

**ENTWICKLUNG EINES PROZESSES
IN PILOTGRÖSSE ZUR
HERSTELLUNG
VON
PROTEIN-COATED MICROCRYSTALS**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von
Corinna König
aus Perleberg

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. K.-J. Steffens

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. A. Lamprecht

Tag der Promotion: 06.08.2009

Erscheinungsjahr: 2010

„Freut euch und
seid fröhlich immerdar
über das, was ich schaffe.“ Jesaja 65,18

PUBLIKATIONEN

König C., Bechtold-Peters K., Baum V., Schultz-Fademrecht T., Bassarab S., Steffens K.-J., Development of a pilot-scale manufacturing process for protein-coated microcrystals (PCMC) – mixing and precipitation – part I. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, submitted 2009

König C., Bechtold-Peters K., Baum V., Schultz-Fademrecht T., Bassarab S., Steffens K.-J., Development of a pilot-scale manufacturing process for protein-coated microcrystals (PCMC) – solvent reduction and final drying – part II. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, submitted 2009

HINWEIS

Sofern nicht anders vermerkt, stellen die in den Abbildungen verwendeten Symbole den arithmetischen Mittelwert und Fehlerbalken die einfache Standardabweichung der Untersuchung dar.

Die Verwendung von warenrechtlich geschützten Handelsmarken und Firmenbezeichnungen erfolgt ohne gesonderte Kennzeichnung.

In der Literatur verwendete englischsprachige Fachtermini sind im Hinblick auf das Verständnis in kursiver Schrift angefügt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1	INNOVATIVE, TROCKENE UND STABILE PROTEINARZNEIFORMEN	4
2.1.1	<i>Lyophilisation.....</i>	4
2.1.2	<i>Sprüh-Gefriertrocknung.....</i>	5
2.1.3	<i>Sprühtrocknung</i>	5
2.1.4	<i>Vakuumtrocknung</i>	6
2.1.5	<i>Kristallisation/ Präzipitation</i>	6
2.1.6	<i>Partikelbildung mit überkritischen Gasen.....</i>	7
2.1.7	<i>Immobilisation auf Trägern.....</i>	8
2.2	PROTEINE UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER	9
2.2.1	<i>Aufbau und Struktur</i>	9
2.2.2	<i>Nativer Zustand</i>	10
2.2.3	<i>Chemische Instabilitäten</i>	11
2.2.4	<i>Physikalische Instabilitäten</i>	11
2.2.5	<i>Applikation.....</i>	13
2.3	PROTEIN-COATED MICROCRYSTALS.....	14
2.3.1	<i>Proteinstabilisierung.....</i>	17
2.3.2	<i>Applikationswege</i>	19
2.3.3	<i>Partikelbildung.....</i>	20
2.3.3.1	<i>Klassische Keimbildungstheorie</i>	20
2.3.3.2	<i>Alternative Keimbildungstheorien</i>	24
2.3.3.3	<i>Klassische Partikelwachstumstheorie.....</i>	26
2.3.3.4	<i>Agglomeration der Präzipitate.....</i>	26
2.3.4	<i>Interpartikuläre Bindungskräfte</i>	27
2.3.4.1	<i>Van-der-Waals Kräfte</i>	28
2.3.4.2	<i>Ion-Dipol und Ion-Ion Kräfte.....</i>	29
2.3.4.3	<i>Wasserstoffbrückenbindung (H-Bindung).....</i>	30
2.3.4.4	<i>Hydrophobe Wechselwirkungen</i>	30
2.3.5	<i>Kontinuierlicher PCMC-Herstellungsprozess.....</i>	31
2.3.5.1	<i>Mischen/ Präzipitieren</i>	31
2.3.5.2	<i>Aufkonzentrierung.....</i>	36
2.3.5.3	<i>Endtrocknung.....</i>	41
2.3.6	<i>Formulierungsentwicklung.....</i>	45

3	MATERIAL	46
3.1	TRÄGERSTOFF/ CARRIER/ CO-PRÄZIPITANT.....	46
3.1.1	<i>Valin.....</i>	46
3.1.2	<i>Glycin.....</i>	46
3.2	MODELLPROTEINE	47
3.2.1	<i>Trypsinogen.....</i>	47
3.2.2	<i>Trypsin.....</i>	47
3.2.3	<i>Bovines Serumalbumin (BSA).....</i>	48
3.2.4	<i>Monoklonale Antikörper (mAb/ IgG).....</i>	48
3.3	PUFFER.....	51
3.4	WEITERE HILFSSTOFFE.....	52
3.5	NICHT-LÖSEMittel/ FÄLLUNGSMEDIUM/ ANTI-SOLVENT	52
3.5.1	<i>2-Propanol (IPA).....</i>	52
3.5.2	<i>2-Methyl-1-propanol (2M1P).....</i>	52
4	METHODEN	53
4.1	METHODEN DER HERSTELLUNG.....	53
4.1.1	<i>Methoden und Geräte zum Mischen/ Präzipitieren</i>	<i>53</i>
4.1.1.1	<i>Herstellung von Protein-Carrier-Lösungen.....</i>	53
4.1.1.2	<i>Herstellung der Präzipitate.....</i>	54
4.1.1.3	<i>Kontinuierliche statische Mikromischer</i>	56
4.1.1.4	<i>Kontinuierliche statische Makromischer.....</i>	59
4.1.1.5	<i>Ultraschallunterstützte Mischer.....</i>	61
4.1.2	<i>Methoden und Geräte zur Aufkonzentrierung.....</i>	<i>64</i>
4.1.2.1	<i>Nutschenfiltration</i>	66
4.1.2.2	<i>Tangentialflussfiltration (TFF)</i>	67
4.1.2.3	<i>Erweiterte Kerzenfiltration</i>	69
4.1.2.4	<i>Zentrifugation</i>	71
4.1.3	<i>Methoden und Geräte zur Endtrocknung</i>	<i>72</i>
4.1.3.1	<i>Lufttrocknung</i>	72
4.1.3.2	<i>Sprühtrocknung.....</i>	73
4.1.3.3	<i>Trocknung mittels überkritischer Gase.....</i>	73
4.2	METHODEN DER ANALYTIK.....	75
4.2.1	<i>Analytik der Präzipitate in Suspension</i>	<i>75</i>
4.2.1.1	<i>Feststoffgehalt (FS) mit gravimetrischer Bestimmung</i>	75
4.2.1.2	<i>Kristallausbeute (SR) mit gravimetrischer Bestimmung</i>	75
4.2.1.3	<i>Geometrische Partikelgröße mit Laserdiffraktometrie (LD)</i>	75
4.2.1.4	<i>Partikelform mit Lichtmikroskopie</i>	76
4.2.1.5	<i>Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier mit Sprühtrocknung</i>	76
4.2.1.6	<i>Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier mit Zentrifugation oder Sedimentation... 77</i>	77

4.2.2	<i>Analytik der trockenen Präzipitate</i>	78
4.2.2.1	Geometrische Partikelgröße mit Laserdiffraktometrie (LD).....	78
4.2.2.2	Aerodynamische Eigenschaften mit Aerodynamic Particle Sizer (APS).....	78
4.2.2.3	Partikelmorphologie mit Rasterelektronenmikroskope (REM).....	79
4.2.2.4	Kristallinität mit Pulverröntgendiffraktometer (XRPD).....	80
4.2.2.5	Restwassergehalt mit Karl-Fischer (KF).....	80
4.2.2.6	Restfeuchtegehalt.....	80
4.2.2.7	Rekristallisationsfeuchte mit dynamischer Wasserdampfadsorption (DVS).....	81
4.2.3	<i>Analytik der rekonstituierten Präzipitate</i>	81
4.2.3.1	Proteinwiederfindung / Proteinbeladung mit UV-Vis-Spektroskopie.....	81
4.2.3.2	Feste Aggregate mit Trübungsmessung.....	83
4.2.3.3	Lösliche Aggregate mit Größenausschlusschromatographie.....	83
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	84
5.1	ENTWICKLUNG DES PROZESSSCHRITTES: MISCHEN/ PRÄZIPITIEREN	84
5.1.1	<i>Mikromischer</i>	85
5.1.1.1	Entwicklungsstart.....	85
5.1.1.2	Testung von Kaskaden-, Kamm- und Ventilmischern.....	89
5.1.1.3	Implementierung des Ventilmischers.....	94
5.1.2	<i>Makromischer</i>	98
5.1.2.1	Scale-up des Double Jet Impingement Mischers.....	98
5.1.2.2	Möglichkeit 1 - Einsatz von Ultraschall.....	101
5.1.2.3	Möglichkeit 2 - Erhöhung der Flussrate.....	105
5.1.2.4	Variationsmöglichkeiten des Double Jet Impingement Mischers.....	114
5.1.3	<i>Mikro- und Makromischer im Vergleich</i>	120
5.1.4	<i>Produktion von großvolumigen Suspensionsmengen</i>	122
5.1.4.1	PCMC-Suspension - 35 Liter.....	123
5.1.4.2	PCMC-Suspension - 80 Liter.....	123
5.1.5	<i>Standzeit der PCMC-Suspension</i>	124
5.1.6	<i>Einfluss der Lagerung</i>	126
5.1.7	<i>Einfluss der Formulierung</i>	127
5.1.7.1	Träger.....	127
5.1.7.2	Protein.....	134
5.1.7.3	Hilfsstoffe.....	136
5.1.7.4	Nicht-Lösungsmittel.....	137
5.1.8	<i>Diskussion des Prozessschrittes Mischen/ Präzipitieren</i>	138
5.1.9	<i>Technische Umsetzung</i>	141
5.2	ENTWICKLUNG DES PROZESSSCHRITTES: AUFKONZENTRIERUNG	144
5.2.1	<i>Nutschenfiltration mittels Vakuum</i>	145
5.2.1.1	Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses.....	145
5.2.1.2	Produktqualität nach der Nutschenfiltration.....	147
5.2.2	<i>Tangentialflussfiltration (TFF)</i>	148
5.2.2.1	Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses.....	148
5.2.2.2	Produktqualität nach der Tangentialflussfiltration.....	149

5.2.3	<i>Erweiterte Kerzenfiltration (modified pressure filtration MPF)</i>	151
5.2.3.1	Entwicklungsstart	151
5.2.3.2	Wechsel zur Verbundfilterkerze und Etablierung der Filterkerzenüberströmung	152
5.2.3.3	Etablierung der Sedimentationszone und Testung erhöhter Suspensionsvolumina	154
5.2.3.4	Reproduzierbarkeit der Filtrationsrate	155
5.2.3.5	Filtrationen weiterer Modellsuspensionen	156
5.2.4	<i>Zentrifugation</i>	157
5.2.4.1	Vertikalzentrifugation	157
5.2.4.2	Becherzentrifugation	158
5.2.5	<i>Diskussion des Prozessschrittes Aufkonzentrierung</i>	160
5.2.6	<i>Technische Umsetzung</i>	164
5.3	ENTWICKLUNG DES PROZESSSCHMITTES: ENDTROCKNUNG	166
5.3.1	<i>Trocknung an der Luft</i>	166
5.3.1.1	Einfluss der Lufttrocknung auf die Produktqualität	166
5.3.1.2	Weiterer Prozessschritt	166
5.3.2	<i>Sprühtrocknung</i>	167
5.3.2.1	Mischen/ Präzipitieren + Sprühtrocknung	167
5.3.2.2	Mischen/ Präzipitieren + Aufkonzentrierung + Sprühtrocknung	169
5.3.3	<i>Trocknung mittels überkritischer Gase</i>	170
5.3.3.1	Variationen von Prozessparametern	172
5.3.3.2	Einfluss der CO ₂ -Extraktion auf die Protein stabilisierung	173
5.3.3.3	Einfluss des Wassergehaltes in der zu trocknenden Suspension auf die Trocknung ..	177
5.3.3.4	Trocknung größerer Suspensionsvolumina mit unterschiedlichen Einsatzbehältern ...	178
5.3.3.5	Kalkulation der Trocknungszeit für Suspensionsmengen im Pilotmaßstab	179
5.3.4	<i>Diskussion des Prozessschrittes Endtrocknung</i>	180
5.3.5	<i>Technische Umsetzung</i>	181
6	ZUSAMMENFASSUNG	183
7	ANHANG	188
7.1	AUTOKATALYSE VON TRYPSIN	188
7.2	HERSTELLUNG DER GLYCINMODIFIKATIONEN ALS REFERENZ	188
7.3	DIFFRAKTOGRAMME STABILITÄTSSTUDIEN GLYCINHALTIGER PCMC	191
7.4	DIFFRAKTOGRAMME GESAMTPROZESS	194
8	LITERATURVERZEICHNIS	195

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2M1P	2-Methyl-1-Propanol
APS	Aerodynamic Particle Sizer
Arg	L-Arginin
ATR FTIR	Attenuated Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy
BI	Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG
BSA	Bovine Serum Albumin = Rinderserumalbumin
CD	Circular Dichroismus
CFD	Computational Fluid Dynamics
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DJI	Double Jet Impingement Mixer
DoE	Design of Experiment
DSC	Differential Scanning Calorimetry = Dyn. Differenzkalorimetrie
DVS	Dynamic Vapour Sorption = Dynamische Dampfabsorption
ED	Emitted Dose = ausgebrachte Pulvermenge in Prozent
FAP	fibroblastenaktiviertes Protein
FPF	Fine Particle Fraction
FS	Feststoffgehalt
Glu	L-Glutamin
Gly	Glycin
HNP	Firma Hydraulik Nord Parchim
HP-SEC	High Performance - Size Exclusion Chromatography
HS	Hilfsstoffe
ID	Innendurchmesser
IgG	Immunglobulin
IPA	Isopropylalkohol = Isopropanol = 2-Propanol
k. A.	keine Angabe
KF	Karl Fischer
LD	Laserdiffraktometrie
LM	Lösungsmittel
m/v	Masse pro Volumen
MMAD	Mass median aerodynamic diameter
MP	Modellprotein
MPF	Modified Pressure Filtration = Erweiterte Kerzenfiltration
MPL	Measured Protein Loading = Proteinbeladung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MW	Molekulargewicht
Nicht-LM	Nicht-Lösungsmittel = Fällungsmedium
PBS	Phosphatpuffer
P-C-L	Protein-Carrier-Lösung
PCMC	protein-coated microcrystals
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PR	Protein Recovery = Proteinwiederfindung
QJI	Quadruple Jet Impingement Mixer
r. F.	relative Feuchte, synonym RH
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RH	relative Feuchte
RT	Raumtemperatur
SC-CO ₂	überkritisches CO ₂
SD	Spray drying = Sprühtrocknung
SJI	Single Jet Impingement Mixer = T-Stück Mischer
SR	Solid Recovery = Kristallausbeute
TFF	Tangentialflussfiltration = Crossfiltration
TMP	Transmembrandruck
TPL	Theoretical Protein Loading = theoretische Proteinbeladung
Tre	Trehalose
Tryp	Trypsin
Tryp.gen	Trypsinogen
upm	Umdrehung pro Minute
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
UVC	Ultrasonic Vortex Crystallizer
v/v	Volumen pro Volumen
V4A	rostfreier Stahl, Legierung X5CrNi 18-10
Val	DL-Valin
VAM	Valve assisted Mixer = Ventilmischer der Firma Ehrfeld
Vis	sichtbar
X ₁₀	Korngröße, unter der 10 % des Gesamtvolumens liegt
X ₅₀	Korngröße, unter der 50 % des Gesamtvolumens liegt
X ₉₀	Korngröße, unter der 90 % des Gesamtvolumens liegt

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

In den letzten Jahrzehnten führten Innovationen in der Biotechnologie zu einer zunehmenden Bedeutung und Anwendung von biopharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere für nicht oder nur schwer heilbare Krankheiten [Schumacher, 2003]. Aufgrund der schlechten oralen Bioverfügbarkeit werden Proteinarzneistoffe meistens parenteral systemisch verabreicht. Proteinarzneistoffe können chemisch sowie physikalisch degradieren, deshalb ist ihre Stabilisierung essentiell wichtig. Sind die therapeutischen Proteine in flüssiger Form nicht ausreichend stabil, werden sie gefriergetrocknet und erst kurz vor der parenteralen Anwendung rekonstituiert. Die Langzeitstabilität ist bei trocken gelagerten Proteinformulierungen größer als bei flüssigen Formulierungen [Carpenter, 2002]. Darüber hinaus steigt die Nachfrage nach alternativen Applikationen für Proteinarzneistoffe. Aus diesem Grund beschäftigen sich einige Forschungsgruppen intensiv mit Proteinarzneiformen, vor allem für die pulmonale, nasale, aber auch dermale oder oculare Applikation [Lee, 1995]. Folkesson et al. [1990] oder Bot et al. [2000] zeigten, dass Immunglobuline über die Lunge systemisch freigesetzt werden können, wenn auch oftmals sehr langsam [Uchenna, 2001]. Für die alternativen Applikationsformen werden Trägersysteme benötigt, auf denen die Proteine stabilisiert werden. Neben der Gefriertrocknung werden innovative Methoden wie die Sprüh-Gefriertrocknung [Gieseler 2004; Maa, 1999], Sprühtrocknung [Schüle, 2005], Kristallisation/ Präzipitation [Shenoy, 2000; Johnson, 1997] oder die Partikelbildung mit überkritischen Gasen [Jovanovic, 2004; Reverchon, 1999; Cape, 2008] erforscht.

Insbesondere zur Kristallisation oder Präzipitation stehen derzeit nur begrenzte Technologien zur Verfügung. Eine patentierte Technologie ist die Herstellung von proteinbeschichteten Mikrokristallen (*protein-coated microcrystals* PCMC) durch Co-Präzipitation von Proteinen und Trägersubstanzen [WO 00/69887 *Rapid dehydration of proteins*]. In der vorliegenden Arbeit soll für diese PCMC ein Herstellverfahren im Pilotmaßstab entwickelt und etabliert werden, welches in kontinuierlichem Modus betrieben und grundsätzlich in GMP-Umgebung eingeführt werden kann. Bei der Präzipitation werden durch ultraschnelle Verdrängung des Lösungsmittels Wasser mit einem Überschuss an Fällungsmittel die zuvor in Wasser gelösten Komponenten wie Proteine und Trägersubstanzen ausgefällt. Durch die Ausfällung mehrerer Substanzen entspricht die Reaktion einer Co-Präzipitation. Die Co-Kristalle sind Mikrokristalle im unteren Mikrometerbereich und gut wasserlöslich.

Die Aufgabenstellung der Prozessentwicklung zur Herstellung von *protein-coated microcrystals* (PCMC) entstand in der Gruppe Pharma Development für biopharmazeutische Produkte bei der Firma Boehringer Ingelheim. Boehringer Ingelheim führte zuvor eine Machbarkeitsstudie mit der Firma XstalBio Limited durch, die Lizenzgeber für die Technologie ist. Aufgrund der vielversprechenden Stabilitätsdaten einer Modellformulierung mit einem Interferon, wurde ein Lizenz- und Kooperationsvertrag mit Firma XstalBio abgeschlossen.

Das Ziel der Arbeit bestand darin, die vielseitig anwendbare Technologie mit Modellformulierungen zu testen und einen kontinuierlichen Prozess im Technikumsmaßstab (Herstellung von bis zu 500 g PCMC-Pulver) zu entwickeln. Die Prozessentwicklung zur Herstellung der *protein-coated microcrystals* untergliedert sich in drei Teilschritte:

1. Mischen/ Präzipitation
2. Aufkonzentrierung der Suspension
3. Endtrocknung der proteinbeladenen Mikropartikel

Das Mischen ist die Voraussetzung für die homogene Präzipitation der PCMC. Dabei sollen in der Arbeit statische, kontinuierlich betriebene Mischer im Mikro- und Makromaßstab sowie ultraschallunterstützte Mischer evaluiert werden. Bei der Herstellung der Präzipitate werden zwei Flüssigkeitsströme vereint, die miteinander mischbar sind. Die Energie zum Mischen bringen die zu mischenden Ströme mit in das System. Die Herausforderung besteht darin, trotz ungleicher Verhältnisse der Ströme von 5 : 95 schnell und homogen zu mischen. Die Zielpartikelgröße liegt im unteren Mikrometerbereich. Wenn 500 g PCMC-Pulver produziert werden sollen, dann muss der Mischer 100 l PCMC-Suspension herstellen können. Umfangreiche Mischerstudien werden mit unterschiedlichen Modellformulierungen durchgeführt, um einen möglichst universell anwendbaren Prozess zu entwickeln. Dabei dienen Aminosäuren wie DL-Valin und Glycin als Trägersubstanzen, die in der vorliegenden Arbeit meistens zu 10 % mit unterschiedlichen Modellproteinen wie Trypsinogen, Trypsin, Rinderalbumin und Antikörper beladen werden. Den beiden Hauptkomponenten können weitere Hilfsstoffe wie Elektrolyte und Polyelektrolyte, die anionische und/ oder kationische Ladungsträger darstellen, zugesetzt sein. Die Proteine adsorbieren bei der Präzipitation an die Oberflächen der ausfallenden Trägersubstanzen. Treibende Kräfte hierfür sind van der Waals-, Coulomb-, Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Wechselwirkungen.

Nach der Präzipitation ist der Feststoffgehalt der PCMC-Suspension je nach Trägerstoff ca. 0,5 % (m/v). Eine direkte Trocknung der Suspension wäre ineffizient,

weshalb ein Aufkonzentrierungsschritt dazwischen geschaltet werden soll. Dabei werden verschiedene Filtrations- und Zentrifugationstechnologien untersucht, wobei die Herausforderung in der Partikelgröße im unteren Mikrometerbereich (1 μm bis 50 μm) liegt. Dazu dürfen die interpartikulären Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier während der Aufkonzentrierung nicht gestört werden.

Beim letzten Prozessschritt der finalen Trocknung wird das restliche Suspensionsmedium des PCMC-Konzentrats durch konvektive Trocknung oder Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid entfernt. Ein pulverförmiges Endprodukt resultiert. Ein gutes Endprodukt zeichnet sich durch den Erhalt der Proteinintegrität nach der Herstellung und Lagerung aus. Durch Immobilisierung auf den kristallinen Trägern sollen die Proteine stabilisiert werden.

Am Ende jedes Prozessschrittes wird deren technische Umsetzung unter Berücksichtigung der Arbeitssicherheit erläutert und in Form einer Abbildung dargestellt.

Weiterhin werden in der vorliegenden Arbeit Einflüsse der Modellformulierungen vorgestellt. In einem Kapitel wird der Träger genauer beleuchtet, denn während der Präzipitation entsteht nach der Ostwaldschen Stufenregel die kinetisch kontrollierte polymorphe Form des Trägers. Diese Modifikation kann sich bei ungünstiger Lagerung in die thermodynamisch stabilere Modifikation umwandeln und dabei das Protein auf der Oberfläche schädigen. In der Arbeit wird dies anhand von Stabilitätsstudien mit Glycin als Träger ausführlich dargestellt. Ein weiteres Kapitel untersucht die Modellproteine, die unterschiedlich stark auf den Modellträgern gebunden sind. Die Stärken der interpartikulären Wechselwirkungen werden vergleichend mit der Zentrifugation, der Sedimentation und der Sprühtrocknung der PCMC-Suspensionen und anschließender Bestimmung der Proteinbeladung des Rückstandes analysiert. Kurz wird der Effekt weiterer Hilfsstoffe wie Elektrolyte erläutert, die die Partikelbildung [Hoffmann, 2004] aber auch die Adsorption der Proteine auf den Trägern [Keller, 2008, Czeslik, 2006] beeinflussen. Darüber hinaus kann das Fällungsmedium einen Einfluss auf die PCMC-Qualität, insbesondere auf die Proteinintegrität nehmen. Dies ist am Beispiel einer Antikörpermodellformulierung, die mit Isopropylalkohol und mit 2-Methyl-1-propanol gefällt wird, erläutert.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Innovative, trockene und stabile Proteinarzneiformen

Proteine, die in Lösung eine unbefriedigende Stabilität aufweisen, können durch diverse Methoden stabilisiert werden:

- Lyophilisation
- Sprüh-Gefriertrocknung
- Sprühtrocknung
- Vakuumtrocknung
- Kristallisation/ Präzipitation
- Extraktion mit überkritischen Gasen
- Immobilisation auf Trägern

Die Stabilisierungspraktiken werden nachfolgend kurz erklärt und die Vor- bzw. Nachteile herausgearbeitet.

2.1.1 Lyophilisation

Die Lyophilisation ist in der Pharmazeutischen Industrie die wichtigste Methode bioaktive Moleküle in fester Form zu stabilisieren. Hilfsstoffe, wie Saccharose, Mannitol, Glycine, Trehalose oder eine Mischung dieser, dienen als amorphe oder kristalline Gerüstbildner. Neben der mechanischen Stabilisierung nimmt der Gerüstbildner auch den Platz des sublimierten Wassers zur Erhaltung des nativen Zustandes des Proteins ein [Arakawa, 2001]. Die Stabilisierung erfolgt entweder durch noch vorhandene Mobilität der hochviskosen, unterkühlten Schmelze (Glas) oder über Interaktionen von Protein und Hilfsstoffen [Chang, 2005]. Es gibt jedoch einige erhebliche Nachteile bei der Lyophilisation, so dass das Interesse an alternativen Stabilisations- und Immobilisationsmethoden zunehmend steigt. Als Nachteile sind zu nennen der hohe Energieverbrauch für die Entfernung von 90 % der Ausgangsmasse der Initiallösung, eine mehrtägige Prozesszeit, die Limitierung der Chargengröße durch das begrenzte Fassungsvermögen eines Lyophilisators, das aseptische Beladen, die diskontinuierliche Funktionsweise und die Schwierigkeiten beim *scale-up* als

Kostentreiber. Weiterhin kann das zu stabilisierende Protein durch den Prozess denaturieren, aggregieren oder ausgefällt werden, da sich während der Gefrier-trocknung die physikalische Umgebung des Proteins dramatisch ändert. Der Einsatz von Kryoprotektoren ist nötig, damit Gefrierkonzentration und Eisbildung als Hauptstressfaktoren ohne Aktivitätsverlust des Proteins überstanden werden. Die Gefrierkonzentration bewirkt, dass in der Lösung Puffersalze ausfallen und eine pH-Veränderung nach sich ziehen können. Durch Übersättigung von Reaktanden können diese vermehrt mit dem Protein reagieren und die Lösemittelzusammensetzung kann sich verändern. Darüber hinaus wird das Protein während des Prozesses durch die Dehydratation gestresst. Der Einsatz von wasserersetzenden Stoffen, sogenannten Lyoprotektoren, wird nötig. Insgesamt ist die physikalische und mechanische Stabilität von lyophilisierten Produkten limitiert. Diese ist abhängig von der Formulierung, die mehr oder weniger stark hygroskopisch ist [Shamblin, 1998]. Die Lagerung von Lyophilisaten muss unterhalb der Glasübergangstemperatur erfolgen und das Produkt muss sicher gegen Luftfeuchte geschützt werden. Insgesamt ist der Lyophilisationsprozess ein kostenintensiver und komplexer Prozess, welcher gut verstanden werden muss [Roy, 2004].

2.1.2 Sprüh-Gefriertrocknung

Die Sprüh-Gefriertrocknung beruht ebenfalls auf den Gesetzmäßigkeiten der Eis-sublimation. Dabei wird die Protein-Hilfsstoff-Lösung zusammen mit den Hilfsstoffen in ein -70 °C kaltes Flüssigstickstoff- oder Flüssigpropanbad gesprüht. Die Sprühlösung gefriert sofort und das Wasser wird im vorgekühlten Gefriertrockner durch Sublimation entfernt. Das Produkt besteht aus ultraporösen, amorphen Partikeln mit sehr guten Partikeleigenschaften [Grieseler, 2003]. Der Prozess ist sehr komplex und analog zur Lyophilisation zeit- und kostenintensiv.

2.1.3 Sprühtrocknung

Proteine können ferner durch Sprühtrocknung stabilisiert werden (siehe Kapitel 2.3.5.3 Endtrocknung). Die Proteinlösung wird bei ca. 90 °C bis 130 °C Einlasstemperatur in einen Sprühturm gesprüht und in Millisekunden getrocknet. Die Temperatur am Ausgang des Sprühturms beträgt 50 °C bis 90 °C. Die Proteinstrukturen werden durch die Verdunstungskälte und der nur sehr kurzen Kontaktzeit nicht zerstört. Während der Evaporation müssen die Proteine durch Hilfsstoffe stabilisiert werden. Schuele et al. [2007] stabilisierten einen Antikörper (MW 150 kDa) in einer Matrix aus Mannitol. Nach

Rekonstitution des sprühgetrockneten Pulvers war der native Zustand des Proteins völlig wiederhergestellt. Im trockenen Zustand zeigte die Amid-I-Bande (ATR-FTIR) jedoch eine Veränderung der Sekundärstruktur. Darüber hinaus musste das Pulver unter 1 % Restfeuchte (nach)-getrocknet werden, um die Lagerstabilität der amorphen Pulver sicherzustellen. Die Sprühtrocknung ist ein kontinuierlicher Prozess, der erfolgreich zur Proteinstabilisierung eingesetzt werden kann, jedoch erfordert der amorphe bis teilamorphe Zustand eine Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur ähnlich den gefriergetrockneten Produkten [Maury, 2005].

2.1.4 Vakuumtrocknung

Weiterhin kann mittels Vakuumtrocknung das Wasser der Proteinlösung evaporiert werden. Dies ist z. B. in der VitriLife Technologie (Avent) realisiert. Dabei werden proteinhaltige Formulierungen zu einem stabilen, amorphen Schaumprodukt durch „kontrolliertes Kochen“ unter Vakuum umgesetzt. Das Endprodukt ist ein Pulver, das bis zu einem Jahr bei Raumtemperatur haltbar ist. Die Technologie ist gegenüber der Lyophilisation wesentlich zeit- und kostengünstiger [Website: Celldex Therapeutics].

2.1.5 Kristallisation/ Präzipitation

Lange wurde angenommen, dass Proteine auf amorphen Oberflächen stabiler sind [Pikal, 1997]. Hauptsächlich wird dies damit begründet, dass Proteine ersatzweise für das durch die Trocknung entfernte Wasser einen Hilfsstoff benötigen, der H-Brücken aufbauen kann. Nach Crowe et al. [1993] bieten kristalline Matrices den Proteinen nicht genügend Möglichkeiten für H-Brücken. Wenn jedoch das Protein selber z. B. während der Gefriertrocknung kristallisiert, was aber praktisch schwierig umsetzbar ist, ist es stabiler und benötigt weniger stabilisierende Hilfsstoffmengen als im amorphen Zustand [Wang, 2006]. In einer Studie verglichen Stenoy et al. [2001] die Stabilität von kristallinen und amorphen Formulierungen zweier Modellproteine. Dabei wurde gezeigt, dass die kristallinen Glycooxidase- (MW 180 kDa) und Lipaseformulierungen (MW 60 kDa) signifikant stabiler sind als die entsprechenden amorphen Formulierungen. Die Erkenntnisse untermauern den interessanten Ansatz, Proteine durch Kristallisation oder Präzipitation zu stabilisieren [Brange, 1992, Stenoy, 2001, Yang, 2003, Clair, 1999] und beide Methoden als Werkzeug bei der Proteinaufreinigung bzw. -isolierung zu nutzen [Judge, 1998, Stenoy, 2001]. Bei der Präzipitation und der Kristallisation wird dem Protein ebenfalls das Wasser entzogen. Beide Methoden differenzieren sich dadurch, dass bei der Präzipitation ein schneller

Wasserentzug stattfindet und folglich eine relativ ungeordnete Kristallstruktur entsteht, wohingegen bei der Kristallisation ein langsamerer Prozess vorliegt und bei guter Prozessführung eine eher geordnete Struktur hervorbringt. In der folgenden Tabelle sind einige Fällungsmittel aufgelistet, um stabilisierte Protein- oder Peptidkristalle zu erhalten [Bechtold-Peters, 2009].

Tab. 2-A Fällungsmittel, um stabile Proteinkristalle zu erhalten

Fällungsmittel	Beispiele
Organische Lösungsmittel	Aceton, Propanol, Ethanol, Isopropanol
Polyhydroxygruppenenthaltende Stoffe	Polyethylenglycol, Cyclodextrine
Salze (Hofmeisterreihe)	Ammoniumsulfat
Überkritische Gase	Überkritisches CO ₂
Puffer (Präzipitation am Isoelektrischen Punkt)	Citratpuffer, Phosphatpuffer

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Präzipitation von Proteinen auf kristallinen Trägermaterialien. Durch ultraschnellen Wasserentzug über Verdrängung des wässrigen Mediums mittels übermäßiger Zugabe eines Nicht-Lösemittels präzipitiert das Protein als amorphe Struktur auf einem Carrier. Das Carriermaterial ist vor der Verdrängung des Lösungsmittels ebenfalls nahe seiner eigenen Sättigungsgrenze in Wasser gelöst und fällt bevorzugt in kristalliner Form aus. [Moore, 1999] Es entstehen unregelmäßig geformte, mikrometergroße, wasserlösliche Co-Präzipitate, die als *protein-coated microcrystals* (PCMC) bezeichnet werden. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt in Kapitel 2.3.

2.1.6 Partikelbildung mit überkritischen Gasen

In Analogie zu den klassischen Kristallisationsmethoden sind überkritische Gase, z. B. überkritisches CO₂ bei 31 °C und ca. 72 bar, Nicht-Lösungsmittel für einen in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Stoff, z. B. Proteine [Sacchetti von Oort, 1996]. Ist das Lösungsmittel in überkritischem Gas gut löslich, kommt es zur Extraktion des Lösemittels, zur Übersättigung der gelösten Stoffe im Gemisch und schließlich zur Präzipitation. Dieses Verfahren wird als GAS (*gas antisolvent*) bezeichnet. Die Partikelbildung verläuft aber relativ unkontrolliert. Eine Verbesserung dieses Prinzips besteht darin, wenn die Lösung zusammen mit dem überkritischen Gas bei niedriger

Temperatur in einen mit überkritischem Gas gefüllten Kessel gesprüht wird. Das überkritische Gas dient dabei auch als Treibgas. Die Zerstäubung wird durch das überkritische Gas unterstützt und die Trocknungszeiten verkürzen sich [Jovanovic, 2004]. Je nach Durchführung existieren verschiedenen Bezeichnungen z. B.:

- SAS (*Supercritical Anti-Solvent*)
- ASES (*Aeosol Solvent Extraction System*)
- SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids*)

Das Partikelgrößenspektrum reicht von einigen Nanometern [Thiering, 2000] bis zu einigen Mikrometern [Jovanovic, 2008]. Je nachdem wie die Prozessparameter (Temperatur, Druck, Zusammensetzung des überkritischen Gases) gewählt werden, unterscheiden sich die Partikel in Morphologie, Größe und Größenverteilung [Jung, 2001]. In Veröffentlichungen werden vor allem Proteine wie Albumin, Insulin, Lysozyme, Myoglobin, Trypsin, Katalasen, rhDNAse erfolgreich stabilisiert und erhalten ihre Bioverfügbarkeit [Jovanovic, 2008].

2.1.7 Immobilisation auf Trägern

Die Immobilisierung von Proteinen auf Trägern ist eine weitere Methode, um eine trockene und stabile Proteinanzneiform zu erhalten. Im engeren Sinne ist die PCMC-Technologie ebenfalls in dieses Gebiet einzuordnen, denn amorphes Protein wird adhäsiv auf der Oberfläche eines kristallinen Carriers fixiert. In diesem Abschnitt soll dargestellt werden, wie Proteine durch kovalente Bindungen, Vernetzungen oder Einbettungen in eine Polymermatrix stabilisiert werden können. Kovalente Bindungen zur Proteinimmobilisation werden derzeit in der pharmazeutischen Analytik ausgenutzt. Zum Beispiel bindet beim ELISA Test das Antigen oder der Antikörper kovalent auf einer hexagonalen 2-D-kristallinen Struktur. Diese 2-D-kristalline Struktur besteht aus COOH-terminalen *Nanospots* auf einer CH₃-terminalen Matrix [Valsesia, 2006]. Durch die gezielte kovalente Bindung an diese neu entwickelte Oberfläche wird ein 4-mal höheres Signal detektiert als bei herkömmlichen ELISA Tests.

Die Einbettung von Proteinen z. B. in *Poly(lactic-co-glycolic acid)* (PLGA) wird seit mehreren Jahren untersucht. Einige Veröffentlichungen berichten von erfolgreicher Inkorporation von Proteinen in PLGA-Mikropartikeln. Als Qualitätsparameter dienen Beladung, Einbettungseffizienz, Partikelgröße und –morphologie. Die Hauptprobleme dieser *protein-loaded PLGA microparticles* sind die unvollständige Freisetzung des

nativen Proteins und die Denaturierung des Proteins durch pH-Effekte beim Abbau der Matrix [Weert, 2000].

2.2 Proteine und monoklonale Antikörper

2.2.1 Aufbau und Struktur

Verglichen mit konventionellen chemischen Wirkstoffen handelt es sich bei Protein-Arzneistoffen um Makromoleküle, deren molekularer Aufbau komplex ist. Die kleinsten Bausteine jedes Proteins sind die Aminosäuren. Alle Proteine, ungeachtet ob sie von Bakterien, Tieren oder vom Menschen stammen, bestehen aus dem gleichen Satz an 20 natürlichen Aminosäuren. In Proteinen sind gewöhnlich mehr als 100 Aminosäuren kovalent über Peptidbindungen zu einer Peptidkette miteinander verbunden [Stryer, 1996]. Peptide bestehen aus weniger als 20 und Polypeptide aus 20 bis 100 Aminosäuren.

Die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette (**Primärstruktur**) ist einzigartig für jedes Protein. Die Ketten der Aminosäuren unterscheiden sich in Größe, Oberfläche, elektrischer Ladung, Fähigkeit zur Ausbildung von H-Brücken und chemischer Reaktivität und legen damit die höhere Ordnung fest. Wiederholen sich sterische Effekte von benachbarten Aminosäure-Resten der Polypeptidkette, kommt es zur periodischen Anordnung, die als **Sekundärstruktur** bezeichnet wird. Häufig vorkommende Sekundärstrukturen sind α -Helices, β -Flattblatt, β -Schleifen und ungeordnete, sogenannte Random-Coil-Strukturen. Der wichtigste Parameter für die biologische Aktivität von Proteinen liegt in der dreidimensionalen Struktur (**Tertiärstruktur**). Die Tertiärstruktur von Proteinen wird von kovalenten Bindungen (Disulfidbrücken) und vor allem von nicht-kovalenten Wechselwirkungen (H-Bindungen, hydrophobe, ionische Bindungen und van-der-Waals-Kräfte) zwischen den Seitenketten der Aminosäuren bestimmt. Einige Proteine bestehen aus mehreren Proteinketten. Diese werden ebenfalls vor allem durch nicht-kovalente Wechselwirkungen aber auch durch kovalente Bindungen wie Disulfidbrücken zusammengehalten und bilden die **Quartärstruktur**. Als Beispiel für aus mehreren Proteinketten zusammengelagerte Komplexe sind die Immunglobuline/ Antikörper zu nennen. Sie bestehen jeweils aus zwei identischen schweren (H-Ketten für *heavy chain*) und zwei identischen leichten (L-Ketten für *light chain*) Proteinketten, die über Disulfidbrücken zu einer funktionstüchtigen Einheit verbunden sind.

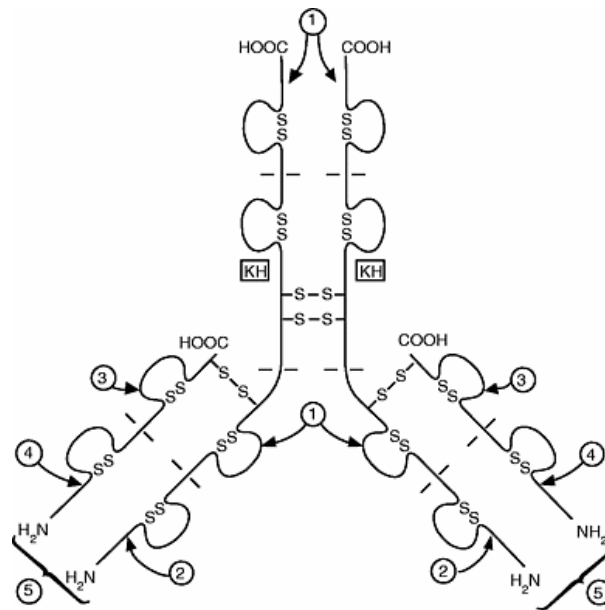


Abb. 2-A Schematische Darstellung der Struktur eines Antikörpermoleküls (IgG)
 1 = H-Kette (konstanter Teil), 2 = H-Kette (variabler Teil), 3 = L-Kette (konstanter Teil), 4 = L-Kette (variabler Teil), 5 = Bindungsstelle für Antigene KH = Kohlenhydrat, -S-S- = Disulfid-Brücken [Römpp Lexikon, Online Version 3.3]

2.2.2 Nativer Zustand

Unter physiologischen Bedingungen liegt die dreidimensionale Struktur immer im Gleichgewicht zwischen dem nativen und entfalteten (denaturieren) Zustand vor.

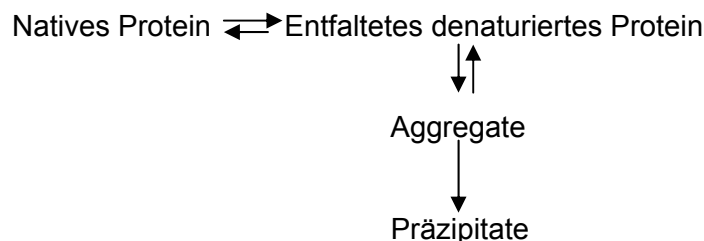


Abb. 2-B Dynamisches Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Protein und Folgereaktionen zu Präzipitaten [modifiziert nach Brange, 2000]

Die Differenz der freien Energie beider Formen ist ein Maß für die Konformationsstabilität des Proteins. Sie ist relativ gering und beträgt nur ca. 10 kJ/ mol bis 50 kJ/ mol. Deshalb können bereits moderate Einflüsse wie z.B. Hitze, Kälte, pH-Verschiebungen oder bestimmte Salze zu einer Verlagerung des Gleichgewichtes vom nativen Zustand des Proteins zur denaturierten Form führen. Die Einflüsse führen zu physikalischen und chemischen Instabilitäten.

2.2.3 Chemische Instabilitäten

Chemische Instabilitäten sind durch Veränderungen an kovalenten Bindungen eines Proteins gekennzeichnet. Durch Bruch, Neuaufbau oder Umbildung dieser Bindungen ändert sich die Primärstruktur des Moleküls. Somit entsteht eine neue Substanz, deren biologische Aktivität sich von der des ursprünglichen Proteins komplett unterscheiden kann. Zu den chemischen Abbaureaktionen gehören [Lai, 1999]:

- die Hydrolyse der Primärsequenz, vorwiegend nach Asparaginsäure
- Oxidation von Cystein-, Methionin-, Histidin-, Tryptophan- und Tyrosinseitenkettenresten
- Deamidierung von Asparagin- und Glutaminseitenkettenresten
- Razemisierung von chiralen Aminosäuren
- Disulfidbrückenaustausch
- β -Elimination

Die häufigste chemische Abbaureaktion erfolgt mit Wasser an Stellen des Peptidrückgrades oder an nach außen gelagerten Aminosäureseitenketten. Reaktive, in den hydrophoben Kern gerichtete Aminosäuren reagieren seltener. Jedoch können diese bei Änderung der nativen Konformation nach außen gerichtet werden und ebenfalls chemischen degradieren [Wang, 2006].

2.2.4 Physikalische Instabilitäten

Physikalische Instabilitäten verändern die räumliche Anordnung des Moleküls (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstrukturen), ohne kovalente Bindungen zu zerstören. Typische physikalische Abbaureaktionen sind die Auffaltung, Assoziation, Aggregation, Präzipitation oder die Oberflächenadsorption von Proteinen. Thermischer Stress, starke pH-Veränderungen, denaturierende Chemikalien, Oberflächenwechselwirkungen oder Scherstress initiieren Proteindenaturierungen. Als Denaturierung wird der Verlust der charakteristischen Tertiär- bzw. Sekundärstruktur des Moleküls bezeichnet. Die Denaturierung kann, insbesondere bei kleineren Proteinen, reversibel sein, das heißt bei geeigneten äußeren Bedingungen bildet sich die native Form spontan zurück. Dies wird in der Proteinaufreinigung zur Erhöhung des richtig gefalteten Proteinanteils auch technisch ausgenutzt. Große Proteine mit sehr komplexem Aufbau denaturieren

dagegen oft irreversibel. In Abb. 2-C ist der Vorgang der Proteinszusammenlagerung schematisch dargestellt:

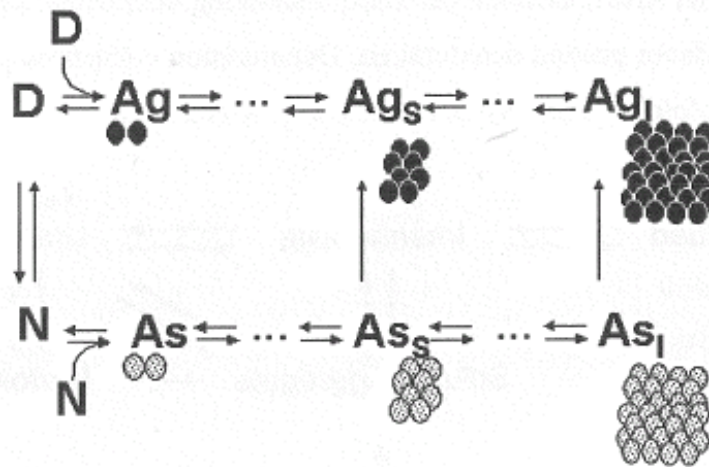


Abb. 2-C Vereinfachtes Modell der Proteinaggregation und -assoziation
schwarze Kreise sind denaturiertes Protein und weiße Kreise sind natives Protein [Mahler, 2005]

Unter Proteinassoziation (As) versteht man die Clusterbildung zu kleineren Assoziaten (As_s) und größeren Assoziaten (As_l) von nativen Proteinen (N). Sie treten z. B. auf, wenn der pH-Wert des Lösungsmittels dem Isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins entspricht. Assoziatbildungen sind oft ein reversibles Ereignis. Bei der Aggregation (Ag) kommt es zu einer Zusammenlagerung denaturierten Proteinmolekülen (D) über nicht-kovalente Bindungen. Sie entstehen vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen entfalteten oder partiell entfalteten Intermediaten. Die gebildeten Proteinaggregate bleiben nicht auf wenige Moleküle beschränkt. In der Regel geht von der Bildung kleinerer, stabilerer Gebilde (Ag_s) die Entstehung größerer, noch löslicher Aggregate (Ag_l) von mehr als 1000 Molekülen aus. Lagern sich große Aggregate weiter zusammen, ist zunehmend die Präzipitation des unlöslichen Proteins möglich. Durch Aggregatbildung kann es zum Verlust der biologischen Aktivität kommen und möglicherweise erhöht sich das Risiko von immunologischen Nebenwirkungen, ohne dass bisher eindeutige Korrelationen erstellt werden konnten. Daher legt die pharmazeutische Formulierungsentwicklung ein besonderes Augenmerk auf die Detektion von löslichen sowie unlöslichen Aggregaten [Tatford, 2004]. Sie sind je nach Größenbereich messbar mit verschiedenen Methoden, wie in Tab. 2-B dargestellt. Die Ermittlung des Aggregatanteils ist in dieser Arbeit Hauptaugenmerk in der Proteinanalytik.

parenterale Depotarzneiformen von Interesse. Allerdings sind diese in der Regel nur für intramuskuläre oder subkutane Anwendungen geeignet.

Verglichen mit transdermalen und oralen Ansätzen ist die Entwicklung pulmonaler Applikationssysteme am weitesten fortgeschritten. Insbesondere die Firma Nektar Therapeutics ist auf diesem Weg aktiv. In Kooperation mit den Firmen Sanofi-Aventis und Pfizer wurde pulverförmiges Insulin entwickelt und unter dem Handelsnamen Exubera 2006 auf den Markt gebracht. Die hohen Kosten der Arzneiform gegenüber der herkömmlichen Therapieform führten zu ungenügender Akzeptanz durch die Krankenkassen und das Produkt wurde mangels Markterfolg wieder vom Markt genommen.

Kleine Peptidmoleküle wie Oxytocin oder Desmopressin können auch nasal verabreicht werden, dennoch ist nach wie vor die parenterale Applikation Standard.

2.3 Protein-coated microcrystals

Protein-coated microcrystals (PCMC) sind Kristalle, die biologisch aktive Proteine auf kristallinen Trägern durch Co-Präzipitation immobilisiert und stabilisiert enthalten. Dabei wird eine wässrige Lösung, bestehend aus Protein, Träger und eventuell aus weiteren Hilfsstoffen, mit einem großen Überschuss an Nicht-Lösungsmittel, das mit Wasser gut mischbar ist, intensiv gemischt. Die Proteine dehydratisieren rasch, präzipitieren in amorpher Form und stabilisieren sich auf den mit ausfallenden kristallinen Trägern [Patent WO 00/69887 - *Rapid dehydration of proteins*]. Der Träger und das Nicht-Lösungsmittel müssen so gewählt werden, dass das Carriermaterial, sofern die Mischung hergestellt ist, sofort ausfällt. Daher werden die Trägermaterialien nahe ihrer Sättigungsgrenze in Wasser eingesetzt. Tab. 2-C gibt eine Übersicht über einige eingesetzte Materialien, wobei die fett markierten in dieser Arbeit Anwendung finden.

In der Entwicklung erfolgt die Herstellung weniger Milligramm im (Semi-)Batch-Verfahren. Das heißt das Nicht-Lösemittel wird im Überschuss (70 % bis 95 % des Gesamtvolumens) in einem Becherglas rührend vorgelegt und die Protein-Carrier-Lösung (5 % bis 30 % des Gesamtvolumens) wird tropfenweise langsam hinzu pipettiert. Durch den Rührvorgang entstehen Mikrowirbel, die das Vermischen beider Flüssigkeiten stark beeinflussen. Die Suspension wird ca. 2 - 5 Minuten lang weiter gerührt. Die Kristalle werden danach vom Suspensionsmittel durch Filtration, Zentrifugation oder Sedimentation separiert und unter dem Abzug ca. 10 - 24 Stunden lang getrocknet.

Tab. 2-C Mögliche Materialien zur PCMC-Herstellung

Protein	Träger = Carrier	Hilfsstoffe	Nicht- Lösungsmittel
Peptide ~ 1 kDa	Aminosäuren	Puffersalze	Organische Lösemittel
Kleine Proteine ~ 1 bis 25 kDa Insulin, Lysozym, Cytochrom C	DL-Valin , L-Glutamin, L-Histidin, Glycin	Citrat , Phosphat	Propan-2-ol Propan-1-ol Ethanol
Mittlere Proteine ~ 25 bis 100 kDa Cytokine, Lipasen, Hyaluronidase, Albumin , Proteasen – Trypsin/ Typsinogen	Salze K ₂ SO ₄	Aminosäuren L-Arginin L-Glutamin Phenylalanin	Ethylacetat 2-Methyl-1- propanol 2-Methyl-2,4- pentandiol 1,5-Pentandiol
Große Proteine > 100 kDa IgG = Antikörper			
Impfstoffe ~ 65 bis 150 kDa			
DNA/ RNA			

Das *small-scale* Batch-Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt, sondern ein kontinuierlicher, statischer Mischschritt, um einige Gramm bis Kilogramm an PCMC herzustellen. Alternativ gibt es zur Kristallherstellung dynamische Mischer, die hier wegen Schwierigkeiten im *scale-up* nicht betrachtet werden. Nach der Herstellung können die Kristalle bei Raumtemperatur lagern. Zur Proteinanalytik werden die Präzipitate in physiologischen Puffer rekonstituiert und vermessen. Die Rekonstitution der PCMC soll innerhalb von 2 Minuten zu einer klaren Lösung führen.

Die PCMC-Partikel sind in Suspension über Wochen bezüglich ihrer Größe stabil. Kleinere Kristalle lösen sich nicht zugunsten größerer Kristalle auf, d. h. es findet keine Ostwald-Reifung in der Suspension statt. Die Oberflächen der kristallinen Träger sind durch die auf der Oberfläche abgelagerten Proteine „vergiftet“. Liegen in der Suspension nur die Träger vor, kommt es über die Lagerzeit zum Partikelwachstum [Vos, 2006].

Durch die Co-Präzipitation entstehen mikrometergroße Partikel 5 µm bis 100 µm. Verschiedene Parameter können auf die Partikelgröße Einfluss nehmen. Auf der einen Seite gibt es zahlreiche Formulierungsparameter wie die Beladungsrate, den pH-Wert der Protein-Carrier-Lösung, der eingesetzte Carrier oder das verwendete Lösungsmittel, auf der anderen Seite kann die Partikelgröße durch Prozessparameter wie Temperatur, Mischungsverhältnis, eingesetzte Mischer und Flussrate beeinflusst werden. Die letztgenannten Prozessparameter sind Gegenstand der Arbeit. Für die Formulierungsparameter wurde von Partridge et al. [2007] veröffentlicht, dass mit zunehmender Beladungsrate die Partikel größer werden.

Typische Beladungsraten sind $\ll 1$ % bis 30 % (m/m). Dabei ist es unerheblich, ob kleine, mittelgroße oder große Proteine eingesetzt werden. Es wurden verschiedene Modellproteine wie bovines Serumalbumin (BSA), Hyaluronidase, Cytochrom C, ein Diphtherie-Impfstoff und mehrere Antikörper in verschiedenen Studien stabilisiert [Partridge, 2007; Lyle, 2006; Partridge, 2005; Murdan, 2005].

Darüber hinaus ist die Auswahl des Carriers entscheidend. Zum Beispiel konnte ein Modellantikörper sehr gut auf Valin und Histidin gebunden werden, weniger gut jedoch auf Glutamin [Partridge, 2005]. Die Funktionalität des Proteins wurde mit einem Bindungstest zu Protein G bestimmt. Die Histidinformulierung zeigte nach 3 Monaten bei 40 °C keinen Funktionsverlust und damit keine Konformationsveränderung im kristallinen Teil des Antikörpers. Die IgG-Histidin Mikrokristalle waren nach DSC-Messungen bei allen Feuchten stabil und unterlagen keiner Umwandlung. In der Studie stellte sich weiterhin der pH-Wert der Carrier-Protein-Lösung als wichtiger Parameter zur erfolgreichen Fällung heraus. Bei einem ungeeigneten pH-Wert waren die PCMC schlecht rekonstituierbar.



Abb. 2-D Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop [Bechtold-Peters, 2009]
 a – Proteinaggregat auf der kristallinen Oberfläche, b - Protein vor und nach der Deformation mit Cantilever im Kontakt-Modus

Messungen an der Oberfläche von Trypsinogen-Valin Mikrokristallen wurden mit dem Rasterkraftmikroskop vorgenommen. Wie in Abb. 2-D a ersichtlich, liegt Trypsinogen dabei in größeren Aggregaten auf der kristallinen Oberfläche des Valins. In geregeltem Kontakt-Modus konnten die Aggregate deformiert und verschoben werden. Dies zeigt, dass das Protein nicht im Kristall eingeschlossen und auch nicht starr mit dem Kristall verbunden vorliegt, sondern über adhäsive Kräfte auf der Oberfläche des Kristalls sitzt [Bechtold-Peters, 2009].

2.3.1 Proteinstabilisierung

Die Erfindung der PCMC-Technologie fand im Bereich der Biokatalyse statt. Ziel war es, Enzyme auf Feststoffen in organischen Lösemitteln zu stabilisieren, um diese voll funktionstüchtig in Reaktionen in organischen Medien einzusetzen. Als Modellenzyme dienten Subtilisine, die zu den Serinproteasen gehören. In der Literatur sind einige Stabilisierungs- und Aktivitätsuntersuchungen mit Subtilisin Carlsberg beschrieben und sollen an dieser Stelle zusammengetragen werden.

In einer Studie werden Subtilisine auf Valin unter Variation des pH-Wertes und der Endwasserkonzentration stabilisiert. Direkt nach der Herstellung zeigen alle Proben volle Enzymaktivität. Nach der 60 °C Einlagerung über 6 Monate wird allerdings bei den Proben, die wenig Wasser in der hergestellten Suspension enthalten, ein Aktivitätsverlust detektiert. „*This indicates that key structural water molecules are required to prevent loss of conformation*“ [Partridge, 2005]. Daneben hat die Variation des pH-Wertes einen Einfluss. Die beste Stabilität wird bei einem pH-Wert von 5,1 analysiert. Gründe dafür sind die geringe Deamidierungstendenz und die Verhinderung des hydrolytischen Abbaus. Immerhin ist es schwierig den Grund genau zu beweisen, weil das Enzym einer Autokatalyse unterliegt [Partridge, 2005]. In einer weiteren Studie werden die Subtilisine sehr erfolgreich auf Kaliumsulfatsalzen präzipitiert. Sie sind über 18 Monate lang stabil. Nur sehr kleine Konformationsveränderungen werden mit einer modifizierten zirkularen Dichroismus Methode (190 nm bis 320 nm) detektiert, wie Abb. 2-E zeigt [Partridge, 2005]. Dargestellt sind im nahem und fernem UV-Spektrum eine wässrige subtilisinhaltige Vergleichslösung und eine PCMC-Suspension, die in Propan-2-ol dispergierte Subtilisin-K₂SO₄ Mikrokristalle enthält. Zur Aufnahme dieser Spektren werden achirale Träger (K₂SO₄) oder Racemate (DL-Valin) benötigt [Partridge, 2005; Ganesan, 2006].

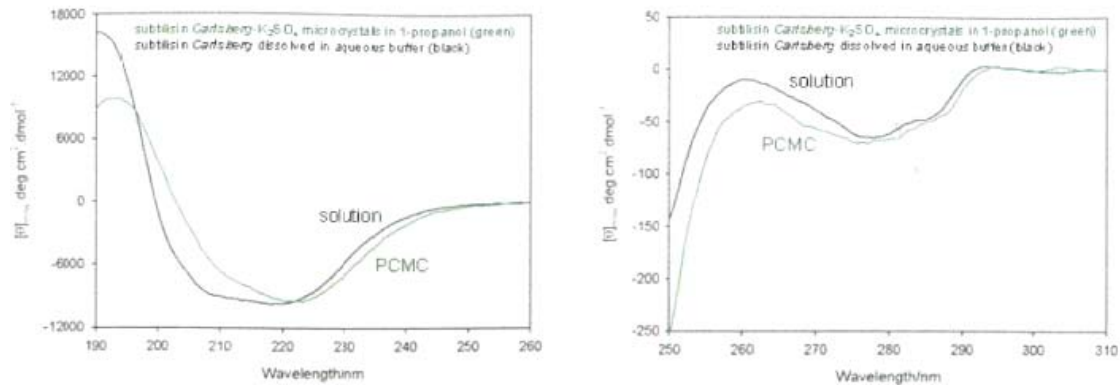


Abb. 2-E CD-Spektren von suspendierten Subtilisin-K₂SO₄ Mikrokrystallen in Propanol und einer wässrigen subtilisinhaltigen Vergleichslösung [Partridge, 2005; Ganesan, 2006]

Wie erfolgt die Stabilisierung? In vielen trocken stabilisierten Proteinarzneiformen erfolgt die Stabilisierung über Einbettung in einen amorphen Glaskörper. Dieser kann aufgrund seiner bestehenden Beweglichkeit die entzogenen Wassermoleküle/ Wasserstoffbrückenbindung ersetzen (*water-replacement theory*) und aktiv zur Stabilisierung der Konformation des Proteins beitragen [Chang, 2005].

Dahingegen erfolgt bei der PCMC-Technologie die Stabilisierung auf kristallinen Trägern. Die CD-Spektren und die Aktivitätsmessungen demonstrieren, dass während der Stabilisierung die Proteine im nativen bzw. nativ-nahen Konformationszustand verbleiben. Damit stehen sich die Aussagen der *water-replacement theory* und die Beobachtung der Proteinestabilisierung auf kristallinen Trägern gegenüber. Partridge et al. [2005] erklären die Stabilisation auf kristallinen Träger folgendermaßen (Abb. 2-F):

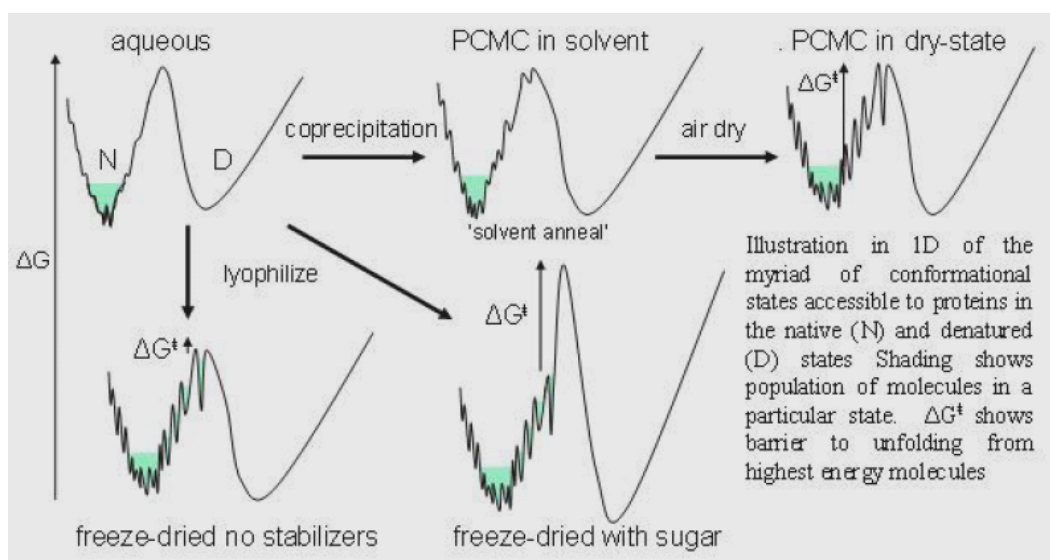


Abb. 2-F PCMC Co-Präzipitation im Vergleich zur Lyophilisation [Partridge, 2005] N – nativer Zustand, D – entfalteter Zustand, ΔG Energiebarriere

Während des ultraschnellen Dehydratationsprozesses sind die organischen polaren Lösungsmittelmoleküle in der Lage eine geringe Energiebarriere zwischen dem nativen und entfalteten Konformationszustand aufzubauen. Dadurch kann das Protein beim Trocknen wieder in einen lokal stabileren, nativen Zustand (*solvent annealing*) übergehen. Die Subtilisine müssen am Ende der Trocknung durch das *solvent annealing* einen sehr stabilen nativen Zustand besitzen, denn ihre volle Enzymaktivität ist erhalten. Dagegen werden bei der Lyophilisation ohne Stabilisator einige Moleküle in instabilere native Zustände überführt und damit in Richtung Denaturierung bewegt (siehe Füllungen in der Abb. 2-F). Werden während der Lyophilisation wie üblich Stabilisatoren eingesetzt, erhöhen diese die Inaktivierungsenergiebarriere zwischen dem nativen (N) und denaturierten (D) Zustand [Partridge, 2005].

In einer Machbarkeitsstudie wird ein therapeutisches Zytokine im Batch-Herstellverfahren präzipitiert, um die PCMC-Technologie an einem Proteinarzneistoff zu testen. Nach der Herstellung und der Einlagerung über 2 Monate (4 °C bis 40 °C und 0 %RH bis 60 %RH) ist das auf DL-Valin immobilisierte Zytokin voll bioaktiv und kaum degradiert. Es werden keine signifikanten Aktivitätsunterschiede und Monomerverluste gemessen. Gleichwohl ist die physikalische Stabilisierung sehr gut. Auch nach 2 Monaten offener Lagerung bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchte ist die aerodynamische Partikelgröße der Pulver unverändert. Die Messungen lassen sich durch Rasterelektronenmikroskopaufnahmen bestätigen [Daten von BI unveröffentlicht]. Auf Basis dieser viel versprechenden Machbarkeitsstudie entscheidet die Firma Boehringer Ingelheim einen Herstellprozess für die Produktion von PCMC im Pilotmaßstab zu entwickeln und zu etablieren. Der Herstellungsprozess wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit detailliert beschrieben und diskutiert.

2.3.2 Applikationswege

Der klassische parenterale Applikationsweg ist nach Rekonstitution der sterilen, trockenen PCMC mit einem entsprechenden physiologischen Puffer denkbar. Auch als parenterale Suspension, subkutan oder intramuskulär, könnten PCMC eingesetzt werden. Dabei könnten die PCMC als hochkonzentrierte Suspension verabreicht werden. Das Suspensionsmittel wäre entweder ein physiologischer Puffer (übersättigte Lösung) oder ein physiologisch verträgliches organisches Lösungsmittel. Weiterhin ist je nach Formulierung bei Partikelgrößen unter 5 µm eine pulmonale Applikation und bei Partikelgrößen um ca. 20 µm eine nasale Applikation der Feststoffkristalle möglich.

2.3.3 Partikelbildung

PCMC-Partikelbildung erfolgt entweder nach der klassischen (Lehrbuch-)Theorie oder nach neueren Keimbildungstheorien. Beides wird nachfolgend erläutert. Nach der Bildung der Partikel können diese wachsen oder agglomerieren.

2.3.3.1 Klassische Keimbildungstheorie

Die Theorie aller Lehrbücher zur Keimbildung geht von einem übersättigten System aus, das sich im einphasigen Zustand befindet. Durch Veränderung der Randbedingungen wie Temperatur, Druck oder die homogene Vermischung mit einer zweiten Komponente (Nicht-Lösungsmittel in der PCMC-Herstellung) verändert sich die Freie Energie derart, dass ein phasenseparierter Zustand energetisch wesentlich günstiger ist. Partikel (Atome, Ionen, Moleküle) lagern sich zusammen und bilden die Keime der zu separierenden Phase. Das bedeutet, die Abscheidung der festen Phase in einer Flüssigkeit (PCMC) oder eine Bläschenbildung in einer Flüssigkeit (Schäume). Die Freie Energie (ΔG) eines sphärischen Keims mit dem Radius (r) setzt sich zusammen aus der bei der Kondensation frei werdenden Enthalpie (ΔG_V) und der zur Bildung neuer Oberflächen notwendigen Grenzflächenenergie (ΔG_S) [Hoffmann, 2004].

$$\Delta G = \Delta G_V - \Delta G_S = \frac{4\pi}{3} r^3 \Delta g_v - 4\pi r^2 \gamma \quad \text{Gl. 2-1}$$

γ = Grenzflächenspannung

Δg_v = Differenz der Freien Energie pro Volumeneinheit zwischen beiden Phasen

Die Terme in der Gleichung haben entgegengesetzte Vorzeichen, so dass ΔG (Summenkurve) als Funktion vom Radius ein Maximum durchläuft (Abb. 2-G). Das Maximum der freien Energie definiert den Radius des kritischen Keimes (r^*). Für ein Partikel links vom Maximum ist der Verlust eines Bausteines enthalpisch günstiger, während für einen Teilchen rechts vom Maximum der Einbau weiterer Partikel enthalpisch günstiger ist.

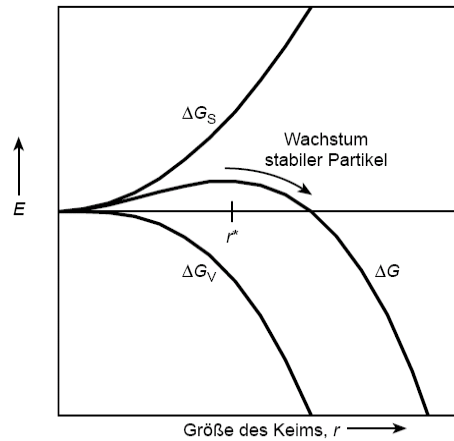


Abb. 2-G Energiediagramm zur Erklärung der Keimbildung [Horn, 2001]

Die Keimbildungsrate (J) ergibt sich aus dem Produkt der Keime (r^*), die sich pro Zeit- und Volumeneinheit bilden, und der Frequenz (A) des Aufeinandertreffens der Moleküle.

$$J = A \times r^* \tag{Gl. 2-2}$$

Für die Keimbildungsenthalpie ($\Delta_{r^*}G$) ergibt sich [Herleitung laut Hoffmann, 2004]:

$$\Delta_{r^*}G \propto \frac{1}{\ln^2 \beta} \tag{Gl. 2-3}$$

β = Übersättigung

Damit ist die Anzahldichte (n^*) an Keimen:

$$n^* \propto \exp\left(-\frac{\Delta_{r^*}G^2}{RT}\right) \tag{Gl. 2-4}$$

R = Gaskonstante

T = Temperatur

Da die Keimdichte exponentiell von der Übersättigung abhängt, kann die Abhängigkeit der Rate für das Auftreffen von Bausteinen vernachlässigt werden. Daraus ergibt sich für die Keimbildungshäufigkeit:

$$J \propto \exp\left(-\frac{\Delta_{r^*}G^2}{RT} \underbrace{\frac{1}{\ln^2 \beta}}_{\propto \frac{1}{\ln^2 \beta}}\right) \tag{Gl. 2-5}$$

Die Keimbildungshäufigkeit hängt damit exponentiell von der Übersättigung ab. Damit ergibt sich ein qualitativer Verlauf der Keimbildungshäufigkeit als Funktion der Übersättigung, wie in Abb. 2-H dargestellt. Die Keimbildung ist bis zu einer bestimmten Übersättigung gleich null, dann steigt sie exponentiell an. Auf artfremden Partikeln (Unterlagen, Wandungen) setzt die Keimbildung bei geringerer Übersättigung (heterogene Primärkeimbildung) ein. Es werden jedoch nicht die Keimbildungshäufigkeiten wie bei homogener Primärkeimbildung erreicht, denn die Anzahl an Fremdpartikeln ist limitiert. Wann die Primärkeimbildung genau einsetzt ist schwer zu kontrollieren, daher handelt es sich hierbei um schwer steuerbare Prozesse.

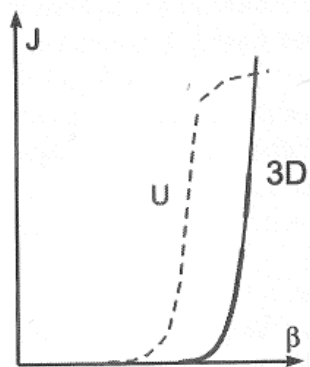


Abb. 2-H Keimbildungshäufigkeit (J) als Funktion der Übersättigung (β)
 U = Funktion bei heterogener Primärkeimbildung / $3D$ = Übersättigung bei homogener Primärkeimbildung [Hofmann, 2004]

Neben der Primärkeimbildung (homogen bzw. heterogen) gibt es die Sekundärkeimbildung, bei der Kristallisationskeime vorhanden sind oder gezielt vorgelegt werden, um den Kristallisationsprozess zu steuern. Tab. 2-D gibt einen Überblick über die Keimbildungsarten.

Tab. 2-D Keimbildungsarten

Art der Keimbildung	Partikel im System	Erforderliche Übersättigung
Primärkeimbildung		
• Homogenkeimbildung	artfremde Partikel sind nicht vorhanden oder nicht wirksam	sehr hoch
• Heterogenkeimbildung	artfremde Partikel wirken als Keime	relativ hoch
Sekundärkeimbildung	Partikel des Kristallisats wirken als Keime	gering

Die PCMC-Technologie basiert auf einer sehr schnellen Kristallisation durch ultraschnelle Verdrängung des Lösungsmittels mit einem partikelfreien Fällungsmedium. Die Kristallkeimbildung erfolgt nach dem Energiediagramm (Abb. 2-G) und die Keimbildungshäufigkeit ist exponentiell von der Übersättigung abhängig (Abb. 2-H). Grundvoraussetzung der PCMC-Technologie ist eine sehr hohe Übersättigung, wodurch der metastabile Bereich sehr schnell überschritten wird und die Folge homogene Primärkeime sind. Zur Verdeutlichung der Notwendigkeit der sehr hohen Übersättigung, zeigt Abb. 2-I schematisch den metastabilen Bereich und die Keimbildungshäufigkeit in einer Abbildung.

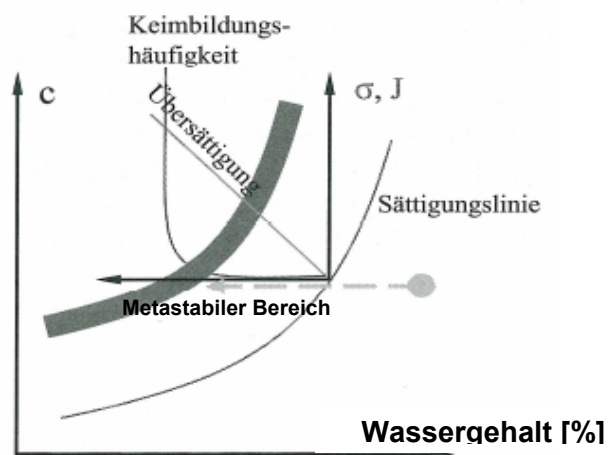


Abb. 2-I Schematische Darstellung der Keimbildungsvorgänge bei einer Verdrängungsreaktion mit polaren organischen Lösungsmittel [modifiziert nach Hoffmann, 2004]

Die Abbildung zeigt, dass bei der Zugabe eines mit Wasser mischbaren organischen Nicht-Lösemittels zur wässrigen Lösung, die Sättigungslinie überschritten wird, die Spontankeimbildung jedoch nicht sofort einsetzt. An der Sättigungslinie sind die Übersättigung und die Keimbildungshäufigkeit gleich null. Bei weiterem Hinzugeben von Nicht-Lösungsmittel steigt die Übersättigung linear an, jedoch die Keimbildungshäufigkeit zeigt den beschriebenen exponentiellen Verlauf. Damit findet die Spontankeimbildung, wie sie bei der PCMC-Technologie ohne Zudosieren von Kristallkeimen benötigt wird, erst ab einer kritischen Übersättigung, die durch den extremen Überschuss an Nicht-Lösungsmittel erzeugt wird, statt. Der Bereich von der Sättigungslinie bis zum Einsetzen der Spontankeimbildung wird als metastabiler Bereich bezeichnet. Die Breite des metastabilen Bereichs hängt von den physikalisch/chemischen Parametern der zu kristallisierenden Stoffen (Carrier, Protein, Hilfsstoffe) und von den Prozessparametern (Mischungsverhältnis, Mischer, Temperatur, Strömungsbedingungen) ab. Bei der Präzipitation im PCMC-Verfahren überwiegt die

Primärkeimbildung im Vergleich zu anschließenden Wachstumsvorgängen. Aufgrund der schnellen Vorgänge (kinetisch getrieben) können während der Präzipitation gallertartige Massen, die amorph oder teilkristallin sind, entstehen. Weiterhin können Baufehler im Kristall, insbesondere in Mischkristallen, auftreten. Typische Baufehler sind Punktdefekte (z. B. Fehlstelle), Liniendefekte (z. B. Schraubenversetzung), Flächendefekte (z. B. Zwilling) und Volumendefekte (z. B. Einschluss) [Hoffmann, 2004].

2.3.3.2 Alternative Keimbildungstheorien

Im Folgenden werden neuere Ideen zur Theorie der Partikelbildung aus übersättigten Systemen erläutert, denn auch diese können für die PCMC-Präzipitatbildung relevant sein.

Existenz von Keimvorstufen (Precursoren)

Die klassischen Keimbildungstheorien setzen voraus, dass die gelösten Komponenten homogen, also molekulardispers in der Lösung gemischt, vorliegen. Einige Experimente weisen jedoch auf das Vorhandensein einer nicht homogenen Mischung und auf Keimvorstufen hin. Dabei handelt es sich um langlebige Aggregate, die sich aus den reagierenden Komponenten zusammensetzen, die jedoch unterhalb der Größe des kritischen Keimes sind [Samani, 2002; Randolph, 1988]. Die homogene Mischung wird bei der PCMC-Herstellung durch spezielle Mischer realisiert, jedoch können diese Vorstufen vor der diffusionsbedingten Durchmischung durchaus vorhanden sein und Einfluss auf die Präzipitatbildung nehmen.

Spinodale Entmischung

In den klassischen Keimbildungstheorien besteht die Annahme, dass sich das übersättigte System im Phasendiagramm im binodalen, d. h. metastabilen Bereich, befindet.

