

**MODELLE ZUR SIMULATION DES ABFÜLLPROZESSES
BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHER ARZNEIMITTEL**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

vorgelegt von

Sandra Nicole Denkinger

aus Albstadt

Bonn 2010

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

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. K.-J. Steffens
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. A. Lamprecht

Tag der Promotion: 09.06.2010

Erscheinungsjahr 2010

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2 DEFINITIONEN UND ERLÄUTERUNGEN	3
3 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	6
3.1 Aufbau der Proteine	6
3.2 Proteinstabilität.....	8
3.2.1 Chemische Instabilität	8
3.2.2 Physikalische Instabilität	8
3.3 Methoden zur Charakterisierung von Strukturänderungen.....	10
3.4 Fill & Finish Prozess.....	18
3.4.1 Filtration	19
3.4.2 Abfüllung.....	20
3.4.3 Primärpackmittel.....	22
3.4.4 Scale-up vom Labor- bis Produktionsmaßstab	22
3.4.5 Degradation während des Fill & Finish Prozesses.....	23
3.4.5.1 Scherung.....	25
3.4.5.2 Hydrophobe Grenzflächen	27
3.4.5.3 Luft-Wasser Grenzflächen	29
3.4.5.4 Proteinverlust durch Anhaften an Grenzflächen	31
3.4.5.5 Grenzflächendenaturierung	32
3.4.6 Risikobetrachtung	33
3.5 Grundlagen zur Modellentwicklung	36
3.6 Formeln zur Berechnung von Scherraten und Mass Shear.....	38
4 MODELLPROTEINE UND METHODEN	41
4.1 Modellproteine	41
4.1.1 Formulierungen.....	42

4.1.2	Kenngrößen und Eigenschaften der Proteine und Proteinlösungen	46
4.2	Methoden	49
4.2.1	Trübungsmessung (Offline)	49
4.2.2	Trübungsmessung (Online).....	49
4.2.3	Lichtblockade.....	50
4.2.4	UV/VIS Spektrometrie und Spektroskopie.....	51
4.2.5	Größenausschlußchromatographie.....	51
4.2.6	Photonenkorrelationsspektroskopie	52
4.2.7	Makroskopische Beurteilung	53
4.2.8	Lichtmikroskopie	53
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	54
5.1	Scherstress-Modell.....	54
5.1.1	Modellbeschreibung.....	54
5.1.2	Kenngrößen.....	56
5.1.3	Ergebnisse.....	57
5.1.4	Diskussion.....	59
5.1.5	Fazit	60
5.1.6	Bewertung des Modells.....	61
5.2	Peristaltikpumpen-Modell	62
5.2.1	Modellbeschreibung.....	62
5.2.2	Kenngrößen.....	66
5.2.3	Ergebnisse.....	66
5.2.3.1	AK-3 Lösung.....	68
5.2.3.2	AK-1 Lösung.....	72
5.2.3.3	AK-2 Lösung.....	72
5.2.3.4	BSA	73
5.2.3.5	IFN-1	77
5.2.3.6	IFN-2	79
5.2.3.7	Vergleich aller Lösungen	80
5.2.4	Diskussion.....	81
5.2.5	Fazit	83
5.2.6	Bewertung des Modells.....	85
5.3	Schüttler-Modell	86
5.3.1	Modellbeschreibung.....	86
5.3.2	Kenngrößen.....	87

5.3.3	Ergebnisse.....	88
5.3.4	Diskussion	94
5.3.5	Fazit	95
5.3.6	Bewertung des Modells	97
5.4	Mischer-Modell.....	99
5.4.1	Modellbeschreibung	99
5.4.2	Kenngroßen	101
5.4.3	Ergebnisse.....	101
5.4.4	Diskussion	108
5.4.5	Fazit	109
5.4.6	Bewertung des Modells	111
5.5	Kolbenpumpen-Modell.....	112
5.5.1	Modellbeschreibung	112
5.5.2	Kenngroßen	115
5.5.3	Ergebnisse.....	117
5.5.4	Diskussion	119
5.5.5	Fazit	120
5.5.6	Bewertung des Modells	122
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	123
7	ANHANG.....	128
7.1	Geräte und Materialien	128
7.1.1	Geräte.....	128
7.1.1.1	Analysengeräte und Zubehör	128
7.1.1.2	Geräte und Zubehör Modellierung.....	130
7.1.2	Materialien.....	132
7.1.2.1	Substanzen	132
7.1.2.2	Materialien Modellierung.....	135
7.2	Berechnungen.....	139
7.2.1	Reynolds-Zahlen.....	139
7.2.2	Scherung im Scherstress-Modell	140
7.2.2.1	Abfüllnadel im Produktionsmaßstab	140
7.2.2.2	Scherrate 8.696 s^{-1}	140
7.2.2.3	Scherrate 72.150 s^{-1}	141
7.2.3	Scherraten und Kontaktzeiten im Peristaltikpumpen-Modell.....	142

7.2.3.1	Versuche mit und ohne Luftdurchfluss.....	142
7.2.3.2	Versuche mit Erwärmen.....	143
7.2.4	Kugeln- und Gummistopfen-Oberflächen im Schüttler-Modell	144
7.2.5	Kugeloberflächen und -Volumen im Mischer-Modell.....	146
7.2.6	Scherung im Kolbenpumpen-Modell.....	147
7.2.6.1	Abfüllnadel.....	147
7.2.6.2	Abfüllpumpe.....	148
7.2.6.3	Kontaktzeiten mit Silikonschläuchen und Metall (Pumpe und Nadel).....	152
7.3	Weitere Tabellen und Abbildungen	154
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	167

Abkürzungsverzeichnis

Englische Fachbegriffe sind in Klammern eingefügt.

A	Oberfläche
AD	Außendurchmesser
AK	Monoklonaler Antikörper
Art.-Nr.	Artikelnummer
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
BI	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Zirkularer Dichroismus (Circular Dichroism)
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CIP	Reinigung an Ort und Stelle (Cleaning in Place)
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration (Critical Micelle Concentration)
Cu	Kupfer
DLS	Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry)
FDA	Gesundheitsbehörde der USA (U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration)
Fe	Eisen
FNU	Trübungseinheit Formazin (Formazine Nephelometric Unit); siehe auch Kapitel 2
FTIR	Fourier Transformation Infrarot
FTU	Trübungseinheit Formazin (Formazine Turbidity Unit); siehe auch Kapitel 2
Gl.	Gleichung
Glu	Glutamin
G-Wasser	Gereinigtes Wasser
HA	Humanes Albumin
HP-SEC	Hochleistungs-Größenausschluss-Chromatographie (High-Performance-Size-Exclusion-Chromatography)
ID	Innendurchmesser

Abkürzungsverzeichnis

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Kat.-Nr.	Katalognummer
kDa	Kilo-Dalton; siehe auch Kapitel 2
Lös.	Lösung
Lys	Lysin
Mat.-Nr.	Materialnummer
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NBE	Neue biologische Wirkstoffe (New Biologic Entities)
NTU	Trübungseinheit (Nephelometric Turbidity Unit); siehe auch Kapitel 2
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCS	Photonen-Korrelationspektroskopie (Photon-Correlation-Spectroscopy)
PdI	Polydispersitätsindex
PETG	Polyethylenterephthalat-Glycol
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch (European Pharmacopeia)
pI	Isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethen; Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur; siehe auch Kapitel 2
SD	Standardabweichung der Grundgesamtheit (Standard Deviation); siehe auch Kapitel 2
SDS	Natriumdodecylsulfat; Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
silik.	silikonisiertes
SIP	Sterilisation an Ort und Stelle (Sterilisation in Place)
T _m	Übergangstemperatur (Transition Midpoint); siehe auch Kapitel 2
U	Anzahl Umdrehungen
u.a.	unter anderem
USP	Arzneibuch der USA (United States Pharmacopeia)
UV/VIS	Ultra-violettes und sichtbares Licht
V	Volumen

VW	Volumenwechsel
WE-Datum	Datum Wareneingang
WFI	Wasser für Injektionszwecke (Water for Injection)
w/w	Gewichtsprozent (Weight per Weight)
w/v	Prozent Gewicht pro Volumen (Weight per Volume)
Z-Ave	Z-Average; siehe auch Kapitel 2
z.T.	zum Teil

Die gemäß dem internationalen Einheitensystem SI (Organisation Intergouvernementale de la Convention Du Mètre, 2006) verwendeten Abkürzungen sind nicht in diesem Verzeichnis aufgeführt.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Anzahl der am Markt verfügbaren biologisch-pharmazeutischen Arzneimittel hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Für viele pharmazeutische Hersteller gewinnt die Erforschung und Entwicklung von neuen biologischen Wirkstoffen (NBE) einen immer höheren Stellenwert. Bei der Therapie in den Indikationsgebieten Onkologie, zentrales Nervensystem und Immunologie bieten NBE's ein hohes Potential (Michl et al., 2009).

Die Applikation von Biopharmazeutika erfolgt in der Regel parenteral. Dies ist erforderlich, da die biologischen Wirkstoffe die Magen-Darm-Schranke meist nicht unbeschadet passieren. Übliche Arzneiformen sind gefriergetrocknete Zubereitungen, Lösungen in Flaschen und Fertigspritzen. Flüssige Arzneiformen finden bevorzugt Anwendung, da sie ohne vorhergehende Rekonstitution sehr anwenderfreundlich sind.

Biologische Wirkstoffe sind aufgrund ihrer Größe und dreidimensionalen Struktur sehr empfindlich bzgl. chemischer und physikalischer Einflüsse. Für die Wirksamkeit im Körper ist es entscheidend, dass die räumliche Struktur der Moleküle erhalten bleibt. Aufgrund der sehr geringen Bindungskräfte innerhalb des Moleküls genügt eine geringe Aktivierungsenergie, um die Struktur aufzubrechen und die Proteine zu entfalten.

Während der Arzneimittelentwicklung ist es wichtig die Quellen für potentielle Zersetzung zu kennen, da sie für den Patienten ein Risiko bedeuten. Veränderungen in der Proteinstruktur können die Aktivität des Wirkstoffes reduzieren und eine Immunantwort im Körper hervorrufen. Die Arzneimittelzusammensetzung, bestehend aus Formulierungspuffer und weiteren Hilfsstoffen, wird während der Entwicklung so ausgewählt, dass die chemische Zersetzung möglichst gering ist.

Beim Abfüllprozess können verschiedene Quellen, wie z.B. Scherung und Kontakt zu Grenzflächen, zu physikalischer Zersetzung führen. Ein Fokus dieser Arbeit lag in der Ermittlung der Ursachen für die physikalische Instabilität während des „Fill & Finish“-Prozesses.

Die durch Fermentation und Aufreinigung gewonnenen biologischen Wirkstoffe sind sehr teuer. Eine Miniaturisierung der relevanten Schritte des Herstellungsprozesses ist daher aus wirtschaftlicher Sicht sinnvoll. Durch die Simulation einzelner Herstellungsschritte im

Modell wird die begrenzte Kapazität der Produktionsanlagen nicht belegt und der Materialbedarf an Wirkstoff ist geringer. Die Arzneimittelentwicklung kann durch parallele Untersuchung mehrerer Substanzen in Modellen zudem rascher erfolgen.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit war daher die Simulation der qualitätsbeeinflussenden Prozessschritte in Modellen.

In der Regel sind die Herstellungsbereiche für die Verarbeitung von verschiedenen Produkten konzipiert (Multi Product Facility). Hierdurch kann die Anlagenauslastung erhöht werden. Proteinlösungen mit unterschiedlicher Molekülgröße und Eigenschaften sollten idealerweise so robust sein, dass sie mit einem standardisierten Prozess abgefüllt werden können. Empfindlichkeiten auf bestimmte Einflüsse sollten möglichst früh identifiziert werden, um den Herstellungsprozess entsprechend anpassen zu können. Die Funktionalität der Modelle sollte deshalb an verschiedenen Klassen von Proteinen überprüft werden.

2 Definitionen und Erläuterungen

Aggregate	Als Aggregate werden Proteinpartikel bezeichnet, die aus dem Zusammenschluss von mehreren aufgefalteten Molekülen entstanden sind. Bei der Entstehung von Aggregaten faltet sich im ersten Schritt die räumliche Struktur auf. Treffen anschließend zwei oder mehrere aufgefaltete Proteinmoleküle aufeinander, entstehen im nächsten Schritt die Aggregate. Vom denaturierten Zustand aus kann teilweise eine Rückfaltung in den nativen Zustand erfolgen. Eine Rückfaltung vom aggregierten in den nativen Zustand ist in der Regel nicht möglich.
Degradation	Mit dem Begriff Degradation wird eine Veränderung der Tertiär-, Sekundär- und/oder Primär-Struktur des Proteinmoleküls beschrieben. Die biologische Funktion geht durch Degradation verloren.
Denaturierung	Die Auffaltung der Tertiär- bzw. Sekundär-Struktur des Proteinmoleküls wird Denaturierung genannt. Der Prozess der Denaturierung ist teilweise reversibel, d.h. eine Rückfaltung ist möglich (siehe Aggregation).
Flotation	Das Aufschwimmen von Partikeln oder Teilchen in der Lösung wird als Flotation bezeichnet.
Fragmente	Fragmente sind Teile des Proteins mit einer geringeren Molekülmasse als das intakte Proteinmolekül. Sie bestehen aus Bruchstücken der Primärstruktur.
Grenzflächen	Das Kontaktareal zwischen zwei Phasen aus Gas, Flüssigkeit oder Feststoff wird als Grenzfläche bezeichnet.
kDa	Die Einheit der Molekülmasse von Proteinen wird in Kilo-Dalton ($\hat{=}$ 1.000 g/mol) angegeben.

Lösliche Aggregate Lösliche Aggregate sind kolloid dispers gelöste Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 500 nm. In Abhängigkeit der analytischen Methode ist nicht immer eine Differenzierung zwischen löslichen und unlöslichen Aggregaten möglich, daher wird der Begriff „Aggregate“ häufig als allgemeine Bezeichnung für degradierte Proteinmoleküle verwendet.

Mass Average Shear Der „Mass Average Shear“ ist als dimensionslose Kennzahl ein Maß für die mittlere Scherbeanspruchung.
 $(\gamma\theta)_{av}$

Mass Wall Shear Der „Mass Wall Shear“ ist eine dimensionslose Kennzahl für die Scherbeanspruchung nahe der Rohrwand.
 $(\gamma\theta)_w$

RT Raumtemperatur entspricht im Rahmen der Versuche 18 - 25 °C.

SD Die Standardabweichung der Grundgesamtheit wurde ausgehend von einer Stichprobe berechnet.

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gl. 2.1}$$

Tm Übergangstemperatur, bei der ca. 50 % des Proteins aufgefaltet ist.

Trübungseinheiten In Abhängigkeit des Messaufbaus bzw. der Wellenlänge und des Messwinkels der Lichtstreuung wird die Trübung in den Einheiten FNU, FTU oder NTU angegeben. Die Kalibrierung erfolgt in allen Fällen mit Formazin-Standard, daher sollten die Werte aller Einheiten vergleichbar sein. Die Einheit FNU ist definiert für eine 90° Streulichtmessung in der Regel bei einer Wellenlänge von 860 nm (Deutsches Institut für Normung e.V., 2000). Für die Messung in FTU- und NTU-Einheiten ist keine Wellenlänge vorgegeben. Der NTU-Einheit liegt ebenfalls eine 90° Streulichtmessung zugrunde. Die FTU-Trübungseinheit bezieht sich nicht auf den Messwinkel und kann winkelunabhängig verwendet werden.

Unlösliche Aggregate Dispergierte Aggregate (grobdisperse Teilchen) mit mehr als 500 nm Durchmesser werden als unlösliche Aggregate bezeichnet.

Z-Ave Der Z-Average gibt den mittleren hydrodynamischer Durchmesser der Teilchen/Partikel an.

[] Dimensionslose Einheiten sind durch eine leere Klammer gekennzeichnet.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Aufbau der Proteine

Proteine sind chemisch aus 20 verschiedenen, natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut. Das Grundgerüst der Aminosäuren besteht aus einem Kohlenstoffatom, an welchem eine Carboxy- (COOH), eine Aminogruppe (NH_2), ein Wasserstoffatom und eine Seitenkette (R) gebunden sind (Abbildung 3-1). Die verschiedenen Seitenketten werden in hydrophobe, hydrophile und saure, basische und neutrale Reste unterteilt. Durch die sauren und basischen Gruppen zeigen Aminosäuren amphoterer Verhalten. Die Seitenketten beeinflussen die Stabilität von Proteinen entscheidend.

In der Literatur sind unterschiedliche Definitionen bezüglich der Molekülgröße von Peptiden und Proteinen zu finden. Peptide werden Moleküle genannt, bei denen weniger als 20 bis 100 Aminosäuren über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Moleküle mit mehr als 50 bis 100 Aminosäuren werden als Proteine bezeichnet. Das kleinste therapeutisch genutzte Protein ist Insulin mit einer molaren Masse von 5.800 g/mol (5,8 kDa; 51 Aminosäuren).

Das größte bekannte menschliche Protein ist Titin mit einer Molekülmasse von ca. 3.600 kDa, bestehend aus mehr als 30.000 Aminosäuren.

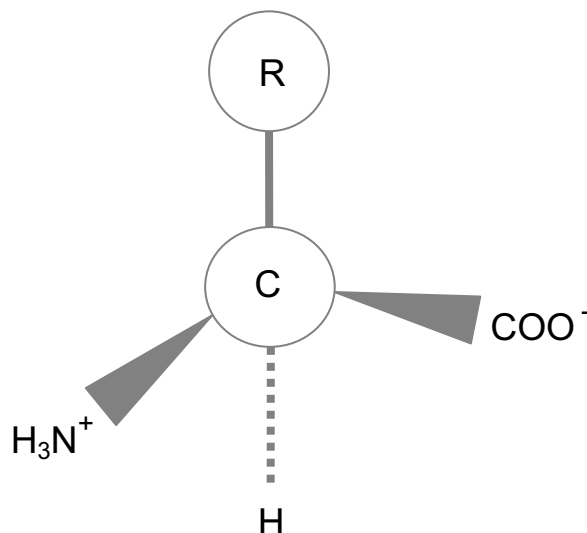


Abbildung 3-1: Struktur von Aminosäuren

Die Primärstruktur der Proteine gibt Aufschluss über die Reihenfolge der einzelnen, kovalent gebundenen Aminosäuren.

Die räumliche Anordnung zur Sekundärstruktur entsteht durch Bindungen in der Primärstruktur zu α -Helix- und β -Faltblattstrukturen und weiteren Anordnungen. Die Konformation von globulären Proteinen wird ca. zur Hälfte durch α -Helices und β -Faltblätter bestimmt (Chen, 1992; Norde et al., 1991).

Alle NH- und CO-Gruppen sind über Wasserstoffbrücken gebunden, ausgenommen die erste NH- und die letzte CO-Gruppe. Daher sind die Enden der Helices polar und befinden sich an der Außenseite des Proteinmoleküls (Banga, 2005).

Eine α -Helix besteht in der Regel aus zehn bis fünfzehn Seitenketten. Eine β -Faltblattstruktur hingegen aus ca. drei bis zehn Seitenketten.

Durch die Anordnung der α -Helices, β -Faltblätter und weiterer Strukturen innerhalb einer Molekülkette zueinander entsteht mit der Tertiärstruktur die native oder auch funktionale Anordnung der Proteine. Diese Struktur ist für die biologische Aktivität von Bedeutung. Die Faltung erfolgt spezifisch und ist von der Aminosäuresequenz der Primärstruktur vorgegeben. Polare Gruppen sind im wässrigen Milieu nach Außen gewandt, während hydrophobe Anteile nach innen gerichtet sind.

Neben Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt Stabilisierung durch Disulfidbrücken, Ionenbindungen und hydrophobe Interaktionen der Seitenketten der Aminosäurereste.

Die Quartärstruktur wird über die räumliche Anordnung mehrerer separater Proteinketten zueinander gebildet. Die Assoziate werden durch nicht kovalente Kräfte, wie hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrücken und van der Waals Kräfte, zusammengehalten (Banga, 2005).

3.2 Proteinstabilität

3.2.1 Chemische Instabilität

Die Zersetzung von Proteinen kann in chemische und physikalische Instabilitäten unterteilt werden.

Chemische Instabilität äußert sich durch Veränderung kovalenter Bindungen, d.h. vor allem Änderungen der Primärstruktur. Sie lässt sich zurückführen auf Deamidierung, Oxidation, Hydrolyse, Disulfid-Austausch, Razemisierung, β -Elimination und Proteolyse.

Die häufigste Degradationsursache proteinhaltiger Arzneimittel ist die Deamidierung (Wang, 1999). Hier werden die Aminogruppen von Glutamin oder Asparagin zu freier Carbonsäure hydrolysiert. Die Deamidierung kann begünstigt werden durch basische pH-Werte, erhöhte Temperatur und Erhöhung der Ionenstärke (Manning, 1989).

Weitere Auslöser von Degradation können Metallionen, Licht oder Sauerstoff sein. Sie stellen Katalysatoren für Oxidation dar. Oxidierbare Seitenketten sind Histidin, Methionin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin. Am leichtesten oxidierbar sind Methionin und Cystein (Wang, 1999).

Eine Degradation durch Hydrolyse tritt seltener auf. Am Empfindlichsten ist die Peptidbindung von Asparaginsäure und Prolin (Banga, 2005).

3.2.2 Physikalische Instabilität

Veränderungen der Sekundär- bis Quartärstruktur werden als physikalische Instabilitäten bezeichnet. Hierbei wird die räumliche Anordnung der Proteinketten zueinander verändert. Die Veränderung kann ausgelöst werden durch Aggregation, Adsorption an Grenzflächen, Denaturierung, Konformationsänderung, Druck und Präzipitation. Die freie Energie zur Entfaltung liegt im Bereich von 10 bis 50 kJ/mol (Wierenga, 2006).

Aggregation ist die häufigste Ursache für physikalische Zersetzung (Patro et al., 2002). Durch Änderungen der Umgebung des Proteins kann es zu Störungen des Kräftegleichgewichtes (van der Waals Kräfte) kommen, welche zu Änderungen der räumlichen Anordnung und damit zur Aggregation führen können. Des Weiteren kann Aggregation ausgelöst werden durch Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Temperatur, den Zusatz bestimmter Additive, Scherung, Frieren-Tauen, Lyophilisation und den Kontakt mit hydrophoben Grenzflächen, wie z.B. Luft (Manning, 1989; Patro et al., 2002). Hierdurch kann sich die Aktivität des Arzneimittels reduzieren, die Halbwertszeit verändern oder eine Immunantwort im Körper ausgelöst werden (Cleland et al., 1993).

Im ersten Schritt der Aggregation faltet sich das Proteinmolekül auf, wobei sich hydrophobe Aminosäurereste nach Außen kehren. Im zweiten Schritt assoziieren die hydrophoben Reste der aufgefalteten Proteine unter Entstehung von Aggregaten. Durch die Assoziation wird der Anteil hydrophober Reste in wässriger Lösung minimiert (Abbildung 3-2).

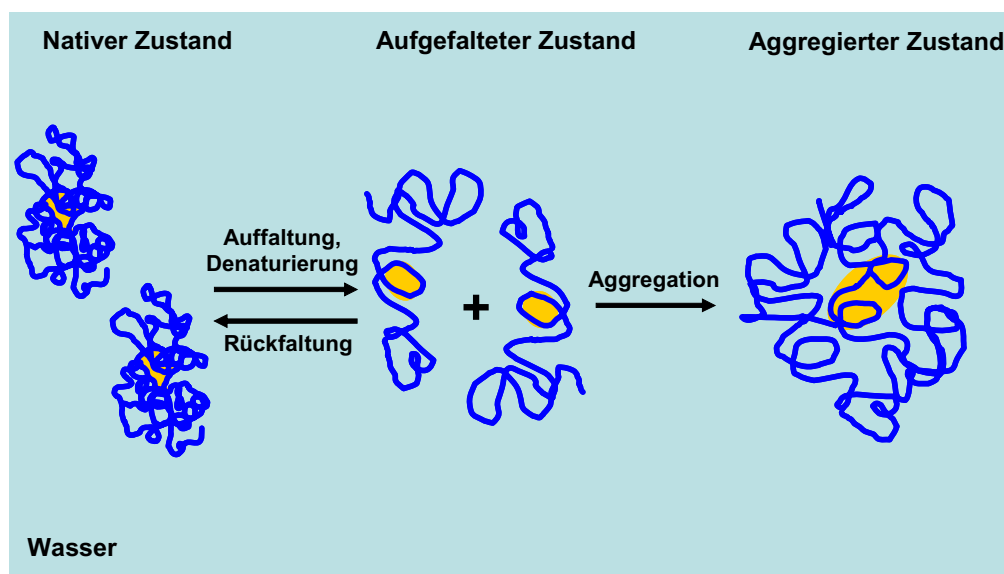


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung von Denaturierung und Aggregation; hydrophobe Bereiche sind gelb gekennzeichnet

Grenzflächen können durch Adsorption bzw. Denaturierung zu Verlust von Proteinen führen. Die hydrophoben Reste liegen zunächst geschützt im Inneren des Moleküls. Durch Anpassen der Struktur an die hydrophobe Grenzfläche kann sich die dreidimensionale Struktur auffalten und die hydrophoben Anteile mit der Grenzfläche in Kontakt treten. Die aufgefalteten Moleküle können assoziieren und Aggregation kann die Folge sein.

3.3 Methoden zur Charakterisierung von Strukturänderungen

Die Auswahl geeigneter analytischer Methoden zur qualitativen und quantitativen Beurteilung biologisch-pharmazeutischer Arzneimittel ist häufig nicht trivial.

Durch den Herstellprozess bedingte geringe Veränderungen in der Struktur können teilweise erst über die Zunahme der Abbauprodukte während der Lagerung erfasst werden. Die analytische Bestimmung von Aggregaten kann zudem erschwert werden, da durch die Messung selbst Aggregate zerstört oder generiert werden können (Philo, 2006).

Zur möglichst umfassenden Ermittlung der Degradation werden in der Regel verschiedene Analysemethoden kombiniert. Die Zuordnung der analytischen Methoden zur erfassbaren Teilchengröße, mit den in dieser Arbeit verwendeten Geräten (Anhang, Kapitel 7.1.1.1), ist in Abbildung 3-3 zusammengestellt.

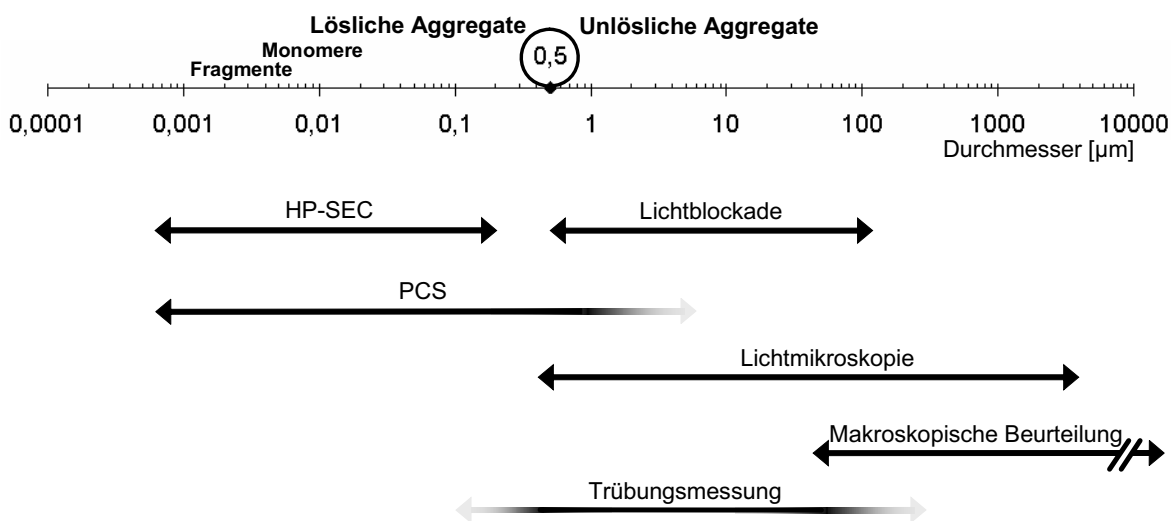


Abbildung 3-3: Analysemethoden mit Zuordnung zum Messbereich

Eine Auswahl von Analysemethoden zur Ermittlung der Primär-, Sekundär-, Tertiärstruktur und Aggregation sind in Tabelle 1 enthalten. Zur Bestimmung der Proteinstruktur bzw. deren Veränderung stehen verschiedene spektroskopische Methoden zur Verfügung. Durch thermische Analyse kann die Auffaltungstemperatur ermittelt werden.

Die Identifizierung von Aggregaten erfolgt häufig durch Trennung der Teilchen auf Basis ihrer Größe.

Des Weiteren wird bei der Freigabepfung parenteraler Biopharmazeutika in der Regel eine makroskopische Beurteilung durchgeführt. Sie gibt über die Zuordnung der Farbe und des Aussehens Aufschluss über Anzeichen von Degradation. Mit Hilfe des Lichtmikroskops kann die Morphologie von unlöslichen Aggregaten beurteilt werden.

Die Prüfung der biologischen Aktivität kann mit verschiedenen Potency-Assays erfolgen. Sie sind zur Ermittlung von geringen Veränderungen der Proteinstruktur meist nicht geeignet, da die Methodenschwankung bis zu 30 % betragen kann.

Tabelle 1: Analysenmethoden zur Untersuchung von Veränderungen der Proteinstruktur

Ermittlung von	Analytische Methoden	Methodenbeschreibung
Primärstruktur	Massenspektroskopie	-Bestimmung der Aminosäuresequenz auf Basis der Molmasse
Sekundär- und Tertiärstruktur	CD Spektroskopie FTIR Spektroskopie Raman Spektroskopie	-Messung auf Basis von Protein-Licht Interaktion
Tertiärstruktur	DSC Fluoreszenz	-Ermittlung Auffaltungstemperatur
Lösliche Aggregate	HP-SEC	-Trennung auf Basis der molekularen Größe der Teilchen -Ermittlung von Monomeren, Aggregaten, Fragmenten
	Analytische Ultrazentrifugation ¹	-Ermittlung hydrodynamische und thermodynamische Parameter mit Hilfe beschleunigter Sedimentation
	Lichtstreuungsmethoden ¹ -Statische Lichtstreuung -Flow Field Flow Fractination -Dynamische Lichtstreuung (PCS)	-Ermittlung Molekülgröße und Form -Messung auf Basis der brownischen Molekularbewegung -Ermittlung Aggregate bis zu ca. 1 µm Durchmesser -Ermittlung hydrodynamische Durchmesser
	SDS-PAGE	-Messung auf Basis der Wanderung von Teilchen im elektrischen Feld abhängig von Masse und Ladung -Ermittlung Molekülgröße in Bezug zur Referenz

¹ Zusätzlich Erfassung kleinerer unlöslicher Aggregate.

Tabelle 1: Analysenmethoden zur Untersuchung von Veränderungen der Proteinstruktur (Fortsetzung)

Ermittlung von	Analytische Methoden	Methodenbeschreibung
Unlösliche Aggregate	Trübungsmessung ²	-Messung des Streulichtanteils
	Partikelzähler (Lichtblockade)	-Ermittlung subvisueller Partikel und Größenverteilung
	Lichtmikroskopie	-Untersuchung der Morphologie
	Makroskopische Beurteilung	-Visuelle Beurteilung -Zuordnung von Farbe und Aussehen der Lösung
Aktivität	Potency-Assay -Zellkultur Assay -Tiermodell Assay -Immunoassay -Biochemischer Assay	-Prüfung der biologischen Aktivität

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Methoden erläutert. Details zur Durchführung der Analysen sind im Kapitel 4.2 zusammengestellt. Eine Bewertung der Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Eine Standardmethode zur Charakterisierung von Proteinlösungen ist die Trübungsmessung. Generell ist eine Trübungszunahme der Lösungen ein Indikator für Denaturierung. Geringe Mengen an Aggregaten können durch erhöhte Lichtstreuung erfasst werden.

Die Lichtstreuung wird in der Regel in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht detektiert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Offline-Gerät wurde bis zu einem Streulichtanteil der Proben von 40 NTU im 90° Winkel gemessen. Ab 40 NTU wurde mit drei Detektoren bei 90°, 120° (Vorwärtsstreuung) und 180° (Durchlicht) gemessen (Ratio Funktion). Die Signale wurden vom Gerät ausgewertet und ein Wert in der Einheit NTU ausgegeben. Die NTU-Werte wurden in FNU-Werte mit folgender Formel umgerechnet:

$$y = 2,467x - 2,363. \tag{Gl. 3.1}$$

y	Trübungswert	[FNU]
x	Trübungswert	[NTU]

² Zusätzlich Erfassung größerer löslicher Aggregate.

Die Formel basiert auf der gerätespezifischen Kalibrierung mit Formazinstandard. Die Umrechnung war erforderlich, da die verwendeten Messküvetten zur Materialeinsparung einen geringeren Durchmesser als der in FNU-Einheiten definierte Durchmesser hatten. Das Gerät wird in regelmäßigen Abständen mit einem Formazinstandard und Referenzsuspensionen kalibriert.

Durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin und Disulfidbindungen bei 250 bis 300 nm, kann mittels UV/VIS Spektrometrie die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Die Konzentration der Proteinlösungen wird durch die lineare Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration definiert. Die Absorptionswerte sollten 1,0 nicht überschreiten, da sonst die Linearität nicht mehr gegeben ist.

Die Konzentration wurde durch das Lambert-Beersche Gesetz mit dem jeweiligen molaren Absorptionskoeffizienten ermittelt, Gleichung 3.2.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times d} \quad \text{Gl. 3.2}$$

c	Konzentration	$[mol/L]$
A	Absorption	$[]$
ε	Molarer Absorptionskoeffizient	$[\frac{mol}{L \times cm}]$
d	Schichtdicke der Küvette	$[cm]$

Praktisch wird die Konzentrationsbestimmung von Proteinen häufig bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Durch Anwesenheit von Aggregaten kann die Lichtstreuung erhöht sein und somit auch die ermittelte Absorption bei 280 nm. Korrektur kann hier durch Subtraktion des Streulichtanteils im Bereich von 300 bis 350 nm vom Messwert bei 280 nm erfolgen.

Durch Messung von nicht filtrierten und direkt vor Messung filtrierten Proben kann der Anteil unlöslicher Aggregate bestimmt werden. Die unlöslichen Aggregate werden vom Filter zurückgehalten und der gemessene Proteingehalt sinkt im Vergleich zum Messwert der unfiltrierten Probe.

Des Weiteren kann mittels UV/VIS Spektrometrie der Aggregations-Index (Wang et al., 2008) durch prozentuale Ermittlung des Streulichtanteils (z.B. 320 nm) bezogen auf die Absorption bei 280 nm ermittelt werden, Gleichung 3.3. Diese Methode stellt eine Alternative zur Trübungsmessung bzw. Ergänzung dazu dar.

$$AI = \frac{100 \times OD320}{OD280 - OD320} \quad \text{Gl. 3.3}$$

<i>AI</i>	Aggregations-Index	[%]
<i>OD320</i>	Optische Dichte; Streulicht bei 320 nm	[]
<i>OD280</i>	Optische Dichte; Absorption und Streulicht bei 280 nm	[]

Mit dem Trübungsphotometer wird in der Regel in einem Wellenlängenbereich größer 400 nm gemessen. Da die Lichtstreuintensität mit der vierten Potenz der Wellenlänge abnimmt (Schmidt, 2000), kann durch diese Methode die Empfindlichkeit zur Ermittlung von Strukturänderungen gegenüber der Trübungsmessung erhöht sein.

Mit der Größenausschlußchromatographie (HP-SEC) können lösliche Aggregate, Monomere und Fragmente bestimmt werden. Die Trennung der Teilchen erfolgt durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit über eine Chromatographiesäule. Die Säule enthält Poren mit unterschiedlichen Durchmessern. Durch einen so genannten Laufpuffer, mit dem die Probe verdünnt wird, wird ein konstanter Fluss über die Säule erzeugt. Große Teilchen können die Säule relativ ungehindert durchlaufen und kommen als erstes am UV/VIS-Detektor an. Kleinere Teilchen können in die Poren eindringen und benötigen daher länger, um die Säule zu passieren.

