos polarizációs pulzusok követik, amelyek oxidatív majd redukív környezetet hoznak létre a felületen. Ezzel letisztítják és reaktiválják az elektród felületét.

Bioassay-k alapelve: hatás él sejten

Aktív hatóanyag

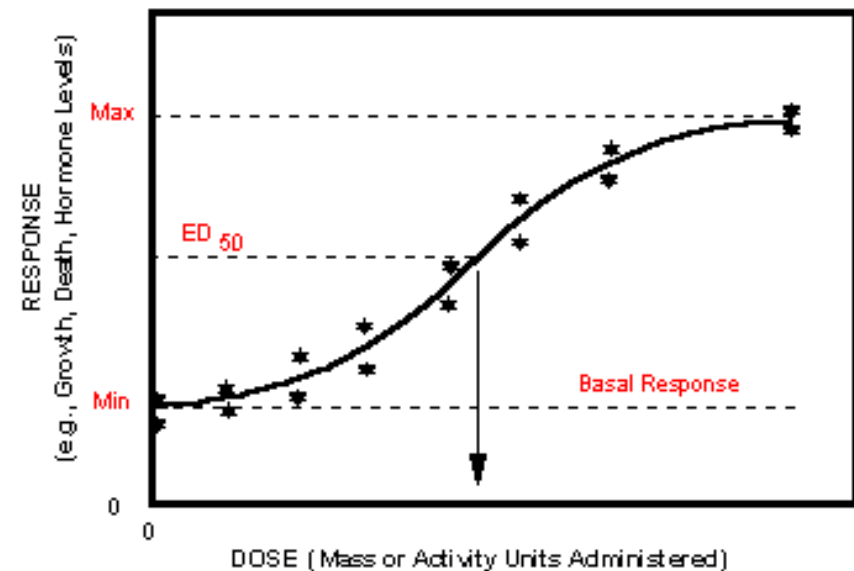


Indukció,
Gátlás,
Stb.

Mérhet válasz:
Sejtszám,
Fluoreszcens jel,
Fényelnyelés
Stb.