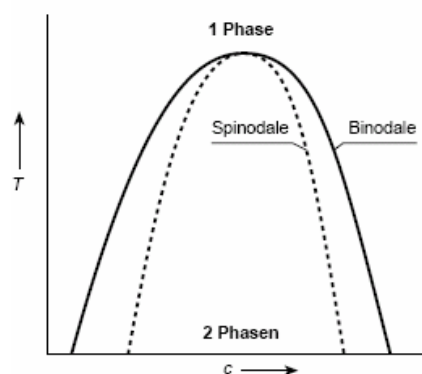


Abb. 2-J Phasendiagramm eines Zweikomponentensystems mit Mischbarkeitslücke [Horn, 2001]

Bei sehr hoher Übersättigung, die Voraussetzung für die PCMC-Herstellung ist, kann die Grenze zur spinodalen Entmischung überschritten werden. Dort kommt es spontan zur Phasentrennung, **ohne** dass zuvor Keime gebildet werden. In der Zweiphasenregion liegen Protein-Carrier-reiche und Lösungsmittel-reiche Regionen vor. Durch weiteres Mischen zerfallen Protein-Carrier-reiche Gebiete in Tropfen, die durch Scherkräfte kollabieren und sich dann zu Kristallen vereinigen [Vos, 2006].

In anderen Publikationen wird für niedermolekulare Systeme folgendes behauptet: Spinodale Entmischung konnte während der Kristallisation auf Grund des notwendigen Überschreitens der gesamten Breite des metastabilen Bereiches nicht beobachtet werden [Myerson, 1999]. Diese Einschätzung beruht wahrscheinlich auf der sehr schlechten Nachweisbarkeit der spinodalen Entmischung, die in nur sehr kurzen Zeitskalen auftritt. Eine scharfe Trennung zwischen den Theorien ist schwierig, denn sie gehen in realen Systemen ineinander über [Horn, 2001].

Partikelbildung in Mehrkomponentensystemen

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Keimbildung der PCMC berücksichtigt werden muss, ist das Vorliegen eines Mehrkomponentensystems, mit Entstehung von Co-Kristallen oder Co-Präzipitaten. Die Forschung ist auf diesem Gebiet auf Grund der enormen Komplexität noch nicht sehr weit. Es gibt erste Ansätze zum Verständnis. Zum Beispiel gibt es ein Morphologiediagramm für die Struktur von Zwei-Komponenten-Clustern als Funktion der jeweiligen Wechselwirkungsparameter, welches für LJ-6-12-Partikel ermittelt wurde (Abb. 2-K) [Clarke, 1994].

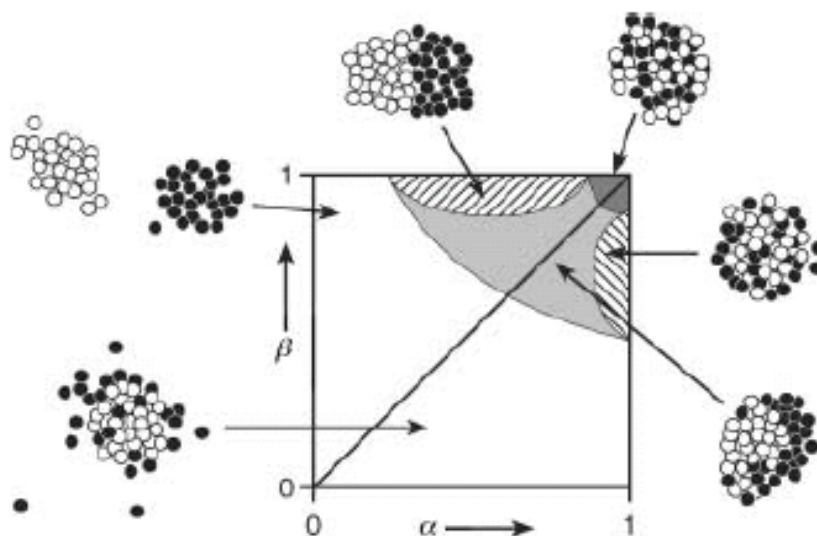


Abb. 2-K Morphologiediagramm von Zwei-Komponenten-Cluster α – Wechselwirkung zwischen „weißen“ und „schwarzen“ Partikel, β – Stärke der Kohäsion zwischen den „weißen“ Partikeln im Vergleich zum entsprechenden Wert der „schwarzen“ Partikel

Oft haben Co-Kristalle andere physikalisch-chemische Eigenschaften, die sich teilweise vorteilhaft (Verbesserung der Löslichkeit, Stabilität, Veränderung der Kristallform) für die pharmazeutische Anwendung erweisen. Bei der PCMC-Herstellung entstehen gemäß aktuellen Formulierungsstrategien (siehe Kap. 2.3.6) bewusst Co-Kristalle. Durch das Auskristallisieren einer basischen, sauren sowie neutralen Komponente im Kristall ist die Proteinstabilisierung insbesondere bei größeren Proteinen wie Antikörpern verbessert [offen gelegtes Patent WO 2008/132439 - *Precipitation stabilising compositions*].

2.3.3.3 Klassische Partikelwachstumstheorie

Das Wachstum von PCMC-Keimen ist ein untergeordneter Prozess, denn die PCMC-Fällung führt primär zur Kristallbildung, wobei eine hohe Anzahl an Kristallkeimen entsteht. Mit der Anzahl wachstumsfähiger Keime sinkt jedoch die für das Wachstum verbleibende Masse bzw. Übersättigung. Deshalb spielt das Wachstum eine untergeordnete Rolle. Weiterhin wird das Wachstum durch die an der Oberfläche abgelagerten Proteine behindert, denn diese „vergiften“ die Oberflächen. Ein Ab- bzw. Aufbau von Kristallmolekülen insbesondere an kink-Positionen wird durch die Proteine erschwert [Hoffmann, 2004].

2.3.3.4 Agglomeration der Präzipitate

Insbesondere bei der Erzeugung von kleinen Mikropartikeln durch Fällung, wie bei der PCMC-Herstellung, sowie bei deren Weiterverarbeitung können sich Agglomerate bilden. Der Begriff Agglomerate beschreibt lose zusammenhängende, nicht verwachsene Partikel oder Partikelanhäufungen, die über Feststoffbrücken miteinander verwachsen sind [Hoffmann, 2004]. Folglich ergeben sich Eigenschaften wie eine bessere Filtrierbarkeit der Agglomerate gegenüber den einzelnen feinen Partikeln oder der Einschluss erheblicher Mengen an Mutterlauge. Die Bildung von Agglomeraten und deren Stabilisierung unterliegen zwei Vorgängen. Zum einen müssen die Partikel miteinander in Kontakt gebracht werden, zum anderen sollten die Agglomerate nicht wieder zerfallen. Die für Partikel $< 10 \mu\text{m}$ am stärksten wirkenden Kräfte sind van-der-Waals Kräfte und Coulombkräfte. Beide Kräfte sind im folgenden Kapitel 2.3.4 genau erklärt und spielen auch bei der Adhäsion der Proteine auf den Carriern eine Rolle. Bei größeren Agglomeraten $> 100 \mu\text{m}$ sind Feststoffbrückenbindungen durch getrocknete bzw. auskristallisierte Flüssigkeitsbrücken für den Zusammenhalt verantwortlich [Hoffmann, 2004]. Einflussgrößen für die Agglomeration sind z. B. Partikeldichte, Partikelgröße, Übersättigung und Rührintensität.

2.3.4 Interpartikuläre Bindungskräfte

Bei proteinbeladenen Mikropartikeln wirken zwischen Protein und Carrier intermolekulare Kräfte. Beim Zusammentreffen von Carrier und Protein können sowohl Kohäsions- als auch Adhäsionskräfte wirken. Liegen entgegengesetzt geladene Stellen enger als gleichsinnig geladene Stellen zusammen, ergibt sich eine Anziehung beider Moleküle. Berühren sich jedoch die äußeren Ladungswolken, stoßen sie sich wieder ab, weil sich ihre Elektronenwolken durchdringen. Anziehende und abstoßende Kräfte halten sich bei einem bestimmten Abstand zwischen den Molekülen die Waage, denn dort ist die Energie der beiden Moleküle am geringsten. Folglich ist das System am Energieminimum am stabilsten.

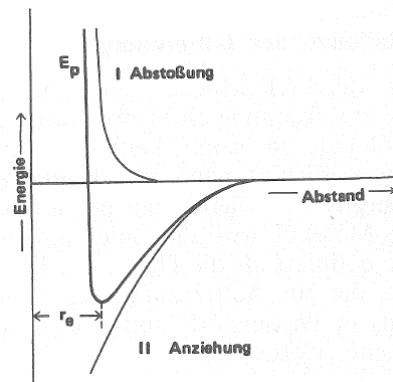


Abb. 2-L Energie der Abstoßung, der Anziehung und der Summenkurve beider Kräfte als Funktion des Abstandes zwischen zwei Molekülen [Martin, Physikalische Pharmazie, 4. Auflage]

Interpartikuläre Wechselwirkungen sind nicht nur vom Abstand der Partikel, sondern auch von deren Größe, Form, Oberflächenrauigkeit, Verformbarkeit und chemischen Identität abhängig. Die wichtigsten Anziehungskräfte oder Haftmechanismen entstehen durch:

- van-der-Waals Kräfte
 - Richt-Kräfte (Keesom-Kräfte) [1 – 50 kJ/ mol]
 - Induktions-Kräfte (Debye-Kräfte) [1 – 50 kJ/ mol]
 - Dispersions-Kräfte (London-Kräfte) [1 – 20 kJ/ mol]
- Ionen und ioneninduzierte Kräfte (Coulomb-Kräfte)
 - Ion-Ion [1 – 1000 kJ/ mol]
 - Ion-Dipol [1 – 500 kJ/ mol]
- Wasserstoffbrückenbindung [1 – 200 kJ/ mol]
- Hydrophobe Wechselwirkungen [1 – 10 kJ/ mol]

Im Folgenden werden die einzelnen Kräfte beschrieben. Aufgrund vielfältiger Einflussfaktoren, der variablen Zusammensetzung der Gesamtkraft aus verschiedenen Kräften und unter der Annahme einer idealen Geometrie der Moleküle dienen die nachfolgenden Modelle nur als Näherungen.

2.3.4.1 Van-der-Waals Kräfte

Auf der **atomaren bzw. molekularen Ebene** gibt es drei verschiedene intermolekulare Wechselwirkungen, die unter den van-der-Waals Kräften zusammengefasst werden. Erstens gibt es die Keesom-Orientierungs-Richtkraft, die die Kräfte zwischen zwei permanenten Dipolen beschreibt, zweitens eine schwächere Debye-Induktionskraft, die auf das Zusammenwirken von einem permanenten Dipol und einem induziertem Dipol basiert, drittens gibt es die London-Dispersionskräfte als schwächste Kraft der drei. Sie entsteht durch die Wechselwirkung von zwei induzierten Dipolen und ist die am häufigsten vorkommende, da sie zwischen allen Atomen und Molekülen wirkt. Die Höhe des Gesamtwechselwirkungspotentials (U) resultiert aus der Addition der drei einzelnen Wechselwirkungsenergien und ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des zwischenmolekularen Abstands (r) zwischen Atomen bzw. Molekülen.

$$U = \frac{\lambda}{r^6} \quad \text{Gl. 2-6}$$

λ = London-van-der-Waals Konstante

Die London-van-der-Waals Konstante fasst die Terme zur Berechnung der drei Kräfte zusammen. Berücksichtigt ist das Dipolmoment und die Polarisierbarkeit der Moleküle sowie das Plancksche Wirkungsquantum multipliziert mit der Schwingungsfrequenz des isotropen Oszillators, den das Molekül beschreibt, und die Dielektrizitätskonstante des Vakuums.

Auf **partikulärer Ebene** gibt es zwei verschiedene Ansätze, die van-der-Waals Kräfte zu berechnen. Einerseits steht der mikroskopische Ansatz von Hamaker, der auf die Annahme von Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen basiert. Dieser geht von der Additivität der Kräfte aus und berechnet die Anziehungskraft durch Integration aller Atom- und Molekülpaare. Unter Berücksichtigung der London-van-der-Waals Konstante lässt sich die Hamakerkonstante (C_H) berechnen.

$$C_H = \lambda \cdot \pi^2 \cdot N_1 \cdot N_2 \quad \text{Gl. 2-7}$$

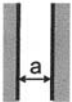
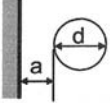
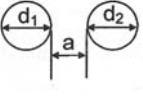
N_1, N_2 = Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit

Der zweite Ansatz entspricht dem makroskopischen Ansatz von Lifshitz. Dieser betrachtet die Kontaktpartner als Partikel mit bestimmten optischen Eigenschaften. Die Lifshitz-van-der-Waals Konstante ($h\omega$) berechnet sich aus den komplexen frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten der Partikel. Die mikro- und makroskopischen Ansätze können ineinander umgerechnet werden.

$$h\omega = \frac{4}{3} \pi C_H \quad \text{Gl. 2-8}$$

In Tab. 2-E sind alle Gleichungen zur Berechnung der van-der-Waals Kräfte nach beiden Theorien in Abhängigkeit vom System zusammengefasst (Fläche/ Fläche, Fläche/ Partikel, Partikel/ Partikel). Voraussetzung ist, dass die Partikel keine Verformung im Kontaktbereich erfahren und die Partikelabstände kleiner 100 nm sind, da für größere Abstände wesentlich kleinere van-der-Waals Kräfte gelten.

Tab. 2-E van-der-Waals Kräfte zwischen ideal glatten, starren Modellpartikeln [Lohrmann, 2005]

Modell	Mikroskopische Betrachtung	Makroskopische Betrachtung
	$\frac{F_{vdW}}{A} = \frac{C_H}{6\pi a^3}$	$\frac{F_{vdW}}{A} = \frac{h\omega}{8\pi^2 a^3}$
	$F_{vdW} = \frac{C_H d}{12a^2}$	$F_{vdW} = \frac{h\omega d}{16\pi a^2}$
 $d = \frac{2d_1 d_2}{d_1 + d_2}$	$F_{vdW} = \frac{C_H d}{24a^2}$	$F_{vdW} = \frac{h\omega d}{32\pi a^2}$

- F_{vdW} = van-der-Waals Kräfte
- A = Oberfläche der wechselwirkenden Partikel
- a = Adhäsionsabstand
- d, d₁, d₂ = Durchmesser der Partikel
- C_H = Hamaker-van-der-Waals Konstante
- hω = Lifshitz-van-der-Waals Konstante

2.3.4.2 Ion-Dipol und Ion-Ion Kräfte

Neben den beschriebenen Dipolen gibt es zwischen polaren/ nichtpolaren Molekülen und Ionen Anziehungskräfte. Elektrostatische Wechselwirkungen basieren auf lokale

Anhäufungen von Ladungen der Partikel mit entgegengesetztem Vorzeichen. Ladungen entstehen durch Reibungseffekte, durch Kollision der Partikel oder sind auf der Oberfläche der Partikel z. B. durch Dissoziation eines Salzes in seine Ionen vorhanden. Es gibt Ion-Dipol Wechselwirkungen, wobei ein Kation eine Anziehungskraft auf das elektronegative Sauerstoffatom des Wassers ausübt, während ein Anion die Wasserstoffatome des dipolaren Wassers anzieht. Weiterhin gibt es Wechselwirkungen unter Ionen.

2.3.4.3 Wasserstoffbrückenbindung (H-Bindung)

Die Wechselwirkungen zwischen einem Molekül mit positivem Wasserstoffatom und einem stark elektronegativen Atom mit freiem Elektronenpaar entspricht einer H-Bindung. Das Wasserstoffatom kann sich dank seines geringen Umfangs und seines starken elektrostatischen Feldes einem elektronegativen Atom stark nähern. Diese H-Bindungen existieren z. B. im Wasser, zwischen Alkoholmolekülen (Nicht-Lösungsmittel), an Aminogruppen (Carrier) und an Polypeptiden (Proteine), wobei die Kräfte der H-Bindungen unterschiedlich stark sein können. Es werden starke (63 kJ/mol bis 167 kJ/mol), mittlere (17 kJ/mol bis 63 kJ/mol) und schwache (< 17 kJ/mol) H-Bindungen unterschieden. Besonderes Interesse gilt den H-Bindungen zwischen den Aminogruppen, die für die Sekundärstruktur (α -Helix, β -Faltblatt) zuständig sind [Krishnamurthy, 2002]. Auch zwischen den Tägern und Proteinen der PCMC treten vermutlich mittlere bis schwächere H-Bindungskräfte auf. Neben intermolekularen treten auch intramolekulare Wechselwirkungen auf.

2.3.4.4 Hydrophobe Wechselwirkungen

Die Aggregation apolarer Strukturen verdrängt Wassermoleküle aus dem Bindungsbereich, weil sie keine H-Bindungen aufbauen können. Durch die Verdrängung nimmt die „Unordnung“ der Wassermoleküle zu, was wiederum zur Stabilisierung des Wechselwirkungskomplexes führt. Diese Art der Wechselwirkung tritt bei denaturierten PCMC oder Proteinaggregaten auf.

Zusammenfassend basieren die Bindungskräfte zwischen Carrier und Protein auf van-der-Waals Kräfte, Ionen-Dipol Kräfte und H-Bindungen, wobei der Anteil der Kräfte von den jeweiligen Komponenten abhängen dürfte und im Rahmen einer gezielten Formulierungsentwicklung optimiert werden kann.

2.3.5 Kontinuierlicher PCMC-Herstellungsprozess

Das Herstellungsverfahren von *protein-coated microcrystals* (PCMC) unterteilt sich in drei Prozessschritte, zu denen in den Abschnitten 2.3.5.1 bis 2.3.5.3 die Grundlagen vermittelt werden.

1. Mischen des Lösungsmittels mit dem Fällungsmittel, was folglich zur Präzipitation führt
2. Aufkonzentrierung der Suspension
3. Endtrocknung der proteinbeladenen Mikropartikel

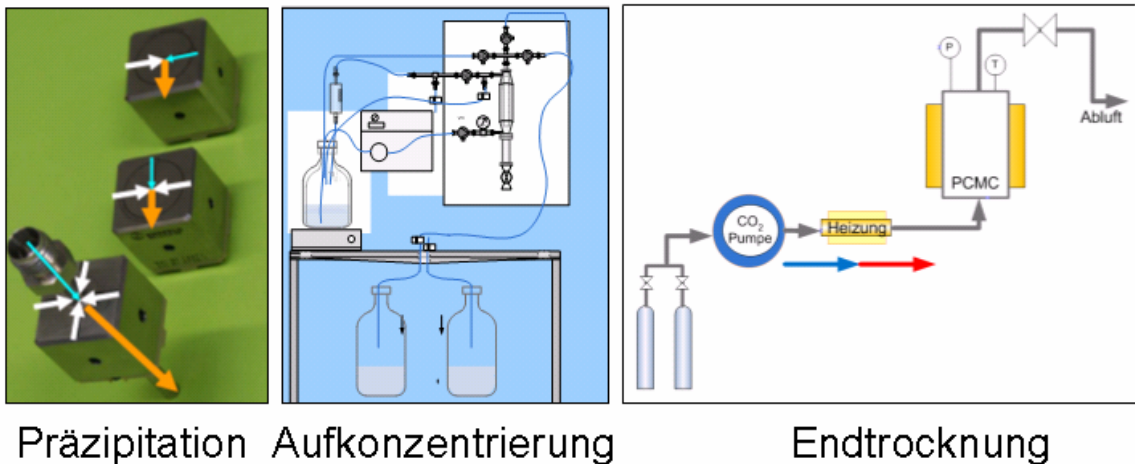


Abb. 2-LL Gesamtprozess

2.3.5.1 Mischen/ Präzipitieren

PCMC-Partikel entstehen durch homogene Keimbildung, wozu eine hohe Übersättigung nötig ist. Hohe Übersättigungen fordern eine intensive homogene Mischung der zwei Reaktanden.

Das Mischen ist eine klassische Grundoperation in der pharmazeutischen Technologie. Unter dem Oberbegriff Mischen wird eine Vielzahl auf unterschiedliche Zwecke ausgerichteter Operationen verstanden, die alle die Aufgabe haben, zwei oder mehrere vorher getrennte Komponenten auf bestimmte Weise zu vereinen. Die Vermischung erfolgt unter dem Einfluss von Bewegungen mit dem Ziel, dass sich die zu mischenden Komponenten möglichst tief durchdringen. Prinzipiell ist das Mischen ein Diffusionsvorgang der Komponenten ineinander. Daher lässt sich die Mischkinetik bei konstanten Mischparametern durch das 1. Ficksche Diffusionsgesetz beschreiben.

$$J = \frac{dM}{A \cdot dt} = -D \frac{dc}{dx}$$

Gl. 2-9

J	= Massenstrom/ Diffusionsstrom
A	= Querschnittsfläche
M	= Masse
t	= Zeit
dc/dx	= Konzentrationsgradient
D	= Diffusionskoeffizient

Der Diffusionskoeffizient enthält die Temperatur und die turbulente Intensität der Bewegung. Beim Mischen zweier Flüssigkeiten reicht, wenn Zeit keine Rolle spielt, durchaus die thermisch bedingte turbulente Brownsche Molekularbewegung für eine Durchmischung aus. Jedoch reicht dieses bei weitem nicht, um schnell übersättigte Lösungen herzustellen. Diese fordern für einen hohen Diffusionsstrom intensive Rührvorgänge. Rühren, ein dynamischer Prozess, ist eine Unterfunktion des Mischens. Allgemein kann das Rühren in einen dynamischen und statischen Mischvorgang unterteilt werden. Beim dynamischen Rühren bewegt sich das Rührequipment (Rührer) und beim statischen Mischen führen feststehende Rohrleitungen, z. T. mit Einbauten, und die Mischgeometrien zur Bewegung bzw. Durchmischung der beiden Flüssigkeiten.

Ziel aller Mischapparaturen für Fällungen ist es, eine möglichst schnelle homogene Vermischung zu erzielen. Die Vermischung kann in Makro-, Meso- und Mikrovermischung untergliedert werden [Baldyda, 1999]. Unter Makrovermischungen fallen turbulente Strömungsvorgänge auf der Längenskala von Dezimetern, wie sie in Rührkesseln relevant sind. Mit Mesovermischung bezeichnet man Mischvorgänge auf der Längenskala von Millimetern. Sie beruhen auf dem Zerfall von turbulenten Wirbeln in immer kleinere Wirbel bis viskose Kräfte gegenüber Trägheitskräften überwiegen. Unter Mikrovermischung fallen Vorgänge im Mikrometerbereich. Dabei wickeln sich die zwei zu mischenden Flüssigkeitsströme ineinander, wobei die Schichten immer dünner werden und lokal laminare Schichten resultieren (Abb. 2-M).

Zwischen den zu mischenden Strömen existiert eine Grenzschicht. An der Grenzschicht ist immer maximale Übersättigung gegeben. Entscheidend für die Betrachtung der Partikelbildung ist nun, ob die Zeit für die Teilchenbildung länger oder kürzer ist als die Zeit bis zur vollständigen homogenen Durchmischung, die auf kleinen Längenskalen durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle definiert wird. Um die klassischen Keimbildungstheorien anzuwenden, wird eine längere Zeit der Teilchenbildung gegenüber der homogenen Durchmischung angenommen. Dagegen kann die Partikelbildung

zu einem hohen Anteil in der Grenzschicht ablaufen, bevor die zwei Ströme homogen vermischt sind [Lindberg, 1999]. Dann kann die Partikelbildung zum einen nach klassischen Theorien stattfinden, zum anderen wäre es möglich, dass sich stark hydratisierte Keimvorstufen (Precursor) nach den alternativen Keimbildungstheorien bilden [Horn, 2001].

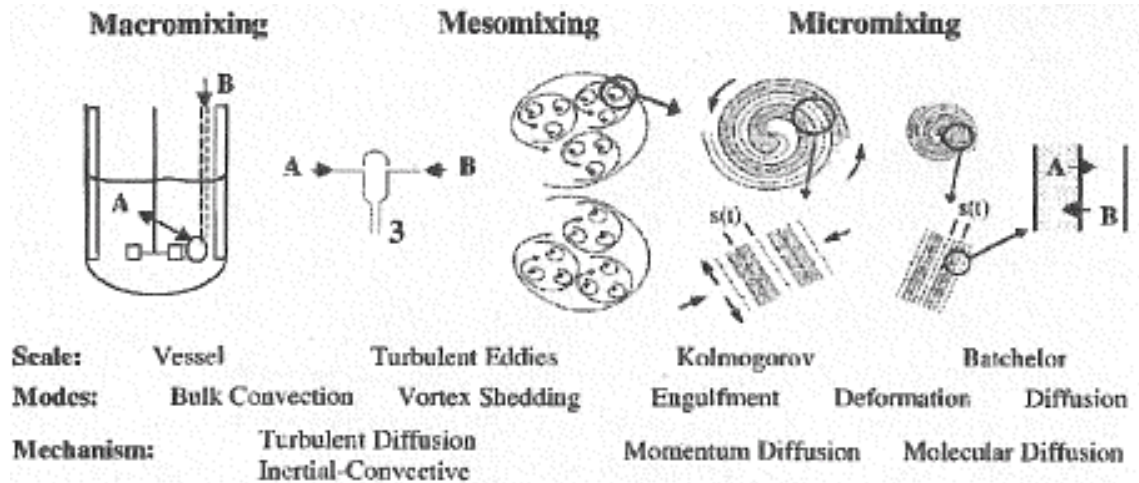


Abb. 2-M Vermischung zweier Eduktströme bei turbulenter Mischung [Baldyda, 1999]

Für Fällungskristallisationen können halbkontinuierliche und kontinuierliche Methoden oder dynamische und statische Methoden zum Einsatz kommen, wobei letztere in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Bei den halbkontinuierlichen Fällungsmethoden liegt z. B. das Nicht-Lösungsmittel im Rührkessel vor und unter Rühren wird die Protein-Carrier-Lösung hinzugegeben. Für die Präzipitatqualität spielt die Zuführung der Reaktanden und die Rührtechnik eine große Rolle. Der Hauptnachteil besteht in der inhomogenen Verteilung der Mischungsenergie im Rührkessel, was sich in der Mischungsqualität zeigt. Die Mischungsqualität verschlechtert sich häufig bei wachsendem Kesselvolumen. Bedenkt man die nötige hohe Übersättigung für ein einheitliches Kristallinat, ist eine homogene und schnelle Durchmischung essentiell. Daher kann ein klassischer Rührkessel für Fällungen als nicht ideal betrachtet werden. In der Literatur gibt es Ansätze, die Mischung in Kesseln zu verbessern. Ein Ansatz besteht darin, einen Taylor-Couette-Reaktor einzusetzen [Marchisio, 2001]. Dabei werden zwischen einem rotierend Zylinder und einer konzentrischen Wand Taylor-Wirbel erzeugt, die lokal hohe Scherkräfte bilden und damit eine hohe Mikromischungseffizienz bewirken. Ein weiterer interessanter Ansatz für Fällungsreaktionen ist der Einsatz von einem Impinging-Jet Mischer in Kesseln [Beckmann, 2008, Patent WO 0044468]. Dabei bringen sich zwei gegenüberliegende Strahlen miteinander in Kontakt. Der eine Stahl besteht aus Fällungsmedium und der

andere aus der Lösung mit den auszufällenden Komponenten. Die Mischung tritt auf, wenn sich die beiden Strahlen einander durchdringen. Die Mischungsintensität und die Mischungsenergie sind Funktionen der Strahlen.

Ein verbreiteter Ansatz für die kontinuierliche, statische Mischung ist die Verwendung von T- oder Y-Mischkammern. Diese Mischer können auch mit weiteren statischen Mixern im Strömungsverlauf kombiniert werden. Die Mischungsintensität wird durch die geometrischen Parameter, die Flussgeschwindigkeit der Reaktanden, den Druckverlust und die Temperaturänderung bestimmt. T und Y-Mischer gibt es im Mikro- (100 nm bis 1000 μm) und Makromaßstab ($> 1000 \mu\text{m} = 1 \text{ mm}$). Die Herausforderung an diese Mischer ist, dass sie durch die Präzipitate nicht verblocken. Für die Produktion größerer Mengen ist ein *scale-up* dieser Mischertypen nicht zu empfehlen, sondern die Parallelisierung. Ebenfalls können komplexe Mikromischer für Fällungsreaktionen eingesetzt werden. Dabei sind drei Mikroeffekte zur Mischungsintensivierung zu nennen, ein intensivierter Stoff-, Wärmetransport und verstärkte Oberflächenphänomene [Markowz, 2005]. Die Mikromischer führen zu intensiven Vermischungen, jedoch ist ebenfalls ein *scale-up* nicht möglich.

Als letzte Methode für eine intensive Durchmischung kommen Ultraschallreaktoren in verschiedensten Ausführungen zur Anwendung. Entweder wird der durch einen Ultraschallwandler erzeugte Ultraschall im ganzen Reaktionsvolumen eingebracht, dann häufig mit einer niedrigen bis mittleren Intensität, oder in einer beschränkten Zone, dann mit hoher Intensität. Der Unterschied zu den anderen Methoden ist, dass die nötige Durchmischungsenergie durch den Ultraschallgenerator aufgebracht wird und nicht durch die Flüssigkeitsströme. Bei Ultraschallmischern führt man die Reaktanden in der Kavitationszone zusammen, in der sich durch die Implosion der Kavitäten lokal *micro-jet-streams* und Druck- sowie Temperaturspitzen ausbilden [Machunsky, 2007].

Rohrströmung

Laminare sowie turbulente Strömungen treten in Abhängigkeit von der Reynoldszahl (Re) auf. Bei laminarer Strömung ($Re < 2300$) bewegen sich die Teilchen auf parallelen Stromlinien. Die Fluidteilchen haben in der Mitte die größte Geschwindigkeit und zum Rand wegen der Randleibung eine stark absinkende Flussgeschwindigkeit. Bei der Mischung von zwei Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Konzentration unter laminaren Bedingungen erfolgt die Mischung unter langsamer Diffusion. Bei turbulenten Strömungen ($Re > 2300$) erfolgt die Durchmischung schneller, da neben der achsenparallelen Strömung eine Querbewegung der Fluidteilchen auftritt. Dies ist sichtbar an der flacheren Geschwindigkeitsverteilung (Abb. 2-N).

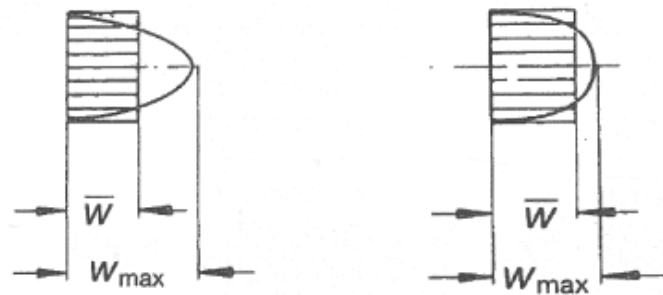


Abb. 2-N links laminare und rechts turbulente Rohrströmung [Baum, 2008]

Die Berechnung der Reynoldszahl (Re) ist abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit ($\varpi = \dot{V} / A$), der kinematischen Viskosität (ϱ) und vom Innendurchmesser (d) des Rohres. Die kinematische Viskosität berücksichtigt die Temperatur und den Druck [Bohl/ Elmendorf, 13. Auflage].

$$Re = \frac{\varpi \cdot d}{\varrho} = \frac{4 \cdot \dot{V}}{\pi d \varrho} \quad \text{Gl. 2-10}$$

Die Präzipitation von PCMC erfolgt mit empfindlichen Arzneistoffen. Proteine sind schersensitiv, daher darf die Scherrate/ Schergeschwindigkeit nicht zu hoch sein. In Rohrreaktoren tritt eine erhöhte Scherrate (s) in Stresszonen auf. Stresszonen bilden sich an Geschwindigkeitsgrenzen oder in Turbulenzgebieten. Im Rohrreaktor wird die Scherrate über die Änderung der wandparallelen Geschwindigkeit bezogen auf die Änderung des Wandabstandes berechnet. Das heißt, eine große Scherrate wird durch einen zunehmenden Volumenstrom und durch einen abnehmenden Wandabstand (r) in dreifacher Potenz bedingt [Baum, 2008].

$$s = \frac{4 \cdot \dot{V}}{\pi \cdot r^3} \quad \text{Gl. 2-11}$$

\dot{V} = Volumenstrom

Thermodynamik

Der Mischprozess ist beendet, wenn die Komponenten die höchste Unordnung, d. h. die maximale Entropie, erreicht haben. Die Änderung der Entropie (ΔS) führt damit zur Änderung der freien Enthalpie (ΔG). Während der PCMC-Herstellung erfolgt eine

Durchmischung des Lösungsmittels (Wasser) mit dem Nicht-Lösungsmittel (Isopropanol bzw. Methylpropanol). Dabei werden Wassermoleküle durch Lösemittelmoleküle substituiert. Der energetische Zustand der flüssigen Materie ändert sich nicht, wenn die Moleküle ihre Lage austauschen. Damit gelten die Gesetzmäßigkeiten einer idealen Mischung:

$$\Delta G = -T\Delta S \quad \text{Gl. 2-12}$$

Die freie Enthalpie ändert sich bei jeder Komponente (W für Wasser und I für IPA) einer idealen Mischung allein aus der mengenmäßigen Zusammensetzung (n_w , n_I) und der absoluten Temperatur (T). Weil der Stoffmengenanteil (x_w , x_I) immer eine Zahl unter 1 ist, ist die freie Enthalpie bei idealen Mischungen negativ. Folglich ist die Durchmischung von Wasser z. B. mit Isopropanol thermodynamisch stabil [Bauer-Frömming-Führer, 7. Auflage].

$$\Delta G_w = n_w \cdot R \cdot T \ln x_w \quad \text{und} \quad \Delta G_I = n_I \cdot R \cdot T \ln x_I$$

$$\Delta G = \Delta G_w + \Delta G_I \quad \text{daher gilt:}$$

$$\Delta G = n_w \cdot R \cdot T \ln x_w + n_I \cdot R \cdot T \ln x_I \quad \text{Gl. 2-13}$$

Grundsätzlich streben die zu mischenden Ströme den Zustand einer optimalen Zufallsmischung an. Mechanisch bedingte Entmischungen sind bei idealen Mischungspartnern nicht zu beobachten. Aufgrund der optimalen Durchmischung kommt es zur Präzipitation der in Wasser gelösten Materie, wenn letztere im Fällungsmittel nicht löslich sind.

2.3.5.2 Aufkonzentrierung

Die PCMC werden durch Präzipitation hergestellt. In der resultierenden Suspension ist der Feststoffanteil in Abhängigkeit von der Löslichkeit der Trägermaterialien ca. 0,5 % (m/v). Die Präzipitate sollen getrocknet werden, um eine trockene stabilisierte Proteinarzneiform als Endprodukt zu erhalten. Die Trocknung kann thermisch durch Sprühtrocknung oder durch Extraktion des Suspensionsmittels mit überkritischem CO₂ erfolgen. Beide Trocknungsprozesse wären langwierig und energieintensiv, wenn keine vorgeschaltete Aufkonzentrierung der Fällungssuspension zu höheren Feststoffgehalten in der Suspension erfolgen würde. Daher erfolgt im Anschluss an die Fällung

eine Aufkonzentrierung der Präzipitate in der Suspension. Die Aufkonzentrierung kann mit verschiedenen Filtrations- und Zentrifugationsmethoden erfolgen.

Filtrieren

Filtrieren gehört in der pharmazeutischen Technologie ebenfalls zu den Grundoperationen und dient zur Trennung bzw. Aufkonzentrierung von festen Partikeln aus Flüssigkeiten oder Gasen. Je nach Zweck werden Klärfiltration und Trennfiltration unterschieden. Die Klärfiltration zielt auf eine quantitative Gewinnung eines klaren Filtrates. Bei der PCMC-Herstellung ist jedoch die Trennfiltration gefragt, die zur Gewinnung des Filterkuchens oder des aufkonzentrierten Produktes führt.

Über Filter/ Filtermittel lässt sich die feste Komponente eines dispersen Systems vom Suspensionsmedium trennen. Die zurückbleibende Komponente wird als Filterkuchen oder als Retentat bezeichnet. Die durch den Filter gelaufene meist klare Flüssigkeit ist das Filtrat/ Permeat.

Je nach Abscheidungsmechanismus oder eingesetzten Filtertyp wird die Oberflächen-/ Siebfiltration von der Tiefen-/ Bettfiltration unterschieden. Bei der Tiefenfiltration trennen Porendurchmesser und Adsorptionseffekte innerhalb des Filters die zu separierenden Phasen. Dadurch können besonders kleine Partikel abgetrennt werden, indem sie in der Filtermembran zurückbleiben. Von Interesse ist bei der Tiefenfiltration häufig nur das Filtrat. Bei der PCMC-Herstellung ist jedoch der Filterkuchen bzw. das Retentat das zu gewinnende Gut. Daher eignet sich besonders die Oberflächenfiltration. Über dünnsschichtige Filter erfolgt die Filtration ausschließlich über die Poren in der Membran. Modellartig entsprechen die einzelnen Poren einzelnen Filterkanälen, die wiederum zylindrischen Kapillaren ähneln. Daher kann für die Kapillardurchlässigkeit das Hagen-Poiseuillesche Gesetz zur Beschreibung annähernd herangezogen werden. Das Durchflussvolumen pro Zeiteinheit (dV/dt) steigt, umso größer der Porendurchmesser (r^4) der Membran und je höher der Druckunterschied (Δp) zwischen Zulauf und Ablauf ist [Bauer-Frömming-Führer, 7. Auflage].

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4 \cdot \Delta p}{8\eta \cdot l} \quad \text{Gl. 2-14}$$

η = dynamische Viskosität des Dispersionsmittels

l = Länge der Kapillare

Aufgrund der Komplexität der Filtrierverfahren modifiziert man das Hagen-Poiseuillesche Gesetz. Die effektive Filterfläche (A) wird durch $\pi \cdot r^2$ und die Porosität (ϵ) beschrieben, woraus Gleichung 2-15 resultiert.

$$\frac{dV}{dt} = \varepsilon \cdot A \cdot \frac{r^2 \cdot \Delta p}{8\eta \cdot l} \quad \text{Gl. 2-15}$$

Häufig ist die Porosität als Funktion der Zeit, insbesondere bei der Kuchenfiltration, nicht genau erfassbar. Daher werden experimentell die hydraulischen Widerstände der Filterschicht (R_S) und des Filterkuchens (R_K) ermittelt, die die dynamische Viskosität (η) des Dispersionsmittels mit berücksichtigen. Die fiktive Kapillarlänge (l) wird durch die Höhe der Filter- sowie Kuchenschicht ersetzt. Daraus ergibt sich die **Darcy-Gleichung**:

$$\frac{dV}{dt} = A \cdot \frac{\Delta p}{R_K + R_S} = A \cdot \frac{\Delta p}{\beta_S \cdot h_S + \beta_K \cdot h_K} \quad \text{Gl. 2-16}$$

β_S / β_K = spezifischer Widerstand der Filterschicht/ des Filterkuchens

h_S / h_K = Höhe der Filterschicht/ des Filterkuchens

Die Kuchenfiltration dient häufig als Trennfiltration zur Gewinnung des Kuchens. Sie ist oft ein diskontinuierliches Verfahren. Zur besseren Kuchenernte empfiehlt sich eine stabile Filtermembran mit glatter Oberfläche. Aktuelle Entwicklungen gibt es in der kontinuierlichen kuchenbildenden Vakuum- und Druckfiltration [Peuker, 2007]. Weiterhin gibt es kontinuierliche Verfahren, die insbesondere beim Verstopfen der Filter durch den Filterkuchen zum Einsatz kommen. Dabei wird zum einen die Filterfläche vergrößert, zum anderen die Suspension tangential angeströmt, um einen Kuchenaufbau zu vermeiden. Darüber hinaus wird bei der Tangentialflussfiltration (TFF) oder *cross-flow* Filtration bei einem wesentlich niedrigeren Differenzdruck filtriert. Eingebaute *screens* zwischen den Membranen erzeugen zusätzlich Turbulenzen, verhindern damit einen Kuchenaufbau und verbessern infolgedessen die Filtration.

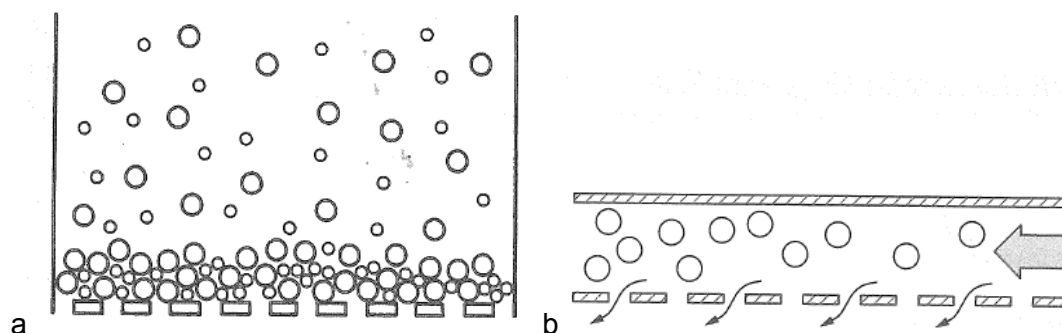


Abb. 2-0 a) Oberflächenfiltration über Siebfilter, wo sich ein Filterkuchen aufbaut, b) Tangentialfiltration, Filtration ohne Verstopfen, [Bauer-Frömming-Führer, 7.Auflage]

Die Filtration insbesondere von Partikeln von wenigen Mikrometern kann zur Herausforderung werden. Theoretisch leiten sich folgende Vorschläge zur Verbesserung der Filtration her: Erstens die Vergrößerung der Filterfläche (A), zweitens die Erhöhung der Druckdifferenz (Δp) durch Druck- oder Vakuumfiltration, drittens die Erniedrigung der Viskosität (η) des Dispersionsmittels, z. B. durch Temperaturerhöhung, und viertens die Reduktion des hydraulischen Filterkuchen- (R_K) bzw. Filterschichtwiderstandes (R_S), z. B. durch dünne Membranen oder TFF. Die experimentelle Testung gibt jedoch erst über den Filtrationserfolg Auskunft.

Der Trenneffekt oder die Trennschärfe wird bei der Membranfiltration durch den Porendurchmesser des Filters bestimmt. Er bestimmt damit den Rückhalteeffekt. Je nach Porendurchmesser werden auch die Filtrierverfahren unterschieden (Tab. 2-F).

Tab. 2-F Filtrierverfahren [modifiziert nach Bauer-Frömming-Führer, 7. Auflage]

Filtrierverfahren	Poren-Ø	zu trennende Systeme
Grobfiltration	> 50 µm	grobe bis feine Partikel oder Suspensionen
Feinfiltration	5 bis 50 µm	sehr feine Partikel oder Suspensionen
Mikrofiltration	0,15 bis 5 µm	kolloidale Partikel (Proteine, Polypeptide)
Ultrafiltration	5 bis 300 nm	kolloidale Partikel, makromolekulare Stoffe
Nanofiltration	0,3 bis 10 nm	echte Lösungen niedermolekularer Stoffe

Tab. 2-G Flächenfiltermaterialien

Filtertyp	Trennschärfe	Materialien
Gewebefilter	10 bis 100 µm	
	<ul style="list-style-type: none"> • Metallgewebe • Filtertücher 	<ul style="list-style-type: none"> rostfreie Stahldrähte Polypropylen, Teflon
Poröse Filter	> 2 µm	Sintermetalle, Glasfritten, Keramik, Kunststoffe
Membranfilter	0,1 bis 0,65 µm	PVDF-, PES-, Teflonmembranen, modifiziertes Celluloseacetat

In der Pharmazie sind vor allem Flächenfiltermaterialien im Einsatz. Die Tabelle (Tab. 2-G) gibt einen Überblick über die verschiedenen Filtertypen, die zur PCMC-Herstellung eingesetzt werden können.

Für die Filterauswahl ist die Trennschärfe das Hauptkriterium. Daneben sind Adsorptionen am Filter und die Filterbeständigkeit gegen chemische und mechanische Beanspruchungen zu berücksichtigen. Unerwünschte Wechselwirkungen der Suspension mit dem Filter müssen ausgeschlossen sein. Welches Filtrationsverfahren eingesetzt wird, entscheidet sich nach dem Filtrationsprodukt. Bei diskontinuierlichen Verfahren, wie z. B. der Nutschenfiltration über Filtermembranen, erhält man trockene Filterkuchen. Diese Filterkuchen müssen häufig in einem weiteren Schritt wieder deagglomeriert werden. Dagegen ergeben kontinuierliche Filtrationsmethoden, wie z. B. die *cross-flow* Filtration aufkonzentrierte Suspensionen, die direkt einem weiteren Trocknungsprozess ausgesetzt werden können [Bauer-Frömming-Führer, 7. Auflage].

Zentrifugieren

Die Zentrifugation kann zur Aufkonzentrierung von Suspensionen unter Ausnutzung der Massenträgheit der Partikel (Zentrifugalkraft = Fliehkraft $\rightarrow F = m \cdot a$) eingesetzt werden. Die Partikel wandern aufgrund ihrer höheren Trägheit nach außen und verdrängen dort die Suspensionsmoleküle. Gegenüber der Sedimentation, die nur auf die Schwerkraft beruht, ist die Zentrifugation wesentlich schneller.

Häufig ist die Beschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) angegeben. Die g-Zahl wird auch als relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) bezeichnet und kann mit folgender Formel berechnet werden.

$$RZB = \frac{4\pi^2}{g} \cdot r \cdot n^2 \approx 0,00001118 \cdot R \cdot N^2$$

Gl. 2-17

R = Radius in cm

N = Umdrehung pro min

Es können zwei kontinuierliche Verfahren der Zentrifugation zur Aufkonzentrierung von Suspensionen unterschieden werden. Erstens die Zentrifugation über ein Filtergewebe, das entweder einem Stülpfiler oder einer Lochtrommel entspricht. Zweitens die forcierte Sedimentation, wobei durch die Zentrifugalkraft die Sedimentationsgeschwindigkeit beschleunigt wird. Bei beiden Verfahren erfolgt die Aufkonzentrierung über das kontinuierliche Abführen des Überstandes. Ein nahezu trockener Filterkuchen bzw. ein feuchter, hochkonzentrierter Rückstand bleibt zur Endtrocknung. Wie bei der

Filtration besteht beim Einsatz eines Filtergewebes bzw. einer Lochtrommel die Abhängigkeit von den hydraulischen Widerständen der Filterschicht und des Filterkuchens.

2.3.5.3 Endtrocknung

Trocknung ist eine Grundoperation der Stoffseparation, bei der die anhaftende Flüssigkeit bzw. das Suspensionsmittel von den Partikeln abgetrennt wird. Die aufkonzentrierten proteinhaltigen Mikrokristalle (PCMC) können z. B. durch konvektive Trocknung des Suspensionsmediums im Sprühturm oder durch die Extraktion des Suspensionsmediums mit überkritischen Fluiden in trockene, fließfähige Pulver überführt werden. Das einfachste Verfahren ist die Verdunstung des Suspensionsmediums bei normalen Temperaturen ohne Zuführung von Wärmeenergie. In diesem Fall muss erfahrungsgemäß danach ein weiterer Prozessschritt zur Desagglomeration der Partikel erfolgen.

Trocknung von Suspensionen im Sprühturm

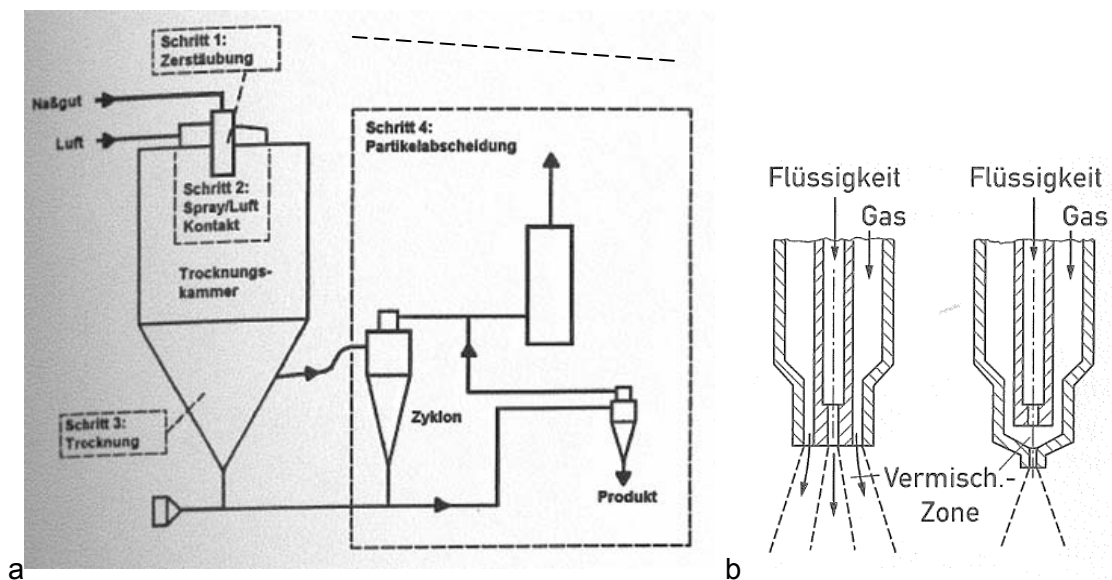


Abb. 2-P a) Aufbau eines typischen Sprühtrockners im Gleichstromverfahren [Masters, 1991] b) Zerstäubung mit Zweistoffdüse, links äußere Vermischung, rechts innere Vermischung [Bauer-Frömming-Führer, 7. Auflage]

Die Prozessschritte der Sprühtrocknung umfassen erstens die Zerstäubung der zu trocknenden Suspension in einem Heißluftstrom, zweitens den Kontakt zwischen Tröpfchen und heißer Luft, drittens die Trocknung der gebildeten Tröpfchen und viertens die Abscheidung der getrockneten Partikel im Luftstrom. Der Aufbau ist in Abb. 2-P a dargestellt. Die Trocknungszeiten liegen bei Tröpfchen $< 100 \mu\text{m}$ unter 1 s

[Nürnberg, 1980]. Damit ist die Sprühtrocknung bezüglich der Temperatur für thermolabile Stoffe (Proteine, Peptide) ein schonendes Verfahren, besonders wenn der Sprühturm im Gleichstrom von Heißluft und Sprühnebel betrieben wird [Masters, 1991]. Häufig sprüht die Düse von oben in den Sprühturm. Beim Gleichstromprinzip trifft dann die wärmste Luft auf die feuchtesten Partikel.

Die Zerstäubung ist der Startpunkt der Sprühtrocknung. Sie erfolgt mit Rotationszerstäubern, Einstoff-, Zweistoff-, Dreistoff- oder Ultraschalldüsen. Der Laborsprühturm SD MICRO (GEA Niro GmbH) benutzt eine Zweistoffdüse, wobei die Suspension unter Mitwirkung eines gasförmigen Mediums versprüht wird. Die Suspension wird über ein Flüssigkeitsrohr der Düsen Spitze zugeführt. Bei den meisten Zweistoffdüsen tritt aus einem Ringkanal um das Flüssigkeitsrohr herum ein beschleunigter Gasstrom/ Sprühgas, z. B. Stickstoff, aus. (Abb. 2-P b) Gegenüber der Suspension besitzt das Sprühgas eine hohe Relativgeschwindigkeit. Dadurch entstehen Scherkräfte, die wiederum feinste Tröpfchen bilden.

Die treibende Kraft bei der Trocknung eines Tröpfchens ist die Differenz zwischen dem Dampfdruck des Lösungsmittels an der Tröpfchenoberfläche und dem Partialdruck des Lösungsmittels in der Umgebung des Tropfens. Die Tropfentrocknung findet mit konstanter Geschwindigkeit statt, solange die Oberfläche mit Suspensionsmedium gesättigt ist. Je größer dabei die Temperaturdifferenz zwischen der Temperatur der Trocknungsluft und der Temperatur an der Tröpfchenoberfläche ist, desto höher ist die Trocknungsgeschwindigkeit [Maa, 1997].

Die getrockneten Partikel werden über Zyklone, Filter und elektrostatische Abscheider vom Luftstrom getrennt. Im Laborsprühtrockner (SD Micro) wird ein konventioneller Zyklon verwendet, in dem tangential Partikel und Luftstrom hineinströmen und einen nach unten gerichteten Wirbel verursachen. Auf die trockenen Partikel wirken Zentrifugalkräfte und Impaktionen an die Zyklonwand. Durch die nach unten gerichtete Zentrifugalkraft sammeln sich die Partikel im Auffanggefäß unter dem Zyklon. Der Luftstrom bewegt sich entgegengesetzt spiralförmig nach oben in den Gasauslass des Zyklons, von wo er ins Filtersystem gelangt.

Trocknung mit überkritischen Fluiden

Typische überkritische Fluide (kritische Temperatur/ kritischer Druck) sind z. B.:

- CO₂ (32,3 °C/ 72,9 atm)
- n-Butan (152 °C/ 37,5 atm) [Skoog, 4.Auflage]

Der Ausdruck „überkritisch“ bezieht sich auf Druck- und Temperaturbedingungen, die oberhalb des kritischen Punktes im Phasendiagramm liegen (Abb. 2-Q). Oberhalb der kritischen Temperatur ist es nicht mehr möglich das Gas durch Druckerhöhung zu verflüssigen. Die Druckerhöhung führt zu einer Dichte ähnlich wie in Flüssigkeiten, die Viskosität bleibt wie bei den Gasen erhalten und der Diffusionskoeffizient liegt zwischen dem eines gewöhnlichen Gases und dem einer Flüssigkeit (Tab. 2-H). Daher können überkritische Gase wie Gase diffundieren und wie Flüssigkeiten Substanzen lösen. Proteine sind in überkritischen Fluiden schlecht löslich [Bouchard, 2004]. Für die Lösefähigkeit eines überkritischen Fluides sind die molekularen Wechselwirkungen mit dem Gelösten von Bedeutung: Stark polare Stoffe, wie z. B. Wasser, weisen in den meist nur wenig polaren überkritischen Fluiden eine erheblich geringere Löslichkeit auf als unpolare Stoffe, wie Coffein, Cholesterin oder α -Tocopherol [Brunner, 1987].

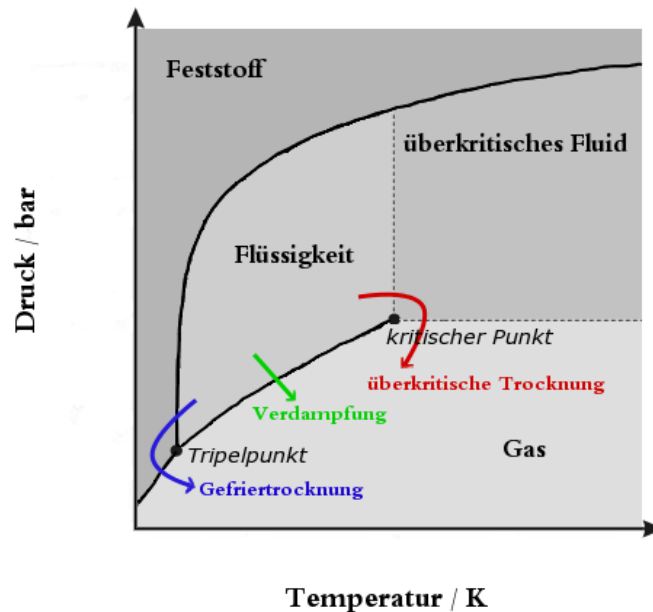


Abb. 2-Q Phasendiagramm von Kohlendioxid [Website: wikipedia]

Tab. 2-H Eigenschaften überkritischer Gase im Vergleich zu Flüssigkeiten und Gasen [Skoog 4. Auflage]

	Gas bei Standardtemperatur und Druck	Überkritisches Fluid	Flüssigkeit
Dichte [g/ cm ³]	$(0,6 - 2) \cdot 10^{-3}$	0,2 - 0,5	0,6 - 2
Diffusionskoeffizient [cm/ s ²]	$(1 - 4) \cdot 10^{-1}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$(0,2 - 2) \cdot 10^{-5}$
Viskosität [g/ cm • s]	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$	$(0,2 - 3) \cdot 10^{-2}$

Durch den Einsatz von Schleppegas (*co-solvent or modifier*) lassen sich die molekularen Wechselwirkungen bei der Trennung durch überkritische Fluide gezielt beeinflussen. Beim Schleppegaseinsatz resultieren Gemische von drei oder mehreren Komponenten. Analoges gilt, wenn Lösungsmittelgemische bereits in der Extraktionskammer vorliegen. Während der PCMC-Trocknung liegt ein Isopropanol-Wasser-CO₂ Gemisch vor.

Eine wichtige Rolle spielt die Löslichkeit des überkritischen Fluides in der flüssigen Phase. Der „Einbau“ der überkritischen Fluid-Moleküle in die flüssige Phase bringt erhebliche Strukturveränderungen mit sich. Die molekularen Wechselwirkungen zwischen den zu lösenden Molekülen werden durch die Vergrößerung der mittleren Molekularabstände stark verringert. Wie stark die Wechselwirkungen und damit die Lösefähigkeit sich ändern, hängt von der Dichte des überkritischen Gases ab. Die Dichte ist ein Maß für den mittleren Molekülabstand, der durch Änderung der von außen einstellbaren Zustandsgrößen Druck und Temperatur relativ leicht beeinflussbar ist. Die Temperatur bestimmt mit der kritischen Temperatur die überkritischen Fluid-Eigenschaften. Sie liegt meistens unterhalb der Siedetemperatur der zu extrahierenden Stoffe. Daher eignet sich die Gasextraktion auch für temperaturempfindliche Stoffe, wie Proteine [Brunner, 1987].

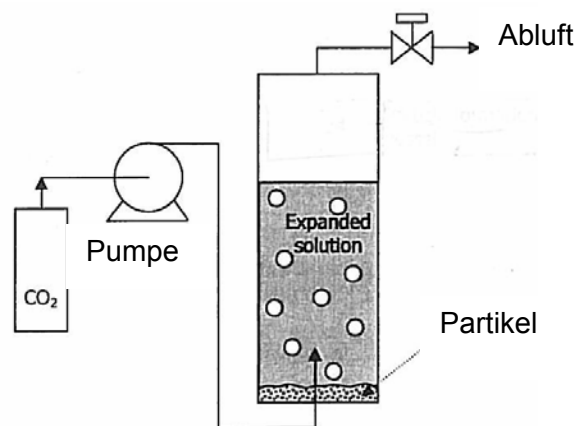


Abb. 2-R Gasextraktion [modifiziert nach Jovanovic, 2004]

Gasextraktion ist eine Trenn-/ Trocknungsoperation und kann in verschiedenen Prozessvarianten gefahren werden. Die PCMC-Trocknung erfolgt durch einen einstufigen Prozess, wobei überkritisches CO₂ mit hoher Dichte als Lösungsmittel für ein Isopropanol-Wasser-Gemisch verwendet wird. Nach der Extraktion werden das CO₂ sowie das Isopropanol-Wasser-Gemisch verworfen. Die Möglichkeit der Trennung der Komponenten wird nicht genutzt.

Die Trocknung mit überkritischen Fluiden vermeidet Komponenten des Trocknungsstress wie Gefrierkonzentrierung bei der Gefriertrocknung und die Hitzedenaturierung bei der Sprühtrocknung. Andere Effekte wie die Säureeigenschaften von CO₂ in Gegenwart von Wasser könnten jedoch negativ wirken. Insgesamt stellt die überkritische Trocknung aber eine sehr aussichtsreiche Trocknungstechnologie dar [Jovanovic, 2004].

2.3.6 Formulierungsentwicklung

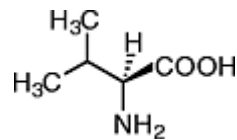
Die Wichtigkeit der Formulierungsentwicklung für jedes einzelne Protein wird im Laufe der Projektentwicklung erkannt. Intensive Arbeiten führt Partridge et al. durch und sind z. B. in einem weiteren derzeit offengelegten Patent [WO 2008/132439 - *Precipitation stabilising compositions*] formuliert. Das Ziel ist, bioaktive Moleküle unter Erhaltung des nativen Zustandes auf Co-Präzipitaten unter Anwendung der PCMC-Technologie zu stabilisieren. Es bleibt festzuhalten, dass es dazu weiterer Hilfsstoffe neben dem reinem Carrier bedarf, die das Protein während der Präzipitation stabilisieren oder schützen. Diese Hilfsstoffe sind als schützende Präzipitationshilfsstoffe (*precipitation protective additives*) benannt. Zusammen mit dem Protein und Carrier lösen sie sich in der Protein-Carrier-Lösung (pH 4 bis 9). In der Lösung ionisieren sie bzw. tauschen Protonen aus. Es resultieren positiv (kationisch) oder negativ (basisch) geladene Moleküle im Wasser, die während der Präzipitation Protonen aufnehmen bzw. abgeben können. Beispiel für eine kationische oder basische Aminosäure ist Arginin, für eine anionische oder saure Aminosäure ist es Glutaminsäure.

3 MATERIAL

PCMC bestehen aus Trägerstoffen, Proteinen und weiteren Hilfsstoffen wie z. B. Puffersalzen. Zur Ausfällung werden Nicht-Lösungsmittel eingesetzt. Im Nachfolgenden werden die zur PCMC-Herstellung nötigen Materialien beschrieben.

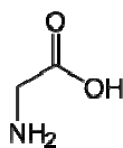
3.1 Trägerstoff/ Carrier/ Co-Präzipitant

3.1.1 Valin



Valin ist eine einfache proteinogene Aminosäure mit einer reinen Kohlenwasserstoffkette bzw. einer Isopropylgruppe als Rest. Bei der eingesetzten Verbindung (Art. 94640, Fluka) handelt es sich um das Racemat DL-Valin. Von DL-Valin gibt es zwei polymorphe Formen, eine monokline und eine trikline Form [Flaig, 2000].

3.1.2 Glycin



Glycin (Art. 137165, Tessenderlo Chemie S.A.) ist die kleinste proteinogene Aminosäure und gehört zu den hydrophilen Aminosäuren. Von Glycin sind drei polymorphe Formen bekannt, wobei die β -Modifikation die instabilste Form ist und sich an Luft und in Wasser in die bei Raumtemperatur stabilste γ -Modifikation irreversibel umwandelt [Chogprasert, 2001].

Tab. 3-A Glycinmodifikationen

beta Modifikation	alpha Modifikation	gamma Modifikation
kinetisch kontrollierte Form	thermodynamisch kontrollierte Form	thermodynamisch kontrollierte Form
nicht zentrische Form (Nadeln)	bipyramidale Form	rhombische Form
metastabile Form	stabile Form	stabilste Form bei RT
generell geringe Stabilität und irreversible Transformation in alpha- oder gamma-Glycin in Luft und Wasser		wird in alpha transformiert, wenn es über 165°C erhitzt wird
beta-Kristalle bleiben in trockener Umgebung unverändert		
monotrop	enantiotrop	enantiotrop

3.2 Modellproteine

3.2.1 Trypsinogen

Trypsinogen (Art. T1143, Sigma-Aldrich) ist das Vorläuferenzym von Trypsin, das im Pankreas gebildet wird. Im Dünndarm entsteht Trypsin durch Einwirkung von Enteropeptidasen.

3.2.2 Trypsin

Das Enzym Trypsin (Art. T0303, Sigma-Aldrich) gehört mit einem Molekulargewicht von 23,7 kDa zu den Serinproteasen. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 223 Aminosäuren, die über 6 Disulfidbrücken quervernetzt sind. Spezifisch bei einem pH-Optimum zwischen 7 bis 9 spaltet Trypsin als Endopeptidase vom C-terminalen Ende her Amid-, Ester- und Peptidbindungen, die auf die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin folgen. Die natürliche Form ist β -Trypsin. Durch Autokatalyse kann α -Trypsin entstehen, indem die Lys¹³¹ - Ser¹³² Bindung im Molekül gespaltet wird. Aus dem Monopeptid entstehen zwei Fragmente, die noch durch Disulfidbrücken

zusammengehalten werden. Die Autokatalyse von β -Trypsin zu α -Trypsin kann durch die Anwesenheit von Ca^{2+} (20 mM) zurückgedrängt werden [Sipos, 1970].

3.2.3 Bovines Serumalbumin (BSA)

Etwa 55 % des Blutes bestehen aus Serum, das ca. 7,5 % Proteine enthält. Dieser Proteinanteil setzt sich aus ca. 63 % Serumalbumin und ca. 36 % verschiedenen Globulinen zusammen. Das Serum dient zur Osmoregulation, als Protein-Reserve und auf Grund des reversiblen Bindungsvermögens des Albumins als Transportmittel für lipophile Stoffe wie z. B. Bilirubin [Römpp-Lexikon, Online Version 3.3].

BSA (Art. A7906, Sigma-Aldrich) besteht aus 582 Aminosäuren, woraus sich eine relative Molekülmasse von ca. 68 kDa ergibt. Insgesamt 17 Disulfidbrücken und eine freie SH-Gruppe zeichnen das Molekül aus. Die Sekundärstruktur besteht zu 55 % aus α -Helices und zu ca. 16 % aus β -Faltblattstrukturen. Serumalbumin ist ein nicht glycosyliertes Protein. Der pI-Wert liegt bei 4,7 bis 4,9 [Suttiprasit, 1992].

3.2.4 Monoklonale Antikörper (mAb/ IgG)

In dieser Arbeit werden 3 verschiedene Antikörper/ Immunoglobuline (IgG I bis III) getestet, die von der Firma Boehringer Ingelheim mit der Hybridomtechnik oder aus Antikörpergen-Bibliotheken hergestellt werden (Tab. 3-B) .

Tab. 3-B IgGs

Bezeichnung in der Arbeit	IgG-Klasse	Firma
IgG I oder (Antikörper I)	IgG1	BI
IgG II oder (Antikörper II)	IgG1	BI
IgG III oder (Antikörper III)	IgG2	BI

Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Globuline. Sind Pathogene/ Antigene anwesend, binden sie diese spezifisch und markieren diese für das restliche Immunsystem. B-Lymphozyten sind in der Lage, fünf verschiedene Isotypen von Antikörpern zu erzeugen, die als IgM, IgG, IgA, IgE, und IgD bezeichnet werden. Am häufigsten treten Immunoglobuline G auf. Ein Immunoglobulin G (150 kDa) besteht aus zwei leichten (je 25 kDa) und zwei schweren (je 50 kDa) Polypeptidketten, wie in Abb. 3-A dargestellt. Jede leichte Kette besteht aus zwei Domänen. Die aminoterminalen Region

bezeichnet man als variable (V_L), die carboxyterminale Region als konstante Domäne (C_L). Bei den schweren Ketten eines IgGs folgt auf drei konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) eine variable Domäne (V_H). Bei detaillierter Betrachtung der variablen Regionen fallen jeweils drei hypervariable Abschnitte auf. Sie werden auch als Paratope oder komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) bezeichnet, denn sie sind im Molekül nach außen gerichtet und binden spezifisch die antigene Determinate (= Epitop) über nicht-kovalente Wechselwirkungen. IgGs untergliedern sich in: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Sie unterscheiden sich z. B. in den schweren Ketten ($\gamma 1$ bis $\gamma 4$), im Isoelektrischen Punkt, in der Größe der Gelenkregion (*hinge*-Region), wie in Tab. 3-C zusammengefasst.

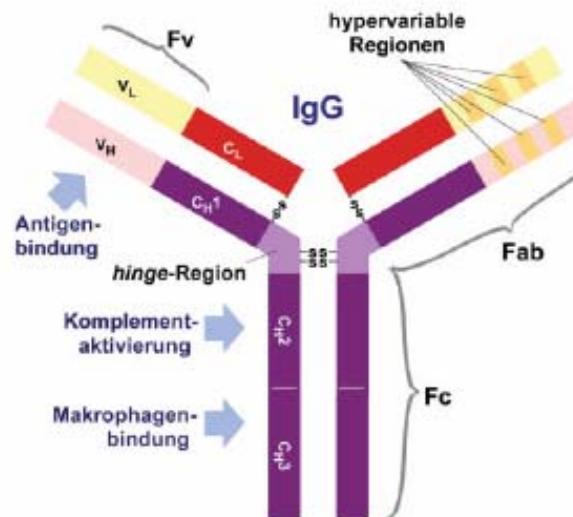


Abb. 3-A IgG [Bübel, Biologie Unserer Zeit 2004]

Tab. 3-C Eigenschaften der IgG-Unterklassen [Schüle, 2005]

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Typ der schweren Kette	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$
Molekularmasse [kDa]	146	146	170	146
Proteinfraction im humanen Serum [%]	60	25	10	5
Isoelektrischer Punkt (IEP +/- 0,4)	8,6	7,4	8,3	7,2
<i>Hinge</i> -Region				
Anzahl der Aminosäuren	15	12	62	12
Anzahl der Disulfidbrücken	2	4	5-13	2

Die Aufgabe der vom Menschen gebildeten Antikörper ist zum einen das spezifische Erkennen eines Antigens und zum anderen die Aktivierung des Immunsystems. Antikörper, die für die Therapie entwickelt werden, haben verschiedene Aufgaben, entweder sie unterdrücken die Zellaktivitäten und Immunantworten, wie bei allergischen Reaktionen oder Autoimmunerkrankungen, oder sie aktivieren die Zellaktivitäten. Weiterhin können sie mit radioaktiven Isotopen markiert werden, um spezifisch nach der Antigenbindung an Krebszellen oder in entarteten Geweben zu wirken. Sie zerstören dabei gezielt die erkrankten Zellen.

Das in der Arbeit verwendete humanisierte Immunglobulin I (Sibrotuzumab) bindet spezifisch an ein Antigen, das nur von epidermalen Krebszellen gebildet wird. Das Antigen ist ein humanes fibroblasten aktiviertes Protein (*human fibroblast activation protein* FAP). Es wird von Krebszellen, die für die Versorgung des Krebses zuständig sind, ausgeschüttet. Das FAP stimuliert das Krebszellgewebe weiter zu wachsen. Bei gesunden epidermalen Zellen gibt es dieses Protein/ Antigen nicht. Deshalb kann der humane Antikörper spezifisch bei einem FAP-positiven Krebsbefall eingesetzt werden wie z. B. bei Karzinomen in der Brust, im Kolon oder in der Lunge [Park, 1999; Scott, 2004].

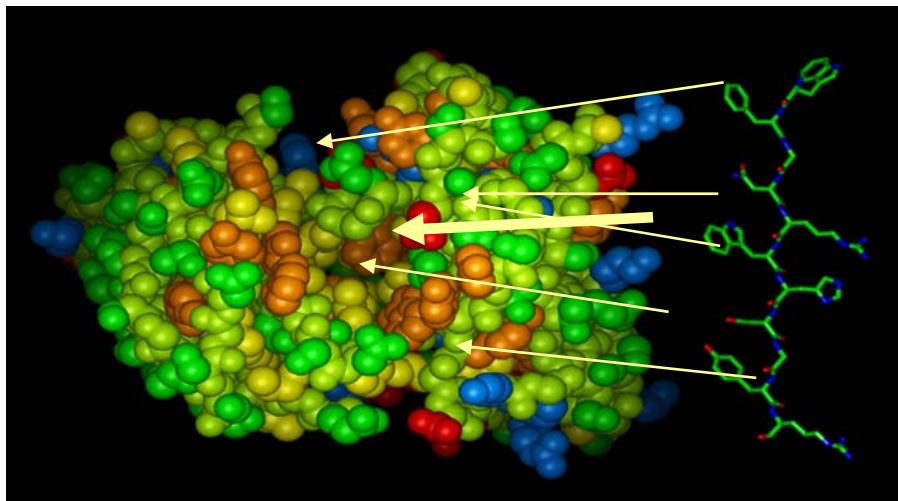


Abb. 3-B Räumliche Struktur des verwendeten IgG II sowie mögliche Interaktion zwischen IgG und Antigen [BI interne Information]

Das in der Arbeit eingesetzte Immunglobulin II (Bivatuzumab, Abb. 3-B) erkennt transmembrane Antigene (Glycoproteine) auf spezifischen Krebszellen. Die Antigene werden von den entarteten Zellen bei primärem Gehirn-, Nacken- und Speiseröhrenkrebs gebildet. Nach erfolgter Bindung des Antikörpers an CD44v6 wird die Antigenaktivität verschlüsselt gehemmt. Darüberhinaus kann der Antikörper mit ^{186}Re markiert werden, um die Zellen gezielt radioimmunologisch zu zerstören. Wirksamkeit zeigte

der IgG II Antikörper auch an weiteren Krebszellen wie z. B. in der Lunge, auf der Haut, im Dickdarm und im Magen [Postema, 2003, Tijink, 2006].

Zu dem dritten in der Arbeit verwendeten Antikörper (IgG III) werden aus Datenschutzgründen keine Angaben gemacht.

3.3 Puffer

Zur Rekonstitution von Trypsinogen und Trypsin wird ein **Tris-Puffer** verwendet.

Tab. 3-D Tris-Puffer

Reagenz	Konzentration	Firma
Trometamol	46 mM	Art. 57492, Angus Chemie GmbH
CaCl ₂ • 6 H ₂ O	11,5 mM	Art. 21110, Fluka

Die beschriebenen Antikörper I und II liegen in **PBS-Puffer**, pH = 7,4 +/- 0,2 vor. Der Puffer dient weiterhin als Rekonstitutionsmedium für IgG I und II beladene Mikrokristalle.

Tab. 3-E PBS-Puffer

Reagenz	Konzentration	Firma
KH ₂ PO ₄	1,47 mM	Art. 25506, Merck
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	8,03 mM	Art. 41171 Chemische Fabrik Budenheim
KCl	2,68 mM	Art. 25506, Merck
NaCl	137 mM	Art. 150847 Südsalz GmbH

Der Antikörper III liegt in einem **Histidin Puffer** vor. Ebenfalls wird dieser Puffer zur Rekonstitution von IgG III Präzipitaten genutzt. Die genaue Zusammensetzung wird aus Datenschutzgründen nicht dokumentiert.

3.4 Weitere Hilfsstoffe

Für spezifische Fragestellungen werden folgende weitere Hilfsstoffe eingesetzt.

Tab. 3-F Weitere Hilfsstoffe

Reagenz	Firma	Verwendung
CaCl ₂ • 6 H ₂ O	Art. 25506, Merck	Salz zur Fällung von Trypsin
NaCl	Art. 150847 Südsalz GmbH	Salz zur Fällung von Trypsin
Na-Citrat • 2 H ₂ O	Art. 29734 Jungbunzlauer Ladenburg	Salz zur Fällung von IgG I
L-Glutamin	Art. 49419, Fluka	saure AS zur Fällung von IgG III
L-Arginin	Art. 258630 Kyowa Hakko Europe GmbH	basische AS zur Fällung von IgG III
Trehalose • 2 H ₂ O	Art. 160040 Ferro Pfanstiehl Laboratories	neutrale AS zur Fällung von IgG III

3.5 Nicht-Lösemittel/ Fällungsmedium/ Anti-Solvent

3.5.1 2-Propanol (IPA)

2-Propanol (Art. 2433, Aug. Hedinger GmbH & Co. KG) wird synonym als Isopropylalkohol oder Isopropanol bezeichnet. Dieser Alkohol ist leicht flüchtig, brennbar und gut mit Wasser mischbar. Er wird häufig als Desinfektionsmittel in einer Konzentration von 70 % (v/v) eingesetzt. In der Arbeit dient er als Fällungsmittel. Die Dichte ist 0,785 g/cm³ und die dynamische Viskosität liegt bei 2,43 mPa • s [Hedinger, Sicherheitsdatenblatt].

3.5.2 2-Methyl-1-propanol (2M1P)

2-Methyl-1-propanol (Art. 270466, Sigma-Aldrich) ist ebenfalls ein mit Wasser gut mischbares Lösungsmittel und dient als Fällungsmittel. Die Dichte ist mit 0,801 g/cm³ ähnlich der von Isopropanol, jedoch ist die dynamische Viskosität mit 4 mPa • s wesentlich höher [Sigma-Aldrich, Sicherheitsdatenblatt].

4 METHODEN

In diesem Abschnitt werden Methoden beschrieben, die den Herstellprozess der PCMC betreffen, sowie Methoden zur Charakterisierung der produzierten PCMC. Die Entwicklung der Herstellmethoden bzw. –verfahren ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit, wodurch sich eine Vielzahl von zu testenden Methoden ergeben. Die einzelnen Verfahren sind in diesem Kapitel vorgestellt. Einzelne Variationen sowie detaillierte Entwicklungsschritte werden im Hauptteil genauer erläutert.

