

Применение центробежных сепараторов для отделения клеточных культур млекопитающих от культуральной жидкости

■ Питер Роуз, компания «Альфа Лаваль»

Питер Роуз, компания «Альфа Лаваль», подготовил обзор одной из быстро развивающихся областей фильтрации и сепарации в фармацевтической биотехнологии — отделение клеток млекопитающих от культуральной жидкости при производстве новых лекарственных средств. В статье исследуется происхождение технологий, применяемых в данной отрасли промышленности, и рассматриваются новейшие разработки.

Мы — млекопитающие — состоим из клеток. Ваше отражение в зеркале может выглядеть весьма целостным, но то, что вы видите на самом деле, представляет собой около 10 триллионов клеток, подразделяющихся примерно на 200 различных типов. Эти группы клеток довольно специализированы: печень состоит из клеток печени, мышцы — из специальных мышечных клеток, и так далее.

Выращивание и сбор клеток млекопитающих вне организма — в лабораторных или промышленных условиях — для производства новых лекарств является одним из интереснейших направлений современной медико-биологической промышленности. Однако, сколь бы неправдоподобным это ни казалось, начало этим гигантским достижениям медицинской науки положило расчленение цыпленка однажды в конце 19-го столетия, точнее — в 1885 году. Именно тогда Вильгельму Ру (Wilhelm Roux) удалось несколько дней поддерживать жизнедеятельность медуллярной пластинки вышеупомянутого эмбриона цыпленка в теплом солевом растворе, тем самым впервые заложив основы принципа культуры тканей.

Его работа получила определенное дальнейшее развитие в трудах ученых Медицинского института имени Джона Хопкинса и Йельского университета в первом десятилетии 20-го века. В 1940-х и 1950-х гг. вирусы, выращенные в клеточных культурах, использовались в производстве вакцин. Эти вакцины против полиомиелита, окончательно устранившие угрозу его распространения, были выращены в культурах клеток из почек обезьяны.

В наши дни, разумеется, производство лекарств на основе клеточных культур — одна из наиболее быстро развивающихся отраслей биотехнологии. Его стремительный прогресс во многом объясняется параллельным развитием технологий трех основных стадий выращивания культуры клеток: ферментации, сбора и очистки.

Сбор осуществляется путем отделения клеточной культуры от питательной среды, и для выполнения этой деликатной операции используются несколько технических приемов: центрифугирование, микрофильтрация, глубинная фильтрация и фильтрация через мембраны с порами абсолютного размера. Из этих разных технологий наиболее масштабный переход от лабораторного уровня к промышленному совершили центрифугирование.

Центрифугирование, в котором используется разность плотностей твердых частиц и окружающей



Система Culterfuge 100 производства «Альфа Лаваль» для отделения клеток

жидкости, ускоряет осаждение, при обычных условиях происходящее во время отстаивания. В большинстве промышленных установок применяются тарельчатые сепараторы, удаляющие клетки и клеточный детрит из культуральной жидкости. Тарельчатые сепараторы могут работать в непрерывном режиме, благодаря чему их производительность соотнобразует с желанием сократить время разделения.

Естественно, всё не так просто, как может показаться. Клетки млекопитающих — очень хрупкие организмы, поэтому, несмотря на то, что тарельчатый сепаратор делает сепарацию относительно простой, тонкость заключается в том, чтобы она происходила с минимальным повреждением продукта. Ускорение насыщенного белками подаваемого материала занимает доли секунды. Однако, хотя скорость и очень важна, она не должна приводить к разрушению исключительно чувствительной к сдвигу мембраны клеточной стенки и, как следствие, нежелательному попаданию внутриклеточных белков в культуральную жидкость — процессу, известному как лизис.

Путем предотвращения дополнительного лизиса во время ускорения можно увеличить производительность сепаратора без ущерба для требуемого результата сепарации. Кроме того, дальнейшая очи-

стка целевых белков упрощается и может осуществляться с использованием более компактного оборудования, за счет чего производство становится гораздо рентабельнее. Проблема, следовательно, в том, чтобы добиться максимальной эффективности сепарации при минимальном разрушении клеток.