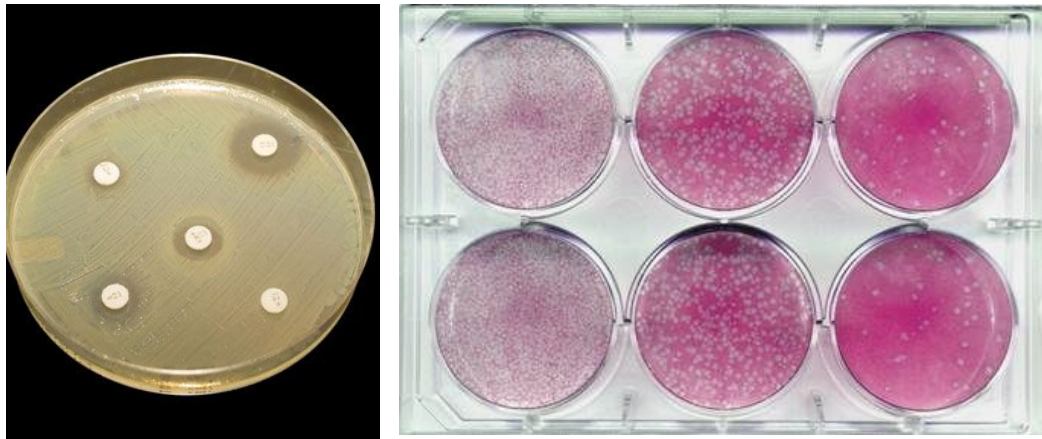
Relatív biológiai aktivitás

Bioassay Dose Response

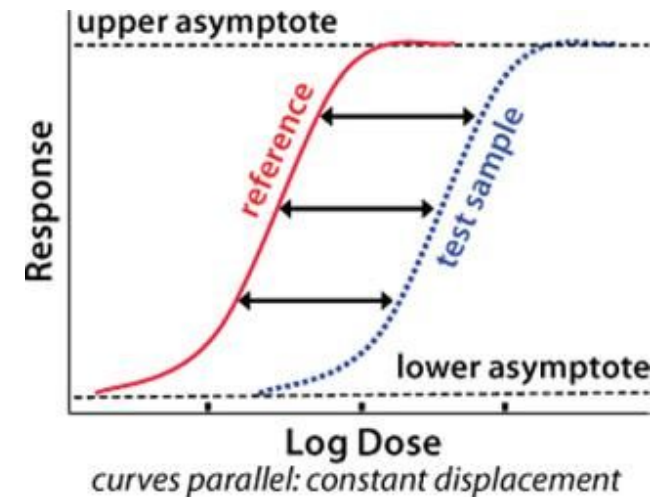
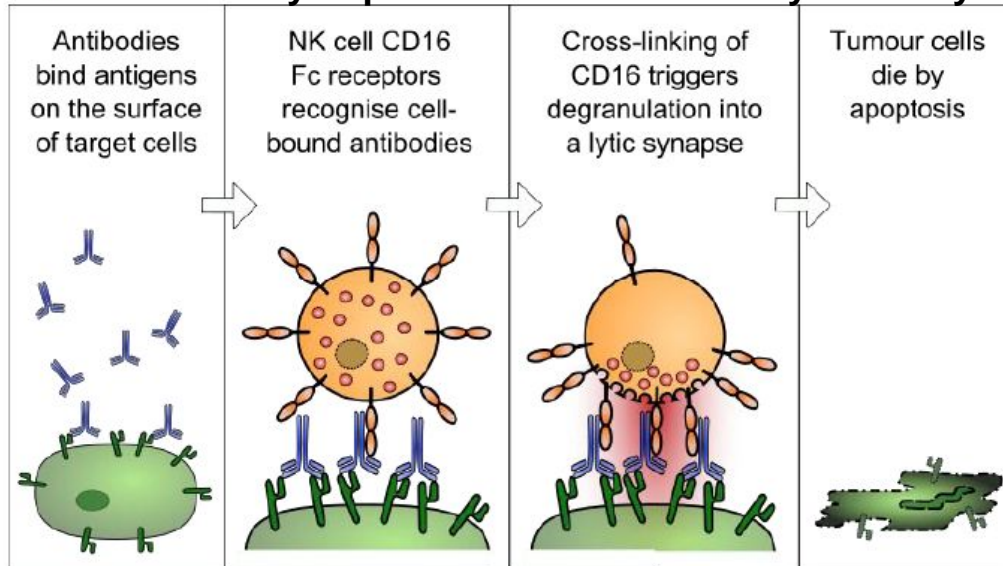


Bioassay-k kivitelezése

Fehérjeminták összehasonlítása élő sejtekre való hatásuk alapján



ADCC Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

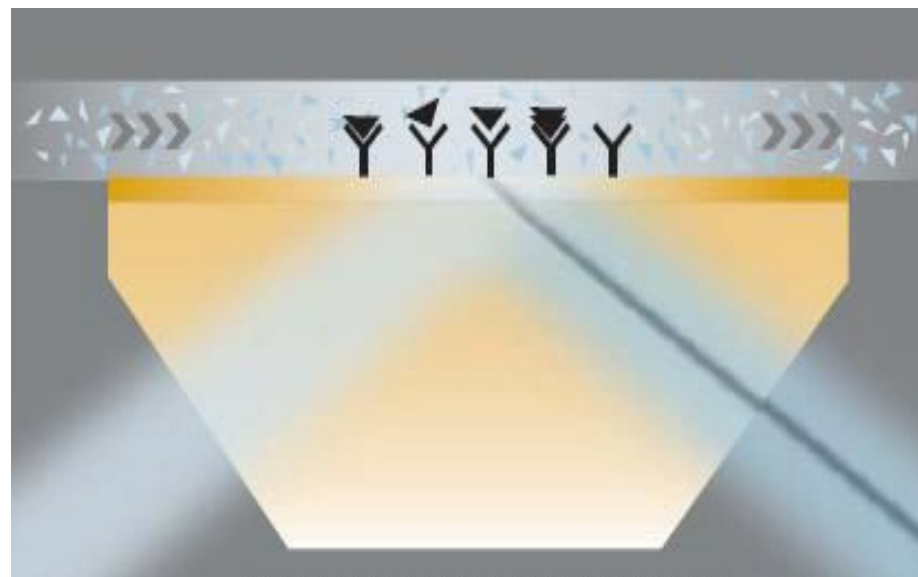


Kötési tesztek

Surface Plasmon Resonance (SPR):