4.1 Methoden der Herstellung

4.1.1 Methoden und Geräte zum Mischen/ Präzipitieren

4.1.1.1 Herstellung von Protein-Carrier-Lösungen

Der Carrier und die weiteren Hilfsstoffe werden in gereinigtem Wasser (G-Wasser) gelöst. Bei Formulierung 1 bis 4 (Tab. 4-A) wird das Protein, das als lyophilisiertes Pulver vorliegt, kurz vor der Herstellung in die Carrierlösung gegeben. Unter langsamem Rühren wird das Protein gelöst. Anschließend wird die Lösung über einen PVDF Filter (0,22 µm, Millipore) partikelfrei filtriert.

Bei den Formulierungen 5 bis 7 (Tab. 4-A) erfolgt die Herstellung durch Vereinigung der gepufferten, aufkonzentrierten Proteinlösung (Pufferzusammensetzung siehe in Kapitel 3.3) mit der separat hergestellten Carrierlösung, der die Hilfsstoffe soweit nicht im Proteinpuffer enthalten, zugesetzt sind (Arginin, Citrat, Glutamin). Gegebenfalls wird der pH-Wert der Carrierlösung dem der Proteinlösung durch Zugabe von HCl bzw. NaOH angepasst. Beide Lösungen werden langsam miteinander vermischt und partikelfrei filtriert.

Tab. 4-A listet die Zusammensetzungen der fertigen Protein-Carrier-Lösungen auf. Aus den eingesetzten Mengenverhältnissen kann die Mischkristallzusammensetzung abgeleitet werden.

METHODEN DER HERSTELLUNG

Tab. 4-A Zusammensetzungen der Formulierungen

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% m/m]	FS [%]	Nicht- LM
1	Tryp.gen (3,0)	Val (60)	-	4,8	0,32	IPA
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl ₂ (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA
5	IgG I (6,1)	Gly (80)	Citrat (5,9) NaCl (6,4) Phosphat (1,0) KCl (0,1)	6,2	0,52	2M1P
6	IgG II (15,9)	Gly (137)	NaCl (8,0) Phosphat (1,6) KCl (0,2)	9,9	0,81	2M1P
7	IgG III (38,7)	Gly (70)	Arg (9,1) Glu (7,7) Treh (28,0) His (1,3) EDTA (0,03) Tween 80 (0,07)	25,2	0,77	IPA

4.1.1.2 Herstellung der Präzipitate

Die starke Übersättigung zum Zeitpunkt der Präzipitation wird durch ein Mischungsverhältnis 95 : 5 gewährleistet. 95 Teile an Nicht-Lösemittel werden mit 5 Teilen wässriger Protein-Carrier-Lösung gemischt. Es soll unter geringem Scherstress möglichst schnell homogen gemischt werden. Diese Anforderung ist unter Einsatz von kontinuierlich mischenden Mischern, trotz stark unterschiedlicher Mischungsverhältnisse, die eigentliche Herausforderung dieser Arbeit. Deshalb kommt der Auswahl eines geeigneten Mischers mit umfangreichen Testungen große Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit werden statische Mikro-/ Makromischer und ultraschallunterstützte Mischer untersucht. Bei statischen Mixern erfolgt die Mischung durch den Energieeintrag der zu mischenden Flüssigkeiten. Bewegende Teile (Rührer) gibt es bei statischen Mixern nicht.

Die Zuführung der zu mischenden Flüssigkeiten erfolgt im Verlauf der Arbeit zuerst mit einer HPLC-Pumpe, dann mit einer Schlauchpumpe und schließlich mit einer Mikrozahnringpumpe. Die Tab. 4-B listet alle verwendeten Pumpen auf. Weiterhin sind jeder Pumpe die eingesetzten Mischer zugeordnet. Bei der Verwendung des Double Jet Impingement (DJI) Mixers wird der Nicht-Lösungsmittelstrom auf zwei Ströme aufgeteilt, entweder mit Hilfe eines T-Stücks oder mit Hilfe von zwei Pumpen.

Tab. 4-B Pumpen

Pumpentyp	Pumpe	Firma	Medium	Mischer	Druck [bar]
Mikrozahnringpumpe	mzr 11507	HNP Mikro- systeme GmbH	Nicht-LM	DJI (3,0 mm, V4A)	20
				QJI (3,0 mm, V4A)	
				SJI (3,0 mm, V4A)	
Mikrozahnringpumpe	mzr 7255	HNP Mikro- systeme GmbH	P-C-L	DJI (3,0 mm, V4A)	20
				QJI (3,0 mm, V4A)	
				SJI (3,0 mm, V4A)	
Schlauchpumpe	Pumpe 520Di/L Pumpenkopf 520 REM	Watson Marlow	Nicht-LM	DJI (3,2 mm, PP)	2-4
				DJI (3,0 mm, V4A)	
				Kenics	
				Ventilmischer	
Schlauchpumpe	Pumpe 520 Di/L Pumpenkopf 505 L	Watson Marlow	Nicht-LM & P-C-L	DJI (2,0 mm, PP)	2-4
				DJI (3,2 mm, PP)	
				DJI (3,0 mm, V4A)	
				Kenics	
Schlauchpumpe	Reglo Digital MS2/ 12	Ismatec	P-C-L	DJI (2,0 mm, PP)	2-4
				Ventilmischer	

Pumpentyp	Pumpe	Firma	Medium	Mischer	Druck [bar]
HPLC-Pumpe	321 Pump	ABiMED	Nicht-LM	DJI (mikro) SJI (mikro)	~ 100
HPLC-Pumpe	Model 300	Gynko- tek	P-C-L	DJI (mikro) SJI (mikro)	~ 100
HPLC-Pumpe	K1001	Knauer	Nicht-LM & P-C-L	Kasdadenmischer Ventilmischer Kammischer	~ 100
HPLC-Pumpe	n. b.	Prosonix	Nicht-LM	UVC	n. b.
Spritzen- pumpe	n. b.	Prosonix	P-C-L	UVC	n. b.

Mit den Mixern sollen bis zu 100 Liter PCMC-Suspension hergestellt werden.

4.1.1.3 Kontinuierliche statische Mikromischer

Mikromischer stellen im Skalenbereich kleiner 1 µm Mischungen her.

Single Jet Impingement Mikromischer = SJI (mikro)

Der Single Jet Impingement Mischer oder der T-Mischer (Abb. 4-A b, Art. 58283, Sigma-Aldrich) hat zwei Einlässe für die zwei zu mischenden Flüssigkeiten und einen Auslass. Er ist der zuerst getestete statische Mischer in dieser Arbeit, jedoch verblockt dieser sehr schnell.

Double Jet Impingement Mikromischer = DJI (mikro)

Im statischen DJI-Mischer (Abb. 4-A a, Art. 58625-U, Sigma-Aldrich) fließen zwei Nicht-Lösungsmittelströme im 180° Winkel und dazu im 90° Winkel die Protein-Carrier-Lösung zusammen. Axial zur Protein-Carrier-Lösung befindet sich der Auslass. Ein wesentlicher energetischer Beitrag zum Vermischen resultiert aus dem Zusammenprall der beiden Nicht-Lösungsmittelströme. Beim Zusammenprall dieser treffen große und träge Massen aufeinander, die einen starken Impuls im Mischer auslösen.

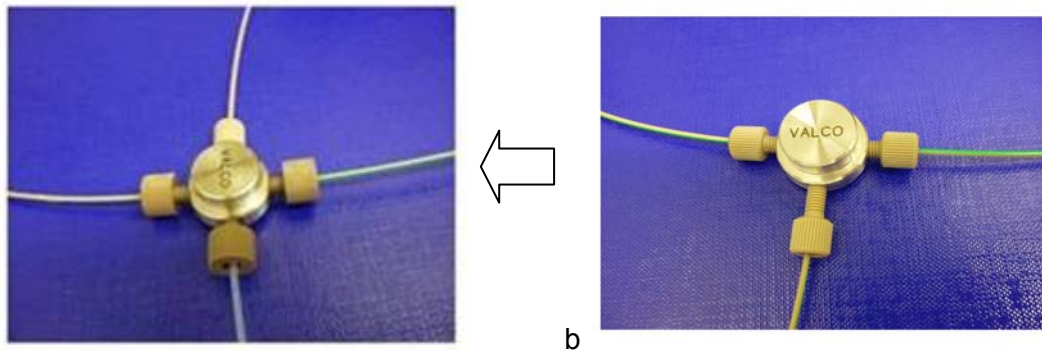


Abb. 4-A Mikromischer a - DJI (mikro) b - SJI (mikro)

Kaskadenmischer

Beide Flüssigkeitsströme werden Y-förmig im Mischer zusammengeführt. Der Mischer (Art. 0101-3-0002-F, Ehrfeld Mikrotechnik BTS) ist aus 5 Mischkaskaden aufgebaut und enthält in der Mitte eine Mischblende als Stromteiler. Der Strom wird wiederkehrend getrennt und an der strömungsführenden Wandstruktur wieder zusammengeführt. Dadurch verdoppelt sich sukzessive die Anzahl der Ströme und die Dicke der Ströme wird halbiert.



Abb. 4-B Kaskadenmischer

Kammischer

Der Kammischer (Art. 0101-3-0001-F, Ehrfeld Mikrotechnik BTS) ist ein Multilaminationsmischer und besteht aus 3 Teilen. Im Mischerboden (1) fließen die beiden Ströme im 180° Winkel durch die Mikrostruktur aufeinander zu und werden alternierend durch den Blendenspalt (2) in den Mischerdeckel (3) gedrückt, in dem sich die Mischkammer befindet.

Das Mischprinzip basiert auf Multilamination zwei zu vermischender Fluidströme. Jeder Strom wird in eine Vielzahl dünner Lamellen aufgespaltet. Dabei vermischen sich die Ströme zunächst in der Mikrostruktur nicht. Sie strömen im 180° Winkel aufeinander zu und liegen nach dem Austritt aus der Mikrostruktur abwechselnd in Lamellen vor. Diese abwechselnden laminar strömenden Lamellen beider Ströme werden auf eine Blende mit einem 50, 100 oder 200 µm breiten Spalt gedrückt. Der Blendenspalt bzw. die Spaltabrisskante unterbricht kurzzeitig den sonst laminaren Strom und führt zu einer Turbulenz, die die diffusionsbedingte Durchmischung beider Ströme begünstigt.

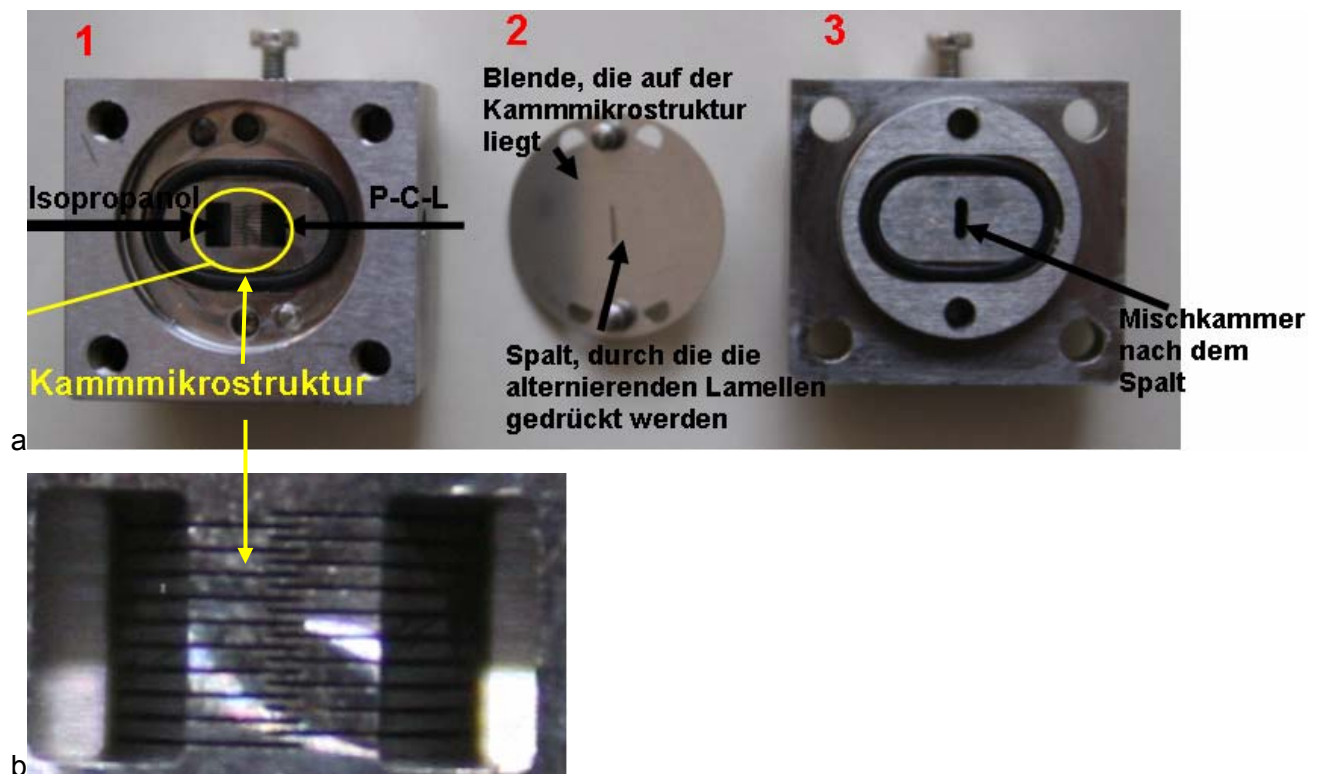


Abb. 4-C a – Kammischer, b - Kammstruktur, Kanalbreite 71 µm

Ventilmischer

Dieser Mischer (Art. 0111-2-0001-F, Ehrfeld Mikrotechnik BTS) ist speziell für Fällungsreaktionen entwickelt worden. Das Fällungsmedium (Isopropanol) wird innerhalb des Mixers über ein Rückschlagventil auf den Ventilkegel geleitet. Dabei wird die gesamte Oberfläche des Ventilkegels mit einem dünnen Isopropanolfilm überzogen. Die Wirkstofflösung fließt dazu im 90° Winkel ein. Danach wird sie durch eine integrierte Mischscheibe in dünne Lamellen aufgeteilt und auf die Basis des Ventilkegels geführt. Die Mikrokanäle der Mischscheibe sind 400, 210 oder 105 µm breit.

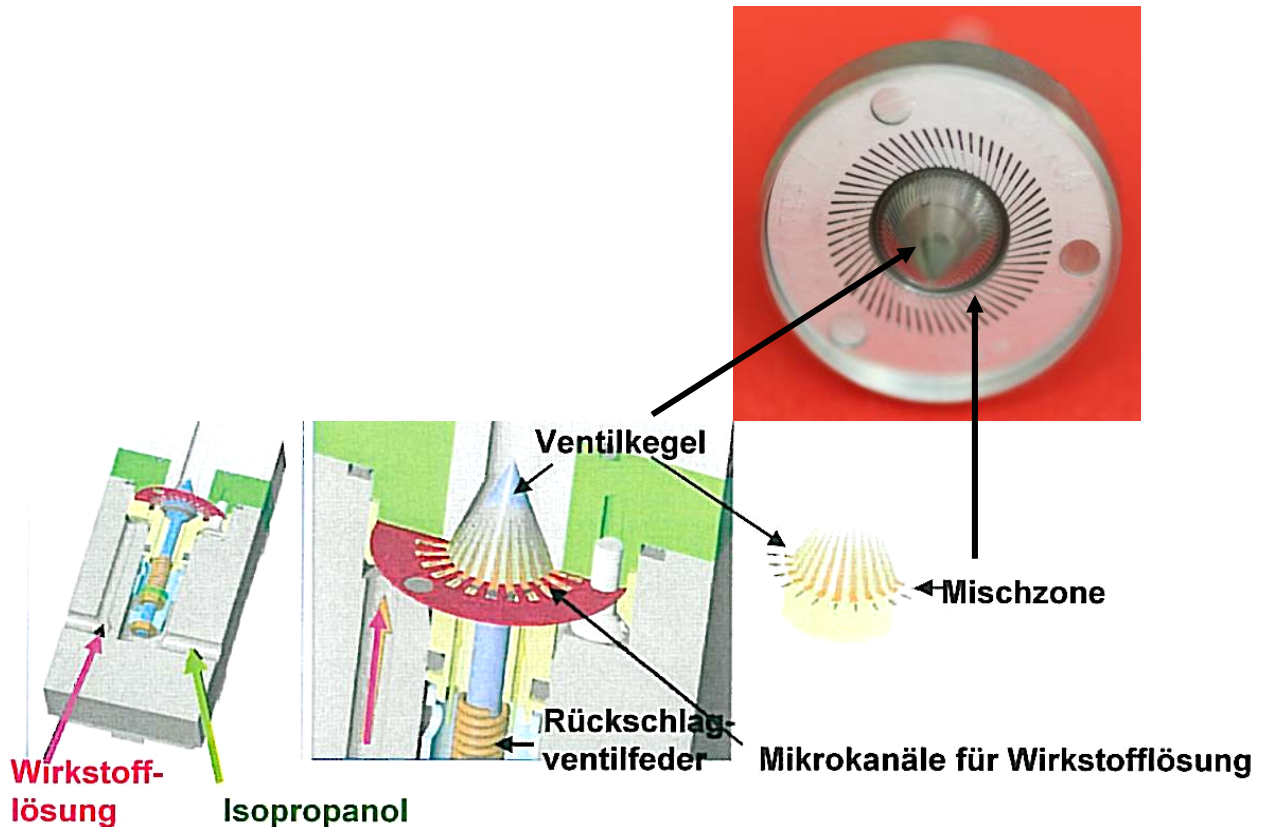


Abb. 4-D Ventilmischer [Website: Ehrfeld Mikrotechnik BTS]

4.1.1.4 Kontinuierliche statische Makromischer

Makromischer arbeiten im Skalenbereich größer 1 μm .

Single Jet Impingement Makromischer = SJI (3,0 mm, V4A)

Der Single Jet Impingement Makromischer (Abb. 4-F oben) ist ein T-Stück (Art. 0722-1-0001 Ehrfeld Mikrotechnik BTS), das für jeden der beiden zu mischenden Flüssigkeiten einen Einlass hat, beide Ströme vereint und einen Auslass besitzt. Er wird nur zu Vergleichszwecken mit den DJI (3,0 mm V4A) und QJI (3,0 mm V4A) eingeführt.

Double Jet Impingement Makromischer = DJI (3,0 mm, V4A)

In Abb. 4-E a wird die Protein-Carrier-Lösung (Pfeil von oben) mit zwei im 180° Winkel aufeinander zuströmende Nicht-Lösungsmittelstrahlen (Pfeile von links und rechts) vermischt. Der nach unten gerichtete Pfeil symbolisiert den Ausgang des Mixers. Der Innendurchmesser des finalen Massenströmmischers (Eigenbau, BI) aus Edelstahl (V4A) ist 3 mm. Die Vorläufermodelle (Abb. 4-E b, c) sind aus Kunststoff (PP). Der erste DJI (Code 1410 Kartell) in Abb. 4-E c hat einen Innendurchmesser von 2 mm, der

in der zweiten Generation auf 3,2 mm (Code 1411 Kartell) in Abb. 4-E b vergrößert wurde. Die Durchmesserergrößerung erfolgt in Anpassung an den Innendurchmesser des Kenics Mixers aus Gründen der Vergleichbarkeit.

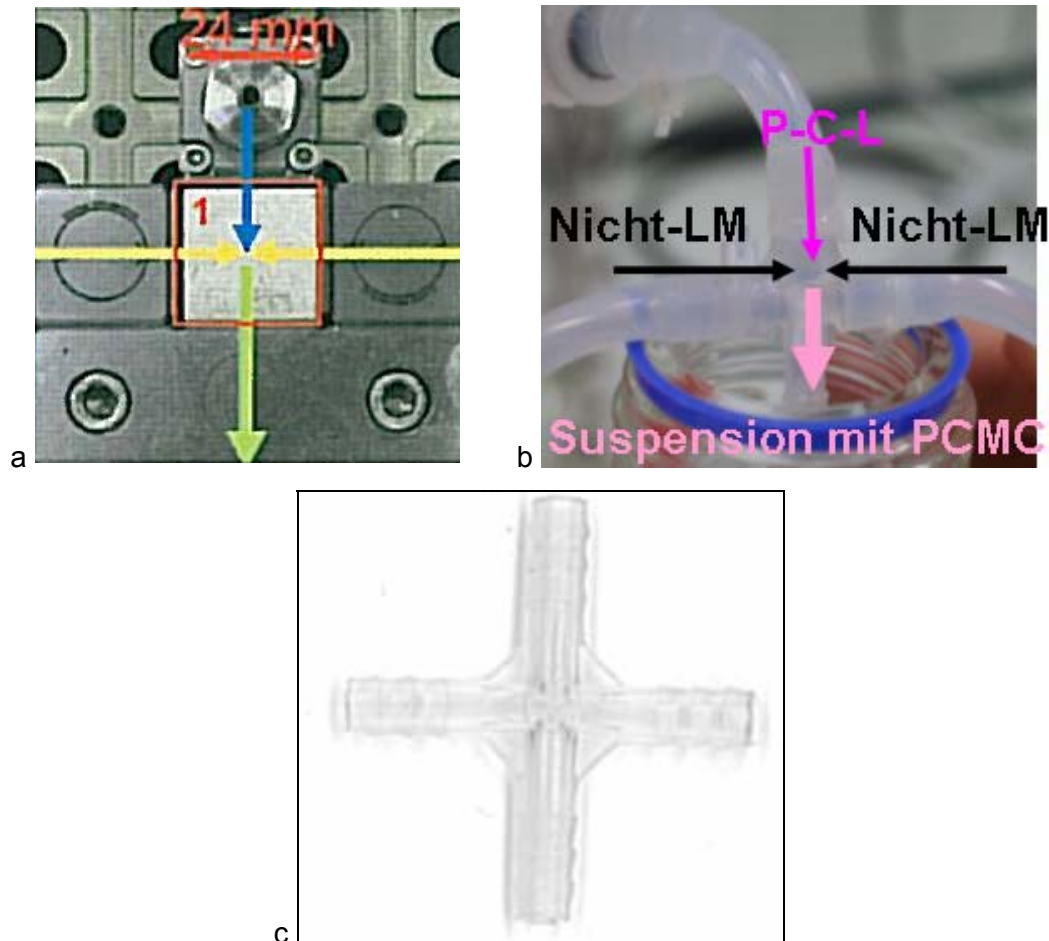


Abb. 4-E Double Jet Impingement Mischer: a – finaler DJI (\O_i 3,0 mm, V4A), b – DJI (\O_i 3,2 mm, PP), c – DJI (\O_i 2,0 mm, PP)

Quadruple Mischer = QJI (3,0 mm, V4A)

Dieser neu entwickelte Massenimpulsmischer (Eigenbau, BI) aus Edelstahl (Abb. 4-F unten) führt einen vierfach geteilten Nicht-Lösungsmittelstrom (dicke Pfeile) im Mischer auf einer Ebene zusammen. Dabei wird die im 90° Winkel in der Masse wesentlich geringe Protein-Carrier-Lösung (dünner Pfeil) sandwichartig eingeschlossen und von allen Seiten her durch den Zusammenstoß der 4 Ströme durchmischt. Für eine optimale Durchmischung sind keinerlei weitere Mischschikanen nötig, wodurch das Protein geschützt wird und Verblockungserscheinungen minimiert werden.

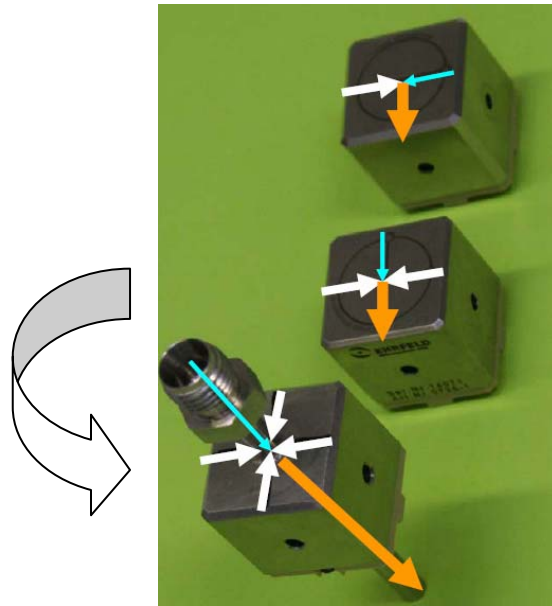


Abb. 4-F Weitere Impingement Mischer: oben - SJI (3,0 mm, V4A), mittig – DJI (3,0 mm, V4A), unten QJI (3,0 mm, V4A)

Kenics Mischer

Der statische Mischer (Art. 37-03-075, LEWA HOV GmbH & Co. KG) enthält ein helikales Mischelement, das den Materialfluss radial zu den Wänden und zurück zur Mischermittle bewegt. Daneben wird der Fluss mehrmals geteilt und wieder zusammengeführt. Dieses wird durch das Aneinandersetzen von linken und rechten Einzelementen des helikalen Mischelementes ermöglicht. Insgesamt wird sehr effektiv mit dem fest installierten Mischelementen gemischt. Der Rohrreaktor hat einen Innendurchmesser von 3,4 mm.

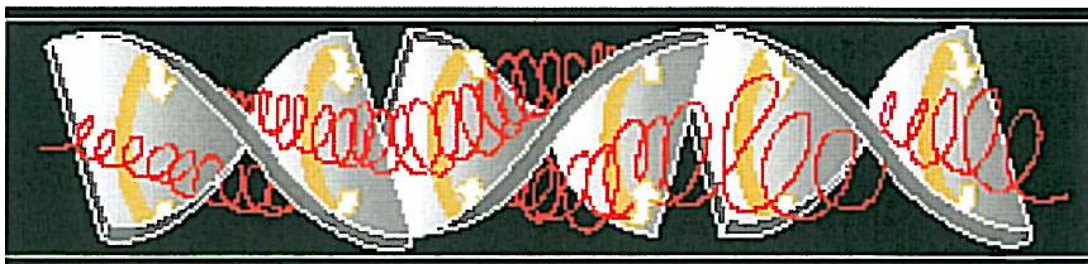


Abb. 4-G Kenics [Website: Chemineer]

4.1.1.5 Ultraschallunterstützte Mischer

Ultraschallunterstützte Mischer besitzen in der Mischkammer einen Ultraschallerzeuger, der die Mischung unter Kavitationsbildung unterstützt.

Fällungen im Ultraschallbad

Durch Ultraschallbäder (40 kHz, 19 W, Branson 200 bzw. 35 kHz, 150 - 300 W, Brandelin Sonorex Digital 10 P) werden Druckschwankungen und Kavitäten erzeugt, die die Durchmischung verbessern und Ablagerungen im Auslassschlauches des DJI-Mischers oder des Kenics minimieren.

Ultrasonic Vortex Crystallizer

Der *Ultrasonic Vortex Crystallizer* (UVC, Prosonix, England) nutzt die hydrodynamische Wirbelbildung, um eine homogene Mischung aus zwei oder drei Flüssigkeiten mit oder ohne Ultraschall herzustellen. Er hat drei tangentielle Einlässe und einen axialen Auslass. Die zylindrische Mischkammer hat einen Innendurchmesser von 20 mm und besitzt keine weiteren Mischschikanen. Sie fasst ein Volumen zwischen 0,1 ml bis 0,2 ml. In den Versuchen ist die maximale Flussrate aller drei Ströme 147 ml/min. Damit ist die kürzeste Verweilzeit im Mischer nur 0,04 ms. Durch den Ultraschallimpuls (40 kHz Ultraschallgeber in der Mitte der Vortex-Mischkammer) entstehen Kavitäten, die durch Implosion eine sehr schnelle Durchmischung ermöglichen und damit die Präzipitation initiieren.

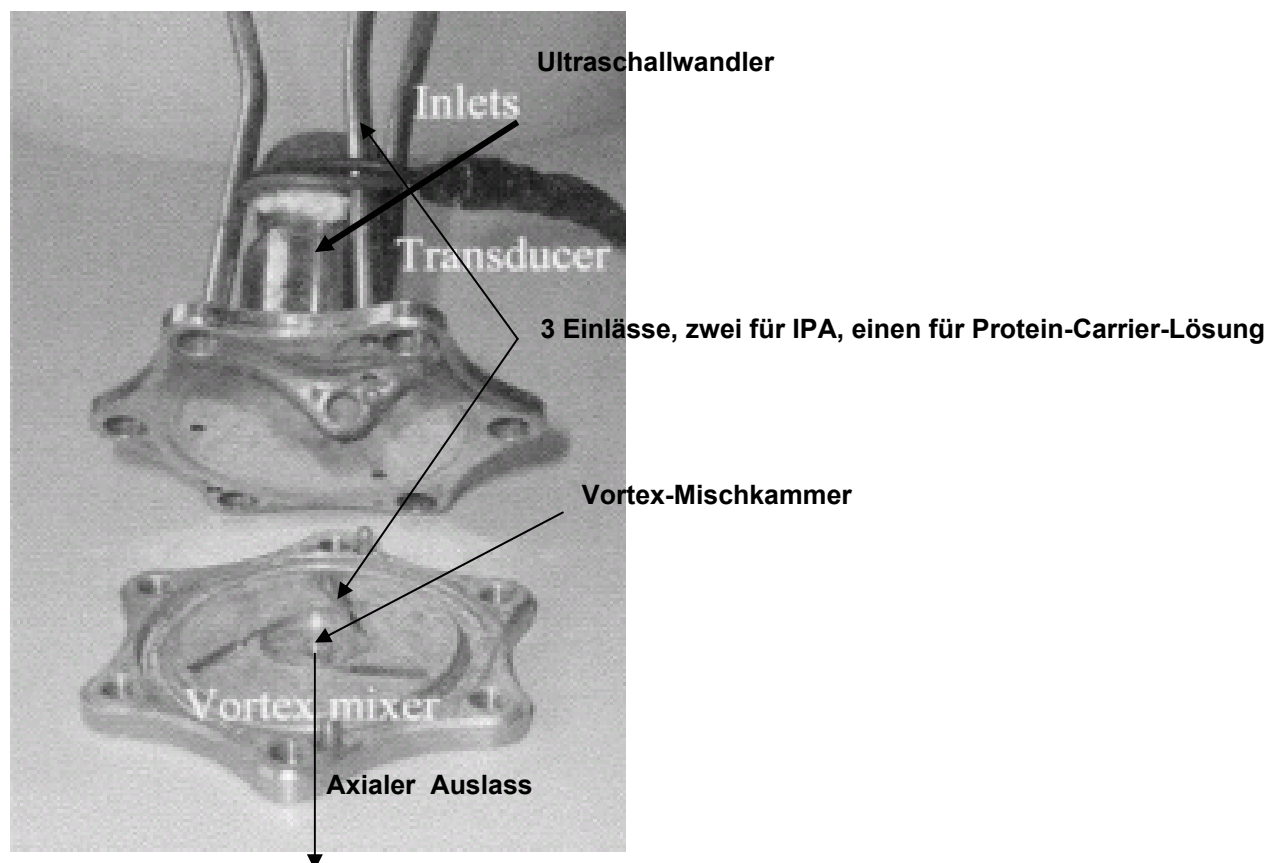


Abb. 4 Ultrasonic Vortex Crystallizer (UVC)

Weitere technische Hilfsmittel

Tab. 4-C weitere technische Hilfsmittel

Hilfsmittel	Firma	Verwendung
Massenflussregler M55-AGD-22-0 M54-AGD-22-0	Wagner Mess- und Regeltechnik	Flussmessung
Sensoren p-Sensor 0513-6011-F T-Sensor 0513-1-6041-F	Ehrfeld Mikrotechnik BTS	Druckmessung Pt 100 für Temperatur
Verbindungen Ein/ Auslässe Spannmodule Grundplatte Dichtungen	Ehrfeld Mikrotechnik BTS	modularer Aufbau der Mischapparaturen
Verbinder, Rückschlagventile, Verschraubungen	Swagelog	druckstabile Verbindungen
PNU-H-6x1 PNU-H-8x1,25	FESTO	druckstabile Schläuche (10 bar)
Manometer DIV-2006-108-RW	WIKA	Druckmessung
STHT-C 078-2, d. h. Ø _i 2,0 mm STHT-C 125-2, d. h. Ø _i 3,2 mm	ITE	Silikonschläuche
Branson 200 (40 kHz, 19 W)	Branson	Ultraschallbad
Brandelin Sonorex Digital 10 P (35 kHz, 150 - 300 W)	Brandelin	Ultraschallbad
Art. Z 227307 Art. Z 226955 Art. 54994	Supelco	Kapillare rot Kapillare grün Kapillare schwarz
Kryo-Thermostat MP F 12	Julabo	Kälte-Umwälzthermostat

4.1.2 Methoden und Geräte zur Aufkonzentrierung

Filtrations- sowie Zentrifugationsmethoden dienen zur Aufkonzentrierung. Filtriert wird mit Vakuum diskontinuierlich über Filtermembranen, mit Druckluft kontinuierlich über Metallverbundgewebe oder ebenfalls kontinuierlich tangential über Mikrofiltrationsmembranen. Daneben werden zwei unterschiedliche Zentrifugationsverfahren getestet. In einem Verfahren wird über ein Filtergewebe zentrifugiert und in einem zweitem Verfahren wird die beschleunigte Sedimentation in einer Becherzentrifuge angewandt. Die Herausforderung liegt in der sehr geringen Feststoffkonzentration der PCMC-Suspension (~ 0,5 % m/v), in der Partikelgröße (1 bis 10 µm) und in der Stabilität (Abscherung von Protein von der Trägeroberfläche) der PCMC. Ziel ist es, 10 l bis 100 l PCMC-Suspension um mindestens Faktor 10 aufzukonzentrieren.

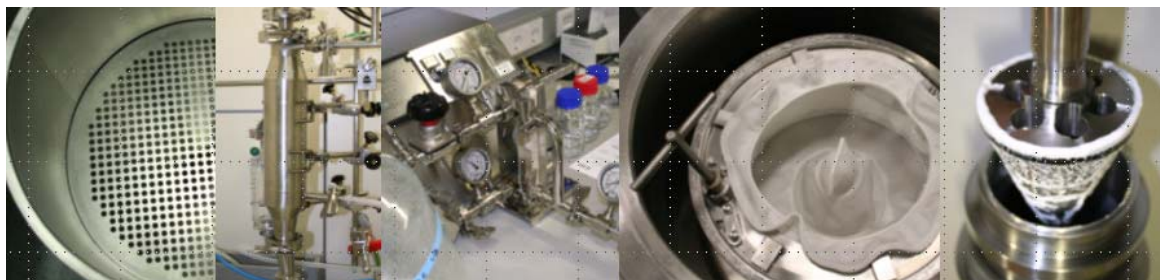


Abb. 4-H Übersicht Aufkonzentrierungsmethoden: von links nach rechts - Nutschenfiltration, Kerzenfiltration, TFF, Zentrifugation über Filtergewebe, Becherzentrifugation

Tab. 4-D Aufkonzentrierungsgeräte und Hilfsmittel

Hilfsmittel	Firma	Verwendung
Nutschenfiltration		
Ganzglasfilterhalter Ø 47 mm	Sartorius AG	Filtrationsstand
Holder Kit Glas Ø 90 mm	Millipore GmbH	Filtrationsstand
Edelstahlfiltrationsstand Ø 300 mm	BI	Filtrationsstand
PC 2001/ Vario	Vaccubrand	Vakuumpumpe
PVDF/ Durapore, 0,45 µm und 0,65 µm	Millipore GmbH	Membranfilter
Gewebefilter - AP 08305 AA, -AB, -AE, cut off 6 bis 10 µm	Lanz-Anliker AG	Filtertücher aus PP

Hilfsmittel	Firma	Verwendung
Tangentialflussfiltration (TFF) oder Cross-flow Filtration		
Sartocon Slice System 17521---001	Sartorius AG	TFF-Halter
Pureflo 21 4-fach Membranpumpe	Jabsco	TFF-Membranpumpe
Hydrosart Sartocon Slice Microfiltration Cassettes, cut off 0,45 µm, 1000 cm ²	Sartorius AG	TFF-Membran offener Kanal
TFF Cogent M	Millipore GmbH	TFF-Halter
Quattroflow Pumpe	Millipore GmbH	TFF-Membranpumpe
Pellicon 3 PVDF, cut off 30 kDa, 1100 cm ²	Millipore GmbH	TFF-Membran
erweiterte Kerzenfiltration (modified pressure filtration = MPF)		
Pureflo 21 4-fach Membranpumpe	Jabsco	Membranpumpe
MPF-Filtrationsstand	BI	MPF-Filtrationsstand
Poromet 2 Poren-Ø nominal 2 µm/ absolut 5 µm	Spörl AG	Filterverbundgewebe
Absolta 2 (214 cm ²) Poren-Ø nominal 2 µm/ absolut 5 µm	Spörl AG	Filterverbundgewebe
Fundabac Typ TSD	Dr. Müller AG	Filtrationsstand
TSD-bench-scale-filter (0,012 m ²) M11U002 Poren-Ø 2 µm bis 10 µm	Dr. Müller AG	Filtertücher aus PTFE, PVDF, PP
Zentrifugen		
GFT V30-O	Heinkel Process Technology GmbH	Filterbeutelzentrifuge
Boden/ Zarge tetex DLW 05-8000-SK 008 Oberteil PP 9307 cut off ~ 10 µm, 1410 cm ²	Heinkel Process Technology GmbH (Sefar)	Filterbeutel
Boden/ Zarge tetex Multi 05-4-660 Oberteil PP 9307 cut off ~ 10 µm, 1410 cm ²	Heinkel Process Technology GmbH (Sefar)	Filterbeutel
ADP-75 Celeros	JMSeparations	Becherzentrifuge

4.1.2.1 Nutschenfiltration

Nutschenfiltration zur Analytik der Präzipitate

Sehr einfach lassen sich jederzeit die PCMC-Präzipitate zu analytischen Zwecken mit der Kuchenfiltration vom Suspensionsmittel trennen. Dabei spannt man eine Filtermembran in eine Nutschenfiltrationseinheit ein und separiert unter Vakuumeinsatz den Feststoff vom Suspensionsmedium. Im Anschluss trocknet der Filterkuchen auf der Membran unter dem Laborabzug. Abschließend wird das Pulver mit einem Kartenblatt von der Membran abgehoben und in einem verschlossenen Glasgefäß aufbewahrt.

Die verwendeten Filtermembranen sind stabil gegenüber organischem Lösungsmittel, besitzen eine glatte Oberfläche und zeigen kaum Proteinadsorptionen. Standardmembranfilter sind aus Polyvinylidendifluorid (PVDF = Durapore), Polyethersulfon (PES), Teflon (PTFE) oder modifiziertem Celluloseacetat (Hydrosart). Der Porendurchmesser ist $0,45\ \mu\text{m}$. Die Filtergrößen variieren zwischen 47 mm und 110 mm. Das Vakuum liegt zwischen 50 mbar und 800 mbar. Zur Analytik werden 5 ml bis 300 ml PCMC-Suspension filtriert.

Nutschenfiltration als Prozessschritt

Analog zur Analytik der PCMC-Präzipitate können die Partikel diskontinuierlich über einen großen Nutschenfilter vom Fällungsmedium separiert werden (Abb. 4-I, Eigenbau, BI). Der Durchmesser dieser Nutsche ist 30 cm. Die perforierte Stützplatte hat eine freie Filtrationsfläche von $286\ \text{cm}^2$. Das Filtermaterial ist aus PVDF mit $0,45\ \mu\text{m}$ im Porendurchmesser (Millipore) und wird manuell zugeschnitten. Das Vakuum kann variiert werden. In der Praxis hat sich eine große Druckdifferenz bewährt, wie auch die Darcy-Gleichung (Gl. 2-16) theoretisch beschreibt. Es wird ein Unterdruck von 200 mbar eingesetzt. Über einen Membranfilter können 5 l bis 15 l PCMC-Suspension je nach Partikeleigenschaften filtriert werden. Im Anschluss an die Nutschenfiltration trocknet der Filterkuchen unter dem Laborabzug. Der kompakte Filterkuchen muss durch einen Mahlschritt wieder deagglomeriert werden.

Theoretische Überlegungen für ein kontinuierliches Nutschensystem sind vorhanden. Dabei würden drei Nutschenapparaturen in Kreis Stationen ablaufen. An der ersten Station erfolgte die Befüllung, an der zweiten unter Vakuum die Filtration und an der dritten der Membranwechsel.

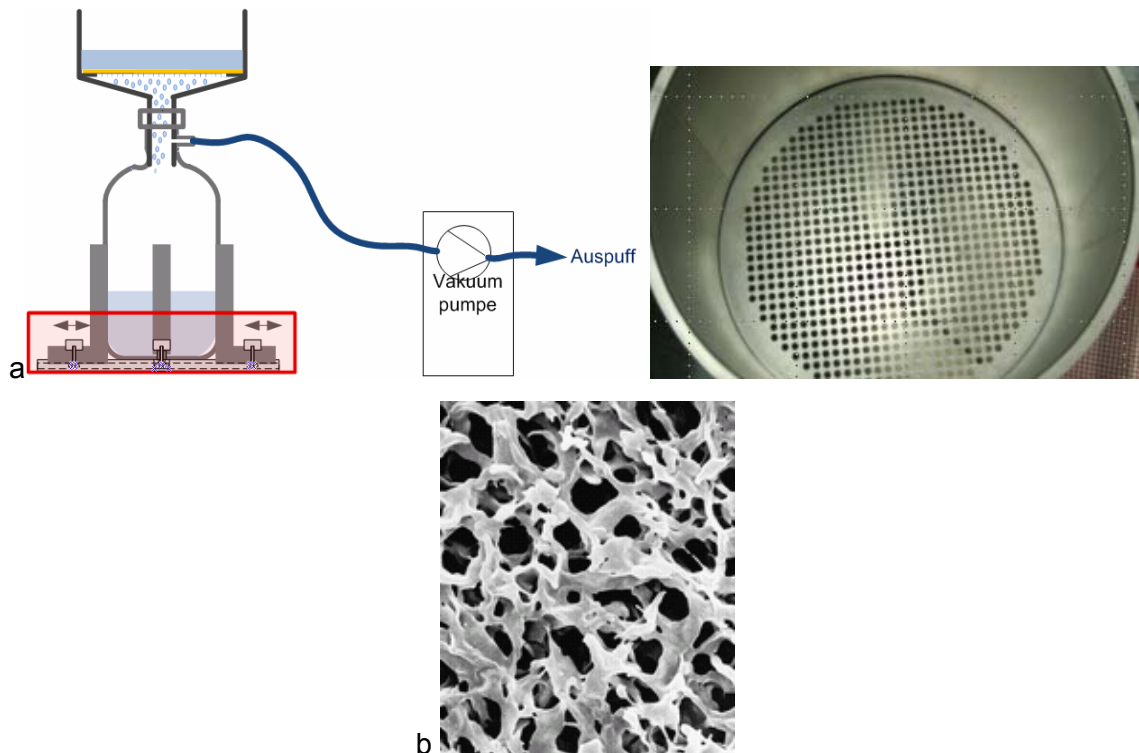


Abb. 4-I a - Nutschenfiltrationsstand (Eigenbau, BI), b - PVDF-Membran [Website: Millipore]

4.1.2.2 Tangentialflussfiltration (TFF)

Eine aufkonzentrierte Suspension ist mit der Tangentialflussfiltration (z. B. Sartocon Slice, Sartorius, Abb. 4-J a) zu erhalten. Dabei wird die Filtermembran tangential mit der PCMC-Suspension überströmt. Die treibende Kraft der TFF ist der Transmembran-Druck, der durch die Überströmung aufgebaut wird. Bei der Filtration penetriert das Suspensionsmedium durch die Membranporen, die z. B. einen Durchmesser von $0,45\ \mu\text{m}$ haben. Das resultierende Filtrat/ Permeat besteht aus mikropartikelfreiem Nicht-Lösungsmittel mit 5 % Wasser. Das Retentat ist der Teil, der nicht durch die Poren penetrieren kann. Es enthält somit die aufkonzentrierten PCMC. Wichtig bei der TFF ist, dass sich auf der Filtermembran kein Filterkuchen aufbaut. Dies wird durch die Überströmung, die Scherkräfte in den schmalen Kanälen zwischen den Membranen verursacht, sowie durch gut gewählte Filtrationsdrücke gewährleistet. Jedoch wirken der Filtration die Konzentrations- und Viskositäts-erhöhung der aufkonzentrierten Suspension entgegen. Die optimalen Prozessbedingungen müssen jeweils getestet werden. Standardhandhabung ist, dass die Membranen mit offenen Kanälen (Abb. 4-J b, Hydrosart Sartocon Slice *open-channel*, Poren- $\varnothing = 0,45\ \mu\text{m}$, Filterfläche = $0,1\ \text{m}^2$, Sartorius) mit 18 Nm bis 25 Nm in einen TFF-Stand eingespannt werden. Die Materialien sind so konstruiert, dass sie sich ohne weiteres Dichtungsmaterial verschließen. Danach wird die Membran gespült und mit Fällungsmittel (z. B. IPA)

konditioniert. Der Start der Aufkonzentrierung ist ein wichtiger Schritt. Bewährt hat sich, das System mit einem zu 90 % geschlossenen Permeatventil und völlig geöffnetem Retentatventil zu starten. Das heißt, die Suspension wird vor allem über die Membran im Kreis mit Hilfe einer Membranpumpe (Quattroflow) gepumpt. Dann kann der Eingangsdruck ($p_{in} = 1 \text{ bar bis } 3 \text{ bar}$) durch das Schließen des Retentatventils vorerst eingestellt werden. Er sinkt, wenn die Filtration durch das leichte Öffnen des Permeatventils gestartet wird. Allerdings lässt er sich sehr schnell nachregeln. Es sind 3 Drücke am TFF-Stand ablesbar. Daraus errechnet sich der Transmembrandruck (TMP):

$$\text{TransMembrane Pressure (TMP)} = \frac{p_{in} + p_{Retentat}}{2} - p_{Permeat} \quad \text{Gl. 4-1}$$

Eine zu geringe Überströmung kann zur Verblockung der TFF-Membran führen. Daher sollte sie immer hoch genug gewählt und möglichst über die Filtration konstant gehalten werden. Nach der Aufkonzentrierung wird das System mit ~ 20 l Wasser von allen Seiten gespült und gereinigt. Der Reinigungserfolg lässt sich mit dem Wasserfluss überprüfen. Dabei wird der Wasserfluss [ml/min] vor und nach der Filtration miteinander verglichen. Die Lagerung der Membran erfolgt in 20 % Ethanol.

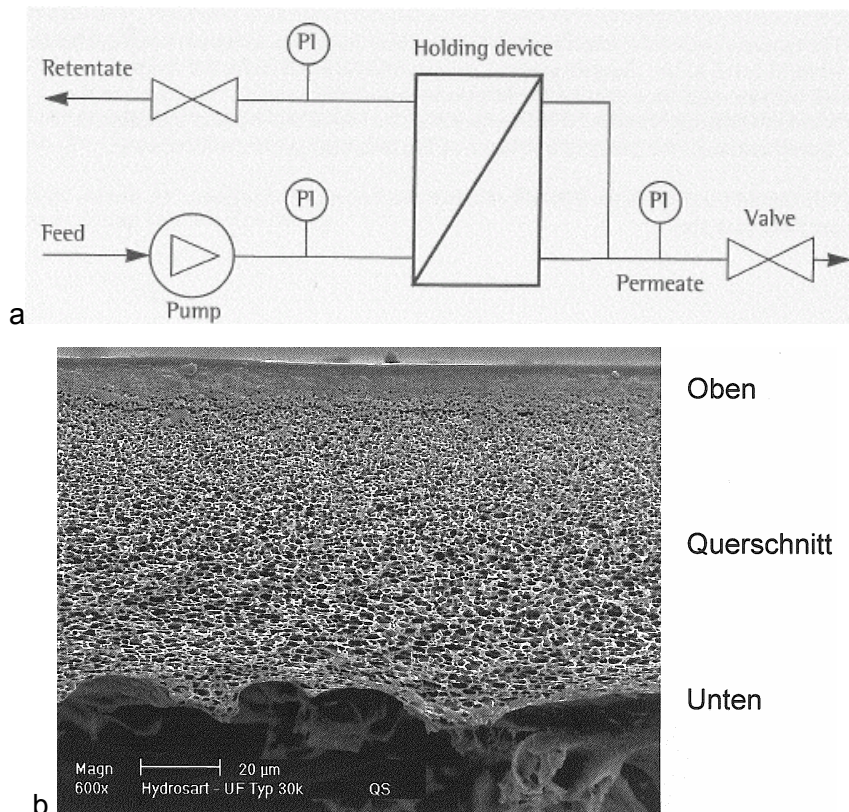


Abb. 4-J a - TFF-Stand, b – Hydrosart-Membran [Sartorius]

Durch Parallelisierung mehrerer Membranen kann das System mit kleineren sowie größeren Volumina gefahren werden. Ein Volumen von 5 l bis 10 l PCMC-Suspension kann mit einer Membran (Fläche 0,1 cm²) filtriert werden. 50 l bis 100 l sind mit 5 Membranen filtrierbar.

4.1.2.3 Erweiterte Kerzenfiltration

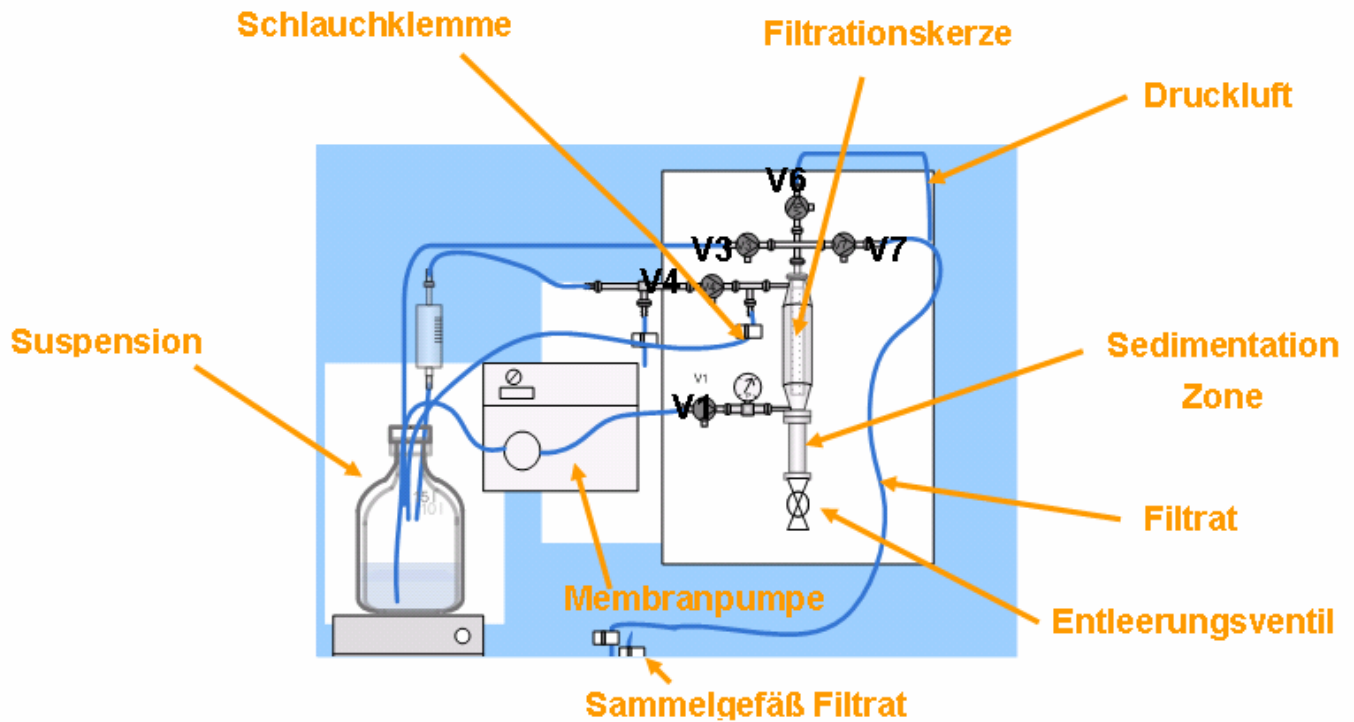


Abb. 4-K Erweiterte Kerzenfiltration (Eigenbau, BI)

Die Kerzenfiltration filtriert mit Druckluft über einen Gewebefilter. Die reine Druckfiltration wird mit weiteren Filtrationsverfahren im Rahmen dieser Arbeit kombiniert. An dieser Stelle wird nur die endgültige Filtrationseinheit (Abb. 4-K) *modified pressure filtration unit* (MPF) erläutert. Mit Hilfe dieser Einheit können kontinuierlich ca. 90 % des Suspensionsmediums entfernt werden. Analog zu der TFF wird ein Kuchenaufbau auf der Filterkerze erstens durch ein kontinuierliches Überströmen der Suspension vermieden, zweitens wird in regelmäßigen Abständen der Filter mit Prozessluft von der Filtratseite her gereinigt und drittens wird die Suspension tangential in den Filtrationskessel eingeführt, damit eine rotierende Strömung um die Filterkerze herum entsteht. Die Innovation ist die Kombination aller drei Verfahren mit dem Ziel, keinen Filterkuchen aufzubauen. Damit erfolgt die Separation über den eingebauten Filter (Verbundfiltergewebe, Abb. 4-L, Absoluta, *cut off* 2 µm, Spörl) und nicht über einen sich aufbauenden Filterkuchen. Um die scherempfindlichen PCMC nicht ständig in der

Filtrationseinheit zu bewegen, ist eine Sedimentationszone unterhalb der Filtrationseinheit eingebaut. Damit verbessert sich gleichzeitig die Filtrationsrate und die Pumpfähigkeit der aufkonzentrierten Suspension.

Die MPF wird in Zyklen gefahren. Dabei sind mehrere Filtrationszyklen je nach Filtrationsvolumen nötig. Die Ventile (V_1 , V_3 , V_4 , V_6 , V_7) werden mit Druckluft automatisch über ein Computerprogramm geöffnet und wieder geschlossen. Über den ganzen Prozess hinweg zirkuliert ein Teil der PCMC-Suspension. Dies erfolgt mit Hilfe einer Membranpumpe (Pumpenleistung 30 %, Pureflo 21, Jabsco). Dazu muss Ventil 1 geöffnet sein. Mit einer Schlauchklemme (Abb. 4-K) stellt man einen Druck von 1,5 bar bis 3 bar in der Filtrationseinheit ein. Die eigentliche Filtration startet, wenn Ventil 3 geöffnet ist. Über Ventil 3 kann das erste trübe Filtratvolumen wieder zurück in das Vorratsgefäß geführt werden. Nach 20 s ist das Filtrat klar. Dann schließt Ventil 3 und Ventil 7 öffnet sich, welches das klare Filtrat in den Sammelbehälter führt. Das Ventil 7 ist für 30 s bis 70 s geöffnet. Nachdem Ventil 7 wieder geschlossen ist, öffnen sich Ventil 4 und 6, um mit einem Druckluftstoß von 2 bar 3 Sekunden lang den Metallfilter von der Filtratseite her zu reinigen. Wenn Ventil 4 und 6 wieder verschlossen sind, ist ein Filtrationszyklus beendet. Mit dem erneutem Öffnen des Ventils 3 startet ein neuer Zyklus. Während der Filtration sedimentieren die PCMC und der abgesprengte Filterkuchen in die Sedimentationszone. Oberhalb und unterhalb der Sedimentationszone ist jeweils ein Ventil eingebaut, womit manuell zwischen Sammel- und Entleerungsmodus zu jeder Filtrationszeit gewechselt werden kann. Die Endentleerung des Kessels erfolgt, indem beide Ventile an der Sedimentationszone geöffnet sind. Die aufkonzentrierte Suspension kann nach der Homogenisation des Produktes durch Rühren zur Endtrocknung übergeben werden. 10 l bis 50 l PCMC-Suspension können mit einer MPF-Einheit aufkonzentriert werden. Das Totvolumen des Filtrationskessels ist ca. 1 l.

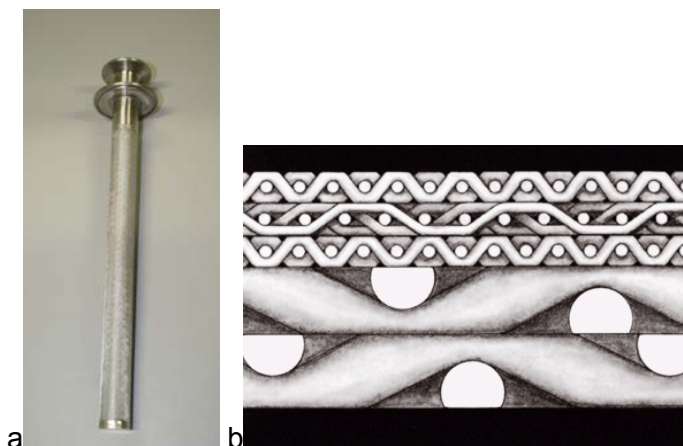


Abb. 4-L a – Kerzenfilter [Eigenbau, BI], b – Absoluta Verbundgewebe [Website: Spörl]

4.1.2.4 Zentrifugation

Vertikalzentrifugation

Kontinuierlich fließt die PCMC-Suspension über einen Einlaufstutzen in den langsam rotierenden Filter (1000 upm) der Vertikalzentrifuge (GFT V 30-O, Heinkel). Kontinuierlich wird das Filtrat abgeführt und in einem Auffanggefäß gesammelt. Im Filtertuch baut sich ein Filterkuchen auf. Bei trübem Filtrat ist eine erneute Beladung und Filtration über den aufgebauten Mikrokristallfilterkuchen nicht ausgeschlossen. Die Zentrifuge ist während der Zentrifugation mit Stickstoff geflutet. Nach dem Beladen wird der Filterkuchen für 10 min bei 1000 upm trockengeschleudert. Das Entladen erfolgt nach dem Stoppen der Zentrifuge durch das Öffnen des Zentrifugendeckels. Der Filterbeutel wird entnommen und unter dem Laborabzug getrocknet oder könnte direkt in die Extraktionskammer einer CO₂-Extraktionseinheit überführt werden. Mit dieser Zentrifuge können 30 l bis 100 l an PCMC-Suspension filtriert werden.

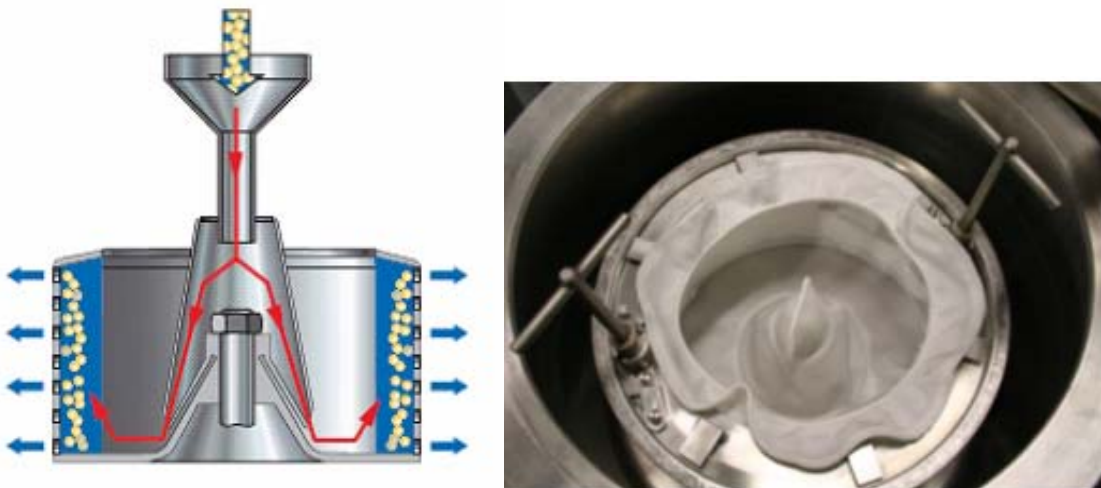
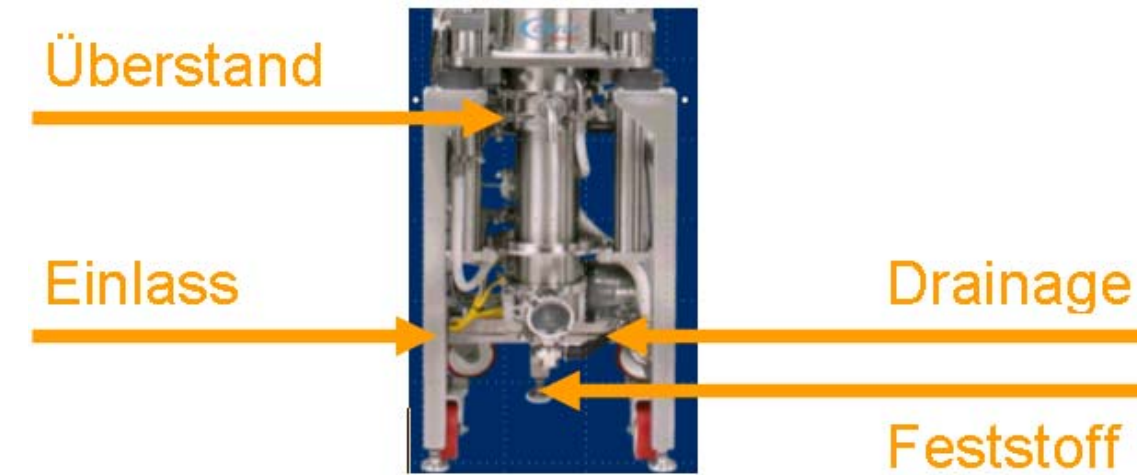


Abb. 4-M Filterbeutelzentrifuge (GTV Vertikalzentrifuge V 030, Heinkel)

Becherzentrifugation

Der rotierende Becher der Zentrifuge (Abb. 4-N, ADP-75 Celeros, JMSepararions) fasst ein Volumen von 1 l und wird kontinuierlich von unten mit der PCMC-Suspension befüllt, wobei das Filtrat oben kontinuierlich entweichen kann. Nach bzw. während der Beladung der gesamten PCMC-Suspension haben sich die PCMC-Präzipitate an der Wand des Bechers niedergeschlagen. Dabei können maximal 0,5 kg bis 1 kg an Feststoff in dieser Ausführung gesammelt werden. Dann erfolgt die Entladung der gestoppten Zentrifuge in zwei Schritten. Zuerst wird unten ein Ventil zur Drainageentleerung geöffnet. Dabei verbleiben die Präzipitate im Becher, denn durch die Zentrifugation sind diese recht fest an den Wänden niedergeschlagen. Die Präzipitate

werden im zweiten Entleerungsschritt entnommen, indem ein hydraulisch betriebener Stößel sie von oben nach unten aus dem Becher drückt. Dabei werden die Präzipitate unterhalb der Zentrifuge in einem zuvor angeflanschten Beutel/ Edelstahlgefäß relativ trocken zur Weiterverarbeitung gesammelt. Die Zentrifuge kann 10 l bis 100 l PCMC-Suspension zentrifugieren.



a



b

Abb. 4-N a - Kontinuierliche Becherzentrifuge (APD-75, Celeros, JMSeparations), b – Stößel zur Präzipitentleerung und zentrifugierte pastöse PCMC

4.1.3 Methoden und Geräte zur Endtrocknung

4.1.3.1 Lufttrocknung

Bei der Lufttrocknung erfolgt die Trocknung der PCMC an zirkulierender konditionierter trockener Luft (Druckluft bzw. Stickstoff) in einer geschlossenen Box (Glovebox, Eigenbau, BI).

4.1.3.2 Sprühtrocknung

Unter aktiver Zuführung von Wärmeenergie kann das Suspensionsmittel schneller verdampfen als bei der passiven Verdunstung. Dabei muss ein Verfahren ausgewählt werden, das bezüglich der Temperatur für thermolabile Stoffe (Proteine) geeignet ist. Die Sprühtrocknung erfüllt dieses Kriterium [Masters, 1991]. Zudem wird die Suspension zerstäubt, wodurch nach der Trocknung ein frei fließendes Pulver vorliegt. Das Prinzip der Sprühtrocknung ist in Kapitel 2.3.5.3 erläutert. Im Folgenden sind die Prozessdaten zusammengetragen. Der SD MICRO (GEA Niro GmbH) wird mit Stickstoff als Trocknungsgas (28 kg N₂/h und $p_{\text{Gas}} = 2.3$ bar) bei einer Einlasstemperatur von 70 °C und einer sich daraus ergebenden Ausgangstemperatur von 50 °C betrieben. Aus Arbeitssicherheitsgründen ist die Temperatur der Heizoberfläche kleiner 200 °C (T3). Die PCMC-Suspension wird mit einer Zweistoffdüse in einzelne Tröpfchen zerstäubt. Gea Niro empfiehlt diese Düse für wärmeempfindliche Produkte und für hochviskose Speisen [Website: Niro]. Die Zerstäuberrate ist 1,5 kg/h und der Zerstäuberdruck ist 0,4 bar. Die Trocknung erfolgt im Gleichstromverfahren und die Partikelabscheidung mit einem konventionellen Zyklon.

4.1.3.3 Trocknung mittels überkritischer Gase

Die SC-CO₂ Extraktion erfolgt mit einer SFE 500 Trocknungseinheit (Thar, Technologies Europe GmbH). Die Anlage besteht aus einer Kühlereinheit (Thermo Scientific Digital One), einem Massenflussmesser (Siemens), einer Hochdruckpumpe (*P-Series CO₂-pump*, Thar), einer *co-solvent* Pumpe (*Series III*, Thar), Heizelementen (Thar), 2 Extraktionskesseln (100 ml & 500 ml, Thar) und einem automatischen Druckregulator (Thar). In den Extraktionskesseln des vorliegenden Gerätes werden 40 ml bis 280 ml aufkonzentrierte PCMC-Suspension getrocknet. Zur Überführung in die Extraktionskessel wird ein Edelstahleinsatz (Thar) oder werden CO₂-permeable Säckchen aus Tyvek (ATMI, LifeSciences, Europe) oder PVDF (Millipore) genutzt. Alle Extraktionen werden bei 45 °C und 100 bar durchgeführt. Das flüssige CO₂ liegt in 10 kg Gasflaschen (Sauerstoffwerk, Friedrichshafen) vor. Mit 10 gCO₂/min bis 40 gCO₂/min fördert die CO₂-Pumpe das flüssige CO₂ kontinuierlich durch die Extraktionskessel. Die Extraktionszeiten betragen 60 min bis 480 min. Nach der Trocknung wird über 15 min lang das System entgast. Abschließend kann der Edelstahlkessel oder der Tyvekbeutel nach der Öffnung des nun druckfreien Kessels entnommen werden. Ein frei fließendes, feines PCMC Pulver wird in einem Glasvial mit Stopfen gefüllt, verbördelt und gelagert.

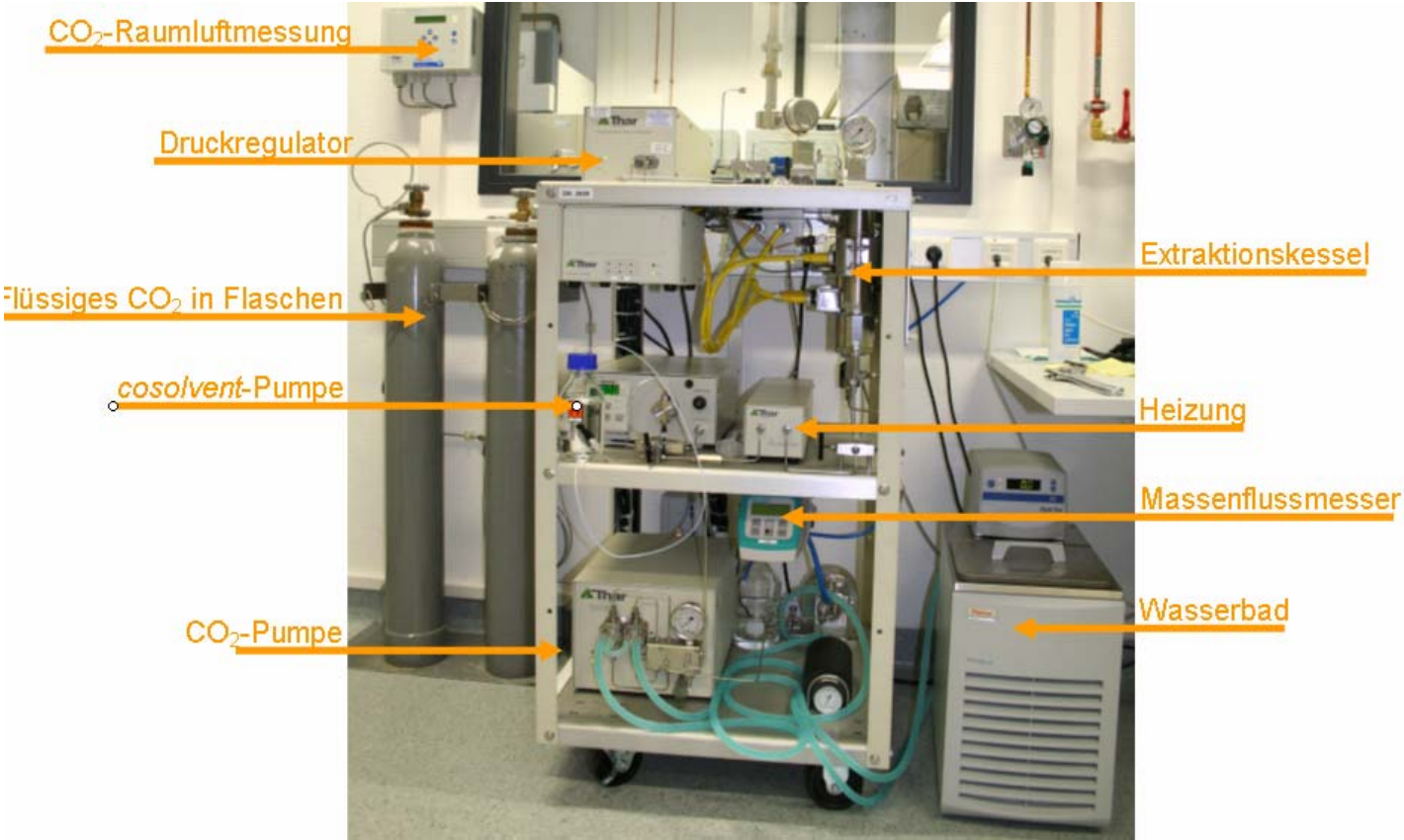


Abb. 4-O Extraktionseinheit (Thar)

4.2 Methoden der Analytik

4.2.1 Analytik der Präzipitate in Suspension

4.2.1.1 Feststoffgehalt (FS) mit gravimetrischer Bestimmung

Ein definiertes Volumen von 5 ml bis 300 ml wird über einen zuvor gewogenen Membranfilter filtriert. Der Filterkuchen trocknet auf der Filtermembran. Beides wird zusammen trocken gewogen. Aus dem Betrag der Differenz beider Werte dividiert durch das Volumen und multipliziert mit 100 % ergibt sich der Feststoffgehalt.

$$FS = \frac{m_{\text{FilternachTrocknung}} [\text{g}] - m_{\text{FiltervorderTrocknung}} [\text{g}]}{V[\text{ml}]} \cdot 100\% = [\%] \quad \text{Gl. 4-2}$$

4.2.1.2 Kristallausbeute (SR) mit gravimetrischer Bestimmung

Die Kristallausbeute definiert in Prozent, wieviel Material nach der Co-Präzipitation als Feststoff gegenüber dem theoretischen Wert vorliegt. Der theoretische Wert ergibt sich aus der Einwaage der Materialien, die theoretisch präzipitieren können.

$$SR = \frac{\text{GemessenePCMCmenge} / \text{Volumen} [\text{mg} / \text{ml}] \cdot 100\%}{\text{TheoretischePCMCmenge} / \text{Volumen} [\text{mg} / \text{ml}]} = [\%] \quad \text{Gl. 4-3}$$

4.2.1.3 Geometrische Partikelgröße mit Laserdiffraktometrie (LD)

Die Teilchengröße bzw. -verteilung bestimmt die Güte der Präzipitation, die bei den Mischervariationen unterschiedlich sein kann.

Das Prinzip der Laserdiffraktion beruht auf der Beugung eines Laserstrahls an der Oberfläche der Partikel, wobei je nach Form und Größe ganz unterschiedliche Beugungsbilder entstehen. Im idealen Falle von kugelförmigen Partikeln erzeugen die abgelenkten Strahlen radial-symmetrische Beugungsspektren auf den konzentrischen Ringen eines Multielement-Detektors. Der Radius eines Beugungsringes ist umgekehrt

proportional zur Partikelgröße. Kleine Teilchen streuen das Licht mit niedriger Intensität und unter großen Beugungswinkeln. Große Teilchen streuen mit hoher Intensität unter kleinen Beugungswinkeln. Darüber hinaus wird die Intensität des Beugungsmaximums von dem Mengenanteil der entsprechenden Partikel im Partikelkollektiv bestimmt. Das Messgerät analysiert die Beugungsbilder in der Regel im Fraunhofer-Bereich, indem das eingestrahlte Licht an den Teilchen, deren Durchmesser größer als die Wellenlänge ist, vorwiegend gestreut und kaum reflektiert oder gebrochen wird [Müller, 1996]. Für die Messungen dient das Laserbeugungsspektrometer HELOS mit Küvette (50 ml) der Firma Sympatec. Die Suspensionen werden mit einer Konzentration von ~ 0,005 mg/ml, bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 upm, ohne Ultraschall gerührt und in den Laserstrahl ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) gepumpt. Zwei Fourierlinsen, die sich in ihrer Brennweite unterscheiden (50 mm oder 100 mm), werden bei den Messungen mit Nassdispersion verwendet. Jedoch führen nicht dispergierte Agglomerate zu einer Fehlmessung mit scheinbar größerer Primärkorngöße. Die Auswertung erfolgt mit der Software (WINDOX Version 5) unter der Annahme des Kugelmodells (Formfaktor = 1). Es werden stets drei separate Messungen durchgeführt und in der Arbeit sind Mittelwerte und Standardabweichungen dieser angegeben. Aus der volumenbezogenen Summenverteilung Q_3 wird der Medianwert x_{50} , der den Partikeldurchmesser, bei dem 50 % des Volumens kleiner ist als diese Größe, der x_{10} und x_{90} zur Errechnung des Span 90 abgelesen. Der Span 90 gibt die Breite der Partikelverteilung an.

$$Span90 = \frac{x_{90} - x_{10}}{x_{50}} \quad \text{Gl. 4-4}$$

4.2.1.4 Partikelform mit Lichtmikroskopie

Mit dem Lichtmikroskop (Olympus SZ x 12) werden die Partikelformen und die Partikelgrößen direkt nach der Kristallisation betrachtet.

4.2.1.5 Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier mit Sprühtrocknung

Die Ergebnisse dieser Methode sind nicht absolut. Jedoch können mit der Methode Unterschiede in der Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Formulierungen entdeckt oder bei der Verwendung einer Formulierung unterschiedliche Aufkonzentrierungsmethoden beurteilt werden.

Nach der Co-Präzipitation wird ein Aliquot der Suspension entnommen. Daraus werden die Präzipitate separiert, getrocknet und deren Proteinwiederfindung der PCMC analytisch bestimmt. Die restliche PCMC-Suspension wird sprühgetrocknet wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben. Im Anschluss wird ebenfalls die Proteinwiederfindung der PCMC mit UV-VIS Spektroskopie bestimmt, siehe Kapitel 4.2.3.1.

Bei starker Bindung der Proteine auf den Carriern sind beide Proteinwiederfindungsraten oder Proteinbeladungsraten nahezu gleich. Bei schwacher Bindung ist die Proteinwiederfindung des sprühgetrockneten Materials signifikant kleiner. Schwach gebundenes Protein wird durch die Scherbelastung während des Sprühvorganges abgeschert. Dies und ungebundenes Protein wird im Zyklon aufgrund der geringen Partikelgröße nicht zurückgehalten, sondern bis in den Abluffilter transportiert. Scherstress tritt bei der Sprühtrocknung vor allem auf dem Weg zur und während der Zerstäubung auf [Lee, 2002].

