

Produktion von Biopharmazeutika – Ein MATLAB[®]-Tool zur Simulation und Optimierung von Zellvermehrungsverfahren

MATLAB EXPO 2017, München

Tanja Hernández Rodríguez

Kirsten S. Koopmann, Jonas Klaes, Simon Kern, Oscar Platas Barradas, Ralf
Pörtner, Björn Frahm

Überblick

- Einführung in den biopharmazeutischen Anwendungsbereich
- Entwickeltes Software-Tool zur Optimierung: Struktur, Modellierung & Mathematik, wesentliche Elemente, Realisierung in MATLAB
- Anwendungen und Einsatzfelder des Tools
- Ein Blick auf experimentelle Anwendungen/Verifizierungen
- Fazit & Ausblick

Biopharmazeutika & die Herausforderungen bei ihrer Herstellung



Wozu dienen
Biopharmazeutika?



Krebs

Diabetes

Multiple
Sklerose

Thrombose

Bluterkrankung

Relevanz / Bedarf

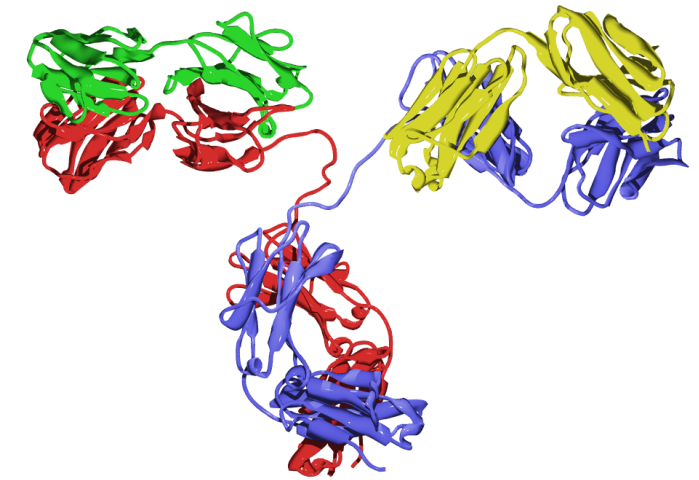


Mehr als 300
biopharmazeutische
Produkte weltweit

Jahresumsatz: ca. 200
Milliarden US\$ weltweit

→ Weltbevölkerung wächst
→ Zahl der älteren
Menschen steigt

Was sind Biopharmazeutika?



Biologische Wirkstoffe, i.d.R. komplexe Proteine

- Bis zu 1000 x größer als chemisch hergestellte Wirkstoffe
- Besitzen eine sehr komplexe Struktur
- Sie benötigen lebende Zellen (meist Säugetierzellen), in denen sie produziert werden. In Bakterien, Pilzen und Hefen ist das nicht möglich (anders als bei Antibiotika).

Komplexe Proteine, wie:

- Monoklonale Antikörper (z.B. für die Krebsbehandlung)
- tPA gegen Thrombose
- Gerinnungsfaktoren (z.B. zur Behandlung der Bluterkrankheit)

Biopharmazeutische Produktion



Produktions-Bioreaktoren, Quelle: COTTER

Viele Schritte unter stetiger Kontrolle notwendig

Sicherstellung, dass die 3-dimensionale Proteinstruktur präzise gebildet wird.

Hohe Anforderungen an die Produktqualität

(schon kleine Abweichungen in der komplexen Proteinstruktur können bei den Patienten zu Immunreaktionen führen)

Viele Faktoren können die Produktqualität beeinflussen/beeinträchtigen (Kultivierungsparameter, Zellzustand,...)

Von der mL-Ampulle bis in
den Produktionsreaktor
(2.000 - 20.000 L)



