

Ciklusidő csökkentésének lehetőségei gyengített vírusvakcinák liofilizálása során

Cycle Time Analysis in the Lyophilization Process of Attenuated Virus Vaccines

SZÁVICCS Nikolett¹, JAKAB Zoltán², POÓS Tibor PhD³

¹ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Épületgépészeti és Gépészeti Eljárástechnika Tanszék, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3., D épület 110., Tel.: +36 1 463 2529
szavnik@gmail.com

² Ceva Santé Animale, H-1107 Budapest, Szállás utca 5.
zoltan.jakab@ceva.com

³ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Épületgépészeti és Gépészeti Eljárástechnika Tanszék, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3., D épület 110., Tel.: +36 1 463 2529
poos.tibor@gpk.bme.hu

Abstract

One of the primary bottlenecks in the industrial production of live attenuated virus vaccines is the extremely long duration of freeze-drying cycles. Since the stability of these products can only be guaranteed within a narrow temperature range, increasing efficiency requires technological optimization while strictly adhering to safe operating limits. In this research, we investigated the possibilities of cycle time reduction using a dynamic process model based on the mechanical parameters of an industrial scale unit. During the simulations, the collapse temperature (T_c) and the glass transition temperature (T_g) known from literature were considered the primary physical constraints. Our results confirm that reserves exist in empirical technological recipes, by shortening the post freezing dwell stages and implementing dynamic, near limit control of the shelf temperature profile, the primary drying time can be reduced without compromising the quality of the final product.

Keywords: Lyophilization, cycle time reduction, primary and secondary drying, process modeling

Kivonat

Az élő, gyengített vírusvakcinák ipari előállításának egyik legfőbb gátja a liofilizálási ciklusok rendkívül hosszú időigénye. Mivel a készítmények stabilitása csak szűk hőtartományban garantálható, a hatékonyság növelése a biztonságos üzemi tartományok szigorú betartása mellett, technológiai optimalizálással érhető el. Jelen kutatásban egy ipari berendezés gépészeti paramétereire alapozva vizsgáltuk a ciklusidő csökkentésének lehetőségeit egy dinamikus folyamatmodell segítségével. A szimulációk során az irodalmi adatokból ismert összeomlási hőmérsékletet (T_c) és az üvegesedési hőmérsékleti pontot (T_g) tekintettük elsődleges fizikai korlátoknak. Eredményeink igazolják, hogy a tapasztalat alapján rögzített technológiai receptekben tartalékok rejlenek, a fagyasztás utáni várakozási szakaszok rövidítésével és a polchőmérséklet profil dinamikus, határérték közeli szabályozásával az elsődleges szárítás ideje csökkenthető a végtermék minőségének veszélyeztetése nélkül.

Kulcsszavak: Liofilizálás, ciklusidő csökkentés, elsődleges és másodlagos szárítás, folyamatmodellezés

1. BEVEZETÉS

A liofilizálás a gyógyszeripar alapvető stabilizálási eljárása, amely elengedhetetlen a hőérzékeny biológiai hatóanyagok hosszú távú eltarthatóságához [1]. Élő, gyengített vírust tartalmazó vakcinák gyártása során a technológia elsődleges célja a vírusok biológiai integritásának és hatóanyagtartalmának megőrzése, melyet teljes dehidratálással lehet elérni. Fontos alapfeltétel, hogy a vizsgált gyógyszeripari oldatok jellemzően cukrot, puffert, polimereket és hatóanyagot tartalmaznak így a tiszta víztől eltérő fagyasztási és szárítási

határfelületek érvényesek. Ezen amorf rendszerek termikus viselkedését olyan paraméterek határozzák meg, mint az üvegesedési hőmérséklet (T_g'), az eutektikus pont (T_{eu}) és az összeomlási hőmérséklet (T_c) [2].