Mit dem UV/VIS Spektrometer wird die Absorption der Lösung über die Dauer der Retention aufgezeichnet. Durch Zuordnung der Retentionszeiten und der am UV/VIS-Detektor gemessenen Absorption können die Peaks den Aggregaten, Monomeren und Fragmenten zugeordnet werden. Zur quantitativen Auswertung werden die einzelnen Peakflächen in Relation zur Gesamtpeakfläche gesetzt. Durch Kalibrierung der Retentionszeiten mit Hilfe von Standards, so genannten Molekularmarkern, kann den Aggregaten, Monomeren und Fragmenten ein ungefähres Molekulargewicht zugeordnet werden.

Die Bestimmung von unlöslichen Aggregaten ist mittels HP-SEC nicht möglich, diese werden durch 0,2 µm Filtration entfernt bzw. auf der Vorsäule zurückgehalten.

Mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) kann der Partikeldurchmesser der Teilchen im Bereich von wenigen Nanometern bis in den unteren Mikrometerbereich ermittelt werden. Das Messprinzip beruht auf der Erfassung der Veränderung der Lichtstreuintensität verursacht durch brownische Molekularbewegung der Teilchen. Die Bewegung der Teilchen wird zeitabhängig erfasst. Kleinere Teilchen bewegen sich schneller in der Lösung als größere. Die Bewegungsgeschwindigkeit kann einem bestimmten Partikeldurchmesser zugeordnet werden.

Da die Teilchen von einer Hydrathülle umgeben sind, wird diese bei Auswertung der Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen mit erfasst. Korrekt wird daher vom hydrodynamischen Durchmesser gesprochen.

Der Z-Average entspricht dem mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Partikelgrößenverteilung. Er wird auf Basis der Intensitätsverteilung über den gemessenen Partikelgrößenbereich ermittelt. Bei einer monomodalen Verteilung entspricht der Z-Average dem Mittelwert einer Gaußverteilung. Antikörper haben in der Regel einen Z-Average von ca. 11 nm (Nobbmann et al., 2007).

Der Polydispersitätsindex (PDI) drückt die Homogenität der Verteilung aus, d.h. die Modalität der Teilchen in der Probe. Ein PDI-Wert größer 0,1 deutet darauf hin, dass mehr als ein Maximum vorhanden ist. Die Quadratwurzel des PDI entspricht der relativen Standardabweichung der Gaußverteilung einer monomodalen Probe.

Subvisuelle Partikel können durch Partikelzähler mit Hilfe der Lichtblockade erfasst werden. Eine Standardmethode ist im Ph. Eur. und im USP im „Light Obscuration Particle Count Test“ für parenterale Arzneimittel beschrieben. Die Grenze für die erlaubte Anzahl der Partikel bei einem Lösungsvolumen kleiner 100 Milliliter liegt bei max. 6.000 Partikel pro Behältnis für Partikel $\geq 10 \mu\text{m}$ und bei max. 600 Partikel pro Behältnis für Partikel $\geq 25 \mu\text{m}$ (European Pharmacopoeia, 2008; United States Pharmacopeia, 2008). Die Prüfung auf subvisuelle Partikel von Parenteralia ist wichtig, da sie die Arzneimittelsicherheit und die Wirksamkeit über die Haltbarkeitsdauer des Arzneimittels beeinflussen können (Carpenter et al., 2009).

Die Farbe und das Aussehen der Lösungen wurden makroskopisch beurteilt. Die Entstehung von Schaum über die Versuchsdauer wurde erfasst und teilweise quantifiziert. Sichtbare Partikel in der Lösung wurden, wenn möglich, als faser- oder kugelförmige Teilchen beurteilt.

Die Größe und Form einer größeren Anzahl unlöslicher Proteinaggregate kann mit dem Lichtmikroskop untersucht werden.

In der Regel sind Proteinaggregate amorph. Mit Hilfe von Polarisationsfiltern können kristalline Anteile, falls vorhanden, identifiziert werden.

Der Vorteil der Lichtmikroskopie ist, dass die tatsächliche Form und Größe (wenn Messskala am Mikroskop verfügbar) der Aggregate direkt ermittelt werden kann. Nachteilig ist, dass die Untersuchung eines Tropfens einer Probe nicht unbedingt repräsentativ für die Grundgesamtheit ist.

Tabelle 2: Bewertung der eingesetzten Methoden

Methoden	Vorteile	Nachteile
Trübungs- messung	<ul style="list-style-type: none"> - einfache, nicht zerstörende Messung - teilweise linear zur Partikelanzahl - sehr sensitiv für geringe Anteile von Aggregaten 	<ul style="list-style-type: none"> - Luftblasen stören Messergebnis - schnell sedimentierende oder flotierende Partikel werden nicht erfasst - kein Rückschluss auf Partikelgröße möglich - keine direkte Korrelation zum Anteil aggregierter Proteine
UV/VIS Spektrometrie	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung unlöslicher Aggregate durch Konzentrationsmessung nicht filtrierter und filtrierter Probe - Erfassung Absorption - durch Aggregations-Index zusätzliche Information zur Lichtstreuung 	<ul style="list-style-type: none"> - Messung von falsch hoher Konzentration, wenn Streulichtanteil bei 280 nm höher ist als bei 320 nm
HP-SEC	<ul style="list-style-type: none"> - Differenzierung zwischen Monomeren, Aggregaten und Fragmenten - sensitiv für geringe Anteile von Aggregaten, Fragmenten 	<ul style="list-style-type: none"> - keine Erfassung unlöslicher Aggregate
PCS	<ul style="list-style-type: none"> - sehr sensitiv für geringe Anteile von Aggregaten - qualitative Beurteilung durch Z-Average und PDI 	<ul style="list-style-type: none"> - keine quantitative Beurteilung der Aggregate, da Proben meist zu polydispers - schnell sedimentierende oder flotierende Partikel werden nicht erfasst
Lichtblockade	<ul style="list-style-type: none"> - einfache und robuste Methode 	<ul style="list-style-type: none"> - hohes Probenvolumen (ca. 8 mL) erforderlich - Luftblasen stören Messergebnis
Licht- mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> - unterschiedliche Partikelmorphologie sichtbar - Identifizierung von optisch isotropen und anisotropen Bereichen 	<ul style="list-style-type: none"> - kein Rückschluss auf Homogenität der Probe - keine Korrelation zum Anteil der aggregierten Proteine - nicht geeignet für geringe Anteile von Aggregaten
Makroskopische Beurteilung	<ul style="list-style-type: none"> - einfache, schnelle Methode - nicht zerstörende Bestimmung 	<ul style="list-style-type: none"> - keine quantitative Erfassung der Aggregation - subjektive Methode

Durch die Kombination der oben beschriebenen Analysemethoden wird der Größenbereich löslicher (inkl. Fragmente) und unlöslicher Aggregate abgedeckt. Geringe Mengen an degradierten Proteinen können mit Hilfe der Trübungs-, PCS- und HP-SEC Analyse erfasst werden. Eine qualitative und quantitative Beurteilung der Proteinlösungen ist möglich.

3.4 Fill & Finish Prozess

Der Wirkstoff für Biopharmazeutika wird durch Fermentation in Mikroorganismen oder tierischen Zellen gewonnen. Nach Aufreinigung der Lösung und ggf. Austausch des Puffers werden alle Hilfsstoffe für die endgültige Zusammensetzung des Arzneimittels hinzugegeben. Diese Lösung, auch als endformulierter Bulk bezeichnet, wird im Fill & Finish Prozesses zum Fertigarzneimittel verarbeitet.

Die meisten proteinhaltigen Arzneimittel werden zurzeit noch parenteral verabreicht, deshalb ist eine Sterilisation erforderlich. Eine Terminalsterilisation im Endbehältnis unter Arzneibuchbedingungen ist aufgrund der niedrigen Denaturierungstemperatur der Proteine nicht möglich. Die Lösung wird daher zur Keimreduzierung einer Sterilfiltration mit Membranen der nominellen Porengröße 0,2 µm unterzogen.

Das Filtrat wird in Reinräumen oder Isolatoren mit laminarer Luftströmung unter keimarmen Bedingungen weiter verarbeitet. Die anschließende Abfüllung in das Endbehältnis erfolgt auf Abfüllanlagen.

Als Endbehältnis werden häufig Glasfläschchen, auch als Vials bezeichnet, eingesetzt. Nach Abfüllung werden die Vials mit einem Gummistopfen verschlossen und mit einer Aluminiumkappe verbördelt.

Vor der anschließenden Etikettierung und Verpackung wird jedes einzelne Gebinde manuell oder maschinell durch Kamerasysteme visuell geprüft. Hierbei werden z.B. Endbehältnisse mit Partikeln, Verunreinigungen und kosmetische Defekte der Packmittel aussortiert.

Die Lagerung von flüssigen Biopharmazeutika erfolgt überwiegend bei 2-8 °C. Eine Kühlung während der Lagerung ist erforderlich, da die Stabilität der Proteinlösungen bei Raumtemperatur häufig nicht ausreichend ist, um eine Haltbarkeitsdauer von 18 bis 36 Monaten zu erreichen.

In Abbildung 3-4 sind die wichtigsten Schritte des Fill & Finish Prozesses am Beispiel der Abfüllung von Vials dargestellt. Die Sterilfiltration und Abfüllung wurden in Modellen simuliert.

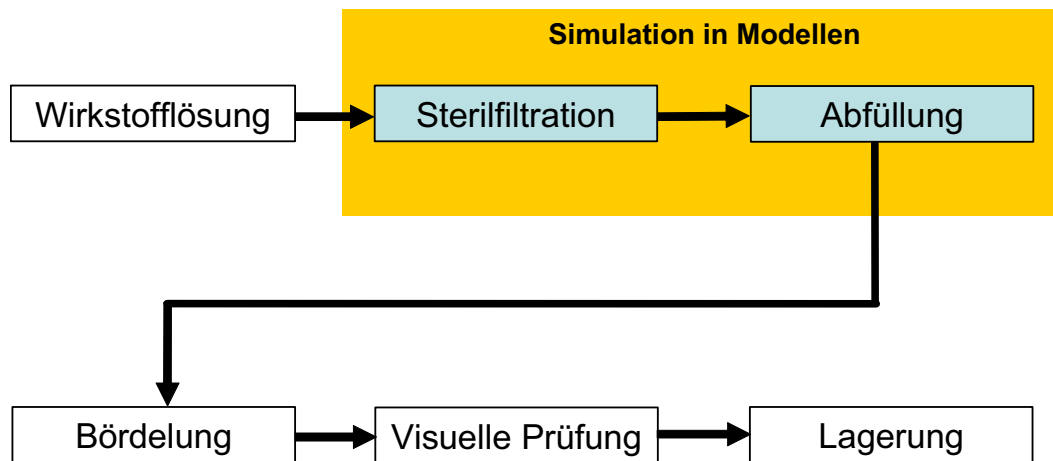


Abbildung 3-4: Prozesskette des Fill & Finish Prozesses am Beispiel der Vialabfüllung

3.4.1 Filtration

Bei der Sterilfiltration wird der endformulierte Bulk von einem Behälter über einen Filter in einen zweiten Behälter überführt. Wird die Lösung komplett in den zweiten Kessel filtriert und erst danach die Abfüllung durchgeführt, wird von einer Bulkfiltration gesprochen. Die Lösung wird hierbei filtriert mit Hilfe eines Überdrucks von bis zu ca. 2 bar, der durch Stickstoff oder Druckluft erzeugt wird. Das Material der Kessel besteht meist aus Edelstahl. Die Verbindung zwischen Kessel und Filter wird über Kunststoffschläuche z.B. aus Silikon, PTFE oder Edelstahlverrohrungen hergestellt.

Eine weitere Möglichkeit der Sterilfiltration ist das Fördern der Lösung mit Hilfe verschiedener Arten von Pumpen. Die Lösung wird hierbei über Schläuche aus dem Bulkbehälter angesaugt und über den Filter gedrückt. Diese Filtrationsart bietet den Vorteil, dass anstelle von Edelstahlcontainern auch so genannte Bags (z.B. aus Polyethylen, Ethylenvinylacetat) als Behälter vor und nach der Filtration eingesetzt werden können.

Immer häufiger wird die Filtration möglichst nahe an der Abfüllanlage durchgeführt, parallel zum Abfüllprozess. Dieses Vorgehen wird als Inlinefiltration bezeichnet. Das aseptische Risiko wird minimiert, da die Filtration direkt vor der Befüllung der Vials erfolgt. Das Filtrat wird meist direkt von der Befüllstation in einen Zwischentank aus Edelstahl oder Glas gefördert.

Je nach Anwendung werden hydrophobe oder hydrophile Filtermembranen aus z.B. Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluorethylen, Polyethersulfon, Glasfaser, Cellulose, Cellulose-Ester, Polycarbonat, Polypropylen oder Polyamid eingesetzt. Die Größe der verwendeten Filterfläche ist abhängig von dem zu filtrierenden Volumen und der Neigung der Wirk- und Hilfsstoffe zur Adsorption an der Filtermembran bzw. Filterverblockung. Das Filtrationsvolumen im Produktionsmaßstab kann von wenigen bis zu mehreren hundert Litern betragen. Die nominalen Porendurchmesser liegen bei 0,2 µm oder kleiner.

3.4.2 Abfüllung

Zur Dosierung der Lösungen in das Endbehältnis sind verschiedene Abfüllsysteme, z.B. Drehkolbenpumpen, Zeit-Druck-Füller, Peristaltikpumpen, Rolling Diaphragm Pumps und Wiegedosierer, am Markt verfügbar. Die Oberflächen, die mit der Abfülllösung in Kontakt kommen sind größtenteils aus Edelstahl, PTFE und Silikon (z.B. Schläuche, Dichtungen).

Sehr verbreitet ist der Einsatz von Abfüllanlagen mit Drehkolbenpumpen aus Edelstahl. Die Drehkolbenpumpen bestehen aus einem Zylinder mit einer passgenau gefertigten Kolbenstange. Über den Kolbenhub wird das Füllvolumen eingestellt. Vorteil der Drehkolbenpumpen ist ihre Robustheit gegenüber Temperaturschwankungen der Lösung. Ein einmal eingestelltes Füllvolumen muss selbst bei einem Abfüllprozess über mehrere Stunden in der Regel nicht nachjustiert werden.

In der jüngeren Vergangenheit finden vermehrt Zeit-Druck-Füllsysteme Anwendung. Die Dosierung erfolgt über die Steuerung der Öffnungsintervalle mehrerer Ventile bis zur Abfüllnadel. An einem Zwischenbehälter an der Abfüllmaschine, der bis zu mehreren Litern Fassungsvermögen haben kann, wird ein Überdruck angelegt. Der Druck und der Flüssigkeitsspiegel des Behälters werden so gesteuert, dass eine konstante Fließrate bei der Dosierung erhalten wird. Die Anlagen können automatisch über CIP/SIP-Prozesse gereinigt und sterilisiert werden. Die produktberührenden, mehrfach verwendeten Teile sind auf den Zwischenbehälter und die Abfüllnadel beschränkt. Daher ist der Aufwand der Reinigung und deren Validierung meist geringer als beim Drehkolbenprinzip.

Abfüllanlagen im Produktionsmaßstab verarbeiten ca. 50 Behältnisse pro Minute und Dosiereinheit. Durch Erhöhung der Anzahl an Dosiereinheiten ist die Abfüllung von mehreren hundert Behältern pro Minute möglich.

Für die parenterale Anwendung werden in der Regel Füllvolumen von ca. 0,3 bis 100 mL pro Einzelbehälter abgefüllt.

Die Dosierung in das Primärpackmittel erfolgt über Abfüllnadeln aus Edelstahl. Der eingesetzte Innendurchmesser der Nadeln wird abhängig vom Füllvolumen und den Eigenschaften der Lösung gewählt und liegt bei ca. 0,8 bis 5 mm.

Die Befüllung in das Endbehältnis kann durch die Position der Abfüllnadel „unter“, „am“ oder „über“ dem Flüssigkeitsspiegel erfolgen, Abbildung 3-5. Bei Neigung der Lösung zu Schaumbildung kann eine „unter Spiegel“ oder „am Spiegel“ Abfüllung vorteilhaft sein. Des Weiteren kann das Abtropfverhalten und evtl. die Dosiergenauigkeit, je nach Viskosität und Oberflächenspannung der Lösung, durch die Positionierung der Nadel beeinflusst werden. Falls oxidationsempfindliche Produkte abgefüllt werden, gibt es die Möglichkeit vor Verschießen der Behälter mit einem Inertgas, zum Beispiel Stickstoff, zu begasen.

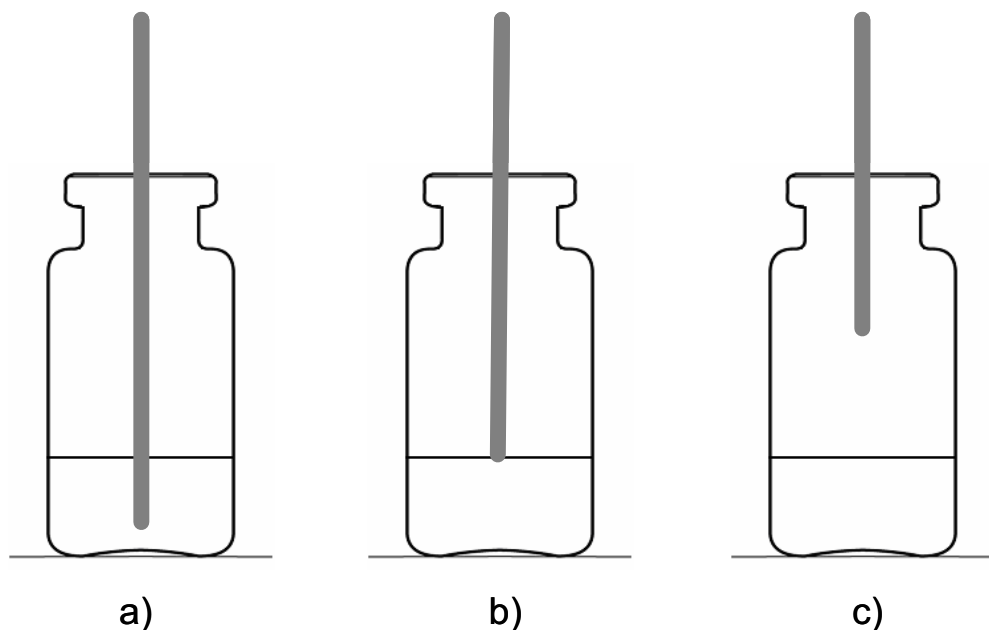


Abbildung 3-5: Positionierung der Nadel bei Abfüllung, schematische Darstellung; a) Unter Spiegel; b) Am Spiegel; c) Über Spiegel

3.4.3 Primärpackmittel

Als Primärpackmittel werden häufig Vials, Spritzen oder Karpulen, überwiegend aus Glas, verwendet. Die Applikation von Karpulen erfolgt mit Hilfe verschiedener Pensysteme. Glas-spritzen und Glaskarpulen werden vor Befüllung mit Lösung silikonisiert (teilweise über Heißluft eingebrannt), bzw. werden bereits silikonisiert und steril vom Glashersteller bezogen. Die Silikonisierung ist erforderlich, um eine geringe Gleitreibungskraft des Stopfens in der Spritze oder Karpule bei der Anwendung zu erhalten.

Vereinzelt werden auch verschiedene Kunststoffbehältnisse eingesetzt. Ein Vorteil gegenüber Glas ist die erhöhte Bruchstabilität. Nachteile sind die relativ hohe Wasserdampfdurchlässigkeit und das potentielle Herauslösen von Substanzen aus dem Kunststoff.

Die Behälter werden mit einem silikonisierten oder PTFE-beschichteten Gummistopfen verschlossen. Die Silikonisierung bzw. Beschichtung der Gummiteile ist unter anderem erforderlich, um eine maschinelle Förderung auf der Abfüllanlage zu ermöglichen.

3.4.4 Scale-up vom Labor- bis Produktionsmaßstab

Der Herstellprozess des Endproduktes besteht im Labor-, sowie Pilot- und Produktionsmaßstab aus Sterilfiltration und Abfüllung. Idealerweise wird während der Arzneimittelentwicklung bereits das gleiche Filtrations-, Abfüllprinzip und das gleiche Primärpackmittel eingesetzt, wie später im Produktionsmaßstab. Hierdurch kann ein maximales Prozess- und Produktwissen aufgebaut werden. Da teilweise verschiedene Produktionsanlagen für die spätere Marktversorgung in Frage kommen, kann eine Änderung des Filtrations- und Abfüllprinzips durch die Maßstabsvergrößerung notwendig werden. Ferner wird die Dosierung im Laufe der klinischen Entwicklung ermittelt und bei Bedarf die Größe des Primärpackmittels angepasst.

Bei der Filtration wird die Größe der Membran bezüglich des zu filtrierenden Volumens ausgewählt. Ein Scale-up ist hier durch ein unverändertes Verhältnis von Filterfläche zu Bulkvolumen im Normalfall unkritisch.

Durch die Untersuchung mit verschiedenen Modellen im Kleinstmaßstab wurden in dieser Arbeit die Degradationswege ausgewählter Proteine und ihre Risiken für die Prozessierung identifiziert.

3.4.5 Degradation während des Fill & Finish Prozesses

Die Qualität der Proteinzubereitung im Fill & Finish Prozess wird besonders durch physikalische Zersetzung, wie Aggregation und Adsorption an Grenzflächen, beeinflusst. Während des Prozessierens werden diese verursacht bzw. treten auf in Form von Scherung, Luft-Wasser Grenzflächen und weiteren Grenzflächen.

Die in Abbildung 3-6 gelb markierten Fill & Finish prozessrelevanten Auslöser für physikalische Zersetzung wurden anhand von Modellen verifiziert.

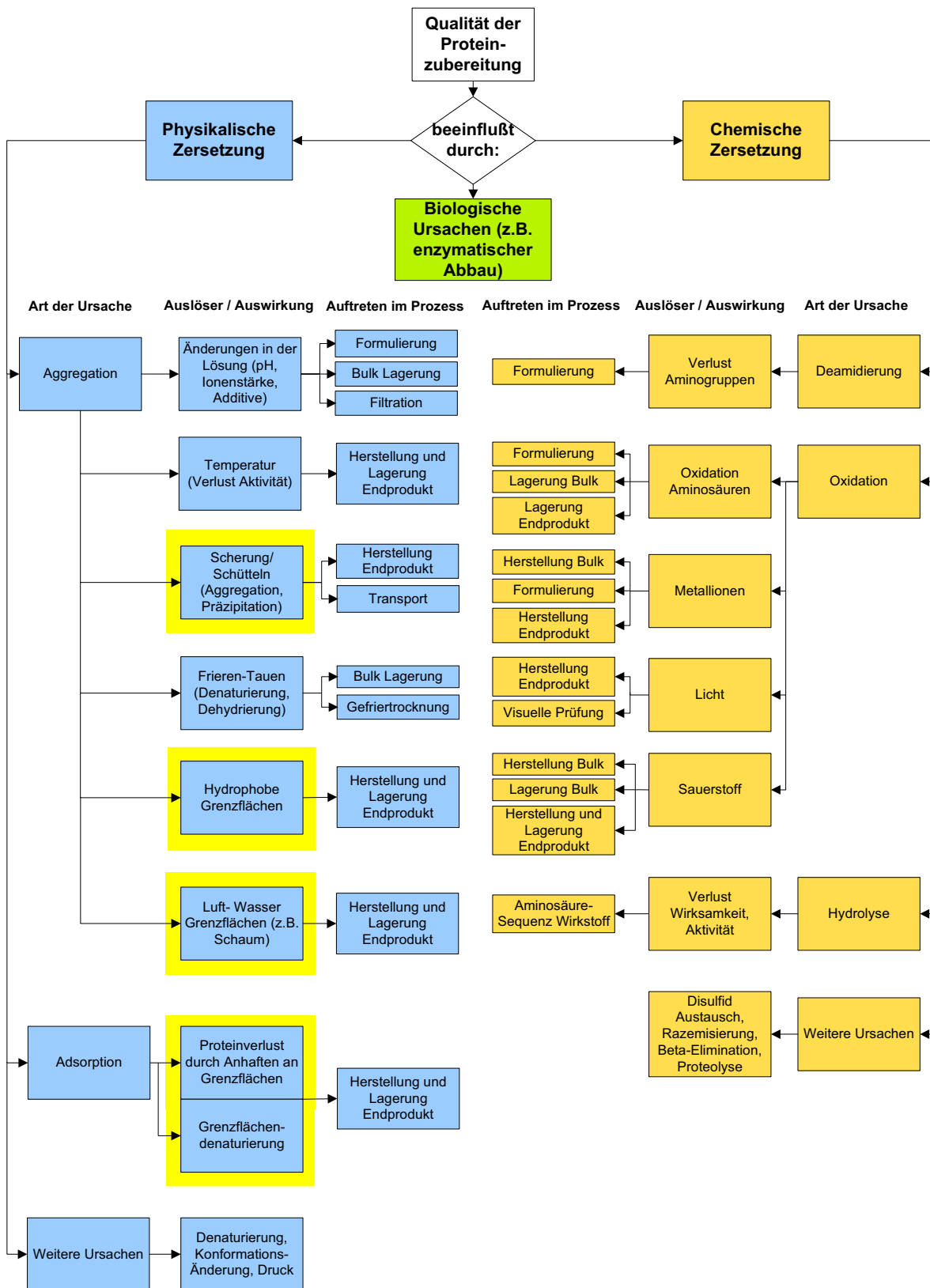


Abbildung 3-6: Ursachen für Degradation während des Fill & Finish Prozesses

In den folgenden Kapiteln, 3.4.5.1 bis 3.4.5.5, werden die Ursachen für physikalische Zersetzung basierend auf der Sekundärliteratur diskutiert.

3.4.5.1 Scherung

Aggregation oder Präzipitation können durch mechanischen Stress, wie hohe Scherung durch Pumpen, Filtration, Mischen oder dem Fill & Finish Prozess, ausgelöst werden (Patro et al., 2002).

Bei der Filtration von drei Proteinen (IgG, bovines Insulin, bovine alkalische Phosphatase) über PVDF-Filtermembranen der Porengröße 0,1 μm , 0,22 μm und 0,45 μm mit einem Überdruck von 345 mbar, 1379 mbar und 2758 mbar wurden keine Veränderungen der CD-Spektren vor und nach Filtration ermittelt (Truskey et al., 1987). Mit einer Polysulfonmembran konnten Unterschiede in den Spektren nachgewiesen werden. Starke Veränderungen der Spektren zeigten sich nach Filtration über eine Polyamidmembran. Es wurde keine Korrelation zwischen der Veränderung der Spektren zur Porengröße und dem Filtrationsdruck ermittelt. Hieraus wurde gefolgert, dass nicht der Scherstress die Strukturänderung initiiert, sondern die Eigenschaft der Membran, das Protein zu binden. Der Mass Average Shear³ wurde mit einem Wert von 1.200 bei 0,45 μm Porendurchmesser, 2.450 bei 0,22 μm Porendurchmesser und 5.300 bei 0,1 μm Porendurchmesser berechnet. Diese Werte liegen weit unterhalb des Grenzwertes von 10^5 , bei welchem durch Truskey angenommen wurde, dass eine durch Scherung verursachte Denaturierung beginnt.

Die durch Schütteln und Rühren verursachte Aggregation eines Antikörpers (IgG1) wurde von Kiese untersucht (Kiese et al., 2008). Die Rührversuche wurden mit einem PTFE überzogenen Magnetrührfisch durchgeführt. Geschüttelt wurde auf einem Horizontalschüttler. Das Rühren wirkte sich auf die Aggregation stärker aus als das Schütteln.

Zusätzlich wurde das Luftvolumen in den Vials variiert. Je größer das Luftvolumen war, umso stärker war die Aggregation. Es wurde gefolgert, dass sich durch Schütteln die Moleküle an der Luft-Wasser Grenzfläche austauschen. Luft kann als hydrophobe Grenzfläche wirken und Adsorption und partielle Auffaltung können nach Kontakt die Folge sein.

³ Definition Mass Average Shear, siehe Kapitel 3.6.

Es wurden höhere Anteile von löslichen Aggregaten nach Schütteln ermittelt. Bei den Rührversuchen wurden hauptsächlich unlösliche Aggregate, sichtbare und subvisuelle Partikel gefunden. Kiese folgerte, dass Proteinadsorption an der hydrophoben Grenzfläche des Rührfisches das Protein destabilisiert haben könnte und nicht die Scherung allein die Ursache für die Auffaltung war.

Polysorbat führte in den oben beschriebenen Versuchen zu einer reduzierten Aggregation.

Untersuchungen mit hohem Mass Average Shear (größer 10^7) und hoher Scherrate (größer 10^5 s^{-1}) am Wachstumshormon rhGH und rekombinanter Deoxyribonuklease rhDNase zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinaggregation und Aktivität (Maa, 1996). Die Scherung wurde durch einen Homogenisator mit Rotor-Stator-Prinzip und einer konzentrischen, zylindrischen Scherapparatur erzeugt.

Die Scherung über eine Silikonkapillare mit Scherraten von $2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ führte ebenfalls zu keiner signifikanten Destabilisierung des nativen Proteins (Jaspe et al., 2006). Scherraten von ca. 10^7 s^{-1} waren erforderlich um kleine, globuläre Proteine (Enzyme, ca. 100 Aminosäuren) zu denaturieren. Eine Vermutung war, dass die Denaturierung der Enzyme ein Effekt der Luft-Wasser oder weiterer Grenzflächen war, jedoch kein Effekt der Scherung.

Auch bei der Untersuchung eines Enzyms mit einem Viskosimeter, durch Scherung in einer PTFE-Kapillare, wurde bei einem Mass Average Shear von kleiner 10^4 keine oder nur geringe Inaktivierung ermittelt (Charm et al., 1970a).

Bewertung der Literatur

Bei den zitierten Scherversuchen wurde die Degradation der Moleküle ermittelt, die einer Kombination aus Scherbeanspruchung (Mass Average Shear 10^3 bis größer 10^7) und Kontakt zu hydrophoben Grenzflächen (PVDF, PTFE, Silikon) oder zu Luft entsprachen. Das Ausmaß der Auffaltung an den verschiedenen Grenzflächen ohne bzw. mit geringer Scherbeanspruchung wurde nicht aufgezeigt. Die Denaturierung der Moleküle könnte überwiegend durch die hydrophoben Grenzflächen und der Kontaktfläche zu Luft verursacht worden sein. Durch Scherbeanspruchung können sich die Moleküle in den Grenzflächen austauschen. Danach kann weitere Auffaltung und Aggregation an den Grenzflächen stattfinden. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Auswirkung von Scherstress auf Proteine war es daher wichtig, den Einsatz hydrophober Materialien und einen Kontakt der Lösung mit Luft möglichst zu vermeiden.

3.4.5.2 Hydrophobe Grenzflächen

Silikonöl, z.B. auf Spritzen oder Gummistopfen, kann Aggregation induzieren (Jones et al., 2005). Studien wurden mit 0,5 % Öl in wässriger Lösung durchgeführt. Eine Trübungszunahme wurde ermittelt, die zumindest teilweise durch an Silikonöldispersion anhaftendes Protein verursacht wurde. Es wurde keine analytische Methode identifiziert, mit der eine Trübungszunahme durch Proteinaggregate oder Silikonöl eindeutig unterschieden werden konnte.

In den Experimenten von Jones wurden BSA, Lysozym, Concanavalin A und Ribonuclease A als Modellsubstanzen verwendet. Die stärkste durch Silikonöl hervorgerufene Aggregation wurde an BSA ermittelt. Dies wurde mit der hohen Hydrophobizität von BSA erklärt. Eine Folgerung war, je hydrophober das Protein ist, desto größer ist seine Tendenz zur Aggregation.

Durch Paraffin und Maisöl wurde eine Veränderung der Tertiärstruktur von BSA induziert und analytisch nachgewiesen (Meng et al., 2005). Der Vorgang der Entfaltung von BSA, so die Folgerung, wird durch die hydrophobe Umgebung, die das Öl liefert, begünstigt.

Die Adsorption von Proteinen an der Grenzfläche zu Luft zeigte eine höhere Reversibilität als an Grenzflächen zu Öl (Beverung et al., 1999). Die hydrophoben Seitenketten des Proteinmoleküls binden an Öl-Grenzflächen stärker als an Grenzflächen zu Luft. Daher findet durch Ölkontakt eine schnellere Denaturierung als bei Luftkontakt statt.

Zur Untersuchung von hydrophoben Grenzflächeneffekten an Insulin wurden PTFE Kugeln in Glasfläschchen gegeben (Sluzky, 1991). Durch erhöhte Temperatur, mechanischen Stress und hydrophobe Grenzflächen sollten die destabilisierenden Bedingungen von Applikationssystemen simuliert werden. Die Grenzfläche zu PTFE Kugeln wurde gewählt, um die Kontaktfläche von Proteinmolekülen mit Luft in Vials zu simulieren, da sich die Luft-Wasser Grenzfläche aufgrund von Blasen- und Schaumbildung als nicht reproduzierbar erwies. Die Vials wurden komplett mit Insulin gefüllt, mit einer Folie (Paraffin-Wachs und Polyolefin) verschlossen und horizontal mit 80 Bewegungen pro Minute bei 37 °C geschüttelt. 4,4 % Insulin adsorbierten an der PTFE Grenzfläche.

Des Weiteren führte die Adsorption eines Antikörpers (IgG) an PTFE zu Denaturierung (Vermeer et al., 2001). Die Denaturierung wurde dadurch erklärt, dass das IgG Molekül seine Struktur der lokalen Umgebung anpasste. Die Folgerung war, je hydrophober die Grenzfläche ist, umso höher ist die Adsorption.

Die Aggregationsrate von Insulin wurde an den Grenzflächen zu Polypropylen, silikonisiertem Glas (Silikonöl 1 h bei 100 °C getrocknet) und unbehandeltem Glas untersucht (Sluzky et al., 1992). Bei unbehandeltem, relativ hydrophilem Glas fand keine Aggregation statt. Dahingegen aggregierte Insulin durch Kontakt mit hydrophoben Grenzflächen. Es wurde angenommen, dass die Grenzflächenhydrophobizität von Polypropylen, PTFE und Luft vergleichbar ist.

Polysorbat wird häufig bei zur Aggregation neigenden Proteinlösungen als Hilfsstoff eingesetzt. Es schützt vor Adsorption an Grenzflächen und wirkt als Stabilisator gegenüber Aggregation (Kerwin, 2008). Die Auffaltung des Moleküls an hydrophoben Grenzflächen kann bereits durch geringe Mengen an Polysorbat in der Lösung reduziert werden. Die Polysorbatkonzentrationen in biopharmazeutischen Arzneimitteln reichen von 0,0003 % (w/v) bis 0,3 % (w/v).

Bewertung der Literatur

Öl (z.B. Silikonöl, Maisöl, Paraffin), weitere hydrophobe Materialien (z.B. PTFE, PP, silikonisiertes Glas) und die Kontaktfläche von Molekülen zu Luft können zu Proteinaggregation führen. Je höher die Hydrophobizität des Proteinmoleküls selbst und je höher die Hydrophobizität der Grenzfläche war, umso größer war die ermittelte Aggregation. Verschiedene Proteinlösungen wurden bei gleicher Proteinkonzentration bzgl. ihres Aggregationsverhaltens untersucht. Hierbei wurden teilweise Moleküle unterschiedlicher Größe eingesetzt. Die Stoffmengenkonzentration der Proteine war nicht einheitlich und somit das Verhältnis der Grenzfläche zur Anzahl der Moleküle unterschiedlich. Dies könnte sich auf das Ausmaß der Auffaltung und Aggregation auswirken. Der Vergleich von Degradation unterschiedlich großer Proteinmoleküle sollte nach Standardisierung der Lösungen bzgl. der Stoffmengenkonzentration durchgeführt werden.

Während des Abfüllprozesses kann die Proteinlösung mit verschiedenen hydrophoben Materialien in Kontakt kommen, z.B. silikonisierte und PTFE beschichtete Gummistopfen, silikonisierte Glasbehältnisse und Schläuche aus Silikon oder PTFE. Die Größe der Kontakt-

fläche, sowie die Kontaktzeit der Lösung im Prozess, können sehr unterschiedlich sein. Um das Risiko der Materialien im Abfüllprozess beurteilen zu können, wird in dieser Arbeit die Proteindegradation in Abhängigkeit von Kontaktfläche und -zeit ermittelt.