4.2.1.6 Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier mit Zentrifugation oder Sedimentation

Im Vergleich zur Bestimmung der Bindungsstärke mittels Sprühtrocknung ist die Bestimmung der Bindungsstärke mittels Zentrifugation oder Sedimentation einfacher und wesentlich weniger arbeitsintensiv.

Von einem Aliquot wird erneut direkt nach der Präzipitation die Proteinwiederfindung analysiert. 50 ml eines weiteren Aliquotes werden in ein Zentrifugierrohrchen (*Falcon-Tube*, 50 ml) gefüllt. Dies wird 15 min bei 1000g (Biofuge primo, Heraeus) zentrifugiert oder 22 h lang bei 0g sedimentiert. Danach werden 40 ml des Überstands möglichst rückstandsfrei entnommen und verworfen. In dem Überstand befinden sich die schwachen oder ungebundenen Proteine, die auf Grund der Partikelgröße wesentlich langsamer sedimentieren als die PCMC. Der Rückstand wird mit dem verbleibenden Suspensionsmedium oder mit 10 ml 100%igem Fällungsmedium redispergiert, filtriert und getrocknet. Die Proteinwiederfindung wird bestimmt. Beide Probenwerte werden miteinander verglichen. Eine starke Bindung liegt vor, wenn beide Proteinwiederfindungswerte annähernd gleich sind. Die Analyse ist keine absolute Methode genauso wenig wie die Methode mit der Sprühtrocknung.

Bei allen drei Methoden wirken unterschiedliche Kräfte auf die PCMC ein. Dadurch sind bei schwach oder schlecht gebundenen Proteinen auf den Carriern die Proteinwiederfindungswerte der drei Methoden unterschiedlich. Ist das Protein schwach oder schlecht gebunden, detektiert dies die Sprühtrocknungsmethode stärker als die Zentrifugation und diese wiederum stärker als die Sedimentation. In der

gleichen Reihenfolge nehmen die Scherstresseinflüsse zwischen den Methoden ab. Bei der Sedimentation tritt kaum Scherstress auf, vielmehr erfolgt die Trennung auf Grund der unterschiedlichen Schwerkraft zwischen den kleinen ungebundenen Proteinpartikeln und den PCMC.

4.2.2 Analytik der trockenen Präzipitate

4.2.2.1 Geometrische Partikelgröße mit Laserdiffraktometrie (LD)

Am Ende des Herstellungsprozesses liegen trockene Mikrokristalle vor, von denen analog zu den Partikeln in der Suspension die geometrische Partikelgröße ermittelt wird. Bei Pulvern, die während des Prozesses mittels Kuchenfiltration gewonnen werden, ist diese Analytik wenig sinnvoll, da das Messergebnis vom Zerkleinerungsgrad des Filterkuchens abhängt.

Das zu untersuchende Pulver wird im Laserbeugungsspektrometer (HELOS, Sympatec) mit Hilfe der Druckluftdispergierung RODOS in den Laserstrahl gebracht. Dazu wird es von einem rotierenden Teller aus in eine Düse mit Verwirbelungsschikanen eingesaugt, durch die es in der Druckluft dispergiert und horizontal zum Laserstrahl eingesprüht wird. Um Agglomerate zu zerstören, wird ein Dispergierdruck von 3 bar gewählt. Die Messung startet bei einer optischen Konzentration $> 0,5 \%$ und endet nach 5 s bzw. bei einer optischen Konzentration $< 0,2 \%$. Standardgemäß wird die Linse mit einer Brennweite von 50 mm eingesetzt.

4.2.2.2 Aerodynamische Eigenschaften mit Aerodynamic Particle Sizer (APS)

Die aerodynamischen Eigenschaften der PCMC-Pulver werden mit dem *Aerodynamic Particle Sizer* (APS Typ 3321, TSI) unter Hilfe des *Impactor Inlets* (Typ 3306, TSI) bestimmt. Zuvor werden die PCMC in Inhalationskapseln eingefüllt.

Der mittlere Teilchendurchmesser (*mass median aerodynamic diameter* MMAD) wird nach dem *Time of Flight* Prinzip (TOF) ermittelt. Dabei wird durch eine Düse die Beschleunigung der Partikel in Abhängigkeit eines beschleunigten Luftstroms gemessen, wobei kleine Partikel langsamer als große beschleunigt werden. Nach dem Verlassen der Düse passieren die Partikel zwei hintereinander liegende Laserstrahlen. Über die Passagezeit, die die Partikel benötigen, um diese beiden Laserstrahlen zu passieren, werden auf Basis einer hinterlegten Kalibrierkurve die aerodynamischen Partikel-

verteilung und damit der mittlere aerodynamische Durchmesser ermittelt. Bei der Probenahme für die MMAD-Messung werden 0,2 % der Partikel in die Düse eingezogen. Die ausgebrachte Dosis (*emitted dose* ED) wird durch eine Differenzwiegung der gefüllten und der leeren Kapsel nach der Messung bestimmt und drückt den Verlust in Prozent aus, das der ausgebrachten Dosis entspricht. Die Feinpartikelfraktion (*fine particle fraction* FPF) wird durch Differenzwiegung eines Tiefenfilters (Art. 61631 Pall) bestimmt, der nach der Impaktorstufe die lungengängige Fraktion auffängt. Die Impaktorstufe hat einen effektiven *cut off* 5 µm und wird mit 39 l/min durchströmt. Das heißt, alle Partikel > 5 µm werden auf der Impaktorstufe zurückgehalten [Schultz-Fademrecht, 2004].

Zur Messung werden 12 g bis 18 g PCMC-Pulver in die Hartgelatine kapsel (Größe 3, Capsugel) abgefüllt, in den HandiHaler (BI) eingelegt und angestochen. Der HandiHaler wird am Mundstück des Impaktoreinlasses (USP *EPI throat of the impactor inlet*) befestigt. Das Pulver wird in einem Luftstrom von 39 l/min mitgenommen, der von außen kontrolliert gestartet wird. Für jedes Pulver werden 3 Kapseln vermessen und der Mittelwert sowie die relative Standardabweichung errechnet. Die Impaktorstufe wird mit einer dünnen Brij 35 Lösung (BI) beschichtet.

4.2.2.3 Partikelmorphologie mit Rasterelektronenmikroskope (REM)

Die räumlichen Oberflächenstrukturen der PCMC lassen sich mit der Rasterelektronenmikroskopie ermitteln. Die Oberflächenabbildungen entstehen, indem ein Elektronenstrahl die zu untersuchende Fläche abrasiert. Beim Auftreffen der Elektronen auf das Objekt werden Sekundärelektronen erzeugt, die zum Signal führen, aus dem das Bild entsteht. Voraussetzung für die Abbildung ist, dass sich die Probe unter Elektronenbeschuss nicht verändert und den Elektronenstrom leitet.

Die Aufnahmen werden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops SUPRA 55 VP (Carl Zeiss SMT AG) und eines SE2 (*secondary electrons*) konventionellen Standarddetektors erstellt. Bei der Präparation werden die Proben auf einen Aluminiumprobenbehälter aufgestäubt, der mit einer beidseitig klebenden Leitfähigkeitsfolie (Leit-Pads, Plannet GmbH) versehen ist. Zur Sicherstellung einer ausreichenden elektrischen Leitfähigkeit werden die Präparate unter Argonatmosphäre (50 Pa) über 90 s mit 10 nm Gold/ Palladium beschichtet. Bei der Messung liegt eine Beschleunigungsspannung von 15 kV an.

4.2.2.4 Kristallinität mit Pulverröntgendiffraktometer (XRPD)

Um Aufschlüsse über die Kristallinität bzw. der polymorphen Form der PCMC-Träger gewinnen zu können, wird die Röntgendiffraktometrie verwendet. Hierbei wird ein Röntgendiffraktometer (STOE STADI P mit ortsempfindlichem Detektor) eingesetzt, das mit einer stationären Kupferanode (40 kV, 40 mA) ausgestattet ist. Die von der Anode emittierte elektromagnetische Röntgenstrahlung (monochromatische $\text{CuK}\alpha$ - Strahlung: $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) trifft auf die Probe, die in einem rotierenden Probenhalter zwischen zwei Acetatfolien eingespannt ist. Diese Strahlung wird je nach Kristallanordnung in der Probe mehr oder weniger stark gebeugt (gestreut), mit einem Zählrohr im ortsempfindlichen Detektor erfasst und zu einem elektrischen Signal transformiert. Dieses charakteristische Interferenzmuster wird Röntgendiffraktogramm genannt und beinhaltet die Intensitäten der Streustrahlung, aufgetragen gegen die Winkel 2θ . Dieser sogenannte 2θ -Wert bezeichnet den Winkel, der von der Probe gebeugten Röntgenstrahlung. Die in dieser Arbeit dargestellten Röntgendiffraktogramme werden in einem Winkelbereich von $3^\circ 2\theta$ bis $40^\circ 2\theta$ vermessen. Liegen keine kristallinen Strukturen vor, entsteht im Röntgendiffraktogramm lediglich ein Rauschen.

4.2.2.5 Restwassergehalt mit Karl-Fischer (KF)

Der Restwassergehalt der PCMC-Pulver wird mit der coulometrischen Karl-Fischer Methode bestimmt, die als allgemeine Methode unter 2.5.32 im Europäischen Arzneibuch beschrieben ist [Ph. Eur. 6 Ausgabe, 2008]. Dabei wird mit einem KF-Coulometer (Typ 756, Metrohm AG) die Reaktion von Wasser mit Schwefeldioxid und Iod in Gegenwart einer Base in Methanol bestimmt.

4.2.2.6 Restfeuchtegehalt

Die Bestimmung des Feuchtegehaltes der PCMC-Pulver erfolgt thermogravimetrisch mit einem Halogenfeuchtemessgerät (HR83, Mettler Toledo). Hierzu werden ca. 150 mg Probe eingewogen. Mit einem Temperaturprogramm wird die Probe auf 150°C aufgeheizt und 2 min bei derselben Temperatur getrocknet. Stellt sich nach 2 Minuten keine Gewichtskonstanz ein, wird die Trocknungszeit automatisch verlängert. Der prozentuale Massenverlust der Probe wird als Feuchtigkeitsgehalt des PCMC-Pulvers angegeben. Die Messung wird jeweils 3-mal durchgeführt, daher ist in der Arbeit der Mittelwert angegeben.

4.2.2.7 Rekrystallisationsfeuchte mit dynamischer Wasserdampfadsorption (DVS)

Wasser kann durch unterschiedliche Prozesse wie Adsorption, Absorption, Kapillarkondensation, Komplexierung und auch durch chemische Reaktionen aufgenommen werden. Die genaue Kenntnis der Wechselwirkung der Materialien mit Wasserdampf ist wichtig für die Lagerung und die Verarbeitung, um damit zusammenhängende Probleme wie z. B. Instabilitäten oder andere Veränderungen zu vermeiden. Der Wassergehalt ist als ein Parameter zur Beschreibung einer Substanz abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit. Dementsprechend kann die kritische Hygroskopizität aus Sorptionsisothermen bestimmt werden. Das Ergebnis gibt wichtige Informationen zum Verhalten der Substanz bei verschiedenen klimatischen Bedingungen.

Alle Untersuchungen werden mit einer Dynamischen Wasserdampf Sorption (DVS, Surface Measurement Systems) auf Grundlage einer gravimetrischen Messung durchgeführt. Ein Trockengasstrom (N_2) wird quantitativ durch eine Massenflusskontrolleinheit gesteuert. Die Einstellung der angestrebten Luftfeuchte erfolgt durch das Mischen zweier Gasströme in einer Kontrollschleife, wobei der eine Gasstrom ein Gefäß mit reinem Wasser durchströmt. Die relative Feuchte wird bei konstanter Temperatur (25 °C) von 0 % r. F. in Zehnerstufen bis 90 % r. F. erhöht. Dabei wird die Masse der Probe- sowie Referenzschale kontinuierlich gemessen. Die nächste Feuchtestufe wird bei Erreichung einer Massenkonstanz (Massenänderung < 0,00025 mg) eingestellt.

Da durch Rekrystallisation und andere physikalische Eigenschaftsveränderungen auch eine Änderung im Wassergehalt und damit in der Masse bewirkt werden kann, ist es möglich, durch kontinuierliche Messung der Masse die Rekrystallisation in Abhängigkeit von der relativen Feuchte zu beobachten. Die Wasserdampfsorption kann somit zur Bestimmung der kritischen Rekrystallisationsfeuchte genutzt werden.

4.2.3 Analytik der rekonstituierten Präzipitate

4.2.3.1 Proteinwiederfindung / Proteinbeladung mit UV-Vis-Spektroskopie

Gelöste Proteine absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm, was auf die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan als Chromophore) in der Proteinstruktur zurückzuführen ist. Diese Absorptionseigenschaft kann zur Gehaltsbestimmung ausgenutzt werden. Eine geeignete Menge von 20 mg bis 60 mg

an PCMC-Pulver wird mit 2 ml bis 8 ml Puffer rekonstituiert. Die Lösung wird in Einmalküvetten bei 280 nm unter Verwendung des Puffers als Kompensationsflüssigkeit mit dem Zweistrahl-UV-VIS-Spektrometer Lamda 12 (Perkin-Elmer) vermessen. Die Messergebnisse müssen dabei im Bereich der Kalibriergeraden, die für Trypsin und Trypsinogen erstellt sind, oder im linearen Bereich zwischen 0,2 bis 1,0 der Absorption verlaufen. Um den Fehler der Lichtstreuung zu berücksichtigen, wird dazu die Absorption bei 320 nm bestimmt und von dem Absorptionswert bei 280 nm subtrahiert. [2.5.33 Gesamtprotein Methode 1, Ph. Eur. 6 Ausgabe, 2008]

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Abhängigkeit der Absorption (A) von der molaren Konzentration (c) bei konstanter Schichtdicke (d):

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 4-5}$$

c = Konzentration in [mol/ l]

Häufig wird statt des molaren Absorptionskoeffizienten (ε) der spezifische $A_{1cm}^{1\%}$ verwendet, wobei die 1%ige Konzentration bei einer Schichtdicke von 1 cm vermessen wird.

$$A = A_{1cm}^{1\%}(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 4-6}$$

c = Konzentration in [%]

Die Proteinwiederfindung (*protein recovery* PR) in Prozent ist die gemessene Proteinkonzentration der rekonstituierten PCMC, multipliziert mit 100 %, dividiert durch die theoretische Proteinkonzentration. Dabei ergibt sich die theoretische Proteinkonzentration aus der genauen Einwaage des PCMC-Pulvers, multipliziert mit der ermittelten Beladungsrate an Protein (z. B. 0,1 bei 10 % Beladung), dividiert durch das Lösungsvolumen der Probe. Die Beladungsrate ergibt sich aus den eingesetzten Massen der Materialien vor der Präzipitation und bezieht sich auf die Gesamtmasse der PCMC. Analog dazu ist die Proteinbeladung (*measured protein loading* MPL) zu errechnen, jedoch wird das Endergebnis auf die Beladungsrate der PCMC bezogen. Für die Proteinwiederfindung/ Proteinbeladung werden jeweils 3 bis 6 Proben vermessen. In der Arbeit sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Bei trüben rekonstituierten Lösungen werden diese vor der Absorptionsmessung mit einem PVDF-Spritzenfilter (0,45 μm , Carl-Roth) partikelfrei filtriert.

4.2.3.2 Feste Aggregate mit Trübungsmessung

Das Trübungsphotometer (Hach 2100AN) bestimmt die Trübung, die unter anderem durch feste Aggregate der rekonstituierten Lösung bedingt ist. Zur Messung werden 40 mg PCMC-Pulver in 4 ml Puffer (10 mg/ml) innerhalb von 2 Minuten gelöst. Sollte die Lösungszeit nicht ausreichen, werden die Proben stehen gelassen und nach 20 min bzw. 2 h vermessen. Dies ist jeweils in den Tabellen dieser Arbeit entsprechend vermerkt. Bei der Messung wird die Intensität des Streulichtes einer Probe im Austrittswinkel von 90° gemessen. Genau gilt dies für Trübungsmessungen bis 40 NTU. Bei Proben, die einen Trübungswert größer als 40 NTU messen, muss die „Ratio“-funktion aktiviert werden. Dabei messen drei Detektoren das Streulicht und über einen mathematischen Algorithmus wird ein Trübungswert ermittelt. Die Trübung kann in NTU (*nephelometric turbidity units*) oder in FNU (*formazin nephelometric units*) gemessen werden. Beide Einheiten können vom Gerät über eine hinterlegte Kalibriergerade ineinander umgerechnet werden.

4.2.3.3 Lösliche Aggregate mit Größenausschlusschromatographie

Mit der *Size Exclusion High-Performance Liquid Chromatography* (HP-SEC) werden lösliche Proteinaggregate und -fragmente der PCMC auf Grund unterschiedlicher Molekülgrößen getrennt. Für die Messungen dient der ÄKTA-*purifier* (GE HealthCare Life Science), ausgestattet mit einer Säule aus Gel mit Poren (300 mm x 7,8 mm, TSK3000SWXL für die Antikörper bzw. TSK2000SWXL für Trypsin, Tosoh Biosep) und einer Vorsäule (40 mm x 6 mm, SWXL Guard, Tosoh Biosep). Die mobile Phase ist ein Hochsalzpuffer aus 0,6 M NaCl und 0,05 M NaH₂PO₄, der mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt wird. Die Flussrate ist 1 ml/ min. Das Injektionsvolumen der rekonstituierten PCMC-Lösungen, die eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml bis 10 mg/ml haben, ist 25 µl. Die Fraktionen (Aggregate, Monomere, Fragmente) detektiert ein UV-Detektor bei 280 nm. Die Absorption wird über die Elutionszeit aufgetragen und ergibt ein Chromatogramm. Im Chromatogramm treten zuerst die Aggregate, dann die Monomere und schließlich die Fragmente auf. Es müssen jedoch nicht immer Aggregate oder Fragmente im Chromatogramm vorliegen. Die Flächenanteile werden mit der Software Unicorn (GE HealthCare) integriert und ergeben prozentual zur Gesamtfläche einen jeweiligen Fraktionsanteil. Der relative Monomergehalt des Modellproteins wird durch den Vergleich einer Standardlösung des Modellproteins bestimmt. Es werden stets zwei Proben gemessen. In der Arbeit sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Entwicklung des Prozessschrittes: Mischen/ Präzipitieren

Grundvoraussetzung für die Präzipitation der PCMC ist eine homogene Mischung. Daher sind beide Operationen Mischen und Präzipitieren nicht voneinander zu trennen. Zur Herstellung der Präzipitate werden zwei Flüssigkeitsströme miteinander vermischt. Der wässrige Strom hat einen Volumenanteil von 5 % und enthält Carrier, Proteine und Hilfsstoffe in gelöster Form. Der Nicht-Lösungsmittelstrom (Fällungsmedium) hat einen Volumenanteil von 95 % und darin sind Carrier, Proteine und Hilfsstoffe nicht löslich. Die Herausforderung besteht darin, beide Ströme schnell, homogen, statisch und kontinuierlich zu mischen. Daher ist die Auswahl eines geeigneten Mischers wichtig. Die Zielpartikelgröße liegt im unteren Mikrometerbereich. Daneben muss der Mischer ca. 100 l PCMC-Suspension innerhalb eines Tages reproduzierbar produzieren können. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse von verschiedenen Mikro-, Makro- und ultraschallassistierten Mischern zur PCMC-Herstellung zusammengetragen.

Beim Mischen der Medien kann sich die Temperatur durch positive/ negative Wärmetönung und durch Eintrag mechanischer Energie ändern. In einem Experiment wird auf 20 °C temperiertes Isopropanol turbulent mit unterschiedlichen Wasseranteilen gemischt und dabei wird mit einem digitalen Thermometer die Temperatur gemessen. Bei einem Wasseranteil größer 10 % im Gemisch ist das Ergebnis ein geringer Temperaturanstieg. Bei einem für die PCMC-Herstellung interessanten Wasseranteil von kleiner 10 % wird ein sehr kleiner Temperaturabfall von ca. 1 °C gemessen (Abb. 5-A). Der Grund für den Temperaturabfall könnte das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen unter Energieverbrauch sein.

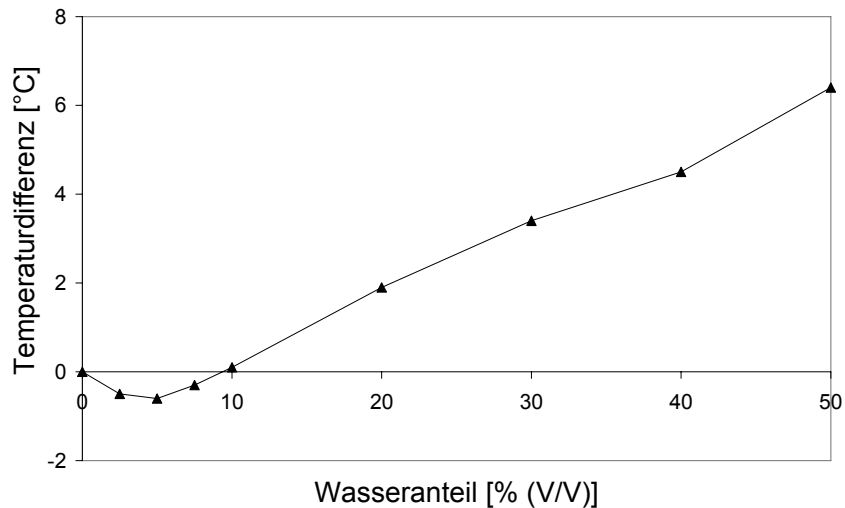


Abb. 5-A Temperaturverlauf beim Mischen von Isopropanol mit Wasser

5.1.1 Mikromischer

Das Projekt startet mit statischen, kontinuierlichen Mikromischern, die mit HPLC-Pumpen betrieben werden. Die erste Versuchsreihe untersucht den *Single Jet Impingement* Mischer SJI (mikro) und den *Double Jet Impingement* Mischer DJI (mikro). Eine zweite Studie prüft Kaskaden-, Kamm-, und Ventilmischer. Der für Fällungsreaktionen konstruierte Ventilmischer wird in einer anschließenden Versuchsreihe nochmals näher untersucht. Verschiedene Formulierungen dienen als Modell für die Entwicklung eines universellen Misch-/ Präzipitierschrittes. Als Mischungsverhältnis beider Flüssigkeiten sind immer 95 Teile Nicht-Lösungsmittel und 5 Teile Protein-Carrier-Lösung zugrundegelegt. Die Qualität der Mikrokristalle wird zum einen durch die Bestimmung der geometrischen Partikelgröße in der Suspension direkt nach der Fällung und zum anderen durch die Bestimmung der Proteinwiederfindung und -aggregate nach der Membranfiltration, Trocknung an der Luft und Rekonstitution bewertet.

5.1.1.1 Entwicklungsstart

Trypsinogen beladene Valin-Mikrokristall-Suspensionen (Tab. 5-A) werden mit dem SJI und dem DJI bei einer Flussrate von 10 ml/min, 15 °C und einem Auslassschlauchdurchmesser von 0,75 mm (Tab. 5-B) in je 3 separaten Produktionen hergestellt.

PROZESSSCHRITT MISCHEN/ PRÄZIPITIEREN

Tab. 5-A Modellformulierung 1

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
1	Tryp.gen (3,0)	Val (60)	-	4,8	0,32	IPA

Tab. 5-B Prozessparameter aller Startversuche in Kapitel 5.1.1.1

Mischer	Fluss [ml/min]	Temp [°C]	Auslass-ID [mm]	Volumen [l]	weitere Parameter [m]
SJI (mikro)	10	15	0,75	0,06	-
DJI (mikro)	5 - 15	5 - 35	0,5 – 1,375	0,06 – 0,8	Auslassschlauchlänge 0,5 - 3

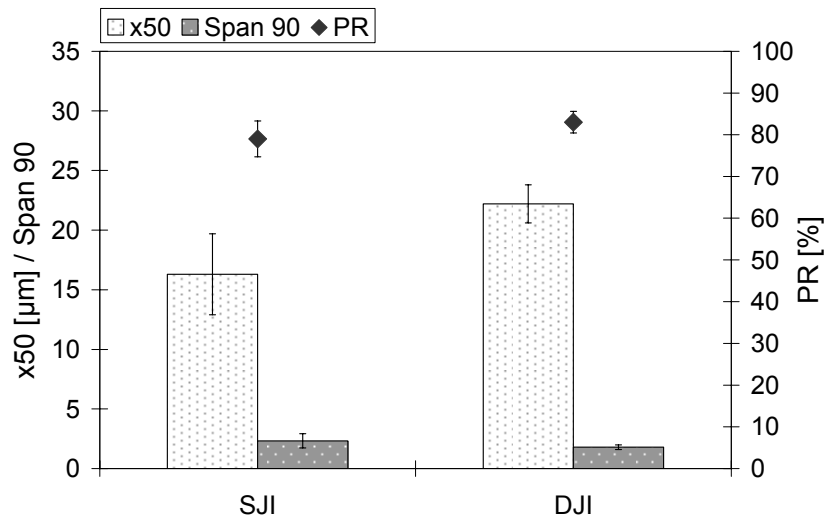


Abb. 5-A1 Geometrische Partikelgrößen, -Verteilungen und Proteinwiederfindungen von SJI und DJI (mikro) hergestellten Trypsinogen-Valin Co-Kristallen, Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet von drei separaten Herstellungen

Die mittlere Partikelgröße der drei SJI-produzierten Suspensionen ist $16,3 \mu\text{m} \pm 3,4 \mu\text{m}$. Die drei DJI-hergestellten Mikrokristall-Suspensionen zeigen einen etwas größeren Partikeldurchmesser von $22,2 \mu\text{m}$, aber mit einer geringeren Schwankungsbreite von $\pm 1,6 \mu\text{m}$ (Abb. 5-A1). Damit ist die Reproduzierbarkeit der Partikelgröße beim DJI besser, was auf eine homogenere Durchmischung zurückzuführen ist. Beim SJI stoßen zwar beide Ströme zusammen, jedoch mischen sich die laminaren Ströme aufgrund der stark unterschiedlichen Volumenverhältnisse anfangs nur unvollständig. Sie fließen zunächst in der Auslasskapillare nebeneinander her, wie fluid-dynamische Simulationsberechnungen verdeutlichen [Baum, 2008]. An der Grenz-

fläche zwischen beiden Phasen bilden sich erst nach und nach Kristallkeime, woraus eine breite Partikelgrößenverteilung (Mittelwert des Span 90 = 2,3) resultiert. Dahingegen ist beim DJI die Energie durch die Aufteilung des Nicht-Lösungsmittelstromes in zwei Ströme und deren Zusammenführung im Mischer mit der im 90° Winkel hereinfließenden Protein-Carrier-Lösung ausreichend, um die ungleichen Ströme homogen zu mischen und gleichzeitig viele Kristallkeime entstehen zu lassen. Die Mischungsgrenzflächen sind gegenüber dem SJI verdoppelt. Die Partikelverteilungen der DJI-produzierten Suspensionen haben im Mittelwert einen Span 90 von 1,8. Die Proteinwiederfindung ist bei beiden Mixern vergleichbar. Zukünftig wird der DJI als Mischer zur PCMC-Herstellung eingesetzt. Verschiedene Prozessparameter wie Temperatur, Auslasskapillardurchmesser, Flussrate und Länge des Auslassschlauches werden in den folgenden drei Studien untersucht.

Die erste der folgenden Studien prüft linear den Temperatureinfluss im Bereich von 5 °C bis 35 °C, unter konstanter Flussgeschwindigkeit von 5 ml/min und einem Auslasskapillardurchmesser von 0,5 mm. Als Modellformulierung dient Trypsinogen-Valin (Tab.5-A).

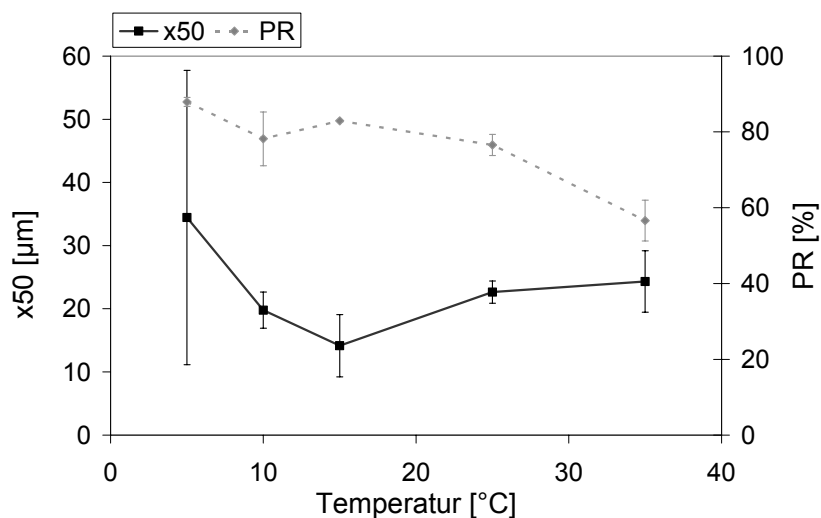


Abb. 5-A2 Temperaturabhängigkeit bei der PCMC-Präzipitation mit dem DJI (mikro), Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens zwei Herstellungen

Bei sehr niedrigen Temperaturen (5 °C) kristallisieren die in der Protein-Carrier-Lösung nahe der Sättigungsgrenze gelösten Carrier zum Teil schon im temperierten Ausgangsgefäß rasch aus. Dieser Teil bildet im Mischer Kristallisationskeime, mit dem Ergebnis von größeren und stark schwankenden Partikelgrößen (Abb. 5-A2). Bei höheren Temperaturen ab 10 °C entstehen keine Kristallisationskeime mehr und die

Partikelgrößen schwanken von 14 µm bis 24 µm, wobei bei 15 °C die kleinsten Partikel entstehen. Die Proteinwiederfindung auf den Carrieroberflächen ist im Temperaturbereich zwischen 5 °C und 25 °C größer 77 %. Bei 35 °C sinkt die Proteinwiederfindung auf inakzeptable 57 %. Die Proteine lagern sich vermutlich bevorzugt bei kälteren Temperaturen auf die Träger, weil diese bei kälteren Temperaturen durch eine höhere Übersättigung schneller gebildet werden und die Diffusionsmobilität der Proteine erniedrigt ist. Zusammenfassend eignet sich zur Fällung von PCMC mit dem untersuchten Versuchsaufbau der Temperaturbereich zwischen 10 °C und 25 °C. In den folgenden Versuchen werden 15 °C eingesetzt.

In einer zweiten Studie werden Trypsinogen-Valin-Mikrokristalle (Tab.5-A) mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten (5, 10, 15 ml/min) in Abhängigkeit vom Durchmesser der Auslasskapillare (0,5; 0,75; 1,375 mm) bei 15 °C präzipitiert. Als Untersuchungsmatrix dient ein *Design of Experiment* (DoE).

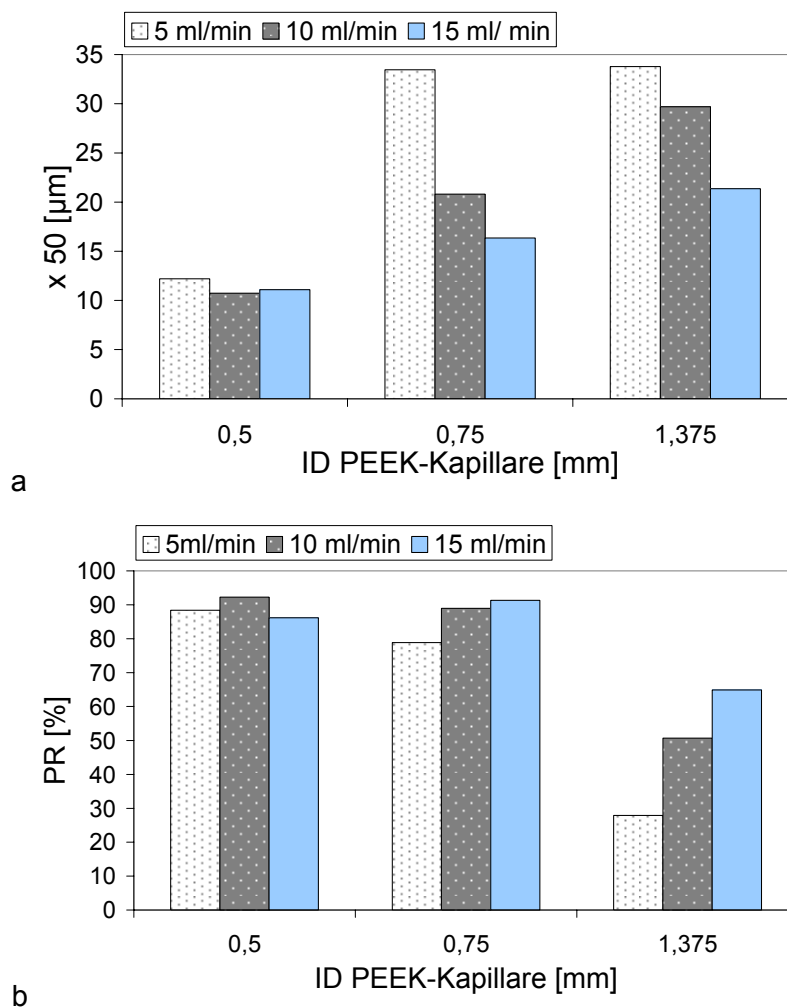


Abb. 5-B a – x_{50} , b - Proteinwiederfindung unter Variation des IDs der Auslasskapillare und der Flussrate bei Einsatz des DJI (mikro)

Der mittlere Kristalldurchmesser nimmt mit zunehmendem Durchmesser der Auslasskapillare deutlich zu und die Proteinwiederfindung ab (Abb. 5-B). Allerdings wird durch Steigerung der Flussgeschwindigkeit die Partikelgröße wieder verkleinert und die Proteinwiederfindung gesteigert. Bei der Auswertung der Experimente mit der statistischen Software Modde stellt der Koeffizientenplot die Variation des Durchmessers als einen signifikanten Einflussparameter auf Partikelgröße und Proteinwiederfindung dar. Die Variation der Flussgeschwindigkeit zeigt keinen signifikanten Effekt nur einen Trend.

In einer dritten Untersuchungsreihe werden Trypsinogen-Valin-Mikrokristalle bei variierenden Auslassschlauchlängen von 0,5 m bis 3,0 m und bei ansonsten konstanten Bedingungen von 15 ml/min, 15 °C und 0,75 mm kristallisiert. Die Mikropartikel zeigen bei allen Herstellungen im Mittelwert die gleichen Partikelgrößen von $15,3 \mu\text{m} \pm 4,0 \mu\text{m}$ und Proteinwiederfindungen von $91 \% \pm 2 \%$. Die Durchmischung und Präzipitation ist folglich nach 0,5 m im Auslassschlauch abgeschlossen und wird nicht durch dessen Verlängerung verbessert.

Neben den beschriebenen Ergebnissen treten während der Versuche ab einem Suspensionsvolumen von 60 ml starke Druckanstiege ($> 20 \text{ bar}$) oder Verblockungen im Mischer und in der Auslasskapillare auf. Wenn sich die Verblockung nicht selber durch den anstehenden Druck löst, muss der Mischvorgang abgebrochen, der Mischer gereinigt und der Prozess neu gestartet werden. Eine kontinuierliche Produktion von mehreren Litern ist unter diesen Bedingungen undenkbar. Deshalb wird der Durchmesser auf 2,0 bis 3,2 mm vergrößert. Um dabei eine gleichbleibende PCMC Qualität zu produzieren, muss die Flussgeschwindigkeit erhöht werden. Dies wird in Kapitel 5.1.2.1 und 5.1.2.3 untersucht und diskutiert. Ein weiterer Vorteil höherer Flussgeschwindigkeiten ist die Produktion größerer Suspensionsvolumina in kürzerer Zeit.

5.1.1.2 Testung von Kaskaden-, Kamm- und Ventilmikromischern

Trypsinogen wird in einigen Forschungsarbeiten als Modellprotein zur Verfahrensentwicklung stabiler Proteinarzneiformen verwendet [Sonner, 2002; Tzaris, 1999; Adler, 2000]. Jedoch kann sich Trypsinogen autokatalytisch zu Trypsin umsetzen. Deswegen ist bei der Größenausschlusschromatographie von Trypsinogen oft ein Doppelpeak im Monomerpeak zu erkennen. Um die Interpretation zu erleichtern, wird in der vorliegenden Arbeit weiter Trypsin und nicht Trypsinogen als Modellprotein eingesetzt. Zudem ist Trypsin kostengünstiger zu beschaffen. Neben DL-Valin wird mit

Glycin eine schnell präzipitierende Aminosäure als Carriersubstanz aufgenommen. Glycin (213 mg/ml) hat in Wasser (20 °C) eine höhere Sättigungslöslichkeit als Valin (61 mg/ml), womit mehr Material in der Protein-Carrier-Lösung gelöst werden kann und höhere Feststoff- wie auch Proteingehalte in der PCMC-Suspension erhalten werden. Die Tab. 5-C listet die in den folgenden Studien eingesetzten Materialien auf.

Tab. 5-C Modellformulierungen 2 und 3

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl2 (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl2 (2,2)	10,0	0,57	IPA

In Mischern mit Mikrostrukturen sind Stofftransport, Wärme- und Oberflächenflächenphänomene intensiviert, denn die benötigte Mischzeit (t_M) ist direkt proportional zum Quadrat des Mischweges bzw. Innendurchmessers (l) und umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten (D). Die Mischzeit wird nach Gl. 5-1 berechnet [Pfeiffer, 2004].

$$t_M = \frac{l^2}{D} \quad \text{Gl. 5-1}$$

Tab. 5-D Prozessparameter

Mischer	Fluss [ml/min]	Temp [°C]	Blenden ID [µm]	Volumen max. [l]	weitere Parameter
Kaskade	52,5	23	-	1,575	Druck < 10 bar
Kamm	52,5	23	50/ 100/ 300	1,575	Druck < 10 bar
Ventil	52,5	23	105 µm/ 30°	1,575	Druck < 10 bar

In der folgenden Studie werden der Kaskaden-, Kamm- und Ventilmischer der Firma Ehrfeld Mikrotechnik BTS getestet. Der Mischweg bzw. der Durchmesser der Mikrostrukturen ist beim Kammischer durch 70 µm breite Kanäle und beim Ventilmischer durch die Mikroscheibe mit 105 µm charakterisiert. Beim Kaskadenmischer werden beide Ströme durch Mischerstruktur und Blende ständig geteilt und wieder zusammengeführt, wobei laminare Ströme im Mikrometerbereich entstehen. Je kleiner die Breite bzw. der Durchmesser der Mischstrukturen ist, desto schneller erfolgt die homogene

Vermischung. Hauptbewertungskriterien für die Untersuchung sind Verblockungstendenz, Proteinwiederfindung, Monomergehalt und Partikelgröße. Die Mikromischer werden mit Hilfe von HPLC-Pumpen und den in Tab. 5-D aufgelisteten Parametern betrieben.

Tab. 5-E Verblockung und Partikelgrößen in Suspension nach Herstellung mit Mikromischern

Mischer	Tryp-Gly			Tryp-Val		
	Verblockung	x ₅₀ [µm]	Span 90	Verblockung	x ₅₀ [µm]	Span 90
Kaskade	im Einlass	6,3	2,1	in der Kaskade	14,6	1,8
Kamm 50	im Einlass	5,4	2,5	-	13,8	1,5
Kamm 100	im Einlass	10,2	2,5	-	11,9	1,6
Kamm 300	im Auslass	12,2	2,2	-	18,0	1,6
Ventil	im Auslass	11,2	2,3	-	14,2	1,6

Alle Mikromischer verblocken bei der Präzipitation von Trypsin-Glycin Co-Kristallen. Insbesondere treten beim Kaskaden- und Kammischer (Blenden 50 µm und 100 µm) Verblockungen im Einlass des Protein-Carrier-Stroms auf, weshalb mit diesen Mixern keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden. Der Kammischer mit der 300 µm Blende sowie der für Fällungsreaktionen konstruierte Ventilmischer sind für weitere Untersuchungen interessant. Verblockungen traten bei diesen Mixern im Mischerauslass auf, die durch schnellere Durchflüsse verhindert werden könnten. Weiterhin könnten antiadhäsive Materialien wie PEEK, PP, Teflon und hochpolierter Edelstahl am Ventilmischerauslass eingesetzt werden.

Die Trypsin-Valin Formulierung verstopft die Mikromischer kaum, weil zum einen der Feststoffgehalt in der Suspension geringer ist und zum anderen die Keimbildung des Valins langsamer erfolgt als die des Glycins. Allerdings verblockt der Kaskadenmischer auch bei dieser Formulierung. Kamm- und Ventilmischer sind einsetzbar.

Die Partikelgrößen liegen bei allen Versuchen im gewünschten unteren Mikrometerbereich zwischen 5 µm bis 18 µm (Tab. 5-E).

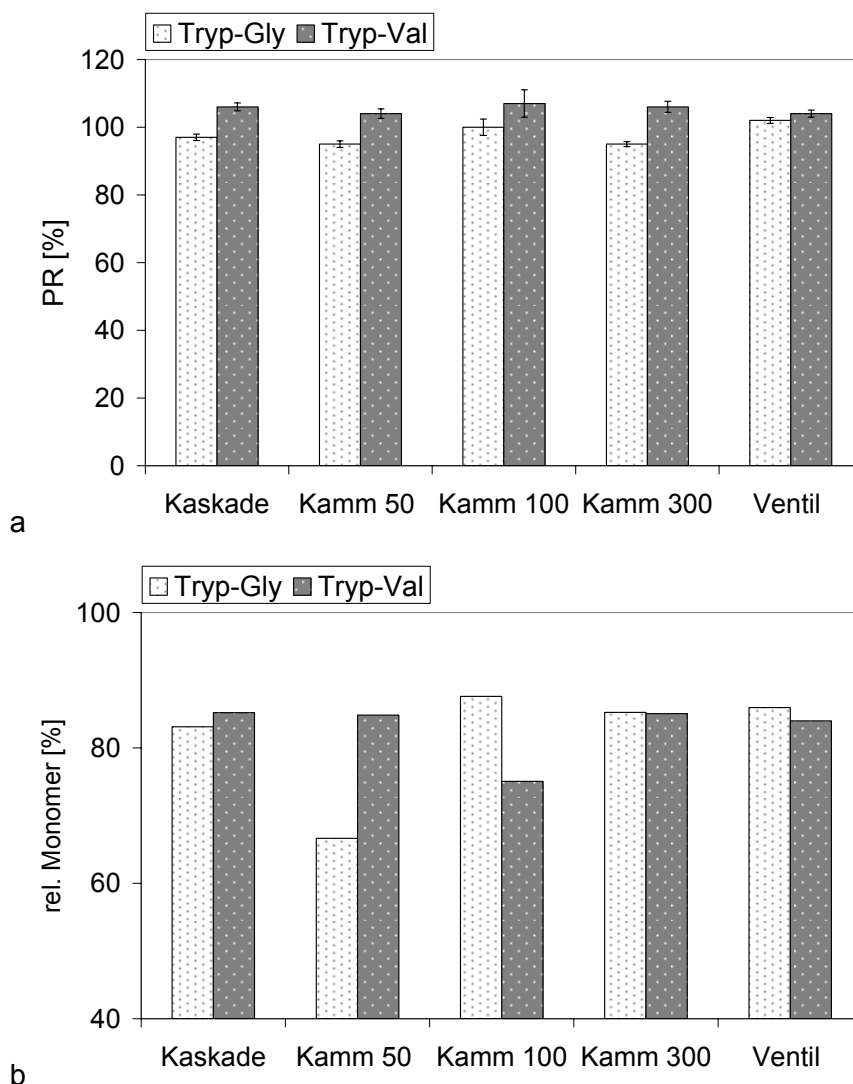


Abb. 5-C a – Proteinwiederfindung b – relativer Monomergehalt nach Herstellung mit Mikromischern

Die Proteinwiederfindung (Abb. 5-C a) ist bei allen Herstellungen sehr gut. Die Analyse des relativen Monomergehaltes zeigt in Abb. 5-C b Unterschiede. Hauptsächlich beim Kammischer mit kleinen Blendenspalten von 50 μm und 100 μm werden in zwei Versuchen nur reduzierte Monomergehalte (65 % und 72 %) gemessen, wobei der Effekt nicht eindeutig ist. Die Abnahme des Monomergehaltes betrug im Durchschnitt 13 %. Durch den Vergleich (siehe Kapitel 5.1.3) von Mikro- und Makromischern soll gezeigt werden, ob der Verlust durch die Mikrostruktur und die damit intensivierten Oberflächenwechselwirkungen verursacht wird oder ob andere Ursachen wie die Modellformulierung oder die eingesetzte Proteinqualität für den Monomerverlust verantwortlich sind.

Der Ventilmischer ist besonders für weitere Untersuchungen interessant. Die erhöhte Gesamtflussrate von 130 ml/min wird mit Schlauchpumpen realisiert, jedoch können diese nur eine Druckdifferenz von 2 bar bis 4 bar überwinden. Daneben werden unterschiedliche antiadhäsive Materialien (hochpolierter Edelstahl, PEEK, PTFE, PP) im Mischerausslass eingebaut. Als Modell dient Trypsin-Glycin (Tab. 5-C). Die Übersättigung ist durch Anteil und Art des Nicht-Lösungsmittels und durch die Temperatur steuerbar. Die Temperatur als Prozessparameter wird in diesem Versuch nochmals aufgenommen, um möglichst schnell Kristalle herzustellen. Dazu werden Plattenwärmeaustauscher (Ehrfeld Mikrotechnik BTS) zwei Zentimeter vor dem Ventilmischer eingebaut. Bei dem Versuchsaufbau bei Temperaturen < 5 °C ist eine Keimbildung im Ausgangsgefäß ausgeschlossen (siehe Kapitel 5.1.1.1). Die Fällung erfolgt bei 4 °C.

Tab.5-F Verblockungen und Produktqualität unter Variation der Materialien des Ventilmischerauslasses bei höheren Flüssen (130 ml/min)

Tryp-Gly bei 4 °C					
	Verblockung	x₅₀	Span 90	PR	rel. Monomer
		[µm]		[%]	[%]
Ventil hochpolierter Edelstahl	-	9,7	2,3	107	79,6
Ventil PEEK	im Auslass	18,1	2,4	107	80,7
Ventil PTFE	-	15,2	2,3	105	80,7
Ventil PP	im Auslass	12,5	2,4	100	79,6

Die Partikelgrößen der Trypsin-Glycin Mikrokristalle aller 4 Herstellungen schwanken trotz vergleichbarer Prozessbedingungen relativ stark von 10 µm bis 18 µm. Insgesamt sind die resultierenden Partikel trotz Flusserhöhung und Temperaturenniedrigung mit dem Partikelgrößenbereich der vorangegangenen Studie vergleichbar. Das gleiche gilt für die Proteinwiederfindung (PR) und den Monomergehalt.

Im nächsten Schritt wird die Langzeiteignung des Ventilmischers mit dem hochpolierten Edelstahlauslass untersucht. Der gewählte Fluss ist 130 ml/min, die Temperatur ist 4 °C, Trypsin-Glycin dient als Modellformulierung und die Produktionszeit ist auf 1 Stunde festgelegt.

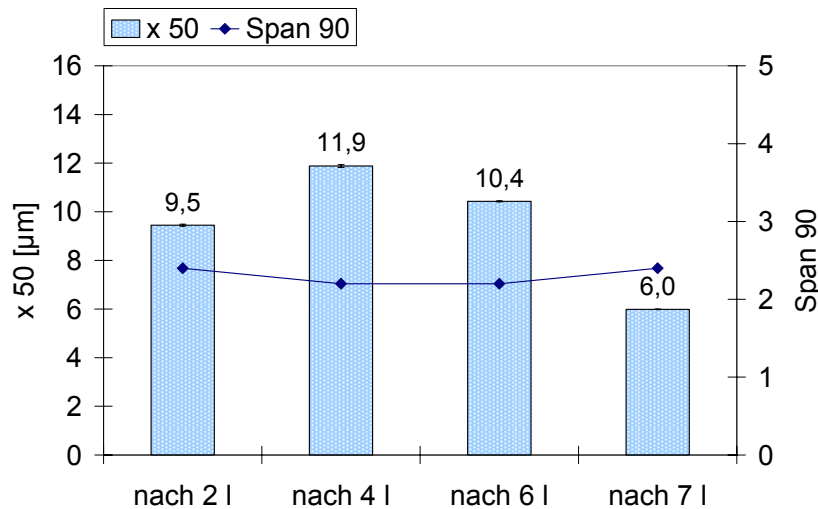


Abb. 5-D Partikelgröße Langzeittest des Ventilmischers

7,8 l PCMC-Suspension werden produziert. Verblockungen sind nicht zu beobachten, aber der Druck steigt während der Produktion auf 3 bar und erste Kristallrückstände sind am Ende der Produktion im Auslass des Ventilmischers sichtbar. Die Partikelgrößen schwanken zwischen 11,9 µm und 6,0 µm (Abb. 5-D). Während der Herstellung wird ein Flussabfall um 20 ml/min gemessen, da die Schlauchpumpen den durch Kristallablagerungen ansteigenden Druck nicht entgegenwirken können.

5.1.1.3 Implementierung des Ventilmischers

Der Ventilmischer ist nach den Teststudien in Kapitel 5.1.1.2 eine interessante Option zur PCMC-Herstellung. In einer weiteren DOE-basierenden Studie wird der Ventilmischer mit unterschiedlichen Flussraten (70, 125, 180 ml/min) bei unterschiedlichen Temperaturen (6; 12,5; 23 °C) betrieben. Die Trypsin-Glycin Formulierung (Modellformulierung 3 in Tab. 5-C) wird eingesetzt. Das Produktionsvolumen der 7 Versuche ist je 1 l Suspension. Zur Förderung der beiden Flüssigkeitsströme dienen 2 Schlauchpumpen (Watson Marlow, Tab. 4-B), die nach Optimierung der Federeinstellung am Pumpenkopf laut Hersteller auch bei einem Differenzdruck von 4 bar arbeiten. Beurteilt werden Verblockungstendenz durch Druck- und Flussbetrachtungen über die Zeit, Proteinwiederfindung, Proteinaggregation und Partikelgrößen. Vor der Herstellung werden die Pumpen jeweils kalibriert, wobei Wasser als Medium verwendet wird. Nach der Kalibrierung wird der Schlauch der Pumpe, die das Fällungsmittel fördert, mit Nicht-Lösemittel (Isopropanol) gefüllt und der Fluss nochmals geprüft. Normalerweise pumpt die Schlauchpumpe immer dasselbe Volumen, unabhängig von dem zu fördernden Medium. In diesem Versuch soll die Pumpe 171 ml/min (95 % von 180 ml/min) fördern. Bei der Überprüfung fließen jedoch 60 ml weniger an Isopropanol

durch die Pumpe. Darüberhinaus wird ein erhöhter Druck als bei Wasser gemessen. Alle Daten sind in der Tab. 5-G zusammengefasst.

Tab. 5-G Pumpenkalibrierung

Medium	$p_{\text{ein-gemessen}}$	$p_{\text{aus-gemessen}}$	V_{gemessen}	η bei 20 °C Literatur
Wasser	0 bar	2,2 bar	171 ml/min	$1005 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}$
Isopropanol	0 bar	2,8 bar	111 ml/min	$2430 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}$

Unter den beschriebenen Bedingungen liegt im System eine laminare Rohrströmungen vor, daher gilt das Hagen-Poiseuillsche Gesetz (Gl. 2-14). Isopropanol und Wasser haben eine unterschiedliche Viskosität (Tab. 5-G). Unter Berücksichtigung der Viskositäten und der Drücke kann der theoretische Volumenfluss wie in Gl. 5-2 dargelegt errechnet werden. Theoretisch können nur 90 ml/min Isopropanol gefördert werden. Praktisch wird ein Volumenstrom von 111 ml/min gemessen. Diese Diskrepanz ist vermutlich durch Messfehler bei der Druck- und Flussaufnahme mit Zylinder und Stoppuhr bedingt.

$$\frac{V_{IPA} \cdot \eta_{IPA}}{P_{IPA}} = \frac{V_{water} \cdot \eta_{water}}{P_{water}}$$

$$V_{IPA} = \frac{P_{IPA} \cdot V_{water} \cdot \eta_{water}}{\eta_{IPA} \cdot P_{water}}$$

$$V_{IPA} = \frac{2.8\text{bar} \cdot 171\text{ml} / \text{min} \cdot 1005 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}}{2430 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot 2.2\text{bar}} = 90\text{ml} / \text{min} \quad \text{Gl. 5-2}$$

$$\frac{P_{IPA}}{\eta_{IPA}} = \frac{P_{water}}{\eta_{water}} = \frac{P_{IPA}}{2430 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}} = \frac{2.2\text{bar}}{1005 \cdot 10^{-6} \text{ Pa} \cdot \text{s}}$$

$$P_{IPA} = 5.3\text{bar} \quad \text{Gl. 5-3}$$

In Gl. 5-3 wird der theoretisch zu überwindende Differenzdruck zur Förderung von Isopropanol mit einer Flussrate von 171 ml/min berechnet. Die eingesetzten Schlauchpumpen müssten einen theoretischen Druck von 5,3 bar überwinden. Dafür sind die Pumpen nicht ausgelegt.

Der Versuch wird dennoch unter nicht optimalen Bedingungen durchgeführt. Die Kalibrierung der Nicht-Lösungsmittelpumpe erfolgt mit Isopropanol. Während der Produktion zeigt sich eine Flusskonstanz bei 70 ml/min und 125 ml/min. Bei der 6 °C Herstellung mit 180 ml/min reduziert sich die Flussrate deutlich auf 130 ml/min. Ein Druckanstieg wird dabei jedoch nicht gemessen.

Die Proteinwiederfindung ist bei allen Herstellungen sehr gut und die drei Chargen des *Center-Points* im DOE zeigen eine gute Reproduktion (Abb. 5-E a). Die Durchströmungsgeschwindigkeit und die Temperatur haben keinen Einfluss auf die Proteinwiederfindung.

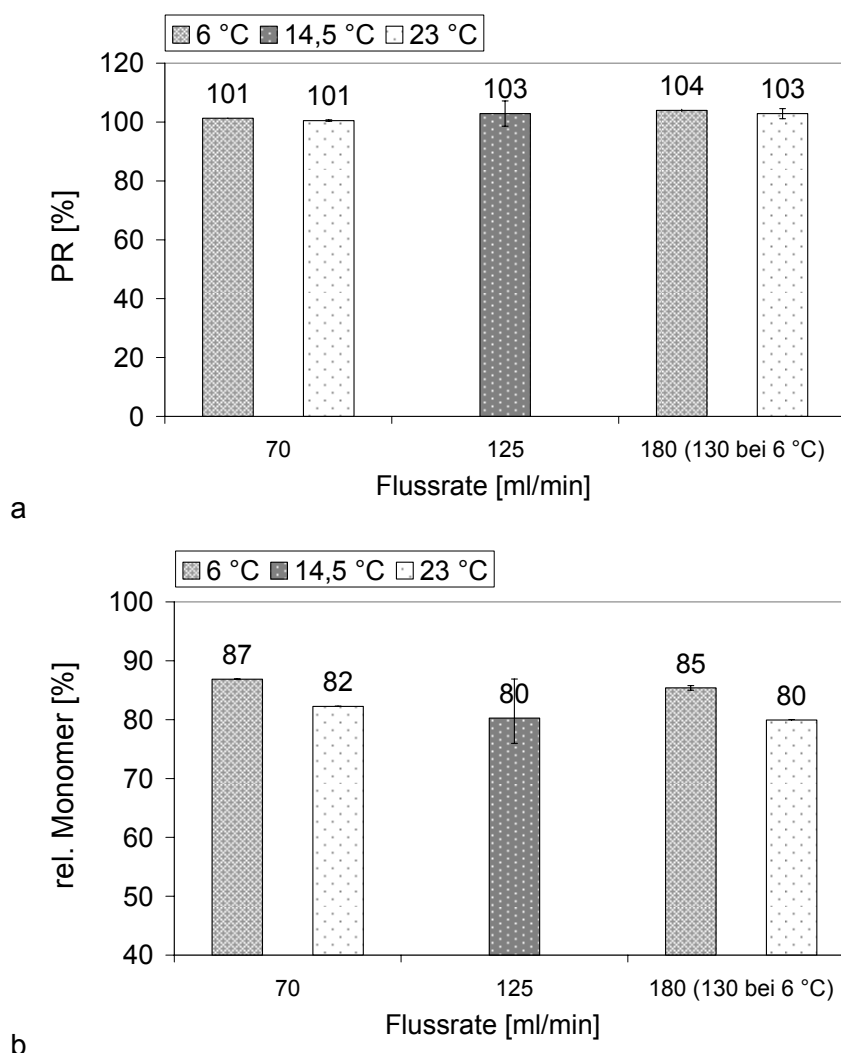


Abb. 5-E a- Proteinwiederfindung, b – relativer Monomergehalt, bei 125 ml/min Mittelwert und Standardabweichung drei separater Herstellungen (*Center-Point* des DOE)

Bei der Auswertung des Monomeranteils zeigt sich bei allen Herstellungen erneut ein gleichmäßiger Verlust von mindestens 13 % des Monomergehaltes (Abb. 5-E b). Mögliche Gründe dafür sind in Kapitel 5.1.1.2 beschrieben. Der Temperatureinfluss wirkt

sich signifikant auf den Monomergehalt aus, wie der Koeffizientenplot in Abb. 5-F darstellt. Bei 6 °C wird das Modellprotein Trypsin weniger geschädigt als bei 23 °C.

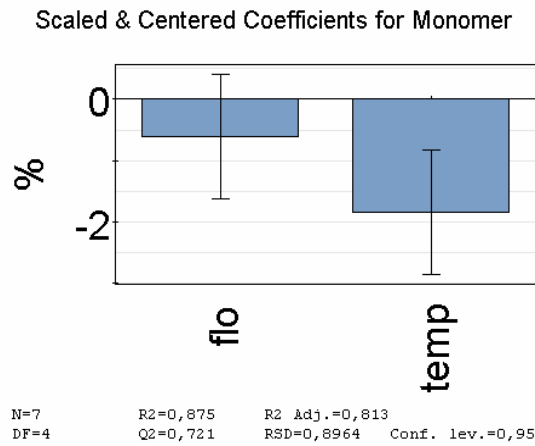


Abb. 5-F Koeffizientenplot der Faktoren Flussgeschwindigkeit (flo) und Temperatur (temp) auf den Monomergehalt nach statistischer Auswertung mit Modde

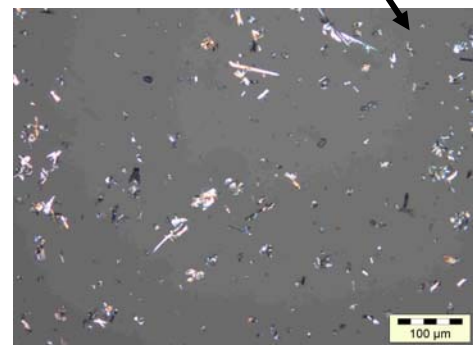
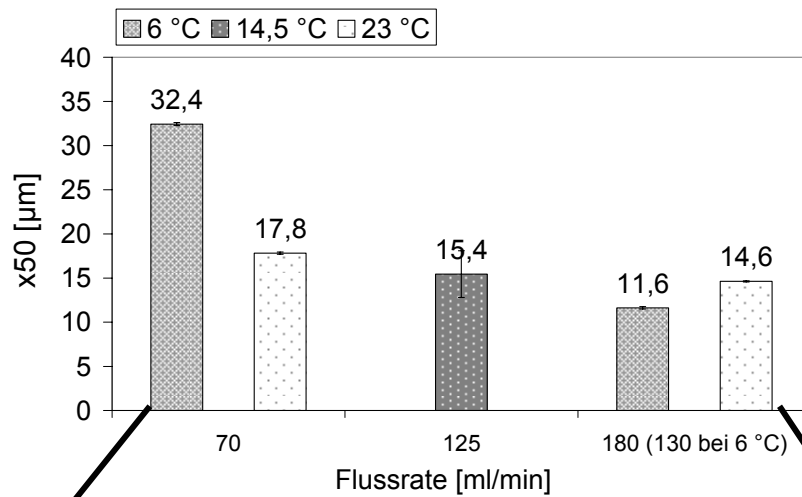


Abb. 5-G Partikelgrößen und mikroskopische Bilder, bei 125 ml/min Mittelwert und Standardabweichung drei separater Herstellungen (*Center-Point* des DOE)

Die geometrische Partikelgröße der Mikrokristalle in Suspension ist unterschiedlich (Abb. 5-G). Es entstehen unterschiedlich große Anteile an Nadeln deren Länge ebenfalls je nach Herstellbedingung variiert. Bei der Laserbeugungsmessung werden die Nadeln als kugelförmige Gebilde detektiert, so dass die geometrische Partikelgröße verfälscht wird bzw. polymodale Verteilungen entstehen. Daher sind die Partikelgrößenangaben fehlerhaft. Mikroskopische Bilder sind für die Überprüfung der Messergebnisse hilfreich. Bei erhöhter Flussrate ist ein statistisch nicht signifikanter Effekt zu kleineren Partikelgrößen erkennbar. Das Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis der Studie am Entwicklungsstart, siehe Kapitel 5.1.1.1.

Insgesamt zeigt der Ventilmischer als Mikromischer bei längeren Herstellungen keine Verblockungen. Er mischt intensiv beide Flüssigkeitsströme. Mit einer weiteren Modellformulierung soll ergänzend untersucht werden, ob durch die intensivierten Oberflächenwechselwirkungen eine Proteinschädigung auftritt (Kapitel 5.1.3).

5.1.2 Makromischer

Die in dem vorausgegangenen Abschnitt dargestellten Mischer eignen sich nicht für die Herstellung von PCMC im Pilotmaßstab. Aus diesem Grund werden dort selektierte Mischertypen im folgenden Abschnitt vergrößert. Dabei steht der DJI wegen seiner hohen Mischleistung im Fokus. Warum der DJI Mischer eine gute Mischung hervorbringt, verdeutlicht nochmals das folgende Zitat: „*Impinging jets rank at the top for rapid mixing and can provide energy dissipation rates up to 10^5 W/ kg compared to single turbulent jets $\sim 10^4$ W/ kg, rotor stator mixers $\sim 10^2$ W/ kg and less for a stirred tank, centrifugal pump or turbulent pipe*” [Johnson, 2003].

5.1.2.1 Scale-up des Double Jet Impingement Mixers

Der DJI (mikro) nutzt Auslasskapillardurchmesser von 0,5 mm bis 1,357 mm. Beim *scale-up* wird der Durchmesser des Mixers und der Auslasskapillare zunächst auf 2,0 mm vergrößert. Der Durchmesser liegt dann im Makrobereich (> 1 mm). Die Vermischung bewegt sich damit auf der Millimeterskala, die dem Mesobereich zuzuordnen ist. Als Formulierung dient wie am Entwicklungsstart Trypsinogen-Valin (Tab. 5-H). Zur Förderung der Flüssigkeitsströme werden pharmataugliche pulsationsarme Schlauchpumpen eingesetzt. Die Protein-Carrier-Lösung wird mit einer Pumpe von Ismatec und das Nicht-Lösungsmittel mit einer Watson Marlow Pumpe gefördert (Tab. 4-B), wobei der Nicht-Lösungsmittelstrom mit einem T-Stück in zwei Ströme auf-

geteilt wird. Im DJI Mischer werden beide Nicht-Lösungsmittelströme wieder im 180° Winkel zusammengeführt. Deren Energie wird zur Mischung der Reaktanden genutzt. Durch den Einsatz von transparenten Silikonschläuchen (ID 2,0 mm, Länge nach dem Mischer 0,76 m) kann die Präzipitation visuell verfolgt werden. Um einen Anschluss an die Startexperimente (Kapitel 5.1.1.1) zu bekommen, wird im ersten Versuch der Gesamtfluss auf 15 ml/min festgelegt. Dann wird der Gesamtstrom auf 150 ml/min erhöht und getestet. Die Präzipitation findet bei 23 °C statt und jeweils 1 l PCMC-Suspension wird hergestellt. Hauptbewertungskriterien sind Verblockungstendenz, Proteinwiederfindung und Partikelgröße (Tab.5-I).

Tab. 5-H Modellformulierung 1

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
1	Tryp.gen (3,0)	Val (60)	-	4,8	0,32	IPA

Tab.5-I Ergebnisse des DJI im Vergleich als Mikro- und Makromischer, (ω) - Strömungsgeschwindigkeit, Re – Reynoldszahl, * aerodynamischer Durchmesser siehe Text, US - Ultraschall

Mischer	ID [mm]	Fluss [ml/min]	ω [m/s]	Re	Ver- blockung	PR [%]	x_{50} [μ m]	Span 90
DJI (mikro)	0,5	15	1,274	228	ja < 300 m	86	11,1	1,8
DJI (mikro)	1,357	15	0,168	83	ja < 300 ml	65	21,4	1,6
DJI (2,0 mm, PP)	2,0	15	0,080	57	ja < 300 ml	24	38,0	1,6
DJI (2,0 mm, PP)	2,0	150	0,796	569	nein	22	20,8*	2,1
DJI (2,0 mm, PP)/ US (40 kHz, 19W)	2,0	150	0,796	569	nein	67	6,5*	5,8

Nach der Vergrößerung des Durchmessers treten unter gleichen Flussbedingungen wie am Entwicklungsstart (15 ml/min) weiterhin Verblockungen auf. Dazu sinkt die Proteinbeladung auf inakzeptable 24 % und die Partikelgröße vergrößert sich auf 38 μ m. Durch die anschließende Flusserrhöhung auf 150 ml/min werden die Verstopfungen vermieden. Dennoch sind an der Auslassschlauchwand zahlreiche Co-Präzipitatablagerungen (*microfouling*) zu erkennen. Es wird vermutet, dass insbesondere die plättchenartige Kristallstruktur des Valincarriers die Ablagerungen begünstigt. *Fouling* kann z. B. durch pulsierende Strömung verhindert werden [Bode, 2006]. Eine pulsierende Strömung verändert aber ständig das Mischungsverhältnis im Mischer, was zu einer breiten Partikelgrößenverteilung führen könnte. Daher wird dieser Lösungsansatz nicht weiter verfolgt. Ein anderer Lösungsansatz ist, die

Pulsation von außen auf den Mischer und insbesondere auf den Auslassschlauch aufzubringen. Zum Beispiel können durch Ultraschall Pulsationen erzeugt werden. Daher wird in Kapitel 5.1.2.2. die Fällung in einem Ultraschallbad bzw. mit einem ultraschallunterstützten Mischer beschrieben. Ein erster Versuch im Ultraschallbad (40 kHz, 19 W) ergibt bei einem Fluss von 150 ml/min relativ kleine Partikel (6,5 µm), aber eine sehr breite Partikelgrößenverteilung (Span 90 = 5,8). Dies könnte durch Agglomerate in der Suspension verursacht sein (z. B. infolge elektrostatischer Aufladung).

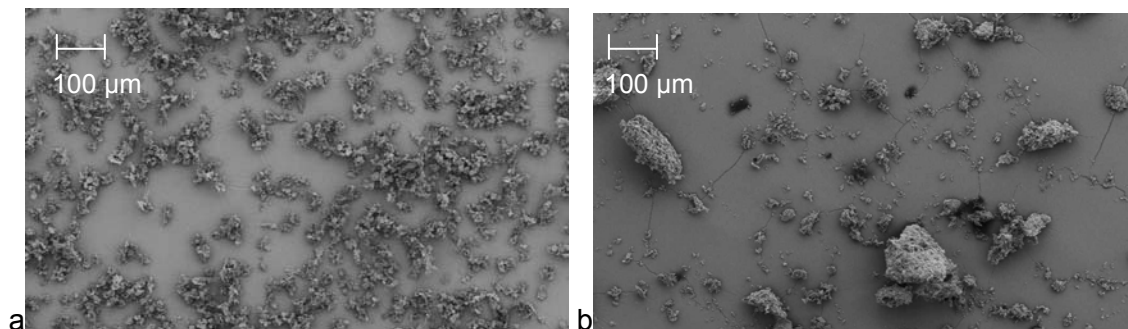


Abb. 5-H REM von PCMC mit DJI (2,0 mm, PP) bei 150 ml/min hergestellt
a – ohne Ultraschall, b – mit Ultraschall

Bei der Messung der aerodynamischen Eigenschaften werden die Agglomerate des Pulvers (siehe rasterelektronisches Bild in Abb- 5-H b) zerstört. Der MMAD ist 4,2 µm, die Feinpartikelfraktion ist mit 45,8 % sehr hoch und die ausgebrachte Pulvermenge entspricht 99,1 %. Damit liegen sehr gute Flugeigenschaften für die pulmonale Applikation bei den ultraschallproduzierten Trypsinogen-Valin Mikrokristallen vor. Bezüglich der Proteinwiederfindung zeigt die Unterstützung eines Ultraschallbades einen sehr positiven Einfluss, da die Proteinwiederfindung 67 % beträgt.

Demgegenüber ist die Proteinwiederfindung des ohne Ultraschall DJI (2,0 mm, PP) produzierten Pulvers mit 22 % trotz Flusserrhöhung auf 150 ml/min inakzeptabel niedrig. Die geometrische Partikelgröße in Suspension wird durch die zehnfache Flusserrhöhung (15 ml/min auf 150 ml/min) um 17 µm auf 21 µm verkleinert (Vergleich rasterelektronisches Bild in Abb. 5-H a). Die aerodynamischen Eigenschaften dieses Pulvers zeigen einen MMAD von 4,1 µm, eine FPF von 48,8 % und eine ausgebrachte Menge (ED) von 96,2 %. Damit weist dieses Pulver ähnlich gute aerodynamische Eigenschaften wie das mit Ultraschall hergestellte Pulver auf. Es eignet sich ebenfalls für den pulmonalen Applikationsweg.

Ein weiterer Entwicklungsweg des DJI (2,0 mm, PP) besteht in der weiteren Erhöhung der Flussgeschwindigkeit und damit der Strömungsgeschwindigkeit. Die dazuge-

hörigen Versuche sind im Abschnitt 5.1.2.3 dargelegt. Es muss geprüft werden, ob der laminare Strömungsbereich ausreichend ist oder ein turbulenter Strömungsbereich ($Re > 2300$) nötig ist. Im turbulenten Bereich führt neben der laminaren achsenparallelen Durchmischung eine Querbewegung der Teilchen zur Mischungsintensivierung, die folglich die Mischungszeit verkürzt.

An dieser Stelle werden noch makroskopische Durchmischungsversuche angeschlossen, indem die Protein-Carrier-Lösung durch methylenblaugefärbtes Wasser ersetzt wird. Bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten werden im DJI (2,0 mm, PP) 95 Teile Isopropanol und 5 Teile wässrige Methylenblaulösung gemischt. Die Beobachtungen sind in Tab. 5-J beschrieben. Ab einer Flussgeschwindigkeit von 108 ml/min wird eine vollständige Vermischung beider Phasen bereits im Mischer beobachtet.

Tab. 5-J Makroskopische Durchmischungsbeurteilung mit eingefärbter wässriger Phase

Fluss [ml/min]	ω [m/s]	Beobachtung
10	0,056	76 cm lang keine Vermischung, bis ins Auffanggefäß
72	0,377	38 cm lang keine Vermischung, am Ende des Schlauches makroskopische sichtbare Vermischung
81	0,425	5 cm lang keine Vermischung
108	0,566	von Anfang an gute Vermischung

5.1.2.2 Möglichkeit 1 - Einsatz von Ultraschall

Die Präzipitation von *protein-coated microcrystals* (PCMC) kann durch Ultraschall unterstützt werden. Es werden dazu zwei Studien durchgeführt. In der ersten Studie wird mit dem DJI (3,2 mm, PP) in einem Ultraschallbad gemischt und gefällt. Die zweite Studie soll die Vor- und Nachteile der Ultraschallfällung unter Verwendung eines ultraschallassistierten hydrodynamischen Mixers der Firma Prosonix (UVC = *Ultrasonic Vortex Crystallizer*) herausarbeiten.

Die Ultraschallkristallisation hat nach theoretischen Überlegungen einige Vorteile. Die Durchmischung ist durch rasche Diffusionsvorgänge auf kurzen Weg- und Zeitskalen bei der Implosion von Ultraschall erzeugten Kavitäten beschleunigt. Dadurch aktiviert Ultraschall die Nukleation bei primärer und sekundärer Keimbildung. Es entstehen häufig viele und sehr kleine Partikel, die ca. 5 μm groß sind. Die Mikropartikel lassen

sich aufgrund ihrer großen Oberfläche gut rekonstituieren und eignen sich ebenso für die pulmonale Applikation. Weiterhin gibt es keine Ablagerungen im Mischer und in den Auslassschläuchen und lange Prozesszeiten werden ermöglicht [Mason, 1999]. Die Ultraschallfällung kann durch viele Parameter wie z. B. die Frequenz des Ultraschallgebers, die Temperatur und die Intensität des Ultraschalls beeinflusst werden. Jeder Ultraschallgeber kann nur eine Frequenz erzeugen. Folgendes ist zu beachten: Je höher die Frequenz ist, desto höher muss die eingebrachte Energie sein, um überhaupt Kavitäten zu erzeugen. In den Versuchen werden Ultraschallgeber mit 35 kHz beim Ultraschallbad (Bandelin Sonorex) und 40 kHz beim UVC (Prosonix) eingesetzt. Die eingebrachte Energie variiert sehr stark von 8 W beim UVC bis zu 150/ 300 W im Ultraschallbad. Luche [1998] zeigte, dass die Kavitationsparameter stark von der Temperatur abhängig sind. Für Isopropanol gibt es ein Temperatur-optimum bei 16 °C, jedoch ist im Bereich von 0 °C bis 30 °C ebenfalls 70 % der optimalen Intensität zu erreichen.

Zur weiteren Entwicklung der Makromischer werden zwei weitere Modellformulierungen eingesetzt (Tab. 5-K). Zum einen wird Trypsinogen durch Trypsin aus den unter 5.1.1.2 genannten Gründen ersetzt, zum anderen wird neben DL-Valin Glycin als Träger verwendet.

Tab. 5-K Modellformulierung 2 und 3

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl ₂ (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA

Der DJI (2,0 mm, PP) wird nochmals in der weiteren Entwicklung im Durchmesser vergrößert. In den folgenden Studien wird mit einem DJI Mischer (3,2 mm, PP) und weiter erhöhten Flussraten präzipitiert. Die weitere Anpassung erfolgt, um den DJI mit einem zweiten statischen Mischer, dem Kenicsmischer, vergleichen zu können. Die kleinste Ausführung des Kenics hat einen Durchmesser von 3,4 mm. Der Vergleich wird in den Studien des zweiten Entwicklungsweges Abschnitt 5.1.2.3 erläutert. Im folgenden Abschnitt liegt der Fokus dagegen auf dem Einfluss von Ultraschall.