Ezek a biológiai rendszerek rendkívül érzékenyek, nem megfelelő hőmérséklet vagy nyomásviszony mellett az anyag összeomlik, és a porózus mátrix szerkezet helyett egy ragacsos amorf massa lesz magas nedvességtartalommal ami nem használható később oltóanyagként. Liofilizálás során az anyagot megfagyasztják, majd vákuum alatt alacsony hőmérsékleten a nedvesség szublimáció útján távozik a termékből [3]. Liofilizálás során a szárítási szakasz két részre bontható, az elsődleges szárítás során nedvesség közel 95%-os eltávolítható szublimáció útján. Ezt követi a másodlagos szárítás, gyakran deszorpciós szakasznak nevezett rész, mely a maradék nedvesség kötött formáját távolítja el szintén vákuumban történő szárítás közben. A folyamat gazdasági hatékonyságának legfőbb gátja a művelet energiaigénye mellett a rendkívül magas időigénye, az ipari ciklusok hossza gyakran eléri a 70–100 órát, ami jelentős szűk keresztmetszetet jelent a kapacitásban. Nagyon fontos a liofilizálási ciklusok pontos megtervezése, ebben az esetben az optimalizálás egyik fő fizikai korlátja az adott termék összeomlási, illetve üvegesedési hőmérséklete. A vizsgálat során szakirodalmi adatok és ipari tapasztalatok alapján rendszereztük a ciklusidőt befolyásoló főbb tényezőket és egymásra gyakorolt hatásukat, ciklusidő csökkentés lehetőségét. Ezekre támaszkodva építettük fel a koncentrált paraméterű dinamikus modellt. Mivel a szakirodalomban elérhető források jelentős része állandósult állapotú közelítésekre épít, a jelen kutatás célja egy időfüggő folyamatmodell alapjainak lefektetése, amely a dinamikus változók kezelésével pontosabb alapot adhat a ciklusidő csökkentési lehetőségek elemzéséhez a kamranyomás és a termék hőmérséklet közötti csatolt viselkedéssel. A szimulációk segítségével vizsgáltuk, hogy a tapasztalati alapon kialakított technológiai receptek tartalmaznak biztonsági időtartalékokat, illetve hogy a polchőmérséklet dinamikus, határérték közeli szabályozásával csökkenthető-e a ciklusidő a termék károsodása nélkül. A modell így előzetes döntéstámogató eszközként alkalmazható a receptúrák racionalizálására és a kritikus paraméterek érzékenységének vizsgálatára.

2. A BERENDEZÉS ÉS A LIOFILIZÁLÁSI CIKLUS ISMERTETÉSE

Az ipari liofilizáló berendezés alapvetően egy vákuumkamrából és kondenzátorból áll. A kamrában hőközlő folyadékkal temperált polrendszer helyezkedik el, a kívánt paraméterek fenntartásáról hűtőkompresszor és vákuumrendszer gondoskodik. A vírusvakcinát tartalmazó fiolák a polcokon helyezkednek el, a hőközvetítés döntően hővezetés útján történik. A szublimáció során keletkező vízgőz a kamrából a kondenzátor felé áramlik, ahol alacsony hőmérsékleten lecsapódik és kifagy. A kamranyomást a vákuumszivattyú és a szabályozószelep együttese tartja a kívánt tartományban. Gépészeti szempontból a liofilizáló berendezés egy olyan összetett rendszert alkot, ahol a polcfűtés biztosítja a fázisátalakuláshoz szükséges látens hőt, miközben a vákuumrendszer és a kondenzátor hűtőfelülete tartja fenn a szublimációhoz elengedhetetlen alacsony nyomásszintet. A ciklus három fő szakaszból épül fel. A fagyasztás során a teljes víztartalom kristályosítása történik, amely meghatározza a későbbi szárítási szerkezetet [3]. Az elsődleges szárítás alatt a jég szublimációval távozik. Ez a ciklus leghosszabb és energetikailag legmeghatározóbb része. A másodlagos szárítás célja a kötött víz eltávolítása, amely magasabb hőmérsékleten, de továbbra is alacsony nyomáson zajlik. Tapasztalati receptek alkalmazása esetén a ciklus jellemzően biztonsági tartalékokat tartalmaz. Ezek a tartalékok csökkentik a minőségi kockázatot, ugyanakkor növelik az összes ciklusidőt. A ciklusidő alakulását több, egymással kölcsönhatásban álló technológiai és termékoldali paraméter határozza meg. Egyes változók közvetlenül szabályozhatók a berendezésen keresztül, míg mások a termék fizikai tulajdonságaiból vagy a gyártási követelményekből adódnak. Az optimalizálás során ezért nem csupán az egyes paraméterek iránya, hanem azok korlátai és egymásra gyakorolt hatása is meghatározó. A technológiai paraméterek mellett az üzemi tapasztalatok azt mutatják, hogy a berendezés műszaki állapota és a rendszeres karbantartás is közvetlen hatással van a ciklusidőre. A vákuumtömítések integritása, a kondenzátor felületének tisztasága, valamint a hőközlő szivattyúk pontos kalibrációja elengedhetetlen a beállított értékek stabil tartásához. Ha a hőátadás romlik vagy a vákuum instabil, a szárítási ciklus meghosszabbodik, ami jelentős többletenergiát igényel. Az optimalizálás tehát csak stabil műszaki alapokon és precíz monitorozás mellett valósítható meg. Fontos kiemelni, hogy az elsődleges szárítás során a polchőmérséklet és a kamranyomás nem független optimalizációs paraméterek, hanem a hő- és tömegátadás rendszerén keresztül kölcsönhatásban állnak. A polcra érkező hőáram növeli a szublimációs tömegáramot, ami lokálisan módosítja a gőznyomás viszonyokat, ez pedig visszahat a szublimáció hajtóerejére. A gyakorlatban alkalmazott receptek azért tartalmaznak jelentős biztonsági tartalékokat, mert az összeomláshoz közeli tartományban a folyamat érzékenysége és az instabilitás jelentősen megnő. A ciklusidőt befolyásoló főbb tényezőket az 1. táblázat foglalja össze.