3.4.5.3 Luft-Wasser Grenzflächen

Die Proteinlösung hat während der Herstellung, sowie im Endbehältnis Kontakt zur Grenzfläche Luft (oder Stickstoff). Beim Transport der Endprodukte besteht die Gefahr, dass Aggregate und Partikel durch Auffaltung des Proteins an der Luft-Wasser Grenzfläche entstehen (Rathore et al., 2008; Treuheit, 2002).

Während Herstellung oder Transport entstehender Proteinschaum wird durch die amphiphilen Eigenschaften von Proteinmolekülen stabilisiert (Clarkson, 1999a). Während der Adsorption der Moleküle an der Luft-Wasser Grenzfläche wurde eine Veränderung der Proteinstruktur festgestellt. Die hydrophoben Regionen des Proteinmoleküls orientierten sich zur Gasphase. Der Anteil denaturierter BSA-Moleküle im Schaum betrug 10 % und war hauptsächlich auf eine Schädigung der Tertiärstruktur zurückzuführen.

Es wurde ausgeschlossen, dass ein signifikanter Teil der Proteinschädigung durch Scherung beim Platzen der Luftblasen verursacht wurde. Ebenfalls wurde ausgeschlossen, dass Sauerstoff im Schaum Ursache für die irreversible Schädigung der Moleküle war.

Durch Erhöhung der Proteinkonzentration und Vergrößerung der Luft-Wasser Grenzfläche, unter Bildung von Schaum, nahm die Aggregation unter 15 %-igem Verlust an Proteinkonzentration eines rekombinanten humanen Wachstumshormons (22,13 kDa) zu (Maa, 1997).

Die Inaktivierung von Lysozym wurde an den Grenzflächen der Lösung zu Glas, Luft und PTFE untersucht (Colombie et al., 2001). Bei Kontakt des Lysozyms mit PTFE und Luft war die Inaktivierung viermal höher als bei Kontakt mit Glas. Dies wurde auf die Hydrophobizität der Grenzfläche zurückgeführt.

Proteine und Tenside stehen im Wettbewerb um die Grenzfläche (Mackie et al., 2005). Bei niedrigen Proteinkonzentrationen ist vorwiegend das Proteinmolekül aufgrund der Größe an der Grenzfläche. Ein einzelnes Proteinmolekül kann die Oberflächenspannung stärker

herabsetzen als ein einzelnes Tensidmolekül. Bei höherer Proteinkonzentration ist es umgekehrt. Das Tensid kann sich in diesem Fall effektiver in die Grenzfläche einbauen und senkt die Oberflächenspannung stärker.

Tenside reduzieren die Oberflächenspannung und somit die freie Energie im System (Cleland et al., 1993). Durch die Reduktion der freien Energie sind die Protein-Protein und Protein-Grenzflächen Interaktionen verringert, die demzufolge die Denaturierung herabsetzen kann.

Sehr starre Proteinmoleküle zeigten eine geringe Oberflächenaktivität (Clarkson, 1999b). Die Schädigung durch Schaum war gering, da die Moleküle ihre Struktur nicht an die Grenzfläche anpassten und somit die Faltung erhalten blieb. Dahingegen adsorbierten Proteine mit geringer struktureller Stabilität schneller an hydrophoben Grenzflächen.

Die Oberflächenspannung zeigte sich als hilfreicher Indikator für die relative Oberflächenaktivität. BSA hatte die höchste Oberflächenaktivität der untersuchten Proteine (weitere: Lysozym, Pepsin, Hefe-Alkoholdehydrogenase, IgG, Catalase). Die Ursache wurde auf die hohe strukturelle Flexibilität von BSA zurückgeführt. Flexible Proteine mit hoher Oberflächenenergie, wie BSA, formten einen stabilen Schaum. Bei Proteinen mit geringer Oberflächenenergie konnte ein stabiler Schaum nicht erzeugt werden.

Die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser Grenzfläche wirkt als Kraft gegen die Expansion des Proteins, Abbildung 3-7 (Wierenga, 2006). Dieses Phänomen ist ähnlich der Spreitung eines Öltropfens an der Luft-Wasser Grenzfläche. Für kein Protein ist der Spreitungskoeffizient der limitierende Faktor. Die Dauer, wie lange die Spreitungskraft ungestört auf das Protein einwirkt ist entscheidend, ob Entfaltung eintritt.

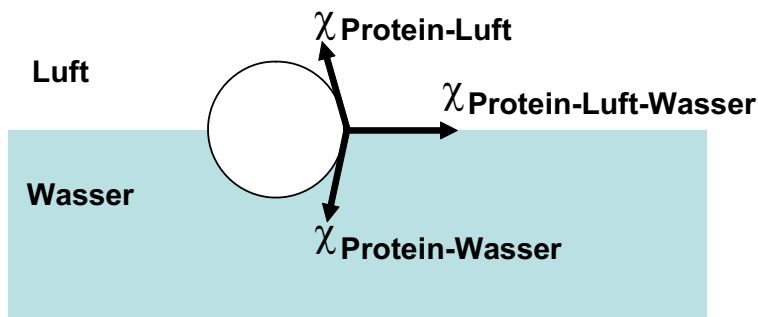


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Kräfte an der Protein-Luft-Wasser Grenzfläche (Wierenga, 2006)

Bewertung der Literatur

Luft-Wasser Grenzflächen können die Ursache für ausgeprägte Aggregation sein. Während des Prozessierens sind zahlreiche Möglichkeiten für eine Entfaltung an Luft-Wasser Grenzflächen vorhanden. Auch auf dem Transport des Arzneimittels kann weitere Aggregation eintreten. Die Verweildauer der Proteinmoleküle an der Luft-Wasser Grenzfläche ist für eine potentielle Auffaltung entscheidend. Eine Strukturänderung der Proteinmoleküle kann durch Tensidzusatz reduziert werden, weil diese die Eigenschaft besitzen die Grenzfläche zu belegen und Protein-Protein Interaktionen zu verringern.

Es sollten Untersuchungen durchgeführt werden, in denen die Verweildauer der Proteinmoleküle an der Grenzfläche zu Luft kontrolliert wird. Weiterhin wäre der Einfluss von Tensiden auf die Aggregation von Proteinlösungen in der Grenzfläche zu Luft zu untersuchen.

3.4.5.4 Proteinverlust durch Anhaften an Grenzflächen

Ein hohes Risiko für Proteinadsorption bietet der Prozessschritt der Filtration. Während der Filtration kann Protein an die Membran binden und sich entweder an der Membran Auffalten und Aggregieren oder zu Proteinverlust im Filtrat durch Anhaften an der Membran führen (Rathore et al., 2008).

Eine Adsorption von 10 % bis max. 15 % wurde durch Burke ermittelt (Burke, 1992). Der Grad der Adsorption war von den Eigenschaften des Proteins abhängig. Es wurde keine Korrelation der Adsorption zur molaren Masse oder zum isoelektrischen Punkt gefunden. Bei der Untersuchung der Anhaftung von Interferon α -2a wurde keine Korrelation zwischen der Adsorption an Glas und verschiedenen pH-Werten festgestellt (Schwarzenbach et al., 2002).

Die Ursache für Adsorption erklärt Ruiz mit der hohen Grenzflächenspannung zwischen der Lösung und dem Packmittel (Ruiz et al., 2005). Die dreidimensionale Struktur des Proteins geht verloren und erhöht die Wahrscheinlichkeit der Adsorption, Aggregation, Denaturierung und weiterer physikalischer und chemischer Reaktionen. Polysorbat schützt das Protein gegen Adsorption, indem es hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche bedeckt.

Für geringe adsorbierte Proteinmengen, auf unterschiedlich behandelten Gläsern, war eine Proteinoberfläche zuerst hydrophob und wurde hydrophil in einer späteren Phase der Adsorption (Kawasaki et al., 1999).

Bei Proteinen mit globulärer Struktur, welche hauptsächlich durch intramolekulare, hydrophobe Bindungen stabilisiert sind, ist eine Strukturveränderung durch Adsorption zu erwarten (Norde et al., 1986).

Die Tendenz eines Proteins sich an einer Grenzfläche anzureichern nimmt mit Erhöhung der Hydrophobizität der Grenzfläche, der Hydrophobizität der Oberfläche des Proteins und der Flexibilität der Proteinstruktur zu (Norde et al., 1991).

Bewertung der Literatur

Die Adsorption an Grenzflächen ist von der Konzentration und Flexibilität der Struktur des Proteins abhängig. Die Bindung an Glas ist gering. Durch die Adsorption kann weitere Zersetzung initiiert werden.

3.4.5.5 Grenzflächendenaturierung

Bei Abfüllung mit einer Drehkolbenpumpe kann durch die Bewegung des Edelstahlkolbens im Edelstahlzylinder Abrieb entstehen. Tyagi hat die Entstehung von Nanopartikeln durch Pumpenabrieb belegt (Tyagi et al., 2008). Er wies nach, dass die Entstehung von Proteinpartikeln durch Edelstahlpartikel induziert werden kann.

Metallionen z.B. aus nicht passivierten Edelstahltanks können zur Proteindegradation durch Oxidation führen (Rathore et al., 2008).

Histidin, Arginin, Lysin, Prolin, Methionin und Cystein sind am anfälligsten für eine durch Metallionen (Fe(III), Cu(II)) ausgelöste Oxidation (Khosravi et al., 2000).

Bei Abrieb von Edelstahlpumpen kann eine Passivierung des Stahls das Risiko der Entstehung von Aggregationskeimen im Endprodukt reduzieren (Cordoba-Rodriguez, 2008).

Bewertung der Literatur

Metallabrieb kann bei Abfüllung mit Drehkolbenpumpen entstehen. Metallionen aus nicht passivierten Edelstahloberflächen können zu einer durch Oxidation induzierten Aggregation führen.

Bei Durchführung von Versuchen mit Metallkontakt der Proteinlösungen, sollten die Oberflächenbehandlung bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

3.4.6 Risikobetrachtung

Die Prozessschritte der Sterilfiltration und der Abfüllung unter Berücksichtigung der Primärpackmittel wurden hinsichtlich des Risikos bzgl. Scherung, Grenzflächeninteraktion und Grenzflächenadsorption in Tabelle 3 beurteilt. Die Bewertung erfolgte unter der Annahme, dass relativ robuste Proteine verwendet werden und ist nicht generell auf alle Moleküle übertragbar.

Eine Zuordnung des Risikos erfolgte in den Kategorien von 0 (unkritisch) bis 3 (sehr kritisch). Die Filtration wurde an den Beispielen Druckfiltration und Peristaltikpumpe bewertet. Der Abfüllprozess wurde an den beiden häufig eingesetzten Prinzipien der Drehkolbenpumpe und des Zeit-Druck-Füllers betrachtet.

Tabelle 3: Risikobewertung der Sterilfiltration, Abfüllung und den Primärpackmitteln

Ursache	Auswirkung	Risikobewertung		
		Scherung	Grenzflächen- interaktion (Aggregation)	Grenzflächen- adsorption
Sterilfiltration				
Filtrationsdruck (Druckluft, Stickstoff)	- Oxidation durch Druckluft	0	1	0
Peristaltikpumpe	- Scherung durch Schlauchquetschen	1	0	0
Ansaugen/Einleiten in Edelstahlbehälter	- Oxidation durch Metallionen - Aggregation durch Luft-Wasser Grenzfläche	0	2	1
Ansaugen/Einleiten in Kunststoffbag	- Aggregation durch hydrophobe Grenzfläche - Adsorption am Bag	0	2	2
Schläuche (Silikon, PTFE)	- Aggregation durch hydrophobe Grenzflächen und Luft-Wasser Grenzflächen	0	2	1
Filter	- Scherung, Adsorption, Aggregation an Filtermembran	1	1	3
Abfüllung				
Drehkolbenpumpe	- Scherung durch Pumpe - Partikelabrieb - Oxidation durch Metallionen	3	2	0
Zeit-Druck-Füller	- Scherung in Schläuchen - Oxidation durch Metallionen in Zwischenbehälter - Aggregation durch Luft-Wasser Grenzfläche	1	2	0
Abfüllnadel (Edelstahl)	- Scherung - Oxidation durch Metallionen - Schäumen beim Befüllen	3	3	0
Schläuche (Silikon, PTFE)	- Aggregation durch hydrophobe Grenzflächen und Luft-Wasser Grenzflächen	0	2	1
Primärpackmittel				
Glasbehälter	- Aggregation durch Luft-Wasser Grenzfläche - Adsorption an Glas	0	2	2
Silikonisierter Glasbehälter	- Aggregation durch hydrophobe Grenzfläche und Luft-Wasser Grenzfläche - Adsorption an Glas	0	3	1
Gummistopfen	- Aggregation durch hydrophobe Grenzfläche - Extrahierbare Substanzen	0	3	0
Summe		9	25	11

Die Grenzflächeninteraktionen bergen das höchste Risiko für eine Zersetzung der Proteinkomplexe während des Fill & Finish Prozesses. Daher wurde der Fokus bei der Modellentwicklung auf die hydrophoben Grenzflächen und die Luft-Wasser Grenzflächen gerichtet. Eine Adsorption an Filtermembranen wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet. Hier ist durch Variation des Verhältnisses von Filterfläche zum filtrierenden Volumen eine einfache Modellierung möglich. Simulationsmodelle sind am Markt verfügbar und häufig Bestandteil der Prozessentwicklung.

Die Prüfung der Adsorption von Proteinen an Lagerbehältern und Endbehältnissen ist Bestandteil von Stabilitätsuntersuchungen. Die Adsorption wurde daher nicht im Detail untersucht.

3.5 Grundlagen zur Modellentwicklung

Es ist anzustreben, dass mit den Modellen der Einfluss von Scherung oder Grenzflächen auf das Protein getrennt untersucht werden kann. Da bei der Versuchsdurchführung immer bestimmte Kontaktflächen in Form von Behältern oder Schläuchen auftreten und ein komplett luftblasenfreier Versuch nicht realisierbar ist, beinhalten die Modelle eine Kombination von mehreren potentiellen Auslösern für Degradation. Es wurden daher verschiedene Modelle entwickelt, bei denen der Schwerpunkt die Ermittlung einzelner oder einer Kombination von kritischen Faktoren war.

In Abbildung 3-8 ist die Auswahl der Modelle und deren Zuordnung zur Simulation des Anteils der Grenzfläche (Y-Achse) und Scherung (X-Achse) dargestellt.

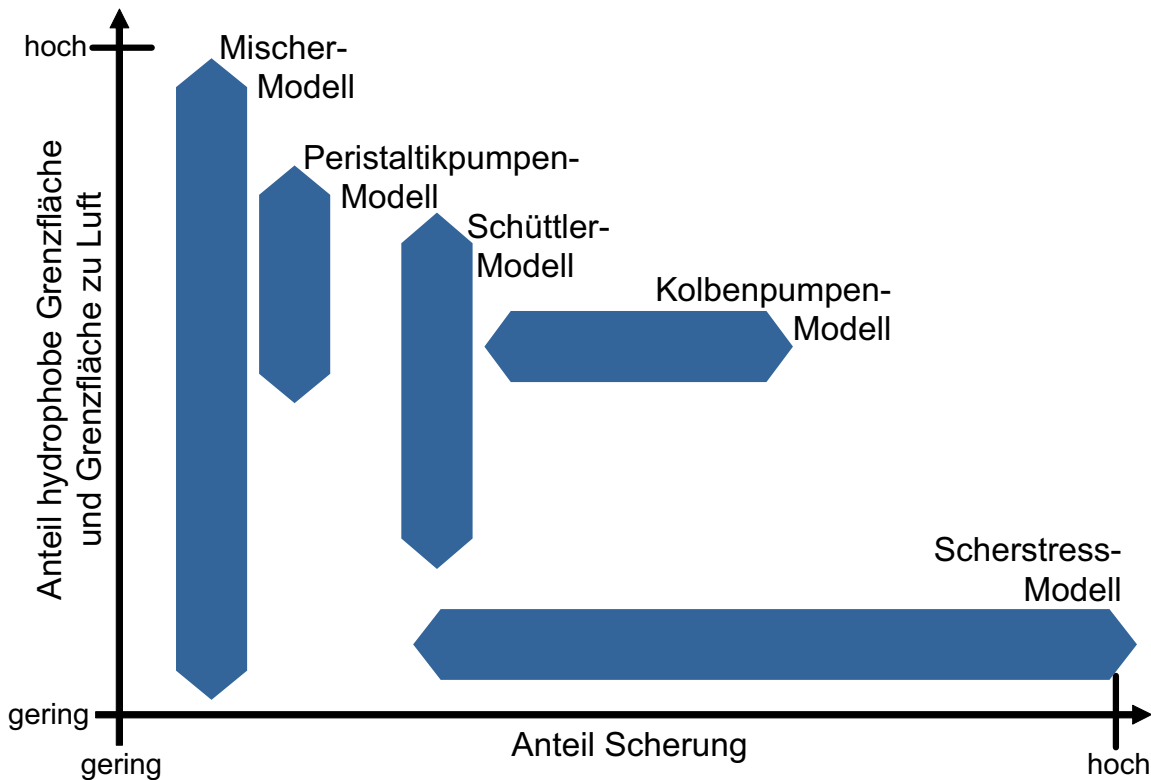


Abbildung 3-8: Modelle zur Untersuchung der Proteindegradation

Zur Ermittlung der Auswirkung von Scherbeanspruchung auf die Proteinlösung wurde ein bereits vorhandenes Scherstress-Modell eingesetzt. Hydrophobe Grenzflächen und die Grenzflächen zu Luft sollten hier vermieden werden, da diese zusätzliche Degradation verursachen können. Als flüssigkeitsberührende Flächen wurden daher Glas und Edelstahl verwendet. Die Scherkräfte werden erzeugt, indem die Lösung durch eine Edelstahlkanüle gedrückt wird. Durch Variation des Volumenstroms und der Anzahl der Zyklen durch eine Kanüle kann die Scherrate und der Mass Shear eingestellt werden.

Zur Untersuchung der Auffaltung der Proteinstruktur an Luft-Wasser Grenzflächen wurde ein Modell unter Verwendung einer Peristaltikpumpe entwickelt. Mit der Pumpe wurde ein konstanter Volumenstrom der Lösung durch Silikonschläuche erzeugt. Durch Einleiten von Luftblasen mit Hilfe eines Gasdurchflussreglers und einer direkt im Schlauch fixierten Kanüle konnte die Kontaktzeit der Luftblasen mit der Proteinlösung über die Schlauchlänge eingestellt werden. Da in diesem Modell Silikonschläuche verwendet wurden, wurde ergänzend die Degradation der Proteinlösung in den Schläuchen ohne Luftblasen ermittelt.

Unter Verwendung eines Horizontalschüttlers und eines Turbula-Mischers wurde die Proteinaggregation an den Grenzflächen zu Luft, PTFE, Metall, Glas und silikonisiertem Glas untersucht. Durch den Zusatz einer bestimmten Anzahl von Kugeln zur Proteinlösung konnten definierte Kontaktflächen simuliert werden.

Mit Hilfe einer halbautomatischen Kolbenpumpen-Abfüllmaschine wurde der Einfluss von Scherkräften auf die Moleküle in Abfüllnadel und Abfüllpumpe bestimmt. Auch bei diesem Modell wurden als Verbindungen Silikonschläuche verwendet, daher konnten Grenzflächeneffekte nicht ausgeschlossen werden. Dieses Modell simuliert den Einfluss von Scherbeanspruchung und Grenzflächen.

Die einzelnen Modelle sind in Kapitel 5 detailliert beschrieben.

3.6 Formeln zur Berechnung von Scherraten und Mass Shear

Zu einzelnen Modellen im Ergebnisteil (Kapitel 5) wurden Scherraten und der Mass Shear berechnet. In diesem Kapitel sind die zur Berechnung verwendeten Formeln definiert.

Für die Berechnung der Scherraten wurde die Beziehung von Hagen/Poiseuille zu Grunde gelegt. Annahmen waren für alle Berechnungen das Vorliegen eines waagrechten Rohres, laminare Strömung der Lösungen und idealviskose und inkompressible Flüssigkeiten. Die Berechnung der Reynolds-Zahlen, als Maß für das Vorliegen von laminarer oder turbulenter Strömungen, sind im Anhang, Kapitel 7.2.1 enthalten. Bei den Untersuchungen mit dem Scherstress-Modell könnte die Strömung turbulent gewesen sein, dies wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Für die *maximale Scherrate* (= *Schergeschwindigkeit*) nahe der Rohrwand gilt die Beziehung von Hagen/Poiseuille (Böhme, 2000).

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} \quad \text{Gl. 3.4}$$

$\dot{\gamma}_w$	Maximale Scherrate Wand	$[s^{-1}]$
\dot{V}	Volumenstrom	$[m^3/s]$
r	Rohrradius	$[m]$

Der *Volumenstrom* wird durch die Strömung des Volumens pro Zeit definiert.

$$\dot{V} = \frac{V}{t} \quad \text{Gl. 3.5}$$

\dot{V}	Volumenstrom	$[m^3/s]$
V	Volumen	$[m^3]$
t	Zeit	$[s]$

Die **Scherdauer** ergibt sich aus der Anzahl der Zyklen, der Rohrlänge und der Geschwindigkeit der Lösung im Rohr.

$$t_s = N \times \frac{l}{w} \quad \text{Gl. 3.6}$$

t_s	Scherdauer gesamt	[s]
N	Anzahl Zyklen/Passagen durch die Testsektion	[]
l	Länge Rohr	[m]
w	Mittlere Geschwindigkeit	[m/s]

Die **mittlere Geschwindigkeit** wird durch den Volumenstrom und Rohrquerschnitt definiert (Bohl, 1982).

$$w = \frac{\dot{V}}{\pi \times r^2} \quad \text{Gl. 3.7}$$

w	Mittlere Geschwindigkeit	[m/s]
\dot{V}	Volumenstrom	[m ³ /s]
r	Rohrradius	[m]

Der **Mass Wall Shear**, als Kennzahl der Scherbeanspruchung nahe der Rohrwand, wurde durch Multiplikation der maximalen Scherrate mit der Scherdauer errechnet (Charm et al., 1981).

$$(\gamma\theta)_w = \dot{\gamma}_w \times t_s \quad \text{Gl. 3.8}$$

$(\gamma\theta)_w$	Mass Wall Shear	[]
$\dot{\gamma}_w$	Maximale Scherrate Wand	[s ⁻¹]
t_s	Scherdauer gesamt	[s]

Die Gleichung 3.8 kann in die vom Volumenstrom unabhängige Formel der Gleichung 3.9 aufgelöst werden.

$$\begin{aligned}
 (\gamma\theta)_w &= \dot{\gamma}_w \times t_s = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} \times N \times \frac{l}{w} = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} \times N \times \frac{l \times \pi \times r^2}{\dot{V}} = \frac{4}{r} \times N \times l \\
 (\gamma\theta)_w &= 8 \times \frac{l}{d} \times N
 \end{aligned}
 \tag{Gl. 3.9}$$

$(\gamma\theta)_w$	Mass Wall Shear	[]
l	Länge Rohr	[m]
d	Rohrdurchmesser	[m]
N	Anzahl Zyklen/Passagen durch die Testsektion	[]

In der Sekundärliteratur findet auch die Formel zur Berechnung des **Mass Average Shear** häufig Anwendung (Charm et al., 1970a; Charm et al., 1970b; Charm et al., 1981; Truskey et al., 1987). Sie ist ein Maß für die mittlere Scherbeanspruchung im Rohr. Zum Vergleich der Daten mit den Literaturwerten wurde auch dieser Wert mit der Gleichung 3.10 berechnet.

$$(\gamma\theta)_{av} = \frac{16}{3} \times \frac{l}{d} \times N
 \tag{Gl. 3.10}$$

$(\gamma\theta)_{av}$	Mass Average Shear	[]
l	Länge Rohr	[m]
d	Rohrdurchmesser	[m]
N	Anzahl Zyklen/Passagen durch die Testsektion	[]

4 Modellproteine und Methoden

4.1 Modellproteine

Zur Prüfung der Funktionalität der Modelle wurden Proteine aus verschiedenen Klassen mit unterschiedlicher Molekülgröße verwendet.

Es wurden bis zu drei verschiedene Antikörperlösungen eingesetzt, da diese einen Großteil der therapeutischen Proteine darstellen. Die als Immunglobuline bezeichneten Antikörper besitzen eine hohe Spezifität, die im Körper über ihre dreidimensionale Struktur vermittelt wird. Die Basisstruktur eines IgG besteht aus einem Y-förmigen Molekül mit je zwei identischen schweren und leichten Ketten. Die Molekülmasse beträgt ca. 150 kDa.

Die Degradation wurde am Beispiel von drei verschiedenen IgG untersucht. Eine Antikörperlösung (AK-3) wurde ausgewählt, von der bekannt war, dass sie während des Prozessierens zur Denaturierung neigt. Eine weitere Antikörperlösung (AK-1) wurde verwendet, die aufgrund der bisherigen Erfahrungen über den Herstellungsprozess und während der Lagerung sehr stabil war. Zu einer dritten Antikörperlösung (AK-2) lagen zum Zeitpunkt der Verwendung noch keine Ergebnisse zur Stabilität vor.

Als weiteres Modellprotein wurde bovines Serumalbumin eingesetzt. BSA zählt nicht zu den therapeutischen Proteinen, wurde aber aufgrund seiner Eigenschaften und des günstigen Preises als Modellprotein verwendet. Mit einer Molekülmasse von ca. 67 kDa liegt BSA zwischen den Antikörpern und den Interferonen. Es ist ein stabiles Molekül, was teilweise durch die 17 enthaltenen Disulfidbrücken erklärt werden kann (Banga, 2005). BSA besitzt amphiphilen Charakter, weshalb es auch als Emulgator in der Lebensmittelindustrie verwendet wird. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften kann Serumalbumin im Blutkreislauf Wasser binden und auch hydrophobe Stoffe, wie z.B. Fettsäuren und Hormone, transportieren.

Mit der Klasse der Interferone wurde die Degradation an Proteinen mit geringer Molekülmasse untersucht, ca. 15 bis 20 kDa. Es gibt drei Gruppen von Interferonen, α -, β - und γ -Interferone. Interferone gehören zur Klasse der Zytokine. Über spezifische Rezeptoren wirken Zytokine im menschlichen Körper auf unterschiedliche Zellen.

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Interferone eingesetzt.

4.1.1 Formulierungen

Die verwendeten Stammlösungen lagen bereits in optimierter Zusammensetzung vor und wiesen ausreichende Haltbarkeit für die Vorbereitung der Versuche und Durchführung der Analysen auf.

Um eine vergleichende Beurteilung des Degradationsverhaltens der Proteinmoleküle durchzuführen, wurden die Lösungen auf eine Stoffmengenkonzentration des Proteins von 0,01 mmol/L standardisiert. Somit lag in allen Lösungen die gleiche Anzahl an Proteinmolekülen vor. Bei der Verdünnung wurden der ursprüngliche Puffer und die ursprüngliche Hilfsstoffkonzentration beibehalten. Die eingesetzten Lösungen sind in Tabelle 4 bis Tabelle 10 zusammengestellt.

Die Stammlösungen bzw. endverdünnten Lösungen wurden bis zur Versuchsdurchführung bei 2-8 °C oder -70 °C über mehrere Wochen gelagert. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden alle Lösungen über einen Filter der Porengröße 0,2 μm filtriert. Hierdurch sollten möglichst gleiche Ausgangsbedingungen geschaffen und, falls vorhanden, unlösliche Aggregate entfernt werden.

Antikörper**Tabelle 4:** Zusammensetzung AK-1 Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
AK-1	1,50	0,01	150.000,00
L-Histidin	3,88	25,0	155,20
Glycin	0,12	1,6	75,07
Mannitol	30,00	164,7	182,17
Salzsäure	12,00	329,2	36,45
WFI	ad 1 mL	---	---

Tabelle 5: Zusammensetzung AK-2 Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
AK-2	1,47	0,01	147.500,00
L-Histidin	1,60	10,3	155,20
L-Histidin HCl × H ₂ O	3,08	14,7	209,63
NaCl	8,01	137,0	58,44
WFI	ad 1 mL	---	---

Tabelle 6: Zusammensetzung AK-3 Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
AK-3	1,53	0,01	152.100,00
Na-Dihydrogenphosphat × 2H ₂ O	0,40	2,6	153,99
Na-Monohydrogenphosphat × 2H ₂ O	1,32	7,5	175,97
NaCl	8,48	145,1	58,44
WFI	ad 1 mL	---	---

Tabelle 7: Zusammensetzung AK-3 Lösung mit Polysorbat (0,0024 %), standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
AK-3	1,53	0,01	152.100,00
Tween 20	0,024	0,02	1.227,72
Na-Dihydrogenphosphat × 2H ₂ O	0,40	2,6	153,99
Na-Monohydrogenphosphat × 2H ₂ O	1,32	7,5	175,97
NaCl	8,48	145,1	58,44
WFI	ad 1 mL	---	---

Die Polysorbat-Konzentration der AK-3 Lösung liegt unterhalb der CMC von 0,08 mmol/L.

Serumalbumin

Tabelle 8: Zusammensetzung BSA-Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
BSA	0,67	0,01	67.000,00
K-Dihydrogenphosphat	0,20	1,5	136,08
Na-Monohydrogenphosphat × 2H ₂ O	1,14	8,0	142,56
KCl	0,22	3,0	74,55
NaCl	8,01	137,1	58,44
WFI	ad 1 mL	---	---

Interferone

Tabelle 9: Zusammensetzung IFN-1 Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
IFN-1	0,185	0,01	18.500,00
HA ⁴	9,26	0,13	69.367,00
Mannitol	9,26	50,8	182,17
Natronlauge	1,00	24,4	41,00
Salzsäure	1,90	52,1	36,45
WFI	ad 1 mL	---	---

Tabelle 10: Zusammensetzung IFN-2 Lösung, standardisiert 0,01 mmol/L

Material	Massen-Konzentration [mg/mL]	Stoffmengen-Konzentration [mmol/L]	Molmasse [g/mol]
IFN-2	0,165	0,01	16.465,00
Tween 20	0,10	0,08	1.227,72
Bernsteinsäure	0,27	2,3	118,09
Dinatriumsuccinat × 6H ₂ O	0,73	2,6	280,14
Mannitol	40,00	219,6	182,17
WFI	ad 1 mL	---	---

Die Polysorbat-Konzentration der IFN-2 Lösung liegt im Bereich der CMC von 0,08 mmol/L.

⁴ Humanes Albumin wird als Hilfsstoff betrachtet.

4.1.2 Kenngrößen und Eigenschaften der Proteine und Proteinlösungen

Mit Hilfe der Software Vector NTI, Version 10.2.0000, wurden durch Eingabe der Aminosäuresequenzen der Proteinmoleküle die in Tabelle 11 zusammengestellten Kenngrößen ermittelt. Auf Basis der jeweiligen Sequenz wurden die Molmasse, die Anzahl an Aminosäuren, der theoretische pI und die Anzahl der negativ und positiv geladenen Reste berechnet.

Tabelle 11: Kenngrößen der Proteinmoleküle

	Antikörper			Serum- albumin BSA	Interferone	
	AK-1	AK-2	AK-3		IFN-1	IFN-2
Molmasse [g/mol]	150.000	147.500	152.100	67.000	18.500	16.465
Anzahl Aminosäuren	1.326	1.328	1.326	607	165	140
Theoretischer pI	8,5	8,3	8,3	5,8	9,0	9,5
Anzahl negativ geladene Reste (Asp + Glu)	118	114	114	99	18	19
Anzahl positiv geladene Reste (Arg + Lys)	132	124	122	86	22	28

In Tabelle 12 sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der standardisierten Lösungen zusammengestellt.

Tabelle 12: Physikalisch-chemische Eigenschaften der standardisierten Proteinlösungen (0,01 mmol/L)

	Antikörper			Serum- albumin	Interferone	
	AK-1	AK-2	AK-3	BSA	IFN-1	IFN-2
pH	6,0	6,0	7,2	7,0	7,1	5,0
Dichte [g/mL]	1,010	1,006	1,006	1,005	1,005	1,012
Osmolalität [mOsmol/kg]	199	284	289	265	99	230
DSC						
Tm1 [°C]	70,3	69,8	73,1	60,7	72,4	55,5
Tm2 [°C]	87,8	81,5	83,6	---	---	---
Oberflächenspannung (bei 23 °C)						
Ausgangslösung [mN/m]	71,7	72,3	Ohne Tween 69,3	47,9	Mit HA 40,5	33,6
Puffer [mN/m] ⁵	72,4	72,9	Ohne Tween 72,8 Mit Tween 43,9	72,9	Ohne HA 72,4 Mit HA 52,6	33,5

Die Anzahl der Aminosäuren der Modellproteine reicht von 140 bei den Interferonen bis zu ca. 1.300 bei den Antikörpern. Durch den Einsatz dieser Modellproteine wurde ein breites Spektrum an Molekülgrößen abgedeckt.

Die Anzahl der negativ und positiv geladenen Reste wurde basierend auf den Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Arginin und Lysin ermittelt. Mit Ausnahme des BSA-Moleküls war die Anzahl der positiv geladenen Reste höher als die der negativ geladenen. Dies spiegelt sich auch im geringen isoelektrischen Punkt (pI) von BSA wider.

Der pH-Wert der Lösungen variierte aufgrund der unterschiedlichen Hilfsstoffzusammensetzung von pH 5,0 bis pH 7,2, die Osmolalität variierte ebenfalls stark im Bereich von 99 bis 284 mOsmol/kg.

Die Dichte aller Lösungen betrug ca. 1,01 g/mL.

Die mittels DSC bestimmte thermische Auffaltungstemperatur (T_m) lag bei der BSA- und IFN-2 Lösung deutlich unterhalb 70 °C. Die drei Antikörper- und die IFN-1 Lösungen hingegen wiesen bei Messung mittels DSC höhere T_m auf.

⁵ Puffer entspricht der Lösung ohne Protein.

Die Oberflächenspannungen (Wilhelmy-Platten Methode) der polysorbatfreien Antikörperlösungen lagen im Bereich von Wasser. Bei der BSA-Lösung wurde eine deutlich geringere Oberflächenspannung gemessen, was auf die ausgeprägt amphiphilen Eigenschaften des Moleküls zurückzuführen ist. Ebenso war die Oberflächenspannung des Humanalbuminhaltigen Puffers zu IFN-1 mit 53 mN/m sehr niedrig. Durch Zusatz von IFN-1 reduzierte sich die Oberflächenspannung weiter auf 41 mN/m. Die IFN-2 Lösung hatte mit 34 mN/m die geringste Oberflächenspannung aller untersuchten Lösungen. Dies ist auf den polysorbathaltigen Puffer zurückzuführen.

4.2 Methoden

In diesem Kapitel ist die Durchführung der Analysenmethoden beschrieben, die im Rahmen der Versuche verwendet wurden. Der theoretische Hintergrund der Methoden wurde im Kapitel 3.3 erläutert. Eine Übersicht der Analysengeräte ist im Anhang, Kapitel 7.1.1.1, enthalten.

Die Durchführung der Analysen mit dem Trübungsphotometer, Partikelzähler, PCS, die makroskopische Beurteilung und die Mikroskopie erfolgten direkt nach Versuchsende. Vor Durchführung der UV/VIS Spektroskopie wurden die Proben bei 2-8 °C für max. zwei Tage nach Versuchsende gelagert.

Die HP-SEC Messungen wurden innerhalb von vier Wochen nach Versuchsende durchgeführt. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Direkt vor Offline-Trübungsmessung und Partikelzählung durch Lichtblockade wurden für die Messung störende Luftblasen aus der Lösung entfernt. Die Proben wurden mit Hilfe von Unterdruck entgast.

4.2.1 Trübungsmessung (Offline)

Für die Trübungsmessung wurden Rundküvetten aus Glas mit je 1,5 mL unverdünnter Lösung verwendet. An jedem Ziehungszeitpunkt wurden zwei Proben entnommen, die Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet.