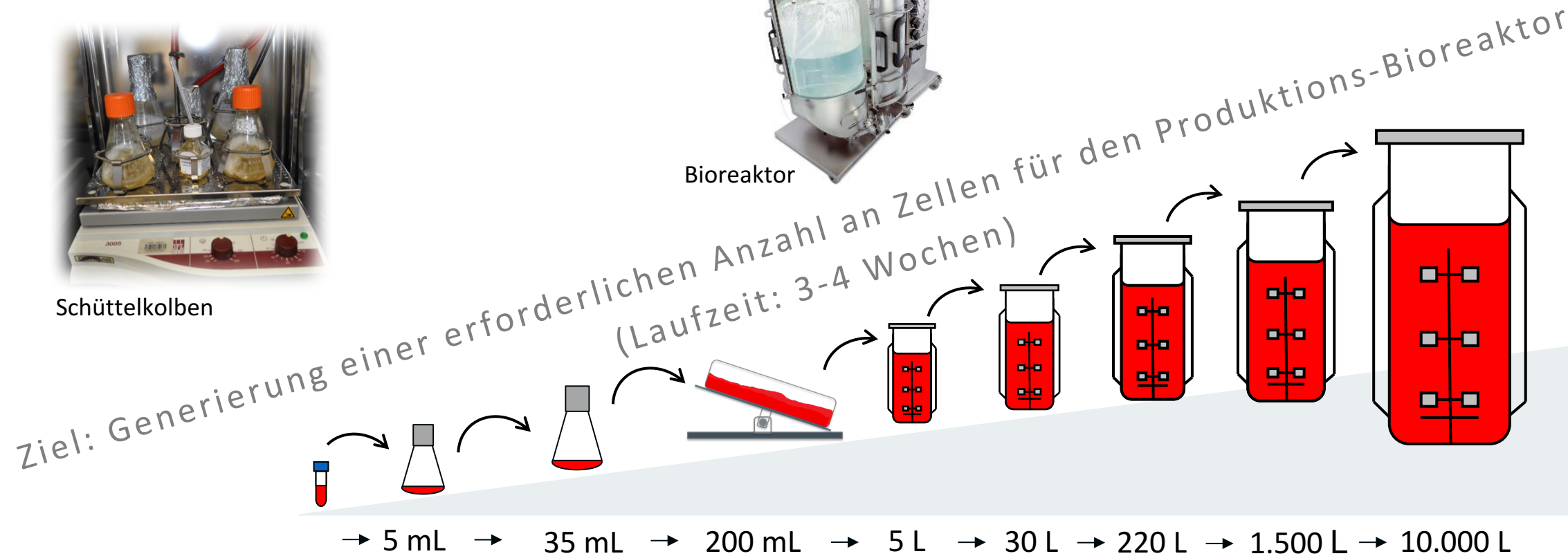
Produktions-Bioreaktoren



Schüttelkolben



Bioreaktor

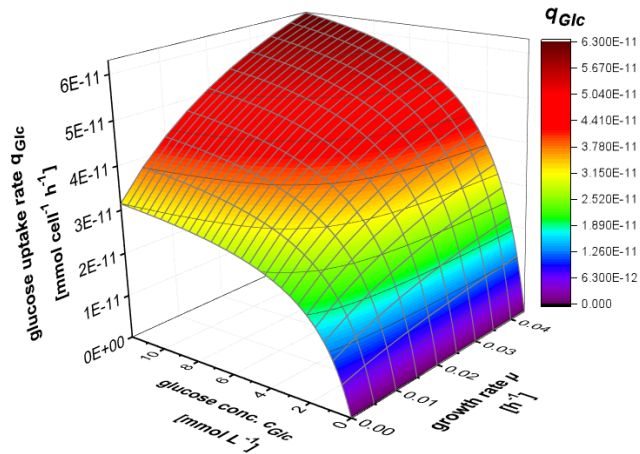


Ziel: Hohe Produktausbeute bei hoher Produktqualität

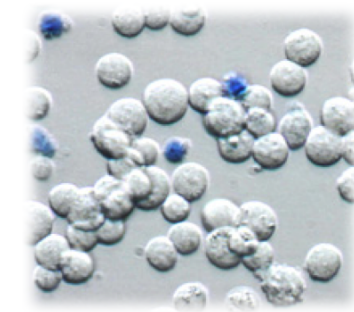
Zellvermehrungsverfahren
(Seed-Trains) zeit- und
kostenintensiv

Lebende Zellen verhalten
sich individuell

Komplexer
Zellmetabolismus



Optimierungsmethoden
erforderlich
→ IT- und modellgestützte
Methoden



Bsp. für Zellen, Quelle: ProBioGen

Zellwachstum und Proteinproduktion
sind von Kultivierungsbedingungen und
Zellperformance abhängig

Zellvermehrungsverfahren hat Einfluss
auf die Erfolgsquote der
Wirkstoffproduktion

**Entwickeltes Software-Tool zur Optimierung:
Struktur, Modellierung & Mathematik, wesentliche Elemente,
Realisierung in MATLAB**

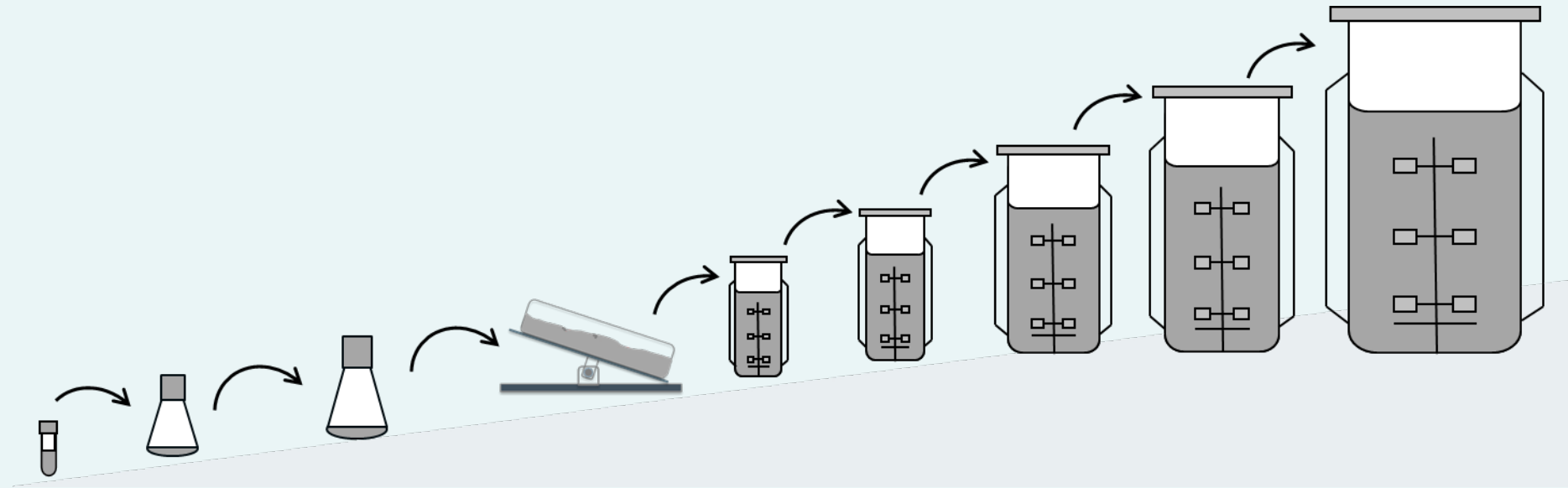
Struktur

Anpassung an Zelllinie

Kultivierungs-
-daten
Zelllinie

Modell

Seed-Train



Mathematisches Modell - Beispiel

Bilanzgleichungen Bio-Phase

$$\frac{dX_v}{dt} = \left(\mu - \mu_d - \frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \right) \cdot X_v$$

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu \cdot X_v - \frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot X_t - K_{Lys} \cdot (X_t - X_v)$$

Flüssig-Phase

$$\frac{dc_{Glc}}{dt} = \frac{F_{Glc}}{V} \cdot c_{Glc,F} + \frac{F_{Medium}}{V} \cdot c_{Glc,Medium} - \frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{Glc} - q_{Glc} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Gln}}{dt} = \frac{F_{Gln}}{V} \cdot c_{Gln,F} + \frac{F_{Medium}}{V} \cdot c_{Gln,Medium} - \frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{Gln} - q_{Gln} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{LS}}{dt} = \frac{F_{Medium}}{V} \cdot c_{LS,Medium} - \frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{LS} - q_{LS} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Lac}}{dt} = -\frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{Lac} + q_{Lac} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Amm}}{dt} = -\frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{Amm} + q_{Amm} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{MAb}}{dt} = -\frac{F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}}{V} \cdot c_{MAb} + q_{MAb} \cdot X_v$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{Glc} + F_{Gln} + F_{Medium}$$