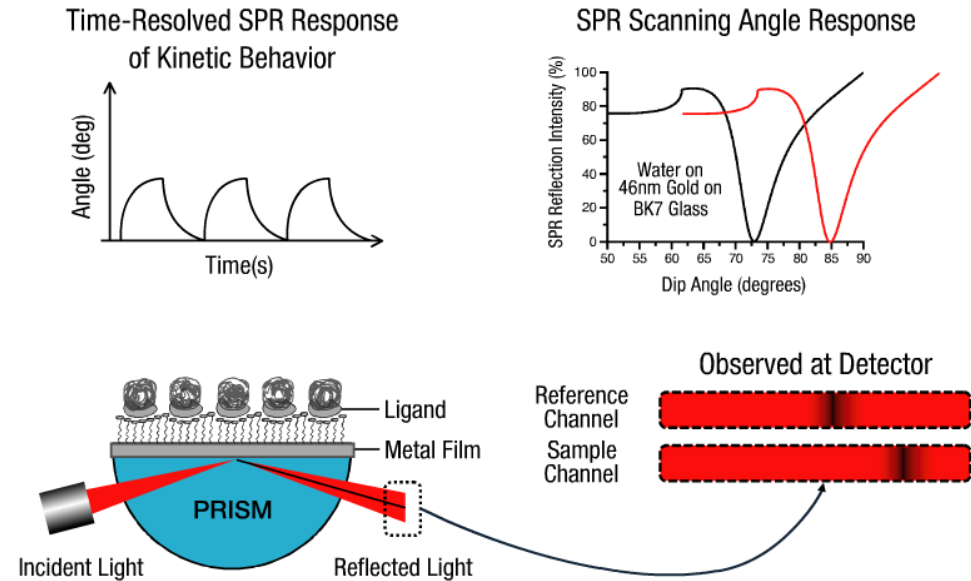
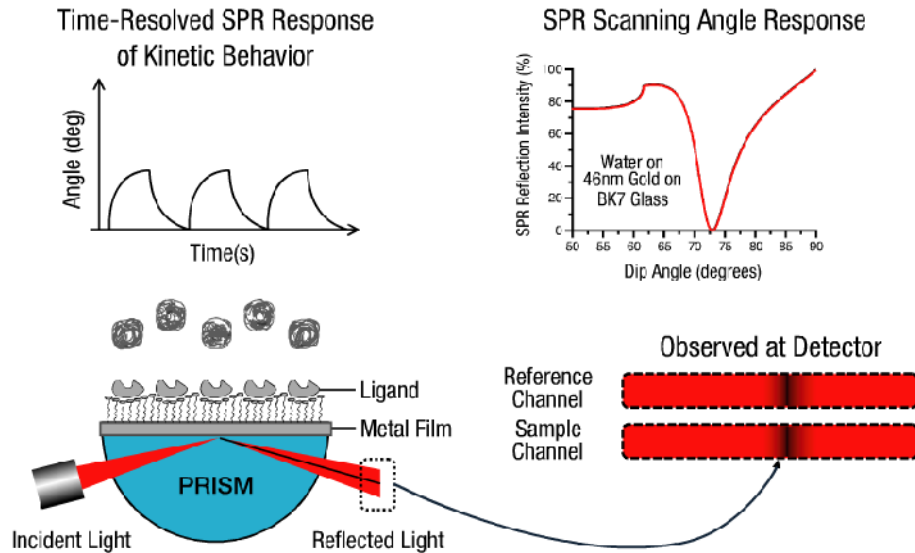
Fehérjeminták összehasonlítása felülethez immobilizált molekulákhoz való kötésük alapján

Amikor a polarizált fény fotonjának energiája éppen jó, kölcsönhatásba lép az arany felület szabad elektronjával és egyfajta fényelnyelés történik. (A plasmon az elektron s r séghullám részecske formájának a neve.)