4.2.2 Trübungsmessung (Online)

Die Online-Trübungsmessung wurde versuchsbegleitend durchgeführt. Die Lichtstreuung wurde in den Winkeln von 90° (seitwärts Streuung), 11° (vorwärts Streuung) und 180° (ungestreutes Licht) gemessen, siehe Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-2. Die Aufzeichnung der Messwerte erfolgte alle 30 Sekunden. Im Ergebnisteil sind die bei 90° detektierten Lichtstreuungen beispielhaft dargestellt.

Die Messzelle wurde während der Versuche vertikal von unten nach oben mit Lösung durchströmt. Hierdurch sollten Störeffekte durch Luftblasen oder sedimentierende Partikel minimiert werden. Die Kalibrierung des Messgeräts wurde vom Hersteller mit Formazinstandard durchgeführt.

4.2.3 Lichtblockade

Die Zählung der subvisuellen Partikel erfolgte mit dem Prinzip der Lichtblockade. Die Methode ist in der USP <788> (United States Pharmacopeia, 2008) und Ph. Eur. 2.9.19 (European Pharmacopoeia, 2008) für Lösungen zur Injektion beschrieben.

Das verwendete Gerät hat einen Messbereich für Teilchendurchmesser von 0,5 bis 130 μm . Eine Kalibrierung der Partikelgrößenkanäle wird in regelmäßigen Abständen vom Gerätehersteller durchgeführt.

Nach einem Vorlauf von 0,5 μL wurden die Proben unverdünnt mit einem Volumen von 1,0 mL im Durchfluss gemessen. Es wurde eine Dreifach-Bestimmung pro Probe durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung je Partikelgrößenkanal wurden berechnet. Bei der Messung wird die Anzahl der Partikel je Partikelgrößenkanal erfasst. In Kapitel 5 sind die Ergebnisse als Häufigkeitsverteilung der Partikelanzahl zur Partikelgröße dargestellt. Bei Versuchen, in denen über die Versuchsdauer mehrere Proben entnommen wurden, ist die kumulierte Anzahl der Partikel pro Milliliter mit den Durchmessern $\geq 0,5 \mu\text{m}$ (gesamter Messbereich), $\geq 10 \mu\text{m}$ und $\geq 25 \mu\text{m}$ (entsprechend Arzneibuch-Klassifizierung) abgebildet. Zur Auswertung der Daten der Partikelbestimmung wurde die Anzahlverteilung gewählt, da diese der Routineprüfung von Parenteralia entspricht.

Die maximal erfassbare Partikelanzahl ist vom Gerätehersteller mit 60.000 Partikel/mL angegeben. Es wurden teilweise Werte von größer 60.000 Partikel/mL erhalten. Durch Messungen nach Verdünnung der Proben sind Artefakte entstanden. Daher wurden in Kapitel 5, beim Fazit der jeweiligen Versuche, bei Überschreitung der maximalen Partikelanzahl die Werte mit „> 60.000“ aufgeführt.

4.2.4 UV/VIS Spektrometrie und Spektroskopie

Die Proben wurden mit dem jeweiligen Puffer verdünnt, bis die Absorption im Bereich des Lambert-Beerschen Gesetzes lag.

Jeweils 500 μL Lösung wurden in einer Einmalküvette analysiert. Die Messung erfolgte im Zweistrahl-Photometer, als Differenz zum jeweiligen Puffer. Die Probe und der Puffer wurden für die Verdünnung bis zur Absorption $\leq 0,7$ in die Küvette eingewogen und die Konzentration mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor berechnet.

Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Für alle Proben wurde zusätzlich der für die Konzentrationsbestimmung störende Streulichtanteil bei 320 nm ermittelt. Dieser Wert wurde vom Wert bei 280 nm subtrahiert, um die tatsächliche Absorption durch das Protein zu erhalten. Anhand der Absorption wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet.

Zusätzlich zu den unfiltrierten Proben wurde die direkt vor der Messung filtrierte Proteinlösung gemessen. Durch die Differenz der Konzentration von unfiltrierter zu filtrierter Probe wurden die unlöslichen Aggregate quantitativ bestimmt. Die prozentuale Veränderung der Proben im Vergleich zur Ausgangslösung wurde in den Abbildungen im Ergebnisteil ebenfalls angegeben.

Der Mittelwert aus drei Messwerten und die Standardabweichung wurden berechnet.

Des Weiteren wurde die Absorption im Wellenlängenbereich von 750 bis 200 nm (Aufnahme Spektren) der Lösungen ermittelt. Hierdurch konnte der Verlauf des Streulichtanteils über den Wellenlängenbereich beurteilt werden.

Zusätzlich wurde der Aggregations-Index zur Bestimmung der relativen Lichtstreuintensität bei 320 nm durch Proteinaggregate zur Ergänzung der Daten der Trübungsmessung berechnet. Im Ergebnisteil in Kapitel 5.4.3 ist dies am Beispiel des Mischer-Modells enthalten.

4.2.5 Größenausschlußchromatographie

Zur Bestimmung der Anteile von Monomeren, Fragmenten und Aggregaten in der Probe wurden die Probengefäße mit je 500 μL filtrierter Lösung unverdünnt in den Autosampler der HP-SEC Anlage positioniert. Es wurden pro Messung 40 μL Probe bei den Antikörper- und BSA-Lösungen und 50 μL bei den Interferonlösungen injiziert. Die Detektion des UV/VIS-Signals erfolgte bei den Wellenlängen 215 und 280 nm. Die Auswertung des

Signals wurde bei den Antikörper- und BSA-Lösungen bei 280 nm und bei den Interferon-Lösungen bei 215 nm durchgeführt, da die Intensität des Signals bei 280 nm zu gering war. Der prozentuale Anteil der einzelnen Peaks bezogen auf die Gesamtpeakfläche wurde mit der Gerätesoftware berechnet. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung pro Probe durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet. Durch Kalibrierung mit Molekularmarker wurde der Retentionszeit eine Molekularmasse zugeordnet.

4.2.6 Photonenkorrelationspektroskopie

Es wurden je 500 μL Probe unverdünnt und unfiltriert in einer Einmalküvette gemessen. Vor jeder Messung erfolgte eine Temperierung der Lösungen für zwei Minuten bei 23 °C. Der Brechungsindex war für alle Lösungen mit 1,45 und die Viskosität von Wasser mit 0,9308 $\text{mPa} \times \text{s}$ vorgegeben. Die optimale Laserstärke, die Messdauer und die Messposition wurden durch die Gerätesoftware automatisch ermittelt.

Die Beurteilung der Proben erfolgte anhand des Z-Average und des Polydispersitätsindex. Die Berechnung der beiden Kenngrößen wurde durch die Gerätesoftware auf Basis der Intensitätsverteilung ausgeführt. Es wurden drei Bestimmungen pro Küvette durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet.

Der Messbereich des verwendeten Gerätes ist vom Hersteller von 0,6 nm bis 6.000 nm (hydrodynamischer Durchmesser) angegeben. Es wurden teilweise Werte für den Z-Average von mehr als 6.000 nm erhalten. Bereits ab 1.000 nm kann die Aussagekraft der Ergebnisse aufgrund von Sedimentationseffekten stark beeinflusst sein. Daher wurden in Kapitel 5, beim Fazit der jeweiligen Versuche, bei Überschreitung des Z-Average von 1.000 nm die Werte mit „> 1.000 nm“ aufgeführt. Eine Verdünnung der Proben kam nicht in Frage, weil dies zur Entstehung von Artefakten hätte führen können.

4.2.7 Makroskopische Beurteilung

Die makroskopische Beurteilung der Lösungen über die Versuchsdauer bzw. am Ende der Versuche erfolgte direkt im Vorlagegefäß. Die Farbe und das Aussehen der Lösungen, die Form (faserartig, kugelig) und Anzahl der Partikel und das Vorhandensein von Schaum wurden vergleichend über die Proben beurteilt.

4.2.8 Lichtmikroskopie

Pro Probe wurden ein bis zwei Tropfen Lösung auf den Objektträger pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Die Messung erfolgte im Durchlicht und die Lichtstärke wurde für jede Vergrößerung angepasst. Es wurde mindestens je ein Foto mit den Vergrößerungen 50, 100, 200 und 500fach aufgenommen. Die Aufnahmen wurden bei den verschiedenen Vergrößerungen innerhalb einer Probe ohne Änderung der Objektträgerposition erstellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln sind die wesentlichen Untersuchungen zur Degradation von Proteinmolekülen, ausgelöst durch Scherung und Grenzflächenkontakt, zusammengefasst. Es wurden verschiedene Modelle entwickelt, um die Ursachen für Instabilitäten von biologisch-pharmazeutischen Arzneimitteln zu ermitteln und bzgl. ihres Risikos im Fill & Finish Prozess zu beurteilen. Durch die Auswahl der Modelle wurde angestrebt, Grenzflächeneffekte von durch Scherung verursachter Aggregation der Moleküle zu trennen bzw. die Effekte, wie sie im Produktionsprozess vorkommen können, gezielt zu kombinieren.

5.1 Scherstress-Modell

Mit diesem Modell wurde die Degradation von Proteinmolekülen aufgrund der Einwirkung von Scherkräften ermittelt. Die Ergebnisse sind am Beispiel der Antikörperlösung AK-3 mit zwei verschiedenen Scherraten dargestellt. Die Scherrate von ca. 8.700 s^{-1} wurde gewählt, da diese in der Größenordnung den im Produktionsmaßstab auftretenden Scherraten im Fill & Finish Prozess entspricht. Beim Abfüllprozess tritt die höchste Scherrate in der Abfüllnadel auf, wenn diese dem kleinsten Durchmesser im System entspricht. Die Scherrate in der Abfüllnadel mit dem Durchmesser von 1,6 mm wurde beispielhaft im Kapitel 5.1.2 mit ca. 8.700 s^{-1} berechnet. Die Auswirkungen von extremen Scherkräften sind exemplarisch an einem Versuch mit einer Scherrate von 72.150 s^{-1} dargestellt.

5.1.1 Modellbeschreibung

Die Scherstressapparatur besteht aus zwei 20 mL Glasspritzen (1) mit Luer-Lock Konus, die über eine Edelstahlkanüle (2) verbunden sind, und den passenden Glaskolben (4), Abbildung 5-1. Die Scherbeanspruchung in der Kanüle wurde durch die Geschwindigkeit des Entleerens der Spritzen, durch den Kanüledurchmesser und der Anzahl der Zyklen eingestellt. Nach dem Befüllen der Spritzen mit der Lösung und anschließendem Entlüften des Systems wurden die Kolben an den Enden fixiert. Der Mittelteil (3) der Scherstress-Apparatur wird über einen Motor angetrieben und führt die eingestellte Anzahl von Zyklen mit der für die jeweilige Scherrate entsprechenden Geschwindigkeit aus. Durch die Bewegung des Mittelteils der Apparatur werden die Spitzen entleert und befüllt. Ein Zyklus entspricht einer Entleerung der Spritze.

Die Materialien, die mit Proteinlösung Kontakt haben, sind aus Edelstahl oder Glas, so dass hydrophobe Grenzflächeneffekte vermieden werden. Das System ließ sich jedoch nicht komplett entlüften. Einzelne in den Spritzen vorhandene Luftblasen wurden während der Versuche nicht durch die Kanüle bewegt. Durch Luftblasen verursachte Grenzflächeneffekte werden daher als vernachlässigbar betrachtet.

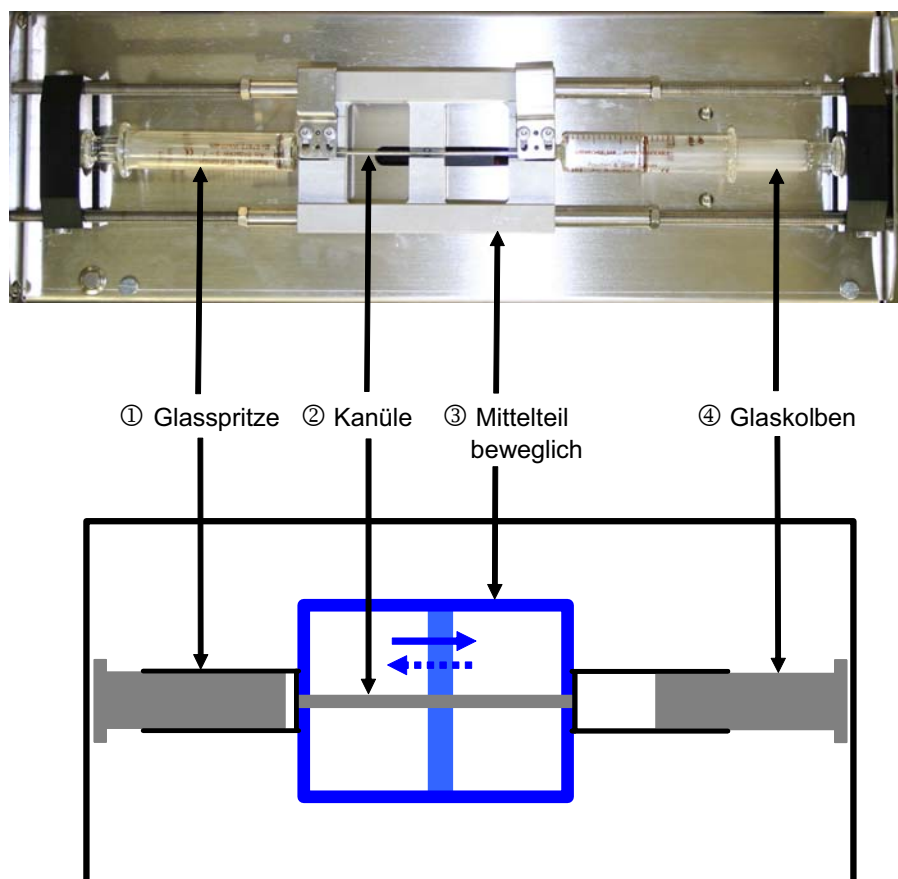


Abbildung 5-1: Foto (oben) und schematische Darstellung (unten) der Scherstressapparatur. Die im Folgenden dargestellten Versuche unterscheiden sich durch die eingestellten Scherraten. Die Ergebnisse sind durch den Zusatz der jeweiligen Scherrate differenziert.

Die Versuche wurden mit AK-3 Lösung (0,01 mmol/L) durchgeführt. Die Lösungen wurden mit 300 Zyklen über eine Kanüle mit 15 mL/Zyklus gedrückt.

Bei der Einstellung der Scherrate von 8.696 s^{-1} betrug der Volumenstrom 6,83 mL/s, der Innendurchmesser der Kanüle 2 mm und die Kanülenlänge 139 mm.

Für die Scherrate von 72.150 s^{-1} wurde eine Kanüle mit dem Innendurchmesser von 0,6 mm und einer Länge von 138 mm verwendet. Der Volumenstrom betrug hier 1,53 mL/s.

Während der Abfüllung der Lösung auf der Abfüllmaschine erfolgt nur ein Zyklus über die Abfüllnadel. In diesem Modell wurden jedoch 300 Zyklen gewählt, um durch kumulative Effekte die Degradation durch Scherung besser beurteilen zu können.

Die Versuche mit dem Kolbenpumpen-Modell wurden zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit mit ebenfalls 300 Zyklen durchgeführt.

5.1.2 Kenngrößen

Wesentliche Scherkräfte im Fill & Finish Prozess können bei der Filtration der Proteinlösungen über Filtermembranen und bei der Abfüllung in der Abfüllnadel entstehen, da hier die kleinsten Durchmesser bei Prozessierung vorhanden sind.

Filtration

Für die Filtration einer Lösung über eine Membran mit dem Porendurchmesser von $0,22\ \mu\text{m}$ wurde durch Truskey (Truskey et al., 1987) ein Mass Average Shear von 2.450 ermittelt, siehe Kapitel 3.4.5.1.

Abfüllung

Die Scherrate wurde am Beispiel der Abfüllnadel mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm und einer Länge 122 mm berechnet.

Üblich sind Abfüllgeschwindigkeiten von ca. 50 Takten pro Minute und Abfüllstation. Die max. Dosiermenge (entspricht höchstem Volumenstrom) der Pumpe (Größe 0,3-2,1 mL) entspricht im Kolbenpumpen-Modell 2,1 mL/Takt. Ein Takt entspricht einer Pumpenbefüllung und -entleerung. Wird der Volumenstrom der Pumpenentleerung betrachtet, welcher der Nadelentleerung entspricht, werden hierfür 50 % des Taktes benötigt. Die weiteren 50 % werden für die Befüllung der Pumpe und für die jeweils zweimalige Drehung von 180 Grad beansprucht, detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 5.5.2.

Die für die Berechnungen zu Grunde liegenden Formeln sind in Kapitel 3.6 vorgestellt. Die einzelnen Berechnungen sind im Anhang, Kapitel 7.2.2 zusammengestellt.

Tabelle 13: Übersicht Scherraten und Mass Shear

	Volumenstrom	Geschwindigkeit	Scherdauer	Scherrate	Mass Wall Shear	Mass Average Shear
	\dot{V} [m ³ /s]	w [m/s]	t_s [s]	$\dot{\gamma}_w$ [s ⁻¹]	$(\gamma\theta)_w$	$(\gamma\theta)_{av}$
Filtration, Membran mit Porendurchmesser 0,2 μm	---	---	---	---	---	2.450
Abfüllung Produktionsmaßstab; Nadel $r=0,0008$ m; Nadel $l=0,122$ m	$3,5 \times 10^{-6}$	1,74	0,007	8.704	609	407
Modell, Scherrate 8.696 s ⁻¹	$6,83 \times 10^{-6}$	2,17	19,22	8.696	$1,67 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$
Modell, Scherrate 72.150 s ⁻¹	$1,53 \times 10^{-6}$	5,41	7,65	72.150	$5,52 \times 10^5$	$3,68 \times 10^5$

Der Mass Average Shear in der Abfüllnadel ($(\gamma\theta)_{av}=407$) mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm ist deutlich geringer als bei der Filtration über eine Membran der Porengröße 0,2 μm ($(\gamma\theta)_{av}=2.450$). Der im Modell simulierte Mass Average Shear (Scherrate 8.696 s⁻¹ und 72.150 s⁻¹) ist um Faktor 45 und 150 höher als in der Filtermembran und um ca. Faktor 270 und 900 höher als in der Abfüllnadel.

5.1.3 Ergebnisse

Exemplarisch für die Scherversuche werden die Ergebnisse der AK-3 Lösung bei den Scherraten von 8.696 s⁻¹ und 72.150 s⁻¹ abgebildet.

Durch die Scherbeanspruchung mit 300 Zyklen nahm die Trübung nur geringfügig auf 1,6 FNU (Scherrate 8.696 s⁻¹) und 1,9 FNU (Scherrate 72.150 s⁻¹) zu.

Die durch Lichtblockade ermittelte Partikelanzahl nahm im Größenbereich von 0,5 bis 5 μm durch den Scherstress deutlich zu (Abbildung 5-2). Die kumulierte Anzahl der Partikel ≥ 10 μm aller Lösungen war mit max. 211 Partikel/mL jedoch sehr gering.

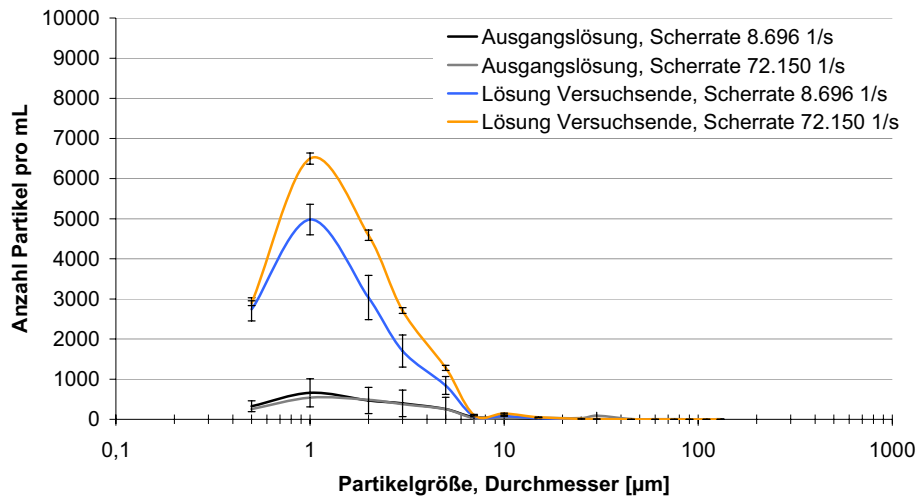


Abbildung 5-2: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Scherstress-Modell
 Die Proteinkonzentration nach 0,2 µm Filtration ist in Abbildung 5-3 dargestellt. Die Säulen entsprechen der Konzentration in Milligramm pro Milliliter, linke Y-Achse. Werte oberhalb der Säulen und das Symbol „×“ entsprechen dem prozentualen Anteil der Proteinkonzentration bezogen auf die Ausgangslösungen, rechte Y-Achse.
 Durch die Veränderung der Konzentration der Lösungen nach den Versuchen im Vergleich zur Ausgangslösung wurde der Anteil der unlöslichen Aggregate nach Filtration erfasst. Der Anteil unlöslicher Aggregate (> 0,2 µm) bezogen auf die Ausgangslösung war mit max. 1,8 % relativ gering.

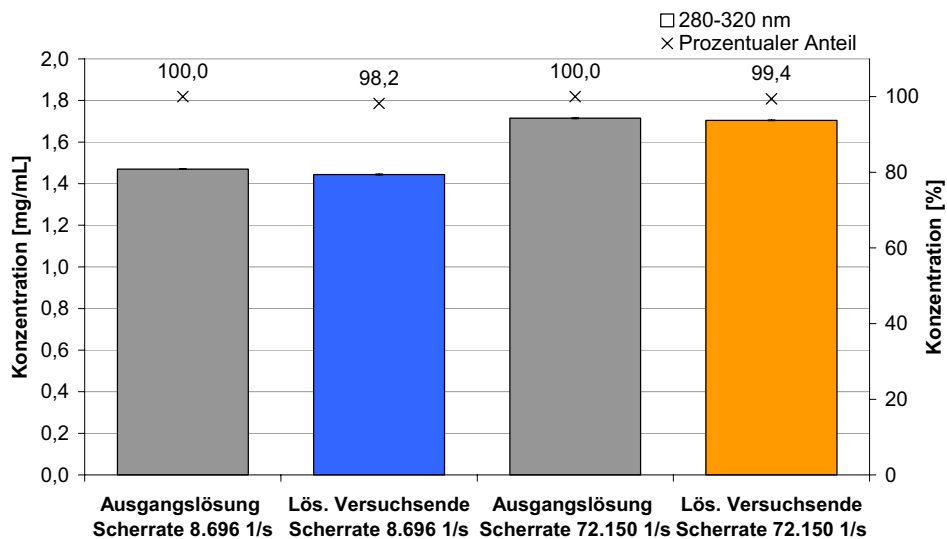


Abbildung 5-3: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der AK-3 Lösungen, Scherstress-Modell

Der Anteil der löslichen Aggregate und Fragmente wurde durch die Veränderung des Monomergehalts der gescherten Lösungen im Vergleich zu den Ausgangslösungen mit Hilfe der HP-SEC Analyse ermittelt. Nach Scherbeanspruchung war der Monomergehalt im Vergleich zur Ausgangslösung um 13 bis 17 % reduziert, was allein auf die Entstehung von Aggregaten, nicht Fragmenten, zurückzuführen war.

Ebenfalls wurde eine Veränderung der Mittelwerte der hydrodynamischen Durchmesser (Z-Average) durch PCS-Analyse an den Lösungen nach den Versuchen ermittelt (Abbildung 5-4). Der Z-Average der Ausgangslösungen wies den für Antikörper erwarteten Wert von 11 nm auf. Nach den Versuchen stiegen die Werte auf 82 nm bzw. 16 nm an. Die Polydispersität der Proben nahm durch die Scherbeanspruchung ebenfalls zu. Ein Polydispersitätsindex von mehr als 0,1 deutet darauf hin, dass keine monomodale Verteilung der Teilchen nach Scherbeanspruchung mehr vorlag.

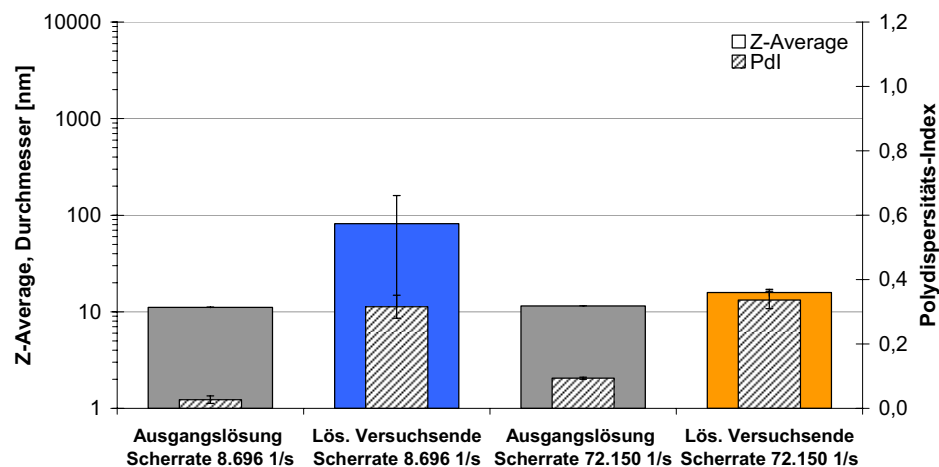


Abbildung 5-4: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der AK-3 Lösungen, Scherstress-Modell

5.1.4 Diskussion

Durch die Scherbeanspruchung sind hauptsächlich lösliche Aggregate entstanden, was durch die Reduktion des Monomergehaltes um ca. 15 % und einer Zunahme des Z-Average belegt wird.

Der Anteil unlöslicher Aggregate durch Trübungsmessung, Lichtblockade und UV/VIS-Messung ermittelt, nahm geringfügig zu. Ursache hierfür könnte eine Zerkleinerung der Aggregate durch die in der Kanüle aufgebauten Scherkräfte sein.

Der im Modell simulierte max. Mass Average Shear war um Faktor 150 höher als der in der Literatur angegebene berechnete Wert für die Sterilfiltration. Im Vergleich von unter Produktionsbedingungen auftretenden Scherbeanspruchungen in der Abfüllnadel, mit der im Modell gewählten Mass Wall Shear, war die Scherbeanspruchung im Modell ca. 900 mal höher. Das Risiko der Degradation durch Scherkräfte während der Prozessierung wird anhand der Ergebnisse daher als gering eingestuft.

Im Modell waren ausschließlich hydrophile Materialien mit der Proteinlösung in Kontakt. Dies könnte die Ursache sein, weshalb sich nur ein geringer Anteil der Moleküle durch die Einwirkung von Scherkräften aufgefaltet hat und aggregiert ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Degradation von Proteinmolekülen an hydrophoben Grenzflächen sind in den Kapiteln 5.2 bis 5.4 dargestellt.

5.1.5 Fazit

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der vorgestellten Scherversuche zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnisse Untersuchungen zu Scherung

Prüfpunkt Methode	Scherrate	
	8696 s ⁻¹	72150 s ⁻¹
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	17	13
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	82	16
Trübung Offline [FNU]	1,6	1,9
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektrometrie [%]	1,8	0,6
Partikelzählung ≥ 0,5 µm Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	13.491	18.281

Durch Scherbeanspruchung sind hauptsächlich lösliche Aggregate entstanden. Es wurde kein entscheidender Unterschied der Degradation bei einer Scherrate von 8.696 s⁻¹

(($\gamma\theta$)_w = 1,7 × 10⁵) und 72.150 s⁻¹ (($\gamma\theta$)_w = 5,5 × 10⁵) ermittelt.

Da im Produktionsmaßstab nur ein Zyklus über die Abfüllnadel durchgeführt wird und in den oben beschriebenen Versuchen 300 Zyklen ausgeführt wurden, stellt die Degradation durch Scherung im Fill & Finish Prozess ein nur geringes Risiko dar.

5.1.6 Bewertung des Modells

Das Modell der Scherstressapparatur ist sehr gut geeignet, um Proteinlösungen hinsichtlich ihrer Schersensitivität zu untersuchen. Die im Produktionsmaßstab bei der Filtration und Abfüllung auftretenden Scherraten können simuliert werden. Grenzflächeneffekte sind durch den Einsatz hydrophiler Kontaktmaterialien minimiert. Durch eine erhöhte Anzahl von Scherzyklen können extreme Bedingungen gewählt und die proteinhaltigen Lösungen bezüglich ihrer Sensitivität auf Scherbeanspruchung beurteilt werden.

Tabelle 15: Bewertung Scherstress-Modell

Parameter	Eigenschaften Modell
Scherbeanspruchung	Hoch
Anzahl Zyklen	Einstellbar (ein bis mehrere tausend Zyklen)
Versuchsdauer	Kurz (ein Tag)
Grenzflächeneffekte	
- Anteil Grenzfläche Metall	Mittel
- Anteil Grenzfläche Glas	Mittel
- Anteil Grenzfläche Luft	Gering
Einsatzgebiet	Charakterisierung Schersensitivität verschiedener Moleküle
Limitation	Viskosität der Lösung
Übertragbarkeit Produktionsmaßstab	Ja, Scherraten können simuliert werden

5.2 Peristaltikpumpen-Modell

Mit dem Peristaltikpumpen-Modell wurde die Degradation der Proteinmoleküle durch Kontakt der Lösung mit Silikonschläuchen und Luft untersucht.

5.2.1 Modellbeschreibung

In diesem Modell wurden die Proteinlösungen bei Raumtemperatur aus einem Vorlagebehälter (5) über einen Silikonschlauch mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (4) gefördert, Abbildung 5-5. Nach der Peristaltikpumpe (4) wurden die Lösungen über ein Online-Trübungsphotometer (2) mit einem Silikonschlauch (3) zurück in den Vorlagebehälter (5) aus Glas geführt. Durch die Zirkulation der Lösung sollten die Effekte durch Kontakt der Proteinmoleküle mit dem Silikonschlauch verstärkt werden.

Zur Untersuchung der Degradation der Proteinmoleküle durch die zusätzliche Kontaktfläche zu Luft wurde am Ausgang des Trübungsphotometers (2) Luft über einen Durchflussregler (6) mit Hilfe einer direkt in den Silikonschlauch (3) eingestochenen Kanüle (7) zugeführt, Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6. Durch diesen Aufbau wurden Luftblasen in der Lösung innerhalb des Schlauches erzeugt. Die Kontaktzeit der jeweiligen Lösung mit den Gasblasen wurde über alle Versuche konstant gehalten.

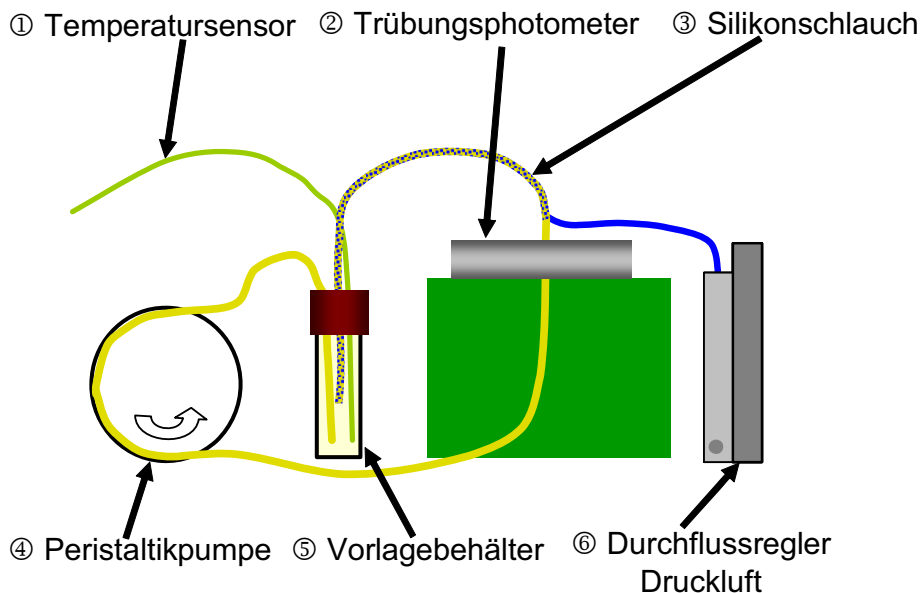


Abbildung 5-5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Versuche mit Zusatz von Luft

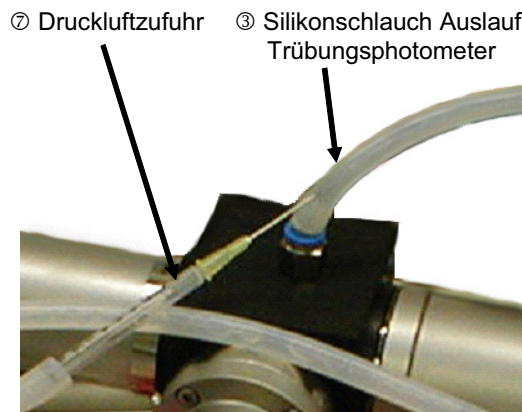


Abbildung 5-6: Foto Auslauf Trübungsphotometer mit Druckluftzufuhr über Kanüle

Als Referenz zur Beurteilung des Ausmaßes der Degradation wurde die Proteinlösung im Vorlagebehälter (5) in einem Wasserbad (8) erwärmt und über Schläuche (3) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (4) befördert, Abbildung 5-7. Die Temperatur der Lösungen im Vorlagebehälter (5) wurde bei allen Versuchen mit Hilfe eines Temperatursensors (1) ermittelt und aufgezeichnet.

Es wurden bei allen Versuchen platin-katalysierte Silikonschläuche pharmazeutischer Güteklasse verwendet.

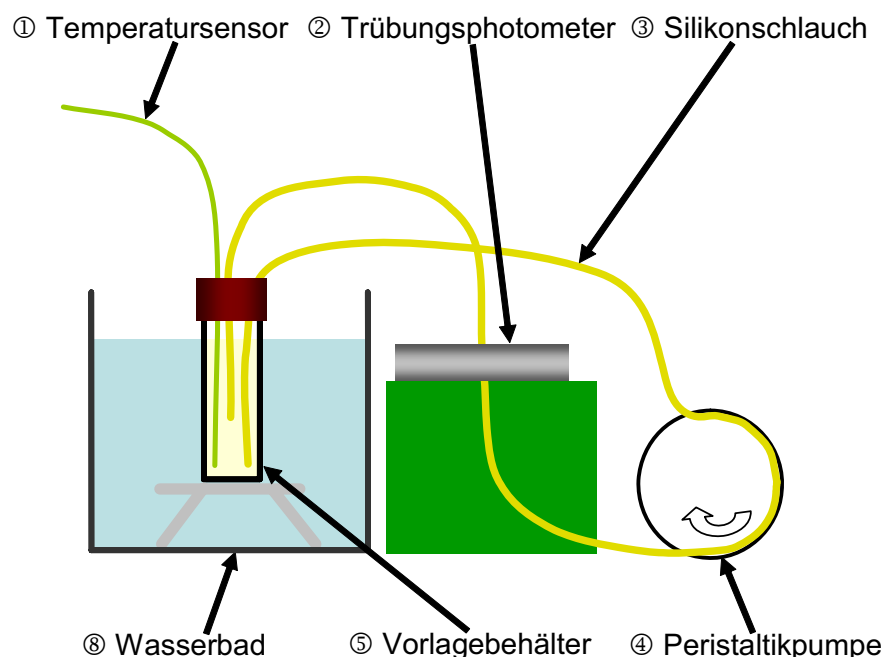


Abbildung 5-7: Schematische Darstellung des Aufbaus der Versuche mit Erwärmen im Wasserbad

Die Proteinlösungen wurden bei minimaler Pumpendrehzahl, entsprechend einer Scherrate im Silikonschlauch von ca. 50 s^{-1} , über 5,5 Stunden ohne oder mit zusätzlichem Lufteintrag zirkuliert. Die Gesamtkontaktzeit der Lösung mit Luftblasen im Schlauch betrug 1 Stunde

und 50 Minuten und mit Silikonschläuchen ca. 2,5 Stunden, Berechnungen siehe Kapitel 5.2.2 und Anhang, Kapitel 7.2.3. Die restliche Zeit von ca. drei Stunden war die Lösung hauptsächlich mit dem Glas des Vorlagebehälters und kurze Zeit mit dem Trübungsphotometer⁶ in Kontakt.