Kinetiken Zell-Wachstum/Absterben

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_{Glc}}{c_{Glc} + K_{S,Glc}} \cdot \frac{c_{Gln}}{c_{Gln} + K_{S,Gln}} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + K_{S,LS}}$$

$$\mu_d = \mu_{d,\min}$$

Substrataufnahme / Metabolitenproduktion

$$q_{Glc} = q_{Glc,\max} \cdot \frac{c_{Glc}}{c_{Glc} + k_{Glc}} \cdot \left(\frac{\mu}{\mu + \mu_{\max}} + 0.5 \right)$$

$$q_{Gln} = K_{p,Gln} \cdot q_{Gln,\max} \cdot \frac{c_{Gln}}{c_{Gln} + k_{Gln}}$$

$$K_{p,Gln} = 1, \quad \text{if } c_{Glc} > c_{cGlc,thr}$$

$$K_{p,Gln} = 1 + a \cdot (c_{cGlc,thr} - c_{Glc}), \quad \text{if } c_{Glc} \leq c_{cGlc,thr}$$

$$q_{LS} = q_{LS,\max} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + k_{LS}}$$

$$q_{Lac} = Y_{Lac/Glc} \cdot q_{Glc} - q_{Lac,uptake} \cdot \frac{\mu_{\max} - \mu}{\mu_{\max}}$$

$$q_{Amm} = Y_{Amm/Gln} \cdot q_{Gln}$$

$$q_{MAb} = q_{MAb,\max}$$

Modellparameter rot hervorgehoben

Struktur

Anpassung an Zelllinie

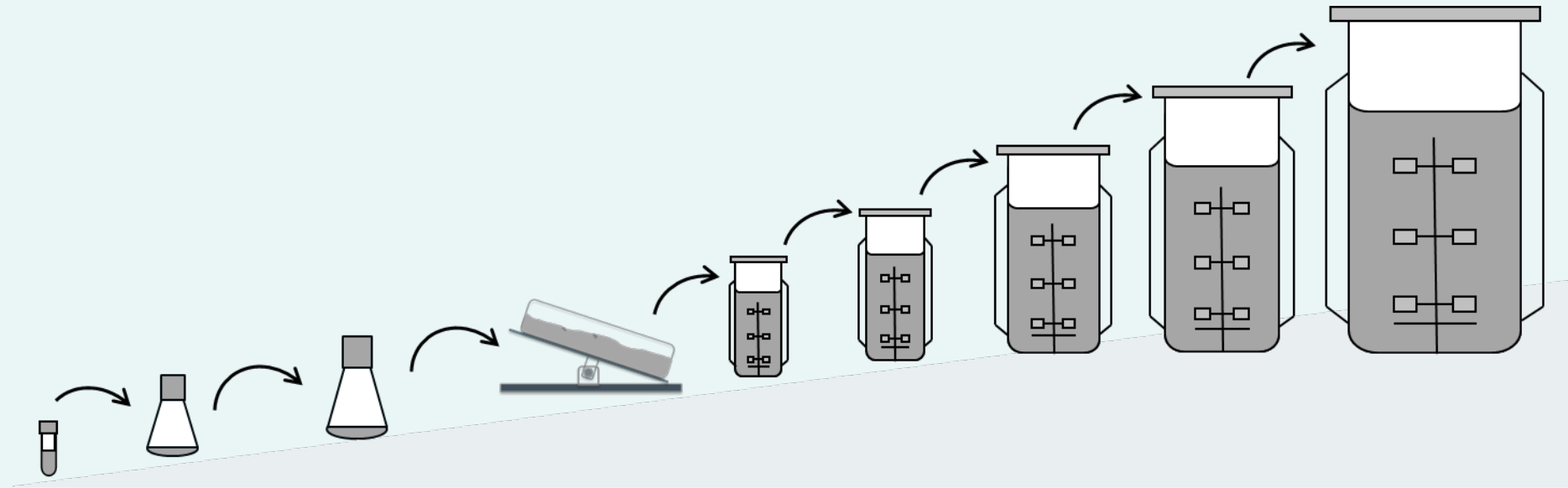
Kultivierungs-
-daten
Zelllinie

Modell

A priori-
Anpassung
der **Modell-
parameter**
an die
Zelllinie

Ggf. Modellanpassung

Seed-Train



Parameterschätzung – Mathematische Formulierung

Gütefunktional

(= Summe der gewichteten Fehlerquadrate)

$$\min_{p \in \mathbf{R}^n} \left(J(p) = \sum_{k=1}^M \sum_{i=1}^{N_k} w_k (y_{k,mess}(t_i) - y_{k,sim}(t_i, p))^2 \right)$$

unter der Nebenbedingung: $lb \leq p \leq ub$

Nichtlineares
Optimierungsproblem
mit Nebenbedingungen

Minimierung der
Fehlerquadrate
mittels
Nelder-Mead-
Simplex-
Algorithmus



Geschätzte
Modellparameter
und Startwerte

$$w_k = \frac{W F_k}{m_k^2}$$

$$m_k = \max_i y_{k,mess}(t_i)$$

$p = (p_1, \dots, p_n)$: Parametervektor
 n : Anzahl der zu schätzenden
 Modellparameter
 M : Anzahl der Messgrößen
 N_k : Anzahl der Messungen
 w_k : Gewichtungen
 $W F_k$: Gewichtungsfaktor für die k -te
 Messgröße
 $y_{k,mess}$: k -ter Messwert
 $y_{k,simu}$: k -te mittels ODE-Löser
 berechnete Näherungslösung,
 basierend auf dem aktuellen
 Parametersatz
 $lb = (lb_1, \dots, lb_n)$: untere
 Parametergrenzen
 (lower bounds)
 $ub = (ub_1, \dots, ub_n)$: obere
 Parametergrenzen
 (upper bounds)

Parametervektor p
bestimmen:
 - Zu schätzende
 Modellparameter
 - Konzentrationsstartwerte
 (Messungenaugigkeiten)

Anfangswerte für die in p
enthaltenen Parameter

Randbedingungen, d.h.
Ober- und Untergrenzen für
die in p enthaltenen
Parameter

Kultivierungsdaten

Lösen des Optimierungsproblems

Nichtlineares
Optimierungsproblem
mit Nebenbedingungen



Hier verwendet wurde der **File Exchange Select** file:
`fminsearchbnd`

Dieser Algorithmus transformiert das beschränkte Optimierungsproblem in ein freies Optimierungsproblem und wendet anschließend den Löser `fminsearch` aus der **Optimization Toolbox** an.

`fminsearch` verwendet den ableitungsfreien **Nelder-Mead-Simplex-Algorithmus**.

Falls einige Modellparameter bereits festgesetzt werden können, fließen nur noch die übrigen unbekanntesten Modellparameter in die Parameteridentifikation ein.