A ciklusidőt befolyásoló tényezők rendszerezett áttekintése

1. táblázat

Ciklusszakasz	Paraméter	Szabályozhatóság	Hatás a ciklusidőre	Korlát
Fagyasztás	Hűtési rámpa (dT/dt_{freeze})	Részben	Meredekobb rámpa, rövidebb lehűtési idő	Hűtési kapacitás, kondenzátor
Elsődleges szárítás	Polchőmérséklet (T_{shelf})	Igen	Emelésével a szárítás gyorsul	Összeomlási hőmérséklet (T_c)
Elsődleges szárítás	Kamranyomás (p_{ch})	Igen	Csökkentésével a szublimáció hajtóereje nő	Hőátadási romlás
Elsődleges szárítás	Felfűtési dinamika (dT_{shelf}/dt)	Igen	Átmeneti szakasz rövidül	Túllendülés
Elsődleges szárítás	Terméktömeg (m_p)	Nem	Növelésével a szárítási idő nő	Gyártási követelmények
Elsődleges szárítás	Száradó réteg vastagodása (R_p)	Nem	Tömegáram csökken	Anyagszerkezet
Másodlagos szárítás	Emelt hőmérséklet	Igen	Idő mérsékelt csökkenthető	Termék hatóanyag stabilitás

Az 1. táblázat adatai alapján a főbb optimalizációs mozgástér az elsődleges szárítás szakaszában található. Ebben a fázisban a polchőmérséklet emelése és a kamranyomás csökkentése közvetlenül gyorsítja a folyamatot, azonban a technológiai határokat a termék összeomlási hőmérséklete és a berendezés hűtési kapacitása jelöli ki. A ciklusidő hatékony csökkentése lehetősége ezért a paraméterek összehangolt, dinamikus vizsgálatát igényli. Ezen paraméterek és összefüggések hatását a következő fejezetben részletezett dinamikus folyamatmodell segítségével használtuk fel.

3. DINAMIKUS MODELL ÉS SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT

A teljes liofilizálási ciklus időbeli leírására egy koncentrált paraméterű, dinamikus folyamatmodellt alkalmaztunk. A modell célja a kamranyomás és a termék hőmérséklet csatolt időbeli viselkedésének vizsgálata volt. A folyamat hajtóerejét a jégfelszínen kialakuló telítési gőznyomás és a kamra parciális gőznyomása közötti különbség adja. A vákuumkamra vízgőzére felírt tömegmérleg (1) egyenlete azon alapult, hogy ideális gáztörvény közelítést alkalmazva a vízgőz parciális nyomásának időbeli változása kifejezhető a szublimációs és az elszívott tömegáramok különbségeként. Feltételezve, hogy a kamratérfogat állandó, és a kamranyomást a vízgőz parciális nyomása dominálja, a mérleg az alábbi alakban írható fel a [4] és [5] összefüggések alapján:

$$\frac{dp_{ch}}{dt} = \frac{R_u T_{ch}}{V_{ch} M_w} (\dot{m}_{sub} - \dot{m}_{out}) \quad (1)$$