Fällungen im Ultraschallbad

Die Co-Präzipitate entstehen mit dem DJI (3,2 mm, PP) bei 23 °C in einem Ultraschallbad (Brandelin, 35 kHz, 150/ 300 W) und mit den Modellformulierungen 2 und 3. Der Auslassschlauch hat einen Durchmesser von 3,2 mm und eine definierte Länge von 1,3 m. Dadurch ergibt sich bei einem Fluss von 250 ml/min eine Verweilzeit von 2,5 s im Ultraschallbad. Es wird jeweils 1 l PCMC-Suspension hergestellt. Verblockungstendenz, Proteinbeladung, Proteinintegrität und Partikelgröße werden als Parameter bestimmt. Die Tab. 5-L fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 5-L Ergebnisse Ultraschallbad

US	Fluss [ml/min]	MPL [%]	Tryp-Gly		Tryp-Val		
			rel. Monomer [%]	x ₅₀ [µm]	MPL [%]	rel. Monomer [%]	x ₅₀ [µm]
kein US	250	10,5	78,0	18,9	9,7	78,4	32,4
US	250	10,3	75,0	20,5	10,3	77,3	3,6

Ultraschall hat bei der Formulierung mit dem schnell präzipitierenden Träger Glycin kaum einen unterstützenden Effekt. Das System verblockt weder noch mit oder ohne Ultraschall, denn die Trypsin-Glycin PCMC zeigen eine geringe Affinität zum Silikon-schlauch. Die analytischen Größen Proteinbeladung, Proteinintegrität und Partikelgröße der Pulver, die mit oder ohne Ultraschall kristallisiert werden, sind vergleichbar. Dagegen zeigt der Einsatz von Ultraschall einen Einfluss bei der Trypsin-Valin Formulierung. Ein deutlicher Vorteil besteht in der stark verringerten Kristallablagerung am Silikon-schlauch und damit einer erniedrigten Verblockungsneigung. Das Protein kann auch besser auf den Carrier geladen werden, wenn Ultraschall unterstützend zur Präzipitation genutzt wird. Durch die Kavitäten wird die Diffusion und Durchmischung beschleunigt, mehr Kristallkeime entstehen und damit steht zur Proteinstabilisierung mehr Oberfläche zur Verfügung. Auch die Partikelgröße spiegelt mit 3,6 µm statt 32,4 µm die Entstehung einer Vielzahl kleiner Kristalle wieder. Trotz Scherstress bei der Implosion der Kavitäten werden die Proteine nicht mehr als bei der klassischen *anti-solvent* Präzipitation geschädigt. Über die üblichen analytischen Diskussionspunkte hinaus soll an dieser Stelle auf die elektrostatische Aufladung der Trypsin-Valin Mikrokristalle in Suspension aufmerksam gemacht werden. Die Trypsin-Valin PCMC lassen sich äußerst schlecht über PVDF-Membranfilter filtrieren. Die Filtration ist unter anderem eine Funktion der Partikelgröße und -form. Speziell die tafelförmige Kristall-

form des Valinträgers erschwert die Filtration. Nach der Filtration trocknen die Pulver an der Luft und ein sehr harter, kompakter Filterkuchen bildet sich aus.

Testung eines ultraschallunterstützten Mischers

Der *Ultrasonic Vortex Crystallizer* (UVC) ist ein hydrodynamischer Mischer, der von einem Ultraschallgeber mit fester Frequenz von 40 kHz und einer gewählten Energie von 8 W unterstützt wird. Die Studie ist eine Teststellung bei der Firma Prosonix (Oxford, UK). Zur Förderung der zwei zu mischenden Ströme stehen eine Schlauchpumpe und eine Spritzenpumpe von der Firma Prosonix zur Verfügung. Das maximale Gesamtfördervolumen ist 147 ml/min. Die Versuche werden mit drei Flussraten 72, 127, 147 ml/min bei 23 °C mit den beiden Modellformulierungen (Tab. 5-K) und Ultraschall durchgeführt. Um den Ultraschalleinfluss zu untersuchen, wird eine Probe bei der höchsten Flussgeschwindigkeit ohne Ultraschall hergestellt. Die Ergebnisse sind in Tab.5-M zusammengefasst.

Tab. 5-M Ergebnisse UVC

US	Fluss [ml/min]	Tryp-Gly			Tryp-Val		
		MPL [%]	rel. Monomer [%]	x_{50} [μ m]	MPL [%]	rel. Monomer [%]	x_{50} [μ m]
kein US	147	10	64,8	24,6	11	66,6	24,9
US	147	10	65,4	20,2	11	65,2	22,1
US	127	11	65,4	20,3	11	64,8	21,1
US	72	14	64,8	12,4	11	65,9	14,6

1 l beider Formulierungen können ohne Verblockungen mit dem Prototyp des UVC hergestellt werden. Die gemessene Proteinbeladung (MPL) entspricht bei allen Herstellungen mindestens dem theoretischen Wert von 10 %. Die leicht erhöhte Proteinwiederfindung bei der Valinformulierung begründet sich damit, dass einige Valinmoleküle nicht auskristallisieren, was ebenfalls in einer Kristallausbeute von ca. 92 % (nicht dargestellt) sichtbar wird. Bei der Glycinformulierung wird ein Ausreißer von 14 % in der Proteinbeladung gefunden, was jedoch auf Veränderung des Mischungsverhältnisses aufgrund von Flussschwankungen zurückgeführt wird. Unabhängig davon ob Ultraschall eingesetzt wird oder nicht, wird Trypsin im UVC zu 35 % fragmentiert. Im Vergleich zur Ultraschallbadstudie sind bei beiden Formulierungen 10 % bis 14 % mehr Monomer zersetzt. Unabhängig vom Ultraschall übt der UVC offensichtlich einen größeren Stress auf die Proteine aus als der DJI (3,2 mm, PP). Feste Aggregate

werden nicht gemessen, denn nach Rekonstitution der Pulver ist die Lösung klar. Die Partikelgrößen beider Formulierungen liegen im unteren Mikrometerbereich von 12 µm bis 22 µm. Interessant ist die Beobachtung, dass unter Ultraschall mit abnehmender Flussgeschwindigkeit die Partikelgrößen kleiner werden. Die Ursache ist die doppelte Verweilzeit in der Mischkammer und damit gekoppelt die doppelte Ultraschallkontaktzeit. Dadurch können mehr Kristallkeime durch die Kavitäten entstehen oder schon entstandene Präzipitate durch die Kavitätenimplosion wieder zerbrochen werden. Abschließend bleibt zu erwähnen, dass während der Herstellung eine nicht zu unterbindende undichte Stelle zwischen Mischer und Ultraschallgeber auftrat. Wegen den eher enttäuschenden Ergebnissen werden keine weiteren Versuche zur Herstellung von *protein-coated microcrystals* mit diesem Mischer mehr durchgeführt.

5.1.2.3 Möglichkeit 2 - Erhöhung der Flussrate

Die Mischung und Präzipitation von PCMC soll mit statischen, kontinuierlichen Mischer durchgeführt werden. Zu Beginn der Entwicklung hat sich der *Double Jet Impingement* Mischer (DJI) neben dem Ventilmischer im Mikromaßstab bewährt. Jedoch zeigen Mikromischer eine hohe Verblockungstendenz, weshalb der Durchmesser des DJI Mixers und des Auslassschlauches vergrößert wird. Die Vergrößerung hat jedoch einen signifikant negativen Einfluss auf die Proteinbeladung (sinkt) und Partikelgröße der PCMC (erhöht sich), was durch eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit antagonisiert werden kann. In den folgenden Studien soll dies weiter untersucht werden. Insbesondere sollen laminarer und turbulenter Strömungsbereich verglichen werden. Der DJI und Auslassschlauch werden im Durchmesser auf 3,2 mm vergrößert, damit ein Vergleich mit dem statischen Kenicsmischer (Ø 3,4 mm) möglich ist. Ebenfalls werden in dieser Reihe wie bei den Versuchen mit den Mikromischern und den Ultraschallfällungen die Modellformulierungen 2 und überwiegend 3 verwendet (Tab. 5-N).

Tab. 5-N Modellformulierungen 2 und 3

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl ₂ (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA

Flussgeschwindigkeit laminar bis turbulent

In diesem Abschnitt wird der DJI (3,2 mm, PP) bei 23 °C mit der Modellformulierung 3 unter Variation der Flussgeschwindigkeit von 250 ml/min bis 1250 ml/min getestet. Der Auslassschlauch ist im Durchmesser 3,2 mm und die Verweilzeit darin ist auf 2,5 s festgesetzt. Zwei Schlauchpumpen fördern die beiden Medien, wobei der Nicht-Lösungsmittelstrom mit einem T-Stück geteilt und im Mischer wieder zusammen geführt wird. Die Mischung der beiden ungleichen Flüssigkeitsströme findet sowohl im laminaren als auch im turbulenten Strömungsbereich statt. Ob der Gesamtfluss dem laminaren bzw. turbulenten Bereich entspricht, basiert auf der errechneten Reynoldszahl (Re). Ist die $Re > 2300$, liegt eine turbulente Strömung vor. Nachstehend eine Beispielrechnung für den langsamsten Fluss in dieser Versuchsreihe:

Flussgeschwindigkeit: 250 ml/min = 4,166 ml/ s
 ID: d = 0,32 cm
 Flussrate: $\varpi = \dot{V} / A = 0,515 \text{ m/s}$
 Kinematische Viskosität von IPA: $\varrho = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$

$$Re = \frac{\varpi \cdot d}{\varrho} = \frac{0,515 \text{ m} \cdot \text{s} \cdot 0,0032 \text{ m}}{\text{s} \cdot 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2} = 589 \quad \text{Gl.5-4}$$

Für eine Flussgeschwindigkeit von 250 ml/min ergibt sich eine Reynoldszahl kleiner 2300. Dies entspricht einer laminaren Strömung.

Tab. 5-O Reynoldszahlen

Fluss [ml/min]	250	500	750	1000	1250
Re	589	1190	1786	2380	2976
Rohrströmung	laminar	laminar	laminar	tubulent	tubulent
Länge Auslassschlauch [m], für eine konstante Verweilzeit von 2,5 s im Schlauch	1,3	2,6	3,9	5,2	6,5

Die Beurteilung der Herstellungen basiert auf den Kriterien Verblockungsverhalten, Proteinwiederfindung, Monomergehaltsanteil des Trypsins und Partikelgröße. In keinem der Versuche verblockte der eingesetzte DJI (3,2 mm, PP). Das Flussverhalten und das Druckprofil unterliegen keinen Schwankungen über die Produktion von je 4 l PCMC-Suspension. Je turbulenter der Fluss, desto mehr Kristalle werden geerntet,

weil die Durchmischung im turbulenten Strömungsbereich durch die zusätzliche Quermischung der beiden Ströme intensiviert wird.

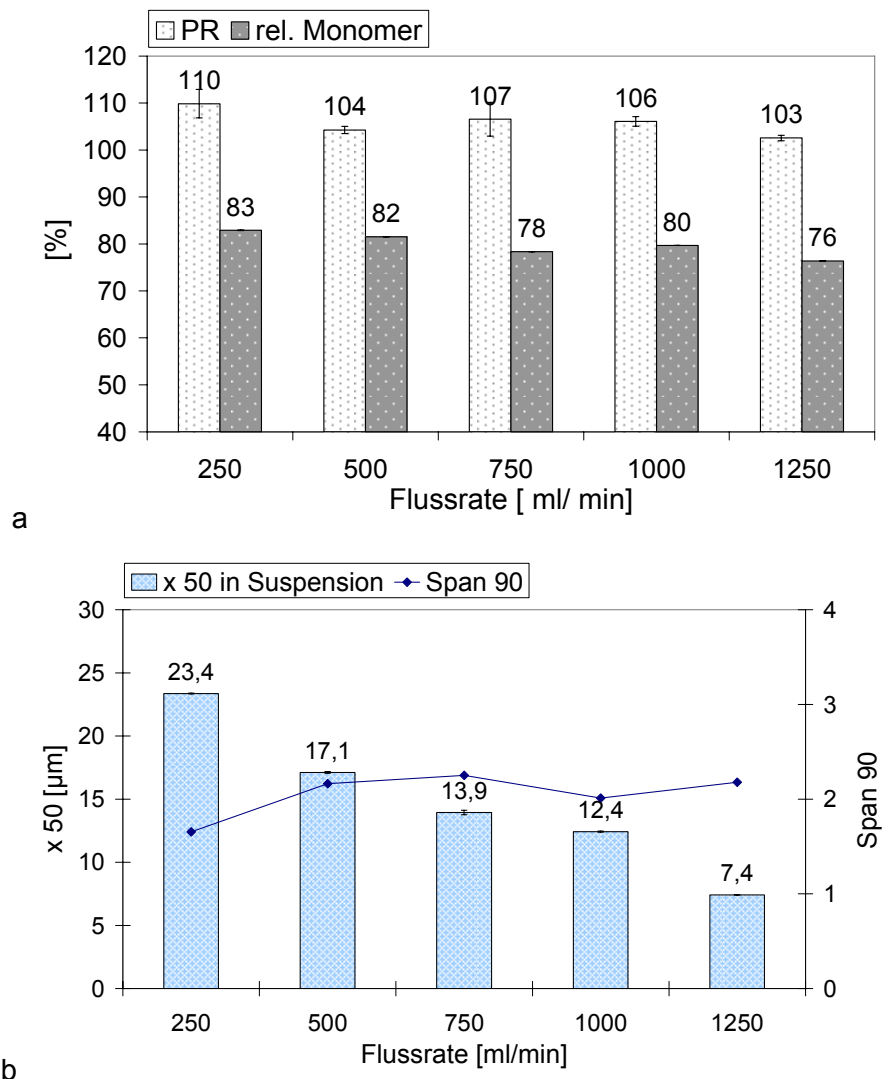


Abb. 5-I Ergebnisse a – PR und Monomergehalt, b – Partikelgröße in Suspension

Das eingesetzte Protein wird nach der Rekonstitution der erhaltenen Pulver vollständig wieder gefunden (Abb. 5-I a). Der relative Monomergehalt des Modellproteins Trypsin beträgt nach der Fällung 76 % bis 83 % analog zu den Fällungen mit dem DJI (3,2 mm, PP) im Ultraschallbad und dem Ventilmischer. Ob der Monomerverlust ein Trypsin typisches Phänomen ist oder durch die Fällung bedingt ist, muss an einem weiteren Modell überprüft werden. Die Partikelgröße in Suspension nimmt mit zunehmender Flussrate nahezu linear ab (Abb. 5-I b). Die Partikelgrößenverteilung ergibt bei allen Herstellungen einen akzeptablen Span 90 um 2.

Unter dem Rasterelektronenmikroskop sind insbesondere bei der Flussrate 250 ml/min zwei unterschiedliche Partikelmorphologien zu erkennen (Abb. 5-J a). Die kugelförm-

igen und unregelmäßig geformten Partikel könnten unterschiedlich zusammengesetzte Co-Kristalle sein. Die Aufnahme eines bei 1250 ml/min hergestellten PCMC-Pulvers (Abb. 5-J b) zeigt unregelmäßig geformte Kristalle. Die Partikelmorphologie ist wesentlich homogener als bei 250 ml/min.

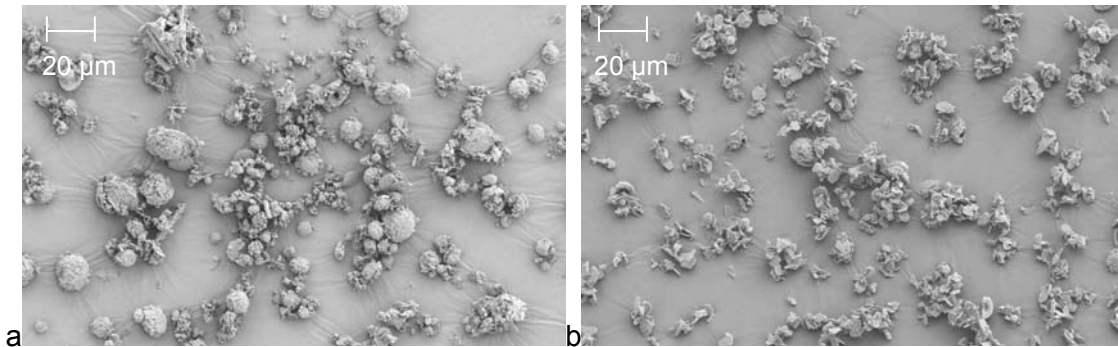


Abb. 5-J REM von Trypsin-Glycin Co-Kristallen mit DJI (3,2 mm, PP) a – bei 250 ml/min, b - bei 1250 ml/min hergestellt

Das Ergebnis dieser Testreihe zeigt, dass PCMC mit dem DJI (3,2 mm, PP) im laminaren (> 250 ml/min) und turbulenten Strömungsbereich (> 1000 ml/min) kristallisiert werden können und weitgehend nur die Partikelgröße als Parameter von der Re-Zahl beeinflusst wird.

Vergleich mit dem Kenicsmischer

Der Kooperationspartner XstalBio arbeitet mit dem statischen Kenicsmischer. In einer gemeinsamen Studie wird der DJI (3,2 mm, PP) mit dem Kenics verglichen. Drei laminare Flussbedingungen (250, 500, 750 ml/min) und drei Temperaturstufen (6; 14,5; 23 °C) werden als Faktoren in einer DoE-Matrix aufgenommen. Mit jedem Mischer wird diese DoE-Matrix bearbeitet. Die anderen Prozessparameter sind konstant. Der Durchmesser des Auslassschlauches ist 3,2 mm, die Verweilzeit der Präzipitate ist in diesem 2,5 s und Trypsin-Glycin Mikrokristalle dienen als Modell. Die Bewertung der Mischer erfolgt wie in allen Studien zuvor.

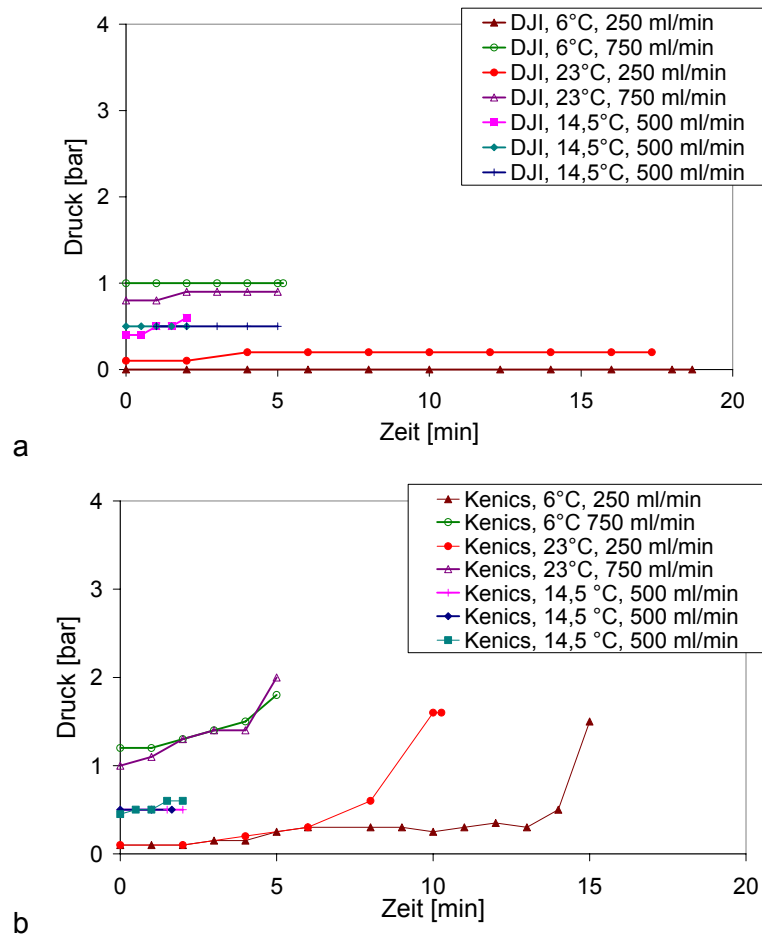


Abb. 5-K Druckprofil während der Herstellung a - DJI (3,2 mm, PP); b – Kenics

Das produzierte Volumen ist an den Eckpunkten des DoE-Designs jeweils 4 l und am *Centerpoint* dreimal ein Liter. Abb. 5-K zeigt zu Beginn der Herstellung beim DJI und Kenics je nach Flussgeschwindigkeit den gleichen Druck zwischen 0,2 bar bis 1,2 bar. Beim DJI bleibt der Druck über die gesamte Produktionszeit konstant, so dass keine Tendenz zur Verblockung erkennbar wird. Beim Kenicsmischer steigt der Druck nach ca. vier Minuten an. Dabei steigert er sich je nach Flussgeschwindigkeit schneller oder langsamer. Die Ursache für den Druckanstieg ist nach visueller Kontrolle abgelagertes Kristallinat im Mischer.

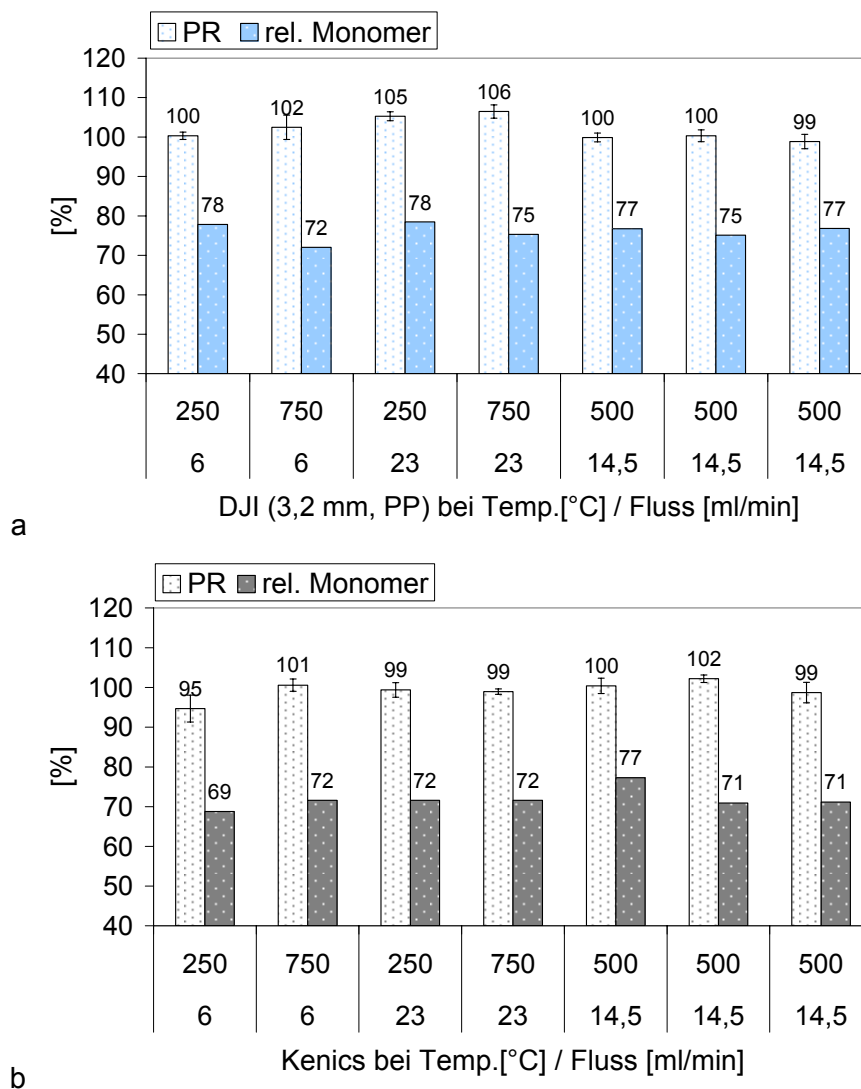


Abb. 5-L Proteinbeladung und relativer Monomergehalt a – DJI (3,2 mm, PP), b - Kenics

Die Trypsin Wiederfindung ist bei beiden Mixern im hergestellten PCMC-Pulver größer als 95 %. Auch der Monomergehalt unterscheidet sich je nach Mischer und Prozessparametrierung nicht signifikant. Es ist lediglich eine Tendenz zur stärkeren Proteinschädigung mit dem Kenics zu erkennen. Die Flussraten und die Prozess-temperatur zeigen wie in der Studie zuvor keinerlei Einfluss auf die Proteinintegrität.

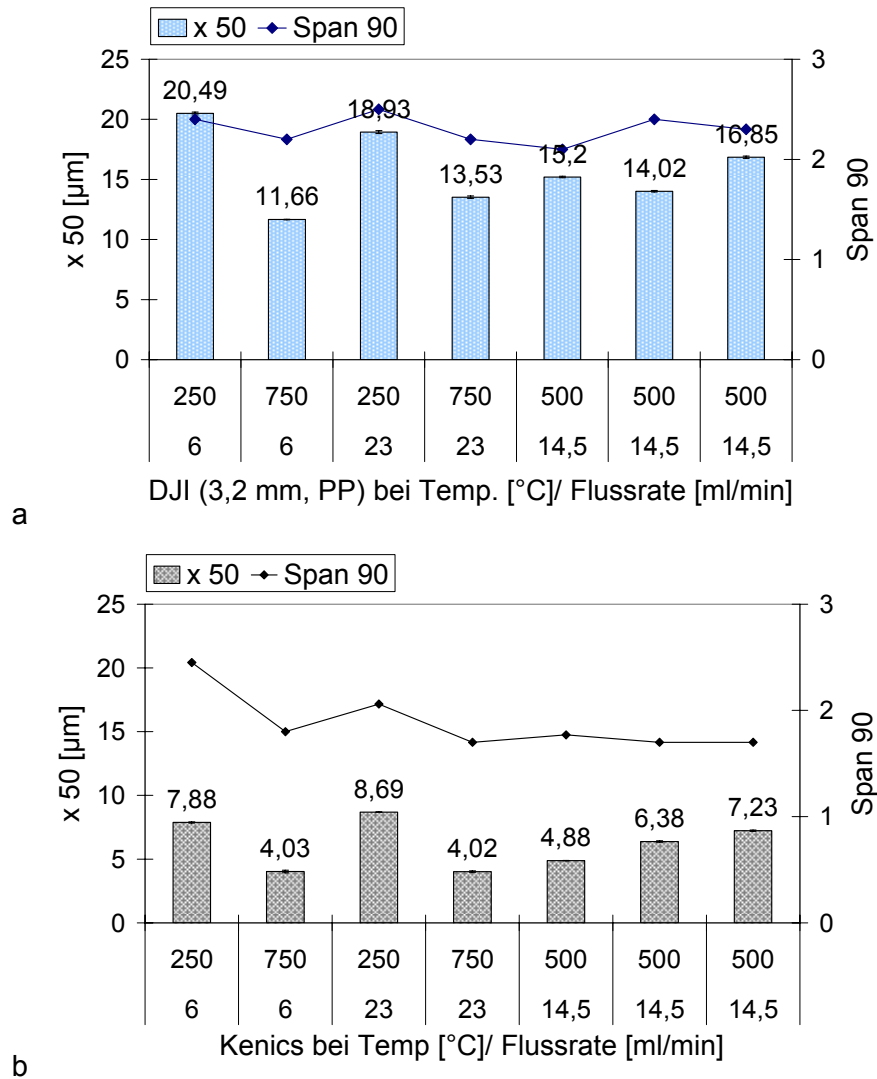


Abb. 5-M Partikelgröße in Suspension a – DJI (3,2 mm, PP), b - Kenics

Der Kenics als Stromteilungsmischer stellt jedoch eindeutig kleinere Partikel her als der DJI. Ursache ist die intensivere Durchmischung beim Kenics durch die eingebauten Mischschikanen im Vergleich zum DJI. Dadurch werden in kürzerer Zeit mehr Kristallkeime, die weniger stark wachsen, gebildet. Weiterhin zeigen die Diagramme in Abb. 5-M kleinere Partikel bei höheren Flüssen. Aus der vorherigen Versuchsreihe ist bekannt, dass der DJI ebenfalls Mikropartikel von 7 µm wie der Kenics produzieren könnte, dies allerdings nur im turbulenten Bereich.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass sich wiederum der DJI (3,2 mm, PP) als Mischer zur PCMC-Herstellung bewährt.

Der DJI aus PP hat relativ flexible Anschlüsse in Form von Silikonschläuchen. Dadurch ist eine robuste Prozessführung eher schwierig umzusetzen. Deswegen soll dieser

Prototyp aus Kunststoff durch einen Impinger aus Edelstahl auf einer modularen Plattform ersetzt werden (Abb. 5-N).

Implementierung des Mixers auf eine stabile Produktionsplattform

Es wird an einem Durchmesser von genau 3 mm festgehalten. Der Mixer ist fest auf der Plattform eingespannt. Sensoren für Druck und Temperatur oder Wärmeaustauscher können bei Bedarf eingebaut werden. Diese Untersuchung soll zeigen, dass der DJI (3,0 mm, V4A) den DJI aus Kunststoff ersetzen kann. Mit jedem Mixer werden je drei Produktionen bei 500 ml/min, 14,5 °C und einer Verweilzeit von 2,5 s im Auslassschlauch sowie einem Durchmesser von 3,2 mm durchgeführt. Trypsin-Glycin Mikrokristalle dienen als Modell.

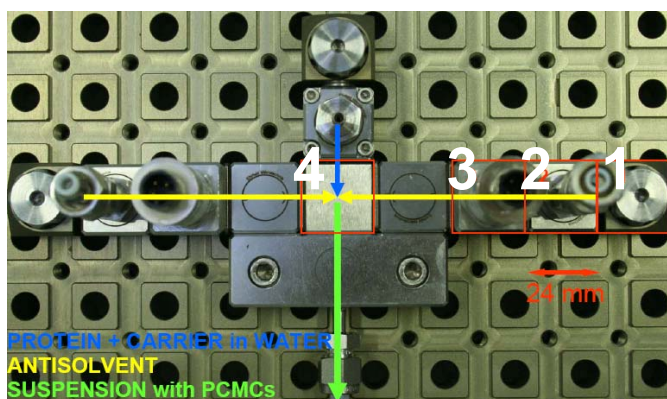


Abb. 5-N DJI (3,0 mm, V4A) auf modularer Plattform: 1 – Spannmodul, 2 – Direkteinlass, 3 – Drucksensor, 4 – DJI

Tab. 5-P Ergebnisse sind Mittelwerte drei separater Herstellungen

Mischer	Ver- blockung	SR [%]	PR [%]	rel. Monomer [%]	x ₅₀ [µm]	Span 90
DJI (3,2 mm, PP)	nein	80 ± 3	100 ± 1	76,3 ± 1,2	15,4 ± 1,4	2,3
DJI (3,0 mm, V4A)	nein	92 ± 3	102 ± 3	82,8 ± 5,3	12,4 ± 1,2	1,9

Verblockungen sind bei keiner Produktion aufgetreten. Die Kristallausbeute (SR) ist beim Edelstahl-DJI wesentlich höher. Dies könnte auf eine bessere Durchmischung, eine robustere Prozessführung und eine geringe Oberflächenadsorption am Edelstahl zurückzuführen sein. Ferner sind die Partikelgrößen nach Produktion im Edelstahl-DJI etwas kleiner. Ansonsten unterscheiden sich die Ergebnisse der Proteinanalytik nur geringfügig. Der Monomergehalt von Trypsin ist bei den Edelstahlproduktionen tenden-

ziell erhöht, aber die Werte der drei separaten Herstellungen schwanken mit 5,3 % recht stark um den Mittelwert.

Zusammenfassend betrachtend, können mit der Edelstahlvariante des DJI Mischers PCMC präzipitiert werden. Gleichzeitig ist eine robuste Medienzuführung und Prozesssteuerung möglich. Die pulsationsfreie Zuführung der Medien ist ein wichtiges Kriterium, um im Mischer stets das gleiche Mischungsverhältnis und damit die gleiche Übersättigung vorliegen zu haben. Ansonsten entsteht ein inhomogenes Produkt. Daneben muss die Pumpe gegen Druckkräfte im System arbeiten können, ohne dabei das Fördervolumen zu reduzieren. Die eingesetzten Schlauchpumpen arbeiten immer wieder nicht hinreichend zuverlässig und pulsieren trotz der 12 Rollen im Pumpenkopf, weshalb nach alternativen Hochdruckpumpen, die hohe Volumenströme realisieren können, gesucht wurde. Das Ergebnis ist die Anschaffung von Mikrozahnringspumpen von der Firma Hydraulik Nord Parchim. Mikrozahnringspumpen sind Verdrängungspumpen mit einem außenverzahnten Innenrotor und einem leicht versetzten innenverzahnten Außenrotor, die bei Rotation auf der Saugseite Förderkammern entstehen lassen und auf der Druckseite diese wieder verkleinern. Zwischen dem nierenförmigen Einlass und Auslass wird somit pulsationsarm, nahezu totvolumenfrei und scherarm das Medium gefördert.

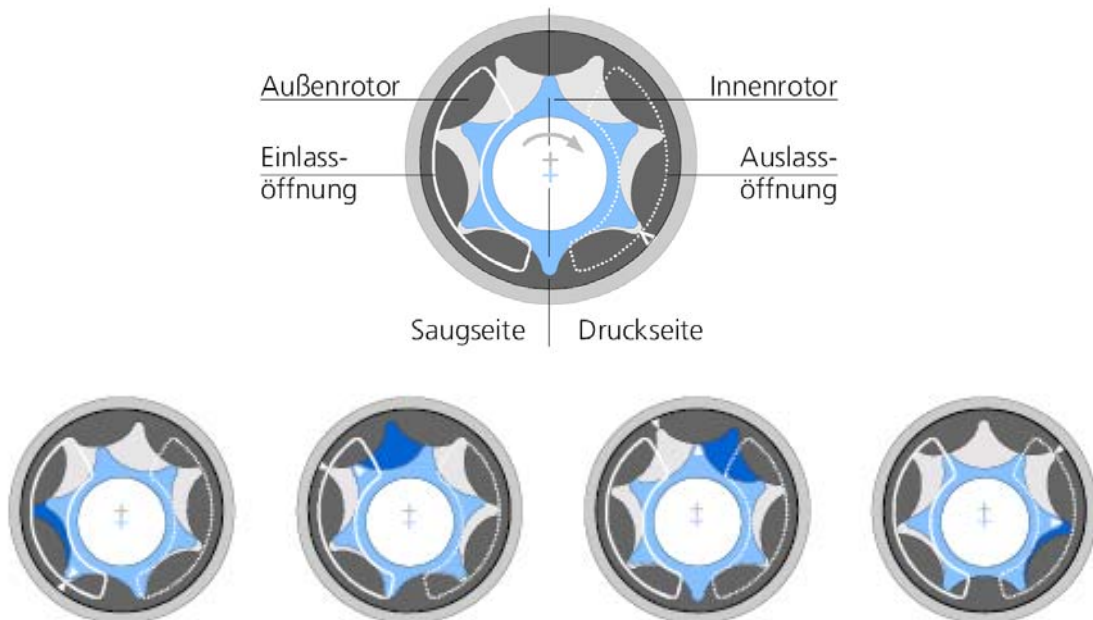


Abb. 5-O Mikrozahnringspumpe von der Firma HNP [Website: hnp-mikrosysteme]

5.1.2.4 Variationsmöglichkeiten des Double Jet Impingement Mischers

Das effiziente und intensive Mischen ist eine Grundvoraussetzung für eine homogene Primärkristallisation der PCMC. Beeinflusst wird das Mischen durch verschiedene Faktoren. Zur PCMC-Herstellung sollen Mischzeit und damit Mischlänge kurz ein. Das Verhältnis der zu mischenden Ströme ist mit 95 : 5 festgelegt. Der gewählte Durchmesser des Mischers und des Auslassschlauches ist 3 mm. Variiert werden können die Strömungsgeschwindigkeit zwischen dem laminaren und turbulenten Bereich. Die Zahl und Platzierung der Mischereinflüsse und des Auslasses kann mit einer Verjüngung ausgestattet werden, um zusätzlich Turbulenzen einzubauen. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden Mischeroptimierungen simuliert und nasschemisch getestet. Einige Ergebnisse zeigen bei der Grundoperation des Mischens eine Verbesserung, weshalb dieses auf den Präzipitationsschritt übertragen werden sollte. Der folgende Abschnitt stellt kurz einige Ergebnisse der *Computational Fluid Dynamics* (CFD) Simulationen und der nasschemischen Reaktionen (Villermaux-Dushman Reaktion) vor. Im Anschluss folgen die Ergebnisse der PCMC-Präzipitationen. Simulationen und Berechnungen werden vom Programm *Fluent* kalkuliert. Dort werden alle relevanten Informationen über Randbedingungen eingegeben. Die Ergebnisse werden in Bildern mit Farbskalen visualisiert. In den folgenden Abbildungen gilt deshalb:

- Farbe grün = optimale Durchmischung
- Farbe rot = noch zu viel Wasser
- Farbe blau = noch zu viel Nicht-Lösungsmittel
- Farbe schwarz = Wassergehalt im Gemisch < 4,7 % oder > 5,3 %

Verjüngter Auslass bei laminaren Strömungen

Durch eine Verjüngung des Mischerauslasses werden beide zu mischenden Ströme daran gehindert, laminar nebeneinander zu strömen, indem sie an der Kante der Verjüngung turbulent vermischt werden. Eine Mischungsverbesserung konnte chemisch mit der sensitiven Villermaux-Dushman Reaktion nicht eindeutig bewiesen werden [Baum, 2008], obwohl die Simulationen dies ergab. Somit ist auch keine deutliche Verbesserung bei der Präzipitation zu erwarten. Darüber hinaus kann eine Verjüngung bei einer Fällungsreaktion verblocken.

Weitere Aufteilung der Lösungsmittelströme

Durch die Aufteilung der 95 Teile des Nicht-Lösungsmittelvolumenstrom in vier Ströme wird die Geschwindigkeit dieser reduziert, wodurch im Mischungspunkt der wässrige

Protein-Carrier-Strom nicht mehr so deutlich nach außen an die Wände gedrückt wird [Baum, 2008]. Für die Aufteilung gibt es 2 verschiedene Varianten. Zum einen können zwei DJI Mischer nacheinander einen Doppelkreuz Mischer ergeben. Im ersten Mischpunkt trifft die Hälfte des Lösungsmittels auf die wässrige Protein-Carrier-Lösung, wodurch sich die veränderten Volumenverhältnisse besser vermischen und im kurz darauf folgenden zweiten Mischpunkt diese vorgemischte Lösung sandwichartig durch den Rest des Nicht-Lösungsmittel turbulent vermischt wird. Dabei ist zu beachten, dass die Abstände zwischen dem ersten und zweiten Mischpunkt nicht zu groß sind. Jedoch bringt die Übertragung auf die PCMC-Fällung keine Vorteile.

In der zweiten Variante sind die Einlässe der 4 Nicht-Lösungsmittelströme (jeweils um 90° versetzt) auf einer Ebene und hinzu kommt axial der Protein-Carrier-Strom. Dieser Mischer bekommt den Namen Quadruple Jet Impingement Mischer = QJI (3,0 mm, V4A). Die Simulation zeigt, dass im Mischpunkt ein „Sandwich effekt“ entsteht, indem die Proteinlösung von allen Seiten vom Nicht-Lösungsmittel eingeschlossen wird. Der „Sandwich effekt“ wird besonders deutlich, wenn man sich die Querschnitte, die in Abb. 5-P mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet sind, nochmals gekippt anschaut (Abb. 5-Q). Die rot eingefärbten Bereiche entsprechen der Grenzschicht zur Protein-Carrier-Lösung, die im DJI außen und beim QJI innen fließt.

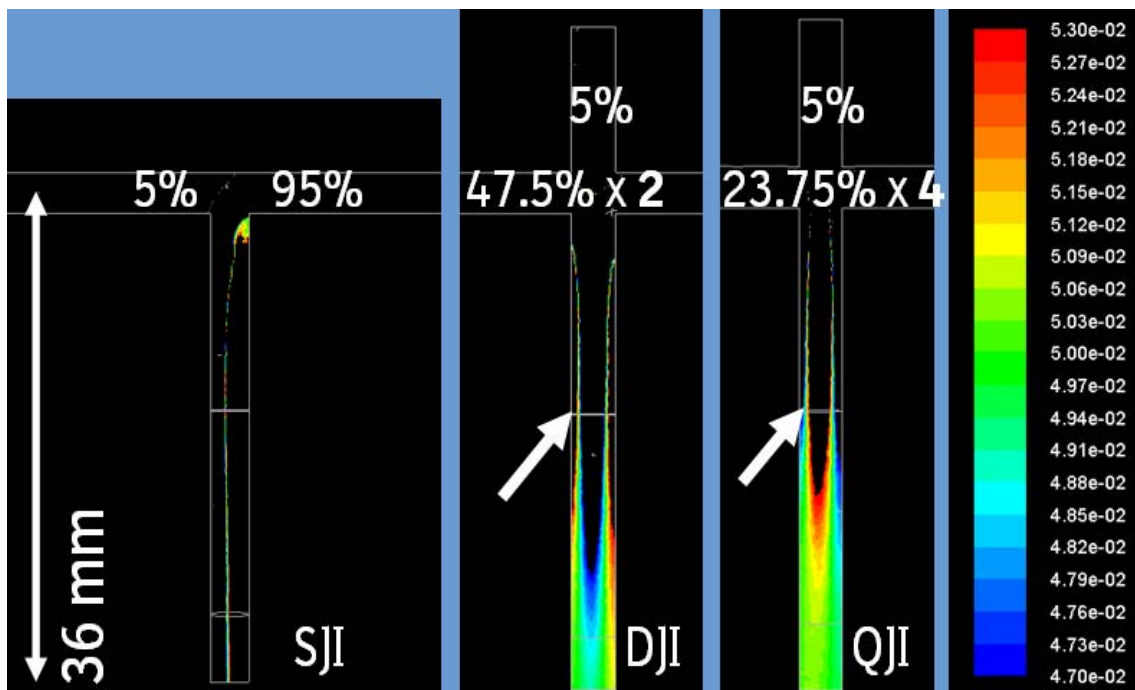


Abb. 5-P Simulationen bei 750 ml/min von SJI, DJI, QJI (3,0 mm V4A)

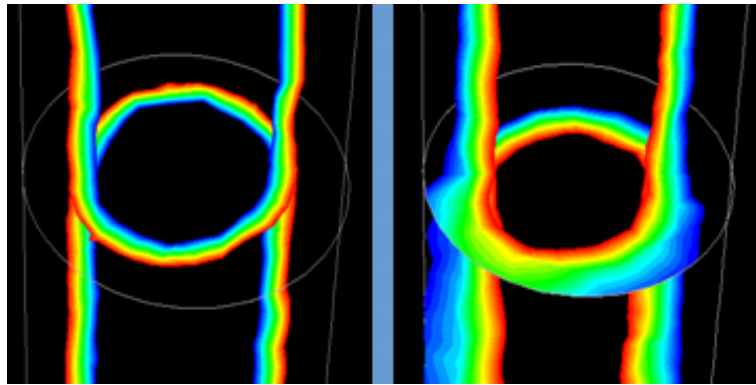


Abb. 5-Q Durchmischungsdarstellung im gekippten Ausschnitt (Pfeil in Abb. 5-P), links – DJI, rechts – QJI mit Sandwicheffekt

Die Simulationen zeigen nach 36 mm an den Ausgängen der Mischer eine Mischungsverbesserung vom SJI über den DJI hin zum QJI (Abb. 5-P visualisiert an den Ausgängen durch ein einheitliches grün). Ebenfalls beweist die sehr empfindliche chemische Nachweisreaktion eine Mischungsverbesserung in der Reihenfolge SJI < DJI ≤ QJI. Ziel mehrerer Versuchsreihen ist es, die Simulationsergebnisse auf die PCMC-Herstellung zu übertragen. Trypsin-Valin und Trypsin-Glycin dienen als Modelle (Tab. 5-N). Die Fällungen werden bei Flussraten von 500 ml/min bis 2000 ml/min, bei 23 °C und mit allen drei Massenimpulsmischern (SJI, DJI, QJI) durchgeführt. Der Durchmesser des Auslasses beträgt jeweils 3,0 mm. Alle Mischer werden auf einer Plattform eingebaut. Jeweils 4 l PCMC-Suspension werden kristallisiert. Zur Förderung der beiden Flüssigkeiten stehen zwei Mikrozahnringspumpen für das Nicht-Lösungsmittel und eine kleine Mikrozahnringspumpe für die Protein-Carrier-Lösung zu Verfügung (Tab. 4-B). Während der Herstellung werden *inline* Druck und Massenfluss aufgezeichnet und wenn möglich wird *offline* die Trübung aufgenommen. Es werden geometrische Partikelgrößen in Suspension, Kristallausbeute, Proteinbeladung und Bindungsaffinitäten mit der Sprühtrocknung, Sedimentation und Zentrifugation (siehe Kapitel 4.2.1.5 und 4.2.1.6) bestimmt. In Abb. 5-R sind Partikelgrößen und die Beladungsraten nach Zentrifugation (vergleichende Aussage über die Proteinbindung) bei einem laminaren und turbulenten Fluss dargestellt.

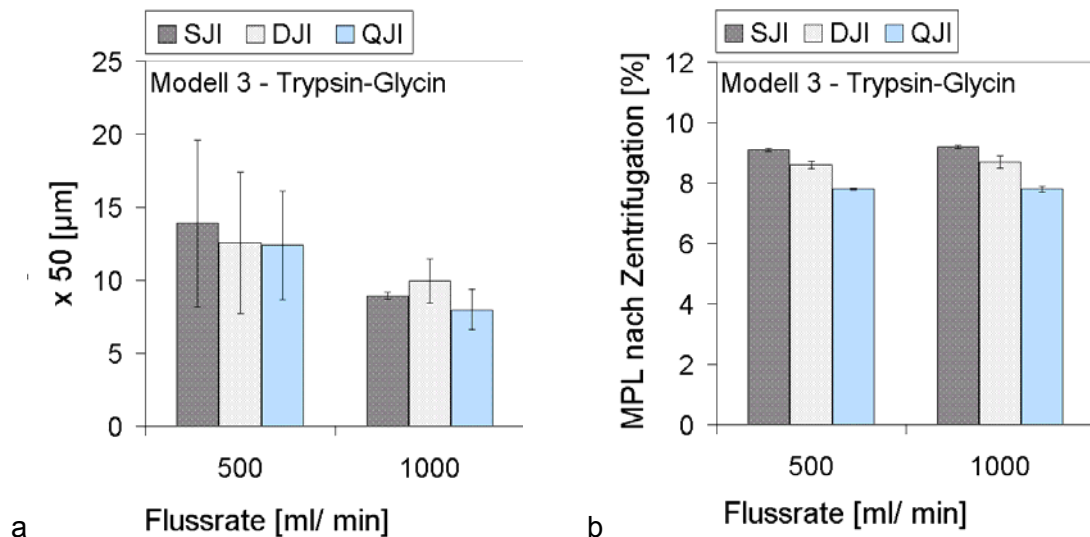


Abb. 5-R Trypsin-Glycin Mikrokristalle a – Partikelgrößen mit Standardabweichung mehrerer Herstellungen, b – Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier durch Bestimmung der Proteinbeladung nach Zentrifugation, Standardabweichung der Analytik

Die Trypsin beladenen Glycin Mikrokristalle haben eine Partikelgröße von 9 μm bis 13 μm (Abb. 5-R a). Der Mischer hat eher einen geringen Einfluss. Durch Flusssteigerung werden die Partikel kleiner, bedingt durch eine schnellere Durchmischung. Dies gilt nur bis zum Übergang in den turbulenten Bereich, bei turbulentem Fluss von 2000 ml/min ist keine weitere Verkleinerung der Partikelgröße gegenüber 1000 ml/min zu messen (nicht dargestellt). Auffällig sind bei 500 ml/min die großen Standardabweichungen, die sich reproduzieren lassen. Der Grund dafür sind nadel-förmigen Kristalle, die typisch für die β-Modifikation des Glycins sind. Im turbulenten Strömungsbereich entsteht ebenfalls die β-Modifikation, jedoch wachsen die Kristalle nicht zu Nadeln an. Sie können durch vorherrschende Turbulenzen wieder zerbrochen werden, oder sie werden vermutlich erst gar nicht gebildet, weil im turbulenten Strömungsbereich eine intensivere und schnellere Durchmischung (Längs- und Querdiffusion) mehr Kristallkeime bildet.

In Abb. 5-R b ist die Proteinbeladung (MPL) nach Zentrifugation der Suspension dargestellt. Sie gibt eine Aussage über die Bindung zwischen Protein und Carrier. Die theoretische Beladungsrate ist maximal 10 %. Beim SJI ist die gemessene Beladung 9 %, d. h. es sind 10 % des Proteins nicht mehr auf den Glycinträgern. Beim QJI sind sogar 20 % der Proteine nach der Zentrifugation der Mikrokristalle verloren gegangen. Die Bindung zwischen dem Modell Trypsin und Glycin ist demnach nur mittelmäßig stark. Bei den Kosten von Proteinanzneimittel wäre jedoch ein Verlust von 20 % bei der Formulierung inakzeptabel. Ob es zwischen den Mixern bezüglich der Protein-

bindung einen Unterschied gibt, kann erst bei einer größeren Datenbasis zu einer aussagekräftigen Schlussfolgerung führen.

Bei der Modellformulierung Trypsin-Valin kann die Trübungszunahme der gemischten Ströme durch die Kristallkeimbildung bestimmt werden, denn DL-Valin ist gegenüber Glycin eine hydrophobe, langsam kristallisierende Aminosäure.

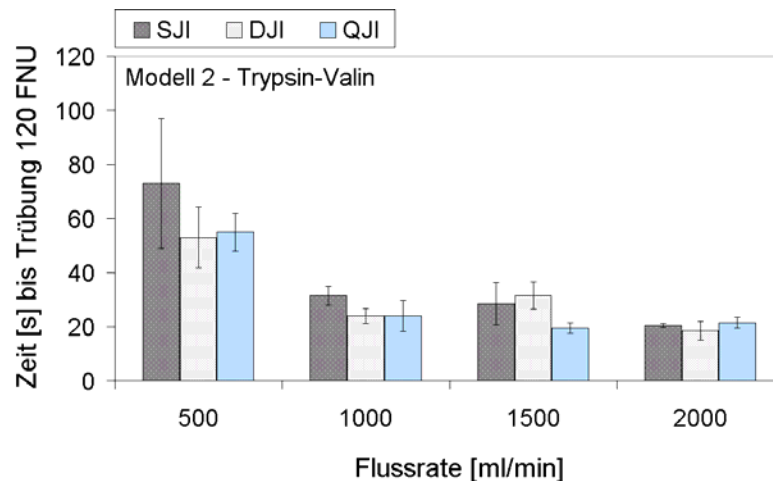


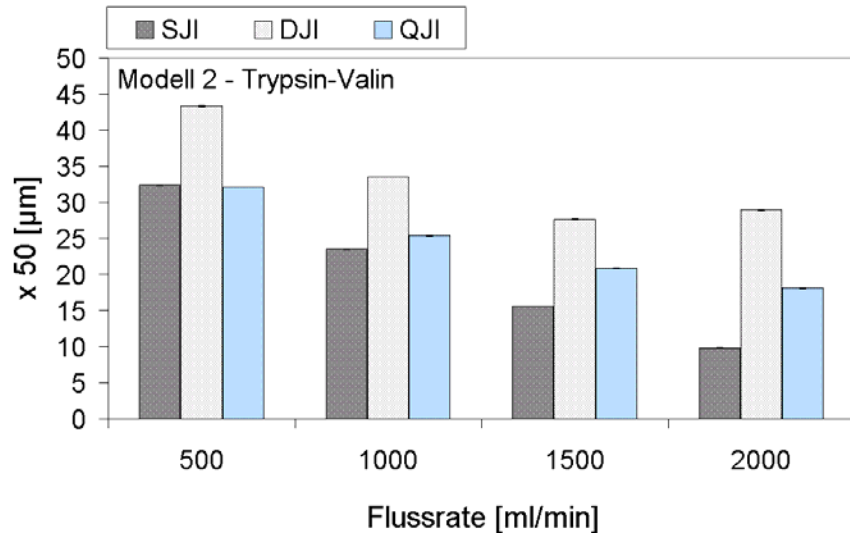
Abb. 5-S Zeit bis zur Trübung von 120 FNU bedingt durch die Bildung von Trypsin-Valin Mikrokrystallen

In Abb. 5-S ist die Zeit separat aufgefangener Proben bis zur Erreichung eines Trübungswertes von 120 FNU in Abhängigkeit von der Flussrate und den Impingementmischern dargestellt. Im laminaren Bereich ist die Kristallkeimbildung langsamer als im turbulenten Strömungsbereich (> 1000 ml/min).

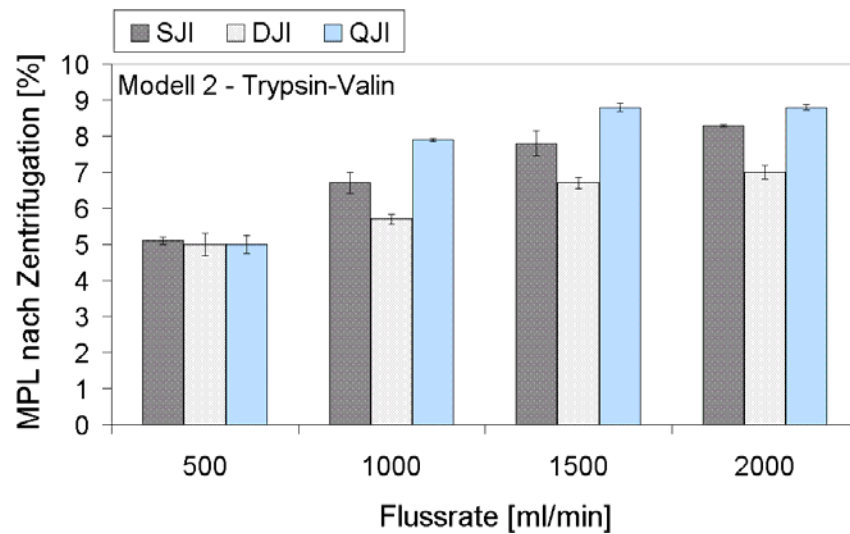
Obwohl beim SJI die Keimbildung im laminaren Bereich im Vergleich zu den anderen Mixern länger dauert, zeigt sich im turbulenten Bereich kein Unterschied mehr zwischen den Mixern (Abb. 5-S).

Die Partikelgrößenanalysen spiegeln zum Teil die Ergebnisse der Kristallkeimbildung wieder. Im laminaren Strömungsbereich sind die Partikel mit 34 µm bis 44 µm größer als im turbulenten Strömungsbereich mit 10 µm bis 34 µm (Abb. 5-T a). Durch Strömungserhöhung werden im turbulenten Bereich die Trypsin-Valin Mikropartikel kleiner. Jedoch unterscheiden sich dabei die Mischer. Die Partikelgrößenabnahme wird besonders beim SJI und weniger beim QJI oder DJI deutlich. Schlussfolgernd demonstrieren der QJI und der DJI schon bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten eine optimale Durchmischung. Unabhängig von der Flussrate werden die größten Partikel mit dem DJI hergestellt. Bei niedrigen Flüssen resultieren beim SJI und QJI vergleichbare Partikelgrößen, jedoch im turbulenten Bereich produziert der SJI die kleinsten Partikel. Vermutlich hat die Mischungsweise der Protein-Carrier-Lösung doch

einen Einfluss auf die Partikelbildung. Beim QJI wird die Protein-Carrier-Lösung sandwichartig eingefangen und führt zu kleineren Partikeln. Beim DJI wird die Protein-Carrier-Lösung an die Außenwände gedrückt. Dies initiiert vermutlich die Kristallkeimbildung. Dies zeigt sich, dass die Keime eher wachsen als dass sich neue Kristalle bilden.



a



b

Abb. 5-T Trypsin-Valin Mikrokristalle a – Partikelgrößen, b – Bindungsstärke zwischen Protein und Carrier durch Bestimmung der Proteinbeladung nach Zentrifugation

Ebenfalls zeigt die Proteinbeladung nach Zentrifugation der Suspensionen deutliche Unterschiede (Abb. 5-T b). Eine gute Proteinbeladung nach Zentrifugation bedeutet eine gute Proteinbindung auf den Trägern. Im laminaren Bereich ist die Proteinbeladung bei allen Mischern wesentlich schlechter als im turbulenten Strömungsbereich. Wiederum zeigt insbesondere der SJI bei der Erhöhung der Flussgeschwindigkeit im turbulenten Bereich eine Erhöhung in der Proteinbeladung. Beim QJI ist dieser Effekt

weniger deutlich ausgeprägt, was wiederum auf die verbesserte sandwichartige Durchmischung bei niedrigen Flussraten zurückzuführen ist. Der DJI zeigt im turbulenten Bereich eine schlechtere Proteinbeladung und damit Proteinbindung als die anderen Massenflussmischer. Scheinbar gibt es einen Zusammenhang zwischen den Partikelgrößen und der Proteinbindung. Je größer die Valincarrier, desto schlechter ist die Proteinbindung.

Insgesamt betrachtet ist die Trypsinbindung auf dem Valincarrier mittelmäßig gut, denn selbst im turbulenten Strömungsbereich gehen mindestens 10 % des Trypsins verloren. Bei laminar hergestellten Co-Präzipitaten sind 50 % der Trypsins nicht oder nur sehr schwach adhäsiv gebunden.

Zusammenfassend betrachtend kann im laminaren Strömungsbereich die simulierte und nasschemisch gezeigte Mischungsverbesserung ($SJI < DJI < QJI$) nur teilweise bestätigt werden. Den robustesten Auftritt über den gesamten Strömungsbereich zeigt unter Betrachtung der Präzipitationskinetik und der Partikelgröße der QJI.

5.1.3 Mikro- und Makromischer im Vergleich

Während der Entwicklung des Misch-/ Präzipitierschrittes zeigten sich der DJI (3,0 mm und 3,2 mm in der PP- wie in der Edelstahlausführung), der Kenics und der Ventilmischer (VAM) mehr oder weniger zur PCMC-Herstellung geeignet. In einer weiteren Versuchsreihe sollen alle Mischer mit einer antikörperhaltigen Modellformulierung getestet werden (Tab. 5-Q). Erneut werden Verblockungstendenz, Kristallausbeute, Proteinwiederfindung, Proteinintegrität und Partikelgröße über die Prozesszeit als Beurteilungskriterium herangezogen. Dazu wird bei XstalBio ein Teil der Studie mit den Mixern DJI (3,2 mm, PP) und Kenics und bei Boehringer Ingelheim ein weiterer Teil der Studie mit den Mixern DJI (3,0 mm, V4A) und einem Ventilmischer durchgeführt.

Die Mischung beider Ströme mit dem Mischungsverhältnis 95 : 5 findet mit den Makromixern (DJIs und Kenics) bei einer Flussrate von 1000 ml/min, mit dem Mikromischer (Ventilmischer) bei 500 ml/min und bei 23 °C statt. Es werden jeweils 5 l PCMC-Suspension hergestellt, die in 10 Aliquots gesammelt, über PVDF-Membranfilter filtriert, an der Luft getrocknet und dann analysiert werden. In Abb. 5-U sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung der 10 Aliquots angegeben.

Tab. 5-Q Modellformulierung 5

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
5	IgG I (6,1)	Gly (80)	Citrat (5,9) NaCl (6,4) Phosphat (1,0) KCl (0,1)	6,2	0,52	2M1P

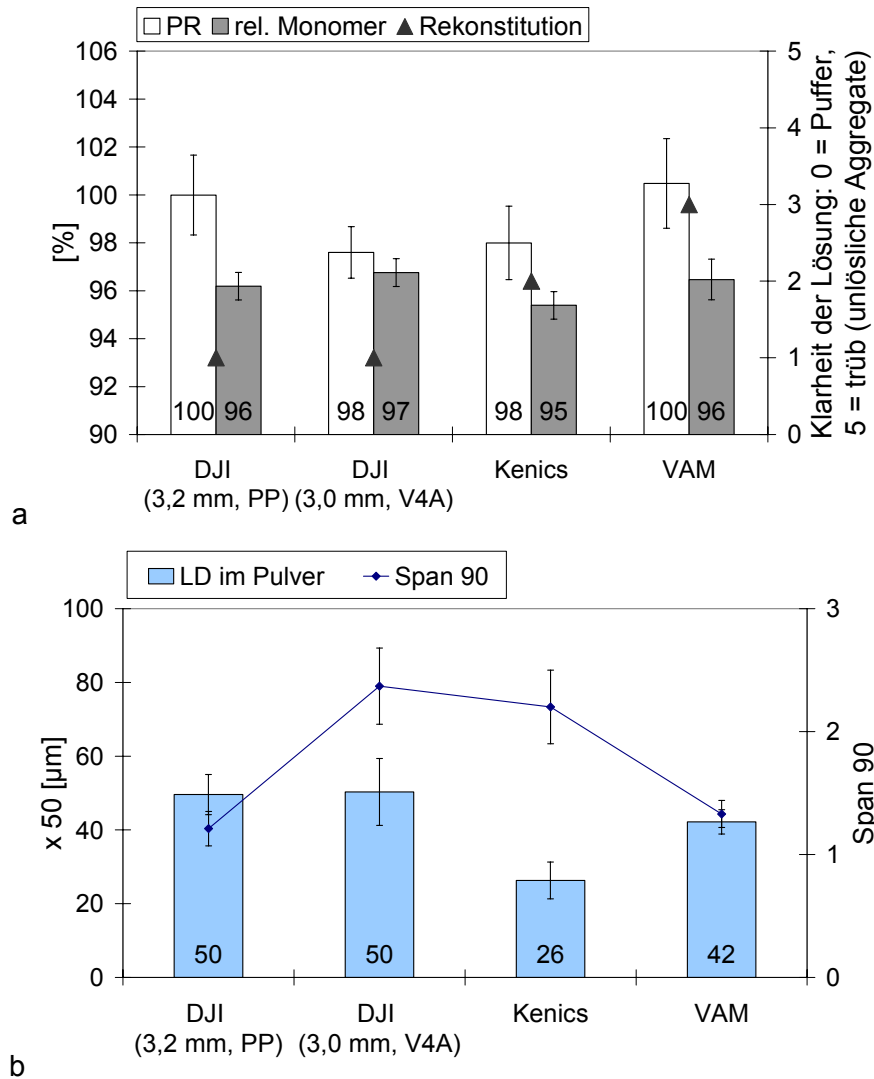


Abb. 5-U a – Proteinanalytik, b –Partikelgröße (im Pulver) von IgG1-Glycin Mikrokristallen, Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Aliquots der jeweiligen Herstellung

Während der Herstellung zeigt kein Mischer eine Verblockung, obwohl der schnell präzipitierende Träger Glycin eingesetzt wird. Auf der anderen Seite ist die Präzipitation bei den Makromischern nach 5 min beendet. Die Gründe für die kurze

Prozesszeit sind zum einen die gewählte Flussrate von 1000 ml/min und zum anderen die limitierte Verbrauchsmenge an Antikörpern. Der höchste Druck von 1 bar wird beim Kenics beobachtet. Mit dem Kenics und dem Ventilmischer ist die Ausbeute an IgG I-Glycin Mikrokristallen höher als mit beiden DJIs, was auf eine intensive und schnelle Durchmischung und somit Keimbildung zurückgeführt wird. Dennoch bewirken der Kenics und der Ventilmischer durch die zahlreichen Stromteilungen der Protein-Carrier-Lösung eine höhere Stresseinwirkung auf die Proteine. Der erhöhte Stress ist erkennbar am Anteil nichtlöslicher Aggregate (Abb. 5-U a - Rekonstitution). Dabei entspricht auf einer Skala von 0 – 5 „0“ einer klaren Lösung nach Rekonstitution des PCMC-Pulvers und „5“ einer sehr trüben Lösung mit vielen sichtbaren Aggregaten. Beiden Studienbearbeitern stand ein Satz mit 5 Trübungsreferenzen zur Verfügung. Diese Skala wird in weiteren Studien durch eine Trübungsmessung abgelöst. Beide DJIs führen kaum zur Bildung fester Aggregate. Bei den löslichen Aggregaten wird nur ein geringer Unterschied zwischen den Mischern festgestellt, wobei der DJI (3,0 mm, V4A) zum höchsten Anteil an Monomeren und der Kenics zum geringsten führt. Jedoch sind die Unterschiede (Abb. 5-U a) im Monomergehalt unter Berücksichtigung der Standardabweichung nur sehr gering. Der Mittelwert des Monomergehaltes wird bei diesem Modellantikörper durch die *anti-solvent* Präzipitation um 3 % bis 5 % reduziert. Es entstehen Aggregate und Fragmente. Dieser Monomerverlust muss durch weitere Formulierungsentwicklung noch reduziert werden.

Die Proteinwiederfindung ist mit 98 % bis 100 % für alle Mischer sehr hoch. Die Partikelgrößenanalyse der Pulver (Abb. 5-U b) ergibt, dass mit dem Kenics die kleinsten Partikel hergestellt werden (26 µm). Dies ist ebenfalls im Vergleich zu den anderen Mischern (42 µm bis 50 µm) ein Indiz für eine schnellere Mischung und damit Kristallkeimbildung im Kenics.

Mit dem Double Jet Impingement Mischer lassen sich offensichtlich Antikörper am schonendsten verarbeiten. Deshalb wird dieser für weitere Versuche ausgesucht und als Mischer der Wahl festgelegt.

5.1.4 Produktion von großvolumigen Suspensionsmengen

Ein Ziel der Prozessentwicklung ist, 50 l bis 100 l Suspension mit einem Feststoffgehalt von ca. 0,5 % (v/v) herzustellen. Der *scale-up* erfolgte in zwei Schritten.

5.1.4.1 PCMC-Suspension - 35 Liter

Trypsin-Glycin Mikrokristalle (Tab. 5-R Modellformulierung 3) werden mit Hilfe des DJI (3,0 mm, V4A) bei 23 °C und einer Strömungsgeschwindigkeit von 1000 ml/min produziert. Zwei Schlauchpumpen fördern die Komponenten. Während der Präzipitation werden zwei kleine Druckspitzen von 1 bar gemessen. Diese können durch abgelagertes Präzipitat im Rohrreaktor hervorgerufen werden. Das System drückt durch den Druckaufbau abgelagerte Kristalle heraus und stellt somit kontinuierlich PCMC-Suspension her. Die mittlere Partikelgröße in Suspension sinkt anfänglich von 18,5 µm auf 12,1 µm, bis sich ab 20 l Produktionsvolumen ein Plateau einstellt und die Partikelgröße konstant bleibt.

Tab. 5-R Modellformulierung 3 und 4

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA

5.1.4.2 PCMC-Suspension - 80 Liter

Für zwei weitere Langzeitproduktionen von 50 l und 80 l wird der QJI (3,0 mm, V4A) als Impingement Jet Mischer mit „Sandwich effekt“ eingesetzt. Die Suspensionen werden für die Entwicklung des nächsten Prozessschrittes produziert, weshalb Albumin-Glycin Mikrokristalle (Modellformulierung 4, Tab. 5-R) hergestellt werden. Der Mischer wird auf der Plattform eingespannt. Die beiden zu mischenden Komponenten werden mit einer Flussrate von 500 ml/min und mit Hilfe von Mikrozahnringspumpen zugeführt. Die Fällung erfolgt bei 23 °C.

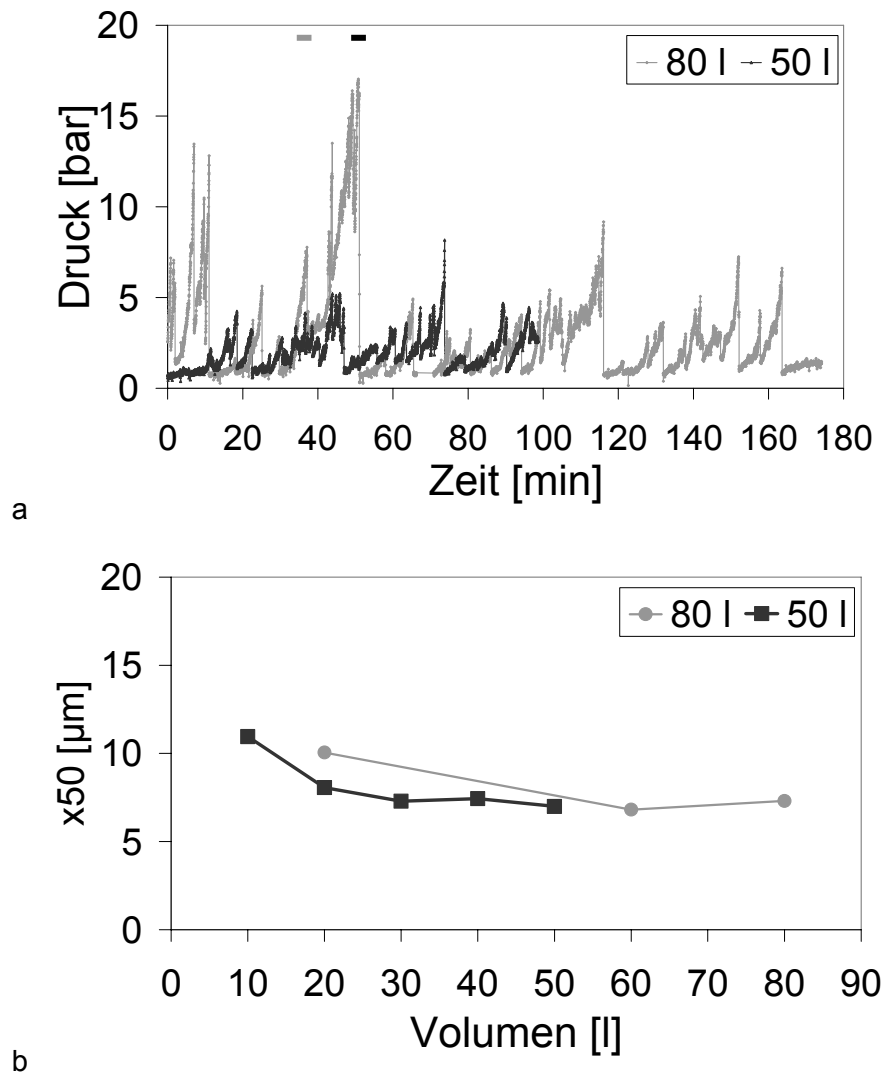


Abb. 5-V a –Druckprofil, b – Partikelgröße über die Produktion von Albumin-Glycin Mikro-kristallen mit dem QJI bei 500 ml/min

Über die Dauer der Herstellungen, besonders bei der 80 l Produktion, lagern sich Kristalle im System ab, die Verblockungen und Druckspitzen verursachen (Abb. 5-V). Die Mischapparatur ist inzwischen für 20 bar ausgelegt und kann dadurch Verblockungen frei spülen, ohne dass die Produktion unterbrochen werden muss. Kontinuierlich werden 50 l bzw. 80 l PCMC-Suspension hergestellt. Die Partikelgröße ändert sich nur am Anfang der Produktionszeit. Nach 20 l oder 40 min stellt sich bei dieser Modellformulierung ein Plateau ein.

5.1.5 Standzeit der PCMC-Suspension

Die Kontaktzeit der PCMC mit dem Suspensionsmittel kann einen Einfluss auf die resultierende PCMC-Qualität haben. Sollte dies der Fall sein, muss innerhalb eines

Zeitfensters der Gesamtprozess bis zum trockenen PCMC-Pulver durchgeführt werden. In der folgenden Studie wird die Hypothese an zwei Modellantikörperformulierungen untersucht (Tab. 5-S).

Tab. 5-S Modellformulierung 5 und 6

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht-LM
5	IgG I (6,1)	Gly (80)	Citrat (5,9) NaCl (6,4) Phosphat (1,0) KCl (0,1)	6,2	0,52	2M1P
6	IgG II (15,9)	Gly (137)	NaCl (8,0) Phosphat (1,6) KCl (0,2)	9,9	0,81	2M1P

Die PCMC werden dem Suspensionsmedium unterschiedlich lang ausgesetzt, zu festgelegten Ziehungspunkten filtriert, getrocknet und nach Rekonstitution analysiert. Die Herstellung der Mikrokristalle erfolgt mit dem DJI (3,0 mm, V4A), bei 23 °C und mit 1000 ml/min. Als Standzeit wird die Zeit nach der Herstellung definiert.

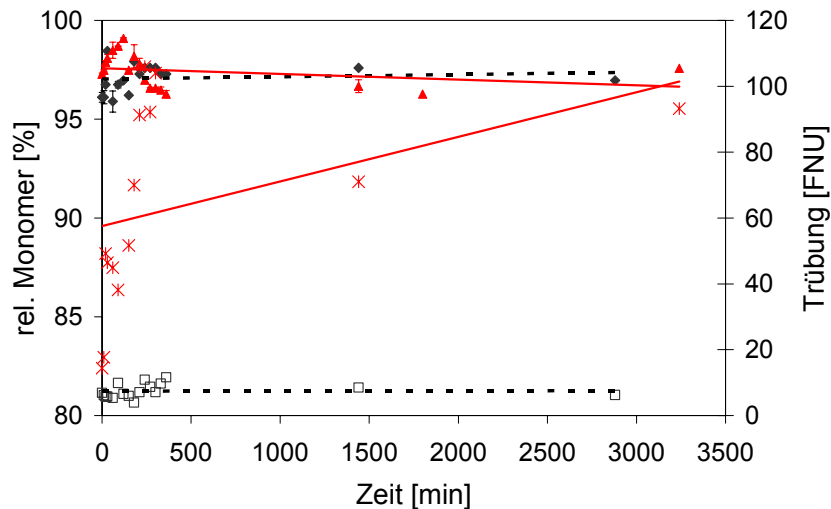


Abb. 5-W Proteinintegrität von IgG I PCMC über die Standzeit (◆) rel. Monomergehalt Modellformulierung 5, (▲) rel. Monomergehalt Modellformulierung 6, (□) Trübung Modellformulierung 5, (×) Trübung Modellformulierung 6, (-----) Modellformulierung 5, (—) Modellformulierung 6

IgG I PCMC (Modellformulierung 5) zeigen direkt nach der Herstellung im Mittelwert einen Monomergehalt von 97,1 % ($s = 0,7$ %) und kaum feste Aggregate. Das heißt, während der Präzipitation werden 3 % der Monomere in lösliche Fragmente oder Aggregate umgewandelt. Über eine zweitägige Standzeit der Mikrokristalle im Suspensionsmedium hinweg ändert sich der Monomeranteil nicht. Die Weiterverarbeitung kann innerhalb von 2 Tagen erfolgen.

Die zweite Modellformulierung (Modellformulierung 6) zeigt bis 10 min nach der Herstellung einen Monomergehalt von 97,4 % und kaum feste Aggregate. Nach 10 min Standzeit steigt die Fraktion kontinuierlich an unlöslichen Aggregaten, so dass nach 5 h eine Trübung von 100 FNU der rekonstituierten PCMC-Pulver resultiert. Außerdem sinkt der lösliche Monomeranteil um 1 % bereits nach einer Standzeit von 5 Stunden. Danach verändern sich Monomeranteil und Anteil fester Aggregate kaum, auch wenn der gemessene Trübungswert sehr stark zwischen 75 FNU und 100 FNU schwankt. Das heißt, dass ein Teil der Proteine der Modellformulierung 6 rasch durch das Suspensionsmittel denaturiert wird. Vermutlich werden besonders nicht gebundene Proteine innerhalb dieser 5 Stunden denaturiert, weil nach dieser Zeit sich der Monomergehalt nicht weiter verschlechtert. Der verbleibende Anteil der Proteine ist auf den Trägern erfolgreich stabilisiert und wird dadurch nicht vom Suspensionsmedium geschädigt. Für diese Modellformulierung gibt es folglich nur ein Produktionsfenster von 10 min.

5.1.6 Einfluss der Lagerung

Die Proben aus der Untersuchung des Standzeiteinflusses (Kapitel 5.1.5) werden nach 30 Tagen Lagerung als Pulver (unter nicht konditionierter Umgebung) nochmals analysiert.

Die Analyse ergibt für die Antikörpermodellformulierungen einen deutlichen Monomerverlust von 7 % bis 20 %. Mögliche Ursachen sind in den Lagerbedingungen, den Formulierungsbestandteilen, der Restfeuchte bzw. dem Restlösemittelgehalt oder dem Prozess zu suchen. Aus der Theorie ist bekannt, dass bei Fällungen aufgrund der schnellen Prozessführung kristalline, teilkristalline oder amorphe Kristalle entstehen [Hoffmann, 2004]. Weiterhin dient bei beiden Modellformulierungen Glycin als Träger. Glycin kristallisiert während der PCMC-Herstellung in der β -Modifikation aus, denn diese polymorphe Form wird kinetisch getrieben gebildet. Eine Ursache für den Monomerverlust könnte die Umlagerung der β -Modifikation in die thermodynamisch stabilere α - oder γ -Modifikation und die dadurch bedingte Schädigung von Proteinen auf der Kristalloberfläche sein. Die detaillierte Untersuchung ist in Kapitel 5.1.7.1

dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass die Lagerung unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit im Temperaturbereich bis 25 °C kaum zu einer Proteinschädigung führt.