Struktur

Anpassung an Zelllinie

Kultivierungs-
-daten
Zelllinie

Modell

A priori-
Anpassung
der **Modell-
parameter**
an die
Zelllinie

Ggf. Modellanpassung

Konzentrations-
Startwerte
(Beginn des
Seed-Trains)

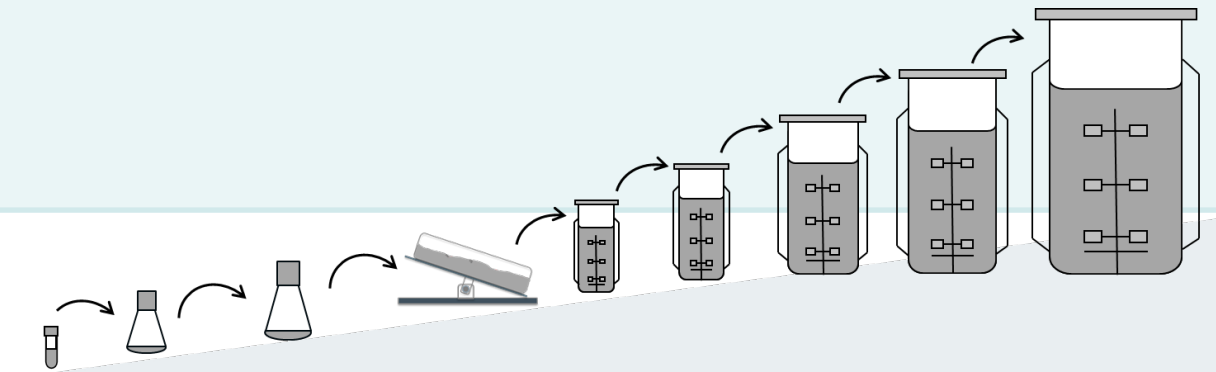
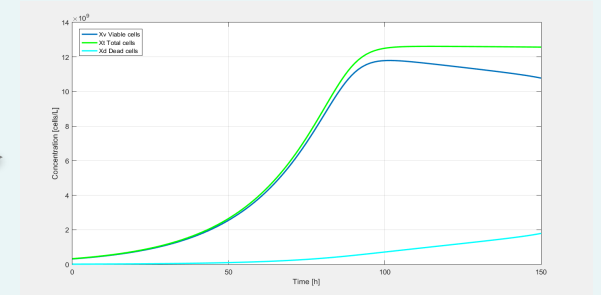
Vorhersage der
zeitlichen Verläufe
pro Scale