Die Versuche unter Erwärmen der Lösungen im Wasserbad wurden bereits nach 2,5 Stunden beendet, da die Trübungswerte überwiegend oberhalb des maximal erfassbaren Messwertes von 100 FTU lagen.

Temperatur des Wasserbades bei den Versuchen mit Erwärmen der Lösungen

Temperatur	Haltezeit	Heizrate
20 - 60 °C	20 min	2 °C/min
60 - 60 °C	10 min	---
60 - 80 °C	20 min	1 °C/min
80 - 90 °C	5 min	2 °C/min
90 - 90 °C	45 min	---
90 - 20 °C	35 min	2 °C/min

Die Temperaturen der Lösungen im Vorlagebehälter betragen max. 52 bis 65 °C.

Die Position von Zu- und Rücklauf der Schläuche im Vorlagebehälter wurde über alle Versuche konstant gehalten und so gewählt, dass möglichst keine zusätzliche Degradation initiiert wurde.

Exemplarisch für das Peristaltikpumpen-Modell wurden die Versuche in Tabelle 16 ausgewählt und die Ergebnisse in Kapitel 5.2.3 zusammengestellt.

Die Reproduzierbarkeit der Versuche mit diesem Modell wurde mit AK-3 Lösung und Luft-eintrag überprüft (Versuche AK-3_L1, AK-3_L2, AK-3_L3).

Die Auswirkung verschiedener Proteinkonzentrationen auf den Trübungsverlauf wird am Beispiel der AK-2, AK-3 und BSA-Lösungen dargestellt.

Die Stabilisierung von Proteinlösungen durch Polysorbat (0,0024 mg/mL Tween 20) unter Einwirkung von Luftblasen wird beispielhaft mit AK-3 Lösung belegt.

⁶ Materialien: Hostaflon, entspricht modifiziertem PTFE, und Sensorfenster aus Saphir.

Tabelle 16: Übersicht Versuchsparameter; Zusatz Versuchs-Bezeichnung: T=Thermischer Einfluss (ca. 60 °C); L=Luftdurchfluss

Proteinlösung	Versuchs-Bezeichnung	Temperatur Lösung [°C]	Durchfluss Luft [L/h]	Protein-konzentration [mg/mL]
AK-1	AK-1_T	Ca. 60	---	1,50
	AK-1	RT	---	
	AK-1_L	RT	1	
AK-2	AK-2_T	Ca. 60	---	1,47
	AK-2	RT	---	
	AK-2_L	RT	1	10,0
	AK-2_L_10mg/mL	RT	1	
AK-3	AK-3_T	Ca. 60	---	1,53
	AK-3	RT	---	
	AK-3_L1	RT	1	
	AK-3_L2	RT	1	
	AK-3_L3	RT	1	
	AK-3_L_2mg/mL	RT	1	2,00
	AK-3_2mg/mL	RT	---	
AK-3 + Tween	AK-3_L_Tween	RT	1	1,53
BSA	BSA_T	Ca. 60	---	0,67
	BSA	RT	---	
	BSA_L	RT	1	20,0
	BSA_20mg/mL	RT	---	
IFN-1	IFN-1_T	Ca. 60	---	0,185
	IFN-1	RT	---	
	IFN-1_L	RT	1	
IFN-2	IFN-2_T	Ca. 60	---	0,165
	IFN-2	RT	---	
	IFN-2_L	RT	1	

5.2.2 Kenngrößen

Die für die Berechnungen zu Grunde liegenden Formeln sind in Kapitel 3.6 aufgeführt. Die einzelnen Berechnungen sind im Anhang, Kapitel 7.2.3 zusammengestellt.

Tabelle 17: Übersicht Scherraten und Kontaktzeiten

	Volumenstrom \dot{V} [m ³ /s]	Geschwindigkeit w [m/s]	Scherrate $\dot{\gamma}_w$ [s ⁻¹]	Volumenwechsel VW	Kontaktzeit t_k [s]
Mit und ohne Luft, RT					
Zulauf Trübungsphotometer	$1,783 \times 10^{-7}$	0,02	50,5	44,1	2.476
Rücklauf Trübungsphotometer		0,01	17,0		6.620

Durch den geringen Volumenstrom waren die Scherraten in den Schläuchen sehr niedrig. Die Kontaktzeit mit dem Schlauchmaterial war mit ca. 2,5 Stunden und mit Luftblasen mit 1 Stunde und 50 Minuten hingegen sehr lang. Somit wurde in diesem Modell vorwiegend die Degradation durch Kontaktflächen erfasst.

5.2.3 Ergebnisse

Die polysorbathaltigen Lösungen (IFN-2, AK-3 mit Polysorbat-Zusatz) entwickelten über die Versuchsdauer keinen Schaum. Die stärkste Schaumbildung wiesen IFN-1 (enthält humanes Albumin) und BSA-Lösungen auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die amphiphilen Eigenschaften von humanem und bovinem Serumalbumin der Schaum stabilisiert wurde.

Faserartige Partikel wurden nur bei Versuchen mit Luftdurchströmung beobachtet. Hier war teilweise eine Kontaktzeit von wenigen Minuten zwischen Proteinlösung und Luftblasen ausreichend, um die Entstehung von sichtbaren Fasern zu induzieren. Die Lösungen der weiteren Versuche enthielten kugelförmige oder keine sichtbaren Partikel. Beispiele zum Aussehen der Lösungen sind in Abbildung 5-8 dargestellt.

Lösungen mit BSA, IFN-2 und AK-3 mit Polysorbat blieben zum Teil über die gesamte Versuchsdauer klar. Details zur makroskopischen Beurteilung sind im Anhang, Kapitel 7.3, Tabelle 33 enthalten.

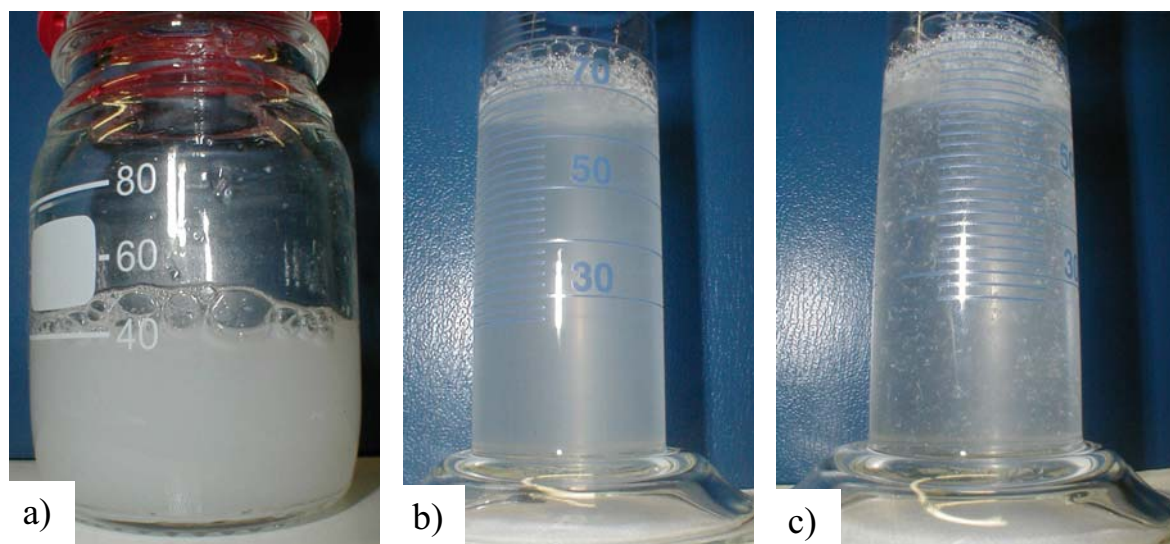


Abbildung 5-8: Fotos der Lösungen am Ende der Versuche mit AK-3 Lösung; a) Erwärmte Lösung erscheint milchig; Partikel sind nicht erkennbar; b) Lösung nach Silikonschlauchkontakt mit kugelförmigen Partikeln; c) Lösung nach Luftblasenkontakt mit faserartigen Partikeln

Die Größe der Luftblasen konnte nur bedingt über den Luftdurchfluss eingestellt werden. In Abhängigkeit von der Oberflächenspannung der Lösungen bildeten sich unterschiedlich große Luftblasen, deren Größe sich zum Teil über die Versuchsdauer veränderte (Abbildung 5-9). Der Anteil der Grenzfläche zu Luft war daher nicht über alle Versuche konstant. Beim Versuch mit polysorbathaltiger AK-3 Lösung veränderte sich die Luftblasengröße von einem Durchmesser von ca. 4 mm zu Versuchsbeginn auf ca. 20 mm am Versuchsende. Eine Ursache für die Veränderung der Oberflächenspannung könnte die Adsorption von Polysorbat an den Grenzflächen sein.

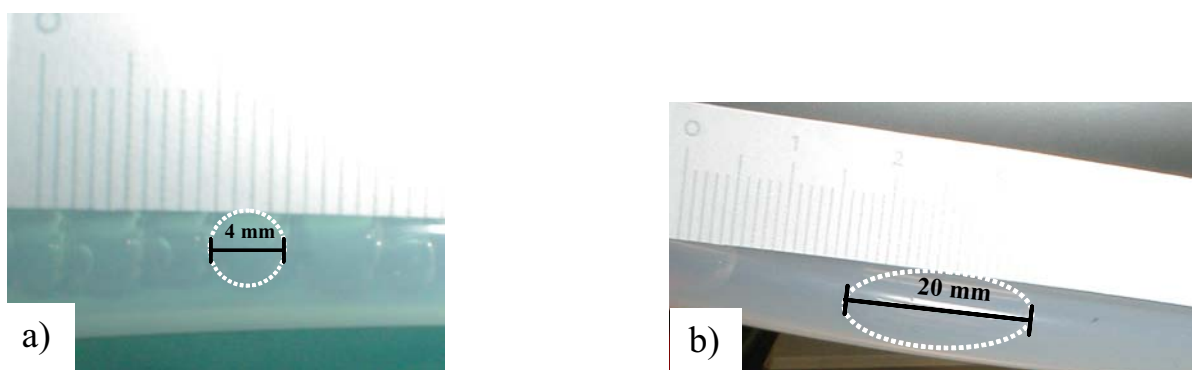


Abbildung 5-9: Fotos zur Luftblasengröße im Silikonschlauch; Maßstab: 1 Teilstrich entspricht 1 mm; Luftblase weiß markiert, AK-3 Lösung mit Polysorbat; a) Anfang Versuch, Durchmesser ca. 4 mm; b) Ende Versuch, Durchmesser ca. 20 mm

Die Darstellung der Linien und Säulen der Diagramme in den Farben rot, grün, blau und gelb entsprechen jeweils den Lösungen am Ende der Versuche. Ausnahmen sind die Abbildungen mit den Online Trübungswerten, die dem Verlauf über die Versuche entsprechen. Die Ausgangslösungen, auch als $t=0$ bezeichnet, sind in grau dargestellt.

5.2.3.1 AK-3 Lösung

Nachdem das Peristaltikpumpen-Modell ausreichend entwickelt und getestet war, wurden Versuche mit AK-3 Lösungen durchgeführt. In Abbildung 5-10 bis Abbildung 5-15 sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt.

Eine deutliche Trübungszunahme wurde bei dem Versuch mit Erwärmen (AK-3_T) ermittelt (Abbildung 5-10). In den Versuchen ohne Lufteintrag und den Proteinkonzentrationen von 1,53 und 2 mg/mL (AK-3; AK-3_2mg/mL) wurde ein vergleichbarer Trübungsverlauf festgestellt. Bei den mit Luftdurchfluss (AK-3_L1 bis L3; AK-3_L_2mg/mL) durchgeführten Versuchen der oben genannten Proteinkonzentrationen stiegen die Trübungswerte nach ca. zwei Stunden nur noch geringfügig an. Dies ist auf Sedimentations- und Flotationseffekte, siehe Abbildung 5-8, zurückzuführen. Die größeren Aggregate waren inhomogen im Vorlagebehälter verteilt und wurden hierdurch nicht mehr vollständig im System zirkuliert und somit durch die Online-Trübungsmessung nicht mehr erfasst. An der polysorbathaltigen Lösung mit Luftdurchfluss wurde auch nach ca. zwei Stunden noch keine Veränderung der Trübung gemessen.

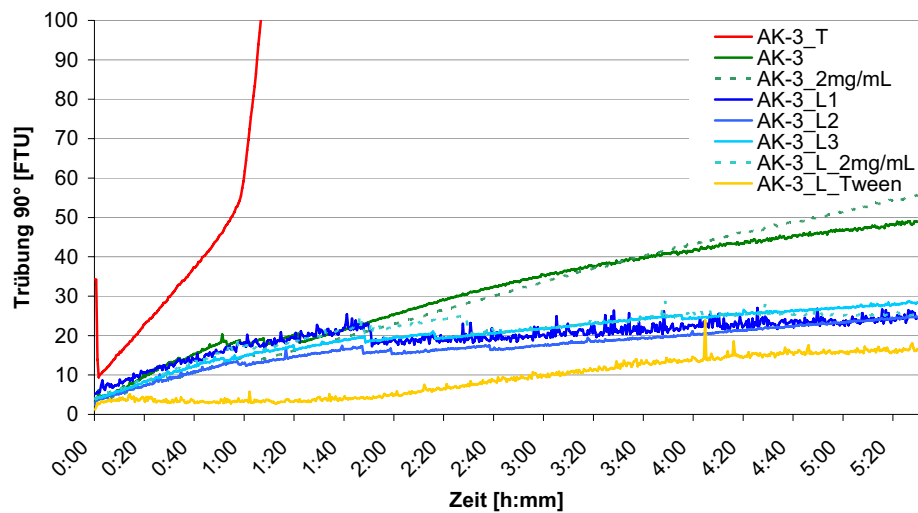


Abbildung 5-10: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der AK-3 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; Linien entsprechen Konzentration 1,53 mg/mL; gestrichelte Linien entsprechen Konzentration 2 mg/mL

Mit dem Offline-Trübungsphotometer wurden ebenfalls stark streuende Werte aufgrund von Sedimentations- bzw. Flotationseffekten in den Versuchen mit Luftdurchfluss (AK-3_L1 bis L3) ermittelt, in Abbildung 5-11 als schraffierte Säulen dargestellt. Die höchste Trübung zeigte die erwärmte Probe (AK-3_T). Polysorbat führte zu einer deutlichen Stabilisierung der AK-3 Lösung (AK-3_L_Tween). Die Trübung der Ausgangslösungen war mit kleiner 1 FNU sehr gering.

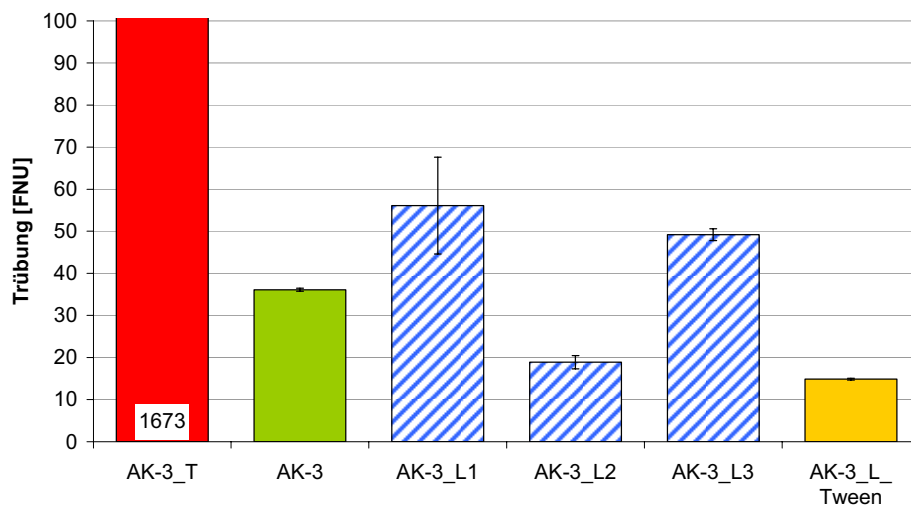


Abbildung 5-11: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der AK-3 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Die häufigste Partikelanzahl, mit Hilfe der Lichtblockade ermittelt, lag bei der erwärmten Probe (AK-3_T) bei einem Durchmesser von 10 μm (Abbildung 5-12). Die häufigste Partikelanzahl aufgrund der Kontaktflächen zu Silikonschlauch (AK-3) und Luftblasen (AK-3_L1 bis L3) lag hingegen bei einem Durchmesser von ca. 5 μm . Durch Polysorbatzusatz (AK-3_L_Tween) zur Lösung konnte die Partikelanzahl bei 5 μm auf ein Drittel reduziert werden.

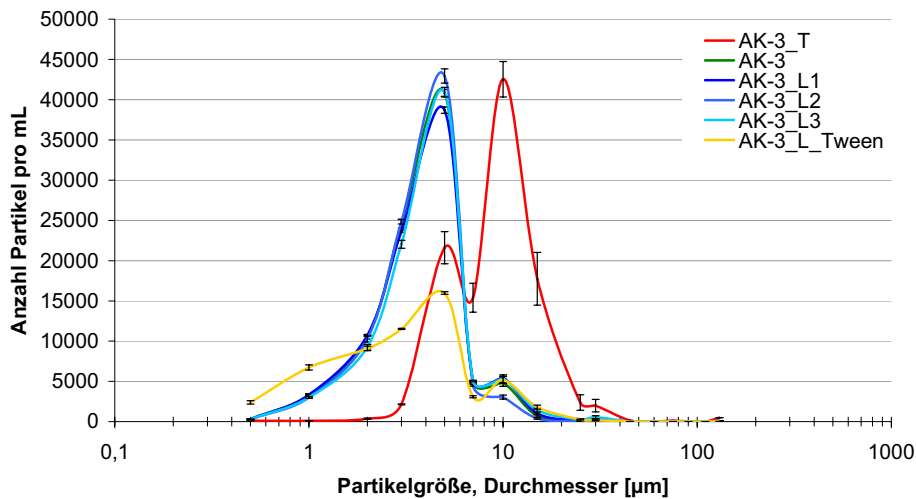


Abbildung 5-12: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell. Der Anteil unlöslicher Aggregate, photometrisch durch UV/VIS Spektrometrie ermittelt, betrug an der Lösung nach Erwärmen ca. 93 % (AK-3_T), Abbildung 5-13. Durch Schlauch- (AK-3) und Luftblasenkontakt (AK-3_L1 bis L3) bei Raumtemperatur entstanden 8 bis 13 % unlösliche Aggregate. Polysorbatzusatz (AK-3_L_Tween) führte in diesem Beispiel zu keiner wesentlichen Verringerung der unlöslichen Aggregate im Vergleich zu den Lösungen ohne Polysorbat.

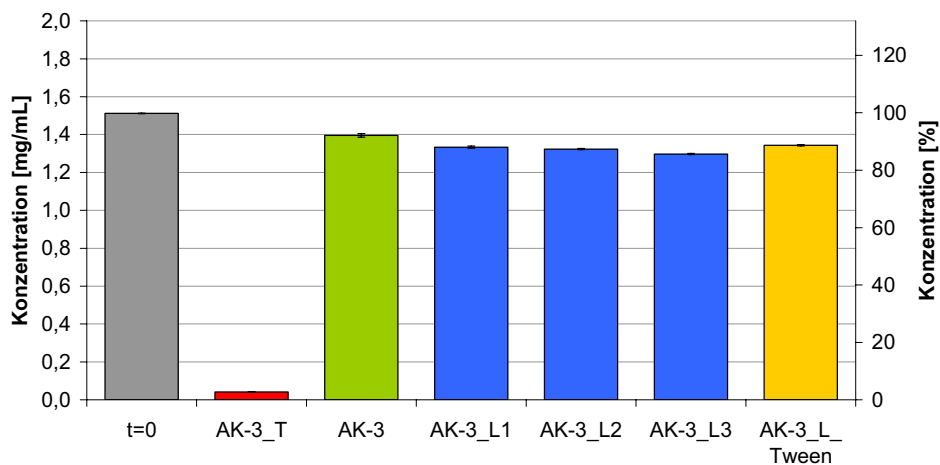


Abbildung 5-13: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der AK-3 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Der Monomergehalt der Versuche mit Erwärmen (AK-3_T), Silikonschlauchkontakt (AK-3) und Luftdurchfluss (AK-3_L1 bis L3) nahm deutlich um ca. 45 % gegenüber den Ausgangslösungen ab (Abbildung 5-14). An der polysorbathaltigen Lösung konnte wiederum die stabilisierende Wirkung belegt werden, da die Abnahme des Monomergehalts auf ein Drittel reduziert war.

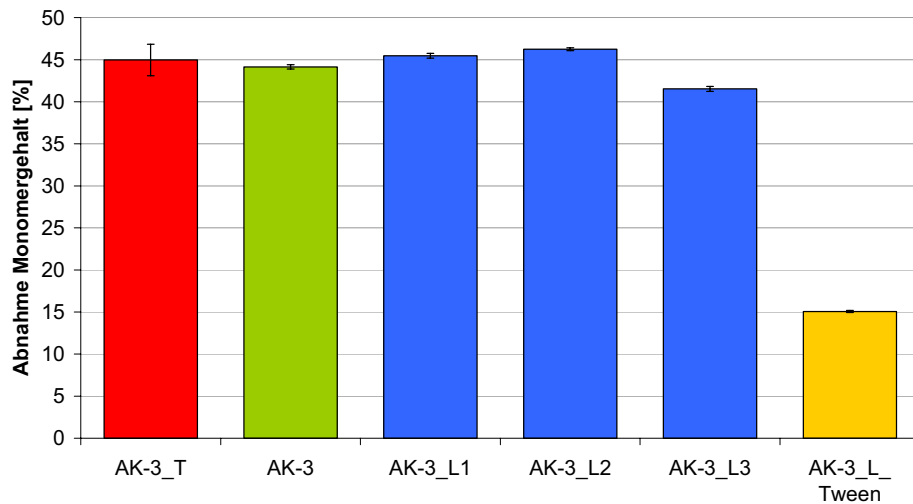


Abbildung 5-14: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt der AK-3 Lösungen bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

Der Z-Average stieg von 11 nm der Ausgangslösungen auf größer 1.000 nm nach Erwärmen (AK-3_T), Kontakt zum Silikonschlauch (AK-3) und zusätzlichem Kontakt zu Luftblasen an (AK-3_L1 bis L3), Abbildung 5-15. Die polysorbathaltige Lösung (AK-3_L_Tween) wies mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ca. 200 nm die geringste Veränderung im Vergleich zu den Ausgangslösungen auf.

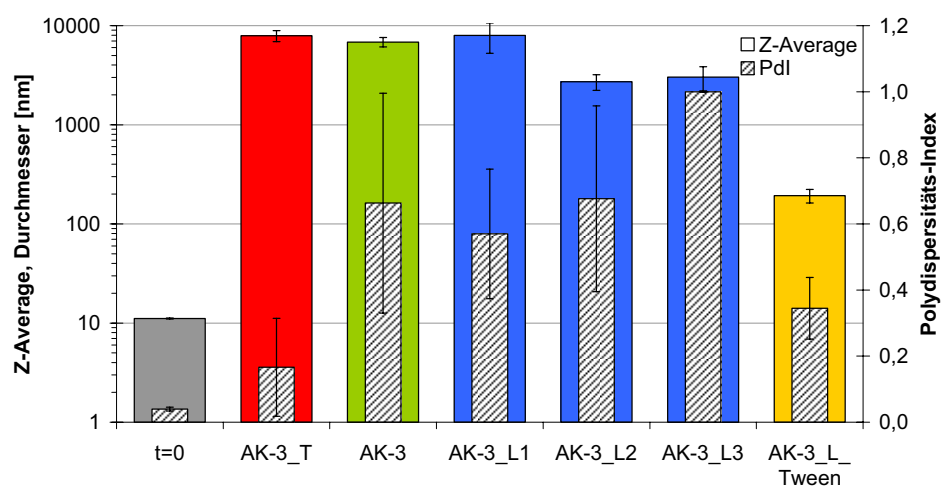


Abbildung 5-15: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der AK-3 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

5.2.3.2 AK-1 Lösung

Die Trübungen der AK-1 Lösungen zeigten ohne (AK-1) und mit Luftdurchfluss (AK-1_L) über die Versuchsdauer den gleichen Verlauf (Abbildung 5-16). Bei der erwärmten Lösung (AK-1_T) wurde eine deutlich stärkere Trübungszunahme ermittelt.

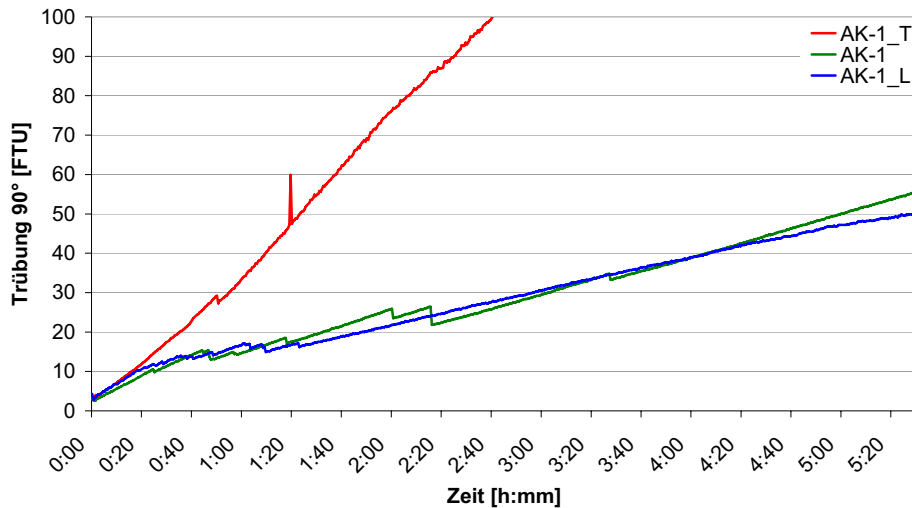


Abbildung 5-16: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der AK-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Weitere Ergebnisse der Versuche mit AK-1 Lösungen sind im Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-3 bis Abbildung 7-7, zusammengestellt.

5.2.3.3 AK-2 Lösung

Die AK-2 Lösung mit der Proteinkonzentration von 1,47 mg/mL wies nach Kontakt mit Luftblasen (AK-2_L) geringere Trübungswerte auf als ohne zusätzlichen Luftkontakt (AK-2), Abbildung 5-17. Die unerwartet geringen Messwerte sind auf Sedimentations- und Flotationseffekte im Vorlagebehälter zurückzuführen. Größere Aggregate wurden nicht mehr im System mit der Peristaltikpumpe zirkuliert.

Die Lösung mit der Proteinkonzentration von 10 mg/mL und Luftblasenkontakt (AK-2_L_10mg/mL) zeigte verstärkt Sedimentations- und Flotationseffekte, was durch einen Abfall der Trübung nach ca. zwei Stunden belegt wird.

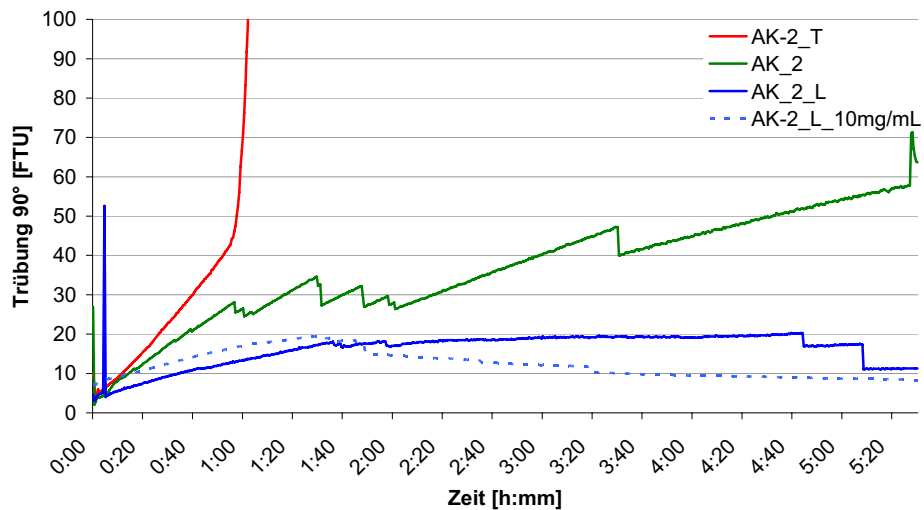


Abbildung 5-17: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der AK-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; Linien entsprechen Konzentration 1,47 mg/mL; gestrichelte Linie entspricht Konzentration 10 mg/mL

Weitere Ergebnisse der Versuche mit AK-2 Lösungen sind im Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-8 bis Abbildung 7-14, aufgeführt.

5.2.3.4 BSA

Die Trübungszunahme der BSA-Lösungen war über die Versuchsdauer deutlich geringer als bei den Antikörperlösungen, Abbildung 5-18. Zusätzlicher Kontakt der BSA-Lösung mit Luftblasen (BSA_L) führte zu keiner Veränderung des Trübungsverlaufs im Vergleich zur Lösung mit Silikonschlauchkontakt (BSA). Bei Erhöhung der standardisierten Proteinkonzentration von 0,67 mg/mL (BSA) auf 20 mg/mL (BSA_20mg/mL) lagen die Trübungswerte im Mittel um 6 FTU höher.

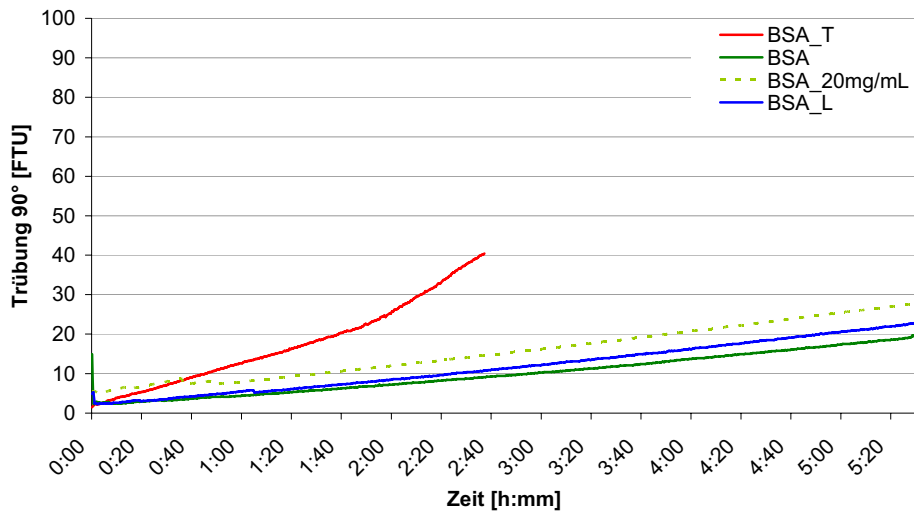


Abbildung 5-18: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der BSA- Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; Linien entsprechen Konzentration 0,67 mg/mL; gestrichelte Linie entspricht Konzentration 20 mg/mL

Die Offline ermittelten Trübungswerte sind ebenfalls deutlich geringer, als die Trübungsergebnisse der Antikörperlösungen (Abbildung 5-19).

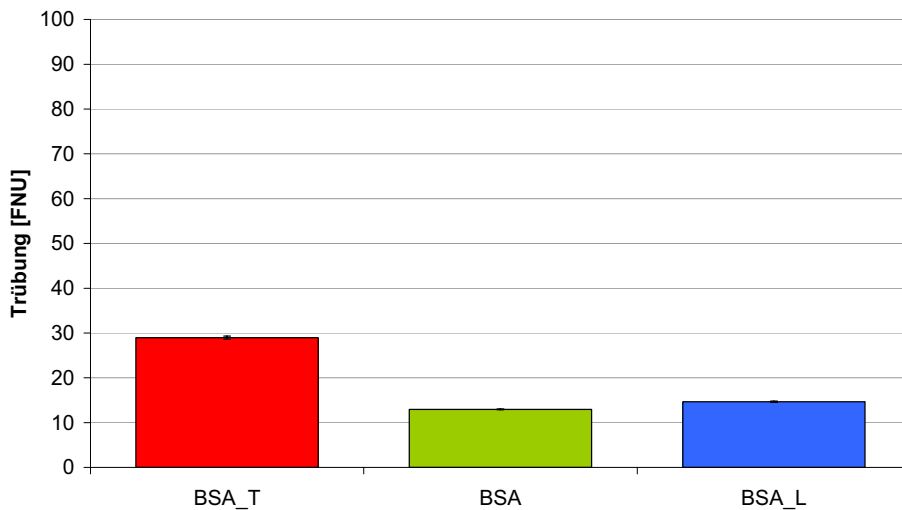


Abbildung 5-19: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der BSA-Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Die häufigste Partikelanzahl lag bei einem Durchmesser von 3 µm (Abbildung 5-20). Bei Versuchsende enthielten die BSA-haltigen Proben ca. 23.000 bis 26.000 Partikel/mL, was einer ca. 350fachen Partikelanzahl gegenüber der Ausgangslösung entspricht.

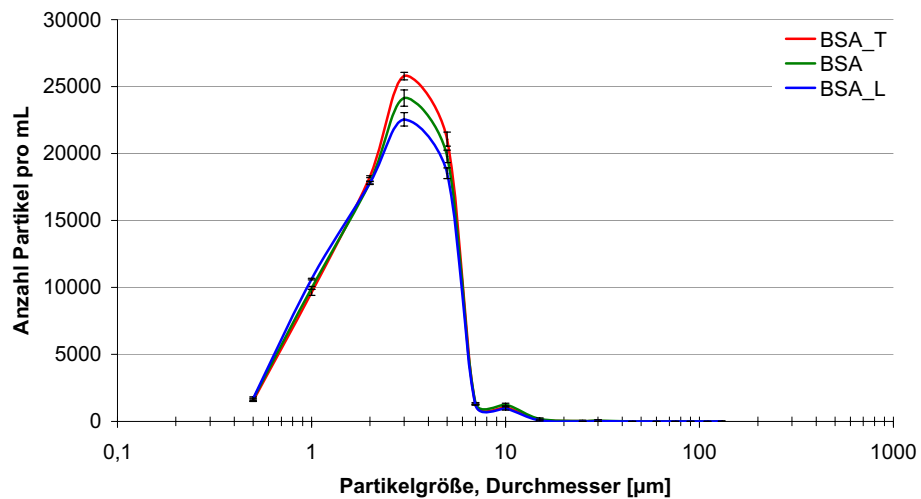


Abbildung 5-20: Ergebnisse Partikelbestimmung der BSA-Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell
Der Anteil unlöslicher Aggregate war mit max. 1,4 % sehr gering (Abbildung 5-21).

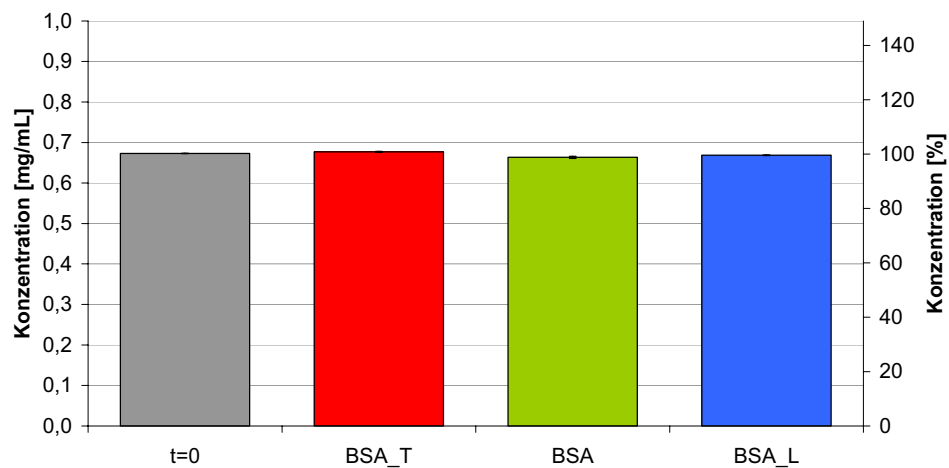


Abbildung 5-21: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der BSA-Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell
Mit einer Abnahme des Monomergehaltes um 11 % lag die BSA-Lösung der erwärmten Probe (BSA_T) am Höchsten (Abbildung 5-22). Der Monomergehalt nahm jedoch auch bei Raumtemperatur nach Kontakt mit Silikonschläuchen (BSA) um 2 % und bei zusätzlichem Kontakt mit Luftblasen (BSA_L) um 4 % ab.