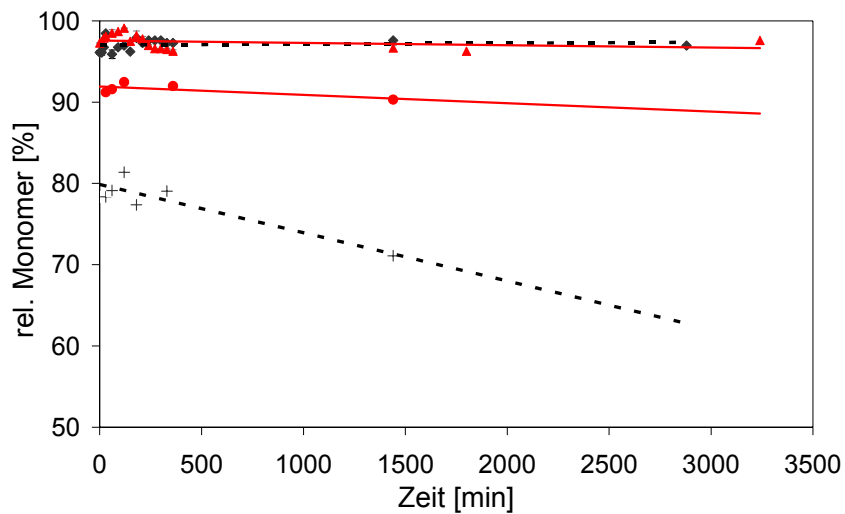


Abb. 5-X Proteinintegrität in Abhängigkeit von der Standzeit nach unterschiedlichen Analysenzeitpunkten, (◆) Modellformulierung 5 direkt nach der Herstellung, (▲) Modellformulierung 6 direkt nach der Herstellung, (+) Modellformulierung 5 nach 30 d Lagerung, (●) Modellformulierung 6 nach 30 d Lagerung, (—) Modellformulierung 6, (-----) Modellformulierung 5

5.1.7 Einfluss der Formulierung

5.1.7.1 Träger

Als Träger werden bevorzugt Aminosäuren, die gut in Wasser lösliche sind, wie DL-Valin und Glycin eingesetzt. Die Träger sollen nahe ihrer Sättigungsgrenze in der Protein-Carrier-Lösung gelöst und im Nicht-Lösungsmittel nicht löslich sein [Variny, 2008].

Stabilitätsstudie von Protein-Glycin Mikrokristallen und Einfluss der Glycin-modifikation

Von Glycin gibt es drei polymorphe Modifikationen und die Stabilität nimmt bei Raumtemperatur von $\beta < \alpha < \gamma$ zu [Perlovich, 2001, Ferrari, 2002, Allen, 2002]. β -Glycin ist eine metastabile Form von geringer Stabilität, die sich an feuchter Luft oder in Wasser irreversibel in α - oder γ -Glycin umwandelt. γ -Glycin wird beim Erhitzen über 165 °C in das enantiotrope α -Glycin transformiert [Weissbuch, 2005].

Glycin kristallisiert während der PCMC-Herstellung nach der Ostwaldschen Stufenregel kinetisch kontrolliert in der β -Modifikation aus. In Stabilitätsstudien sollen Zeit und

Umwandlungsbedingungen für die Transformation der β -glycinhaltigen PCMC analysiert werden. Die Proteine auf den Kristalloberflächen der PCMC inhibieren die Transformation. Möglicherweise können sie die Umwandlung nicht vollständig unterbinden, weil nur ein Teil der Oberflächen mit Antikörpern bedeckt ist. Analog zu der Standzeitstudie werden in dieser Untersuchung IgG I-Glycin Mikrokristalle (Modellformulierung 5 mit Modellantikörper 1, Tab. 5-S) mit dem DJI (3,0 mm, V4A) bei 23 °C und mit 1000 ml/min produziert. Über Membranfilter werden die Kristalle geerntet, an trockenerer Luft (0 %RH) getrocknet und in Glasvials abgefüllt. Die Vials werden bei unterschiedlichen Lagerbedingungen für 6 Monate eingelagert.

Lagerbedingungen:

- 25 °C/ 60 %RH
- 25 °C/ trocken
- 40 °C/ trocken
- 4 °C/ trocken

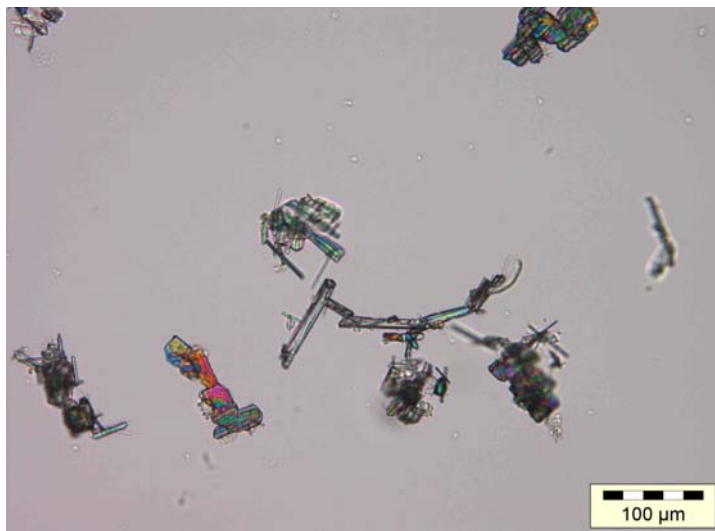


Abb. 5-X1 Mikroskopisches Bild von Glycin Mikrokristalle mit Modellantikörper 1 in Methanol hergestellt mit DJI bei 1000 ml/min

Das mikroskopische Bild der IgG I-Glycin Mikrokristallsuspension zeigt wenige kubische aber viele für die β -Modifikation typische nadelförmige Kristalle. Die Kristalle sind in der Suspension im Mittelwert 62 µm groß.

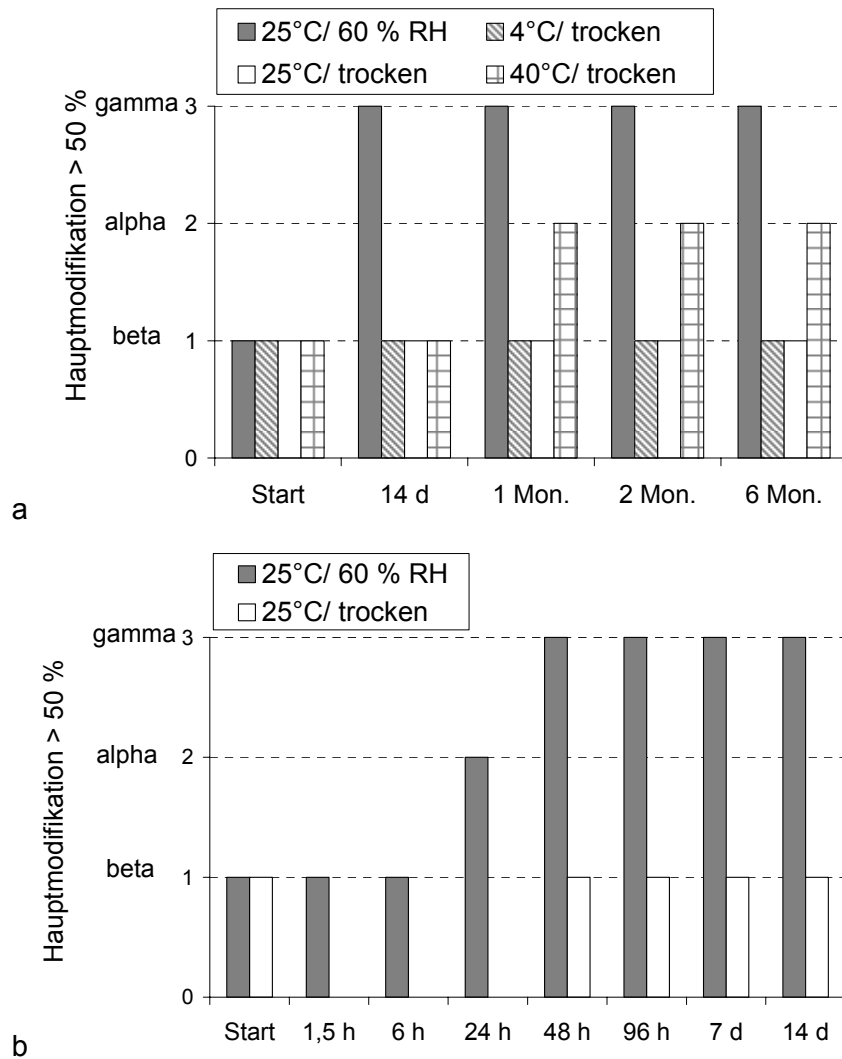


Abb. 5-Y Stabilitätsstudien – Trägermodifikationen von IgG I-Glycin Mikrokrystallen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen, hergestellt mit dem DJI bei 1000 ml/min

Im Diagramm in Abb. 5-Y sind die Daten aus den Röntgenuntersuchungen dargestellt. Die entsprechenden Röntgendiffraktogramme sind im Anhangkapitel 7.3 abgebildet. Direkt nach der Herstellung liegt das Glycin vorwiegend in der β -Modifikation vor. Der Einfluss von Luftfeuchtigkeit (60 %RH) bewirkt eine sehr rasche Umwandlung. Der Einfluss von erhöhter Temperatur (40 °C) bewirkt eine eher langsame Umwandlung des Glycinträgers in die α - und γ -Modifikation. Die Trägertransformation geht offensichtlich mit der Proteinschädigung einher, denn der Monomergehalt sinkt und die festen Aggregate nehmen zu (Abb. 5-Z, Abb. 5-AA).

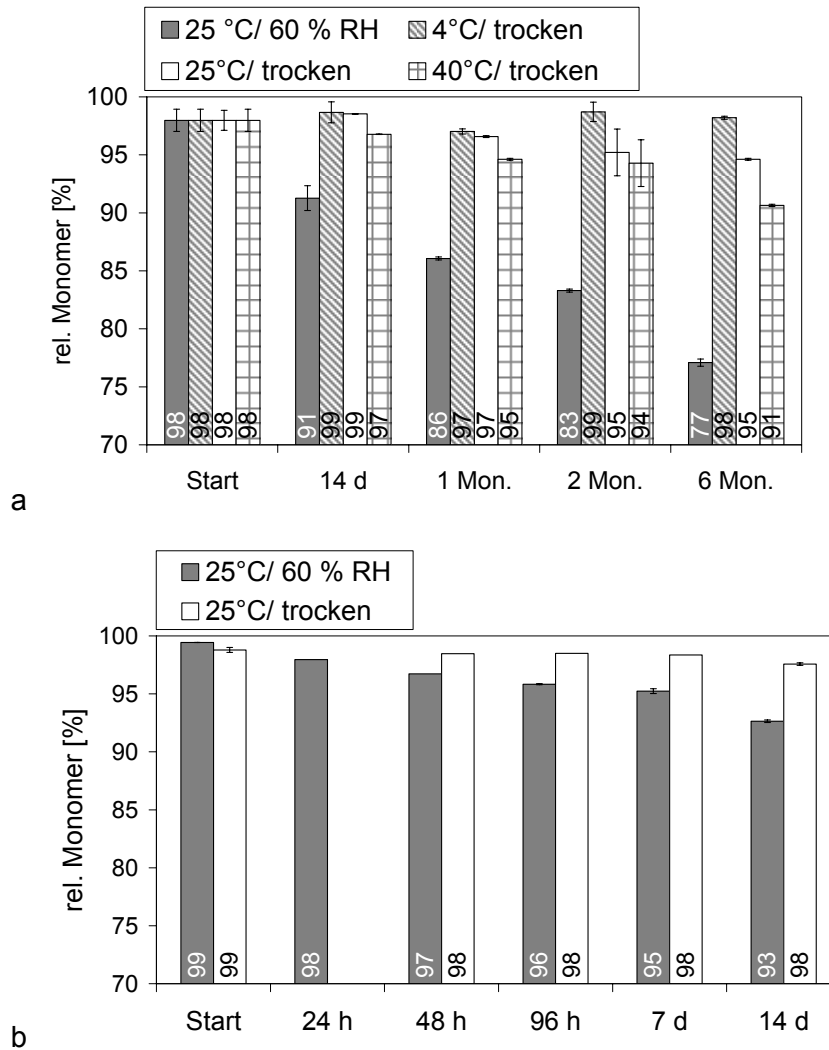


Abb. 5-Z Stabilitätsstudien – Monomergehalt von IgG I-Glycin Mikrokristallen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen, hergestellt mit dem DJI bei 1000 ml/min

Die feucht gelagerten Proben (25 °C/ 60 %RH) zeigen eine erste Umwandlung in die α -Modifikation bereits nach 6 h bis 24 h. Die zweite Umwandlung in die bei Raumtemperatur stabilste γ -Modifikation ist nach 48 h abgeschlossen. Der Monomergehalt hat nach 48 h bereits um 2 % abgenommen. Nach 14 Tagen werden nunmehr 91% - 93 % und nach 6 Monaten nur noch 77 % an löslichen Monomeren gemessen (Abb. 5-Z). Weiterhin wird die Proteinschädigung am Anstieg des festen Aggregatanteils ersichtlich (Abb. 5-AA). Der feste Aggregatanteil wird unter anderem mit der Trübungsmessung erfasst. Ein deutlicher Anstieg wird von anfänglich 15 FNU auf 30 FNU nach 48 h und auf 35 FNU nach 14 Tagen gemessen. Über die Lagerzeit von 14 Tagen bis 6 Monaten ändert sich der Trübungswert und damit der feste Aggregatanteil nicht weiter.

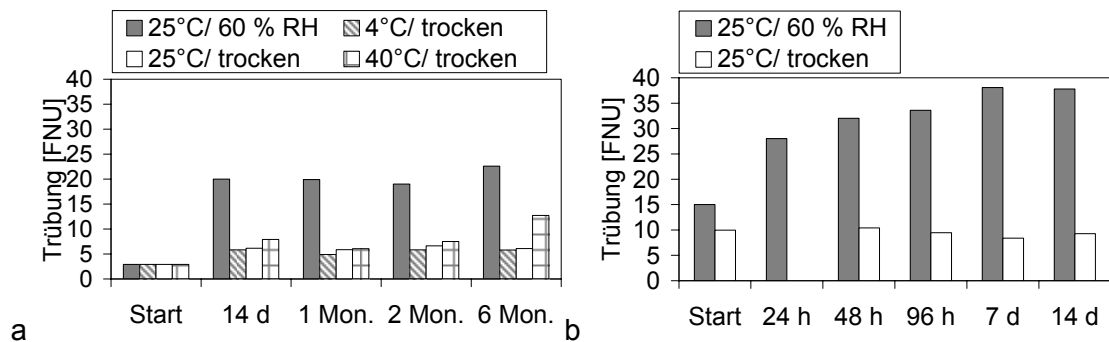


Abb. 5-AA Stabilitätsstudien – Trübungswerte von IgG I-Glycin Mikrokrystallen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen, hergestellt mit dem DJI bei 1000 ml/min

Es gibt drei Strategien, den Proteinintegritätsverlust zu unterbinden. Die erste und beste Strategie wäre die Herstellung der thermodynamischen stabilsten Trägermodifikation, jedoch ist dies unter den festgelegten Prozessparametern der Präzipitation nicht möglich. Die zweite Strategie wäre einen Träger einzusetzen, der keine polymorphen Formen hat. Am Beispiel von Natriumchlorid wird versucht, dies umzusetzen. Jedoch reagiert das Protein auf die hohe Salzkonzentration empfindlich und wird sehr stark während der Herstellung denaturiert. Die dritte Strategie ist die Lösung, indem die PCMC unter trockenen Bedingungen gelagert werden. Durch den Ausschluss der Luftfeuchte wird die Umwandlung unterbunden.

Tatsächlich zeigen sich beim Ausschluss der Luftfeuchte insbesondere bei 4 °C über 6 Monate keine Änderung der Glycinmodifikation (β -Modifikation), kein Monomerverlust (98 % Monomer) und keine Zunahme des festen Aggregatanteils (5 FNU). Ebenfalls unter Ausschluss der Luftfeuchte bei höheren Temperaturlagerbedingungen wie 40 °C verschiebt sich nach einem Monat das Gleichgewicht zur thermodynamisch stabileren α -Modifikation. Auch nach 6 Monaten kommt es jedoch nicht zur weiteren Umwandlung in die stabilste γ -Modifikation des Glycins. Die Proteinschädigung ist schwächer als bei den feuchteausgesetzten Pulvern. Nach 6 Monaten beträgt der Monomergehalt noch 91 % bei 40 °C Lagerung im Vergleich zu 77 % nach 25 °C und Feuchteinfluss. Bei 25 °C unter trockenen Bedingungen sind noch 95 % Monomer nach 6-monatiger Lagerung erhalten. Der Trübungswert zeigt kaum eine feste Aggregatbildung über die Lagerung unter trockenen Bedingungen. Bei der 40 °C Lagerung unter Ausschluss von Feuchte werden nach 6 Monaten 15 FNU und bei 25 °C/ trocken werden nach 6 Monaten nur 5 FNU gemessen. Beide Werte werden den Arzneibuchanforderungen von 18 FNU gerecht.

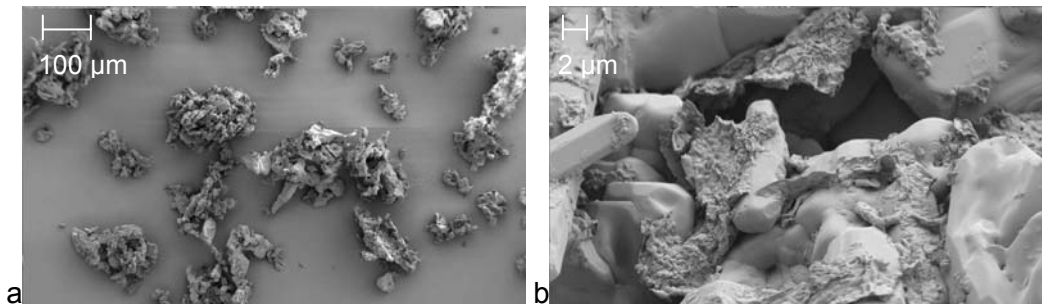


Abb. 5-BB REM von IgG I-Glycin Mikrokristallen nach 2 Monaten bei 25 °C/ 60 %RH

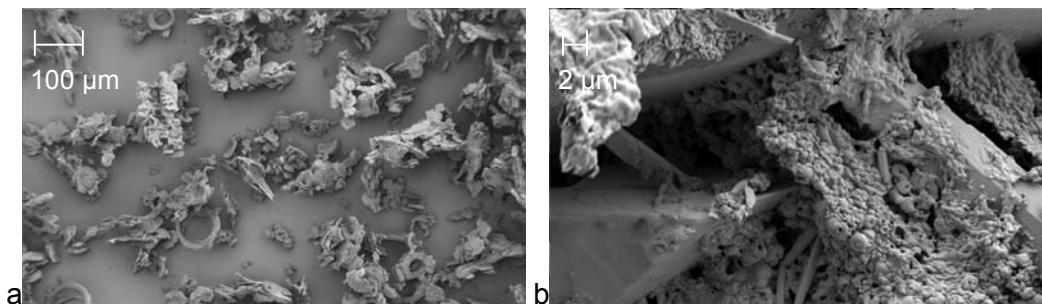


Abb. 5-CC REM von IgG I-Glycin Mikrokristallen nach 2 Monaten bei 25 °C/ trocken

Die Rastelektronenaufnahmen zeigen in der feucht gelagerten Probe im Vergleich zur trocken aufbewahrten Probe verschmolzene Strukturen (Abb. 5-BB und 5-CC).

Bestimmung der kritischen Luftfeuchte zur Lagerung von PCMC

IgG I-Glycin Mikrokristalle (Modellformulierung 5) nehmen in Abhängigkeit von der relativen Umgebungsfeuchte Wasser auf, welches mit einer Sorptionswaage (*Dynamic Vapor Sorption, DVS*) gemessen werden kann. Die β -Modifikation der PCMC wird beginnend mit 0 %RH schrittweise bis 90 %RH ausgesetzt, wobei die Gewichtszunahme erfasst wird (Abb. 5-DD a). Steht die Probe mit der herrschenden Umgebungsfeuchte im Gleichgewicht, wird die aufgenommene Wassermenge (= Massenänderung) zur Erstellung von Wasserdampfsorptionsisothermen verwendet (Abb. 5-DD b).

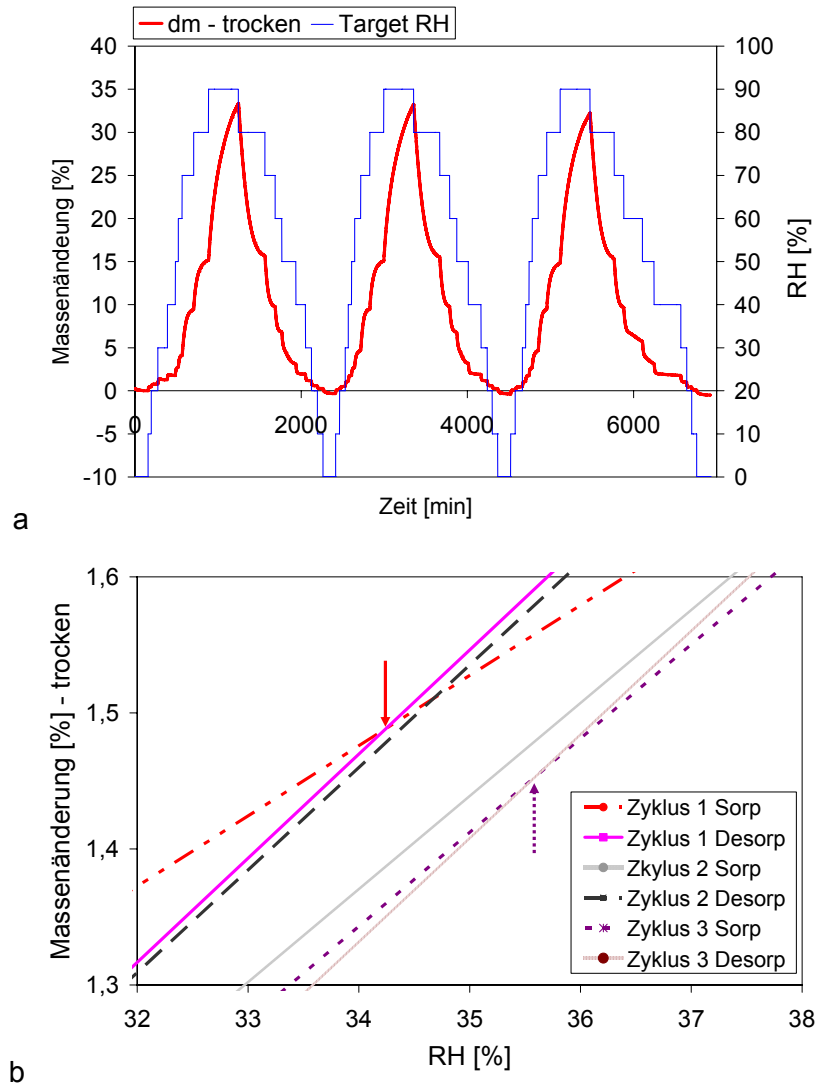


Abb. 5-DD DVS a – Massenzunahme, b – Wasserdampfsorptionsisotherme von IgG I-Glycinmikrokristallen

Im ersten Zyklus wandelt sich die β -Modifikation in α -Glycin und im dritten Zyklus endgültig in thermodynamisch stabilste γ -Form um, denn die jeweiligen Sorptions- und Desorptionsisotherme schneiden sich in diesen beiden Zyklen. Die Umwandlungsfeuchte liegt bei ca. 35 %RH.

Zusammenfassend lässt sich anhand der durchgeführten Versuche ableiten, dass glycinhaltige PCMC vor allem feuchteempfindlich sind. Bei Ausschluss von Luftfeuchtigkeit im Temperaturbereich von 4 °C bis 25 °C kommt es kaum zur Proteinschädigung.

5.1.7.2 Protein

Beim PCMC-Prozess lagern sich die Proteine vor allem auf den Oberflächen der Trägermaterialien ab und können so die Ostwaldreifung unterdrücken [Vos, 2006]. Andernfalls würden kleinere Kristalle zugunsten größerer mit der Zeit aufgelöst werden. Wichtig für die Stabilisation der Proteine auf den Trägern sind die nicht kovalenten Wechselwirkungen. Zur Bestimmung dieser Wechselwirkungskräfte werden zwei Verfahren entwickelt. Die Methoden sind in Kapitel 4.2.1.5. und 4.2.1.6 beschrieben. Für die drei am häufigsten eingesetzten Modellformulierungen (Abb. 5-EE) werden folgend die Bindungsstärke zwischen den beiden Partnern ermittelt.

Abb. 5-EE Modellformulierungen 2,3,4

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl ₂ (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA

Die PCMC-Suspensionen werden mit dem DJI bzw. QJI (3,0 mm V4A) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1000 ml/min und 23 °C hergestellt. Jede Suspension wird in 4 Aliquots unterteilt. Der erste Teil wird wie üblich über einen Membranfilter filtriert. Der zweite Teil wird 15 min bei 1000g zentrifugiert, wovon der Überstand verworfen und der Rückstand mit Isopropanol redispersiert über einen Membranfilter geerntet wird. Der dritte Teil wird zur Sedimentation der PCMC 22 Stunden lang stehen gelassen und im Anschluss analog zu der Zentrifugationsprobe aufbereitet. Der vierte Teil wird sprühgetrocknet. Die Scherkräfte beim Trocknen und Abscheiden im Zyklon bewirken eine Trennung des schwach oder ungebundenen Proteins von den Trägern, so dass diese Fraktion mit der Abluft ausgetragen wird. Nach Rekonstitution aller PCMC-Pulver wird die Proteinbeladung bestimmt (Abb. 5-FF). Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen spiegeln mindestens zwei Herstellungen wieder.

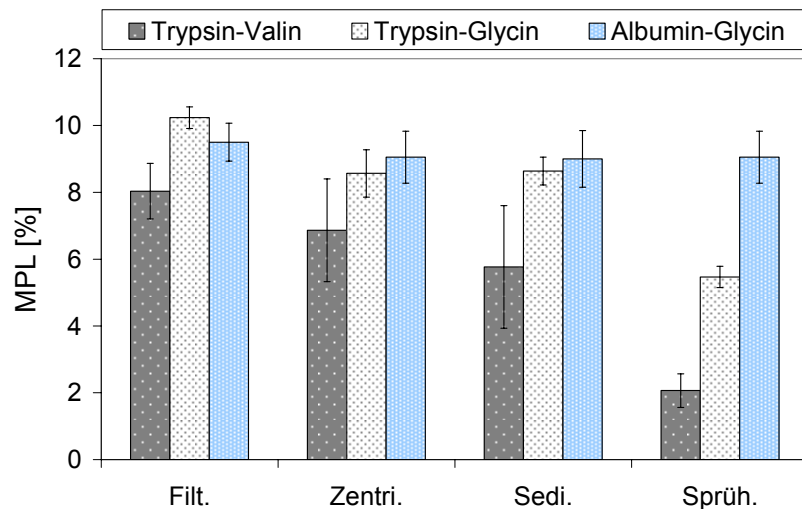


Abb. 5-FF Proteinbeladungen in Abhängigkeit der Methoden zur Bestimmung der nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier

Die interpartikulären Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier sind bei den Modellformulierungen unterschiedlich. Jede Methode zur Bestimmung der Bindungsstärke bestätigt, dass Trypsin auf DL-Valin wesentlich schlechter bindet als auf Glycin. Dabei wird der Unterschied der Bindungsstärke zwischen den Methoden von der Zentrifugation über die Sedimentation bis zur Sprühtrocknung zunehmend deutlicher. Albumin bindet auf Glycin stärker als Trypsin. Der Unterschied ist bei der Zentrifugation und Sedimentation nicht signifikant, jedoch bei der Sprühtrocknung. Der Unterschied zwischen den Modellformulierungen mit Trypsin und mit Albumin kann durch die unterschiedlich resultierenden Partikelgrößen bedingt sein. Albumin-Glycin Mikropartikel sind tendenziell immer etwas kleiner als die salzhaltigen Trypsin-Glycin Mikropartikel. Je größer die angebotene Oberfläche, desto mehr Bindungsmöglichkeiten stehen zur Verfügung.

Die Bindungsunterschiede sind bei der Bestimmung der Proteinbeladung bzw. Proteinwiederfindung über die Membranfiltration sehr schlecht zu identifizieren, denn ungebundenes oder schwach gebundenes Protein wird im Filterkuchen während der Filtration zurückgehalten. Von den zurückbleibenden Proteinen im Filterkuchen werden nur feste Aggregate (> 450 nm) separiert. Alle anderen Proteine werden in der UV-Bestimmung erfasst.

Ungebundenes oder schlecht gebundenes Protein kann bei der Prozessentwicklung wie der Filtration Schwierigkeiten verursachen, denn das ungebundene Protein verstopft häufig die Filterporen, so dass Membranfilter oder Metallfiltergewebe verblocken. Zudem sollte die Proteinstabilisierung durch die PCMC auch eine Funktion der Wechselwirkungsstärke sein.

5.1.7.3 Hilfsstoffe

Zusätze wie weitere Aminosäuren, Salze oder biologische Puffersalze vermögen die Kristallkeimbildung, die Wachstumsgeschwindigkeit und die Form der Kristalle zu verändern. Dies kann durchaus im Prozess und in der Qualität der PCMC sprühbar werden, wie am Beispiel von Puffersalzen insbesondere NaCl kurz dargestellt werden soll. Modellformulierung 4 wird einmal ohne und einmal mit weiteren Hilfsstoffen präzipitiert. Im Prozess wird jeweils der QJI (3,0 mm, V4A) mit einem Fluss von 500 ml/min und 23 °C eingesetzt.

Tab. 5-T Modellformulierung 4 und 4* mit Salzzusätzen

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA
4 *	dito	dito	NaCl (8,0) Phosphat (0,16) KCl (0,2)	dito	dito	dito

Ohne zusätzliche Salze entstehen sehr kleine Mikropartikel von 8 µm in Suspension. Die Kristalle sind unregelmäßig kubisch geformt. Dagegen zeigen sich bei den salzinduzierten PCMC wesentlich mehr nadelförmige und vor allem größere Mikrokristalle von 27 µm. Dazu sind vereinzelt runde Aggregate zu erkennen (Abb. 5-GG). Dieses Beispiel verdeutlicht den Einfluss von Fremdionen, die die Präzipitation, den Prozess und die Qualität des Produktes stark beeinflussen.

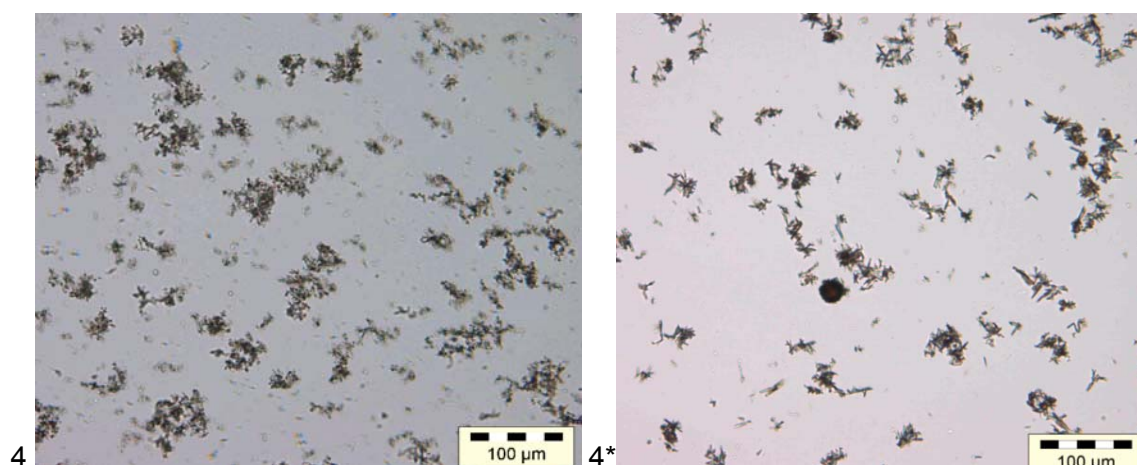


Abb. 5-GG Mikroskopische Bilder, 4 - Albumin-Glycin Kristalle, 4* - Albumin-Salz-Glycin Kristalle

5.1.7.4 Nicht-Lösungsmittel

In diesem Versuch wird eine Antikörperformulierung (Modellformulierung 7, Tab. 5-U) mit zwei unterschiedlichen Nicht-Lösungsmitteln (Methylpropanol und Isopropanol) im DJI (3,0 mm, V4A) bei 1000 ml/min und 23 °C gefällt.

Tab. 5-U Modellformulierung 7, die mit IPA oder 2M1P (7*) gefällt wird

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
7	IgG III (38,7)	Gly (70)	Arg (9,1) Glu (7,7) Treh (28,0) His (1,3) EDTA (0,03) Tween 80 (0,07)	25,2	0,77	IPA
7*	dito	dito	dito	dito	dito	2M1P

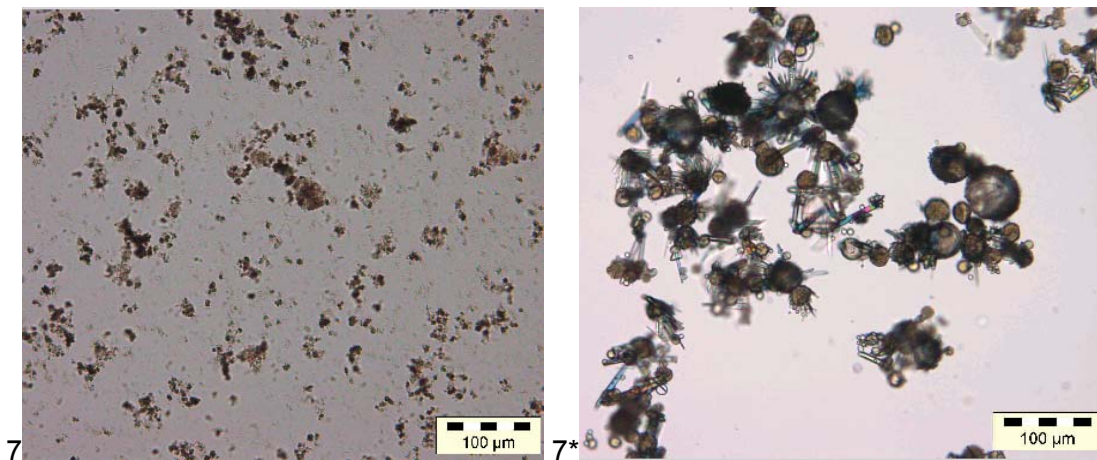


Abb. 5-HH Mikroskopische Bilder, 7 – IgG III-Glycin Cokristalle in Isopropanol, 7* - IgG III-Glycin Co-Kristalle in Methylpropanol

Tab. 5-V Ergebnisse von IgG III-Glycin Mikrokristallen gefällt mit IPA und 2M1P

	kinem. Viskosität [cm ² /s]	Re	x ₅₀ in Suspension [µm]	rel. Monomer nach 2,5 h [%]	rel. Monomer nach 48 h [%]
7 IPA	2,799	2528 (turbulent)	13,3 ± 0,3 µm	99,7	95,9
7* 2M1P	5,81	1218 (laminar)	96,6 ± 0,3 µm	99,6	99,5

Die Präzipitation mit verschiedenen Fällungsmedien verhält sich unter gleichen Produktionsbedingungen unterschiedlich. Es werden mit dem höher viskosen Methylpropanol 7-mal größere Kristalle produziert als mit Isopropanol (Tab. 5-V). Dazu erscheinen beim Methylpropanol zwei Morphologien wie Nadeln und kugelförmige Kristalle (Abb. 5-HH). Die Ursache liegt darin, dass der Prozess des Mischens bei Methylpropanol nicht so effizient ist wie bei Isopropanol. Methylpropanol hat eine höhere kinematische Viskosität als Isopropanol. Die Viskosität spielt bei der Errechnung der Reynoldszahl eine wichtige Rolle. Beide Proben werden zwar unter gleichen Prozessbedingungen hergestellt, jedoch ist die Rohrströmung bei Isopropanol turbulent und bei Methylpropanol nur laminar. Weil im laminaren Strömungsbereich nur eine Längsmischung und keine Quermischung auftritt, ist die Durchmischung bei Methylpropanol langsamer. Dies spiegeln zum einen die größeren Kristalle wieder, zum anderen zeigen die zwei Partikelmorphologien bei Methylpropanol, dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgrund der inhomogenen Durchmischung entstanden sind. Für den Mischprozess mit Methylpropanol sollte daher die Strömungsgeschwindigkeit auf 2000 ml/min erhöht werden, damit im turbulenten Bereich gemischt wird.

Die Untersuchung der Standzeitstabilität über 2 Tage zeigt, dass Methylpropanol im Vergleich zu Isopropanol keine Proteinschädigung bewirkt. Isopropanol verringert den löslichen Monomeranteil auf 96 % innerhalb von 2 Tagen während mit Methylpropanol ein Monomeranteil von 99,5 % gemessen wird (Tab. 5-V).

Generell wird bei der Präzipitation des IgG III der Monomeranteil weniger stark als bei IgG I und IgG II verändert, womit dieser Modellantikörper das beste Ergebnis in der Arbeit zeigt. Ein möglicher Grund ist, dass das eingesetzte Material weniger lang vor Einsatz gelagert wurde.

5.1.8 Diskussion des Prozessschrittes Mischen/ Präzipitieren

Die Grundoperation Mischen ist Voraussetzung für die homogene Präzipitation der PCMC. In der vorliegenden Arbeit wurden statisch, kontinuierlich betriebene Mischer im Mikro- sowie Makromaßstab untersucht. Die Energie zum Mischen trägt das Mischgut ein, weshalb sich insbesondere die Massenflussmischer (DJI, QJI) zur PCMC-Herstellung bewähren. Sie bringen einerseits genügend Energie zum Mischen ins System und andererseits sind die Scherbelastungen für die Proteine in diesen am geringsten.

In Mikrostrukturen (< 1 mm) ist die Mischzeit/ Diffusionszeit \leq der Verweilzeit, weshalb dort im laminaren Strömungsbereich gemischt werden kann. Ein signifikanter Zusam-

menhang besteht zwischen dem Durchmesser und der Partikelgröße/ -beladung. Je kleiner der Durchmesser, desto kleiner sind die PCMC und desto besser sind diese mit Protein beladen.

Die große Herausforderung während der PCMC-Herstellung ist das ungleiche Mischungsverhältnis der beiden zu mischenden Ströme von 95 : 5. Häufig drückt der überwiegende Nicht-Lösungsmittelstrom in den kleinen Protein-Carrier-Strom und verblockt den Einlass des Mikromischers. Deshalb sind diese Mischer wie z. B. der Kaskadenmischer nicht für die PCMC-Herstellung einsetzbar. Jedoch zeigen auch der Ventilmischer und der DJI (mikro) Verblockungstendenzen, weshalb auf Makrostrukturen (> 1 mm) umgestiegen wurde.

Der *scale-up* erfolgt zunächst auf 2 mm später auf 3 mm, womit im Skalenbereich von Millimetern gemischt wird. Bei der Vergrößerung des Durchmessers werden die PCMC größer und das Protein wird wesentlich schlechter auf den Trägern gebunden. Dies kann durch den Einsatz von Ultraschall und durch den Einsatz höher Flussgeschwindigkeiten kompensiert werden. Beide Möglichkeiten eignen sich, PCMC im gewünschten unteren Mikrometerbereich mit guter Proteinbeladung herzustellen.

Der direkte Ultraschallimpuls wird in einem ultraschallunterstützten Mischer (*Ultrasonic Vortex Crystallizer UVC*) untersucht. Die hydrodynamische Mischergeometrie und nicht der direkte Ultraschallimpuls erweist sich jedoch als monomergehaltsschädigend. Der indirekte Ultraschallimpuls wird untersucht, indem der DJI und der Auslassschlauch des Mixers in ein Ultraschallbad gelegt werden. Der indirekte Ultraschallimpuls zeigt im Strömungsbereich 15 ml/min bis 150 ml/min eine Mischungsverbesserung. Bei einem Volumenstrom von 250 ml/min zeigt die Herstellung mit Ultraschall im Vergleich zu der Herstellung ohne Ultraschall keinen wesentlich Einfluss auf die Fällung. Analytisch zeigen die Pulver eine hohe Proteinbeladung, Partikelgrößen von 3 µm bis 30 µm und unabhängig vom Ultraschalleinfluss den gleichen Monomergehalt.

Die weitere Möglichkeit besteht darin, die Strömungsgeschwindigkeit zu erhöhen. PCMC können mit dem Impingement Jet Mischer proteinschonend unter laminaren und turbulenten Strömungen hergestellt werden. Dabei entstehen insbesondere im turbulenten Strömungsbereich homogene Partikelmorphologien. Diese Bedingungen ergeben für Isopropanol einem Gesamtstrom von 1000 ml/min und für Methylpropanol eine Gesamtflussrate von 2000 ml/min. Die unterschiedlichen Ströme ergeben sich aufgrund der unterschiedlichen kinematischen Viskosität beider Fällungsmittel.

Die zu mischenden Ströme sollten pulsationsarm und konstant vermischt werden. Pharmatypische Schlauchpumpen haben sich nicht bewährt, sondern druckstabile Mikrozahnringpumpen, deren Leistung über Massenflussmesser kontrolliert wird. Daneben ist die Aufzeichnung des Druckes eine wesentliche Kontrolle des Prozesses.

Gegenüber anderen statischen Mischern wie dem Kenics und dem Ventilmischer haben sich die Massenflussmischer (DJI, QJI) durch eine geringe Proteinschädigung bewährt.

Zwischen den Massenflussmischern zeigen fluiddynamische Simulationen und nass-chemische Experimente eine Verbesserung der Mischung vom SJI > DJI hin zum QJI. Die Übertragung der Erkenntnisse auf die Präzipitation bei schnell präzipitierenden Trägern wie Glycin zeigt jedoch keine Verbesserung in der Proteinbeladung und der Partikelgröße. Lediglich bei der langsameren Kristallbildung von Valin-PCMC zeigt sich, dass der SJI für die Kristallbildung im laminaren Bereich zwei- bis dreimal länger braucht als der DJI oder QJI. Zwischen DJI und QJI ergeben sich für die PCMC-Herstellung keine Unterschiede. Im turbulenten Strömungsbereich sind alle drei Impingement Mischer kaum voneinander zu unterscheiden. Jedoch wirkt sich eine turbulente Strömungserhöhung beim SJI stärker auf die resultierenden Valin-PCMC aus als beim DJI bzw. beim QJI. Dies ist ein Indiz für eine bessere Mischung des DJIs und QJIs bei langsameren Strömen. Fluiddynamische Simulationen zeigen im laminaren Strömungsbereich einen Unterschied in der Art und Weise, wie beide Komponenten vermischt werden. Beim DJI wird die Protein-Carrier-Lösung an die Ränder des Rohrreaktors gedrückt und dort mit dem Fällungsmittel vermischt. Beim QJI gibt es einen „Sandwichereffekt“. Die Protein-Carrier-Lösung wird von den vier Fällungsmittelströmen umgeben und mittig vermischt.

Während der Entwicklung werden unterschiedliche Modellformulierungen untersucht. Glycin und Valin als Trägersubstanzen immobilisieren nicht jedes Protein über interpartikuläre Bindungen gleich gut. Die interpartikulären Bindungsunterschiede zwischen den Formulierungen können durch eigens dafür entwickelte Methoden bestimmt werden. Zum Beispiel werden durch die Zentrifugation der PCMC-Suspensionen ungebundene bzw. schlecht gebundene von gut gebundenen Proteinen getrennt. Die im Anschluss durchgeführte Proteinwiederfindung gibt eine Aussage über die Bindungsstärke.

Bei Verwendung von Glycin als Träger entsteht während der Präzipitation nach der Ostwaldschen Stufenregel die kinetisch kontrollierte polymorphe β -Form. Bei Lagerung unter Feuchteinfluss wandelt sich die β -Form in die thermodynamisch stabileren α - und γ - Modifikationen um. Dabei wird das Protein auf der Oberfläche geschädigt. Für Glycin als Träger wird eine trockene Lagerung bei 8 °C – 25 °C empfohlen.

DJI (3,0 mm, V4A) bzw. QJI (3,0 mm, V4A) sollen im turbulenten Strömungsbereich eingesetzt werden. Unter diesen Bedingungen können innerhalb von 30 Minuten bis 1 Stunde 60 l PCMC-Suspension kontinuierlich hergestellt werden.

5.1.9 Technische Umsetzung

Für die technische Umsetzung wurde ein spezieller PCMC-Raum auf die Anforderungen des Prozesses ausgerichtet.

Für die Präzipitation steht ein begehbarer Abzug (Waldner, Deutschland) mit CO₂-Löschanlage (Sitech, Deutschland) zur Verfügung. Bis zu 50 l organisches Lösungsmittel können unter diesem Abzug möglichst in geschlossenen Gefäßen gehandhabt werden. Das organische Lösungsmittel wird aus zwei 25 l Salzkottengefäßen mit Steigrohr (Roetzmeier) von zwei zwangsverdrängenden Mikrozahnringspumpen (HNP Mikrosysteme GmbH, Deutschland, mnr 11507, Konformitätserklärung und Zündquellenanalyse liegt vor) über lösungsmittelbeständige und druckstabile 10 bar Schläuche (PNU) angesaugt. Zum Schutz der Mikrozahnringspumpen passieren die organischen Lösungsmittelströme (Fällungsmedien) einen 10 µm Edelstahlfilter (HNP, Deutschland). Nach den zwei Pumpen fließen die Ströme durch die Massenflussmesser (Coriflow, Wagner Mess- und Regeltechnik, Deutschland) und werden im 180° Winkel versetzt in den Mischer auf eine Mischerplattform geführt. Auf der Plattform fließen beide Ströme jeweils über ein Einlassmodul, einen Druckaufnehmer, evtl. einen Wärmeaustauscher und über einen Temperatursensor (Ehrfeld, Deutschland) direkt in den DJI (3,0 mm, PP). Wenn der QJI (3,0 mm, PP) eingesetzt wird, werden die zwei Ströme vor den Massenflussmessern durch zwei T-Stücke in vier Ströme aufgeteilt und im 90° Winkel versetzt zum Mischer auf die Mischerplattform geführt. Aus Sicherheitsgründen sind zwischen Pumpen und Mischerplattform die Rohrleitungen (Ø = 3 mm) aus Edelstahl gefertigt. Bei der Verlegung sollten 90° Winkel vermieden werden, denn durch diese werden unnötige Turbulenzen im Strom erzeugt, die das Fließen beunruhigen. Derzeit ist der Prozess auf 20 bar begrenzt ausgelegt, denn der Arbeitsbereich der Mikrozahnringspumpe für die Protein-Carrier-Lösung (HNP, mnr 7255, Deutschland) ist 20 bar. Die Protein-Carrier-Lösung wird stets am Tag der Herstellung frisch hergestellt und über einen 0,45 µm PVDF-Membranfilter (Stericup, Millipore) partikelfrei filtriert. Die Protein-Carrier-Lösung wird von der Mikrozahnringspumpe ohne Edelstahlfilter in die Mischer gefördert, um Scherung für die Proteine zu vermeiden. Die Lösung fließt über zahlreiche Sensoren, die analog den organischen Lösungsmittelströmen angeordnet sind. Beim DJI fließt die Protein-Carrier-Lösung im 90° Winkel versetzt zu den Lösungsmittelströmen und beim QJI axial in den Mischer hinein. Zuvor muss das Mischungsverhältnis und die Flussgeschwindigkeit aller Ströme eingestellt werden. Dies erfolgt bei den Mikrozahnringspumpen für jeden einzelnen Strom durch die Flussgeschwindigkeitseingabe im Programm LabView. In Abb. 5-HH sind dieser und weitere Regelkreise, die Datenaufzeichnungen und die

Anschlüsse visualisiert. Die Suspension fließt nach dem Mischer durch einen 3,2 mm Silikonschlauch (ITE, STHT-C 125-2) in 10 l Duranglasflaschen oder Salzkottengefäße, die unter dem Tisch wie die Vorratsgefäße stehen. Der Tisch wurde für den Prozess konstruiert. Dieser ist 10 % kleiner als die Abzugsfläche, damit genügend CO₂-Löschgas im Ernstfall unter den Tisch strömen kann und hat eine Auffangwanne für Leckagen. Ebenfalls aus Arbeitssicherheitsgründen sind die Pumpen, der Tisch und das Produktgefäß geerdet. Beim Produktgefäß stehen dafür Metallsteigrohre zur Verfügung. Bezüglich des Ex-Schutzes muss der Medienfluss unter 1 m/s liegen und der Schlauchdurchmesser darf 30 mm nicht überschreiten. Alle elektrischen Geräte, die dem Mischprozess dienen, incl. Labbox, sind von außen ein- und ausschaltbar. Der Prozess wird bei Überschreitung des Spitzendruckes von 20 bar abgeschaltet.

Der DJI (3,0 mm, V4A), QJI (3,0 mm, V4A), Ventilmischer und ein „kleiner“ DJI (1,5 mm, V4A), insbesondere für die Formulierungsentwicklung, sind auf der Mischplattform ohne großen Aufwand einbaubar.

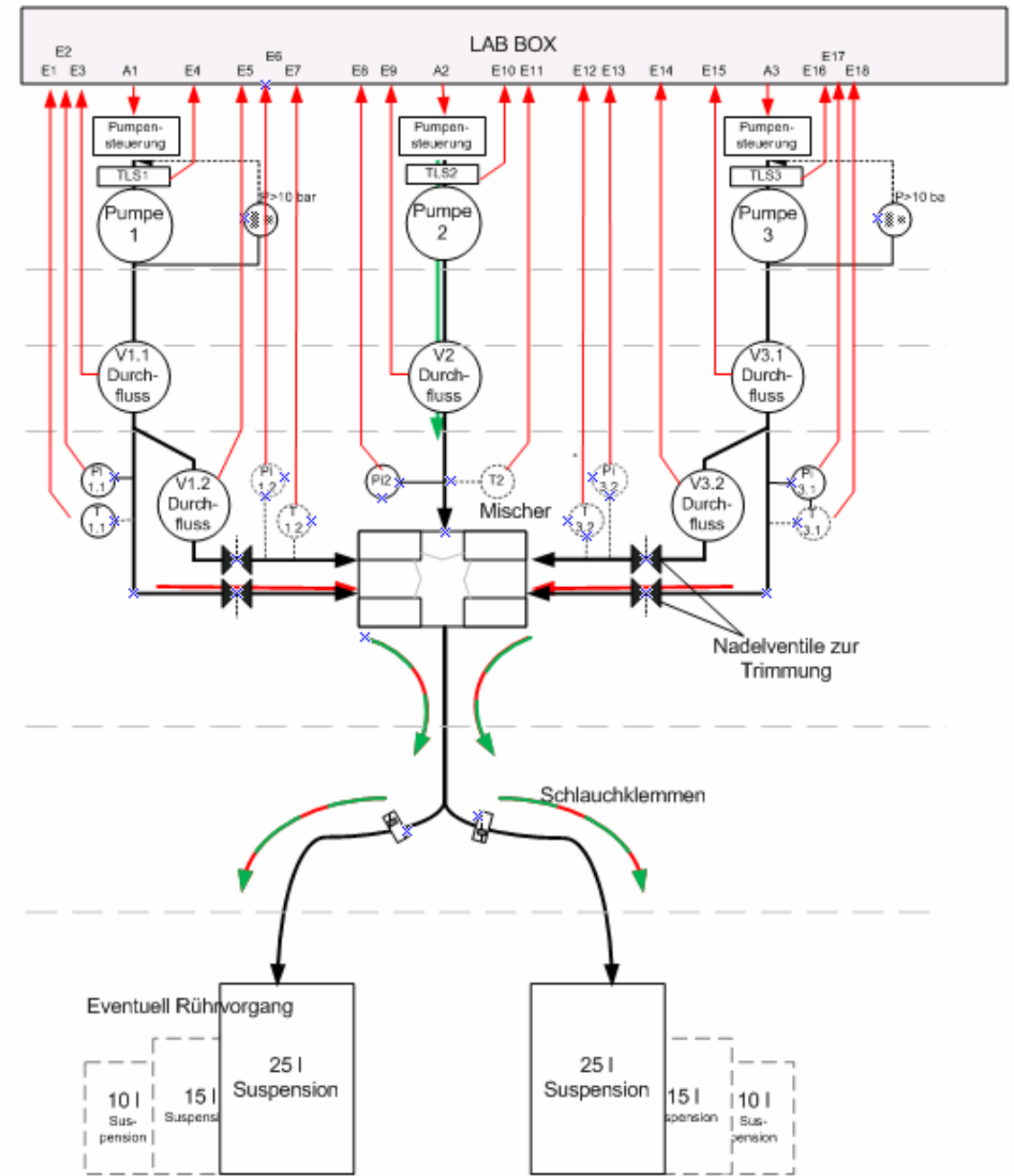


Abb. 5-II Mischen/ Präzipitieren Mess- und Regelkonzept

Kennzahlen des Prozessschrittes Mischen/ Präzipitieren:

- 50 Liter organische Lösungsmittel
- Betriebsdruck ca. 1 bar
- Betriebsdruck maximal ca. 4 bar
- Fehler-Spitzendruck ca. 10 bar bis 20 bar

5.2 Entwicklung des Prozessschrittes: Aufkonzentrierung

Nach der Präzipitation ist der Feststoffgehalt der PCMC-Suspension in Abhängigkeit von der Löslichkeit der Trägermaterialien ca. 0,5 % (m/v) oder sogar niedriger. Eine direkte Trocknung der Suspension wäre ineffizient, weil >> 99 % des Suspensionsmittels entfernt werden müssten. Daher wird ein Aufkonzentrierungsschritt zwischen beiden Prozessschritten eingeführt. Verschiedene Filtrations- und Zentrifugationstechnologien stehen für die Erhöhung der Feststoffkonzentration zur Verfügung, aber die geringe Partikelgröße der PCMC von 5 µm bis 50 µm ist für viele Technologien eine Herausforderung. Das Produkt kann bereits eine aufkonzentrierte Suspension oder ein noch weiter konzentrierter feuchter, kompakter Filterkuchen sein. Bevorzugt sollen kontinuierliche Technologien zum Einsatz kommen. 50 l bis 100 l PCMC-Suspension sollen um mindestens Faktor 10 bis 20 aufkonzentriert werden können. Folgende Technologien werden getestet:

- Nutschenfiltration
- Tangentialflussfiltration
- Kerzenfiltration
- Zentrifugation

Der Entwicklung dienen drei Modellformulierungen (Tab.5-W). Analog zur Mischerentwicklung wird die Trypsinogen-Valin Mikrokristallsuspension (Modellformulierung 1) getestet. Weiterhin werden Trypsin-Glycin Mikrokristallsuspensionen (Modellformulierung 3) und später Albumin-Glycin Mikrokristallsuspensionen (Modellformulierung 4) eingesetzt. Der Grund für den letzten Formulierungswechsel ist, dass Trypsin weniger gut auf Glycin gebunden wird (Kapitel 5.1.7.2). Die ungebundene oder schwach gebundene Proteinfraction verstopft die Filterporen, insbesondere die Metallfilterporen bei der Kerzenfiltration.

Die Bewertung des Aufkonzentrierungsprozesses erfolgt auf Basis folgender Größen:

- Filtrationsrate über die Zeit [ml/min] bzw. Aufkonzentrierungsrate [ml/min/cm²]
- Einflussfaktoren auf den Prozess
- Produktqualität: Feststoffgehalt, Proteinbeladung, Proteinbindung

Bei der Aufkonzentrierung sollen darüber hinaus die Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier nicht beeinträchtigt werden.

Tab. 5-W Modellformulierung 1,3 und 4

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
1	Tryp.gen (3,0)	Val (60)	-	4,8	0,32	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA

5.2.1 Nutschenfiltration mittels Vakuum

Polyvinylidendifluorid (= PVDF, Durapore, Millipore) ist ein Membranfiltermaterial, das resistent gegenüber organischen Lösungsmitteln ist und kaum Proteine adhäsiv bindet. Die Membranfiltration zur Kristallernte eignet sich besonders für die Analytik der Kristalle direkt nach der Präzipitation. In diesem Kapitel wird die Membranfiltration für größere Produktionsvolumina getestet. Membranfilter gibt es mit unterschiedlichen Durchmessern (47 mm, 101 mm, selbst zugeschnitten 300 mm). Membranfilter werden in eine entsprechende Halterung eingespannt. Mit Vakuum wird die Filtration beschleunigt. Das Verfahren wird während der Entwicklung diskontinuierlich betrieben. Dennoch kann durch den Einsatz von 3 bis 6 Nutschenapparaturen im Wechseleinsatz ein semikontinuierlicher Prozess aufgebaut werden. Dabei wird z. B. an einer Station die Nutsche zusammengebaut und mit Suspensionsmedium beladen, an der zweiten Station wird filtriert und an der dritten Station wird der Filterkuchen geerntet.

5.2.1.1 Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses

Albumin-Glycin Mikrokristalle dienen als Modell (Modellformulierung 4). Die mittlere Partikelgröße der Suspension ist 8 µm und es werden 15 l Suspension über einen PVDF-Membranfilter (Ø 300 mm, Poren-Ø 0,45 µm) filtriert.

Die Filtrationsrate nimmt am Filtrationsbeginn stark ab, weil sich nach und nach ein Filterkuchen aufbaut. Nach 10 min bestimmt der Filterkuchenwiderstand die Filtrationsrate, wie in der Darcy-Gleichung (Gl. 5-16) beschrieben. Die Filtrationsrate liegt nach 10 min bei ~ 400 ml/min. Die Aufkonzentrierungsrate ist in diesem Versuch 0,65 ml/min/cm². Darüber hinaus kann die Filtrationsrate durch die Vergrößerung des

Porendurchmessers beschleunigt werden. Ein Versuch zeigt, dass ein Porendurchmesser von 0,65 μm an statt der standardmäßigen 0,45 μm eine geringe Verbesserung der Flussrate ergibt. Weiterhin zeigt die Variation der effektiven Filterfläche der perforierten Platte keinen Einfluss auf die Filtrationsrate.

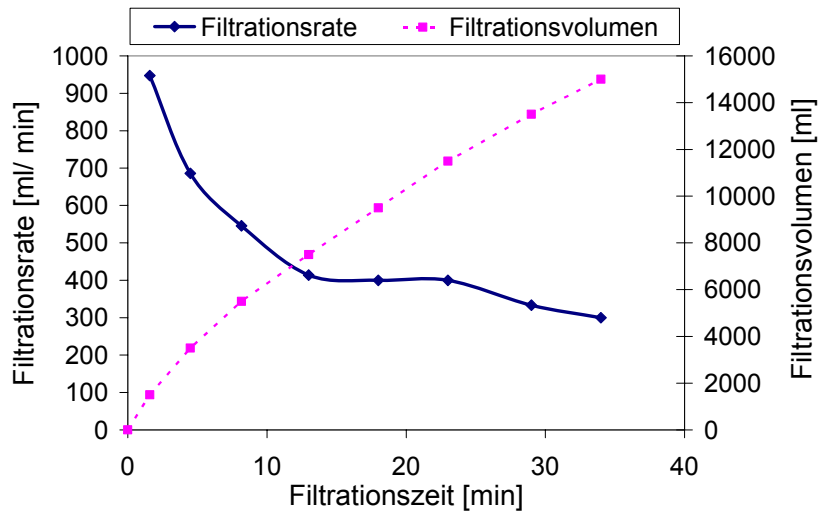


Abb. 5-JJ Filtrationsrate und –volumen von 15 l Albumin-Glycin Cokristallen bei 200 mbar

Vakuumeinfluss

Trypsin-Glycin ($\sim 12 \mu\text{m}$) sowie Albumin-Glycin ($\sim 8 \mu\text{m}$) Mikrokristalle werden über PVDF-Membranfilter ($\varnothing 300 \text{ mm}$, Poren- $\varnothing 0,45 \mu\text{m}$) unter Variation des Unterdruckes filtriert.

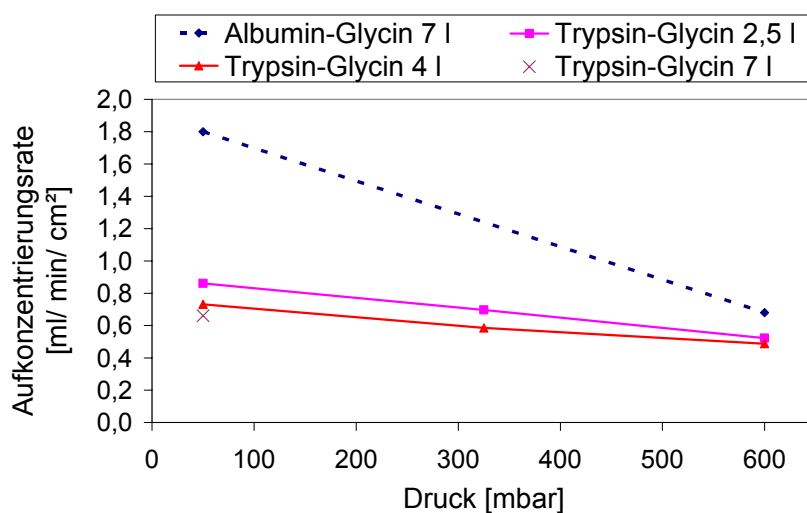


Abb. 5-KK Variation des Vakuums bei der Membranfiltration von Trypsin-Glycin und Albumin-Glycin Co-Kristallen

Mit zunehmendem Unterdruck bzw. zunehmender Druckdifferenz wird bei allen Modellsuspensionen die Filtrationsrate angehoben. Dieser Zusammenhang ist ebenfalls in der Darcy-Gleichung beschrieben (Gl. 5-16). Zwischen den getesteten Formulierungen zeigen sich die größten Unterschiede in der Filtrationsrate, wenn eine große Druckdifferenz zur Filtration genutzt wird. Albumin-Glycin Co-Kristalle lassen sich trotz vergleichbarer Höhe der Filterkuchen wesentlich schneller als Trypsin-Glycin Co-Kristalle vom Suspensionsmedium entfernen. Der Filterkuchen von Trypsin-Glycin Mikrokristallen ist nicht kompakter als der der Albumin-Glycin Formulierung und nicht die Ursache für die langsamere Filtration. Ein Erklärungsansatz für die schlechtere Filtration der Trypsin-Glycin Suspension kann sein, dass ungebundene Trypsinpartikel die Kapillaren im Filterkuchen verstopfen bzw. verkleben und damit die Filtration behindern. Es ist aus Kapitel 5.1.7.2 bekannt, dass Trypsin schlechter als Albumin auf Glycin gebunden wird.

5.2.1.2 Produktqualität nach der Nutschenfiltration

Das Endprodukt nach der Membranfiltration ist ein kompakter feuchter Filterkuchen, der zu einem harten trockenen Kuchen an der Luft trocknet. Die trockenen Partikel können durch Mahlung deagglomert werden. Weitere Untersuchungen werden mit einer Quadro Comil (Model 193, Quadro) durchgeführt, die mit zwei Siebgrößen und zwei Rührergeschwindigkeiten betrieben werden kann. Der trockene Albumin-Glycin Filterkuchen wird unabhängig von den Siebgrößen und den Rührergeschwindigkeiten der Mühle in eine mittlere Korngröße von 2,1 μm zerkleinert. Die mittlere Korngröße nach Deagglomeration entspricht der mittleren Korngröße nach Sprühtrocknung der verwendeten PCMC-Suspension. Weiterhin ist die Proteinbeladung nach Filtration und Mahlung gleich dem theoretischen Wert. Es wird also kein Protein durch die Siebmahlung abgeschilfert.



Abb. 5-LL Kompakter Filterkuchen von Albumin-Glycin Co-Kristallen nach Membranfiltration

5.2.2 Tangentialflussfiltration (TFF)

Die Tangentialflussfiltration ist eine ergiebige Methode PCMC-Suspensionen aufzukonzentrieren. Die Suspension wird tangential über die Filtermembran geführt und verhindert ein Anwachsen einer Filterkuchenschicht. Die Grenze der Filtration wird weitgehend durch die Membranporen bestimmt.

5.2.2.1 Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses

Am Beispiel der Albumin-Glycin Suspension (mittlere geometrische Teilchengröße in Suspension $\sim 8 \mu\text{m}$) und einer Mikrofiltrationskassette mit offenem Kanal (Hydrosart, Poren- \emptyset $0,45 \mu\text{m}$, $A = 1000 \text{ cm}^2$) wird die Tangentialflussfiltration zur Aufkonzentrierung von 5 l geprüft. Größere Volumina werden durch Parallelisierung der Membranen filtriert. In Tab. 5-X sind die Parameter der Versuche aufgelistet.

Beim ersten Lauf nimmt die Filtrationsrate (Abb. 5-A) sehr schnell ab, denn die Überströmung der Membran ist zu niedrig und das Retentatventil zu stark geschlossen, so dass sich sehr schnell eine Filterschicht auf der Membran bildet und das System verblockt.

Deshalb wird im zweiten Lauf die Pumpenleistung erhöht, das Retentatventil weiter geöffnet und das Permeatventil stärker für einen Gegendruck ausgehend von der Filtratseite geschlossen. Die Filtration beginnt mit 200 ml/min, es baut sich kein Filterkuchen auf und die Filtrationsrate bleibt konstant (Abb. 5-MM). Nach 10 min wird in zwei Schritten das Permeatventil von 0,8 bar auf 0,4 bar weiter geöffnet, um die Filtrationsrate von 200 ml/min auf 320 ml/min zu beschleunigen. Die eingestellten Drücke am Ende des zweiten Laufes ergeben einen Transmembrandruck von 0,4. Die Filtrationsrate verläuft bis zum Ende konstant ohne Filterschichtaufbau.

Diese optimalen Bedingungen werden in Lauf 3 überprüft und dort zeigt sich über die Filtrationszeit eine relativ konstante Filtrationsrate von 310 ml/min. Die Erhöhung der Überströmungsgeschwindigkeit kann also eine Filterverblockung effektiv verhindern.

Eine weitere Möglichkeit den Filterschichtenaufbau zu verhindern und schnell zu filtrieren, besteht in der Erhöhung des Transmembrandruckes (TMP). Dies wird in Lauf 4 getestet. Der TMP wird auf 1,5 bar eingestellt, indem das Retentatventil stärker geschlossen wird. 5 min lang wird eine Filtrationsrate von 820 ml/min erreicht, womit in dieser Zeit ca. 4 l an Suspensionsmittel entfernt werden. Danach baut sich durch die Ankonzentrierung eine Deckschicht auf der Filtermembran auf und die Filtrationsrate sinkt innerhalb weiterer 5 min auf 400 ml/min ab. Die Überströmung ist bei dem angelegten TMP zu niedrig und müsste daher deutlich erhöht werden, um einen

gleichmäßigen Filtrationsverlauf zu gewährleisten. Über eine ausreichend hohe Überströmung werden Scherkräfte auf der Membran erzeugt und die sich bildende Deckschicht auf der Filtermembran abgetragen. Andererseits können die entstehenden Scherkräfte die interpartikulären Bindungen zwischen Protein und Träger negativ beeinflussen. Dies wird im Folgenden betrachtet.

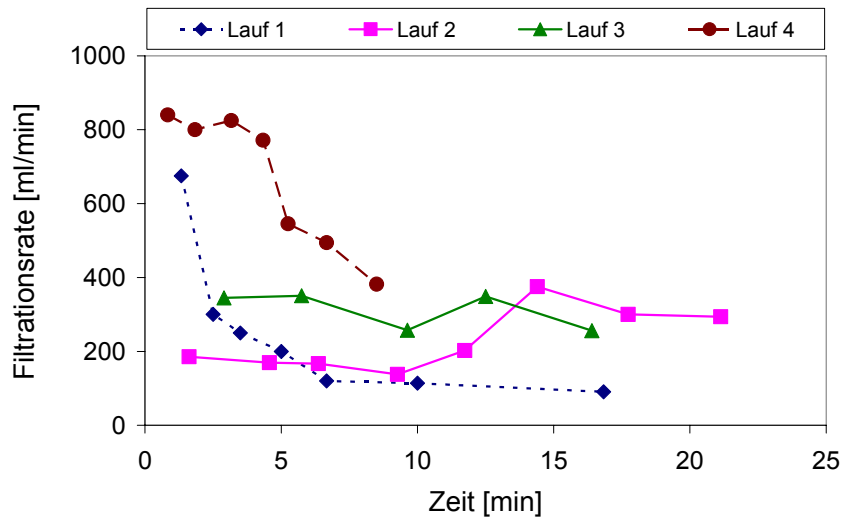


Abb. 5-MM Flussrate von jeweils 5 l Albumin-Glycin Suspensionen

Tab. 5-X Parameter der Tangentialflussfiltrationen mit Albumin-Trypsin Suspensionen

L	V	t	mittlere Filtrationsrate	Aufkonzentrierungsrate	P_{ein}	P_{Retentat}	P_{Permeat}	T	Pumpenleistung
f	[l]	[min]	[ml/min]	[ml/min/cm ²]	[bar]	[bar]	[bar]	M	[%]
1	3	17	250	0,25	3	1,2	0,2	1,9	20
2	5	21	229	0,23	1,5	0,2	(0,8) 0,4	0,4	34
3	5	16	312	0,31	1,8	0	0,4	0,5	34
4	5,4	8,5	665	0,67	2,8	1,6	0,4	1,5	34

5.2.2.2 Produktqualität nach der Tangentialflussfiltration

Mit der TFF wird eine konzentrierte, agglomeratfreie und homogene PCMC-Suspension erhalten. Der Feststoffgehalt der Läufe 2 bis 4 belegt mit 4,2 % (m/v) bis 6,6 % (m/v), dass die Albumin-Glycin Suspension um Faktor 10 aufkonzentriert wird. Die bei der Filtration auftretenden Scherkräfte verringern jedoch die gemessene Proteinbeladung wie aus Abb. 5-NN hervorgeht. Offensichtlich sind die

interpartikularen Bindungskräfte zwischen Protein und Carrier zu gering, um eine Trennung zu verhindern. Abb. 5-NN zeigt grafisch die Proteinbeladung vor und nach der TFF, die absolut um 1,4 % bis 2,1 % sinkt. Damit werden 14 % bis 21 % der Proteine während der TFF abgeschert und über das Filtrat entfernt. Die Menge an ungebundenem bzw. sehr schwach gebundenem Protein kann auch über die Sprühtrocknung annähernd bestimmt werden (Abb. 5-OO). Direkt nach Herstellung enthält die Suspension einen geringen Anteil von 4 % bis 9 % schwach gebundenem Protein. Nach der TFF erhöht sich dieser Anteil auf 31 % bis 53 %.

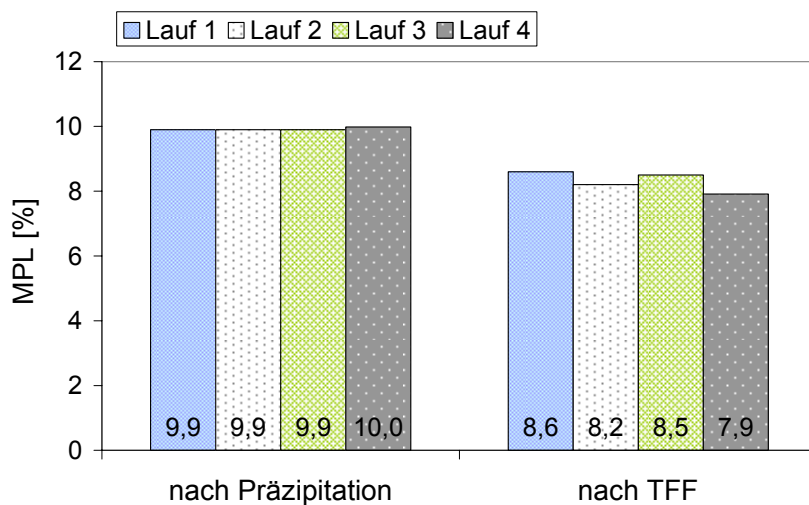


Abb. 5-NN Proteinbeladung vor und nach TFF von Albumin-Glycin Mikrokristallen

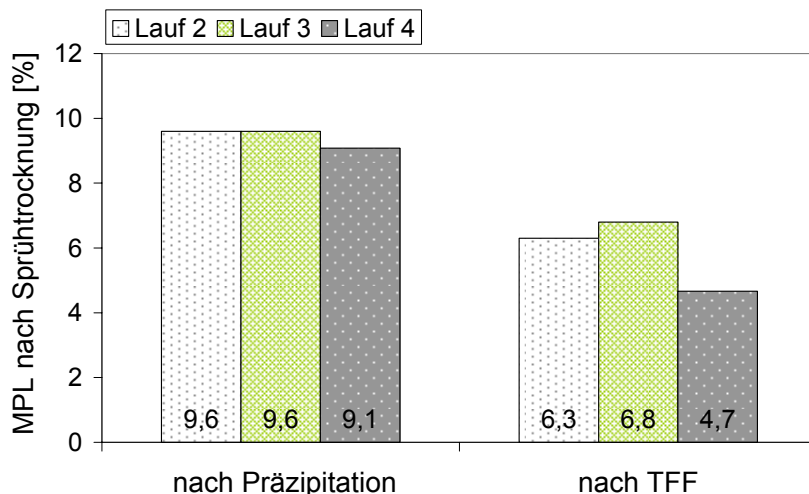


Abb.5-OO Proteinbeladung nach Sprühtrocknung zur Bestimmung der Bindungsstärke zwischen Albumin und Glycin von den Suspensionen vor und nach der TFF

Andere Modellsuspensionen weisen einen noch höheren Proteinverlust auf. Offensichtlich verändert die turbulente Strömung zwischen den Filtermembranen die PCMC Struktur derart, dass diese Methode nicht für die Aufkonzentrierung von PCMC-Suspensionen geeignet ist. Nur wenn es gelingt, die Bindungskräfte zwischen Protein und Träger deutlich zu erhöhen, bietet die Methode einen gut steuerbaren und einfach skalierbaren Prozess zur Aufkonzentrierung. Das Endprodukt ist ein homogenes Konzentrat.

5.2.3 Erweiterte Kerzenfiltration (*modified pressure filtration* MPF)

Aus Vorversuchen ergab sich, dass die Kerzenfiltration im Gegensatz zur TFF eine aussichtreiche Aufkonzentrierungsmethode für die scherempfindlichen PCMC-Suspensionen ist und weiter entwickelt werden soll. In diesem Abschnitt wird deshalb der Start der Entwicklung, der Wechsel zur Verbundfilterkerze, die Etablierung der Filterkerzenüberströmung und der Sedimentationszone erläutert. Dabei kommen Modellformulierung 1, 3 und 4 zum Einsatz wie in der Einleitung zu Kapitel 5.2 beschrieben wird (Tab. 5-W).

5.2.3.1 Entwicklungsstart

Trypsinogen-Valin Co-Kristalle werden mit dem DJI (2,0 mm, PP) unter Ultraschalleinfluss und bei 150 ml/min präzipitiert. Die Proteinbeladung der Partikel nach der Fällung entspricht 61 %. Die Suspensionspartikel von 3,5 µm werden über einen Taschenfilter (Fundabac TSD, Dr. Müller AG, Schweiz) vom Suspensionsmedium separiert, ohne das Protein abzuscheren. Die Proteinbeladung steigt nach der Filtration auf 92 % an. Das deutet darauf hin, dass ungebundenes Protein auf den PCMC durch die Druckfiltration niedergeschlagen wird.

Der bis zu 1 l Suspension fassende Filtrationsbehälter enthält in der Mitte eine Filtrationskerze. Die Filtration wird unter 1 bar – 3 bar durchgeführt. Der Filtrationsbehälter wird von unten durch eine nicht zwangsverdrängende Membranpumpe (max. 5 bar) befüllt (Ventil 8, 6, 1 sind geöffnet). Dann startet bei 2 bar die Vorfiltration bis zur Klarheit des Filtrates (Ventil 8, 6, 4 offen) und danach beginnt die eigentliche Filtration. Nach der Filtration wird die Pumpe ausgeschaltet und der Filter über die Filtratseite entlüftet (Ventil 4 noch offen). Im nächsten Schritt wird der Filterkuchen rückgespült, indem über Ventil 3 für 3 Sekunden ein- bis zweimal Druckluft (2 bar) auf die Filterkerze ausgehend von der Filtratseite aufgebracht wird (Ventil 1 offen). Dabei sedimentiert der Feststoff des Filterkuchens in den Konus des Kessels und kann durch

das Öffnen des Ventils 7 ausgebracht werden. Als Filtermittel dienen Filtergewebe aus verschiedenen Werkstoffen wie PP, PVDF oder PTFE. Nach Testung mehrerer Filter bewährt sich nur ein Gewebe aus Polypropylen und Resinat (M11 U 002/ 30). Das Filtrat war trotz Vorfiltration leicht trüb. Die Filtrationszeit für die 4 l Trypsinogen-Valin Suspension (tafelförmige PCMC Partikel) beträgt 5 h Stunden (16 ml/min) und ist damit sehr lang. Bei Einsatz von Glutamin als Träger, wodurch eine andere PCMC Morphologie entsteht, lässt sich die Filtrationszeit auf 32 min (125 ml/min) reduzieren. Die ersten Ergebnisse der Experimente zeigen durchaus, dass mit dieser Methode eine kontinuierliche und scherarme Apparatur zur PCMC Aufkonzentrierung entwickelt werden kann.