Modell-
parameter

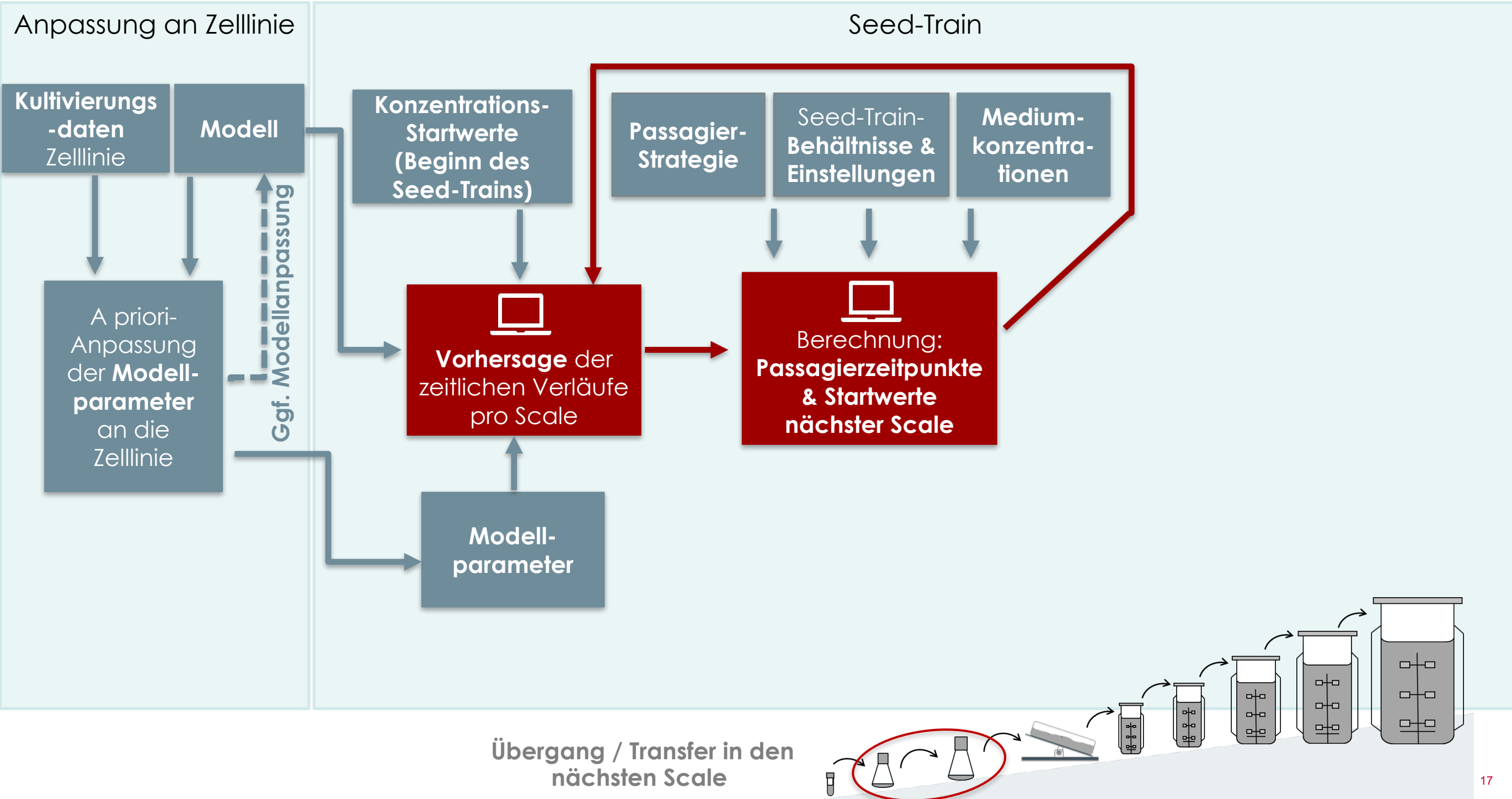
Seed-Train

Vorhersage der Konzentrationsverläufe

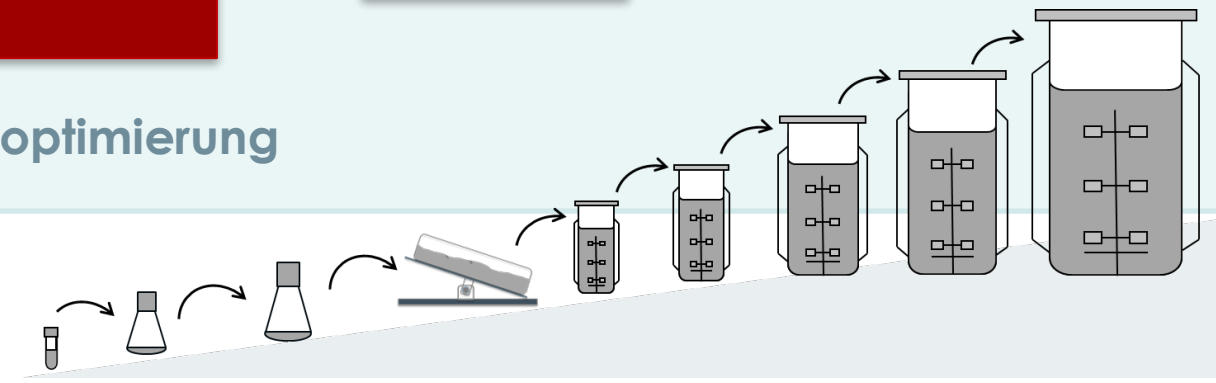
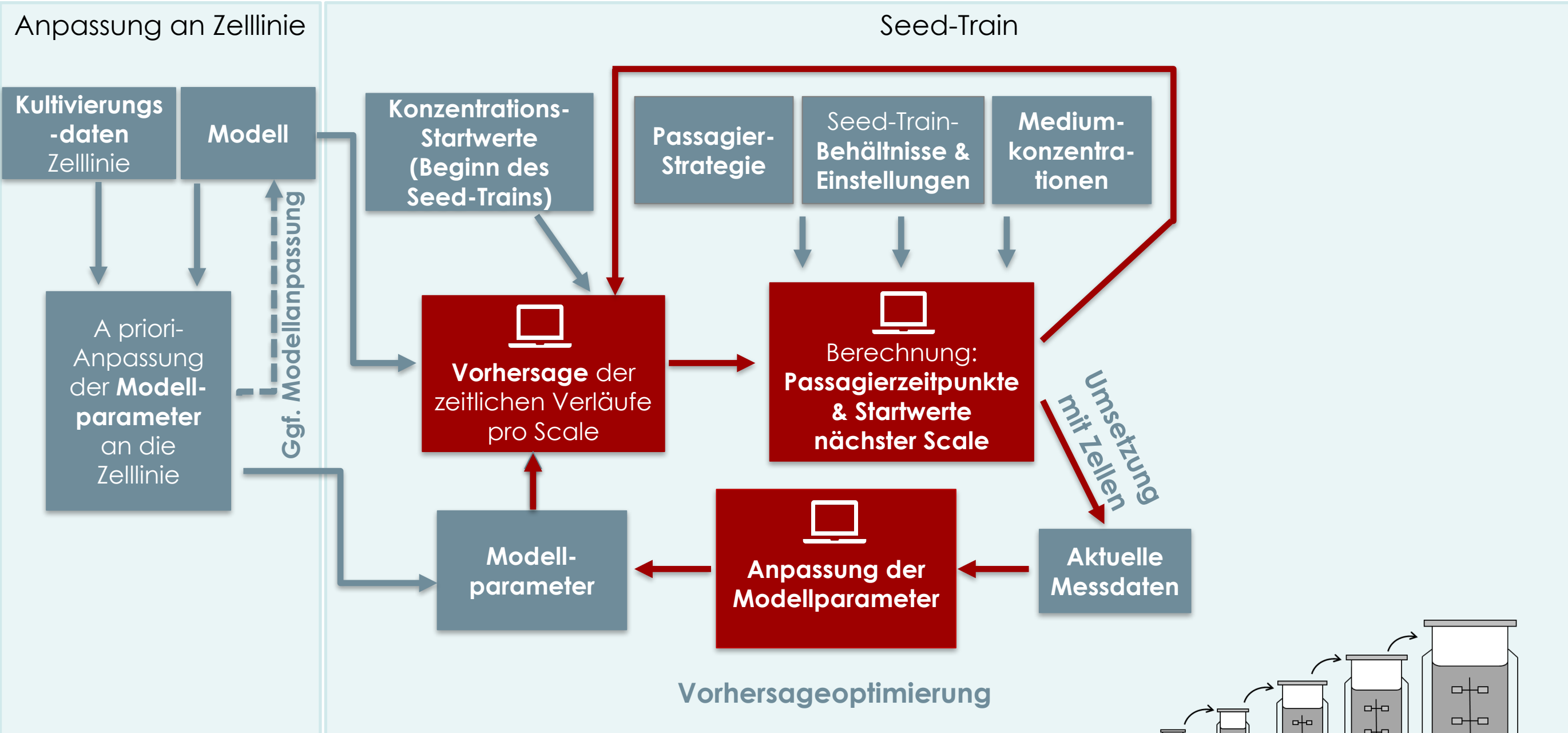
Lösen der
Differentialgleichungen mittels
ODE-Löser: ode23