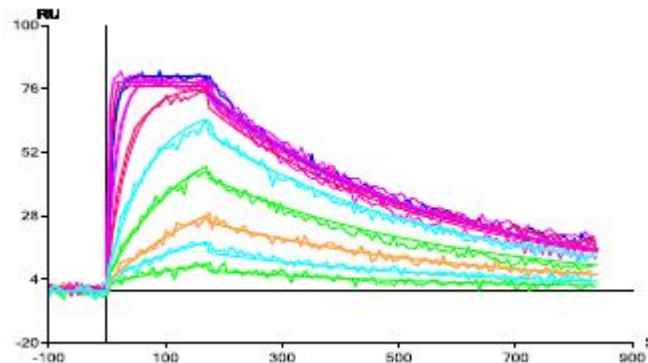
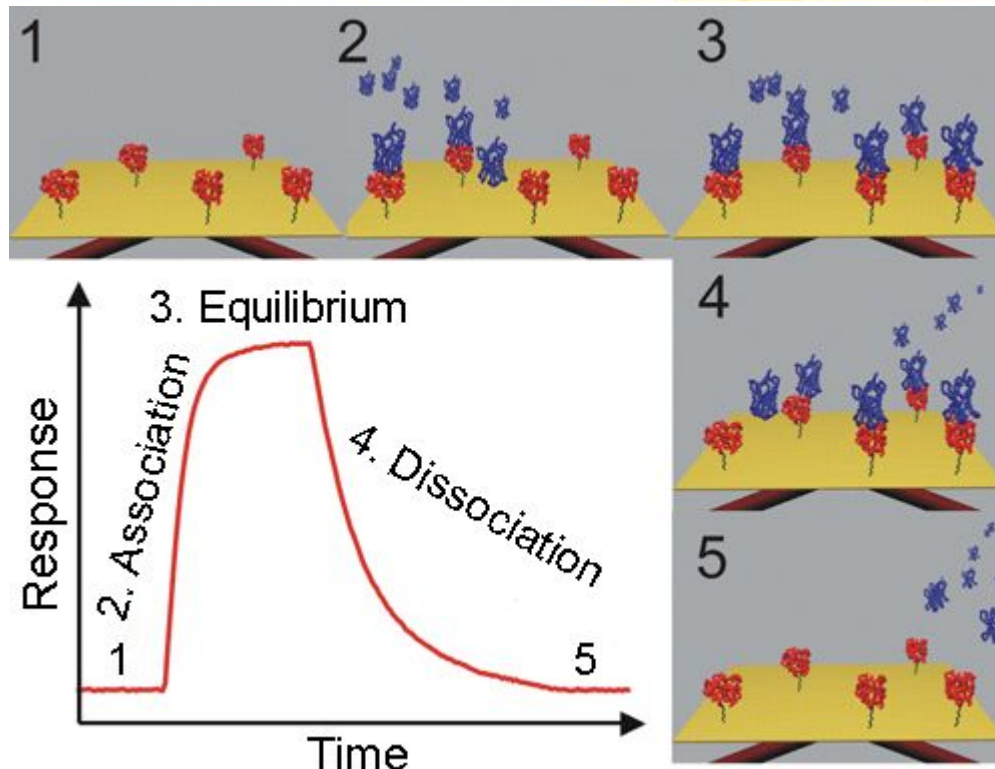
A módszer: jelölésmentes,
azonos idej (real-time),
kinetikai mérésekre alkalmas