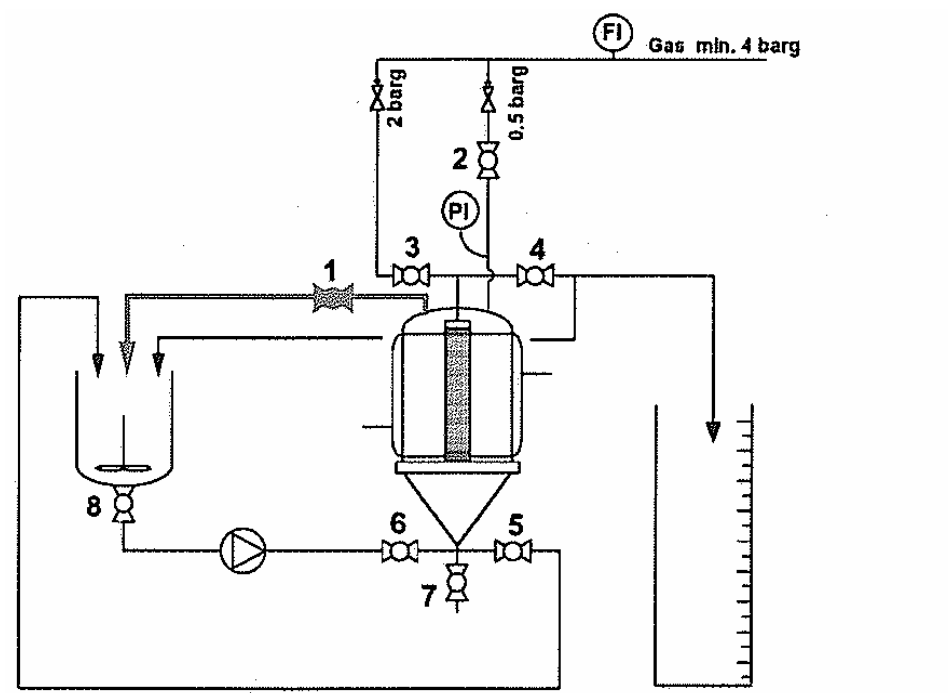


Abb. 5-PP Taschenfilter, Fundabac TSD, Dr. Müller AG

5.2.3.2 Wechsel zur Verbundfilterkerze und Etablierung der Filterkerzenüberströmung

Zur weiteren Prozessverbesserung wird ein neues Verbundfiltergewebe eingesetzt, um ein klares Filtrat zu erhalten (Absolta 2 µm der Firma Spörl). Der Filtrationstand wird weiterhin kontinuierlich betrieben, jedoch in wesentlich kürzeren Zyklen: Vorfiltration 20 s, Filtration 60 s. Ein neuer Zyklus startet ohne Entnahme des Filterkuchens, vielmehr wird der Kessel erst am Prozessende entleert. Des Weiteren wird die Membranpumpe nicht mehr ausgeschaltet, sondern die Suspension wird kontinuierlich von unten tangential in den Kessel gefördert. Am oberen Teil des Kessels befindet sich ein

Überlauf, der zurück in den Speisebehälter führt. Darüber hinaus ist der Kesselumfang schmaler konstruiert, damit die Kerze laminar überströmt werden kann. Bei der Testung des neuen Verbundfiltergewebes und des neuen Kessels, werden Trypsin-Glycin (Modellformulierung 3) und Albumin-Glycin (Modellformulierung 4) Suspensionen mit annähernd gleich großen Mikropartikeln von ca. 10 µm filtriert. Die Prozessparameter und Ergebnisse sind in Tab. 5-Y zusammengefasst. Generell lassen sich die Albumin-Glycin Mikrokristalle wesentlich besser als die Trypsin-Glycin Mikrokristalle aufkonzentrieren/ filtrieren. Die mittlere Filtrationsrate ist bei Albumin-Glycin im Vergleich zu Trypsin-Glycin fast doppelt so hoch. Es wird vermutet, dass dieser Unterschied durch ungebundenes Protein bedingt ist und die Filterporen damit verstopft werden. Wie in Kapitel 5.1.7.2 dargestellt, bindet Albumin besser auf dem Träger. Weiterhin kann festgehalten werden, dass die PCMCs in ihrer primären Partikelgröße und -morphologie unverändert bleiben. Das Filtrat ist nach der Vorfiltration von 20 s klar. Die Suspension ist um Faktor 3 bis 4 aufkonzentriert, der Feststoffgehalt beträgt 1,1 % bis 2,0 % (m/v). Durch die Absprengung des Filterkuchens liegen in der Endsuspension jedoch Agglomerate vor, die die Suspension inhomogen erscheinen lassen.

Tab. 5-Y Parameter und Ergebnisse der MPF für Modellformulierung 3 und 4

	Trypsin-Glycin	Albumin-Glycin
Pumpenleistung für die Überströmung [%]		30
Filtrationsdruck [bar]	2	1,8
Vorfiltrationszeit [s]		20
Filtrationszeit [s]	70	60
Reinigungsdruck [bar]		2
Reinigungszeit [s]		3
Filtrationsvolumen [l]	10 - 14	15 - 25
Filtrationsrate [ml/min]	78 - 308	260 - 660
MPL nach Präzipitation [%]	n. b.	9,8 – 9,9
MPL nach Kerzenfiltration [%]	n. b.	9,6 – 9,4
Produktaussehen	heterogene Suspension	

Während der Aufkonzentrierung wird der Einlass der Suspension am Kesselboden häufig durch das Sediment verstopft. Dies führt zur Idee, den Kessel mit einer Sedimentationszone unterhalb des Einlasses auszustatten. Unterhalb der Sedimentationszone werden zwei Ventile angebracht, um während der Prozesses Konzentrat

entleeren zu können. Das aufgefangene Konzentrat wird gerührt und ein homogenes Aufkonzentrierungsprodukt erhalten (siehe folgendes Kapitel 5.2.3.3).

5.2.3.3 Etablierung der Sedimentationszone und Testung erhöhter Suspensionsvolumina

50 l einer Albumin-Glycin-Suspension (Modellformulierung 4) werden wie im Methodenteil unter 4.1.2.3 beschrieben über die Verbundfilterkerze filtriert.

Der Gesamtprozess zur Aufkonzentrierung von 50 l Albumin-Glycin Suspension auf 3,8 l Konzentrat dauert 157 min. Ein Restvolumen von 1,7 l verbleibt in der Anlage. Das Filtratvolumen ist 44,5 l. Daraus ergibt sich ein Aufkonzentrierungsfaktor von 13, wenn nur das Konzentrat berücksichtigt wird. Es ergibt sich jedoch ein Aufkonzentrierungsfaktor von 9, wenn neben dem Konzentrat das Restvolumen im Kessel mit berücksichtigt wird. Die mittlere Filtrationsrate ist 283 ml/min. Die Filtrationsrate nimmt bedingt durch einen leichten Schichtaufbau auf der Verbundfilterkerze über den Prozess kontinuierlich ab. Die Proteinbeladung vor der Filtration ist 9,7 %, und nach der Filtration 9,6 %. Demnach ist Albumin während der Filtration nicht abgeschert und verloren gegangen.

Der Feststoffgehalt des Retentats steigt während der Filtration von Albumin-Glycin Mikrokristallen über die Zyklenzahl nur geringfügig an. Das bedeutet, dass sich das Retentat kaum aufkonzentriert, sondern die Aufkonzentrierung vor allem durch die Sedimentation des Materials in die Zone unterhalb des Kessels erfolgt. Die Sedimentationszone wird im hier dargestellten Versuch nach jeweils 10 Zyklen entleert, damit der Eingang des Kessels für die Suspension nicht verstopft.

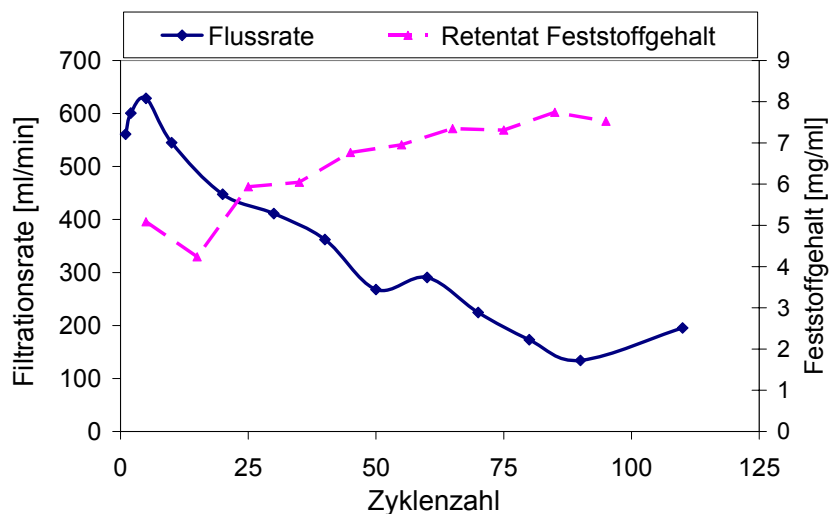


Abb. 5-QQ Flussrate über Zyklenzahl von 50 l Albumin-Glycin Suspension

Tab. 5-Z Ergebnisse der Kerzenfiltration von 50 l Albumin-Glycin Suspension

Albumin-Glycin Suspension 50 l	
Zyklenanzahl	120
mittlere Filtrationsrate [ml/min]	283
Aufkonzentrierungsrate gesamter Prozess [ml/min/cm ²]	1,3
Aufkonzentrierungsfaktor	13
MPL nach Präzipitation [%]	9,7
MPL nach Kerzenfiltration [%]	9,6
Produktaussehen	homogene Suspension

5.2.3.4 Reproduzierbarkeit der Filtrationsrate

Albumin-Glycin Mikrokristalle können mit der Kerzenfiltration aufkonzentriert werden. Bei allen Prozessen, bei denen Volumina zwischen 20 l und 50 l verarbeitet werden, sinkt die Filtrationsrate über die Zeit ab. Trotz Reinigung und Überströmung bildet sich auf der Filterkerze eine Partikelschicht. Die Aufkonzentrierungsfaktoren der drei Suspensionen ist variabel zwischen 5 und 20 einstellbar, je nachdem wie häufig die Sedimentationszone während der Filtration entleert wird und ob das Restvolumen des Kessels dem Konzentrat hinzugegeben wird oder nicht. Die PCMC sind sowohl vor als auch nach der Kerzenfiltration gleichermaßen mit Protein beladen.

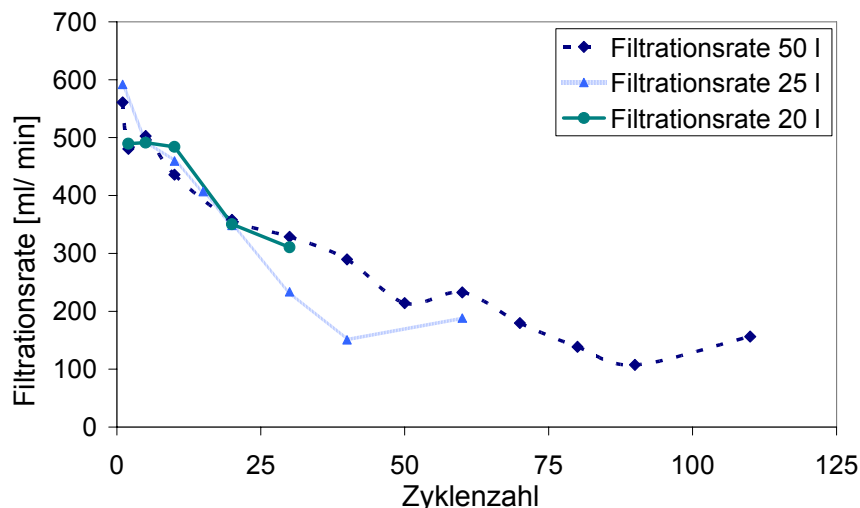


Abb. 5-RR Filtrationsraten über Zyklen von Albumin-Glycin Suspensionen

5.2.3.5 Filtrationen weiterer Modellsuspensionen

Tab. 5-AA Parameter und Ergebnisse der MPF für Modellformulierung 5 und 7

	IgG I-Glycin	IgG III-Glycin
Pumpenleistung für die Überströmung [%]		30
Filtrationsdruck [bar]	2	1,8 - 2
Vorfiltrationszeit [s]		20
Filtrationszeit [s]		60
Reinigungsdruck [bar]		2
Reinigungszeit [s]		3
Volumen [l]	12	15
Suspensionsmedium	95 % 2M1P	95 % IPA
Zyklenanzahl	5	27
mittlere Filtrationsrate [ml/min]	1244	462
Aufkonzentrationsrate gesamter Prozess [ml/min/cm ²]	3,8	1,0
Aufkonzentrationsfaktor	16	12
MPL nach Präzipitation [%]	10,2	9,9
MPL nach Kerzenfiltration [%]	10,2	10,0
Produktaussehen	homogene Suspension	

Mit der Kerzenfiltration können weitere Modellformulierungen aufkonzentriert werden. Die IgG I-Glycin Suspension filtrierte aufgrund der großen Teilchengröße von 50 µm sehr gut. Dies spiegelt sich zum einen in der hohen Filtrationsrate von 1244 ml/min und zum anderen in der niedrigen erforderlichen Zyklanzahl (5) wieder. Der Aufkonzentrationsfaktor ist 12 und damit im gewünschten Bereich von 10 bis 20. Während der Filtration bleiben die PCMC unverändert. Das aufkonzentrierte Produkt ist eine homogene Suspension, die direkt in die Trocknungseinheit überführt werden kann. Die IgG III-Glycin Suspension lässt sich ebenfalls gut filtrieren und in homogenes Konzentrat überführen (Tab. 5-AA).

Je nach Modellsuspensionen muss der Prozess durch den Anwender leicht angepasst werden. Dabei ist die wichtigste Kontrollgröße der Druck. Steigt dieser während der Filtration, baut sich nach und nach ein Filterkuchen auf. Um den Kuchenaufbau und damit die Sekundäragglomeratbildung zu verringern, muss der Filtrationsdruck begrenzt und die Filtrationszeit verkürzt werden. Zugleich müssen Frequenz der Filterkerzenreinigung und Überströmung erhöht werden.

Die erweiterte Kerzenfiltrationseinheit (*modified pressure filtration unit*) ist ein Verfahren zu Aufkonzentrierung von PCMC mit dem > 90 % des Suspensionsmediums entfernt werden können. Zusammenfassend ist das Wesentliche dieser Anlage die Kombination verschiedener Technologien. In diesem Prozess wird analog zur TFF ein Kuchenaufbau weitgehend vermieden, so dass die Abhängigkeit vom Filterkuchenwiderstand vernachlässigbar wird. Die Reduzierung der Filterkuchenbildung wird durch vier Mechanismen erzielt:

- Tangentialer Einlass der Suspension in den Filtrationskessel, so dass im Kessel eine rotierende Strömung um die Filterkerze herum vorliegt. Die Partikel werden hierdurch von der Filterkerze weg bewegt.
- Die Suspension überströmt die Filterkerze, wodurch der Kuchenaufbau reduziert wird.
- Der Verbundfilter wird durch periodisches Rückspülen mit Luft bzw. Stickstoff gereinigt.
- Durch die Sedimentationszone im Kessel kann dem Prozess kontinuierlich Feststoff entzogen werden, wodurch die Verschlechterung der Filtrationsrate reduziert wird und die Viskosität der aufzukonzentrierenden Suspension weitgehend konstant bleibt.

5.2.4 Zentrifugation

Unter Ausnutzung der Massenträgheit können die Feststoffpartikel beschleunigt mit der Zentrifugation vom Suspensionsmittel getrennt werden. Damit können einerseits trocken geschleuderte Filterkuchen und andererseits Konzentrate erhalten werden.

5.2.4.1 Vertikalzentrifugation

Getestet wird eine Vertikalzentrifuge (GFT V 300-0, Heinkel) mit Siebtrommel und Filtergewebe. Dabei werden 31 l einer Albumin-Glycin Suspension mit einer mittleren Partikelgröße von 8 µm filtriert, wie im Methodenteil unter 4.1.2.4 beschrieben.

Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses

31 l PCMC-Suspension können über den Filterbeutel (Multi 05-4-660, Sefar) bei 1000 upm (\cong 177g) innerhalb von 11 min separieren werden. Das Ergebnis ist ein dünner Filterkuchen und ein trübes Filtrat. Der sich aufbauende Filterkuchen beeinflusst die Filtrationsrate (2730 ml/min) aufgrund der großen Filtrationsfläche

(1410 cm²) nur geringfügig. Das trübe Filtrat wird erneut zweimal über den aufgebauten Filterkuchen gegeben, bis die Trübung des Filtrates auf 30 FNU abgesunken ist. Die Trübung wird bedingt durch die PCMC Partikelgröße. Die Größe ist teilweise so gering, dass sie durch die Poren (10 µm) des Filterbeutels gelangen können. Die errechnete mittlere Aufkonzentrierungsrate berücksichtigt die Filterfläche und ist bei diesem Prozess 2,0 ml/min/cm². Berücksichtigt man die erneute Beladung des Filtrates über die Zeit und das Trockenschleudern am Ende des Prozesses, ergibt sich eine Aufkonzentrierungsrate von 0,48 ml/min/cm² (= 31000 ml/46 min/1410 cm²). Die getestete Anlage ist für größere Suspensionsmengen (≥ 100 l) ausgelegt.

Produktqualität nach der Vertikalzentrifugation

Das Endprodukt nach der Vertikalzentrifugation ist ein kompakter Filterkuchen, der zu einem sehr harten Kuchen an der Luft trocknet. Die Partikel können durch Mahlung analog zu dem Filterkuchen nach der Membranfiltration deagglomeriert werden. Die Proteinbeladung der Modellsuspension ist nach der Präzipitation 9,9 % und nach der Zentrifugation 9,1 %. Damit gehen relativ 8 % des Albumins verloren. Diese Proteinmenge entspricht der schwach bzw. ungebundenen Proteinfraction, die nach der Präzipitation und Sprühtrocknung bestimmt wurde (siehe Abb.5-00).



Abb. 5-SS Albumin-Glycin-Filterkuchen nach Vertikalzentrifugation

5.2.4.2 Becherzentrifugation

Mit der Becherzentrifuge (ADP 75, Celeros, JM-Separation) werden kontinuierlich 10 l einer Albumin-Glycin Suspension (9 µm) von unten in einen Edelstahlbecher (Fassungsvermögen 1 l) gefördert. Am oberen Teil des Edelstahlbeckers wird das Filtrat kontinuierlich unter Zentrifugation des Beckers abgeführt. Dabei verbleiben die Mikrokristalle im Becher und bilden den Rückstand, der nach dem Stoppen der Zentrifuge geerntet wird. Bei der Kristallernte gibt es zwei Fraktionen. Die erste Fraktion ist eine flüssige Drainage (Totvolumen des Edelstahlbeckers) und die zweite Fraktion ist eine

pastöse Kristallfraktion, die durch das hydraulische Herunterfahren eines Stößels geerntet wird.

Filtrationsrate über die Zeit und Einflussfaktoren des Prozesses

Die Laboranlage (ADP 75, Celeros) hat ein Becherfüllvolumen von 1 l und wird mit einer Radialbeschleunigung von 1000g bis 10000g betrieben. Die Filtrationsrate entspricht der Förderrate der Suspension, die in beiden dargestellten Experimenten 1000 ml/min beträgt. Die Verweilzeit der Kristalle im Becher der Zentrifuge wird durch die Förderrate und die g-Zahl bestimmt. Das Filtrat ist in beiden Versuchen trüb. Bei 1000g ist die Trübung 145 NTU. Die Trübung des Filtrats kann bei 10000g auf 43 NTU verringert werden. Verursacht wird die Trübung von ausgetragenen PCMC, die im Mittelwert eine Partikelgröße von 2,3 µm aufweisen.

Produktqualität nach der Becherzentrifugation

Das Endprodukt unterteilt sich in eine flüssige Drainage- und eine pastöse Kristallfraktion, die in diesen Versuchen separat aufgefangen werden. Analog zu der Kerzenfiltration, könnte die pastöse Fraktion mit der flüssigen Drainagefraktion für die Weiterverarbeitung vermischt werden.

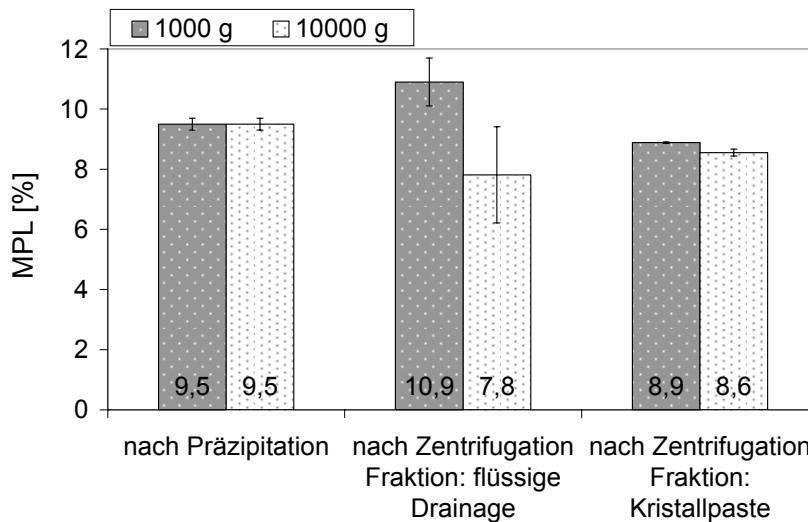


Abb. 5-TT Proteinbeladung von Albumin-Glycin Co-Kristallen nach Präzipitation und Becherzentrifugation

Während der Filtration sinkt die Proteinbeladung der pastösen Fraktion von 9,5 % auf 8,9 % bei 1000g und auf 8,6 % bei 10000g, womit relativ 6 % bzw. 9 % des Albumins verloren gegangen sind. Dieser Anteil entspricht der ungebundenen bzw. schwach gebundenen Proteinmenge der Modellformulierung Albumin-Glycin. Dabei gilt, je höher

die Kräfte ($1000g > 10000g$), die auf die PCMC einwirken, desto größer ist der Bindungsverlust zwischen Proteinen und Trägern. Die in der Drainage vorliegenden PCMC zeigen bei $1000g$ eine erhöhte bzw. bei $10000g$ eine verringerte Proteinbeladung (und eine hohe analytische Standardabweichung siehe Abb. 5-TT). Bei $1000g$ sammelt sich offensichtlich das ungebundene Protein eher in der Drainage statt im Filtrat, bei $10000g$ ist dies genau umgekehrt.

Aus den Versuchen wird abgeleitet, dass die Becherzentrifuge eine gute Option zur PCMC-Aufkonzentrierung ist, wenn die interpartikulären Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Trägern stark genug sind. Mikropartikel im untersten Mikrometerbereich ($1\ \mu\text{m}$ bis $3\ \mu\text{m}$) sind nur bei relativ hohen g-Zahlen vom Suspensionsmedium zu separieren. Mit einer Flussrate von $1000\ \text{ml/min}$ wird die Zentrifuge kontinuierlich beladen und das Filtrat in der gleichen Geschwindigkeit ausgebracht. Ist der Feststoffgehalt der PCMC-Suspensionen $0,5\ \%$ (m/v) können mit der getesteten Maschine $100\ \text{l}$ bis $150\ \text{l}$ Suspension aufkonzentriert werden. Beide Endproduktfraktionen können separat oder getrennt in einem sterilen Beutel aufgefangen und direkt in die Trocknungseinheit überführt werden. Abschließend bleibt anzumerken, dass es die Apparatur noch nicht in einer ex-geschützten Ausführung gibt.

5.2.5 Diskussion des Prozessschrittes Aufkonzentrierung

Die verschiedenen Aufkonzentrierungsmethoden unterliegen unterschiedlich technologischen Trennprinzipien. Im Folgenden sind die Kernergebnisse der Methoden (Tab. 5-BB) und ein Leitfaden zur Findung einer geeigneten Aufkonzentrierungsmethode (Abb. 5-UU) erarbeitet. Prinzipiell sollten der Weg der Endtrocknung und die Applikation bekannt sein, damit das geeignete Aufkonzentrierungsverfahren ausgewählt werden kann.

Tab. 5-BB Kernergebnisse der Aufkonzentrierungstechnologien unter Verwendung von Albumin-Glycin Mikrokristallsuspensionen

Methode	Nutschen- filtration	Tangential- fluss- filtration (TFF)	Erweiterte Kerzen- filtration (MPF)	Vertikal- zentri- fugation	Becher- zentri- fugation
Separations- prinzip	Kuchen- filtration unter Vakuum	Querstrom- filtration	Sedimentation, Kuchenfiltration unter Druck, Querstrom- filtration	Zentri- fugation über Filter- beutel	Zentri- fugation ohne Filterbeutel
Prozess					
Volumen	bis 15 l über Ø 30 cm	6 l	bis 50 l	31 l	10 l
Filtrationsrate [ml/min]	300 - 900	310 - 820	260 - 660	2730	1000
Filterporen-Ø	0,45 µm	0,45 µm	2 µm (nominal)	10 µm	-
Filtergröße	683 cm ²	1000 cm ²	214 cm ²	1410 cm ²	-
Kapazität für 100 l	6 Nutschen	Filterfläche vergrößern	2 Kerzenfilter	gleiche Anlage	gleiche Anlage
Produktqualität					
Endprodukt	harter Filterkuchen ↓ weiterer Mahlschritt nötig	homogenes Konzentrat	heterogenes Konzentrat, das durch Rühren homogenisiert wird + Totvolumen des Kessel (1 l)	sehr harter Filter- kuchen ↓ weiterer Mahl- schritt nötig trüb	pastöses Konzentrat + aufkon- zentrierte Drainage (1 l)
Filtrat	klar	klar	Vorfiltrat trüb, Filtrat klar	trüb	leicht trüb
relativer Proteinverlust durch Aufkonzen- trierungs- verfahren	kein Verlust Filterkuchen hält Protein- partikel zurück	14% - 21 %	1 % - 4 % Filterkuchen hält Proteinpartikel zurück, Sedimentations- zone verringert nochmals Verlust	8 %	6 % - 9 %

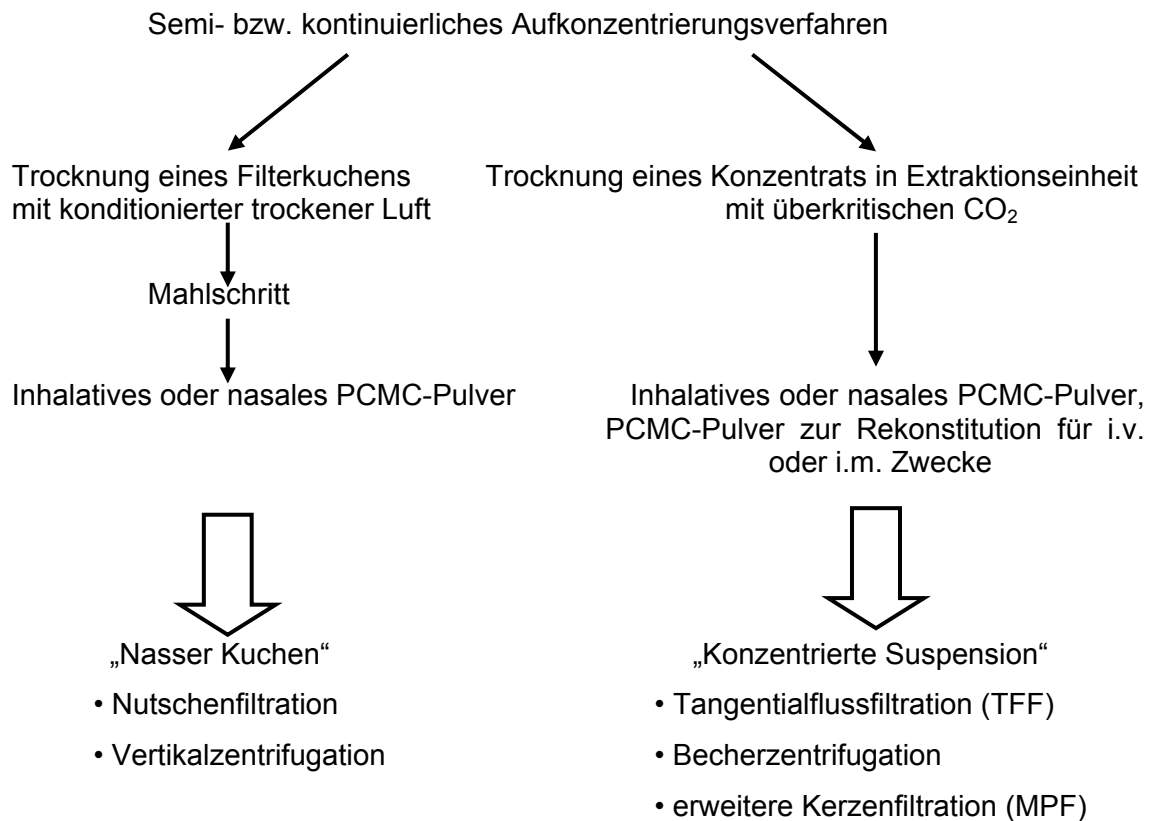


Abb. 5-UU Entscheidungsleitfaden

Soll das PCMC-Pulver inhalativ oder nasal als Pulver appliziert werden, kann die Suspension sehr gut mit der Nutschenfiltration oder mit der Vertikalzentrifugation aufkonzentriert werden. Bei der Nutschenfiltration entsteht mit der Modellformulierung Albumin-Glycin ein klares Filtrat, während bei der Vertikalzentrifugation ein trübes Filtrat aufgrund des größeren Porendurchmessers des Filterbeutels resultiert. Bei beiden Methoden bleibt ein feuchter kompakter Filterkuchen zurück. Im Filterkuchen verbleibt nur wenig Restsuspensionsmittel, das nach der Aufkonzentrierung unter konditionierter trockener Luft entfernt wird. Der kompakte Filterkuchen muss anschließend wieder in die einzelnen Mikropartikel zerkleinert werden. Deshalb ist eine Mahlung unabdingbar. Die vorliegende Studie zeigt, dass der Filterkuchen durch Mahlung wieder in die Primärpartikelgröße der PCMC zerkleinert werden kann und dass sich die Proteine weiterhin auf den Trägern befinden. Das Deagglomerationsverfahren muss jedoch ausreichend schonend sein, um Hitzeentwicklung, Scherstress und eine mögliche polymorphe Umwandlung während der Mahlung zu vermeiden. Die Auswirkung der Mahlung auf die Proteinintegrität und Proteinstabilisierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Sollen die Mikropartikel pulmonal, nasal oder parenteral nach Rekonstitution appliziert werden, wird das Restlösemittel bevorzugt über eine Extraktion entfernt. Bei der

parenteralen Applikation verbietet sich ein nachgelagertes Mahlverfahren aufgrund des möglichen Eintrags von Fremdpartikeln. Aus ökonomischen Gründen ist es sinnvoll, ein PCMC Konzentrat in die Extraktionseinheit zu überführen. Ein Konzentrat wird mit der Tangentialflussfiltration, der erweiterten Kerzenfiltration und mit der Becherzentrifugation erhalten.

Mit der Tangentialflussfiltration wird zwar ein homogenes Konzentrat erzeugt, jedoch werden die PCMC stark beansprucht, da während der Filtration der Filterkuchen auf der Filtermembran durch Turbulenzen abgetragen wird. Die dabei auftretenden Scherkräfte können die interpartikulären Bindungen zwischen Protein und Carrier zerstören. Beispielsweise verliert die Modellformulierung Albumin-Glycin in den Versuchen 14 % bis 21 % des Albumins. Im Vergleich zu anderen getesteten Methoden weist die Tangentialflussfiltration den höchsten Proteinverlust auf. Deshalb sollte die Tangentialflussfiltration nur dann zum Einsatz kommen, wenn besonders starke interpartikuläre Bindungen zwischen Protein und Träger vorliegen.

Durch Zentrifugation im Becher wird ein pastöses Konzentrat produziert, das mit der flüssigen Drainage bei Bedarf vermengt werden kann. Während der Zentrifugation bei 1000g bis 10000g werden nur sehr schwache Bindungen zwischen Protein und Träger zerstört und ungebundenes Protein mit dem Filtrat entfernt. Die Proteinbeladung ist im Vergleich zur Ausgangssuspension (Albumin-Glycin Mikrokristalle) um 6 % bis 9 % verringert.

Auch mit der erweiterten Kerzenfiltration kann ein Konzentrat erhalten werden. Das Konzentrat, das sich aus abgesprengtem Filterkuchen und sedimentierten Partikeln zusammensetzt, sammelt sich in der Sedimentationszone. Es wird diskontinuierlich durch den Anwender entleert und muss durch Rühren homogenisiert werden. Nach der Filtration kann das dickflüssige Konzentrat mit dem Totvolumen des Kessels verdünnt werden. Die Aufkonzentrierung mit dieser Methode beruht auf der Kombination verschiedener Prinzipien. Zum einen findet eine Kerzenfiltration über einen Metallverbundfilter mit Druck statt. Um den Filterkuchenwiderstand zu verringern, wird die Filterkerze periodisch mit Druckluft ausgehend von der Filtratseite gereinigt und ständig laminar überströmt. Über die Beobachtung der Filtrationsrate, die über die Zeit abnimmt, kann geschlussfolgert werden, dass es trotz der Maßnahmen zu einem leichten Filterkuchenaufbau bzw. zu einer leichten Verstopfung der Filterporen kommt. Weiterhin beruht die Aufkonzentrierung mit der erweiterten Kerzenfiltration auf der Sedimentation der Mikropartikel in eine speziell konstruierte Sedimentationszone. Insbesondere bei der gut sedimentierenden Albumin-Glycin Suspension zeigt sich der Vorteil, denn durch den Einbau der Sedimentationszone liegt der Proteinverlust während der Aufkonzentrierung bei 1 %. Ohne Sedimentationszone liegt er bei 4 %. Im

Vergleich zu den anderen Aufkonzentrierungsmethoden sind die Proteinverluste bei der erweiterten Kerzenfiltration am geringsten.

Die erweiterte Kerzenfiltration ist nunmehr die gewählte Methode zur Aufkonzentrierung, denn die interpartikulären Bindungen werden durch die geschickte Kombination der Filtrations-/ Abtrennungstechnologien am wenigsten beansprucht.

Abschließend sind die Vorteile der erweiterten Kerzenfiltration (MPF) zusammengetragen:

- hohe Filtrationsraten bei geringen Filterflächen
- kein wesentlicher Proteinverlust durch Abscherung von Proteinen
- leicht realisierbarer *scale-up*
- keine hohen Ex-Schutz Anforderungen, da der Filtrationskessel ausschließlich pneumatisch betrieben wird
- hohe Feststoffanteile durch diskontinuierliche Entleerung des Kessels bzw. der Sedimentationszone realisierbar

5.2.6 Technische Umsetzung

Die Nutschenfiltration, die Tangentialflussfiltration und die erweiterte Kerzenfiltration stehen im Basisentwicklungslabor zur Aufkonzentrierung für die PCMC-Herstellung zur Verfügung. Dabei dürfen 50 l PCMC-Suspension unter einem begehbaren Abzug mit CO₂-Löschanlage mit einer Aufkonzentrierungstechnik bearbeitet werden. Mit einer Nutschenapparatur (Ø 30 cm, Eigenbau) können ca. 15 l PCMC-Suspension filtriert werden. Bei größeren Volumina ist eine Parallelisierung mehrerer Nutschen nötig. Die TFF-Einheit kann mit 5 Membranen je 1000 cm² Filterfläche bestückt werden, womit ca. 50 l PCMC-Suspension aufkonzentriert werden können. Über die erweiterte Kerzenfiltration, die nunmehr die bevorzugte Methode ist, können 50 l einer gut sedimentierenden PCMC-Suspension separiert werden (Abb. 5-WW). Die reine Filtrationszeit einer 50 l Albumin-Glycin Suspension benötigt mit der erweiterten Kerzenfiltration 160 min. Bei größeren Volumina wird auch hier eine Parallelisierung vorgeschlagen, damit der Filtrationsprozess innerhalb von 3 Stunden durchführbar ist. In Abb. 5-VV ist die Prozessanalyse der erweiterten Kerzenfiltration zusammengefasst. Vakuumpumpe und Membranpumpe sind entsprechend der Zündquellenanalyse spezifiziert. Das Filtrat ist aufzufangen und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu entsorgen. Der Rückstand, der mindestens um Faktor 10 aufzukonzentrieren ist,

wird dem letzten Prozessschritt übergeben, d. h. bei 50 l PCMC-Suspension sind maximal 5 l endzutrocknen.

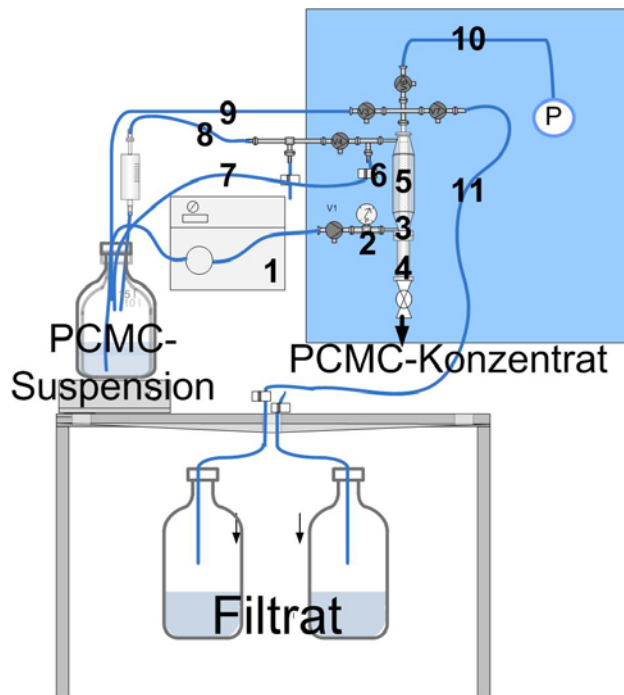


Abb. 5-VV Aufkonzentrierung mit der erweiterten Kerzenfiltration (MPF), 1 – Membranpumpe, 2 – Druckmanometer für Filtration, 3 - tangentialer Einlass, 4 - Sedimentationszone, 5 – Filterkerze, 6 – Schlauchklemme zur Einstellung des Filtrationsdruckes, 7 – Auslass für Crossflow, 8 – Auslass für Suspension beim Absprengen des Filterkuchens, 9 – Vorfiltrat, 10 – Druckluft zur Abreinigung der Filterkerze, 11 - Filtrat



Abb. 5-WW Prozessanalyse erweiterte Kerzenfiltration (MPF)

5.3 Entwicklung des Prozessschrittes: Endtrocknung

Dieser Prozessschritt entfernt das Suspensionsmedium möglichst vollständig, so dass ein trockenes Pulver als Endprodukt resultiert. Eine ausreichende Trocknung ist wichtig, denn eine zu hohe Restfeuchte kann die Stabilität der PCMC nachteilig beeinflussen. Das zu trockene Gut ist durch den Aufkonzentrierungsschritt für die konvektive Trocknung vorbereitet. Der einfachste Weg ist, das Suspensionsmedium an der Luft verdunsten zu lassen. Unter Zuführung von Wärmeenergie kann dieser Prozess wie bei der Sprühtrocknung beschleunigt werden und man spricht dann von Verdampfung. Das Suspensionsmedium kann auch durch Extraktion physikalisch entfernt werden.

5.3.1 Trocknung an der Luft

Die Trocknung erfolgt an konditionierter trockener Luft in einer mit Druckluft durchfluteten Box über mindestens 12 h. Das zu trockene Gut ist dabei ein feuchter Filterkuchen, wie er nach der Nutschenfiltration oder Vertikalzentrifugation erhalten wird. Diese Art der Trocknung hat sich insbesondere für analytische Zwecke der PCMC bewährt.

5.3.1.1 Einfluss der Lufttrocknung auf die Produktqualität

Der während der Aufkonzentrierung über Nutschenfiltration oder Vertikalzentrifugation gebildete Filterkuchen ist kompakt und wird während der Trocknung nicht bewegt. Das Ergebnis ist ein kompakter trockener Filterkuchen. Dabei haben Schichtdicke des Filterkuchens und Wasseranteil im Suspensionsmedium Einfluss auf die Trocknungszeit.

5.3.1.2 Weiterer Prozessschritt

Der kompakte trockene Filterkuchen kann durch Mahlung wieder in die Primärpartikel des Kuchens zerlegt werden. Am Beispiel eines Albumin-Glycin Filterkuchens erfolgt die Deagglomeration der Partikel durch Siebmahlung (Quadro Comil, Model 193). Die resultierende Primärpartikelgröße ist 2 μm ($\text{LD}_{x_{50}}$). Während der Mahlung wird der feste Filterkuchen von oben auf ein stark konisch geformtes Sieb gegeben. Der Rührer verteilt das Material auf dem Sieb und drückt es durch die Siebporen. Die wirkenden

Kräfte bei der Zerkleinerung sind Scher-, Reibungs- und Druckkräfte. Wie in Kapitel 5.2.5 diskutiert, kann die eingebrachte Energie während der Mahlung polymorphe Veränderungen begünstigen oder sich schädigend auf das Protein auswirken. Für analytische Zwecke wird daher der Filterkuchen mit einem Kartenblatt deagglomeriert.

5.3.2 Sprühtrocknung

Mikrosuspensionen und deren Konzentrate können durch Zerstäuben der Suspension in einem warmen Luftstrom im Gleichstromprinzip getrocknet werden.

5.3.2.1 Mischen/ Präzipitieren + Sprühtrocknung

Einige PCMC Modellsuspensionen (Modellformulierungen 1 bis 4) werden über Sprühtrocknung getrocknet. Die Formulierung 1 wird im Mikromaßstab mit dem DJI (mikro) bei 5 ml/min und die Formulierungen 2 bis 4 werden im Makromaßstab mit dem DJI oder QJI (3,0 mm, V4A) bei 1000 ml/min jeweils unter optimalen kontinuierlichen Mischbedingungen präzipitiert. Nach der Präzipitation werden alle Suspensionen direkt wie in Methodenteil 4.1.3.2 beschrieben sprühgetrocknet.

Tab. 5-CC Modellformulierungen 1 bis 4

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
1	Tryp.gen (3,0)	Val (60)	-	4,8	0,32	IPA
2	Tryp (4,6)	Val (40)	NaCl (0,3) CaCl ₂ (1,1)	10,0	0,23	IPA
3	Tryp (11,4)	Gly (100)	NaCl (0,6) CaCl ₂ (2,2)	10,0	0,57	IPA
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA

Die sprühgetrockneten Endprodukte der 4 Modellformulierungen bilden ein feines, gut fließfähiges, inhalierbares und kristallines PCMC-Pulver. Die mittlere Partikelgröße in Suspension ist zwischen den Formulierungen unterschiedlich. Sie liegt zwischen 4 µm und 9 µm (Abb. 5-XX b) bei den Glycinformulierungen und zwischen 12 µm und 33 µm bei den Valinformulierungen. Insbesondere die Valinformulierungen zeigen in Suspension Sekundäragglomerate, die während der Messung nicht zerstört werden und größere Mikropartikel vortäuschen. Bei der Bestimmung der mittleren Primärpartikelgröße im Pulver werden dann wesentlich kleinere Partikel gemessen. Das auf

den kristallinen Trägern nicht kovalent gebundene Protein wird während des Sprühvorganges teilweise abgeschert (Abb. 5-XX a). Dies kann aus reduzierten Proteinwiederfindungswerten entnommen werden. Vermutlich wird ungebundenes Protein und/ oder schwach gebundenes Protein mit der Abluft als sehr feine Teilchen ausgetragen. Zwischen den Formulierungen gibt es deutliche Unterschiede. Trypsin bindet wesentlich besser auf Glycin als auf Valin, möglicherweise bedingt durch die unterschiedliche Kristallform. Reines Glycin kristallisiert in der β -Modifikation nadelförmig aus, jedoch fallen die Co-Präzipitate des Glycins unter Voraussetzung einer guten Mischung während der Präzipitation als unregelmäßig geformte Kristalle aus. An deren Oberflächen bindet sich das Protein (Abb.5-YY b). Valin bildet dagegen eine plättchenartige Kristallstruktur. Das Protein bindet vermutlich bevorzugt an den schnell wachsenden kleinen Seiten und hat damit weniger Anhaftungsfläche zur Verfügung (Abb.5-YY a).

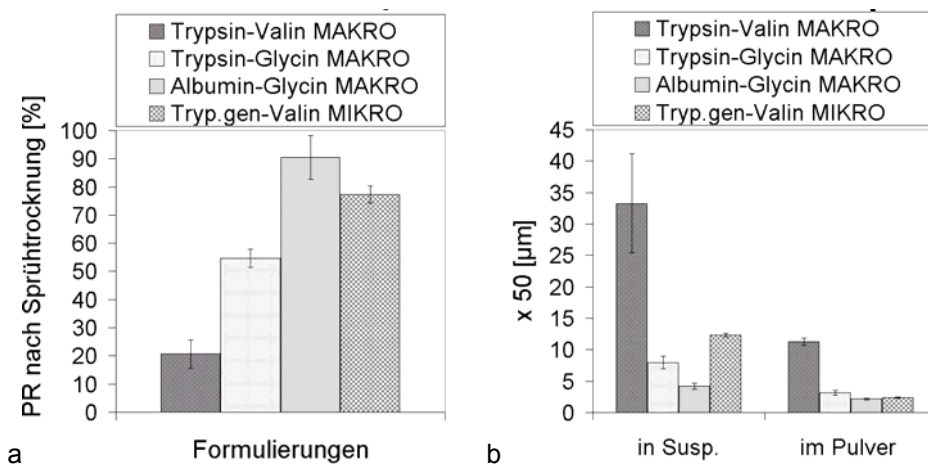


Abb. 5-XX a – Proteinwiederfindung nach Sprühtrocknung, b - Partikelgröße nach Präzipitation und nach Sprühtrocknung verschiedener Modellformulierungen, Mittelwert und Standardabweichung von drei separaten Herstellungen

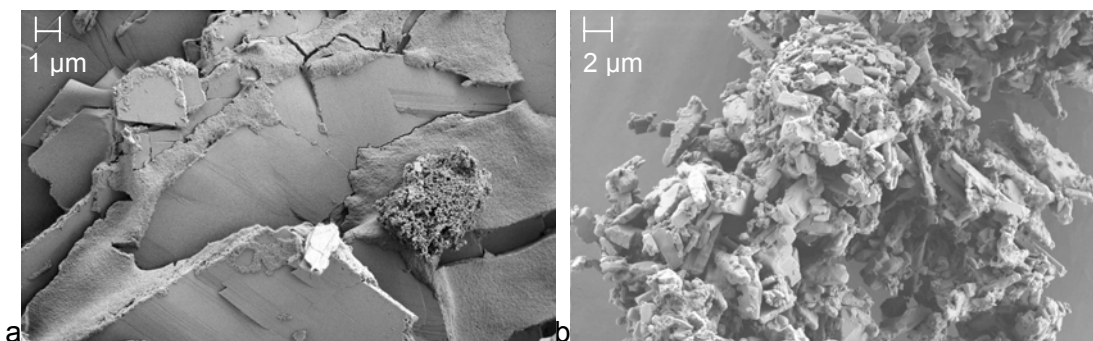


Abb. 5-YY Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen a - Trypsin-Valin Co-Kristalle, b – Trypsin-Glycin Co-Kristalle herstellt mit DJI (3,0 mm,V4A) bei 1000 ml/ min

Aus Abb. 5-XX a ist ebenso ersichtlich, dass Trypsinogen viel stärker als Trypsin auf Valin gebunden wird. Neben den Proteineigenschaften können hierzu aber auch die unterschiedlichen Formulierungen beigetragen haben: die Beladungsraten sind verschieden (5% Tryp.gen, 10 % Trypsin) ebenso wie die Salzkomponenten (0 mg/ml Tryp.gen, 1,4 mg/ml Trypsin). Zudem wurde Trypsinogen im Mikromischsystem präzipitiert.

Auch Albumin bindet wesentlich besser auf Glycin als Trypsin (Abb. 5-XX a). Als mögliche Ursache wird diskutiert, dass die Albuminformulierung aufgrund des höheren Molekulargewichts des Albumins (75 kDa) gegenüber Trypsin (25 kDa) anzahlmäßig weniger interpartikuläre Bindungen aufzubauen hat. Zudem sind die Albumin PCMC kleiner als die Trypsin PCMC und bieten zur Bindung mehr Oberfläche.

Die mit der Sprühtrocknung detektierten Unterschiede in der Proteinwiederfindung zwischen den Formulierungen sind der Anstoß für die Analyse der Bindungsqualität zwischen Protein und Träger. Andere technisch weniger aufwendige Methoden wurden daraufhin entwickelt und sind in Kapitel 4.2.1.6 beschrieben und in Kapitel 5.1.7.2 diskutiert.

5.3.2.2 Mischen/ Präzipitieren + Aufkonzentrierung + Sprühtrocknung

Das vorige Kapitel beschreibt PCMC-Suspensionen, die direkt nach der Herstellung sprühgetrocknet werden. In diesem Abschnitt werden dazu PCMC-Konzentrate sprühgetrocknet. Albumin-Glycin Co-Kristalle dienen als Modellformulierung (Modellformulierung 4), weil sie über gute interpartikuläre Wechselwirkungen verfügen. Die Präzipitationen erfolgen mit dem QJI (3,0 mm V4A) mit einer Gesamtflussrate von 1000 ml/ min. PCMC-Konzentrate entstehen durch die erweiterte Kerzenfiltration (MPF) oder durch die Tangentialflussfiltration (TFF). Je nach Aufkonzentrierungsmethode unterscheidet sich die Proteinwiederfindung nach anschließender Sprühtrocknung (Abb. 5-ZZ). Während der TFF wird Albumin von den Trägern abgeschert (- 30 %) und fehlt im sprühgetrockneten Endprodukt. Die erweiterte Kerzenfiltration (MPF) ist ein schonenderes Verfahren. Deshalb bleibt die Proteinbeladung auch nach Aufkonzentrierung erhalten. Ungebundenes oder wenig mit den Trägern interagierendes Protein wird jedoch dann während der Sprühtrocknung von den PCMC separiert, wenngleich in reduziertem Umfang (- 7 %). Die Referenzproben (Präzi.) werden nach der Präzipitation über einen Membranfilter separiert und an der Luft getrocknet.

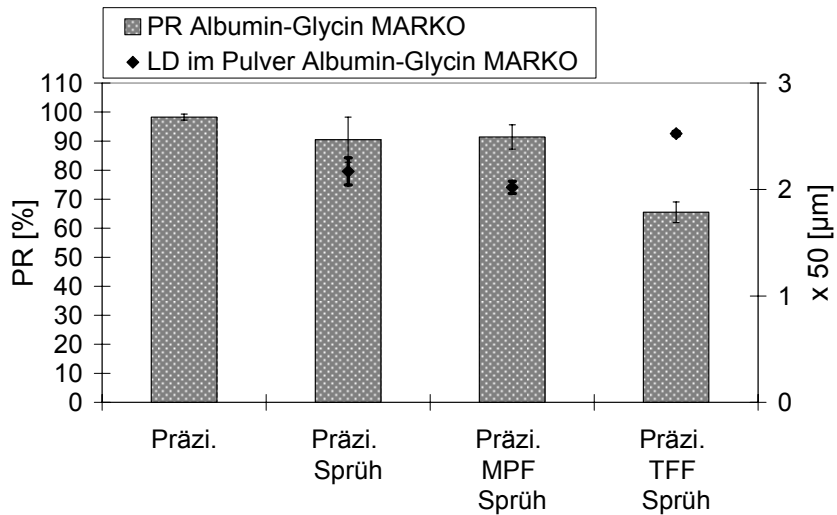


Abb. 5-ZZ Proteinwiederfindung und Partikelgröße von Albumin-Glycin Suspensionen, Mittelwert und Standardabweichung von zwei separaten Herstellungen, Präzi. – Proben, die präzipitiert, membranfiltriert und luftgetrocknet sind, Präzi. Sprüh – Proben, die präzipitiert und sprühgetrocknet sind, Präzi. MPF oder TFF Sprüh – Proben, die präzipitiert, aufkonzentriert und sprühgetrocknet sind

Aus den Ergebnissen der Sprühtrocknungsversuche ist abzuleiten, dass die Trocknungsmethode nur für PCMC-Formulierungen mit guten Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier eingesetzt werden kann.

5.3.3 Trocknung mittels überkritischer Gase

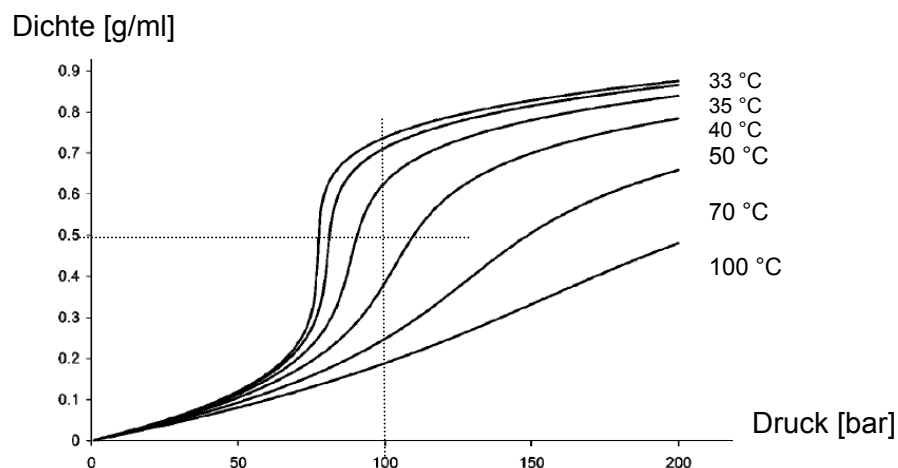


Abb. 5-AAA CO₂-Dichte in Abhängigkeit vom Druck und der Temperatur, gewählte Prozessparameter 100 bar und 45 °C, entspricht CO₂-Gasdichte von 0,5 g/ml

Kohlendioxid ist oberhalb von 34 °C und 71 bar im überkritischen Phasenzustand und zeichnet sich durch ein hohes Diffusionsvermögen, eine niedrige Viskosität und eine hohe Dichte aus. Die Dichte ist für die Lösefähigkeit des Suspensionsmediums entscheidend. Sie kann durch die Temperatur und den Druck variiert werden wie Abb. 5-AAA darstellt [Jung, 2001].

Der Kooperationspartner XstalBio empfiehlt auf Basis von Testreihen folgende Trocknungsparameter für nicht aufkonzentrierte Suspensionen [BI interne Information]:

- Druck: 100 bar
- Temperatur: 45 °C
- CO₂ Flussrate: 25 g/min
- Entgasungsrate (*depressurisation rate*): 1 bar/ 10 s
- Keine Verwendung eines Schleppegases (*co-solvent*)
- Transfergefäß aus Tyvek

Tab. 5-DD Modellformulierungen 4,5 und 7

Form.	Protein [mg/ml]	Carrier [mg/ml]	Hilfsstoffe [mg/ml]	TPL [% (m/m)]	FS [%]	Nicht- LM
4	Alb (11,1)	Gly (100)	-	10,0	0,56	IPA
5	IgG I (6,1)	Gly (80)	Citrat (5,9) NaCl (6,4) Phosphat (1,0) KCl (0,1)	6,2	0,52	2M1P
7	IgG III (38,7)	Gly (70)	Arg (9,1) Glu (7,7) Treh (28,0) His (1,3) EDTA (0,03) Tween 80 (0,07)	25,2	0,77	IPA

Die genannten Prozessparameter werden in Abschnitt 5.3.3.1 unter Variation der Trocknungszeit und der CO₂ Flussrate mit Konzentrationen der Modellformulierung 4 und 7 getestet. Die Pulverqualität wird in diesem Abschnitt durch die Bestimmung der Restfeuchte und des Restwassergehaltes beurteilt.

Im darauf folgenden Abschnitt 5.3.3.2 wird die Pulverqualität darüber hinaus durch die Bestimmung des Monomergehaltes und der polymorphen Form bewertet. Dazu wird

der Gesamtprozess mit zwei Antikörpermodellformulierungen (Modellformulierung 5 und 6) durchgeführt.

In Abschnitt 5.3.3.3 wird der Einfluss des Restwassers in der Suspension untersucht. Weiterhin werden größere Volumina getrocknet und unterschiedliche Transfergefäße evaluiert. Abschließend erfolgt die Kalkulation der Trocknungszeit für Suspensionsmengen im Pilotmaßstab.

5.3.3.1 Variationen von Prozessparametern

In dieser Versuchsreihe werden 100 bar/ 45 °C genutzt und die nötige Prozesszeit zur Trocknung von PCMC-Konzentraten unter Variation der Flussrate des Kohlendioxids ermittelt. Der Fluss beträgt 10 g/min bis 40 g/min, die Extraktionszeit dauert 30 min bis 270 min, das Suspensionsmedium besteht aus jeweils 40 ml Albumin-Glycin bzw. IgG III-Glycin Konzentraten oder Suspensionen. Die Restfeuchte (RF) und der Restwassergehalt (KF) werden zur Beurteilung der Güte der Trocknung herangezogen. Feste Aggregate werden mit der Trübungsmessung erfasst.

In den Versuchen mit Albumin-Glycin Co-Kristallen gibt es kaum Unterschiede. Die variierenden Prozessparameter zeigen keine statistische Effekte und Wechselwirkungen. Die Pulver haben nach der Trocknung einen Restfeuchtegehalt von 1 % bis 3 %, wobei die höher konzentrierten Suspensionen tendenziell trockener werden als die Suspensionen mit niedrigem Feststoffgehalt. Der Wert der Restfeuchte (Wasser und Nicht-Lösungsmittel) ist bei allen Proben höher als der des Restwassers. Daraus wird abgeleitet, dass das Nicht-Lösungsmittel unvollständig entfernt wurde. Insgesamt verläuft für Albumin-Glycin der Trocknungsprozess stabil und reproduzierbar. 40 ml eines Albumin-Glycin Konzentrates (100 mg/ml) können mit 15 gCO₂ pro Milliliter Konzentrat bei einer Dichte von 0,5 g/ml getrocknet werden.

Bei den IgG III Konzentraten zeigt sich, dass 30 min Extraktionszeit nicht ausreichen, um 40 ml zu trocknen. Erst ab einer Trocknungszeit von 90 min wird ein organoleptisch trockenes Pulver erhalten. Die Restfeuchte oder der Restwassergehalt respektive liegen bei den organoleptisch trockenen Pulvern zwischen 3,5 % und 5 %. Im Vergleich dazu sind die Albumin Pulver trotz vergleichbarer Prozessbedingungen jeweils trockener als die IgG III Pulver. Um die organoleptisch trockenen Pulver zu erhalten, müssen diese bei einer CO₂-Dichte von 0,5 g/ml mit 56 gCO₂ pro Milliliter IgG III-Glycin Konzentrat getrocknet werden. Die verbrauchte Menge an Kohlendioxid ist gegenüber der Albumin Formulierung um ca. viermal höher.

Tab. 5-EE Ergebnisse der Trocknung/ Extraktion von PCMC-Konzentraten

CO₂ Fluss [g/min]	t [min]	CO₂- Menge [g/ml]	Konz. [mg/ml]	Formu- lierung	RF [% (m/m)]	KF [% (m/m)]	Trübung [NTU]
Faktoren					Messgrößen		
10	60	15	5	4	2,8	2,1	1,8
40	60	60	5	4	1,9	2,2	2,0
10	120	30	5	4	3,0	2,1	1,7
40	120	120	5	4	2,4	2,0	2,0
10	60	15	100	4	1,8	1,5	1,9
40	60	60	100	4	1,7	1,2	1,9
10	120	30	100	4	2,0	1,1	1,8
40	120	120	100	4	1,0	1,0	1,9
25	90	56	53	4	1,9 ± 0,5	1,2	1,9
25	90	56	53	4	1,9 ± 0,5	1,4	2,0
25	90	56	53	4	1,8 ± 0,1	1,3	2,0
10	30	15	62	7	163,7 ± 19	6,5	13,1
40	30	30	62	7	29,5 ± 21	6,0	13,9
10	270	67	62	7	4,2 ± 0,1	3,7	16,9
40	270	135	62	7	3,8 ± 0,4	3,6	11,0
25	150	94	62	7	4,5 ± 0,7	4,2	10,3
25	150	94	62	7	3,8 ± 0,6	4,2	10,8
25	150	94	62	7	4,5 ± 0,3	4,1	11,2
25	90	56	62	7	4,7 ± 0,3	4,4	17,2

Aus den Experimenten lässt sich ableiten, dass für jede Modellformulierung, unabhängig vom Aufkonzentrierungsgrad, der CO₂-Verbrauch und damit die Trocknungszeit ermittelt werden muss. Die CO₂-Flussrate hat bei einer ausreichenden Trocknungszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Trockenheit des Pulvers gezeigt. Obwohl bei höheren Flussraten (40 gCO₂/min statt 10 gCO₂/min) über die gleiche Trocknungszeit die vierfache Menge an Kohlendioxid durch die Suspension geleitet wurde, sind die Pulver nur tendenziell trockener.

5.3.3.2 Einfluss der CO₂-Extraktion auf die Proteinstabilisierung

In diesem Abschnitt soll an 2 Antikörpermodellformulierungen der Einfluss des Kohlendioxids auf die Proteine, die auf den Oberflächen der Mikropartikel stabilisiert sind,

untersucht werden. Dazu werden Modellformulierung 5 und 7 mit dem DJI (3,0 mm, V4A) bei einer Flussrate von 1000 ml/min präzipitiert. Nachdem die Präzipitation durchgeführt ist, beginnt die Standzeit der Suspension ($t = 0$). Die PCMC-Suspensionen werden im Anschluss mit der erweiterten Kerzenfiltration aufkonzentriert, wodurch das Volumen auf 1/ 10 reduziert wird. 40 ml der aufkonzentrierten Suspension werden mit dem überkritischen Kohlendioxid getrocknet. Bei 100 bar und 45 °C hat das Kohlendioxid den überkritischen Zustand erreicht. Die weiteren Prozessparameter sind eine Flussrate von 25 gCO₂/min und eine Trocknungszeit von 90 min.

Modellformulierung 5 (IgG I-Glycin Co-Kristalle in Methylpropanol)

Tab. 5-FF Ergebnisse Modellformulierung 5 (* Rekonstitutionszeit 20 h), t^1 – Standzeit bis zur Trocknung des PCMC Konzentrates

Prozessschritt	t^1 [h]	PR [%]	x-ray	abs. Monomer [%]	lösliche Agg. [%]	Trüb- ung* [NTU]
Protein-Carrier-Lösung	0	-	-	92,6 ± 0,3	6,75 ± 0,1	-
nach Präzipitation + Membranfiltration + Lufttrocknung	1	102,0 ± 0,2	$\beta > 90 \%$	89,9 ± 0,5	8,5 ± 0,2	1,1
nach MPF + Membranfiltration + Lufttrocknung	1	101,7 ± 0,7	$\beta > 50 \%$	89,5 ± 0,3	8,9 ± 0,1	1,2
nach SCF Restfeuchte: 3,2 % Restwasser: 3,6 % x_{50} : 19,6 μ m MMAD: 9,9 ± 0,5 μ m FPF: 19,0 ± 1,3 % ED: 99,3 ± 1,3 %	72	96,9 ± 0,3	$\alpha + \gamma$	90,2 ± 0,3	8,3 ± 0,1	4,2
nach MPF + Membranfiltration + Lufttrocknung	144	100,7 ± 1,6	γ	87,2 ± 0,3	9,9 ± 0,1	4,8
nach SCF Restfeuchte: 3,6 % Restwasser: 3,3 % x_{50} : 24,4 μ m MMAD: 5,5 ± 0,9 μ m FPF: 21,1 ± 1,7 % ED: 99,7 ± 0,6 %	144	87,5 ± 2,2	γ	89,9 ± 0,3	10,3 ± 0,1	3,6

Glycin präzipitiert in der β -Modifikation aus und ist mit der eingesetzten Proteinmenge beladen. Der Antikörpermonomergehalt sinkt signifikant während der Präzipitation um 2,7 % vor allem zugunsten löslicher Aggregate. Die anschließende Aufkonzentrierung verändert die Partikelqualität nicht weiter. Auch die überkritische Extraktion verändert den Monomergehalt der PCMC trotz 72 Stunden Standzeit vor der Trocknung nicht (aufgrund technischer Probleme). Bei der Betrachtung der Diffraktogramme (siehe Anhang 8.4) kann eine Modifikationsänderung des Trägers ($\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \gamma$) erkannt werden. Dazu werden eine leichte Trübungszunahme (auf 4,2 NTU) sowie eine leicht reduzierte Proteinwiederfindung (97 %) gemessen.

Um zwischen dem Einfluss der Standzeit und dem Einfluss der Extraktion zu differenzieren, werden Proben nochmals nach einer Standzeit von 144 h getrocknet und analysiert. Die Proben zeigen, dass die Extraktion mit Kohlendioxid keinen Einfluss auf die Trübung hat, jedoch auf die Proteinwiederfindung. Der Träger der Glycin lagert sich in Methylpropanol über die Standzeit von 144 h vollständig in die thermodynamisch stabilste γ -Form um. Dies führt möglicherweise zur Destabilisierung der Proteine auf der Trägeroberfläche und zur Aggregation der Antikörper.

Modellformulierung 7 (IgG III-Glycin Co-Kristalle in Isopropylalkohol)

Tab. 5-GG Ergebnisse Modellformulierung 7, t^1 – Standzeit bis zur Trocknung des PCMC Konzentrates

Prozessschritt	t^1 [h]	PR [%]	x-ray	abs. Monomer [%]	lösliche Agg. [%]	Trüb- ung [NTU]
Protein-Carrier-Lösung	0	-	-	99,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	-
nach Präzipitation + Membranfiltration + Lufttrocknung	2,5	99,2 ± 0,7	β	99,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7
nach MPF + Membranfiltration + Lufttrocknung	2,5	101,6 ± 0,9	β	98,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0
nach SCF Restfeuchte: 4,5 % Restwasser: 4,7 %	2,5	90,6 ± 2,7	β	94,6 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,5
x_{50} : 3,2 μm MMAD: 4,6 ± 0,1 μm FPF: 26,2 ± 1,1 % ED: 88,4 ± 7,2 %						

Der Modellantikörper (IgG III) stabilisiert sich hervorragend auf Glycin und wird durch den Aufkonzentrierungsschritt kaum verändert, nur geringfügig entstehen lösliche und unlösliche Aggregate. Durch die Extraktion verändert sich die PCMC-Qualität signifikant. Es entstehen lösliche und unlösliche Aggregate. Weiterhin ist die Proteinbeladung um 8 % (PR = 91 %) verringert. Der Trübungswert erhöht sich auf 5,5 NTU. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist diese Veränderung ebenfalls zu erkennen (Abb. 5-BBB). Insbesondere beim Vergleich der Proben nach der Präzipitation und nach der Extraktion sind fadenförmige Proteinaggregate bei der extrahierten Probe zu erkennen.

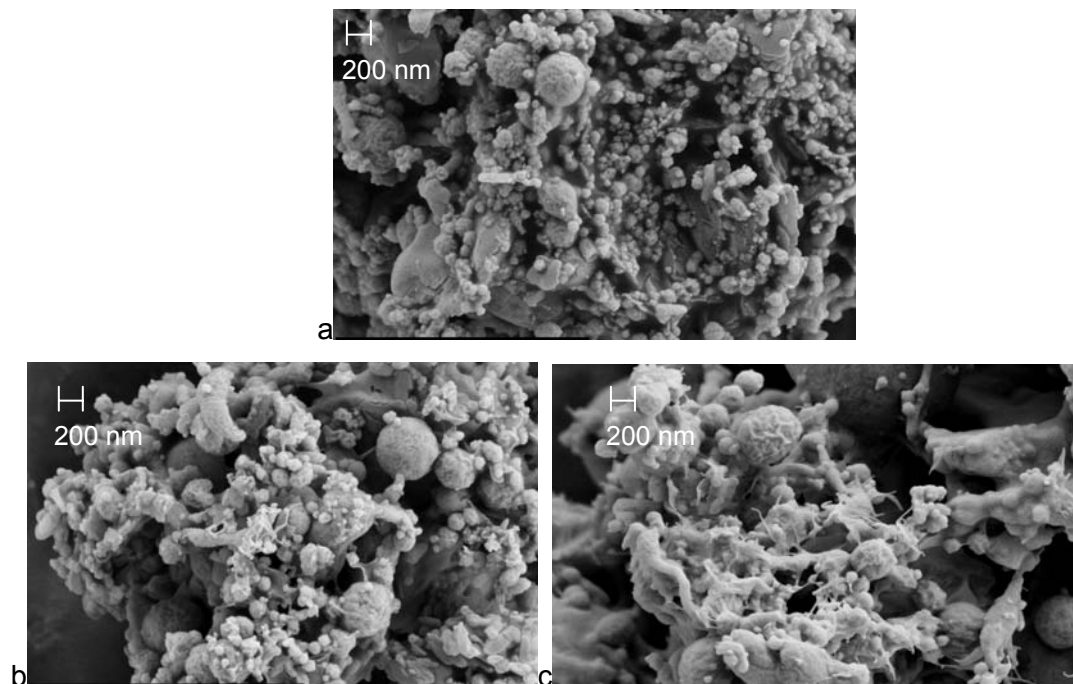


Abb. 5-BBB Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Modellformulierung 7, a – nach der Präzipitation, b – nach erweiterter Kerzenfiltration, c – nach der Endtrocknung

Abschließend kann festgehalten werden, dass Kohlendioxid einen Einfluss auf die Proteinstabilisierung haben kann und dann nicht für den Prozess eingesetzt sollte (Modellformulierung 7). Bei anderen Formulierungen (Modellformulierung 5) reagiert Kohlendioxid nicht mit den PCMC und deshalb eignet sich die Extraktion sich als Prozessschritt zur Endtrocknung.

Der entstehende mittlere aerodynamische Durchmesser (MMAD) der Modellantikörperformulierungen 5 und 7 liegt zwischen 4,6 μm bis 9,9 μm und die Feinpartikelfraktion (FPF) zwischen 20 % und 26 %, so dass diese Pulver nur bedingt zur pulmonalen Applikation geeignet wären.

5.3.3.3 Einfluss des Wassergehaltes in der zu trocknenden Suspension auf die Trocknung

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Untersuchung, ob unterschiedliche Wassergehalte im PCMC-Konzentrat unter gleichen Extraktionsbedingungen zu identischen Endprodukten führen oder nicht. Dazu werden bei 45 °C, 100 bar und einer CO₂-Flussrate von 25 gCO₂/min über 90 min lang 40 ml Albumin-Glycin Konzentrate (53 mg/ml) mit unterschiedlichen Wassergehalten (bestimmt mit Karl Fischer zwischen 1,6 % bis 12,2 % bezogen auf die Gesamtsuspension) getrocknet. Die Wassergehalte werden ausgehend von 5 % Wasser im Suspensionsmedium entweder durch Zugabe von Wasser oder durch Wasserentzug mit Zeolithen (Z 3-01 1 mm – 2 mm, Zeochem) eingestellt. Ein Wassergehalt von 10 % ist für Präzipitationen mit geändertem Mischungsverhältnis interessant. Die Zielgrößen in diesen Versuchen sind Restfeuchte und Restwassergehalt im Pulver.

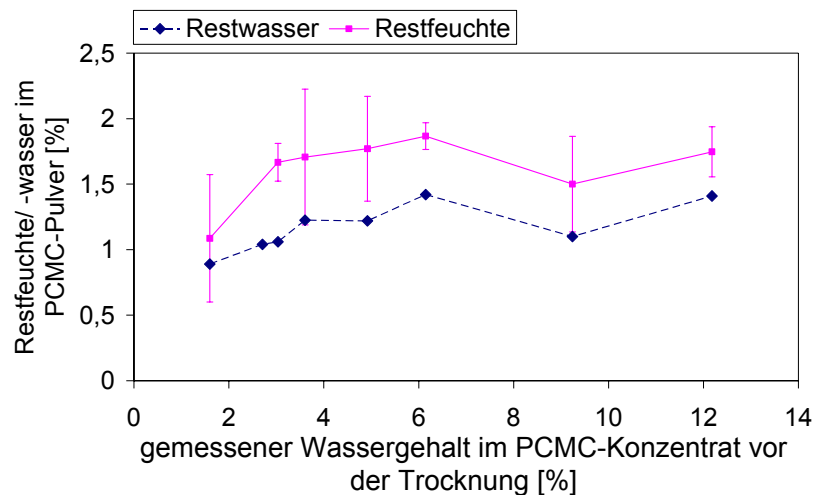


Abb. 5-CCC Ergebnisse Restfeuchte bzw. Restwasser getrockneter Albumin-Glycin Mikrokristalle, deren Wassergehalt im PCMC-Konzentrat vor der Trocknung eingestellt variiert wird

Der Wassergehalt im PCMC-Konzentrat (< 12 %) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Restfeuchte (1,1 % bis 1,8 %) bzw. Restwasser (0,9 % bis 1,4 %) im resultierenden getrockneten PCMC-Pulver. Die Restfeuchte im Endprodukt ist stets höher als der Restwassergehalt, weshalb im Endprodukt nach der Extraktion immer noch Nicht-Lösungsmittel (Fällungsmittel) vorliegt.

5.3.3.4 Trocknung größerer Suspensionsvolumina mit unterschiedlichen Einsatzbehältern

Die Extraktionseinheit von Thar ist mit zwei Extraktionskesseln ausgestattet. Der kleine Kessel fasst maximal ein Volumen von 100 ml und der große Kessel maximal ein Volumen von 500 ml. Durch Transfergefäße (Tyvekbeutel oder Edelstahleinsatz) wird das Kesselvolumen jedoch verkleinert, so dass im großen Kessel beim Tyvekbeutel maximal 450 ml und bei Edelstahleinsatz maximal 280 ml getrocknet werden können. Um beide Transfergefäße in einer Reihe zu testen, wird das größte zu trocknende Volumen auf 240 ml festgelegt. Das bisher getrocknete Volumen war stets 40 ml. In dieser Versuchsreihe sollen nun größere Volumina von 80 ml bis 240 ml getrocknet werden. Als Modell dienen Albumin-Glycin Konzentrate (95 mg/ml). Beide Transfergefäße werden getrocknet. Die Extraktion erfolgt bei 45 °C, 100 bar und einer mittleren CO₂-Flussrate von 25 gCO₂/min. Ob bei der Trocknung von größeren Volumina auch größere CO₂-Mengen pro Milliliter PCMC-Suspension nötig sind, wird durch Variation der Menge von 15 gCO₂/ml bis 45 gCO₂/ml evaluiert. Die entsprechende Trocknungszeit ergibt sich aus den gegebenen Parametern und ist nachfolgend beispielhaft für die erste Extraktion errechnet.

CO₂-Flussrate: 25 gCO₂/min

Suspensionsvolumen: 80 ml

CO₂-Verbrauchsmenge: 15 gCO₂/ml

$$Trocknungszeit = \frac{80ml \cdot 15gCO_2 \cdot min}{25gCO_2 \cdot ml} = 48min \quad \text{Gl. 5-5}$$

Der Tyvekbeutel ist gegenüber der PCMC-Suspension nicht dicht (Leckage über die Membranwand). Zudem liegt der Tyvekbeutel nicht vollständig an den Extraktionskesselwandungen an und überkritisches Kohlendioxid geht zwischen Wandungen und Tyvekbeutel verloren. Dagegen werden mit dem Edelstahleinsatz PCMC-Konzentrate ohne Tropfen in die Extraktionseinheit überführt. Das gesamte überkritische Kohlendioxid wird durch den Edelstahlbehälter zwangsgeleitet und steht für die Extraktion des Suspensionsmediums zur Verfügung. Beides ist gegenüber dem Tyvekbeutel eine elementare Verbesserung. Weiterhin ist die Restfeuchte des Endproduktes, das im Edelstahleinsatz (Versuch 1 bis 9) extrahiert wird, reproduzierbar herzustellen, wohingegen die im Tyvekbeutel (Versuch 10 bis 12) extrahierten Endprodukte manchmal ohne erkennbaren Grund sehr feucht sind.