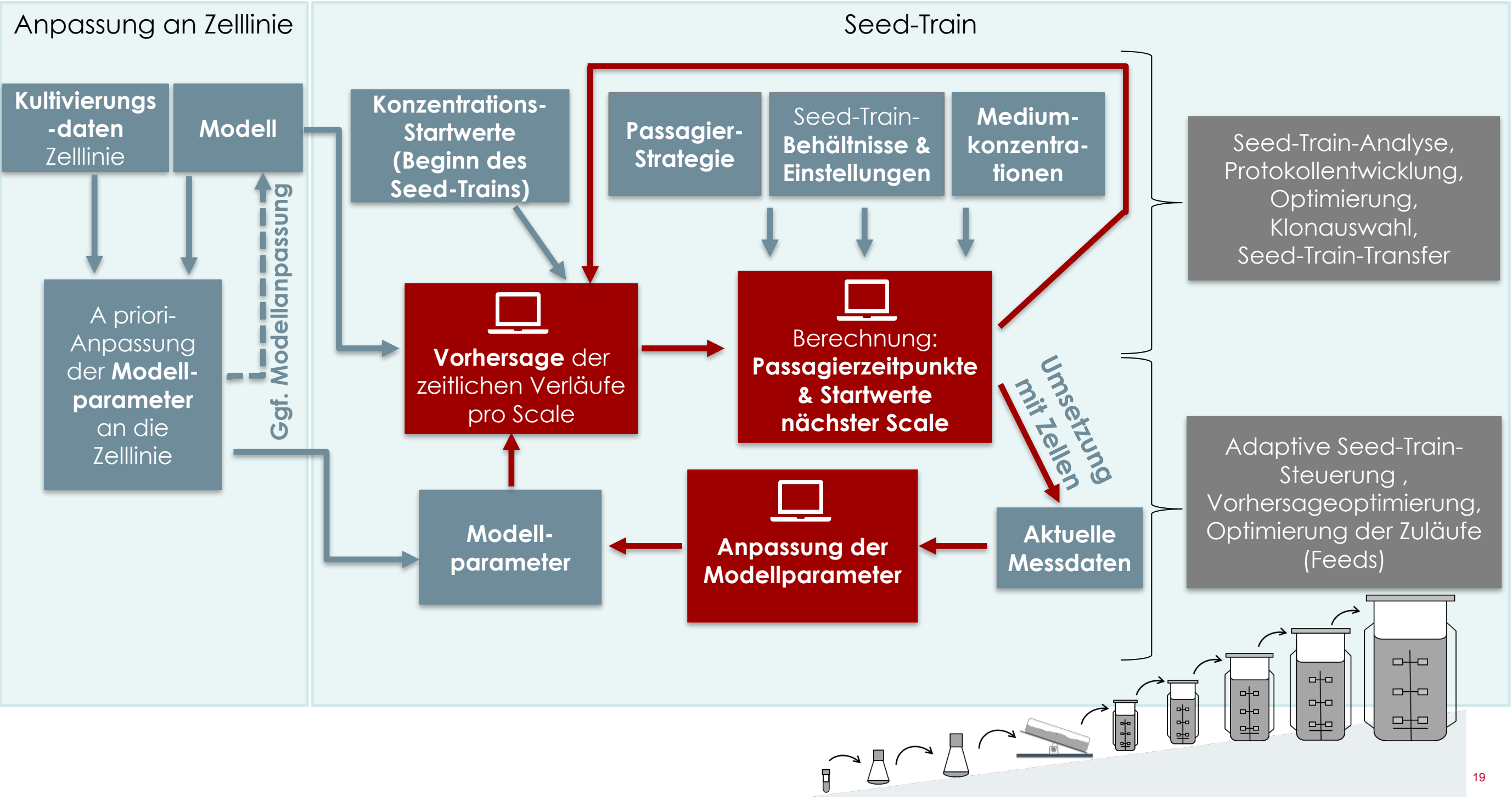
Struktur



Struktur



Struktur





Einsatzfelder und Anwendungen des Tools

Entwicklung & Produktion
(Biopharmazeutische Industrie)

Einsatzfelder

Forschung (Hochschulen &
Universitäten)

Optimierung eines
bestehenden Seed-Trains
hinsichtlich Zellausbeute
(→ Zeit- und
Kostenoptimierung)

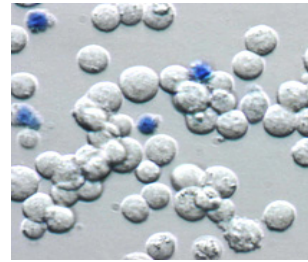
Anwendungs- Möglichkeiten

Planung eines Seed-Trains für
ein anderes Produkt oder eine
andere Produktionsstätte

Online-Entscheidungshilfe bzgl. der nächsten Prozessschritte
mittels Vorhersage,
z.B. Zeitpunkt für den Transfer von einem Scale in den
nächsten

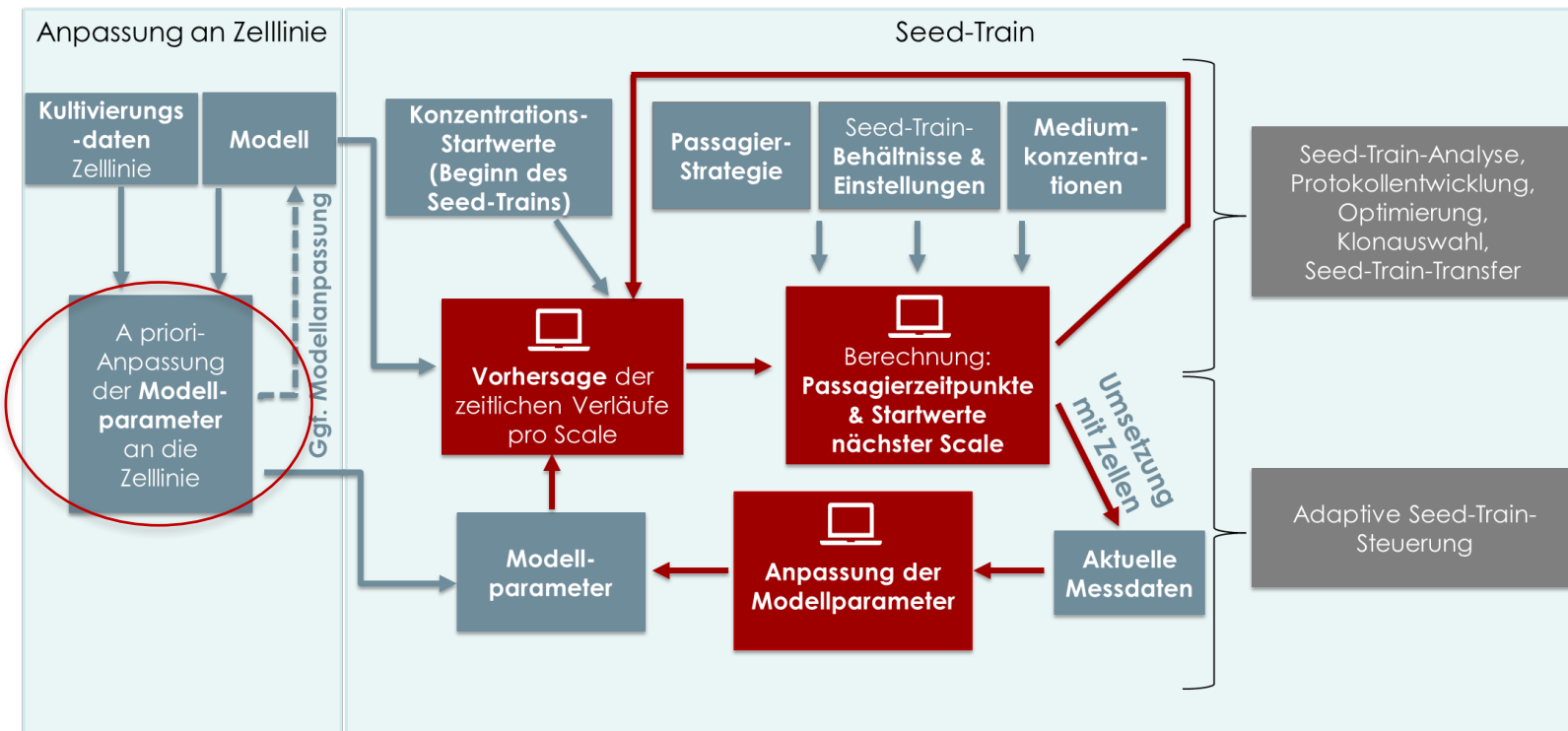
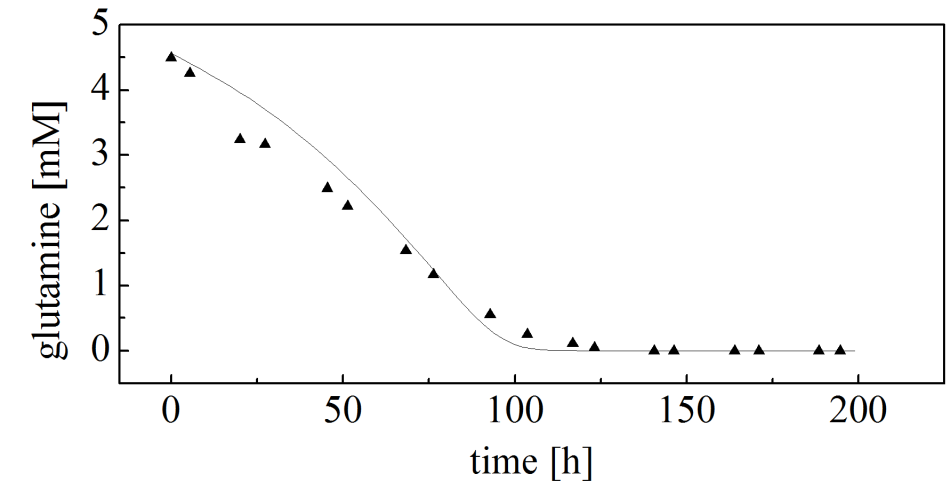
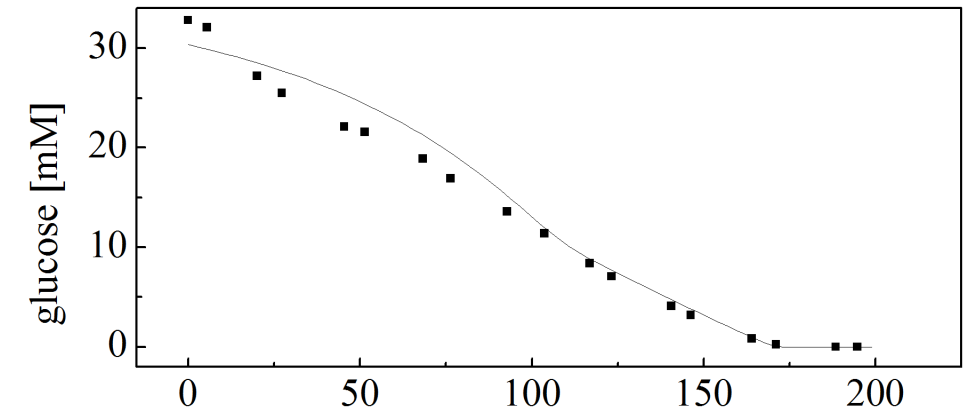
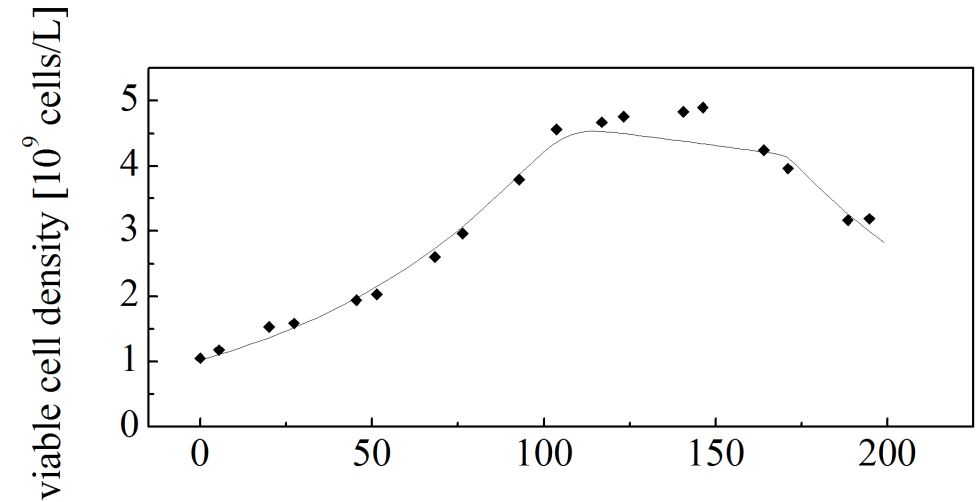
Ein Blick auf Anwendungen / Verifizierungen