Ahol (\dot{m}_{sub}) a termékből távozó szublimációs, (\dot{m}_{out}) pedig a vákuumrendszer által elszívott tömegáram. Figyelembe véve az ipari léptékű terméktömeg (m_p) hőtehetetlenségét felírható egy energiamérleg. Ez figyelembe veszi a polcra érkező hőáramot, a terméktömeg hőtehetetlenségét, valamint a szublimáció látens hőigényét (Δh_{sub}). Ennek eredményeként a termék hőmérséklet időbeli változását leíró differenciálegyenlet a következő összefüggés:

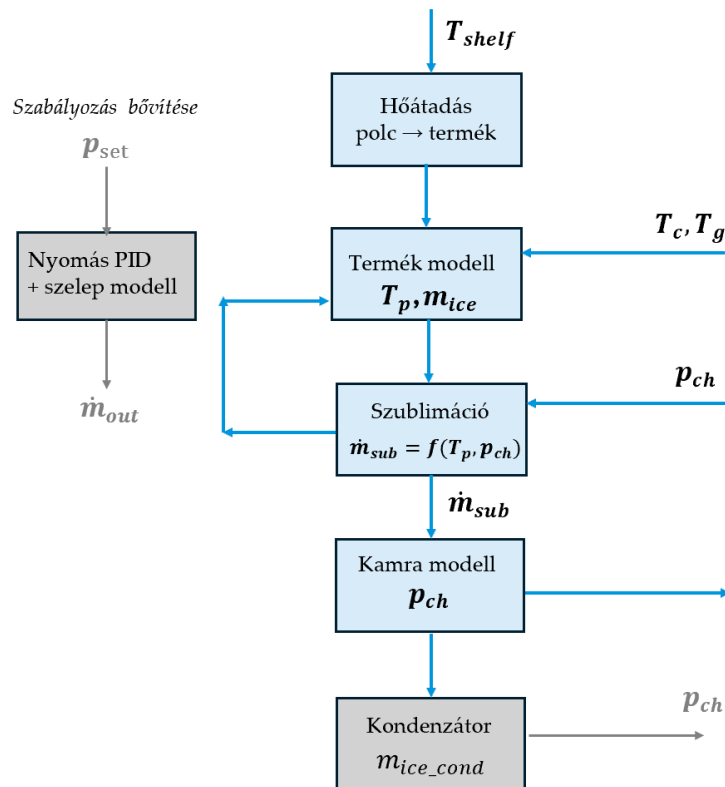
$$m_p c_p \frac{dT_p}{dt} = k A_{prod} (T_{shelf} - T_p) - \dot{m}_{sub} \Delta h_{sub} \quad (2)$$

A kamra tömegmérlege és a termék energiamérlege a szublimációs tömegáramon keresztül csatolt rendszert alkotnak. Ezt a szublimációs tömegáram kapcsolja össze, amelyet a (3) egyenlet ír le. Ennek hajtóereje a jég felszínén uralkodó egyensúlyi gőznyomás ($p_{v,ice}$) és a kamranyomás (p_{ch}) különbsége. A folyamat sebességét a száradó termékréteg anyagszerkezeti ellenállása (R_p) korlátozza. A száradt réteg vastagodásával a vízgőz kiáramlása egyre nagyobb áramlási ellenállásba ütközik, ami a szublimáció tömegáramának fokozatos csökkenését eredményezi:

$$\dot{m}_{sub} = \frac{A_{prod} (p_{v,ice} - p_{ch})}{R_p} \quad (3)$$

A modell paramétereit az ipari berendezés és a vizsgált vakcinatartalmú fiolák geometriai adatai alapján határoztuk meg. Ez a matematikai keretrendszer tette lehetővé a ciklus szimulációját és a technológiai paraméterek anyagszerkezeti határok mentén történő vizsgálatát, egyszerűsítések mellett.