Tab. 5-HH Ergebnisse der Trocknung von 80 ml bis 240 ml Albumin-Glycin Konzentraten

Nr.	CO ₂ -Menge [g/ml]	t [min]	Volumen [ml]	Formul./ Konz. [mg/ml]	RF [% (m/m)]	KF [% (m/m)]	Trübung [NTU]
Faktoren					Messgrößen		
Edelstahleinsatz							
1	15	48	80	4/ 95	2,1 ± 0,4	1,0	5,3 ± 1,0
2	15	96	160	4/ 95	2,1 ± 0,4	0,9	16,0 ± 5,4
3	15	144	240	4/ 95	1,9 ± 0,6	1,1	10,7 ± 3,6
4	30	96	80	4/ 95	1,6 ± 0,1	1,1	5,7 ± 0,4
5	30	192	160	4/ 95	1,9 ± 0,4	1,0	13,1 ± 1,3
6	30	288	240	4/ 95	2,9 ± 1,6	1,3	10,1 ± 0,7
7	45	144	80	4/ 95	1,5 ± 1,1	1,0	9,8 ± 2,2
8	45	288	160	4/ 95	1,7 ± 0,2	1,0	17,7 ± 1,1
9	45	432	240	4/ 95	1,3 ± 0,5	1,1	13,2 ± 3,8
Tyvekbeutel							
10	30	288	240	4/ 95	1,7 ± 0,2	1,5	14,8 ± 2,1
11	30	288	240	4/ 95	83,9 ± 36,0	5,0	31,9 ± 2,4
12	30	288	240	4/ 95	2,0 ± 0,5	1,4	15,0 ± 1,6

Größere Volumina (240 ml) können mit der in Kapitel 5.3.3.1 ermittelten minimalen CO₂-Menge pro Milliliter PCMC Suspension (15 gCO₂/ml) getrocknet werden. Die Restfeuchte aller im Edelstahltransfergefäß getrockneten PCMC-Pulver liegt zwischen 1 % bis 3 % und der Restwassergehalt um 1 % (Tab. 5-HH). Größere Mengen an Kohlendioxid von 30 gCO₂/ml oder 45 gCO₂/ml führen nicht zu einem trockeneren Produkt.

Eine im Tyvekbeutel getrocknete Probe (Versuch 11) weist eine hohe Restfeuchte bzw. einen hohen Restwassergehalt auf. Dies führt zur Proteinaggregation, erkennbar am erhöhten Trübungswert dieser Probe (Tab. 5-HH). Eine Restfeuchte von 1,7 % bis 2,0 % (Versuch 11 und 12) führt hingegen kaum zur Aggregation. Daraus wird geschlussfolgert, dass die Proben ausreichend getrocknet sind.

5.3.3.5 Kalkulation der Trocknungszeit für Suspensionsmengen im Pilotmaßstab

Soll eine größere Menge an PCMC-Konzentrat (a – 10 Liter mit 50 mg/ml oder b – 5 Liter mit 100 mg/ml) getrocknet werden, dauert der Prozess extrapoliert unter

Annahme des ermittelten Verbrauches (15 gCO₂/ml) und einer CO₂-Flussrate von 25 gCO₂/min für a = 100 h und für b = 50 h (Ermittlung mit Gleichungen in Abb. 5-BBB). Die Zeit könnte durch die Erhöhung der CO₂-Flussrate auf 40 gCO₂/min bei a auf 62,5 h und bei b auf 31,25 h verkürzt werden. Ob eine Flussrate von 40 gCO₂/min zu einem gleich trockenen Produkt führt, muss jedoch in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Zwar wurde in Kapitel 5.3.3.1 der Flussrateneinfluss untersucht und ergab kein Effekt, jedoch wurde in der Studie die Trocknungszeit nicht gleichzeitig verkürzt. Weiterhin kann durch den Einsatz von 2 parallel betriebenen Kesseln die Trocknungszeit nochmals halbiert werden, d. h. für a - 10 Liter in zwei 5 Liter Kesseln ergibt eine Zeit von 31,25 h und für b - 5 Liter in zwei 2,5 Liter Kesseln eine Zeit von 15,6 h. Eine weiterer Optimierungsansatz ist, bei einer höheren CO₂-Dichte als 0,5 g/ml (ergibt sich aus 100 bar und 45 °C) zu extrahieren.

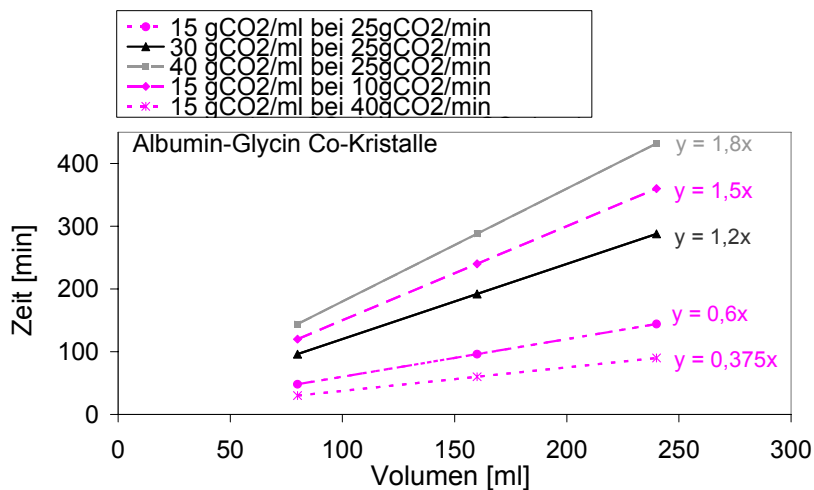


Abb. 5-DDD Notwendige Trocknungszeit in Abhängigkeit vom Suspensionsvolumen bei verschiedenen Flussraten und CO₂-Verbrauch pro ml, Gleichungen zur Extrapolation der Trocknungszeit größerer Suspensionsvolumina

5.3.4 Diskussion des Prozessschrittes Endtrocknung

Während der Endtrocknung entsteht ein pulverförmiges Endprodukt, das sich in der Qualität je nach angewendetem Verfahren unterscheidet. Bei der Lufttrocknung eines zuvor aufkonzentrierten Filterkuchens bildet sich ein kompakter trockener Kuchen, der durch einen anschließenden Mahlschritt in seine Primärpartikel wieder zerlegt werden muss. Die Sprühtrocknung der PCMC-Konzentrate kann zur Trocknung eingesetzt werden, jedoch ist eine starke Adsorption der Proteine auf den Trägern Grundvoraussetzung, sonst werden die Proteine von den Trägern getrennt und aufgrund ihrer kleinen Größe im Zyklon vom Endprodukt separiert. Die treibenden Kräfte für die

Adsorption sind von der Waals-, Coulomb- und hydrophobe Wechselwirkungen. Diese Kräfte sollten in einer Formulierungsentwicklung gezielt optimiert werden, indem zum Beispiel anionische und/ oder kationische funktionelle Bausteine zur gezielten Immobilisierung eingesetzt werden. Um die Güte der Immobilisierung zu beurteilen, kann die Sprühtrocknung als vergleichende analytische Methode eingesetzt werden.

Während der Extraktion der PCMC mit überkritischem Kohlendioxid entstehen feine, gut fließfähige Pulver. Für jede Modellformulierung muss die Menge an Kohlendioxid, die pro Milliliter des Konzentrates benötigt wird, ermittelt werden. Der Einfluss des Kohlendioxids auf die Proteine, die auf den Trägern stabilisiert sind, wird an zwei Modellen in dieser Arbeit genauer untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den Formulierungen (Modellformulierung 5 und 7).

Für die richtige Wahl des letzten Prozessschrittes sollten die gewünschten Eigenschaften des Endproduktes und der Applikationsweg definiert sein. Wie in der Diskussion zum Aufkonzentrierungsschritt aufgeführt, kann die Endtrocknung an konditionierter trockener Luft erfolgen, wenn die Pulver inhalativ oder nasal appliziert werden sollen. Danach muss ein weiterer Prozessschritt (Siebdesagglomeration) erfolgen.

Um Pulver zur Injektion nach Rekonstitution herzustellen, wird die Extraktion als Endtrocknungsschritt empfohlen.

5.3.5 Technische Umsetzung

Die konvektive Lufttrocknung erfolgt in einer Kunststoffbox, die kontinuierlich mit 1 bar trockener Druckluft durchströmt wird.

Zur Extraktion des Suspensionsmediums dient überkritisches Kohlendioxid. Deshalb ist flüssiges Kohlendioxid in großen Mengen nötig. Für die Anlage (SFE 500, Thar Technologies Europe GmbH) stehen zwei mobile 10 kg Steigrohrflaschen (Sauerstoffwerk, Friedrichshafen) zur Verfügung. Die Lagerung des Kohlendioxides erfolgt in einem Gaslagerschrank außerhalb des Gebäudes und die Flaschen werden mit einem entsprechenden Transportwagen bewegt. Zur Überwachung des CO₂-Gehaltes im PCMC-Raum ist ein CO₂-Messfühler (VarioGrad IR CO₂, Dräger Saftey) auf die Alarmgrenze von 2500 ppm an CO₂ eingestellt. Beim Überschreiten der Schwelle wird der Alarm innerhalb und außerhalb des Raumes akustisch sowie visuell angezeigt. Bei Alarm können die CO₂-Flaschen manuell über Sicherheitsventile außerhalb des Raumes verschlossen werden. Die Extraktion erfolgt kontinuierlich und im Anschluss findet bei der kleinen Anlage keine Trennung von Kohlendioxid und dem entfernten Suspensionsmedium statt, obwohl diese dafür ausgestattet ist. Beide Stoffe werden über einen Schlauch (PU6, Festo) in den Abzug eingeleitet und mit der Abluft entsorgt.

PROZESSSCHRITT ENDTROCKNUNG

Die extrahierten Suspensionsmengen in der Laborextraktionsanlage sind maximal 450 ml über mehrere Stunden, wobei kein explosionsfähiges Gemisch entstehen kann. Die PCMC-Konzentrate bzw. PCMC-Suspensionen füllt der Anwender in ein Transfergefäß, bevorzugt ein Edelstahlinsatz mit einer perforierten Bodenplatte (1 µm Fritte). Dieses Transfergefäß wird dann in den Extraktionskessel hineingesetzt.

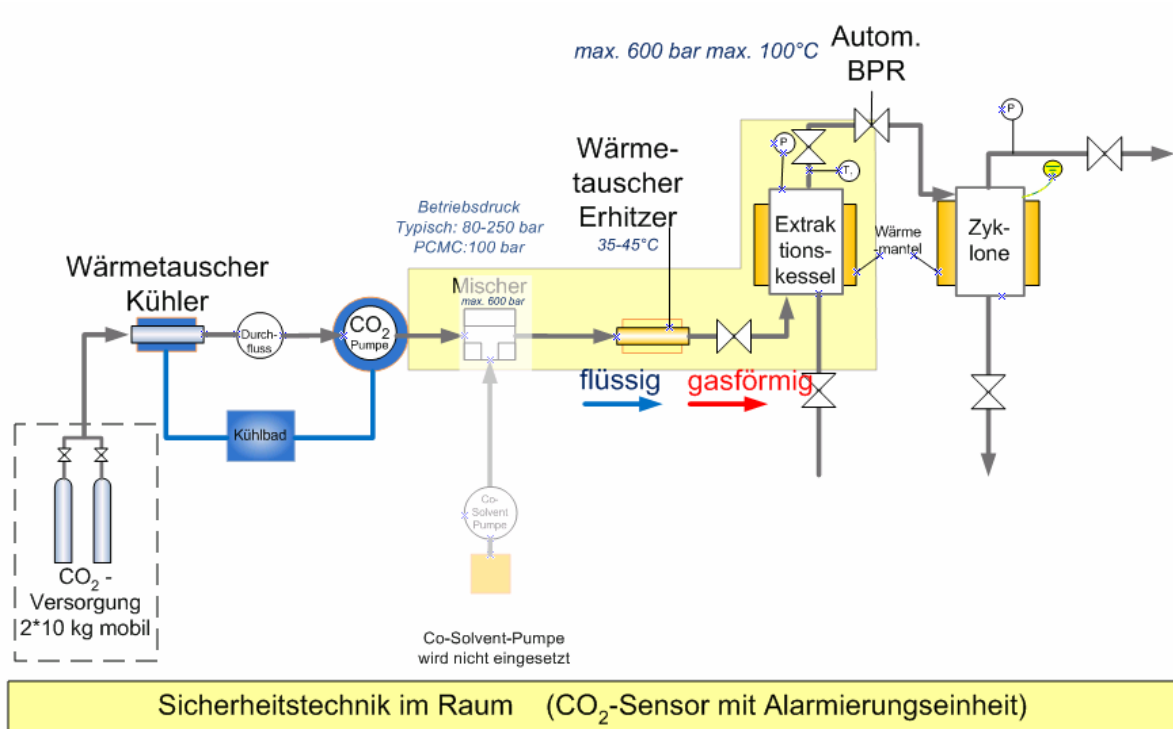


Abb. 5-EEE Extraktionseinheit zur Trocknung von PCMC

Für die Extraktion von größeren Konzentratmengen (a – 10 Liter mit 50 mgPCMC/ml oder b – 5 Liter mit 100 mgPCMC/ml) muss eine größere Anlage angeschafft werden. Dazu wird empfohlen, eine Anlage mit zwei parallel zu betreibenden Kesseln auszustatten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen durchgehenden, skalierbaren Herstellprozess für proteinüberzogenen Mikrokristalle (PCMC) zu entwickeln. Der Gesamtprozess gliedert sich in drei einzelne Prozessschritte: Zuerst werden durch schnelle, homogene Vermischung einer wässrigen, proteinhaltigen Carrierlösung mit Fällungsmittel die Co-Kristalle präzipitiert. Im Anschluss wird die lösungsmittelhaltige Suspension mit einem Feststoffgehalt von ca. 0,5 % (m/v) um mindestens Faktor 10 bis 20 aufkonzentriert. Ein wesentlich geringeres Volumen muss dann bei der Endtrocknung entfernt werden. Mit dem Prozess sollen 500 g Produkt hergestellt werden können. Bei einem vorgegebenen Mischungsverhältnis von 5 Teilen wässriger Protein-Carrier-Lösung und 95 Teilen Fällungsmittel entspräche dies einem Suspensionsvolumen von 100 l bis 200 l.

Das schnelle und einheitliche Mischen der beiden Phasen ist eine Voraussetzung für die homogene Präzipitation der PCMC. Dazu wurden am Entwicklungsbeginn ein T-förmiger (*Single Jet Impingement*, SJI) und ein X-förmiger (*Double Jet Impingement*, DJI) Mikromischer zur kontinuierlichen und statischen PCMC-Herstellung getestet. Der DJI produziert engere Partikelgrößenverteilungen als der SJI, weil er durch die Art und Weise der Medienzuführung die beiden Flüssigkeitsströme optimal mischt. Beim DJI wird der Strom des Fällungsmittels in zwei Ströme gesplittet und anschließend in der Mischkammer durch einen 180° Zusammenstoß wieder vereint. Der Zusammenstoß verursacht eine hohe Mischeffizienz. Der Mischimpuls der Protein-Carrier-Lösung ist gering, weil die axial zum Mischerausslass zugeführte Masse klein ist. Deshalb wird die Mischeffizienz wesentlich durch das Fällungsmittel kontrolliert. Dazu zeigen fluiddynamische Simulationsbilder, dass im DJI der Protein-Carrier-Strom über den gesamten Querschnitt des Auslasses verteilt wird und dort schon nach wenigen Millimetern optimal mit dem Fällungsmedium vermischt ist. Dagegen wird beim SJI der Protein-Carrier-Strom nur an eine Seite des Auslasses gedrückt, womit weniger Oberfläche zur Diffusion der beiden zu mischenden Flüssigkeiten zur Verfügung steht und die Durchmischung länger dauert. Der DJI wird für weitere Untersuchungen eingesetzt. Jedoch verblockt die Mikromischer-Version nach 60 ml - 300 ml Durchsatzvolumen an Suspension. Deshalb ist eine Vergrößerung des Mischerdurchmessers und des Auslasses notwendig. Der *scale-up* erfolgt zunächst auf 2 mm und schließlich auf 3 mm, um mit anderen getesteten statischen Mixern wie dem Kenicsmischer größenkonform zu sein. Durch die Vergrößerung des Durchmessers werden jedoch die

Partikel deutlich größer und dazu wird das Protein wesentlich schlechter auf der Carrieroberfläche gebunden. Um diesen zwei Veränderungen entgegenzuwirken, wird die Durchmischung zum einen durch den Einsatz von Ultraschall und zum anderen durch wesentlich höhere Gesamtflussgeschwindigkeiten verbessert. Ultraschall erzeugt implodierende Kavitäten und führt damit zur Mischungsverbesserung. Ultraschall wird in den Versuchen indirekt durch ein Ultraschallbad, in dem sich der DJI und der Auslassschlauch befinden, und direkt in einer hydrodynamischen Mischkammer erzeugt. Durch die Durchmischungsverbesserung resultieren kleinere PCMC. Jedoch zeigt der direkte Ultraschallimpuls bzw. die dynamische Mischkammer eine höhere Proteinschädigung. Aus diesem Grund wird dieser Weg nicht weiter verfolgt. Die zweite Möglichkeit die Mischeffizienz erfolgreich zu verbessern, zeigt sich durch die Erhöhung der Gesamtgeschwindigkeit. Homogene Mischungen werden relativ schnell bereits im laminaren Strömungsbereich erzielt, jedoch wird der turbulente Strömungsbereich zum Mischen/ Präzipitieren empfohlen, weil kleinere Partikel und homogenere Partikelmorphologien auch bei viskoserer Fällungsmitteln entstehen. Für den DJI mit einem Durchmesser von 3 mm ergibt sich ein turbulenter Gesamtstrom ab 1000 ml/min (Fällungsmittel Isopropylalkohol) bzw. ab 2000 ml/min (2-Methyl-1-propanol). Die Strömungscharakteristik wird über die Reynoldszahl bestimmt, die eine einheitslose Größe darstellt.

Durch eine weitere Umkonstruierung des Massenflussmischers entstand der *Quadruple Jet Impingement* Mischer, QJI. Bei diesem Mischer trifft die axial zum Mischerausslass einströmende Protein-Carrier-Lösung in der Mitte des Mischers auf vier fließende Ströme des Fällungsmittels. Die Protein-Carrier-Lösung wird dabei sandwichartig vom Fällungsmedium umschlossen und auf sehr kurzem Weg optimal mit diesem durchmischt. Fluiddynamische Simulationsbilder zur Mischung beweisen eine Mischungsverbesserung in der Reihenfolge SJI < DJI < QJI. Die Fällungen folgen nicht ganz dieser Reihenfolge bei der Betrachtung der Partikelgröße und der Proteinwiederfindung. Unter Betrachtung der Präzipitationskinetik zeigt jedoch der QJI über den gesamten Strömungsbereich den robustesten Austritt. Trotzdem werden zukünftig der DJI und der QJI als Massenstrommischer zur Herstellung eingesetzt. Andere statische Makromischer wie der Kenics und der für Fällungen konstruierte Ventilmikromischer (Ehrfeld Mikrotechnik BTS) können ebenfalls zur PCMC-Herstellung eingesetzt werden, jedoch offenbaren sie in den Testreihen gegenüber den Massenflussmischern eine leicht erhöhte Proteinschädigung. Beide Mischer stehen als Backup zur Verfügung. Weitere Mikromischer, wie der Kammischer und Kaskadenmischer (Ehrfeld Mikrotechnik BTS), sind grundsätzlich nicht zur Herstellung von

PCMC geeignet, da in diesen insbesondere die Einlässe für die Protein-Carrier-Lösung verblocken.

Im Tecnikum wird für den Prozessschritt des Mischens/ Präzipitierens der DJI bzw. QJI Mischer zur Herstellung von PCMC implementiert. Dabei wird dieser auf einer Plattform fest verschraubt. Die zu mischenden Flüssigkeiten werden mit pulsationsarmen Mikrozahnringpumpen, über Massenflussregler, Temperatur- und Drucksensoren partikelfrei in den Mischer gefördert. Bei den oben genannten Gesamtflussraten werden innerhalb von 1 h bis 2 h 60 l bis 240 l PCMC Suspension hergestellt.

Bei der Aufkonzentrierung entstehen mit der Nutschenfiltration über Membranfilter und der Vertikalzentrifugation über Filterbeutel feuchte Filterkuchen, die an trockener Luft zu kompakten Pulverkuchen trocknen. Durch einen anschließenden Mahlschritt können die Kuchen in die Primärkörner der PCMC zerkleinert werden, jedoch ist eine parenterale Anwendung unter diesen Herstellungsbedingungen problematisch (z. B. durch die Partikelfracht nach Abrieb).

Nach Tangentialflussfiltration (TFF) oder erweiterter Kerzenfiltration (Eigenbau BI) entsteht ein dickflüssiges PCMC-Konzentrat. Bei der Tangentialflussfiltration werden allerdings die interpartikulären Kräfte zwischen Protein und Träger derart beansprucht, dass diese Methode zur Aufkonzentrierung nur bedingt eingesetzt werden kann. Im Falle von Formulierungen mit stärkeren Bindungen zwischen Protein und Carrier kann dies jedoch neu überdacht werden. Bei der erweiterten Kerzenfiltration wird wie bei der Tangentialflussfiltration ebenfalls der Aufbau eines Filterkuchens verhindert. Die Kerzenfiltration erfolgt über einen Metallverbundfilter mit Druck. Um den Filterkuchenwiderstand zu verringern, wird die Filterkerze periodisch mit Druckluft von der Filtratseite her gereinigt und ständig laminar überströmt. Desweiteren befindet sich unterhalb der Filterkerze eine Ruhezone, in der die Suspensionspartikel und die abgesprengten Filterkuchenreste sedimentieren können. Die Lösemittelreduktion erfolgt so schonend, dass kaum Protein von der Carrieroberfläche abgeschert wird. Mit der erweiterten Kerzenfiltration können 50 l PCMC-Suspension auf 5 l in ungefähr 3 Stunden aufkonzentriert werden. 100 l PCMC-Suspension würden in zwei Anlagen in der gleichen Prozesszeit aufkonzentriert werden. Aufkonzentrierungsfaktoren von 20 sind realisierbar.

Die Trocknung erfolgt über Konvektion mit oder ohne Zuführung von Wärmeenergie oder durch Extraktion. Filterkuchen trocknen am einfachsten unter Verdunstung des restlichen Suspensionsmediums an trockener Luft. Dieser Weg eignet sich hervorragend für analytische Untersuchungen, wenn kein feinputikuläres fließfähiges

Produkt erhalten werden muss. PCMC-Konzentrate können auch mit Sprühtrocknung unter Wärmezufuhr getrocknet werden, wenn die interpartikulären Bindungen zwischen Protein und Carrier ausreichend stark genug sind. Die Sprühtrocknung wird in der Arbeit ebenfalls als analytische Methode eingesetzt und zwar zur Bestimmung der Bindungskräfte zwischen Protein und Carrier. Es wurde festgestellt, dass schwach oder nicht gebundenes Protein mit der Abluft während der Sprühtrocknung ausgetragen wird und so als Proteinverlust erkennbar wird.

Bei Extraktion des Suspensionsmediums mittels überkritischem Kohlendioxid werden gut fließfähige PCMC-Pulver erhalten, die einen mittleren Durchmesser von 3 μm bis 25 μm (x_{50} gemessen mit LD), abhängig von der eingesetzten Formulierung, aufweisen. Die Menge an Kohlendioxid, die zur Extraktion eines Milliliter PCMC-Konzentrates bei einer Gasdichte von 0,5 g/ml nötig ist, schwankt formulierungsabhängig zwischen 15 gCO₂/ml und 56 gCO₂/ml. Daneben variieren die Restfeuchten der Pulver ebenfalls abhängig von der Formulierung zwischen 1 % und 5 %. Der Monomergehalt eines Modellantikörpers ist nach superkritischer Extraktion verringert, demgegenüber zeigt ein anderer Modellantikörper keine Monomerabnahme. Der Einfluss ist daher von Antikörper zu Antikörper verschieden.

Im Labor ist eine Anlage implementiert, in die ein Edelstahltransfergefäß mit einem Füllvolumen von 280 ml passt. Für den Pilotmaßstab wird für die Extraktion von 5 l PCMC-Konzentrat mit 100 mgPCMC/ml (Aufkonzentrierungsfaktor 20) eine Extraktionsanlage mit zwei Kesseln á 2,5 l Füllvolumen empfohlen. Die Trocknungszeit von 5 l PCMC-Konzentrat beträgt mit der zweikessligen Anlage, einer Flussrate von 40 gCO₂/min, einem Verbrauch von 15 gCO₂/ml und einer überkritischen Gasdichte von 0,5 g/ml (45 °C und 100 bar) fast 16 Stunden.

Während der Präzipitation entsteht nach der Ostwaldschen Stufenregel die kinetisch kontrollierte polymorphe β -Form des Modellträgers Glycin. Am Beispiel einer Antikörperformulierung wird jedoch innerhalb von 2 Tagen eine Umwandlung des Glycins in die thermodynamisch stabilere γ -Modifikation beobachtet. Währenddessen wird der Modellantikörper auf der Oberfläche geschädigt. Die Umlagerung kann durch Lagerung unter trockenen Bedingungen bei 8 °C bis 25 °C mindestens über 6 Monate hinweg vermieden werden.

Die interpartikulären Wechselwirkungen zwischen Protein und Carrier können über Gravitation nutzende Methoden (Sedimentation oder Zentrifugation) oder über Sprühtrocknung charakterisiert werden. Zwischen den Modellformulierungen gibt es starke Bindungsunterschiede, so bindet z. B. Trypsin auf dem plättchenförmig auskristallisierenden DL-Valin-Träger wesentlich schlechter als auf dem unregelmäßig

auskristallisierenden Glycin-Träger oder Albumin bindet deutlich besser auf Glycin als Trypsin. Die Ursachen der Bindungsunterschiede sind mannigfaltig und können darüber hinaus etwa durch weitere Hilfsstoffe, das gewählte Fällungsmedium und das Mischverfahren beeinflusst werden. Eine systematische Untersuchung dieser vielseitigen Einflüsse könnte im Rahmen einer zukünftigen Formulierungsentwicklung geschehen. Damit würde das Verständnis für die Co-Kristallbildung und Protein-stabilisierung weiter verbessert werden, um schließlich das Potential dieser Technologie zur Stabilisierung von Proteinen auf kristallinen Trägern optimal ausnutzen zu können.

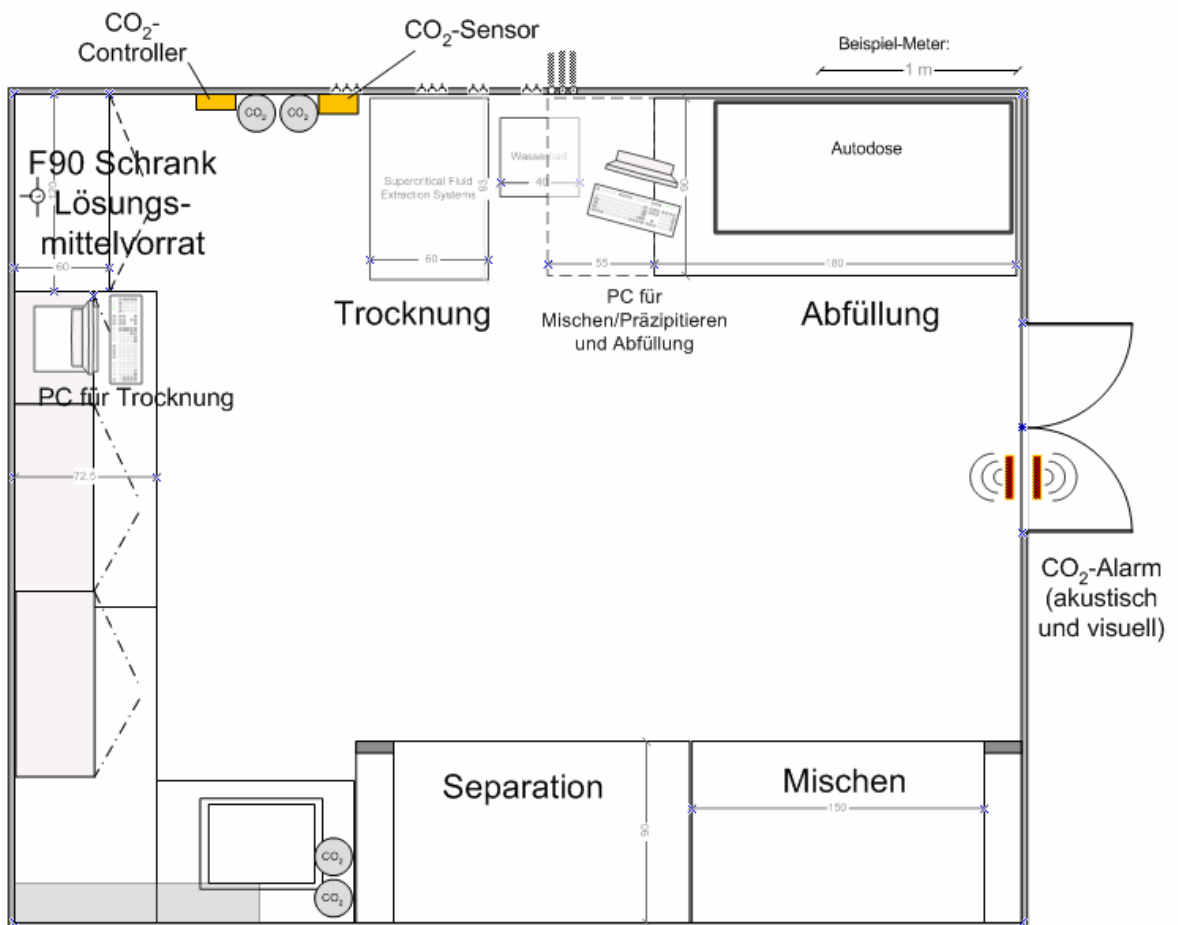


Abb. 6-A PCMC-Technikum

7 ANHANG

7.1 Autokatalyse von Trypsin

Trypsin (T0303, Sigma-Aldrich) in Tris-Puffer gelöst, wird nach 1, 7, 10, 21, 40 Stunden bezüglich des Monomergehalts untersucht (Abb. 8-A). Bereits nach 21 h sinkt der Monomergehalt um 3 % aufgrund der autokatalytischen Aktivität. Bis bei der HP-SEC die letzte Probe vom *Autosampler* analysiert wird, vergehen ca. 20 Stunden. Daher ist ein Monomerverlust von 3 % bei der Interpretation der trypsinhaltigen Mikrokrystallproben nicht prozesstechnisch bedingt.

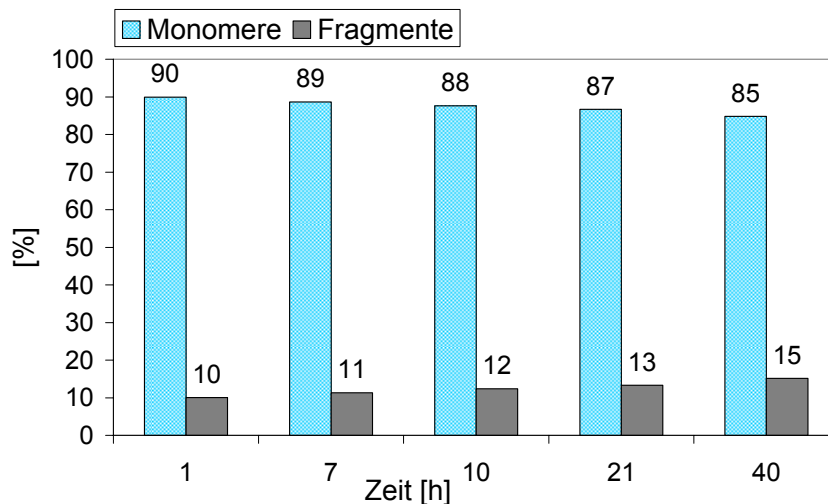


Abb. 7-A Autokatalyse von Trypsin (T0303, Sigma Aldrich)

7.2 Herstellung der Glycinmodifikationen als Referenz

Glycin tritt in 3 polymorphen Modifikationen auf. Die Stabilität nimmt bei Raumtemperatur von $\beta < \alpha < \gamma$ zu [Perlovich, 2001, Weissbuch, 2005, Ferrari, 2002, Allen, 2002].

Es erfolgt die Herstellung der 3 Referenzen [Chongrasert, 2001, Bouchard, 2007 A]. β - und γ -Glycin entstehen bei der Gefriertrocknung unter unterschiedlichen Einfrierprozeduren. Jeweils 3 ml einer 5 % (m/v) Glycinlösung werden in 10 R Vials gefüllt und in den Gefriertrockner (Laborlyophilisator Epsilon 2-12 D Spezial, Christ) gestellt, dabei werden Brommethylostopfen (SAP-Nr. 42095, BI) benutzt. Für **β -Glycin** wird die Lösung ausgehend von Raumtemperatur mit einer Kühlrate von 1,6 °C/min auf -45 °C

eingefroren und dann für 5 Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Danach beginnt der Tempersschritt indem die Vials von -45 °C mit einer Aufwärmrate von $0,05\text{ °C/ min}$ auf -5 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für 5 h gehalten werden. Darauf kühlen die Stellplatten mit einer Rate von $0,1\text{ °C/ min}$ erneut auf -45 °C ab. Die Temperatur von -45 °C wird nochmals 2 h gehalten. Anschließend beginnt die Primärtrocknung bei $0,12\text{ mbar}$, indem die Vials mit $0,1\text{ °C/ min}$ auf 0 °C erwärmt werden. Die Sekundärtrocknung startet dann bei 0 °C und mit einer Aufwärmrate von $0,1\text{ °C/ min}$ werden die Vials auf 25 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wird 12 h nachgetrocknet. Die Vials werden unter Vakuum verschlossen. **γ -Glycin** wird sehr schnell im Stickstoff eingefroren (*Quenching*), auf die auf -45 °C vorgekühlten Platten im Gefriertrockner gestellt und 4 h bei dieser Temperatur gehalten. Dann startet wie bei der α -Modifikation der Tempersschritt. Die Trocknung beider Modifikation ist ebenfalls identisch. **α -Glycin** entsteht durch Präzipitation und anschließender Transformation. Dazu werden 80 Teile Wasser mit 20 Teilen Eisessig gemischt und mit Glycin (Art. 137165, Tessengerlo Chemie S.A.) über nach Nacht rührend gesättigt. Der Bodensatz wird mit einem $0,45\text{ }\mu\text{m}$ PVDF-Membranfilter abfiltriert. Zu gleichen Teilen werden 96 % Ethanol und die gesättigte Glycinlösung unter Rühren vermischt. Das Präzipitat wird sofort über einen PVDF-Membranfilter abfiltriert und an der Luft über Nacht (12 h) getrocknet und unter 0 % Feuchte verschlossen. An der Luft erfolgt die Umwandlung von β -Glycin zu α -Glycin. Alle drei Diffraktogramme wurden innerhalb von 3 Tagen mit dem Pulverdiffraktometer aufgezeichnet (Abb. 7-B).

Tab. 7-A Vergleich der drei Modifikationen des Glycins

	18 °2 θ	19 °2 θ	20,3 °2 θ	21,8 °2 θ	25,5 °2 θ
β	sehr intensiv	schwach	sehr schwach	-	-
α	schwach	intensiv	Doppelpeak	-	-
γ	intensiv	schwach	sehr schwach	intensiv	intensiv

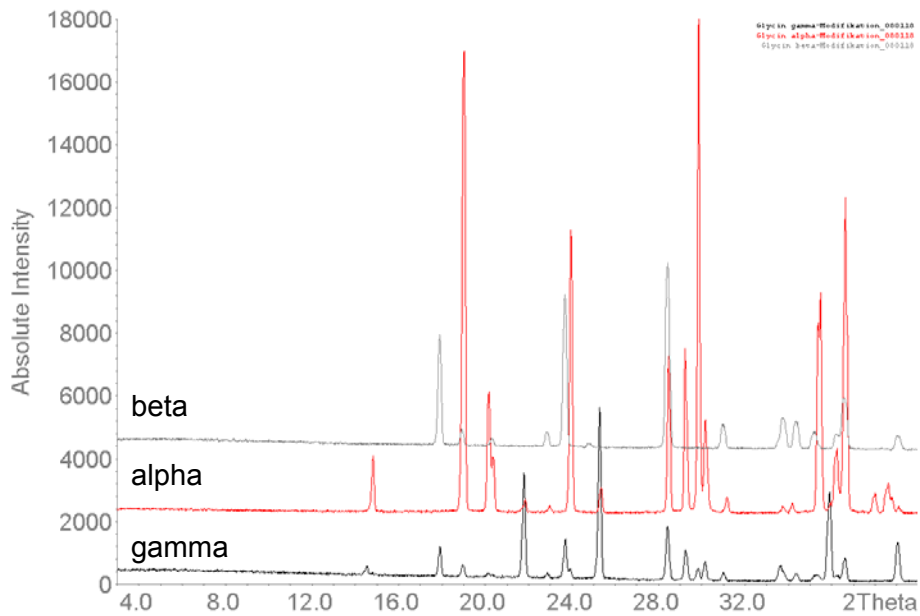


Abb. 7-B Diffraktogramme der drei Modifikationen des Glycins

Die β -Modifikation unterscheidet sich insbesondere durch den intensiven Peak bei $18^\circ 2\Theta$ und einen kleinen Peak bei $19^\circ 2\Theta$. Die α -Modifikation zeigt charakteristische Peaks bei $14,9$; 19 ; $29,2^\circ 2\Theta$ sowie Doppelpeaks bei $30,2^\circ 2\Theta$ und $34^\circ 2\Theta$. Die bei Raumtemperatur thermodynamisch stabilste γ -Modifikation unterscheidet sich sehr eindeutig von den anderen beiden polymorphen Formen durch intensive Signale bei $21,8^\circ 2\Theta$ und $25,5^\circ 2\Theta$. Weiterhin ist ein intensitätsschwacher Peak bei $13,5^\circ 2\Theta$ charakteristisch.

7.3 Diffraktogramme Stabilitätsstudien glycinhaltiger PCMC

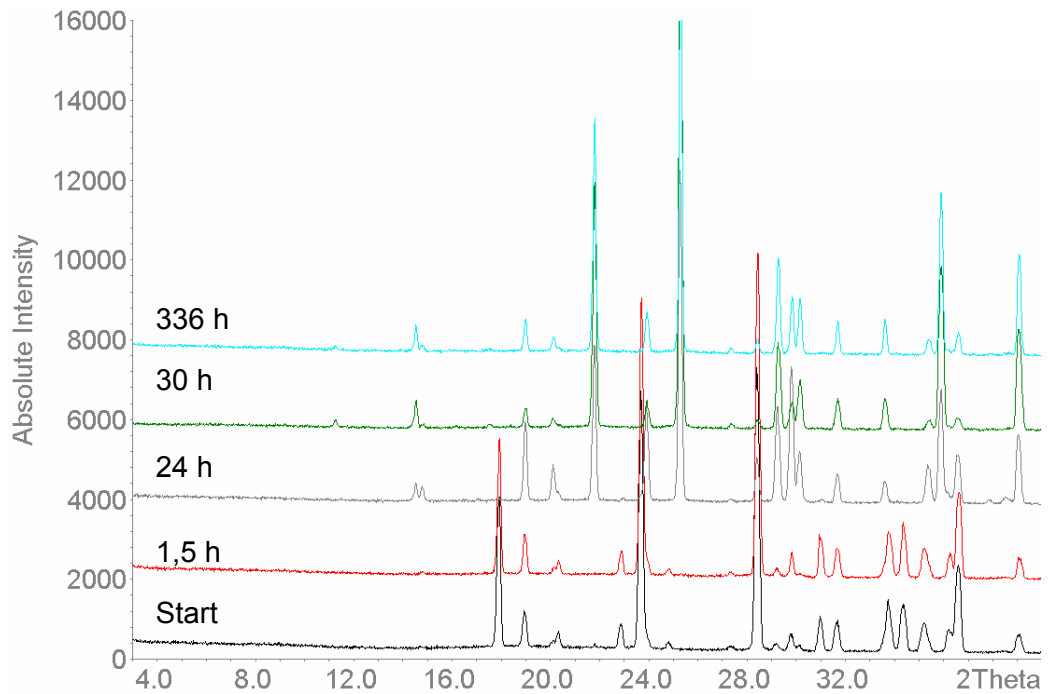


Abb. 7-C Stabilitätsstudie – 25 °C/ 60 % RH – 14 Tage (IgG I-Glycin Mikrokristalle)

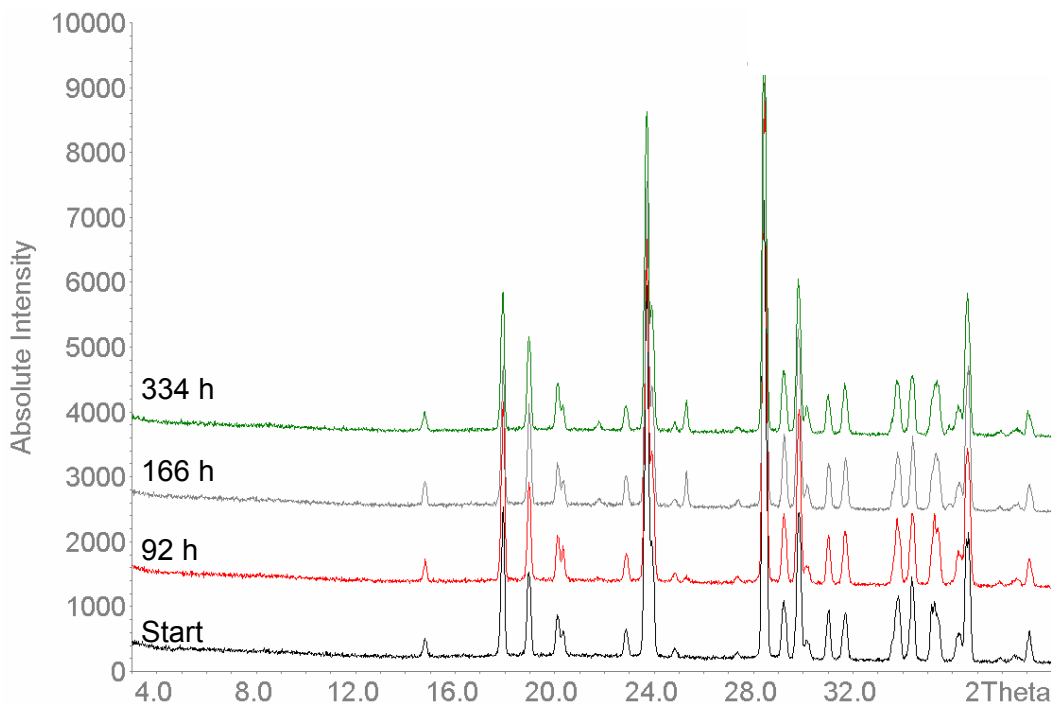


Abb. 7-D Stabilitätsstudie – 25 °C/ trocken – 14 Tage (IgG I-Glycin Mikrokristalle)

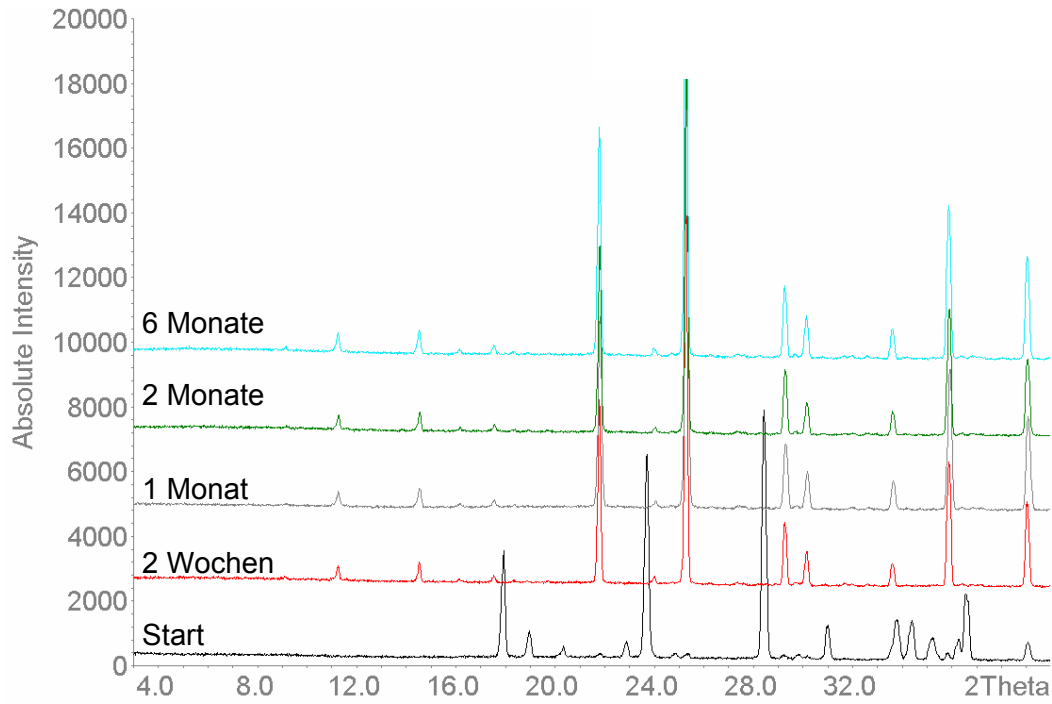


Abb. 7-E Stabilitätsstudie – Einlagerung bei 25 °C/ 60 % RH – 6 Monate (IgG I-Glycin Mikrokrystalle)

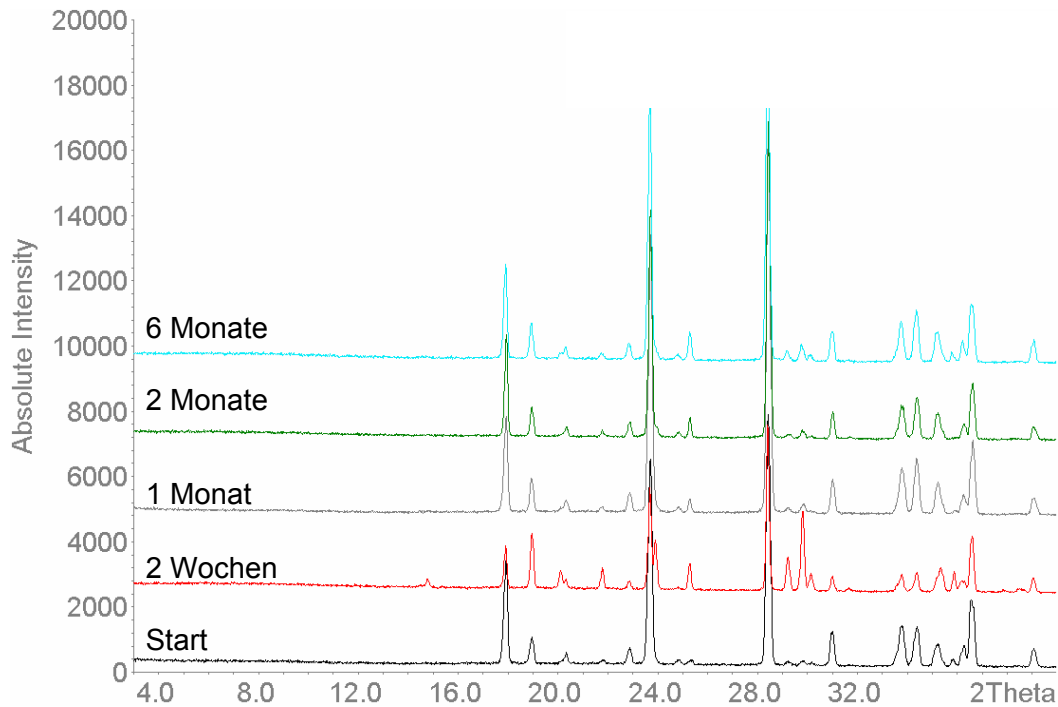


Abb. 7-F Stabilitätsstudie – Einlagerung bei 4 °C/ trocken – 6 Monate (IgG I-Glycin Mikrokrystalle)

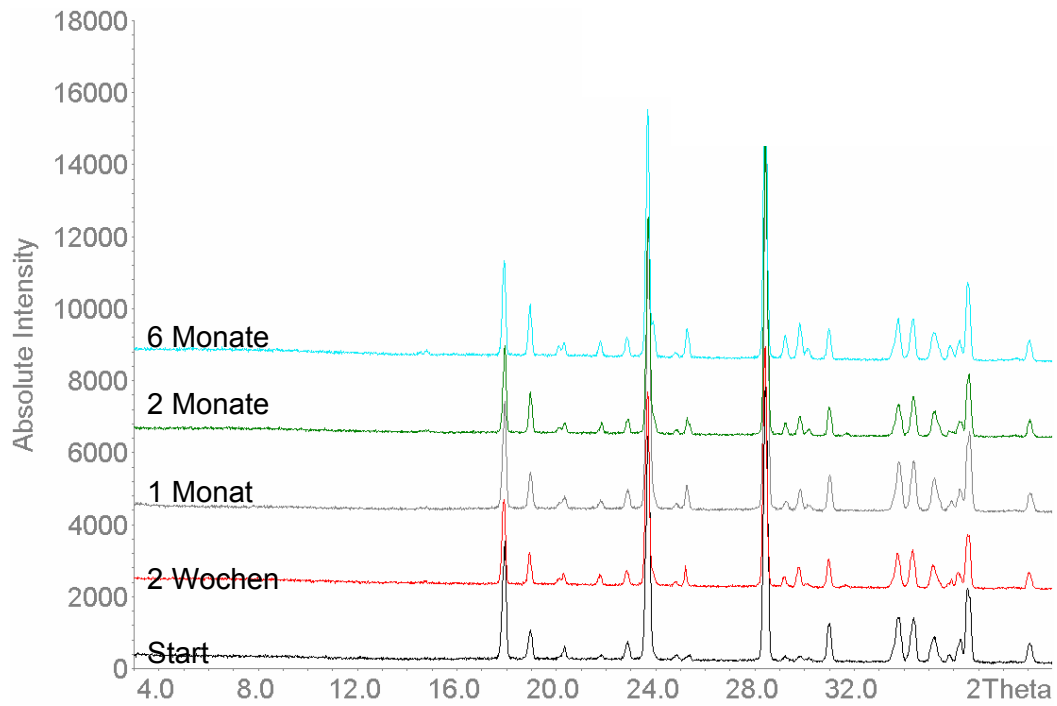


Abb. 7-G Stabilitätsstudie – Einlagerung bei 25 °C/ trocken – 6 Monate (IgG I-Glycin Mikrokrystalle)

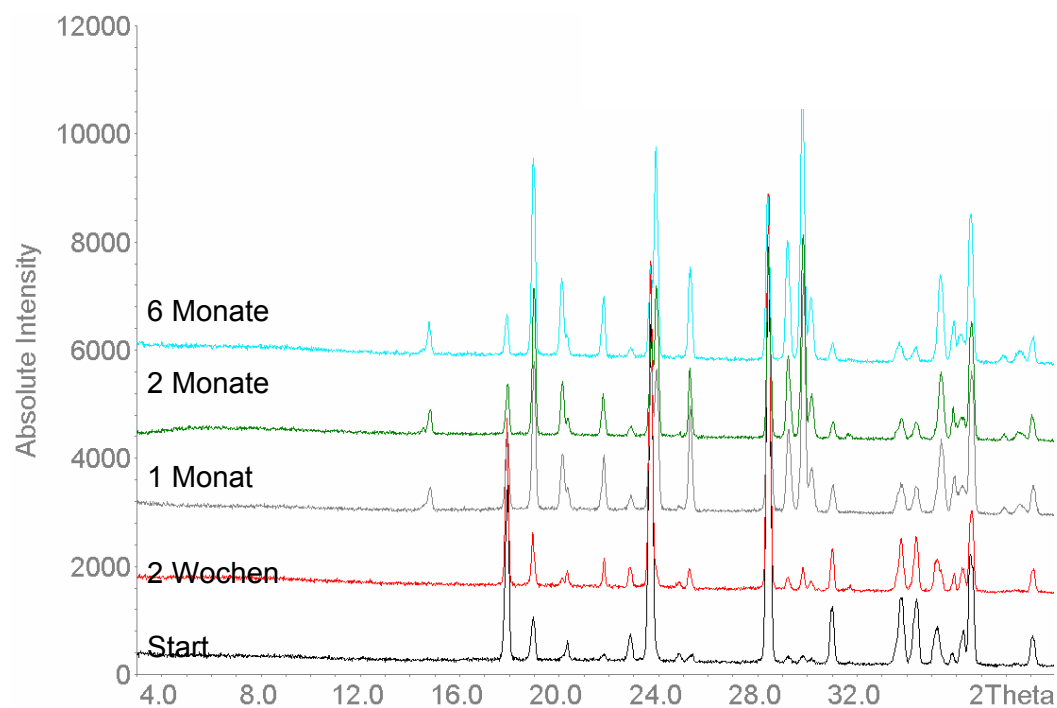


Abb. 7-H Stabilitätsstudie – Einlagerung bei 40 °C/ trocken – 6 Monate (IgG I-Glycin Mikrokrystalle)

7.4 Diffraktogramme Gesamtprozess

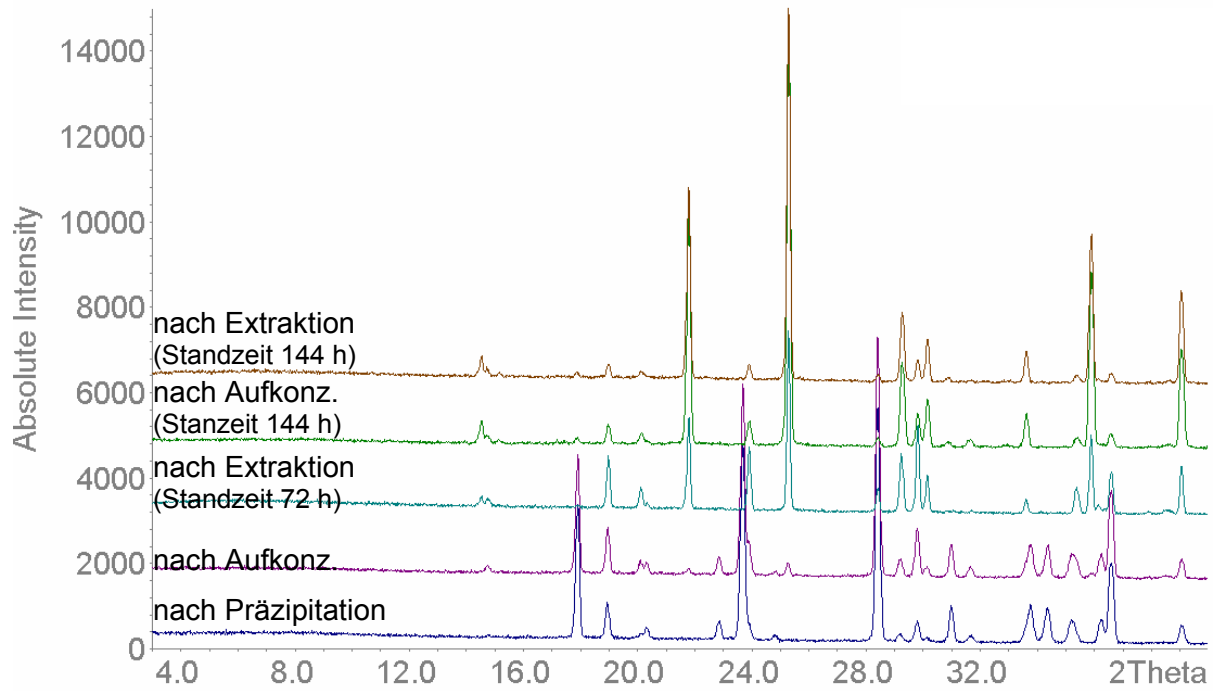


Abb. 7-I Gesamtprozess Modellformulierung 5 (IgG I-Glycin Mikrokrystalle)

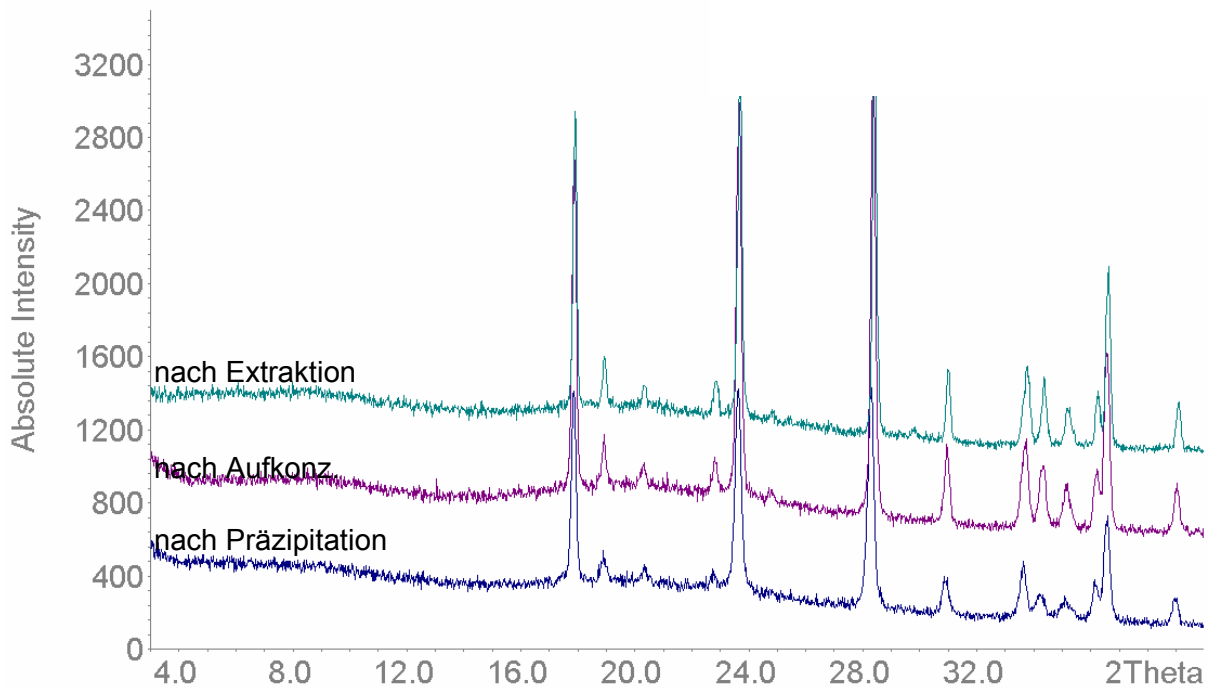


Abb. 7-J Gesamtprozess Modellformulierung 7 (IgG III-Glycin Mikrokrystalle)

8 LITERATURVERZEICHNIS

Adler M, Unger M, Lee G. Surface Composition of Spray-Dried Particles of Bovine Serum Albumin/Trehalose/Surfactant. *Pharmaceutical Research* 2000;17(7):863-70.

Allen K, Davey RJ, Ferrari E, Towler C, Tiddy GJ, Jones MO, et al. The Crystallization of Glycine Polymorphs from Emulsions, Microemulsions, and Lamellar Phases. *Cryst Growth Des* 2002 Nov 6;2(6):523-7.

Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001 Mar 1;46(1-3):307-26.

Atkins PW, Höpfner A, Schleitzer A, Bär M. *Physikalische Chemie*. 3. Auflage ed. VCH; 2001.

Baldyga J, Bourne JR. *Turbulent Mixing and Chemical Reactions*. Wiley; 1999.

Bauer FF. *Bauer-Frömming-Führer*. 7. Auflage ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2002.

Baum V. *Fluiddynamische Untersuchungen und experimentelle Untersuchungen verschiedener Mischerkonfigurationen zur Herstellung von Protein Coated Mircocrystals*. 28-2-2008. Unpublished Work

Beckmann W. APV-Seminar: Grundlagen und Auslegung von Kristallisationen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie 21. bis 22. Februar. 2008.

Bode K, Hooper RJ, Paterson WR, Wilson DI, Augustin W, Scholl S. Reinigung von Molkeproteinablagerungen mit pulsierender Stromung. *Chemie Ingenieur Technik* 2006;78(5):613.

Bohl/ Elmendorf. *Technische Strömungslehre*. Vogel-Buchverlag. Auflage. 2005.

Bot AI, Tarara TE, Smith DJ, Bot SR, Woods CM, Weers JG. Novel lipid-based hollow-porous microparticles as a platform for immunoglobulin delivery to the respiratory tract. *Pharmaceutical Research* 2000;17(3):275-83.

Bouchard A, Hofland GW, Witkamp GJ. Solubility of Glycine Polymorphs and Recrystallization of Glycine. *J Chem Eng Data* 2007 Sep 13;52(5):1626-9.

Bouchard A, Jovanovi N, Hofland GW, Mendes E, Crommelin DJA, Jiskoot W, et al. Selective Production of Polymorphs and Pseudomorphs Using Supercritical Fluid Crystallization from Aqueous Solutions. *Cryst Growth Des* 2007;7(8):1432-40.

Bouchard A, Jovanovic N, Martin A, Hofland GW, Crommelin DJA, Jiskoot W, et al. Effect of the modifier on the particle formation and crystallisation behaviour during precipitation from aqueous solutions. *The Journal of Supercritical Fluids* 2008 Apr;44(3):409-21.

Brange J, Langkjisgmaelig L, Havelund S, Volund A. Chemical Stability of Insulin. 1. Hydrolytic Degradation During Storage of Pharmaceutical Preparations. *Pharmaceutical Research* 1992 Jun 1;9(6):715-26.

Brange J. Physical stability of proteins. Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins 2000;89-112.

Brunner G. Stofftrennung mit überkritischen Gasen (Gasextraktion). Chem -Ing -Tech 59 (1987) Nr 1 S 12-22 1987.

Cape SP, Villa JA, Huang ETS, Yang TH, Carpenter JF, Sievers RE. Preparation of active proteins, vaccines and pharmaceuticals as fine powders using supercritical or near-critical fluids. Pharmaceutical Research 2008;25(9):1967-90.

Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Pharm Biotechnol 2002;13:109-33.

Chang LL, Shepherd D, Sun J, Ouellette D, Grant KL, Tang XC, et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix. J Pharm Sci 2005;94(7):1427-44.

Chiu BS, Wilkinson G. Ternary phase equilibria of the iso-propanol+water+carbon dioxide system at high pressure. Korean Journal of Chemical Engineering 1999 Mar 1;16(2):187-92.

Chongprasert S, Knopp SA, Nail SL. Characterization of frozen solutions of glycine. J Pharm Sci 2001 Nov;90(11):1720-8.

Clair N, Shenoy B, Jacob LD, Margolin AL. Cross-linked protein crystals for vaccine delivery. Proceedings of the National Academy of Sciences 96[17], 9469-9474. 1999. National Acad Sciences.

Clarke AS, Kapral R, Patey GN. Structure of two-component clusters. The Journal of Chemical Physics 1994 Aug 1;101(3):2432-45.

Cordoba-Rodriguez RV. Aggregates in MAbs and Recombinant Therapeutic Proteins: A Regulatory Perspective. BioPharm International,(November 2008): 44-53 2008.

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF. Preserving Dry Biomaterials: The Water Replacement Hypothesis, Part 1. Biopharm-Eugene- 1993;6:28.

Czeslik C. Proteinadsorption an festen Grenzflaechen. Erwünscht und unerwünscht. Chemie in unserer Zeit 2006;40(4).

Dolgonosov BM. Effect of initial supersaturation on the integral characteristics of disperse phases precipitated from solutions. Theoretical Foundations of Chemical Engineering 1996;30(4):372-7.

Dübel S, Rohrbach P, Schmiedl A. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen. Biologie Unserer Zeit 34.Jahrgang 2004 Nr.6 . 2004.

Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008. 6. Ausgabe ed. Deutsche Apotheker Verlag Stuttgart Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmH Eschborn; 2008.

Flaig R. Neue experimentelle Methoden der Ladungsdichtebestimmung Disseratation. Freie Universität Berlin. 2000.

Folkesson HG, Westrom BR, Karlsson BW. Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 1990;139(2):347-54.

Bechold-Peters K, Gembotz W, Shire S, Andya J. *Monoclonal Antibodies*. Springer Verlag, USA, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects Series. In press 2009.

Gieseler H, Friedrich-Alexander-Univ. *Product Morphology and Drying Behavior Delineated by a New Freeze-drying Microbalance*. Naturwissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2004.

Hoffmann GEd, Scherzberg H, Beckmann W, Kind M, Ulrich J, Heffels, et al. *Kristallisation in der industriellen Praxis*. Wiley-VCH; 2004.

Horn D, Rieger J. Organic nanoparticles in the aqueous phase - Theory, experiment, and use. *Angewandte Chemie - International Edition* 2001;40(23):4330-61.

Johnson BK, Prud'homme RK. Chemical processing and micromixing in confined impinging jets. *AIChE Journal* 2003;49(9):2264-82.

Johnson KA. Preparation of peptide and protein powders for inhalation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997 Jun 9;26(1):3-15.

Jovanovic N, Bouchard A, Hofland GW, Witkamp GJ, Crommelin DJA, Jiskoot W. Stabilization of Proteins in Dry Powder Formulations Using Supercritical Fluid Technology. *Pharmaceutical Research* 2004;21(11):1955-69.

Jovanovic N, Bouchard A, Hofland GW, Witkamp GJ, Crommelin DJA, Jiskoot W. Stabilization of IgG by supercritical fluid drying: Optimization of formulation and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008 Feb;68(2):183-90.

Jovanovic N, Bouchard A, Sutter M, Van Speybroeck M, Hofland GW, Witkamp GJ, et al. Stable sugar-based protein formulations by supercritical fluid drying. *International Journal of Pharmaceutics* 2008 Jan 4;346(1-2):102-8.

Judge RA, Forsythe EL, Pusey ML. The Effect of Protein Impurities on Lysozyme Crystal Growth.

Jung J, Perrut M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *The Journal of Supercritical Fluids* 2001;20(3):179-219.

Keller JU. Perspektiven der Biothermodynamik-Teil II. Adsorption von Proteinen. *Chemie Ingenieur Technik* 2008;80(6).

Krishnamurthy R, Manning MC. The Stability Factor: Importance in Formulation Development. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2002;3:361-71.

Lai MC, Topp EM. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999;88(5):489-500.

Lee G. *Spray-drying of Proteins. Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice* 2002.

Lee VHL. Peptide and protein drug delivery. *Pharmacokinetics: Regulatory, Industrial, Academic Perspectives* 1995;59.

Leuenberger H. Martin Physikalische Pharmazie 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2002.

Lindberg M, Rasmuson C. Product concentration profile in strained reacting fluid films. *Chemical Engineering Science* 1999;54(4):483-94.

Lodge JFM, Heyes DM. Structural evolution of phase-separating model colloidal liquids by Brownian dynamics computer simulation. *The Journal of Chemical Physics* 1998 Nov 1;109(17):7567-77.

Lohrmann M. Adhäsionskräfte in interaktiven Mischungen für Pulverinhalatoren. Dissertation. Universität Düsseldorf. 2005.

Lu X, Pikal MJ. Freeze-Drying of Mannitol-Trehalose-Sodium Chloride-Based Formulations: The Impact of Annealing on Dry Layer Resistance to Mass Transfer and Cake Structure. *Pharmaceutical Development and Technology* 2004;9(1):85-95.

Luche JL. *Synthetic Organic Sonochemistry*. Plenum Press. New York; 1998.

Maa YF, Hsu CC. Feasibility of protein spray coating using a fluid-bed Wurster processor. *Biotechnology and Bioengineering* 1997;53(6):560-6.

Maa YF, Nguyen PA, Sweeney T, Shire SJ, Hsu CC. Protein Inhalation Powders: Spray Drying vs Spray Freeze Drying. *Pharmaceutical Research* 1999 Feb 21;16(2):249-54.

Machunsky S., Peuker U.A., Designstudie eines kontinuierlichen Ultraschall-Faellungsreaktors. *Chemieingenieurtechnik* 2007;79(3):251-6.

Mahler HC, Mueller R, Friess W, Delille A, Matheus S. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005;59(3):407-17.

Marchisio DL, Barresi AA, Fox RO. Simulation of turbulent precipitation in a semi-batch Taylor-Couette reactor using CFD. *AIChE Journal* 2001;47(3):664-76.

Markowz G, Schirrmeister S, Albrecht J, Becker F, Schuette R, Caspary KJ, et al. Microstructured Reactors for Heterogeneously Catalyzed Gas-Phase Reactions on an Industrial Scale. *Chemical Engineering & Technology* 2005;28(4):459-64.

Mason TJ. *Sonochemistry Oxford chemistry primers* Oxford science publications. Oxford University Press; 1999.

Maury M, Murphy K, Kumar S, Mauerer A, Lee G. Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005;59(2):251-61.

Mersmann A.(Ed.). *Crystallization Technology Handbook*. Marcel Dekker; 1995.

Moore B.D, Parker M.C., Halling P.J., Partridge J., Stevens H.N.E., inventors; Rapid dehydration of proteins. University of Strathclyde, Glasgow (GB) patent WO 00/69887. 1999 May 13.

- Müller RH, Schuhmann R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 1996.
- Myerson AS. Handbook of industrial crystallization. Butterworth-Heinemann; 1999.
- Nürnberg E. Darstellung und Eigenschaften pharmazeutischer relevanter Sprühtrocknungsprodukte, eine Übersicht. *Acta Pharmaceutica Technologica* 26(1): 39-67 1980.
- Park JE, Lenter MC, Zimmermann RN, Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Fibroblast Activation Protein, a Dual Specificity Serine Protease Expressed in Reactive Human Tumor Stromal Fibroblasts. *J Biol Chem* 1999 Dec 17;274(51):36505-12.
- Partridge J, Lyle C, Vos J, Parker MC, Moore BD. Antibody-coated microcrystals Poster at the Annual conference of the AAPS 2005 Nashville, TN. 2005 Nov 5; 2005.
- Partridge J, Ganesan A, O'Farrell N, Parker M, Moore B. Stabilisation without sugars Poster at the Annual conference of the AAPS 2005 Nashville, TN. 2005.
- Partridge J, Lyle C, Vos J, Moore B. Protein Coated Microcrystal Dry Powder Formulations with Payloads of 30 %w/w to 0.01% w/w Poster at the Annual conference of the AAPS NBC 2007. San Diego, CA, June 24 - 27, 2007. 2007.
- Perlovich G, Hansen L, Bauer-Brandl A. The Polymorphism of Glycine. Thermochemical and structural aspects. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2001 Dec 16;66(3):699-715.
- Peuker UA. Aktuelle Entwicklungen der kontinuierlichen Kuchenbildenden Vakuum- und Druckfiltration. *Chemie-Ingenieur-Technik* 2007;79(11):1893-903.
- Pfeifer P, Bohn L, Görke O, Haas-Santo K, Schygulla U, Schubert K. Mixing. Microscale mixer for gas phase processes - Production, characterization, and application possibilities. *Chemie-Ingenieur-Technik* 2004;76(5):497, 607-497, 613.
- Postema EJ, Borjesson PK, Buijs WC, Roos JC, Marres HA, Boerman OC, et al. Dosimetric analysis of radioimmunotherapy with ¹⁸⁶Re-labeled bivatuzumab in patients with head and neck cancer. *J Nucl Med* 2003;44(10):1690-9.
- Randolph AD, Larson MA. Theory of particulate processes. Academic Press; 1988.
- Reverchon E. Supercritical antisolvent precipitation of micro-and nano-particles. *The Journal of Supercritical Fluids* 1999;15(1):1-21.
- Roy I, Gupta MN. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2004;39(2):165-77.
- Sacchetti M, Van Oort MM. Spray-Drying and Supercritical Fluid Particle Generation Techniques. *Lung Biology in Health and Disease* 1996;94:337-84.
- Schuele S. Stabilization of Antibodies in spray dried Powders for Inhalation. Dissertation. Universität Muenchen. 2005.
- Schuele S, Friess W, Bechtold-Peters K, Garidel P. Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007;65(1):1-9.

Schultz-Fademrecht T, Bechtold-Peters K, Fuhrherr R, Garidel PA, Bassarab S, Friess W. Characterization of Aerodynamic Behaviour of Spray Dried Protein Powders by TSI Aerodynamic Particle Sizer and by Andersen Cascade Impactor. Respiratory Drug Delivery IX, USA 2004.

Schumacher K, Winter G, Mahler MHC. Instabilitaeten von Proteinarzneimitteln. PZ Prisma 2003;10(1):15-8.

Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, et al. A Phase I Dose-Escalation Study of Sibrotuzumab in Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-positive Cancer. Clin Cancer Res 2003 May 1;9(5):1639-47.

Shamblin SL, Hancock BC, Zografi G. Water vapor sorption by peptides, proteins and their formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1998;45(3):239-47.

Shenoy B, Wang Y, Shan W, Margolin AL. Stability of crystalline proteins. Biotechnology and Bioengineering 2001;73(5):358-69.

Sipos T, Merkel JR. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. Biochemistry 1970;9(14):2766-75.

Skoog DA, Leary JJ. Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geraete, Anwendungen 4.Auflage. Springer; 1996.

Somani RH, Yang L, Hsiao BS. Precursors of primary nucleation induced by flow in isotactic polypropylene. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications 2002 Feb 1;304(1-2):145-57.

Sonner C, Maa YF, Lee G. Spray-freeze-drying for protein powder preparation: Particle characterization and a case study with trypsinogen stability. Journal of Pharmaceutical Sciences 2002;91(10):2122-39.

Suttiprasit P, Krisdhasima V, Mc Guire J. The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin. I: Surface tension measurements with single-component and mixed solutions. Journal of colloid and interface science 1992;154(2):316-26.

Tatford. Analytical techniques for the evaluation of liquid protein therapeutics. Biotechnology and Applied Biochemistry, 40(Pt 1): 67-81 2004.

Thiering R, Dehghani F, Dillow A, Foster NR. The influence of operating conditions on the dense gas precipitation of model proteins. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2000;75(1):29-41.

Thieme Roempp-Lexikon Online Version 3.2. Thieme; 2009

Tijink BM, Buter J, de Bree R, Giaccone G, Lang MS, Staab A, et al. A Phase I Dose Escalation Study with Anti-CD44v6 Bivatuzumab Mertansine in Patients with Incurable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck or Esophagus. Clin Cancer Res 2006 Oct 15;12(20):6064-72.

Tzannis ST, Prestrelski SJ. Activity-stability considerations of trypsinogen during spray drying: Effects of sucrose. Journal of Pharmaceutical Sciences 1999;88(3):351-8.

- Uchenna Agu R, Ikechukwu Ugwoke M, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respiratory Research* 2001;2(4):198-209.
- Valsesia A, Colpo P, Meziani T, Lisboa P, Lejeune M, Rossi F. Immobilization of antibodies on biosensing devices by nanoarrayed self-assembled monolayers. *Langmuir* 2006;22(4):1763-7.
- van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharmaceutical Research* 2000 Oct 1;17(10):1159-67.
- Variny M. Formation of Valine Microcrystals Through Rapid Antisolvent Precipitation. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2008;29(4):617-20.
- Volker Hessel, Holger Löwe. Mikroverfahrenstechnik: Komponenten, Anlagenkonzeption, Anwenderakzeptanz, Teil 2. *Chemie Ingenieur Technik* 2002;74:3.
- Vos J. Understanding the formation mechanism of protein coated microcrystals. Thesis. Universität Strathclyde. Glasgow. unpublished work. 2006.
- Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007;96(1):1-26.
- Weissbuch I, Torbeev VY, Leiserowitz L, Lahav M. Solvent effect on crystal polymorphism: why addition of methanol or ethanol to aqueous solutions induces the precipitation of the least stable beta form of glycine. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005 May 20;44(21):3226-9.
- Yang MX, Shenoy B, Disttler M, Patel R, McGrath M, Pechenov S, et al. Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(12):6934-9.