Parameterschätzung der Modellparameter einer **AGE1.HN_{AAT}-Zelllinie** basierend auf zwei Datensätzen

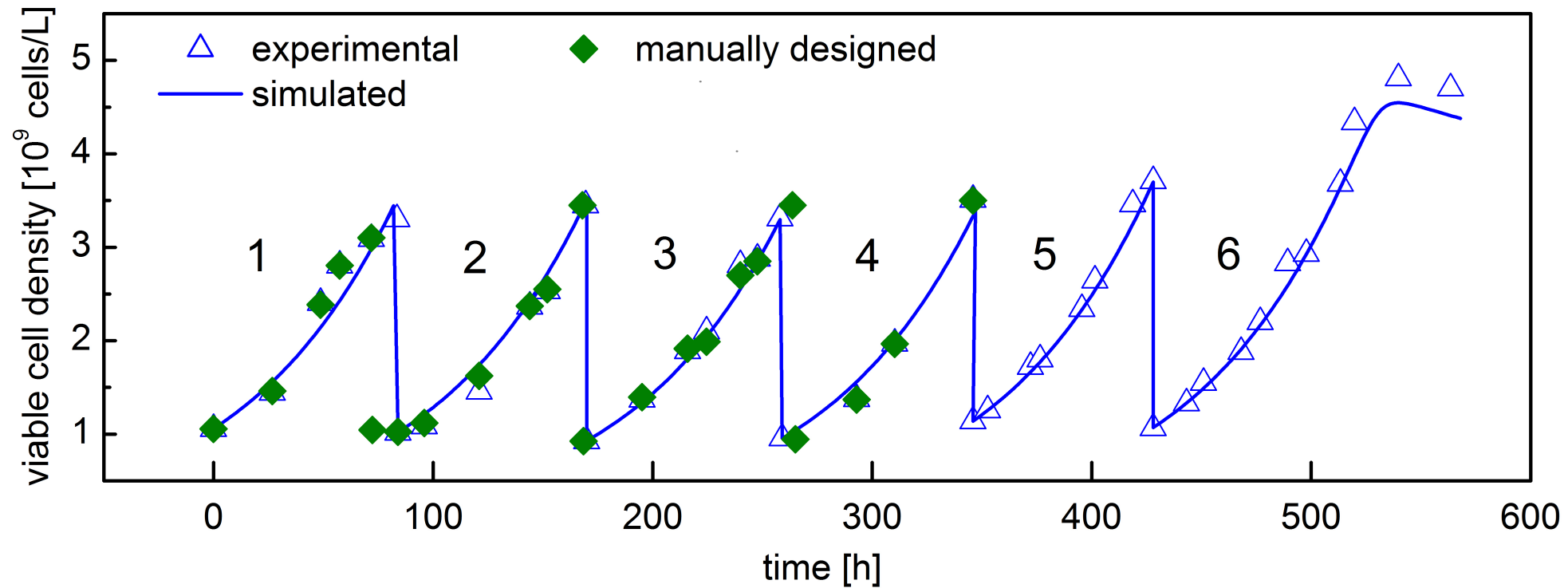


Quelle: ProBioGen, SysLogics

- Menschliche Zelllinie (ProBioGen AG, Berlin, Germany)
- Produziert das therapeutische Protein α -1-Antitrypsin