A modell MATLAB Simulink környezetben, alrendszerre (termék, szelep, kondenzátor, vákuumkamra) bontva épült fel. A dinamikus csatolást két integrátorblokk biztosítja, amelyek zárt visszacsatolási hurkot alkotnak. A hőmérsékleti hurok a telített gőznyomáson keresztül határozza meg a szublimációs tömegáramot, míg a tömeg-hurok a vákuumkamra nyomásviszonyaiért felel. A bemutatott modell jelenleg közelítő jellegű, több rögzített korláttal dolgozik, így elsősorban a rendszeregységek közötti kapcsolódások szemléltetésére alkalmas. Rövid távú dinamikai válaszok leképezésére, mint például vákuum ráadása, polcfűtés indítása megfelelő, azonban egy teljes, 100 órát meghaladó ipari ciklus stabil szimulálására további finomításokat és részegységeket igényel. A numerikus stabilitást a szelep alrendszer négyzetgyökös nyomáskülönbség képlete, valamint a kondenzátor jégréteg dinamikája biztosítja, utóbbi a jég hőszigetelő hatását is figyelembe veszi. A szimuláció során a készítmény üvegesedési (T_g) és összeomlási hőmérsékletét (T_c) tekintettük elsődleges fizikai korlátoknak, amelyek meghatározzák a polchőmérséklet profil biztonságos tartományát. A géppoldali beavatkozások ellenőrzésére egy Python alapú, Matplotlib vizualizációval ellátott algoritmus is kidolgozásra került, amely alapul szolgál a későbbi modellfejlesztésekhez, illetve eredmények szemléltetésére alkalmas. A modellt, és a benne lévő logikai kapcsolatot az első ábrán látható blokkdiagram szemlélteti.



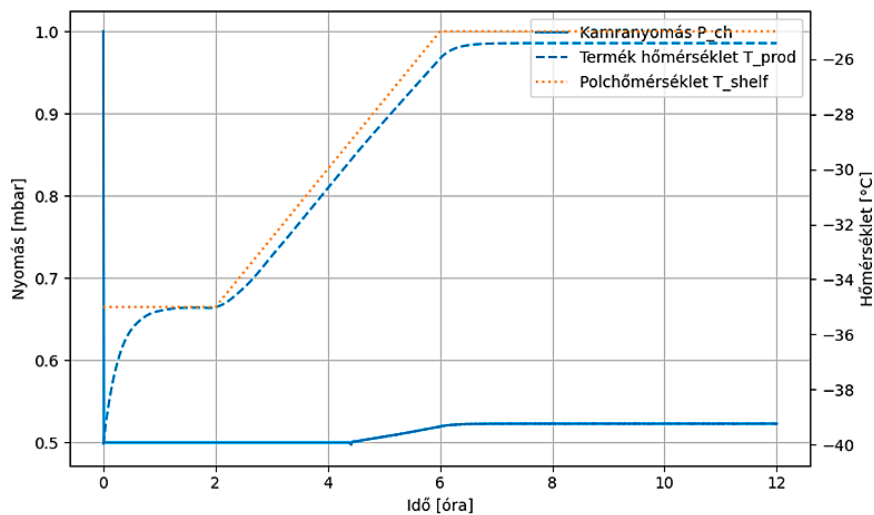
1. ábra A liofilizálási folyamat dinamikus modelljének blokkdiagramja

A modell kiindulópontja a polchőmérséklet, amely a hőátadási blokkon keresztül meghatározza a termékhez közvetített hőáramot. Ez a hőbevitel a termék modellben jelenik meg, ahol a termék hőmérséklet és a jégtartalom időbeli változása kerül leírásra. A szublimációs blokk a termék állapotából és a kamranyomásból számítja a keletkező vízgőz tömegáramát. Ez a tömegáram a kamra modellbe jut, ahol a nyomás alakulását a keletkező és az elszívott gázáram egyensúlya határozza meg ($\dot{m}_{sub} - \dot{m}_{out}$). A kamranyomás nem csupán eredménye a folyamatnak, hanem visszahat a szublimáció hajtóerejére is, így a rendszer erősen csatolt dinamikájú. A modellben a termék hőmérsékletet kritikus hőmérsékleti korlátok (T_c, T_g), limitálják, amelyek a megengedhető hőbevitel felső határát szabják meg. A blokkdiagramon szürkével jelölt elemek a modell lehetséges továbbfejlesztési irányait szemléltetik, beleértve a nyomásszabályozás részletesebb leírását, valamint a kondenzátor jégfelhalmozódásának figyelembevételét.