Kötési tesztek



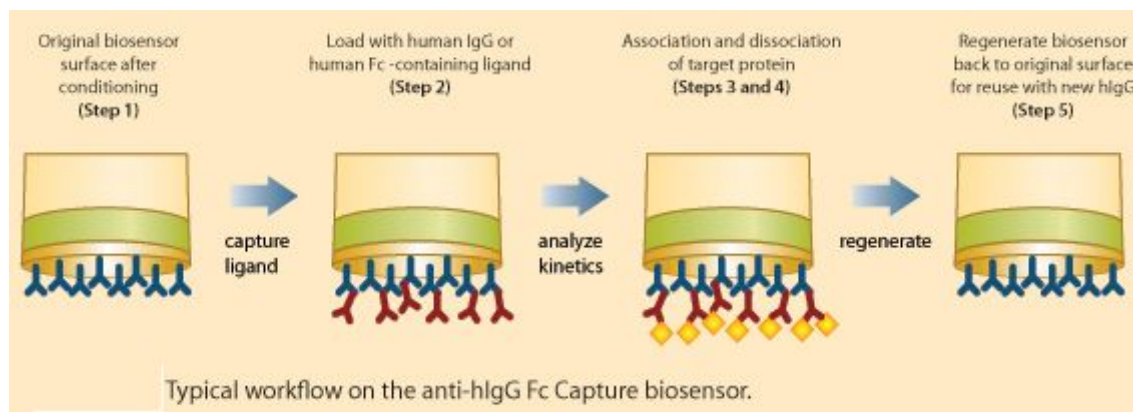
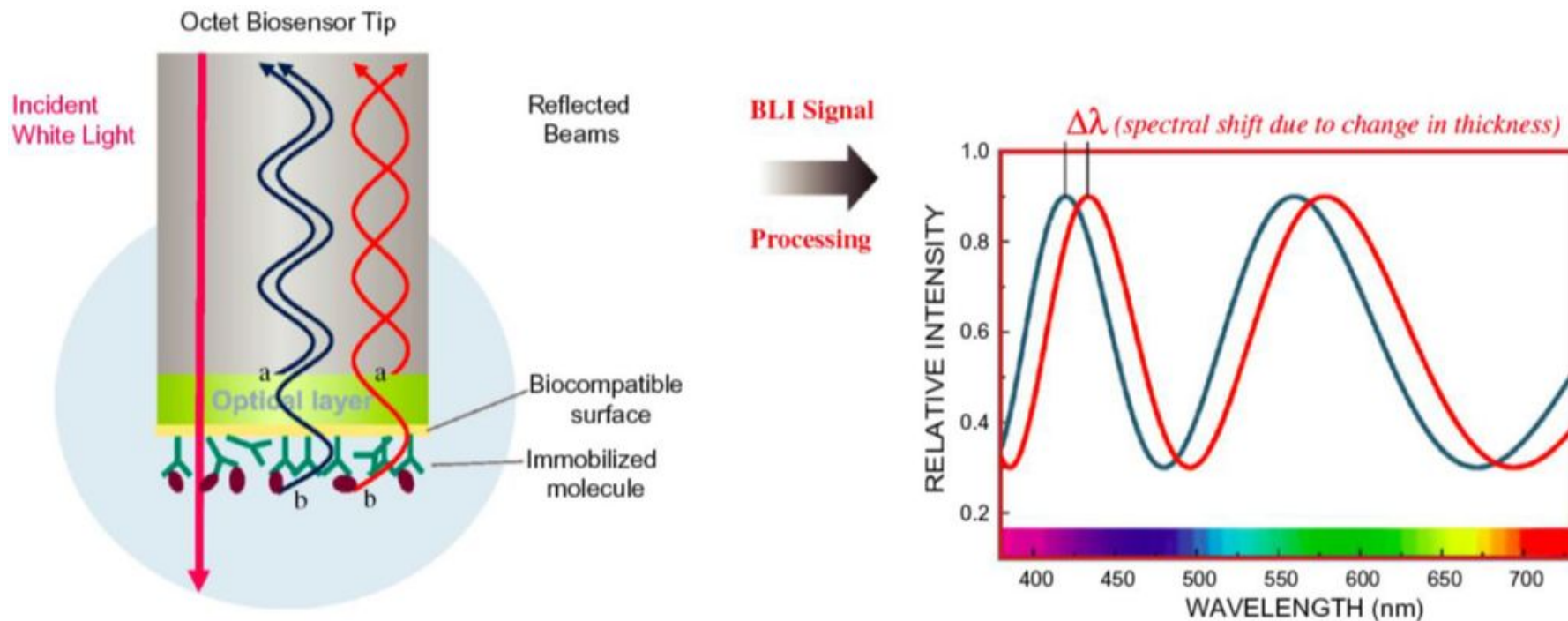
A lézer fény mérhet refraktív index változást szenved az arany felületén, ha az arany másik oldalán tömegváltozás történik. Pl. egy felülethez lekötött fehérje befog v.milyen molekulát a felette lévő oldatból.

Kötési tesztek



**Mennyire specifikus a reakció?
Milyen gyors a reakció (k_a)?
Milyen stabil a komplex (k_d)?
Milyen erős a komplex (K_d)?**

Kötési teszt – fényinterferencián alapuló detektálás



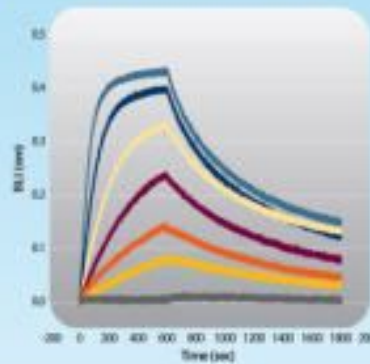
Kötési teszt – fényinterferencián alapuló detektálás

Label-Free, Real-Time Interaction Analysis

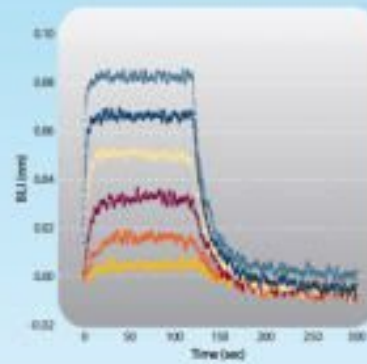
DIP AND READ



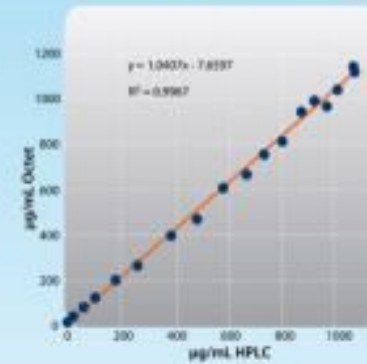
PROTEIN:PEPTIDE



PROTEIN:SMALL MOLECULE



PROTEIN QUANTITATION





Köszönöm a figyelmet !