Современное оборудование для сбора культур клеток ведет свое происхождение от столь же скромных прототипов, как и сами культуры в их нынешних разновидностях. По существу, еще на самых ранних стадиях развития науки выращивания клеточных культур, когда фирма «Альфа Лаваль» в сотрудничестве с лидерами индустрии разрабатывала системы для их ферментации в крупных масштабах, вскоре стало очевидно, что характеристики культур требуют таких конструкций сепараторов, которые обеспечивают бережное отделение клеток. Решением, к которому пришли инженеры, был полый вал, прототипами которого послужили концепции, изначально разработанные для молочной промышленности, где плавный режим работы использовался для предотвращения распада частиц жира в молоке от сдвигающего воздействия при разгоне. Десятилетия спустя та же самая технология является одним из краеугольных камней получения клеточных культур на современном оборудовании.

Как и в случае многих инноваций, начальный задел имел мало общего с конечным результатом. Когда инженеры «Альфа Лаваль» первоначально решили изучить применимость того или иного сепаратора, обеспечивавшего выброс жидкости под давлением, они думали не о молоке, а о пиве. Целью была очистка пива путем сепарации без впуска воздуха и под достаточным давлением для предотвращения потери углекислого газа.

Единственным рациональным способом получения замкнутой системы была подача жидкости в резервуар снизу, через трубчатый шпиндель, и ее выброс через горловину. Построенная экспериментальная машина для очистки пива была испытана и на молоке, поскольку считалось, что она может решить проблему сепарации и в этом случае. Что она и сделала.

Решение для обработки молока выглядело экономически более выгодным. Инженеры модифицировали первоначальную конструкцию машины, оснастив ее двумя выпускными патрубками, чтобы ее можно было использовать и в качестве сепаратора для сливок. Испытания на одном шведском молочном заводе оказались столь успешными, что компания «Альфа Лаваль» затем выпустила несколько новых сепараторов для демонстрации на Германской сельскохозяйственной выставке 1933 г. в Берлине. Этот первый герметичный сепаратор коренным образом изменил технологии производства молока и пива.

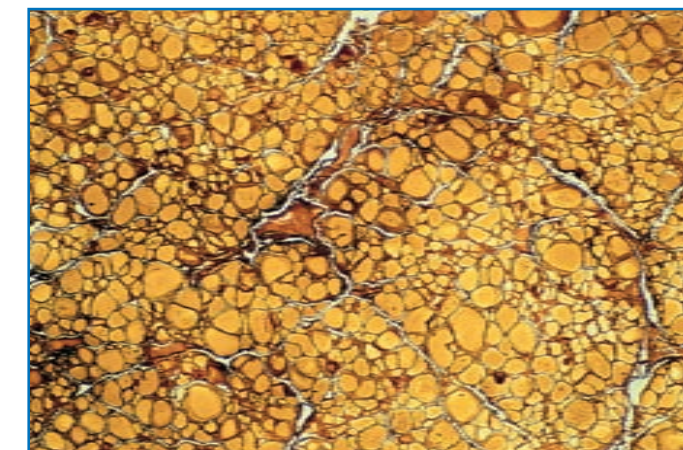
Как и подобало принципиально новой единице оборудования, герметичный сепаратор с полым валом выглядел абсолютно иначе, чем более ранние центрифуги. Корпус был разработан таким образом, чтобы выпускные патрубки для цельного молока в нижней части машины были легкодоступными.

Ни традиционный двухсекционный, ни более новый вал т.н. балтийского типа не могли быть использованы: герметичный сепаратор требовал наличия вала совершенно новой конструкции. Было решено адаптировать шпиндель от OVK 5 — самого большого в то время сепаратора для отделения дрожжей производства «Альфа Лаваль».

С верхнего конца вала, прямо под резервуаром, эластичный верхний подшипник (радиальный шари-

коподшипник) поддерживал вес резервуара, а с нижнего конца сферический шарикоподшипник обеспечивал точное перемещение шпинделя. Цельное молоко подавалось под давлением через шпиндель в нижнюю часть резервуара. Уплотнение между неподвижным впускным патрубком и вращающимся шпинделем представляло собой U-образную резиновую прокладку, армированную тканью. Молоко поступало в резервуар через центральную камеру у дна, откуда распределялось по пакету тарелок сепаратора обычным способом.