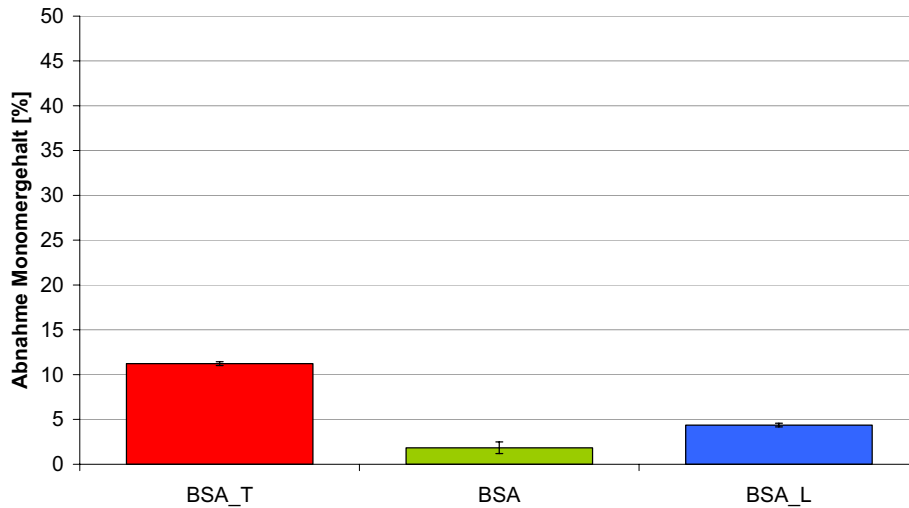


Abbildung 5-22: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt der BSA-Lösungen bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

Der hydrodynamische Durchmesser der Ausgangslösungen betrug im Mittel 9 nm (Abbildung 5-23). Für das Monomer des BSA-Moleküls in der Lösung wurde jedoch ein kleinerer Durchmesser erwartet. Der Polydispersitätsindex der Ausgangslösungen von größer 0,2 deutet auf das Vorhandensein mehrerer Maxima hin, z.B. Monomere und Dimere. Dimere wurden auch bei der Analyse mittels HP-SEC in den Ausgangslösungen nachgewiesen. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Lösungen am Versuchsende sind mit ca. 400 bis 550 nm vergleichbar.

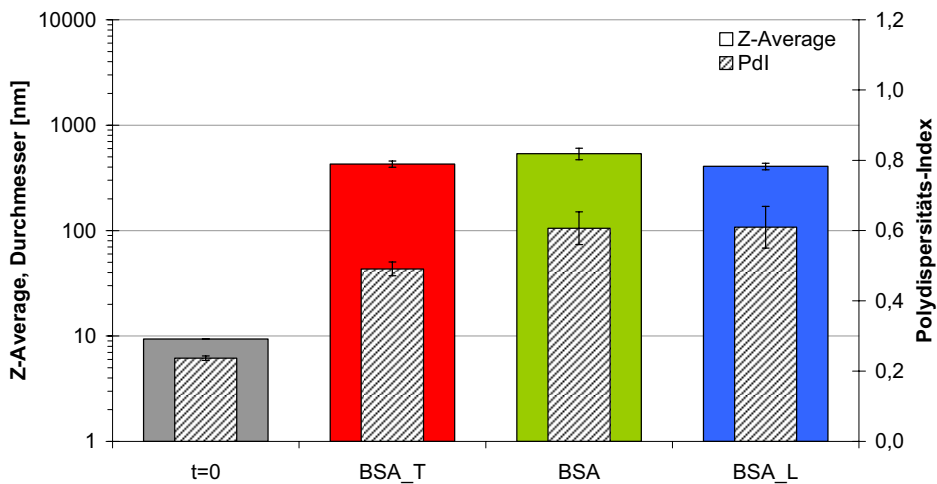


Abbildung 5-23: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der BSA-Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

5.2.3.5 IFN-1

Der stärkste Trübungsanstieg aller untersuchten Proteinlösungen wurde bei Kontakt mit Luftblasen (IFN-1_L) an der IFN-1 Lösung ermittelt (Abbildung 5-24). Die Trübungszunahme war etwas geringer als bei dem Versuch in dem die Untersuchungslösung (IFN-1_T) erwärmt wurde.

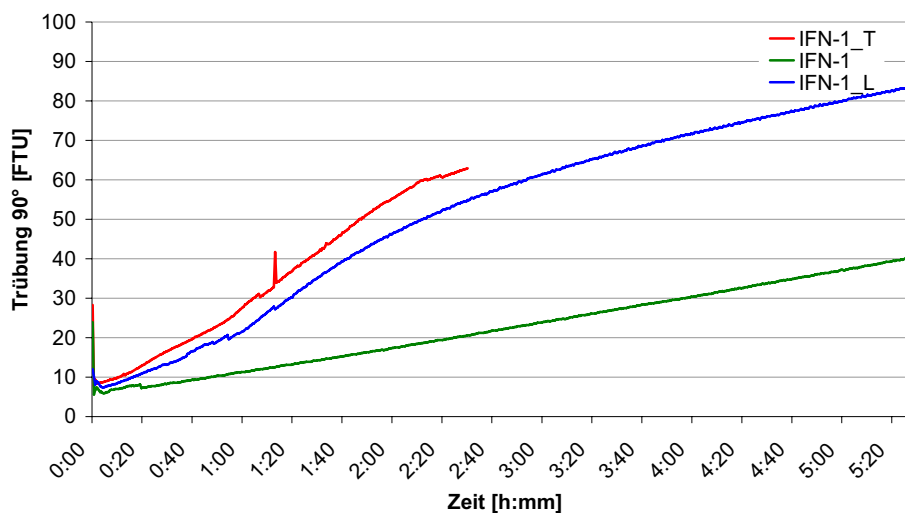


Abbildung 5-24: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der IFN-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Die mit Hilfe der Offline-Messung ermittelten Trübungswerte am Ende der Versuche (Abbildung 5-25) ergaben bei der erwärmten Probe (IFN-1_T) geringere Werte als bei der Lösung mit Luftblasenkontakt (IFN-1_L). Dies ist auf die kürzere Dauer des Versuchs mit Erwärmung zurückzuführen. D.h. bei gleicher Versuchsdauer ist zu erwarten, dass die erwärmte Probe eine leicht höhere Trübung aufweist, als die Lösung mit Kontakt zu Luftblasen.

Die Trübungswerte der Ausgangslösungen lagen bei allen untersuchten Proben im Bereich von 4 bis 7 FNU.

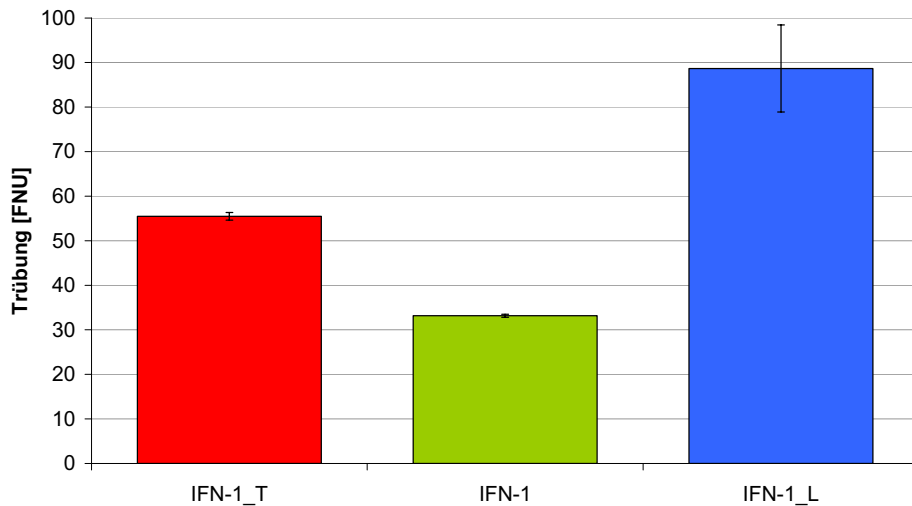


Abbildung 5-25: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der IFN-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Analog zu den Ergebnissen mit BSA-Lösungen lag die häufigste Partikelanzahl bei einem Durchmesser von 3 μm , die Partikelanzahl betrug ca. 22.000 bis 27.500 Partikel/mL (Abbildung 5-26).

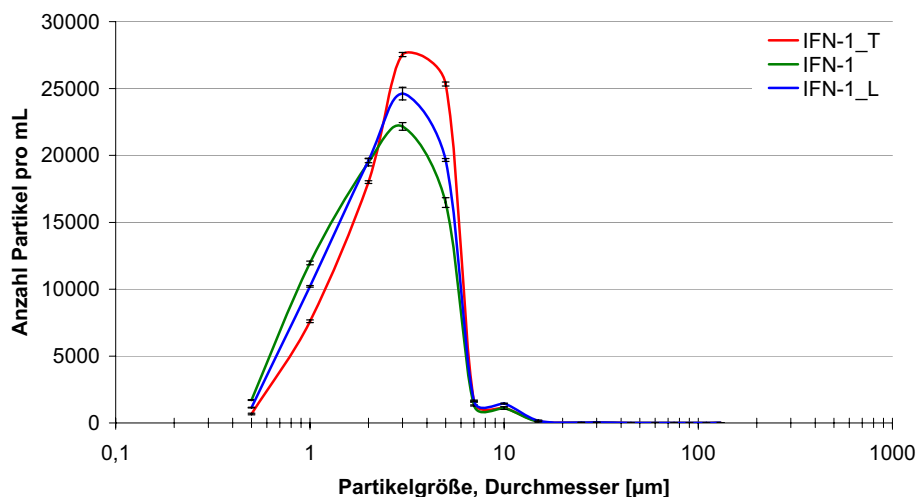


Abbildung 5-26: Ergebnisse Partikelbestimmung der IFN-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Die Messung unlöslicher Aggregate mit Hilfe der UV/VIS Spektrometrie wurde nicht durchgeführt, da die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten von Humanalbumin und Interferon nicht hätten ausgewertet werden können.

Aufgrund der Überlagerung von Peaks war eine Auswertung der HP-SEC Daten nicht möglich.

Die PCS Analyse (Abbildung 5-27) ergab, dass die Ausgangslösungen, wie erwartet, nicht als monomodale Verteilung vorlagen (PdI 0,4). Dies ist auf das Vorhandensein von Interferon und Humanalbumin und evtl. der Kombination von beiden Molekülen

zurückzuführen. Der hydrodynamische Durchmesser der Lösung mit Luftblasenkontakt (IFN-L) war mit ca. 1.000 nm deutlich höher als die Werte der beiden weiteren Versuche mit IFN-1 (IFN-1_T, IFN-1).

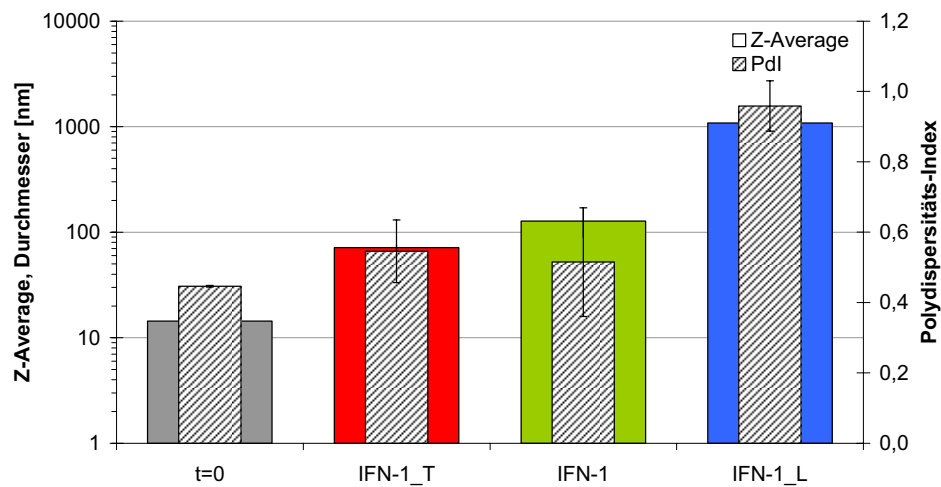


Abbildung 5-27: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und Pdl (schraffierte Säulen) der IFN-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

5.2.3.6 IFN-2

Die Trübung der IFN-2 Lösung blieb über die gesamte Versuchsdauer nahezu unverändert (Abbildung 5-28). Die erwärmte Probe (IFN-2_T) nahm von 0,8 auf max. 2,7 FTU zu.

Offline wurde eine Trübung von max. 1 FNU ermittelt.

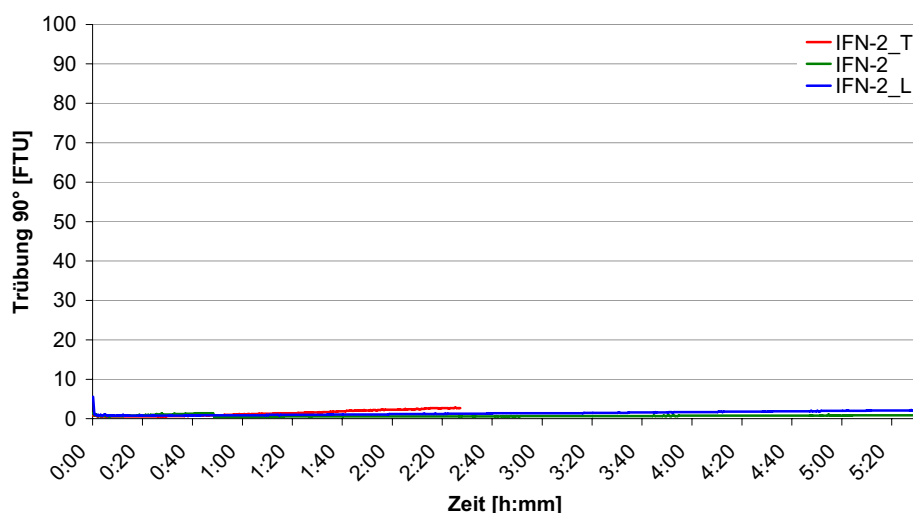


Abbildung 5-28: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der IFN-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

Die weiteren Ergebnisse der Versuche mit IFN-2 Lösungen sind im Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-15 bis Abbildung 7-17, dargestellt.

5.2.3.7 Vergleich aller Lösungen

Die Ergebnisse der Trübungsmessung aller untersuchten Lösungen mit und ohne Kontakt zu Luftblasen sind in Abbildung 5-29 dargestellt. Die Ergebnisse der AK-2 und AK-3 Lösungen mit Luftkontakt sind aufgrund der Sedimentationseffekte nicht abgebildet. IFN-1 Lösung mit Luftkontakt (IFN-1_L) wies die höchsten Trübungswerte auf, danach folgten die Antikörperlösungen. Der Trübungswert der polysorbathaltigen AK-3 Lösung (AK-3_L_Tween) war vergleichbar mit den Ergebnissen für die BSA-Lösungen (BSA_L). Bei den IFN-2 Lösungen wurde nahezu keine Veränderung der Trübung über die Versuchsdauer ermittelt.

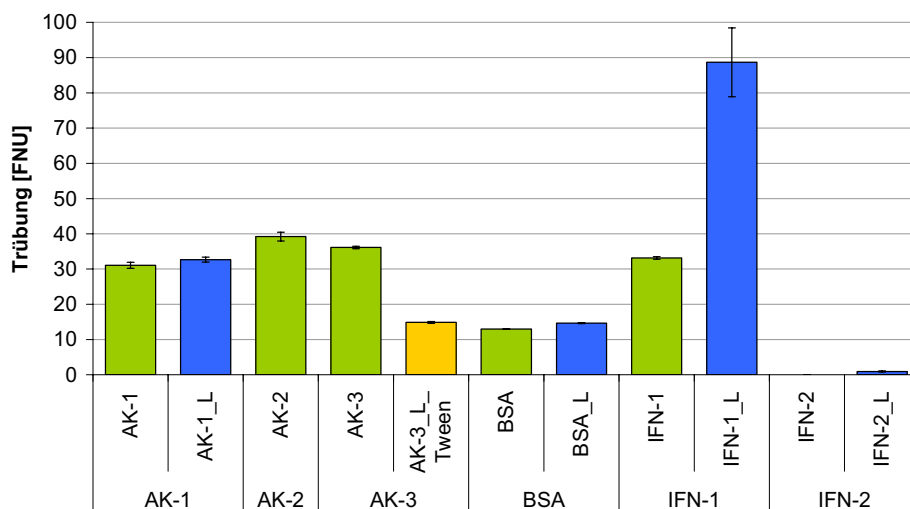


Abbildung 5-29: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung aller Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell. Der Vergleich der Abnahme des Monomergehalts aller Lösungen mit und ohne Kontakt zu Luftblasen ist in Abbildung 5-30 dargestellt. Eine Auswertung der Daten der IFN-1 Lösungen konnte nicht durchgeführt werden und ist in der Abbildung unten nicht enthalten. Die AK-3 Lösungen wiesen den größten Verlust an Monomeren auf. BSA- und IFN-2 Lösungen zeigten sich am Stabilsten.

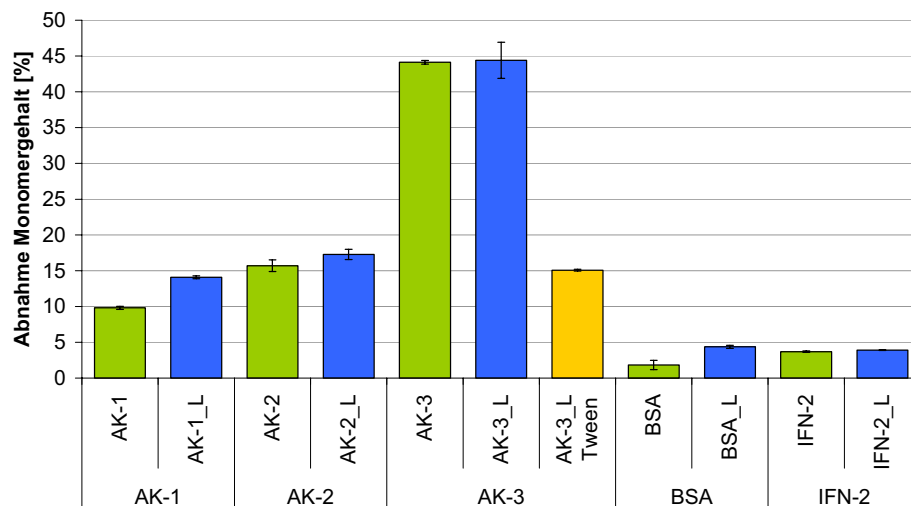


Abbildung 5-30: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt aller Lösungen (ohne IFN-1) bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

5.2.4 Diskussion

Die Antikörperlösungen mit Kontakt zu Silikonschlauch und Luftblasen zeigten eine höhere Trübungszunahme und größere Abnahme des Monomergehalts als die BSA- und IFN-2 Lösungen. Die größeren Moleküle falteten sich bevorzugt auf. Allerdings ist nur aufgrund der Molekülgröße keine Aussage auf die Stabilität gegenüber hydrophoben Grenzflächen möglich. Die IFN-1 Lösung erreichte trotz der geringen Molekülgröße die höchsten Trübungswerte aller untersuchten Lösungen nach Luftkontakt. Eine starke Trübungserhöhung durch das in der IFN-1 Lösung enthaltene Albumin erscheint unwahrscheinlich, da bei den BSA-Lösungen über die Versuchsdauer geringere Trübungswerte erzielt wurden.

Es wurde an allen Lösungen Zersetzung durch Kontakt mit Silikonschläuchen ermittelt. Teilweise wurde durch den zusätzlichen Kontakt mit Luftblasen weitere Aggregation induziert. Eine Erklärung hierfür könnte die Anordnung der lipophilen Regionen des Proteins zur Luftblase hin sein. Hierbei könnte bereits eine teilweise Auffaltung der Struktur stattfinden. Nach Zerstörung der Luftblasen oder durch das Bewegen der Lösung können sich Aggregate durch Zusammentreffen von weiteren aufgefalteten Molekülen bilden.

Die Offline gemessenen Trübungswerte am Ende der Versuche waren teilweise niedriger als die Online ermittelten Werte. Störend bei der Online-Messung können Luftblasen gewesen sein. Bei der Offline-Messung wurden die Lösungen zuvor entgast, um Luftblasen aus der Lösung zu entfernen. Schnell sedimentierende oder flotierende Partikel werden bei der Offline-Messung ebenfalls nicht erfasst.

Die Konzentrationsbestimmungen wurden bei allen Lösungen, außer der AK-3 und BSA-Lösungen, durch kolloid disperse Teilchen gestört, die nicht vom Filter zurückgehalten wurden. Es wurde teilweise eine vermeintlich höhere Absorption durch die Streuung des Lichtes an den Teilchen ermittelt. Ein Abfall der Absorption ist im Bereich von 310 bis 400 nm der UV/VIS-Spektren zu erkennen, im Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-13 und Abbildung 7-14 am Beispiel der AK-2 Lösung dargestellt. Hierdurch ergibt sich bei der Berechnung der Konzentration durch das Signal bei 280 nm abzüglich des Streulichtanteils bei 320 nm eine scheinbar höhere Proteinkonzentration. Dies ist auf die Abhängigkeit der Lichtstreuintensität von der Wellenlänge zurückzuführen.

Eine Schädigung der Moleküle durch das Quetschen des Schlauches in der Peristaltikpumpe kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurde hier nur ein geringer Anteil der Moleküle geschert im Vergleich zur Anzahl der Moleküle mit Kontakt zu den Grenzflächen Silikonschlauch und Luftblasen. Aus den Ergebnissen des Scherstress-Modells sollte die Scherung einzelner Moleküle bei nur 44 Volumenwechseln vernachlässigbar sein.

Der Zusatz von Polysorbat zeigte, am Beispiel der AK-3 Lösung, einen deutlich stabilisierenden Effekt. Bis zu einer Versuchsdauer von ca. zwei Stunden wurde keine Trübungszunahme ermittelt. Danach stieg die Trübung bis zum Versuchsende an. Evtl. wurde Polysorbat über die Versuchsdauer an den Grenzflächen adsorbiert und somit könnte die Anzahl der Polysorbat-Moleküle zu gering gewesen sein, um die hydrophoben Bereiche aller aufgefalteten Proteinmoleküle vor Aggregation zu schützen.

5.2.5 Fazit

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Versuche mit den Grenzflächen Silikonschlauch und Luft zusammengestellt. Die Daten wurden pro Prüfpunkt mit einer Punktzahl von 1 = höchste Degradation bis 13 = geringste Degradation bewertet. Der arithmetische Mittelwert über alle Methoden ergibt den „Durchschnitt Bewertung“.

Tabelle 18: Ergebnisse Untersuchungen zu Grenzflächen Silikonschlauch und Luft
Bewertung: 1 = höchste Degradation; 13 = geringste Degradation

Prüfpunkt Methode	Proteinlösungen						
	AK-1	AK-2	AK-3	AK-3 mit Poly- sorbit	BSA	IFN-1	IFN-2 (mit Poly- sorbit)
Ohne Luftdurchfluss, Raumtemperatur							
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	10	16	44	---	2	--- ⁷	4
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	535	> 1.000	> 1.000	---	537	128	87
Trübung Offline [FNU]	31	12	36	---	13	33	0
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektrometrie [%]	3	0	8	---	1	--- ⁷	0
Partikelzählung $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	> 60.000	> 60.000	> 60.000	---	> 60.000	> 60.000	2.051
Durchschnitt Bewertung	5,0	4,2	1,6	---	6,4	5,3	10,2
Gesamtbewertung	7	6	3	---	10	8	13
Mit Luftdurchfluss, Raumtemperatur							
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	14	17	44	15	4	--- ⁷	4
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	> 1.000	> 1.000	> 1.000	192	407	> 1.000	196
Trübung Offline [FNU]	33	39 ⁸	41 ⁸	15	15	89	1
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektrometrie [%]	0	0	13	11	0	--- ⁷	0
Partikelzählung $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	> 60.000	> 60.000	> 60.000	56.177	> 60.000	> 60.000	5.965
Durchschnitt Bewertung	3,4	2,8	1,0	7,0	6,0	1,0	9,2
Gesamtbewertung	5	4	1	11	9	1	12

⁷ Keine Auswertung möglich.

⁸ Nicht in Gesamtbewertung einbezogen aufgrund Sedimentation.

Die Sensitivität gegenüber hydrophoben Grenzflächen war bei den untersuchten Lösungen nicht eindeutig vom Molekulargewicht abhängig. Unterschiedliche Auswirkungen aufgrund der Stoffmengenkonzentration können bei den Versuchen ausgeschlossen werden, da alle Lösungen auf 0,01 mmol/L eingestellt waren.

Die Erhöhung der Proteinkonzentration der AK-3 Lösung von 1,53 auf 2 mg/mL führte zu keiner Veränderung des Trübungsverlaufs. Bei der AK-2 Lösung waren durch die Erhöhung der Konzentration von 1,47 auf 10 mg/mL die Sedimentations- bzw. Flotationseffekte verstärkt. Durch die Konzentrationserhöhung der BSA-Lösung von 0,67 auf 20 mg/mL stiegen die Trübungswerte im Mittel um 6 FTU an.

Die Reproduzierbarkeit der Versuche wurde am Beispiel der AK-3 Lösung mit Luftdurchfluss gezeigt. Bei den Offline ermittelten Trübungswerten war die Streuung zwischen den Versuchen aufgrund von Sedimentation und Flotation sehr hoch.

Die BSA- und IFN-2 Lösungen zeigten die geringsten Veränderungen bei Kontakt mit Luftblasen und mit Silikonschläuchen. Am Empfindlichsten gegenüber der Grenzfläche Luft reagierte die IFN-1 Lösung. Die AK-3 Lösungen wiesen von allen Lösungen die größte Abnahme im Monomergehalt auf. AK-2 und AK-3 Lösungen zeigten bei der makroskopischen Beurteilung durch die Bildung von Fasern, bereits nach kurzem Kontakt mit Luftblasen, eine deutlich andere Partikelmorphologie als die Lösungen der anderen Versuche. Mikroskopische Aufnahmen sind im Anhang Kapitel 7.3, Abbildung 7-20 eingefügt.

Der Anteil der löslichen und unlöslichen Aggregate war abhängig von der Art des Proteins und dem Material der Kontaktfläche. Das Maximum der Häufigkeitsverteilung der Partikelanzahl, mit Hilfe der Lichtblockade ermittelt, lag nach Kontakt mit Silikonschlauch und Luftblasen bei den Antikörperlösungen bei einem Durchmesser von 5 μm , bei BSA- und IFN-1 Lösungen bei 3 μm und bei den IFN-2 Lösungen bei 1 μm .

Die Kontaktfläche der Proteinlösungen mit Silikonschläuchen und Luft muss im Produktionsprozess als kritisch bewertet werden. Nach einer Versuchsdauer von 30 Minuten, welche einer Schlauchlänge von ca. zehn Metern⁹ entspricht (vier Volumenwechsel bei einer Schlauchlänge von 2,6 m), ist bei bestimmten Proteinlösungen bereits ein deutlicher Anstieg der Trübungswerte messbar. Für die Summe der eingesetzten Schläuche im Produktionsmaßstab entsprechen zehn Meter einer typischen Länge.

5.2.6 Bewertung des Modells

Das Modell ist sehr gut geeignet zur Ermittlung der Sensitivität von Proteinlösungen gegenüber der Grenzfläche Silikonschlauch und Luft. Die Kontaktzeit der Lösungen mit den Grenzflächen kann über die Pumpendrehzahl, die Anzahl der Zyklen und den Durchfluss der Luft gesteuert werden. Durch die Online-Trübungsmessung ist eine direkte Erfassung der unlöslichen Aggregate über die Versuchsdauer möglich. Die Größe der im Produktionsmaßstab verwendeten Schlauchoberflächen können über die Anzahl der Zyklen simuliert werden.

Tabelle 19: Bewertung Peristaltikpumpen-Modell

Parameter	Eigenschaften Modell
Scherbeanspruchung	Gering
Anzahl Zyklen	Einstellbar (ein bis mehrere hundert Zyklen)
Versuchsdauer	Kurz (ein Tag)
Grenzflächeneffekte	
- Anteil Grenzfläche Glas	Mittel
- Anteil Grenzfläche Silikonschlauch	Hoch
- Anteil Grenzfläche Luft	Hoch
Einsatzgebiet	Ermittlung Sensitivität bzgl. Silikonschlauch und Luft
Limitation	Stark schäumende Lösungen; Kontaktzeit mit Luft kann gesteuert werden, Luftblasengröße nur eingeschränkt (u.a. von Oberflächenspannung abhängig)
Übertragbarkeit Produktionsmaßstab	Ja, Größe der Grenzfläche kann simuliert werden

⁹ Berechnung siehe Anhang, Kapitel 7.2.3.1.

5.3 Schüttler-Modell

Der quantitative Einfluss hydrophober Grenzflächen auf die Qualität von Proteinlösungen wurde mit Hilfe des Schüttler-Modells ermittelt. Zur Simulation der hydrophoben Grenzfläche wurden PTFE-Kugeln eingesetzt. Am Beispiel der AK-3 Lösung wurde die Auswirkung von unterschiedlich großen PTFE-Flächen und der Grenzfläche Luft über vier Wochen bei Raumtemperatur ermittelt.

5.3.1 Modellbeschreibung

Die Proteinlösung wurde auf einem Horizontalschüttler bis zu vier Wochen in Glasvials bei Raumtemperatur geschüttelt, Abbildung 5-31. Um den Einfluss verschieden großer PTFE-Kontaktflächen mit der Proteinlösung zu simulieren, wurde eine unterschiedliche Anzahl von Kugeln in die Vials gegeben.



Abbildung 5-31: Fotos der Vials mit PTFE-Kugeln im Schüttler

In den Experimenten wurden 6 bzw. 60 Kugeln verwendet. Als Vergleich wurde Proteinlösung in Vials ohne Kugeln gegeben. Als Referenz dienten geschüttelte Pufferlösung und ruhende Vials mit AK-3 Lösung ohne Kugeln, Tabelle 20.

Tabelle 20: Übersicht Versuche Schüttler-Modell

Anzahl Kugeln	Ruhend			Geschüttelt		
	0	6	60	0	6	60
Puffer	---	---	---	X	---	---
AK-3 Lösung	X	---	---	X	X	X

Die Oberfläche von 6 Kugeln mit dem Durchmesser 4 mm beträgt 302 mm². Diese Oberfläche entspricht der lösungsberührenden Oberfläche eines Gummistopfens, Berechnungen siehe Anhang, Kapitel 7.2.4. Zur Untersuchung der Degradation unter extremen Bedingungen wurde eine 10fach größere Oberfläche (3.016 mm²) verwendet, welche durch 60 Kugeln simuliert wurde.

Je 20 mL Proteinlösung wurden in 100 mL Glasvials pipetiert und die entsprechende Anzahl Kugeln hinzugegeben. Die Behälter wurden mit Gummistopfen verschlossen und diese mit Aluminiumkappen fixiert. Um eine Verkeimung über die Versuchsdauer zu verhindern, wurden sterilisierte Materialien eingesetzt und die Befüllung der Vials unter keimarmen Bedingungen durchgeführt. Die verschlossenen Vials wurden mit 300 U/min bei Raumtemperatur horizontal geschüttelt. Nach 0, 1, 3, 7, 17 und 27 bzw. 28 Tagen wurden die Lösungen analysiert.

5.3.2 Kenngrößen

Proteinlösungen können mit PTFE z.B. bei Verwendung von PTFE-beschichteten Gummistopfen im Endbehältnis in Kontakt kommen. Die für die Lösung zugängliche Oberfläche des Stopfens entspricht ca. 300 mm². Berechnet wurde dies am Beispiel des Stopfens der Firma West, Typ S10-F451 RS D777-1, siehe Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-19.

Das Verdrängungsvolumen einer Kugel entspricht 0,03 mL. Dies bedeutet bei einem Füllvolumen von 20 mL eine Erhöhung des Volumens (Proteinlösung + Kugeln) im Vial um 1 % bei 6 bzw. 10 % bei 60 Kugeln.

Die mit Proteinlösung benetzte Glasoberfläche der Vials im ruhenden Zustand erhöhte sich durch die Zugabe von 6 Kugeln unwesentlich (0,4 %). Nach Zugabe von 60 Kugeln wurde 5 % mehr Glasoberfläche in den ruhenden Vials durch die Lösung berührt.

5.3.3 Ergebnisse

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der geschüttelten Lösungen zusammengestellt.

Tabelle 21: Makroskopische Beurteilung der geschüttelten Lösungen über die Versuchsdauer

Anzahl Kugeln	Farbe, Aussehen	Faserartige Partikel	Kugelförmige Partikel	Schaum	Niederschlag Vialrand
0	Milchig	Keine	Keine	Ja	Leicht
6	Klar	Keine	Einzelne	Nein	Stark, lässt sich nur z.T. in Lösung bringen
60	Milchig	Keine	Mehrere	Nein	Stark, lässt sich nur z.T. in Lösung bringen

Die Lösungen der geschüttelten Vials ohne Kugeln zeigten über die gesamte Versuchsdauer Schaum am Flüssigkeitsspiegel. An den Lösungen der Vials mit Kugeln war kein Schaum vorhanden. In Abbildung 5-32 sind die Vials nach einem Tag Schütteln dargestellt.

Faserartige Partikel wurden bei keiner der Lösungen beobachtet. Dahingegen traten kugelförmige Partikel in Abhängigkeit der Kugelanzahl auf. Die Lösungen mit 6 Kugeln blieben über die gesamte Versuchsdauer klar.

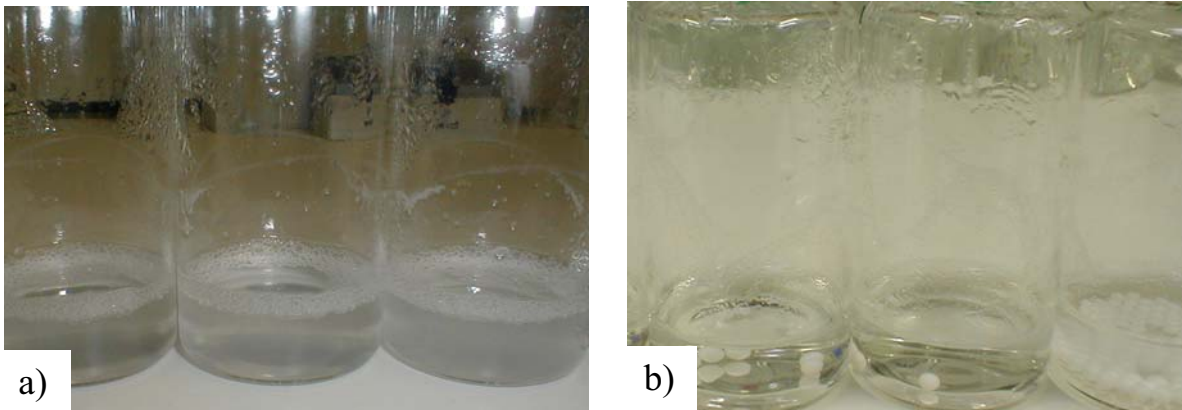


Abbildung 5-32: Fotos der Vials nach einem Tag Schütteln; a) Vials ohne Kugeln; b) Vials mit 6 bzw. 60 Kugeln

Pro Ziehungszeitpunkt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Messergebnisse aus je zwei Vials berechnet.

Mit Hilfe der Trübungsmessung ließen sich keine relevanten Veränderungen der geschüttelten Pufferlösungen und der ruhenden AK-3 Lösung über die Versuchsdauer ermitteln. Die Trübung stieg von einem Ausgangswert von 1 auf max. 2 FNU an. Die Trübung der Lösungen mit 60 Kugeln nahm am Stärksten zu, auf Werte bis zu ca. 1.300 FNU nach 27 Tagen Schütteln. Bei den geschüttelten Lösungen ohne Kugeln lag die Trübung unerwartet, um ca. 400 FNU, höher als bei den Lösungen die 6 Kugeln enthielten (Abbildung 5-33).