4. EREDMÉNYEK

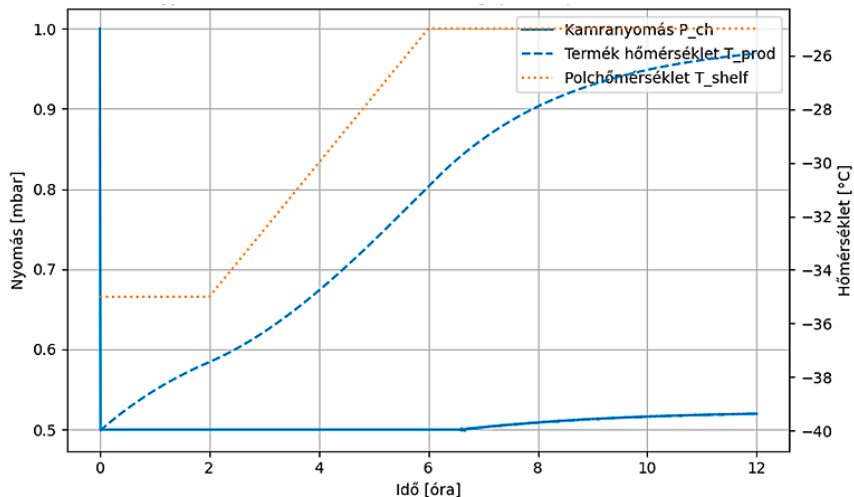
A szimulációs vizsgálat során az elsődleges és másodlagos szárítás dinamikus viselkedésének elemzése történt különböző terméktömegek mellett, azonos gépészeti és szabályozási paraméterek feltételezésével. A modell a fagyasztási szakaszt nem tartalmazza. A szimuláció során az elsődleges szárítás időtartamát főként a

polchőmérséklet és a kamranyomás beállítása határozza meg. A polcfűtés emelésével a szublimáció sebessége növelhető, azonban a termék hőmérséklet ekkor megközelíti az összeomlási hőmérsékletet. Ez a különbség addig csökkenthető, amíg a termék hőmérséklete a legrosszabb esetben is a kritikus érték alatt marad. Az (1)-(3) összefüggések miatt a ciklus optimalizálása nem tekinthető kizárólag hőmérsékleti kérdésnek. A polchőmérséklet, a kamranyomás és a terméktömeg együttesen határozzák meg a szublimáció ütemét, így a rendszer viselkedése erősen csatolt jellegű. Azonos szabályozási paraméterek mellett a tömegváltozás nemcsak az eltávolítandó vízmennyiséget növeli, hanem a hőmérsékleti és nyomásbeli dinamikát is módosítja. A 2. ábra az alapbeállítások melletti ciklus lefutását mutatja elsődleges és másodlagos szárítás során, ahol a polchőmérséklet, a termék hőmérséklet és a kamranyomás időbeli alakulása együttesen szemlélteti a folyamat dinamikáját 5 kg termékkel.



2. ábra. Egyszerűsített liofilizálási kamramodell 5kg termékkel

Az elsődleges szárítás kezdetén a termék hőmérséklete a -40°C -os kiindulási értékről emelkedni kezd, majd egy közel állandó tartomány alakul ki. Ez a szakasz a jég szublimációjához kapcsolódik, ahol a bevitt hőenergia döntően a fázisátalakulást fedezi. A szublimáció végét a nyomás változása jelzi, a hőmérséklet emelkedése folyamatos, a másodlagos szakasz pedig kevésbé különül el élesen. Ez a modellben alkalmazott fizikai közelítéseknek, valamint a vizsgált arányoknak, azaz néhány órás ciklusidő és a töltött tömeg kapcsolatának köszönhető. A kamranyomás változása a gőzképződés intenzitását követi. A 3. ábra ugyanazt a szabályozási beállítást mutatja, de a vizsgált termékmennyiséget 50 kg -ra emeltük. Itt válik láthatóvá a tömeg hatása, a stagnálási szakasz és a teljes ciklusidő jelentősen megnyúlik, mivel a berendezésnek sokkal nagyobb vízmennyiséget kell eltávolítania változatlan polchőmérséklet karakterisztika mellett. Nagyobb terméktömeg esetén a termék hőmérsékletének felfutása láthatóan lassabb, ami a nagyobb hőkapacitás és a fokozott szublimációs hőigény közvetlen következménye.