Поскольку сепаратор не имел отверстия в центре, его диаметр был значительно уменьшен по сравнению с машинами с верхней подачей. Как результат конструктивного решения в целом, все свободное пространство в резервуаре было заполнено жидкостью.



При работе с большими объемами вскоре стало очевидно, что характеристики клеточных культур требуют таких конструкций сепараторов, которые обеспечивают бережное отделение клеток

Помимо достижения главной цели — получения сливок и обезжиренного молока без пены, этот герметичный сепаратор обеспечивал ряд других преимуществ, важнейшим из которых была такая чистота отделенных сливок, какой не мог похвастаться ни один другой сепаратор. Повышенная эффективность работы машины была обусловлена двумя факторами. Во-первых, молоко разгонялось в длинном пологом вале очень плавно, что сводило к минимуму разбивание жировых шариков. Во-вторых, Alfa-диски были выполнены с меньшим внутренним радиусом, что увеличило площадь сепарации без увеличения объема барабана.

Та же герметичная конструкция полого вала стала центральным элементом Culturefuge — первой в мире специализированной полностью герметичной центрифуги для отделения клеточных культур, разработанной в основном для областей применения, охватывавших культуры клеток млекопитающих и осажденный белок. Она была призвана обеспечивать максимально плавное ускорение в центробежном тарельчатом сепараторе, специально разработанном для сбора клеточных культур.

Плавное ускорение подвергает клетки минимальным сдвиговым деформациям. Не менее важно то, что полый вал обеспечивает действительно герметичную конструкцию, которая полностью исключает образование поверхностей раздела фаз «воздух-жидкость» внутри центрифуги и тем самым исключает вспенивание — одну из главных причин снижения качества белка.



Модуль для отделения клеток Culturefuge

СОВРЕМЕННАЯ СИСТЕМА CULTUREFUGE

Трансформировавшись в современную систему сбора клеточных культур Culturefuge, вышеупомянутая технология позволила реализовать метод непрерывного сбора клеток в условиях герметичности. Смонтированная на раме, приспособленной для транспортировки, установка Culturefuge состоит из высокоскоростного тарельчатого сепаратора с системой трубопроводов для перекачки технологических жидкостей. Установка включает в себя встроенную электросистему с пускателем, программируемый логический контроллер и пневмоагрегат. В стандартную комплектацию входит электродвигатель со встроенным частотно-регулируемым приводом. Дополнительно систему можно оснастить инжектором твердых частиц, стерилизуемым паром. Конструкция Culturefuge соответствует большинству основных технических требований к сосудам под давлением, включая нормы ASME и PED.

Все детали, контактирующие с продуктом, изготавливаются из высококачественной нержавеющей стали. Предусмотрены различные степени шероховатости поверхности: Ra = 1,2 мкм, 0,8 мкм или 0,5 мкм (электрополировка). Модульная конструкция, пригодная для транспортировки, может поставляться в исполнениях для эксплуатации в открытом состоянии, в закрытом состоянии, в комплектации для проведения операции в асептических условиях со стерилизацией паром или эксплуатации только с паровым обеззараживанием.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Подаваемый материал поступает в систему Culturefuge 100 через впускной патрубок с полым шпинделем и постепенно ускоряется по мере движения вверх, за счет чего минимизируются усилия сдвига, действующие на жидкость, и предотвращается лизис клеток. Во избежание опасности смешивания подаваемого материала с воздухом, зона подачи полностью заполнена вращающейся жидкостью. Наличие абсолютно герметичного выпускного патрубка исключает возможность контакта материала с наружным воздухом, вследствие чего не происходит вспенивание и денатурация продукта.

В обычном производственном режиме рабочая вода удерживает скользящее днище барабана закрытым по отношению к колпаку резервуара. Во время разгрузки резервуара скользящее днище на короткое время (менее чем на секунду) опускается, и твердые частицы выталкиваются через выпускные отверстия. Высокая скорость выталкиваемых частиц гасится в циклонном уловителе.

Сбор клеток для разработки новых вакцин и медикаментов перешел из области научной фантастики в реальность — отчасти благодаря кусочку цыпленка и сепаратору, поначалу использовавшемуся для отделения молока от сливок, и сегодня помогает получать самый ценный товар - крепкое здоровье.