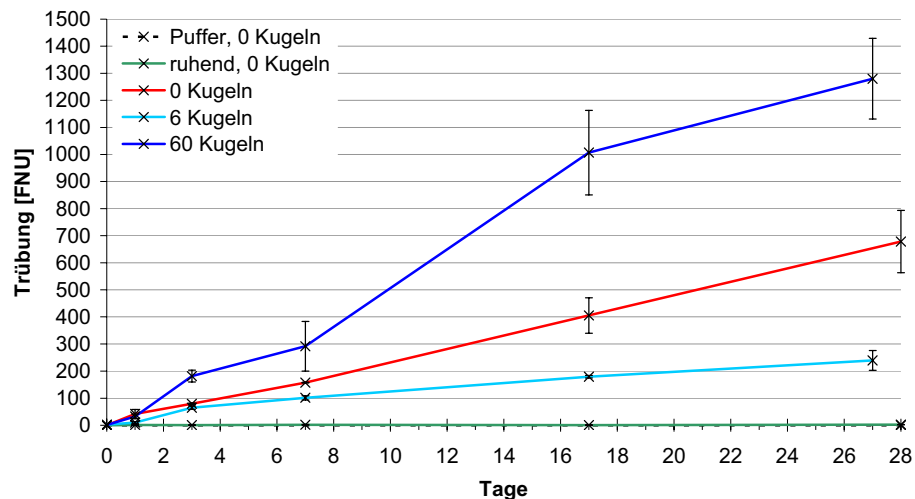


Abbildung 5-33: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell

In der Partikelanzahl mit $\geq 0,5$ und mit ≥ 10 μm Durchmesser wiesen ebenfalls die Lösungen mit 60 Kugeln die höchsten Werte auf (Abbildung 5-34, Abbildung 5-35). Bei den Lösungen der geschüttelten Vials mit 60 Kugeln und ohne Kugeln fand die stärkste Partikelgenerierung unabhängig von der Größe (0,5 bis 130 μm Durchmesser) innerhalb des ersten Tages statt.

Im geschüttelten Puffer wurde keine Veränderung der Partikelanzahl ermittelt.

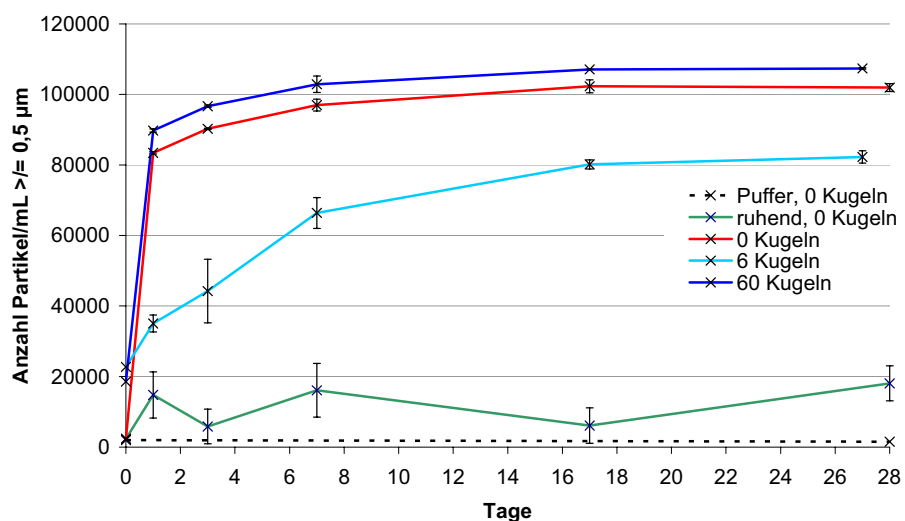


Abbildung 5-34: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, Partikelanzahl $\geq 0,5 \mu\text{m}$

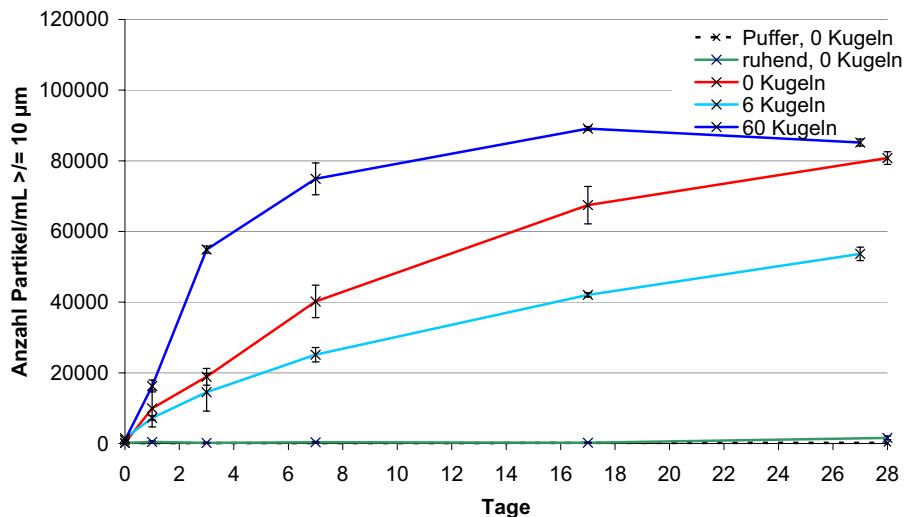


Abbildung 5-35: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, Partikelanzahl $\geq 10 \mu\text{m}$

Die Anzahl der Partikel mit einem Durchmesser von $\geq 25 \mu\text{m}$, der geschüttelten Lösungen ohne Kugeln und mit 6 Kugeln, stieg über die Versuchsdauer kontinuierlich an (Abbildung 5-36). Mit 60 Kugeln wurde mit Durchmessern von 25 bis $130 \mu\text{m}$ nach 27 Tagen eine geringere Partikelanzahl als nach 17 Tagen bestimmt.

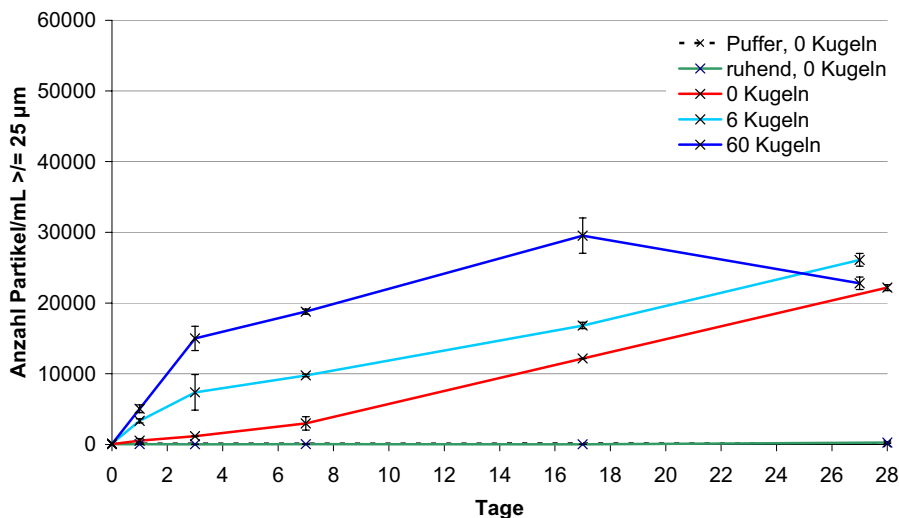


Abbildung 5-36: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, Partikelanzahl $\geq 25 \mu\text{m}$

Durch die dreidimensionale Darstellung der Partikelgrößenverteilung zu den Versuchen mit 0 und 60 Kugeln (Abbildung 5-37, Abbildung 5-39) wird ersichtlich, dass sich das Maximum der Häufigkeitsverteilung über die Versuchsdauer von einem Durchmesser von 5 auf $10 \mu\text{m}$ verschiebt. Bei den Versuchen mit 6 Kugeln (Abbildung 5-38) nahm hingegen die Partikelanzahl über die Versuchsdauer bei den Durchmessern von 5, 10 und $30 \mu\text{m}$ zu.

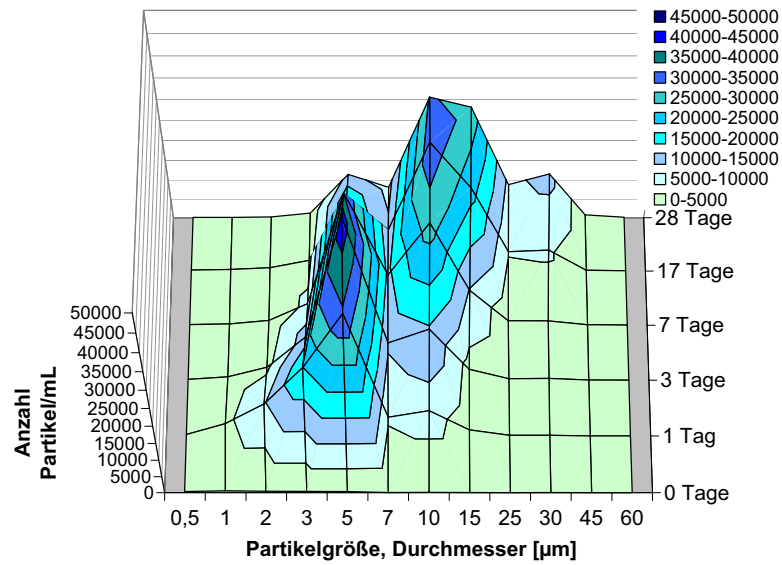


Abbildung 5-37: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, 3D-Darstellung der Versuche mit 0 Kugeln

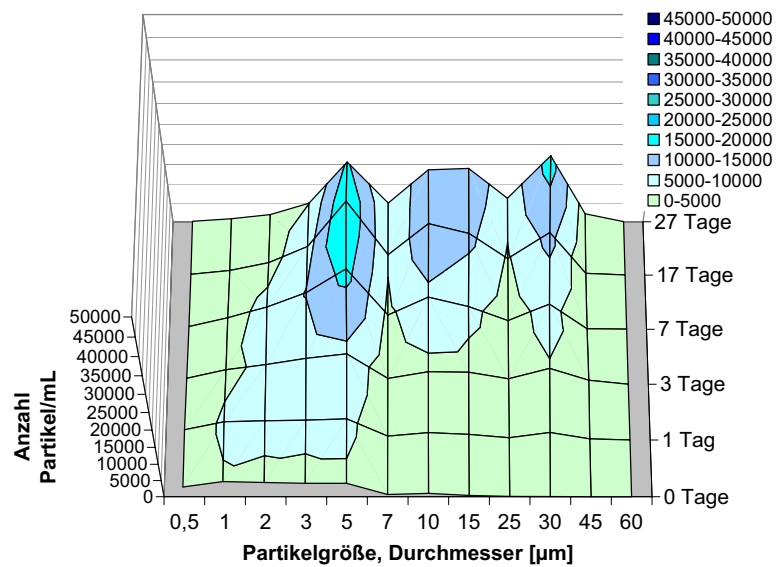


Abbildung 5-38: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, 3D-Darstellung der Versuche mit 6 Kugeln

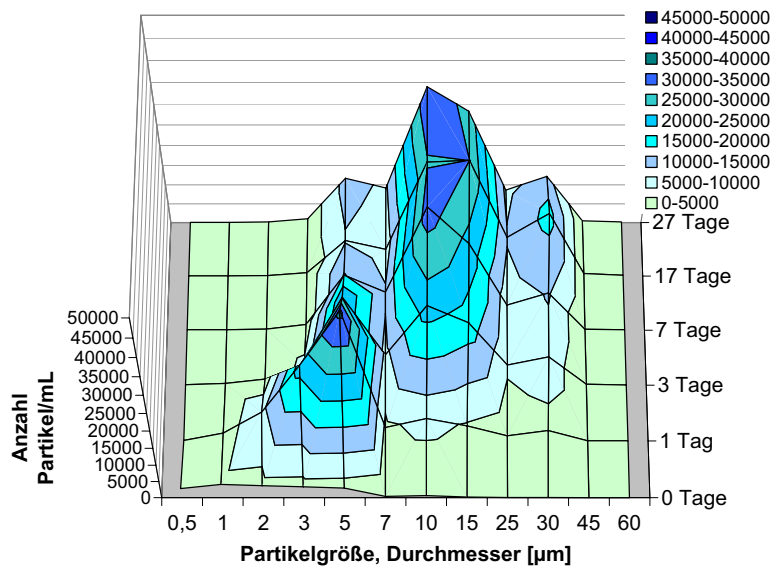


Abbildung 5-39: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell, 3D-Darstellung der Versuche mit 60 Kugeln

Die Proteinkonzentrationen der filtrierten Lösungen, der ruhend und ohne Kugeln gelagerten Vials, blieb über die Versuchsdauer konstant bei 1,5 mg/mL (Abbildung 5-40). Die geschüttelten Proben wiesen eine starke Abnahme der Konzentration über die Versuchsdauer auf. Der Anteil unlöslicher Aggregate der Lösung, die mit 60 Kugeln geschüttelt wurde, betrug am Versuchsende 98 %. D.h. es wurden nahezu alle Proteinmoleküle in unlösliche Aggregate durch Schütteln über 27 Tage mit PTFE-Kugeln überführt. An der geschüttelten Lösung ohne Kugeln wurde am Versuchsende 82 % unlösliche Aggregate ermittelt. Diese Lösung zeigte, analog den Ergebnissen der Trübungsmessung, stärkere Aggregation als die geschüttelte Lösung mit 6 Kugeln.

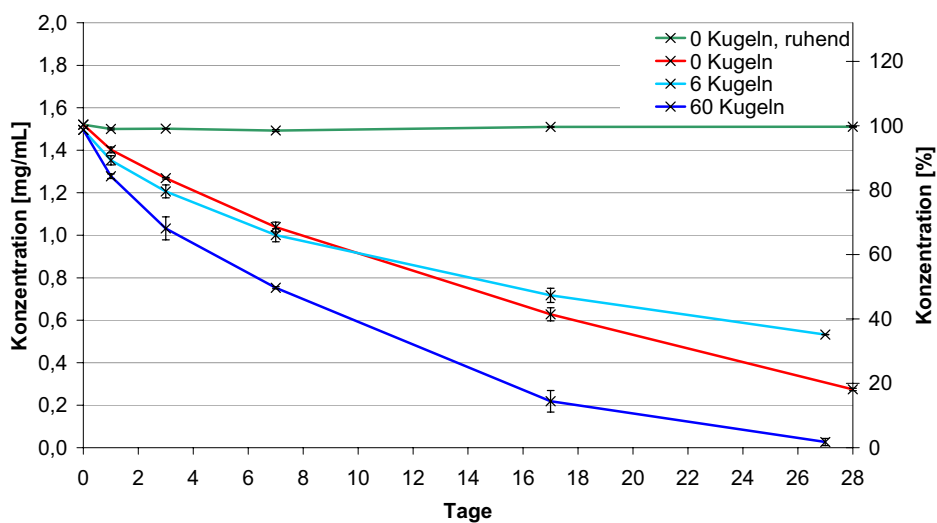


Abbildung 5-40: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell

Es wurden keine wesentlichen Anteile an löslichen Aggregaten und Fragmenten ermittelt (Abbildung 5-41). Der Monomergehalt betrug bei allen Proben 96 bis 100 %. In der Lösung mit 60 Kugeln konnten nach 27 Tagen Schütteln keine Monomere mehr nachgewiesen werden. Dies ist auf die geringe Proteinkonzentration von weniger als 0,05 mg/mL der Lösung nach Filtration zurückzuführen.

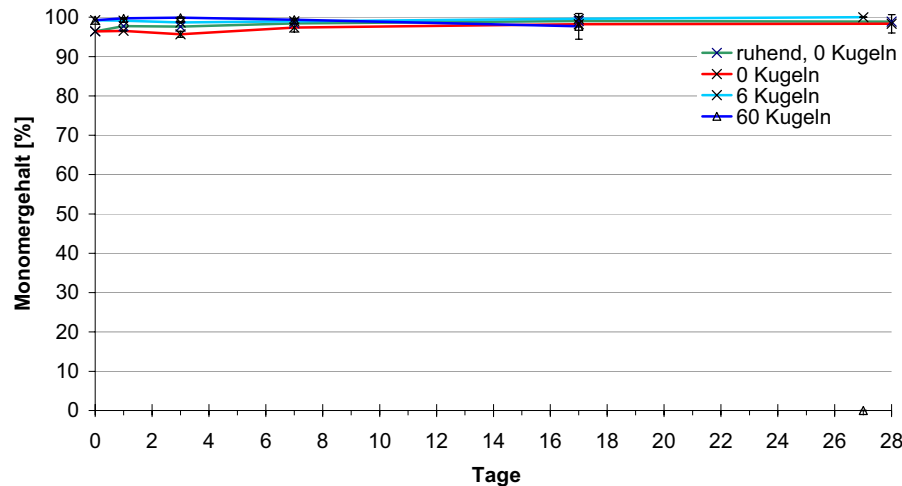


Abbildung 5-41: Ergebnisse Monomergehalt der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell

Der Mittelwert der hydrodynamischen Durchmesser der geschüttelten Lösungen mit 60 Kugeln und ohne Kugeln, nahm vergleichbar mit der Partikelanzahl $\geq 0,5 \mu\text{m}$ innerhalb des ersten Tages am Stärksten zu (Abbildung 5-42). Der mittlere Durchmesser der ruhenden Lösungen blieb über die Versuchsdauer unverändert bei 11 nm.

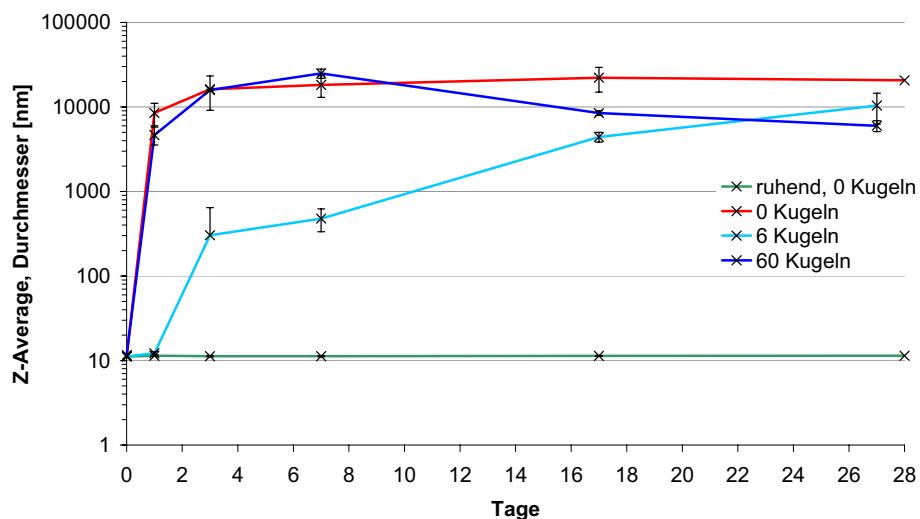


Abbildung 5-42: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser (Z-Average) der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell

Der Polydispersitätsindex ist in Tabelle 22 dargestellt. Die Polydispersität nahm über die Versuchsdauer bei allen Lösungen zu.

Tabelle 22: Ergebnisse Bestimmung des Polydispersitätsindex der AK-3 Lösungen, Schüttler-Modell

Tage	0	1	3	7	17	27	28
ruhend, 0 Kugeln	0,026	0,079	0,060	0,050	0,062	---	0,081
0 Kugeln	0,026	0,577	0,819	0,524	0,248	---	0,272
6 Kugeln	0,074	0,154	0,385	0,532	0,900	0,942	---
60 Kugeln	0,140	0,972	0,755	0,503	0,309	0,272	---

5.3.4 Diskussion

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen im Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-20 ergänzen die oben beschriebenen Ergebnisse mit Informationen zur Partikelmorphologie. Die geschüttelten Lösungen ohne Kugeln wiesen längliche, faserartige, transparente Partikel auf. Während die mit Kugeln geschüttelten Lösungen kugelförmige, kompakte Partikel enthielten. Die Entstehung der kompakten Partikel könnte durch die Bewegung der Kugeln in der Lösung verursacht worden sein. Durch die Kugeln hat sich die Bewegung der Fasern in der Lösung erhöht und somit war die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von mehreren Fasern gesteigert. Treffen mehrere Fasern aufeinander, könnten sie sich zu einer kompakteren Form zusammenlagern. Zudem könnten Fasern durch das Zusammentreffen mit Kugeln zerkleinert worden sein und sich zu kugelförmigen Partikeln anordnen.

In den Lösungen der Vials ohne Kugeln war durch den hohen Anteil unlöslicher Aggregate (Trübung, Gesamtpartikelanzahl, Proteinkonzentration) eine stärkere Schädigung nachweisbar, als in den Lösungen mit 6 Kugeln. Als Ursache kann die Entwicklung von Schaum über die gesamte Versuchsdauer in den Lösungen ohne Kugeln diskutiert werden. Die Schaumhöhe betrug ca. 0,5 cm, Abbildung 5-32. Durch den Schaum war die Grenzfläche der Moleküle gegenüber Luft rechnerisch erhöht¹⁰ und damit deutlich größer als die Grenzfläche von 6 PTFE-Kugeln (302 mm²).

¹⁰ Vialinnenradius = 22,3 mm. Oberfläche zur Luft entspricht 1.562 mm² ($A = \pi \times (22,3 \text{ mm})^2$). Da mehrere Schaumblasen übereinander lagen, kann von einer Grenzfläche größer als 1.562 mm² ausgegangen werden.

In den Vials mit Kugeln wurde über die gesamte Versuchsdauer kein Schaum beobachtet. Die Entstehung und Stabilisierung von Schaum lässt sich durch die amphiphilen Eigenschaften der Proteinmoleküle erklären. Es ist denkbar, dass die in den Versuchen mit Kugeln aufgefalteten Proteinmoleküle einen geringeren Bereich an der Grenzfläche zu Luft, durch ihre kompaktere Form, eingenommen haben. Diese These wird durch die erwähnten mikroskopischen Untersuchungen unterstützt. Unter anderem könnten aufgefaltete Moleküle bevorzugt in die Grenzfläche zwischen Lösung und PTFE-Kugeln streben, wodurch weniger Moleküle an der Oberfläche zur Schaumbildung zur Verfügung stehen.

Aufgrund des Verlaufs der Partikelgrößenverteilungen über die Versuchsdauer (Abbildung 5-37 bis Abbildung 5-39) ergibt sich die Folgerung, dass das Maximum der Häufigkeitsverteilung über die Versuchsdauer von 5 auf 10 μm Durchmesser zunimmt.

Eine Ursache für die Abnahme der Partikelanzahl mit den Durchmessern $\geq 25 \mu\text{m}$ nach 27 Tagen der Lösung mit 60 Kugeln könnte die Entstehung von Partikeln außerhalb des maximalen Messbereiches von 130 μm gewesen sein. Es können nach 17 Tagen Versuchsdauer vermehrt Partikel durch Zusammenlagerung größer 130 μm Durchmesser entstanden sein, die nicht mehr detektiert wurden und somit eine vermeintliche Abnahme der Partikel nach 27 Tagen gemessen wurde.

5.3.5 Fazit

In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Grenzflächen PTFE und Luft zusammengestellt. Die Daten wurden pro Prüfpunkt mit einer Punktzahl von 1 = höchste Degradation bis 4 = geringste Degradation bewertet. Der arithmetische Mittelwert über alle Methoden ergibt den „Durchschnitt Bewertung“.

Tabelle 23: Ergebnisse Untersuchungen zu Grenzflächen PTFE und Luft
Bewertung: 1 = höchste Degradation; 4 = geringste Degradation

Prüfpunkt Methode	Ohne Kugeln		Anzahl Kugeln	
	ruhend	geschüttelt	6 geschüttelt	60 geschüttelt
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	1	2	0	--- ¹¹
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	11	> 1.000	> 1.000	> 1.000
Trübung Offline [FNU]	2,1	679	240	1.280
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektrometrie [%]	0	82	65	98
Partikelzählung $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	18.063	> 60.000	> 60.000	> 60.000
Durchschnitt Bewertung	3,6	1,4	2,2	1,0
Gesamtbewertung	4	2	3	1

Die stärkste Schädigung der Proteinlösung fand beim Schütteln mit 60 PTFE-Kugeln und mit Luft statt. Es entstanden nahezu keine löslichen Aggregate. Die PCS Analyse ergab mittlere hydrodynamische Durchmesser im Bereich der grobdispersen Partikel. Der Zusatz von 60 PTFE-Kugeln in 20 mL Proteinlösung führten zur Denaturierung nahezu aller Moleküle über vier Wochen bei Raumtemperatur.

Die PTFE-Oberfläche von 6 Kugeln, die der produktberührenden Oberfläche eines Gummistopfens entspricht, führte zu keiner Verstärkung der Aggregation im Vergleich zur Aggregation an der Grenzfläche Luft.

Das Oberflächen- zu Volumenverhältnis von $1,5 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$, bei 60 Kugeln, wird als kritisch bewertet. Bereits nach einem Tag Schütteln bei Raumtemperatur fand eine deutliche Veränderung der Lösung statt (Partikelanzahl, Proteinkonzentration, Z-Average und PdI).

¹¹ Keine Auswertung möglich.

Das im Modell simulierte Verhältnis von PTFE-Oberfläche zum Lösungsvolumen entspricht z.B. der benetzten Oberfläche eines 100 mL Vials mit einem Füllvolumen von ca. 20 mL. D.h. falls Behälter aus PTFE oder Behältnisse aus PTFE-beschichteten Materialien zur Lagerung von Proteinlösungen eingesetzt werden, kann die Produktqualität durch die Grenzfläche negativ beeinflusst werden. Bei Verwendung von Magnetrührstäbchen mit PTFE-Überzug, wie häufig in Versuchen im Labormaßstab angewendet, kann ebenfalls eine Veränderung der Proteinlösung stattfinden¹².

Während der Herstellung von Endprodukten sollte bei empfindlichen Molekülen die Grenzfläche zu Luft so gering wie möglich gehalten werden. Die Entstehung von Schaum während des Prozessierens sollte unbedingt verhindert werden. Die eingesetzten Behälter sollten nach Möglichkeit einen hohen Befüllungsgrad aufweisen, dies sollte besonders bei Transporten Berücksichtigung finden bzw. wenn unvermeidbar im Rahmen von Validierungsstudien untersucht werden.

5.3.6 Bewertung des Modells

Das Modell eignet sich zur Ermittlung der Sensitivität von Proteinlösungen gegenüber den Grenzflächen zu PTFE und Luft in Kombination. Die Größe der zu simulierenden PTFE-Grenzfläche kann durch die Anzahl der Kugeln variiert werden.

Nicht beeinflusst werden kann hingegen die Kontaktfläche und -zeit der Proteinmoleküle zur Grenzfläche Luft. Durch unterschiedliches Schaumverhalten der Lösungen können diese stark variieren und somit zusätzliche Degradation hervorrufen. Allerdings ist auch die Entstehung von Schaum in der Lösung im Produktionsprozess und beim Transport im Bulk- oder Endbehältnis nicht ausgeschlossen. Die Kombination aus Grenz- und Oberflächeneffekten kann mit Hilfe des Schüttler-Modells sehr gut simuliert werden.

¹² Bei Einsatz eines Magnetrührstäbchens mit z.B. der Länge 3 cm und dem Radius 0,3 cm in 4 mL Lösung entspricht das Oberflächen- zum Volumenverhältnis $1,6 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$

$$\left(\frac{A}{V} = \frac{2 \times \pi \times r^2 + 2 \times \pi \times r \times l}{4 \text{ cm}^3} = \frac{6,22 \text{ cm}^2}{4 \text{ cm}^3} = 1,6 \text{ cm}^2 / \text{cm}^3 \right).$$

Tabelle 24: Bewertung Schüttler-Modell

Parameter	Eigenschaften Modell
Scherbeanspruchung	Mittel
Anzahl Zyklen	---
Versuchsdauer	Wählbar (ein Tag bis mehrere Wochen)
Grenzflächeneffekte	
- Anteil Grenzfläche Glas	Mittel
- Anteil Grenzfläche PTFE	Variierbar, gering bis hoch
- Anteil Grenzfläche Luft	Hoch
Einsatzgebiet	Ermittlung Sensitivität bzgl. der Kombination aus PTFE und Luft
Limitation	Schaumentstehung der Lösung; Kontaktfläche und -zeit mit Luft kann nicht gesteuert werden
Übertragbarkeit Produktionsmaßstab	Ja, Grenzfläche PTFE kann simuliert werden

5.4 Mischer-Modell

Das Mischer-Modell wurde entwickelt, um die Degradation von Proteinlösungen an den einzelnen Grenzflächen zu PTFE, Metall, Glas und silikonisiertem Glas unter Ausschluss von Luft zu ermitteln. Die Effekte des Vorlagebehälters aus Glas und der Einfluss von Luft wurden ebenfalls untersucht. Die Modellfunktionalität wurde am Beispiel der AK-3 Lösung belegt.

5.4.1 Modellbeschreibung

Die häufig im Produktionsprozess verwendeten Materialien wurden in Form von Kugeln der Proteinlösung beigefügt. Durch Zugabe einer definierten Anzahl von Kugeln zur Lösung wurde die Größe der Kontaktfläche vorgegeben. Als Behälter wurden 20 R Glasvials eingesetzt, die randvoll mit Untersuchungslösung befüllt wurden. Beim Verschließen der Vials wurde darauf geachtet, dass die Lösung möglichst luftblasenfrei war, um den Einfluss der Grenzfläche zu Luft auf ein Minimum zu reduzieren. Die verschlossenen Vials wurden in einem Turbula-Mischer bei niedrigster Einstellung (22 U/min) bis zu sieben Tagen bei Raumtemperatur bewegt, Abbildung 5-43. Nach den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 7 Tagen wurden die Lösungen von je zwei Vials analysiert. Pro Vial waren 150 Kugeln enthalten. Das Verhältnis von Kugeloberfläche zum Lösungsvolumen stellte mit $3,8 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ eine extreme Bedingung dar, Berechnungen siehe Anhang, Kapitel 7.2.5.

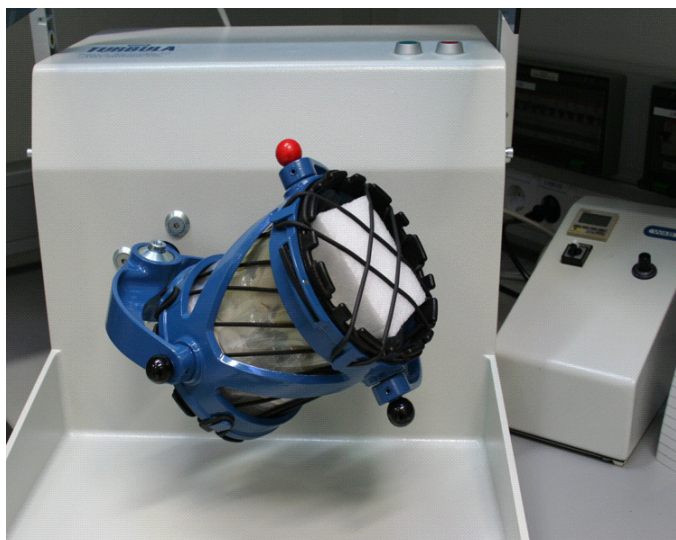


Abbildung 5-43: Foto Turbula-Mischer befüllt mit Vials

Nach Vorlage der Kugeln in den Vials wurden die Behälter randvoll (25 mL) mit AK-3 Lösung befüllt. Zum Entfernen teilweise anhaftender Luftblasen wurden die Lösungen unter Vakuum entgast. Nach dem Entgasen wurden mehrere Tropfen Proteinlösung in die Vials pipettiert bis eine konvexe Krümmung der Lösung am Flüssigkeitsspiegel erkennbar war. Zum Verschließen der Vials wurde ein Deckglas von der Seite aufgelegt. In Abbildung 5-44 sind befüllte Vials mit Deckglas, mit einzelnen vorhandenen Luftblasen, dargestellt.

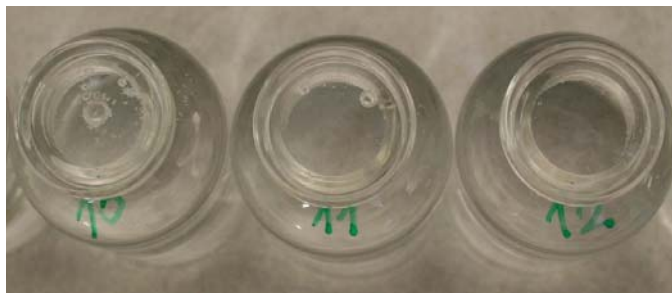


Abbildung 5-44: Foto befüllte Vials mit Deckglas, nahezu luftblasenfrei

Die Deckgläser wurden am Rand der Vials mit Folie (Paraffin-Wachs und Polyolefin) fixiert.

Um eine Verkeimung der Lösung über die Versuchsdauer zu vermeiden, wurden alle Materialien vor Verwendung sterilisiert. Die Proteinlösung wurde vor Abfüllung unter einer laminar-flow Einheit über einen Filter der Porenweite 0,2 μm filtriert.

Alle eingesetzten Kugeln hatten einen Durchmesser von 4 mm. Die Metallkugeln entsprechen der Edelstahl-Qualität AISI 316-L, V4A. Die Glaskugeln waren aus Borosilikatglas. Diese Materialien entsprechen der Qualität der produktberührenden Oberflächen im pharmazeutischen Herstellungsprozess.

Zur Silikonisierung der Glaskugeln wurde eine Silikonölemulsion, siehe Kapitel 7.1.2.1, verwendet. Die gewaschenen und sterilisierten Glaskugeln wurden mit der Emulsion benetzt und im Heißluftofen bei 260 °C für eine Stunde eingebrannt.

Die Vials ohne Kugeln, zur Untersuchung der reinen Grenzflächeneffekte zu Luft, wurden mit nur 20 mL Lösung befüllt.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Grenzflächen war die Lösung mit dem Glas der Vials und dem Deckglas in Berührung. Um deren Einfluss zu ermitteln wurden als Referenz Vials mit Lösung voll befüllt und ohne Kugeln untersucht.

Der Zusatz von je einer Metall- bzw. Glaskugel wurde gewählt, um den Austausch der Moleküle an der Grenzfläche im Glasvial gegenüber der Lösung ohne Kugeln zu erhöhen.

Das Material von Glas und Metall wurde hierfür ausgewählt, da angenommen wurde, dass an diesen Grenzflächen die geringste Proteinschädigung stattfindet. Bei den voll befüllten Vials ohne Kugeln ist davon auszugehen, dass der Austausch der Proteinmoleküle an der Grenzfläche aufgrund fehlender Strömung reduziert war. Die einzelnen Versuche sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Tabelle 25: Übersicht Versuche Mischer-Modell

Kontaktfläche der Lösung	Anzahl Kugeln
Glasvial, Deckglas (voll befüllt)	0
Luft (Volumen 5 mL) ¹³	0
PTFE ¹³	150
Metall ¹³	150
	1
Glas ¹³	150
	1
Glas silikonisiert ¹³	150

5.4.2 Kenngrößen

Die Oberfläche von 150 Kugeln mit dem Durchmesser 4 mm entspricht 75 cm², das Kugelvolumen betrug insgesamt 5 mL. Das verwendete 20 R Vial hat ein Randvollvolumen von 25 mL. Das Füllvolumen der Vials mit 150 Kugeln lag bei 20 mL. Das Verhältnis von Kugeloberflächen- zum Füllvolumen betrug 3,8 cm²/cm³. Berechnungen siehe Anhang, Kapitel 7.2.5.

5.4.3 Ergebnisse

Die Lösungen der voll befüllten Vials ohne Kugeln und der Vials mit Glaskugeln blieben über die gesamte Versuchsdauer klar und farblos (Abbildung 5-45). Durch die Grenzfläche der Lösungen zu Luft entstanden faserartige und kugelförmige Partikel, die sedimentierten oder flotierten. Die Lösungen, die mit silikonisiertem Glas und PTFE in Kontakt waren, zeigten eine milchige Trübung. Der Kontakt der Lösung mit Metallkugeln führte zu leicht gelblicher bis bräunlicher Färbung.

¹³ Zusätzliche Kontaktfläche zu Glasvial und Deckglas.