3. ábra. Egyszerűsített liofilizálási kamramodell 50 kg termékkel

A modell jól szemlélteti a hőbevitel, a szublimáció és a kamranyomás közötti visszacsatolt kapcsolatot, és az eredmények igazolják, hogy a polchőmérséklet változása közvetetten, a termék hőmérsékleten és a szublimáción keresztül hat a kamranyomás alakulására. A modell felépítése során a liofilizálás szempontjából meghatározó fizikai jelenségek kerültek előtérbe, ezért a komplex rendszer kezelhetősége érdekében egyszerűsítések bevezetése szükséges volt. A termék koncentrált paraméterű közelítéssel került leírásra, így a fiolán belüli rétegződés és lokális inhomogenitások nem jelennek meg a modellben. Ez az elhanyagolás elfogadható, mivel a vizsgálat elsődleges célja a fő folyamatrendek és a ciklusidő-optimalizálás elemzése. A hőátadás modellezése során a vezetés szerepe került figyelembevételre, míg a másodlagos szerepű sugárzás és konvekció hatása elhanyagolásra került [3], [6]. A szublimációs ellenállás (R_p) effektív paraméterként szerepel, amely nem a pórusszerkezet fizikáját írja le, hanem annak a folyamatra gyakorolt összehatását reprezentálja. A kamranyomás számítása ideális tömegmegmaradási feltételezésen alapul, így a modell nem tartalmazza az olyan nemlineáris hatásokat, mint a szelepek holtideje vagy az esetleges szivárgások. Az 1. ábrán szürkével jelölt kondenzátor- és vákuumrendszer részletesebb kidolgozása a későbbi fejlesztési irányokat jelöli, a jelen megközelítés célja a technológiai paraméterek közötti alapvető összefüggések feltárása. Fontos megjegyezni, hogy a jelenlegi eredmények elsősorban a rendszer dinamikai viselkedésének szemléltetésére szolgálnak, későbbi munkánk során a Python modell korlátait és görbéit Simulink környezetbe visszaépítve pontosabb szabályozási feladatokra alkalmazható.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A liofilizálás energia- és időigényes művelet, amelynek ciklusideje közvetlenül befolyásolja a gyártási kapacitást. A munka célja egy időfüggő, dinamikus folyamatmodell kialakítása volt, amely a hő- és tömegátadási jelenségek csatolt vizsgálatával képes a ciklus lefutását leírni, és a csökkentés lehetőségeit feltárni. A megközelítés eltér a hagyományos, tapasztalati alapú recepttervezéstől, mivel a rendszer választ időben követi, és a paraméterek kölcsönhatását együtt vizsgálja. A szimulációs eredmények alátámasztották, hogy 50 kg töltetnél fellépő szublimációs tömegáram növekedés olyan gépészeti terhelést jelent, amely miatt a rendszer nehezebben éri el a szárításhoz optimális paramétereket. A vizsgálatok alapján igazolható, hogy a polchőmérséklet és a kamranyomás összehangolt, dinamikus módosítása mellett a kritikus hőmérsékleti határok biztonságos megközelítése ciklusidő-csökkentési potenciált hordoz. A modell jól szemlélteti, hogy a száradó réteg növekvő ellenállása miként lassítja a szublimációt, és hogyan alakul ki a folyamat természetes korlátja. Konkrét százalékos megtakarítás jelen szakaszban még nem közölhető, mivel annak meghatározása termelési validációt igényel. A további fejlesztés célja a modell részletesebb gépészeti paraméterezése és validálása, valamint egy olyan integrált szimulációs környezet kialakítása, amely alkalmas lehet ipari ciklusok kockázatmentes vizsgálatára. Hosszabb távon a rendszer egy digitális iker alapját képezheti, amely támogatja a ciklusok optimalizálását és a gyártási kapacitás növelését.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük az Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.-nek a projektben nyújtott támogatását. A munka a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/00059/23/6) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak (NKFIH FK-142204) támogatásával készült.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] Yitzhak Grant, *Engineering the rational design and optimisation of lyophilization processes for biological materials*, Ph.D. dissertation, University College London, London, UK, 2011.
- [2] Kett, V., McMahon, D., & Ward, K. (2004). *Freeze-drying of protein pharmaceuticals - The application of thermal analysis*. *Cryoletters*, 25(6), 389-404.
- [3] T. A. Jennings, *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*, New York: Informa Healthcare, 2008, pp. 4, 93-252, 261-410.
- [4] Atkins and J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, 8th ed. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 2006
- [5] X. C. Tang, S. L. Nail, and M. J. Pikal, *Freeze-drying process design by manometric temperature measurement: Design of a smart freeze-dryer*, *Pharmaceutical Research*, vol. 22, no. 4, pp. 685-700, 2005.
- [6] L. Rey, J. C. May (Eds.), *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 3rd ed., New York: Informa Healthcare, 2010., pp. 115-132. (Section: Effects on Product Morphology, Surface Area, and Drying Rate)