Verifizierung Vorhersage - Zelllinie AGE1.HN_{AAT} und Vergleich zur einer manuellen Optimierung



Seed-Train über 6 Scales:

1. culture tube (0.01 L)
2. shake flask (0.035 L)
3. shake flask (0.13 L),
4. Vario 1000 (0.35 L)
5. VSF 2000 (1 L)
6. Labfors 5 Cell (2.5 L)

Simulierter Verlauf

Experimentelle Daten
der Durchführung

Experimentelle Daten
eines manuell
entworfenen Verlaufs

Gute Seed-Train-Auslegung

Weitere Anwendungen

Seed-Train-Vorhersage
CHO-K1-Zelllinie

Modellierung
industrieller Seed-Trains
bis in den großskaligen
Produktionsmaßstab

Sensitivitätsanalyse

Fazit

Erfolgreiche Erstellung
eines umfangreichen
Optimierungs-Tools

Ausblick

- Implementierung zusätzlicher Funktionen
- (z.B. Einbinden von Unsicherheit → Vorhersagebereiche, Evaluation der Modellgüte,...)
- Weitere Untersuchungen
- Weiterer industrieller Einsatz

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

M. Sc. Tanja Hernández Rodríguez, Prof. Dr.-Ing. Björn Frahm
FB4 – Life Science Technologies

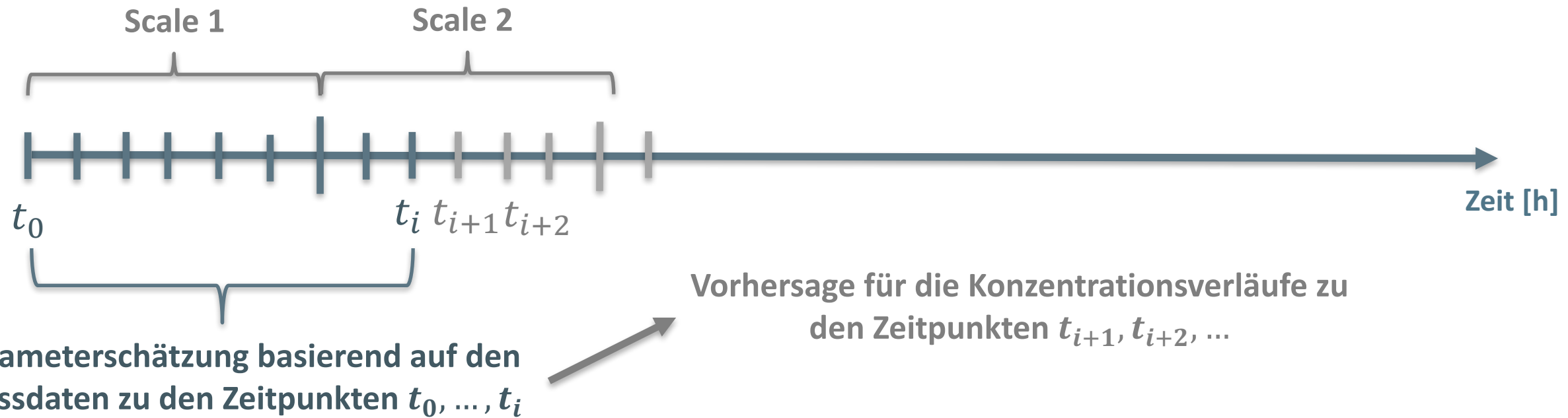
Telefon +49 5261 – 702 5399 (Tanja Hernández Rodríguez), +49 5261 – 702 5662 (Björn Frahm)
Telefax +49 5261 – 702 85662
tanja.hernandez@hs-owl.de, bjoern.frahm@hs-owl.de
www.hs-owl.de/fb4

Back up: Sensitivitätsanalyse

- Modellparameter einer CHO-K1-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von Prof. Noll, Universität Bielefeld)
- Variation der Startwerte (I), der wichtigen Mediumkonzentrationen (II) und der zellspezifischen Modellparameter (III) um +/-5 % .
- Der Einfluss auf den Passagierzeitpunkt wurde mit Hilfe eines vollfaktoriellen Versuchsplans (*one factor at a time (OFAT)*) untersucht.
- Passagierzeitpunkt: Mittelung aus Zeitpunkt der optimalen Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) und Zeitpunkt, bei dem die scheinbare Wachstumsrate auf 90 % der maximalen scheinbaren Wachstumsrate abgefallen ist.

	Deviation 0 %	Deviation < 1 %	Deviation 1 - 5 %	Deviation 5 - 7 %
(I) Seed train starting conditions	c_{Glc} (95 % / 105 %)	c_{Gln} (95 % / 105 %)	X_v, X_t (95 % / 105 %)	
	c_{Lac} (95 % / 105 %)			
(II) Important medium concentrations	$c_{Lac,medium}$ (95 % / 105 %)	$c_{Gln,medium}$ (95 % / 105 %)		
	$c_{Glc,medium}$ (95 % / 105 %)			
(III) Cell line parameters for model	k_{Glc} (95 % / 105 %)	$K_{S,Gln}$ (95 % / 105 %)	$q_{Gln,max}$ (95 % / 105 %)	μ_{max} (95 % / 105 %)
	$\mu_{d,max}$ (95 % / 105 %)	$\mu_{d,min}$ (95 % / 105 %)	k_{Gln} (95 % / 105 %)	
	K_{Lys} (95 % / 105 %)			
	$K_{S,Glc}$ (95 % / 105 %)			
	$q_{Lac,uptake,max}$ (95 % / 105 %)			
	$Y_{Lac/Glc}$ (95 % / 105 %)			
	$q_{Glc,max}$ (95 % / 105 %)			
$Y_{Amm/Gln}$ (95 % / 105 %)				

Back up: Wesentliche Elemente – Optimierte Vorhersage



- Sequentielle Vorhersagen: Nach jeder neuen Messung erneute Parameterschätzung
- Verbesserung der Vorhersage
 - Bewegliches Zeitfenster „Moving Horizon“
 - Entscheidungshilfe bzgl. der nächsten Prozessschritte