Партнёр компании «Альфа Лаваль» в России по оборудованию для фармацевтики и биотехнологий – ООО «Холдинг Фармтех».
Тел./факс (495) 940-84-11
www.pharmtech.ru

Еще одно преимущество такой конструкции состоит в том, что она обеспечивает выброс очищенной жидкости после центрифугирования при малом радиусе, вследствие чего в ходе сепарации уменьшается энергопотребление и температура поддерживается на минимальном уровне.

При изучении математической модели разрушения чувствительных к сдвигу частиц в зоне подачи центробежных сепараторов было установлено, что разрушение не зависит от расхода. Исследование, проведенное Бойчиным (Boychun) и др., имитировало поле потока в зоне ускорения традиционной центрифуги с помощью вычислительной гидродинамики (ВГД). В этом исследовании сравнивались два случая: классический, в котором в зоне подачи присутствовал воздух, и тот, в котором заполнение жидкостью происходило плавно, т.е. без наличия воздуха.

Данная методика моделирования подтвердила, что во время разгона при наличии воздуха максимальная скорость рассеяния энергии может быть вдвое выше, чем при отсутствии воздуха.

Более интенсивное рассеяние энергии приводит к гораздо большему разрушению частиц в суспензии для осаждения белка и, как следствие, к менее эффективному очищению. В более позднем исследовании Бойчина использовался аналогичный метод ВГД для моделирования ускоряющих сил в зоне ускорения многокамерного барабана. В этом случае группа исследователей была способна точно спрогнозировать характеристики центрифуги.

И, наконец, та же группа провела сравнительное исследование культуры клеток, обработанной в двух небольших тарельчатых сепараторах промышленного и полупромышленного масштабов. Один сепаратор имел классическую незаполненную зону ускорения, а другой — герметичный впускной патрубок с полым валом для плавного разгона подачи. Во всех других важных аспектах (эквивалентная площадь, частота вращения и др.) машины были идентичны. Группа обнаружила, что центрифуга с полым шпинделем обеспечивает 2,5-кратный прирост пропускной способности при той же эффективности очистки по сравнению с другим сепаратором.



Приглашаем специалистов биотехнологических и фармацевтических производств принять участие в семинаре

"Технологическое оборудование для выделения, очистки и обработки продуктов в фармацевтической биотехнологии"

06 - 07 апреля 2011 года
г. Королёв Московской области

ОРГАНИЗАТОРЫ СЕМИНАРА – ОАО "Альфа Лаваль Поток" и ООО "Холдинг Фармтех"

Начало семинара 6-го апреля в 9-30, окончание – 7-го апреля в 16-00.

Темы семинара:

- ✓ Оборудование для выделения и очистки продуктов биотехнологии и фармацевтики Alfa Laval
- ✓ Установки для дезагломерации, эмульгирования, микрокапсулирования и дезинтеграции клеток Microfluidics
- ✓ Системы водоподготовки и стерилизации для фармацевтических производств Bosch
- ✓ Современные технологии выделения и очистки биофармацевтических препаратов Millipore
- ✓ Полимерные соединительные системы/шланги/фитинги для биотехнологий от компании Saint-Gobain Performance Plastics
- ✓ Сублимационное оборудование Shanghai Tofflon – использование автоматических систем загрузки и разгрузки, в том числе в изоляторном исполнении

Для получения информации просим обращаться:

Холдинг Фармтех

Степанова Ирина Ивановна, Зайцева Валерия Владимировна
тел. (495) 940-84-11, Irina.Stepanova@pharmtech.ru, Valeria.Zaitseva@pharmtech.ru
www.pharmtech.ru

Альфа Лаваль Поток

www.alfalaval.ru

Проживание для иногородних организовано в гостинице "Новые горки", г. Королёв. Для москвичей и проживающих в других отелях будет предоставлен автобус от ст.м. ВДНХ. Вся дополнительная информация будет выслана в письменном виде по Вашему запросу.

Количество участников ограничено.

Биотехнологам, начальникам производств и главным инженерам участие в семинаре может быть предоставлено бесплатно.