In allen Vials wurden einzelne Luftblasen mit einem Durchmesser von ein bis zehn Millimeter beobachtet.

Details zur makroskopischen Beurteilung sind im Anhang in Tabelle 34 enthalten.

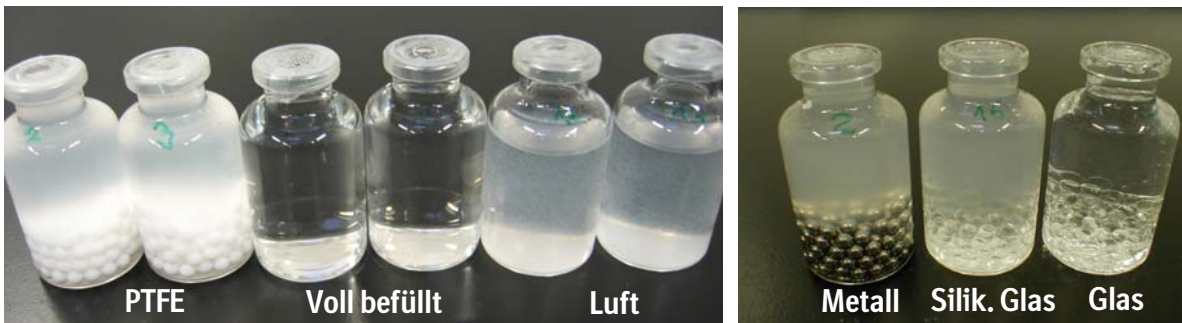


Abbildung 5-45: Fotos der Vials mit Lösung nach einem Tag im Turbula-Mischer. Pro Ziehungszeitpunkt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Messergebnisse der Lösungen aus je zwei Vials berechnet.

Die Trübungswerte der Lösungen mit Metallkugeln waren nach sieben Tagen mit ca. 1.700 FNU von allen untersuchten Proben am Höchsten (Abbildung 5-46). Ähnlich hohe Werte wurden mit ca. 1.200 FNU an den Lösungen mit Kontakt zu PTFE-Kugeln ermittelt. Die Trübung der Lösungen mit den Kontaktmaterialien Metall und PTFE nahm kontinuierlich über die Versuchsdauer zu. Die Lösungen mit Kontakt zu silikonisiertem Glas und Luft zeigten bereits innerhalb des ersten Versuchstages die größte Trübungszunahme. Über die Versuchsdauer bis zum siebten Tag nahmen die Trübungswerte dieser Lösungen nur noch geringfügig zu. Die Lösungen der Vials mit je einer Kugel Metall oder Glas und die voll befüllten Vials ohne Kugeln hatten nach sieben Tagen nahezu unveränderte Trübungswerte von weniger als zwei FNU.

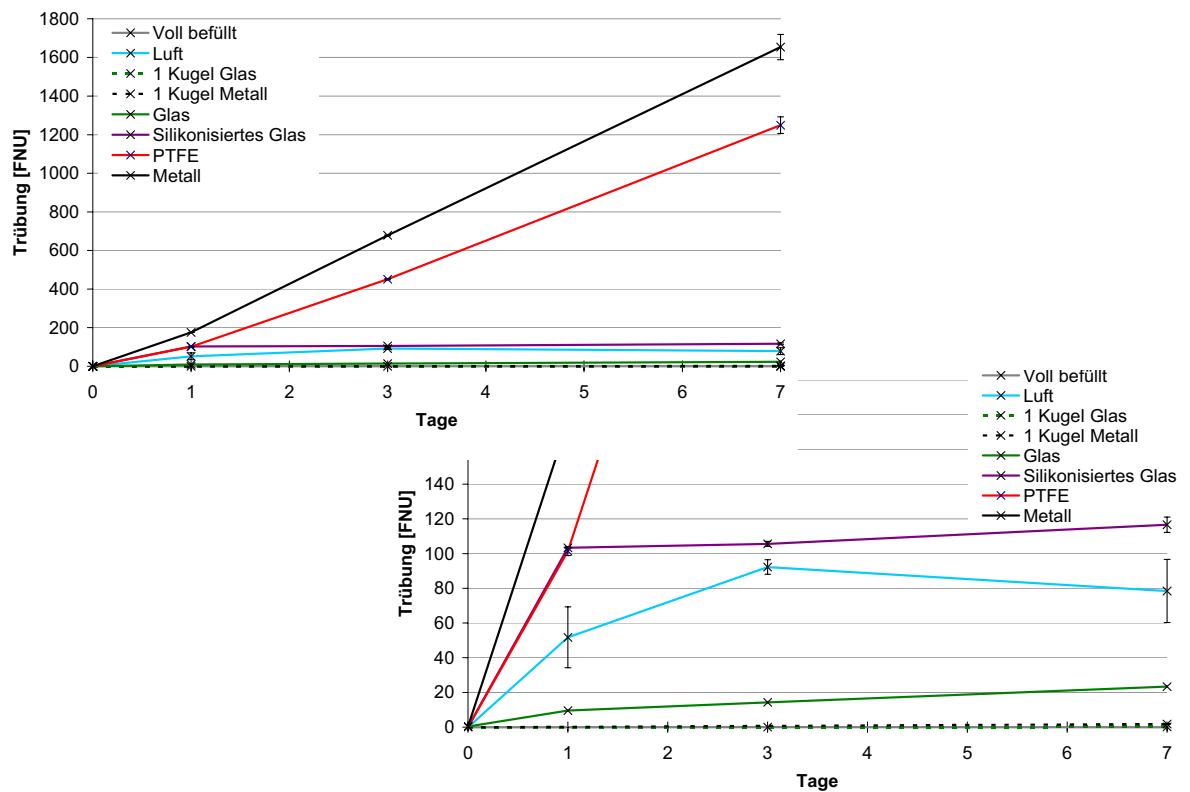


Abbildung 5-46: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell; Diagramme mit unterschiedlicher Skalierung der Y-Achse

Aufgrund der sehr hohen Trübungswerte wurde zusätzlich der Aggregations-Index, durch Messung der Lichtstreuung mit dem UV/VIS Spektrometer bei 320 nm bezogen auf die Absorption bei 280 nm, ermittelt. Hierzu wurden die Proben, wie bei der Konzentrationsbestimmung üblich, mit Puffer verdünnt. Die Lösungen mit PTFE-Kontakt zeigten im Vergleich zu den Lösungen mit Metallkontakt einen leicht höheren Aggregations-Index (Abbildung 5-47). Der Verlauf der Aggregations-Indices ist vergleichbar mit dem Verlauf der Trübungswerte.

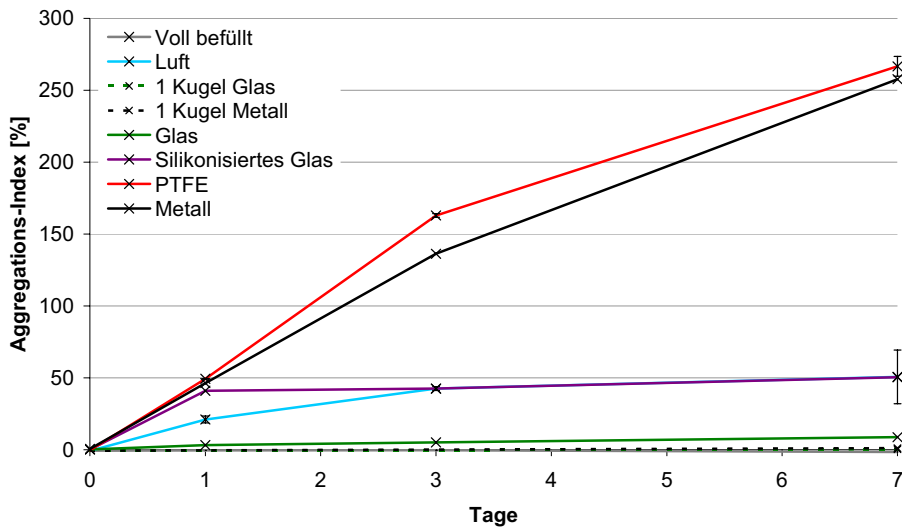


Abbildung 5-47: Ergebnisse Aggregations-Index der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell
 Die größte Zunahme aller mittels Lichtblockade erfassten Partikel ($\geq 0,5 \mu\text{m}$) der Lösungen mit je 150 Kugeln und mit Luft, fand innerhalb des ersten Versuchstages statt (Abbildung 5-48). Bei der Lösung mit nur einer Metallkugel nahm die Partikelanzahl $\geq 0,5 \mu\text{m}$ von kleiner 2.000 Partikel/mL auf ca. 16.000 Partikel/mL nach sieben Tagen zu.

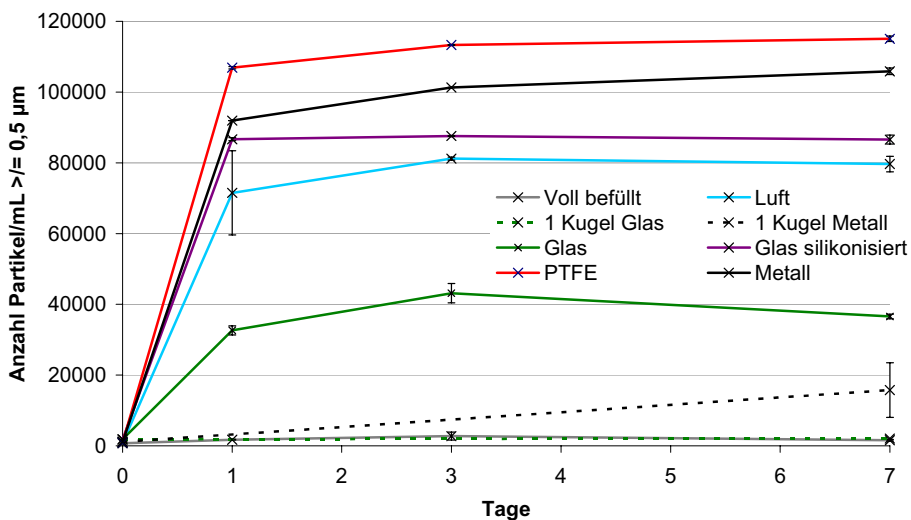


Abbildung 5-48: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell, Partikelanzahl $\geq 0,5 \mu\text{m}$

In den Lösungen mit Metallkugeln sind nur wenige Partikel mit Durchmessern $\geq 10 \mu\text{m}$ entstanden (Abbildung 5-49).

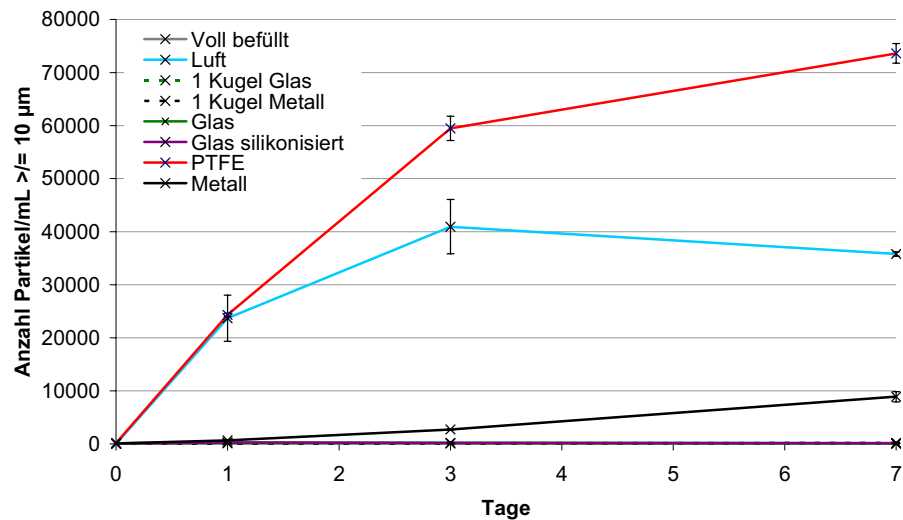


Abbildung 5-49: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell, Partikelanzahl $\geq 10 \mu\text{m}$

Bei den Lösungen mit Luft- und PTFE-Kontakt wurde ein deutlicher Anstieg der Partikel mit Durchmessern größer 10 und 25 μm ermittelt (Abbildung 5-49, Abbildung 5-50).

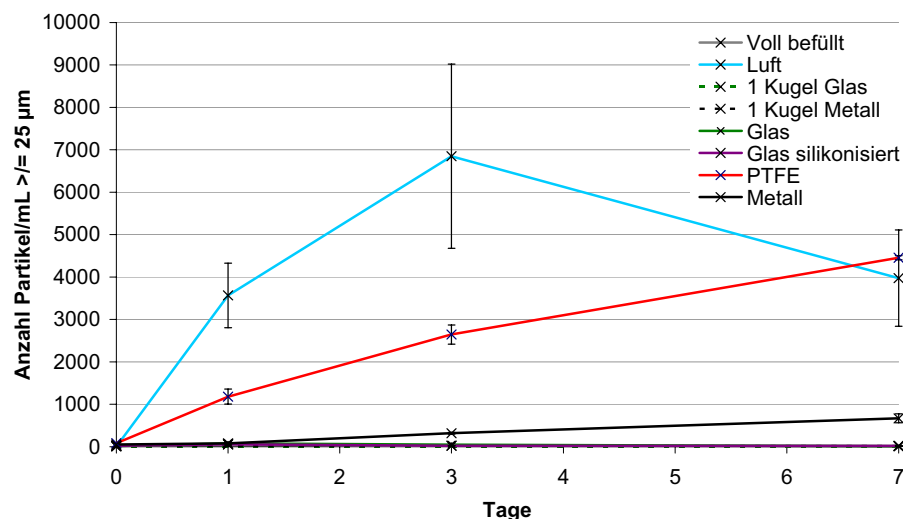


Abbildung 5-50: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell, Partikelanzahl $\geq 25 \mu\text{m}$

Der Anteil der unlöslichen Aggregate, durch Konzentrationsbestimmung nach Filtration ermittelt, spiegelt das Bild der Trübungswerte wider (Abbildung 5-51). Die Proteinkonzentrationen der Lösungen mit Kontakt zu PTFE und Metall sanken um bis zu ca. 58 %. Durch den Kontakt der Lösungen mit Luft nahm die Konzentration um bis zu 45 % ab. Bei den Ergebnissen der Trübungsmessung war die Veränderung der Lösungen mit Luftkontakt über die Versuchsdauer weniger deutlich. Die Lösungen mit Kontakt zu silikonisierten Glaskugeln wiesen nach einem Tag eine um 6 % geringere Proteinkonzentration im Vergleich zur Ausgangslösung auf, die bis zum Versuchsende unverändert blieb.

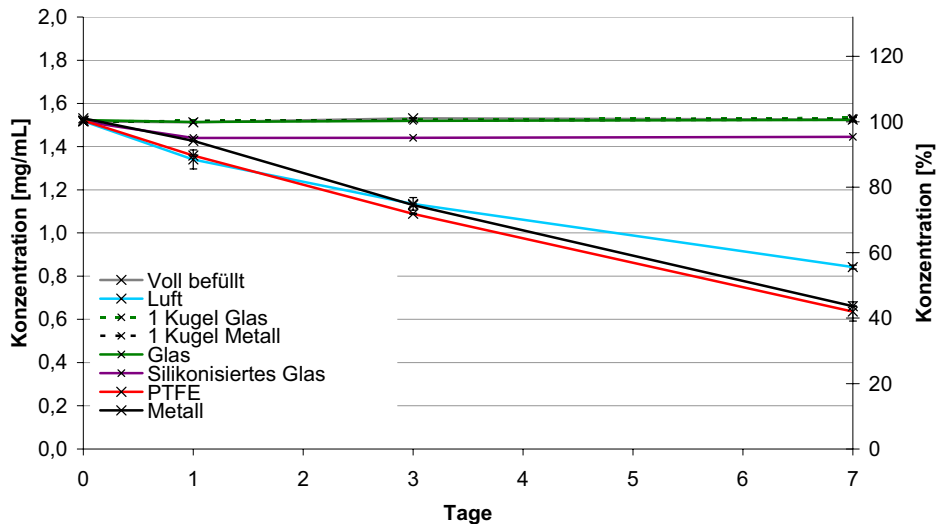


Abbildung 5-51: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell
 Lösliche Aggregate und Fragmente waren bei allen Lösungen mit Ausnahme der Lösungen mit Glas- und Metallkugeln nicht nachweisbar (Abbildung 5-52). Der Monomergehalt fast aller Lösungen blieb über die Versuchsdauer unverändert bei 98 bis 100 %. Bei den Proben mit Glaskugeln wurde eine Abnahme des Monomergehalts um 4 % ermittelt. Die Lösung mit Metallkugeln zeigte bereits beim Initialwert eine Abnahme des Monomergehalts um 12 %. Diese Lösung war ca. zwei Stunden mit Metallkugeln im ruhenden Zustand bei Raumtemperatur in Kontakt. Danach erfolgte die Probenahme der Lösungen, wie auch bei allen anderen Initialwerten, für HP-SEC und weiterer Analysen.
 Am Ende des Versuches betrug der Monomergehalt der Lösung mit Metallkugeln noch 66 %.

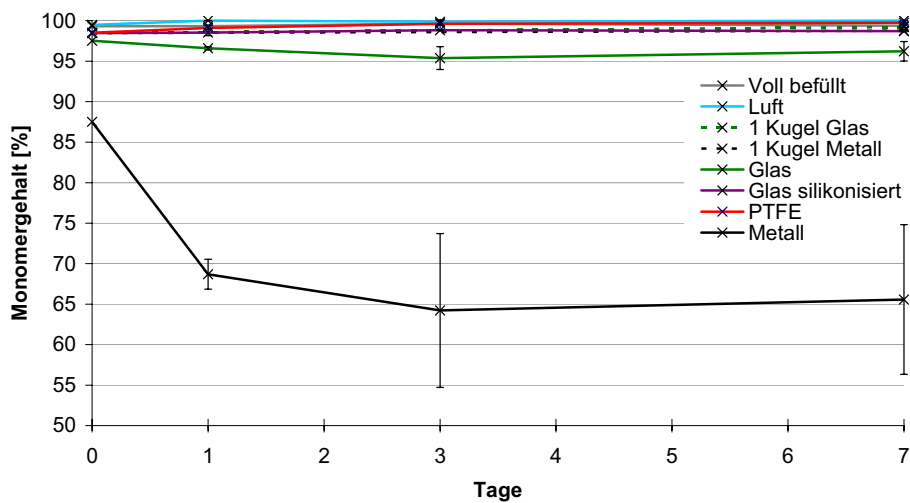


Abbildung 5-52: Ergebnisse Monomergehalt der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell

Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser (Abbildung 5-53) der Lösungen mit Kontakt zu Luft, Metall, PTFE und silikonisiertem Glas lagen ab dem ersten Tag bis zum Versuchsende im Bereich der unlöslichen Aggregate (größer 500 nm). An den Lösungen mit Kontakt zu Glaskugeln wurde ebenfalls eine deutliche Veränderung des Z-Average über die Versuchsdauer ermittelt. An der Lösung mit nur einer Metallkugel wurde eine Veränderung des Z-Average von 11 nm auf 29 nm nach sieben Tagen gemessen.

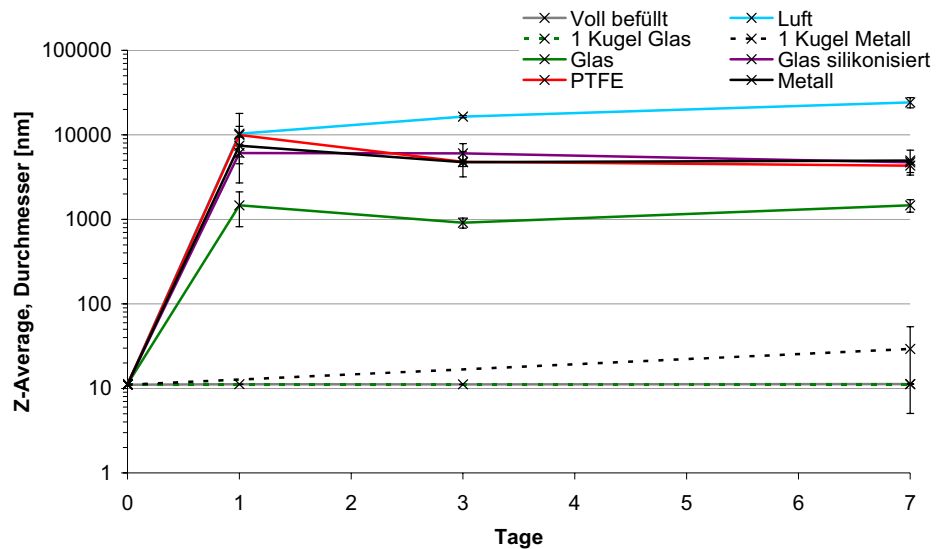


Abbildung 5-53: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser (Z-Average) der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell

Der Polydispersitätsindex ist in Tabelle 26 dargestellt. Die Polydispersität stieg über die Versuchsdauer an.

Tabelle 26: Ergebnisse Bestimmung des Polydispersitätsindex der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell

Kontaktmaterial	Anzahl Kugeln	Initialwert	1 Tag	3 Tage	7 Tage
--- (voll befüllt)	0	0,021	0,020	0,030	0,050
Luft	0	0,029	0,750	0,810	0,601
Glas	1	0,021	---	---	0,071
Metall	1	0,021	---	---	0,210
Glas	150	0,044	0,969	0,965	0,997
Silikonisiertes Glas	150	0,050	0,409	0,563	0,464
PTFE	150	0,036	0,530	0,280	0,231
Metall	150	0,026	0,299	0,340	0,292

5.4.4 Diskussion

Mit Hilfe der UV/VIS Messung der Lösung mit Luftkontakt wurde eine Abnahme der Proteinkonzentration von 45 %, aufgrund unlöslicher Aggregate, ermittelt. Die Trübungszunahme dieser Lösung war verhältnismäßig gering. Die in der Lösung enthaltenen Partikel wurden, evtl. infolge von Sedimentations- und Flotationseffekten, nur zum Teil durch die Trübungsmessung erfasst.

Die Trübungswerte der Lösungen mit Kontakt zu Metall und PTFE stiegen kontinuierlich über die Versuchsdauer an. Hingegen nahm die Trübung der Lösung mit Kontakt zu silikonisiertem Glas nur innerhalb des ersten Versuchstages zu und blieb dann bis zum Versuchsende nahezu unverändert. Die tatsächliche Größe der Grenzfläche mit Silikonöl ist fraglich. Das Silikonöl wurde über eine Silikonölemulsion auf den Glaskugeln eingebrannt. Selbst wenn die Silikonölemulsion einen kohärenten Film auf den Glaskugeln bildete, wäre davon auszugehen, dass im Anschluss an den Einbrennschritt nur die lipophilen Öltröpfchen auf der Oberfläche bleiben und diese wahrscheinlich keinen durchgängigen Film auf den Kugeln mehr ausbilden. D.h. die Fläche des Silikonöls auf 150 Kugeln war potentiell geringer als 75 cm², was der Gesamtoberfläche der Kugeln entsprach. Evtl. kann sich Silikonöl innerhalb des ersten Versuchstages von den Kugeln abgelöst und die Trübung erhöht haben. Durch den Nachweis von vorwiegend kleinen Partikeln (Durchmesser von 1 bis 5 µm) nach einem Tag Versuchsdauer und einer konstanten Partikelanzahl bis zum Versuchsende wird diese These unterstützt, siehe Abbildung 5-54. Beim Vorliegen von Aggegaten wäre zu erwarten, dass die Partikelanzahl bei den größeren Durchmessern ($\geq 10 \mu\text{m}$) über die Versuchsdauer zunimmt, analog den im Kapitel 5.3.3 dargestellten Ergebnissen des Schüttler-Modells. Die Abnahme der Proteinkonzentration innerhalb des ersten Tages kann durch Adsorption von Proteinmolekülen an den Silikonöltröpfchen verursacht worden sein.

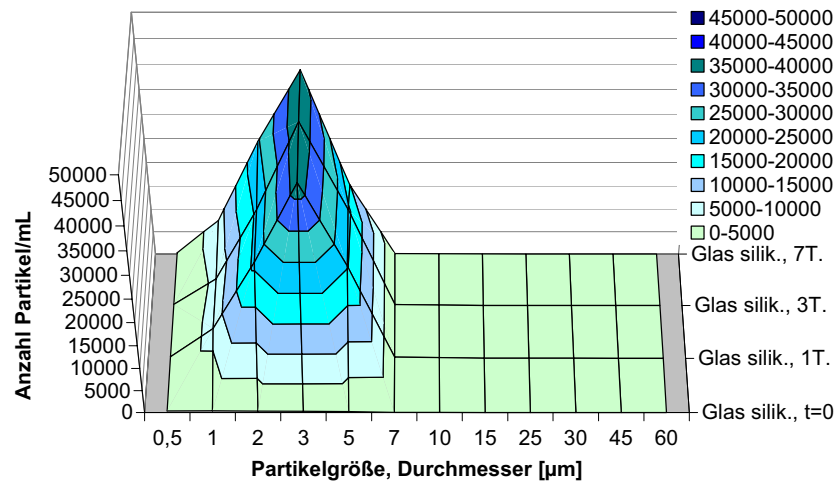


Abbildung 5-54: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Mischer-Modell, 3D-Darstellung des Versuchs mit silikonisierten Glaskugeln

Die Lösung mit Kontakt zu Metallkugeln zeigte eine unerwartet hohe Aggregation. Bereits in der für den Initialwert genutzten Lösung, welche nur wenige Stunden im ruhenden Zustand mit Metallkugeln in Kontakt war, lag der Monomergehalt bei 88 %. Ebenfalls konnten an den Lösungen mit nur einer Kugel (Kugeloberfläche zum Verhältnis des Lösungsvolumens von $0,03 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$) Veränderungen in der Partikelanzahl $\geq 0,5 \text{ µm}$ und im hydrodynamischen Durchmesser durch PCS-Analyse ermittelt werden. Die Edelstahlkugeln waren vor Einsatz nicht passiviert worden, so dass die Auffaltung in einer durch Metallionen katalysierten Reaktion erklärt werden könnte.

5.4.5 Fazit

In Tabelle 27 sind die Ergebnisse der Versuche mit den Kontaktflächen der Proteinlösungen mit Luft, Glas, silikonisiertem Glas, PTFE und Metall zusammengestellt. Die Daten wurden pro Prüfpunkt mit einer Punktzahl von 1 = höchste Degradation bis 8 = geringste Degradation bewertet. Der arithmetische Mittelwert über alle Methoden ergibt den „Durchschnitt Bewertung“.

Tabelle 27: Ergebnisse Untersuchungen zu Grenzflächen Luft, Glas, silikonisiertes Glas, PTFE, Metall
Bewertung: 1 = höchste Degradation; 8 = geringste Degradation

Prüfpunkt Methode	0 Kugeln		1 Kugel		150 Kugeln			
	Glasvial, Voll befüllt	Luft	Glas	Metall	Glas	Silikonisiertes Glas	PTFE	Metall
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	1	0	1	1	4	1	0	34
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	11	> 1.000	11	29	624	> 1.000	> 1.000	> 1.000
Trübung Offline [FNU]	0	78	0	2	23	117	1.249	1.654
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektrometrie [%]	0	45	0	0	0	6	58	57
Partikelzählung $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	1.558	> 60.000	2.061	15.752	36.562	> 60.000	> 60.000	> 60.000
Durchschnitt Bewertung	6,0	3,2	5,8	5,2	4,4	2,4	2,4	1,2
Gesamtbewertung	8	4	7	6	5	2	2	1

Es sind im Wesentlichen unlösliche Aggregate mit dem Mischer-Modell entstanden, eine Ausnahme bildete die Lösung mit Metallkontakt. Hier war der Monomergehalt deutlich reduziert.

Die stärkste Aggregation wurde bei Kontakt der Proteinmoleküle mit Metall, silikonisiertem Glas, PTFE und Luft ermittelt. Geringe Veränderungen wurden beim Kontakt der Lösung mit Glas festgestellt. An den Lösungen der voll befüllten Vials und Vials mit je einer Glas-kugel wurden keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zur Ausgangslösung beobachtet.

Die Lösung mit einer Metallkugel zeigte bereits erste Veränderungen im hydrodynamischen Durchmesser und auch der Partikelanzahl $\geq 0,5 \mu\text{m}$.

Die Auffaltung von Proteinmolekülen an hydrophoben Grenzflächen konnte belegt werden. Hydrophobe Grenzflächen im Herstellungsprozess erhöhen das Risiko von Auffaltung und Aggregation der Proteinmoleküle.

Unerwartet stark war die Degradation der Moleküle induziert durch Metallkontakt. Die Grenzflächendenaturierung, durch Metallionen induziert, ist ein bekannter Effekt und in der Literatur beschrieben, siehe Kapitel 3.4.5.5.

5.4.6 Bewertung des Modells

Das Mischer-Modell ist sehr gut geeignet zur Ermittlung der Sensitivität von Lösungen bezogen auf die im Produktionsprozess vorkommenden Materialien, wie PTFE, Metall, Glas, silikonisiertes Glas und Luft.

Das Modell bietet die Möglichkeit den Einfluss der gewünschten Grenzfläche unter maximalem Ausschluss von Luft auf die Proteinlösung zu ermitteln. Durch die Anzahl der Kugeln pro Vial kann die Größe der Kontaktfläche von Proteinlösung zur Grenzfläche variiert werden.

Bei Bedarf können weitere Materialien zur Simulation eingesetzt werden.

Tabelle 28: Bewertung Mischer-Modell

Parameter	Eigenschaften Modell
Scherbeanspruchung	Gering
Anzahl Zyklen	---
Versuchsdauer	Wählbar (ein Tag bis mehrere Wochen)
Grenzflächeneffekte	
- Anteil Grenzflächen (Luft, Glas, silikonisiertes Glas, PTFE, Metall)	Hoch
Einsatzgebiet	Ermittlung Sensitivität gegenüber Grenzflächen
Limitation	Luftblasengröße bei Untersuchung der Kontaktfläche Proteinlösung und Luft kann nicht gesteuert werden
Übertragbarkeit Produktionsmaßstab	Ja, Größe der Grenzflächen kann simuliert werden

5.5 Kolbenpumpen-Modell

Am Beispiel der AK-3 Lösung wurde die Proteindegradation mit dem Modell der Kolbenpumpe untersucht. Dieses Modell entspricht in hohem Maße den in der Produktion vorhandenen Bedingungen bei der Abfüllung. Die gleichen Drehkolbenpumpen können auch im Produktionsmaßstab zur Abfüllung von Proteinlösungen in Endbehältnisse eingesetzt werden.

Mit diesem Modell wurde die Wirkung von Scherkräften in Kolbenpumpe und Abfüllnadel auf die Proteinlösung erfasst. Weiterhin wird auch die Auswirkung des Kontaktes zu den Grenzflächen Silikonschlauch, Metall, Glas und Luft in produktionsnahen Verhältnissen erfasst.

5.5.1 Modellbeschreibung

Als Modell wurde eine halbautomatische Kolbenpumpen-Abfüllmaschine eingesetzt, Abbildung 5-55 und Anhang, Kapitel 7.3, Abbildung 7-21.

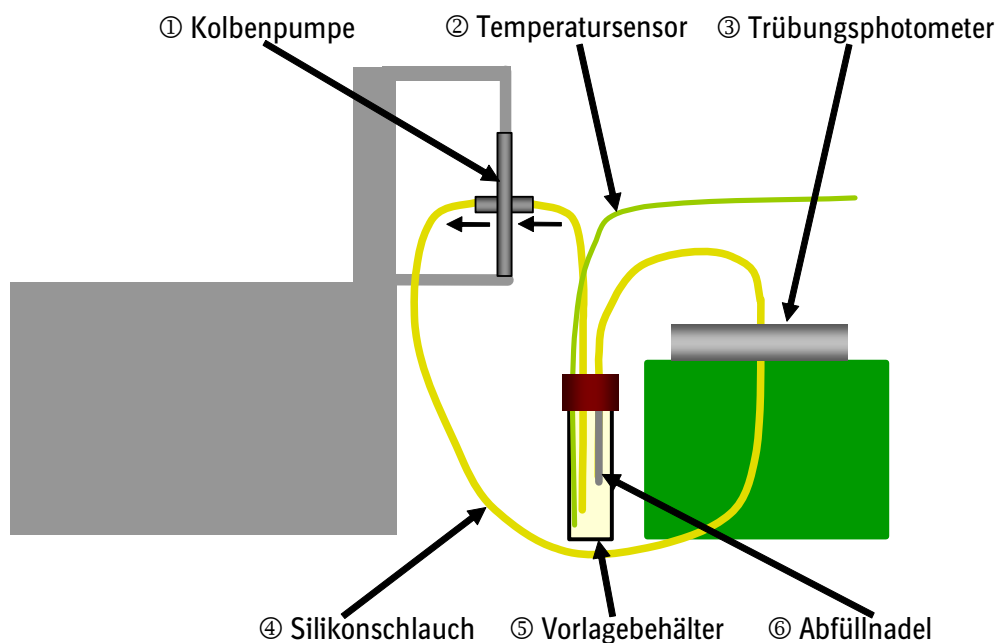


Abbildung 5-55: Schematischer Aufbau des Kolbenpumpen-Modells

Die AK-3 Lösung wurde von einem Vorlagebehälter (5) über einen Silikonschlauch mit einer Drehkolbenpumpe (1) (Abbildung 5-56) angesaugt. Über einen zweiten Silikonschlauch (4) wurde die Lösung dem Online-Trübungsphotometer (3) zugeführt und über einen dritten Silikonschlauch in den Vorlagenbehälter (5) über die Abfüllnadel (6) zurückgeführt.

Durch die Zirkulation der Lösung mit 300 Passagen über Abfüllpumpe und -nadel wurden extreme Bedingungen ausgewählt. Die Temperatur in der Lösung wurde mit einem Temperaturmessgerät aufgezeichnet und betrug über die gesamte Versuchsdauer konstant ca. 22 °C.

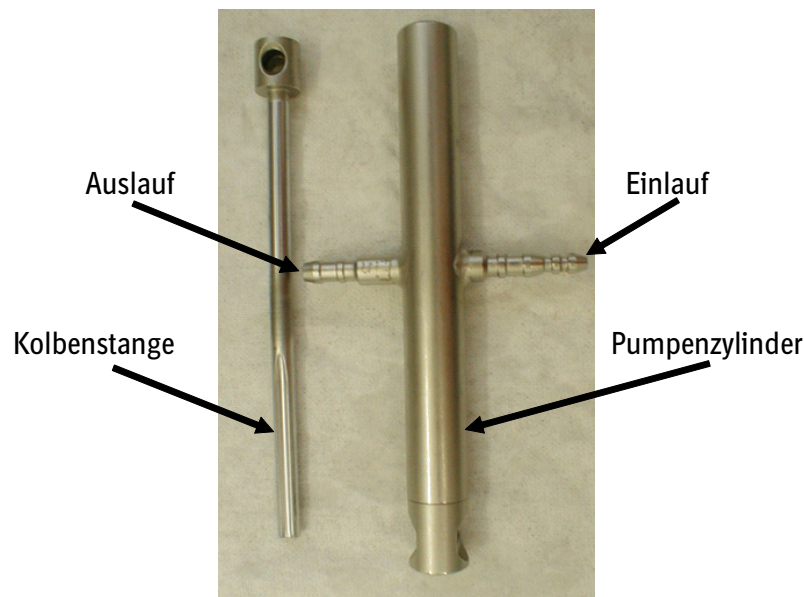


Abbildung 5-56: Foto Kolbenpumpe bestehend aus Pumpenzylinder und Kolbenstange

Der Vorgang des Befüllens und Entleerens der Kolbenpumpe ist in Abbildung 5-57 dargestellt.

Zur Befüllung (1) bewegt sich die Kolbenstange bis zu einer definierten Position nach oben. Die Lösung fließt über den Einlauf an der Aussparung der Kolbenstange in den Zylinder. Nach einer 180 Grad Drehung (2) der Kolbenstange gibt diese den Auslauf frei und die Lösung wird durch die Abwärtsbewegung des Kolbens aus dem Zylinder gedrückt. An der unteren Position angelangt, führt der Kolben erneut eine 180 Grad Drehung (4) durch und erreicht wieder die Ausgangsposition.

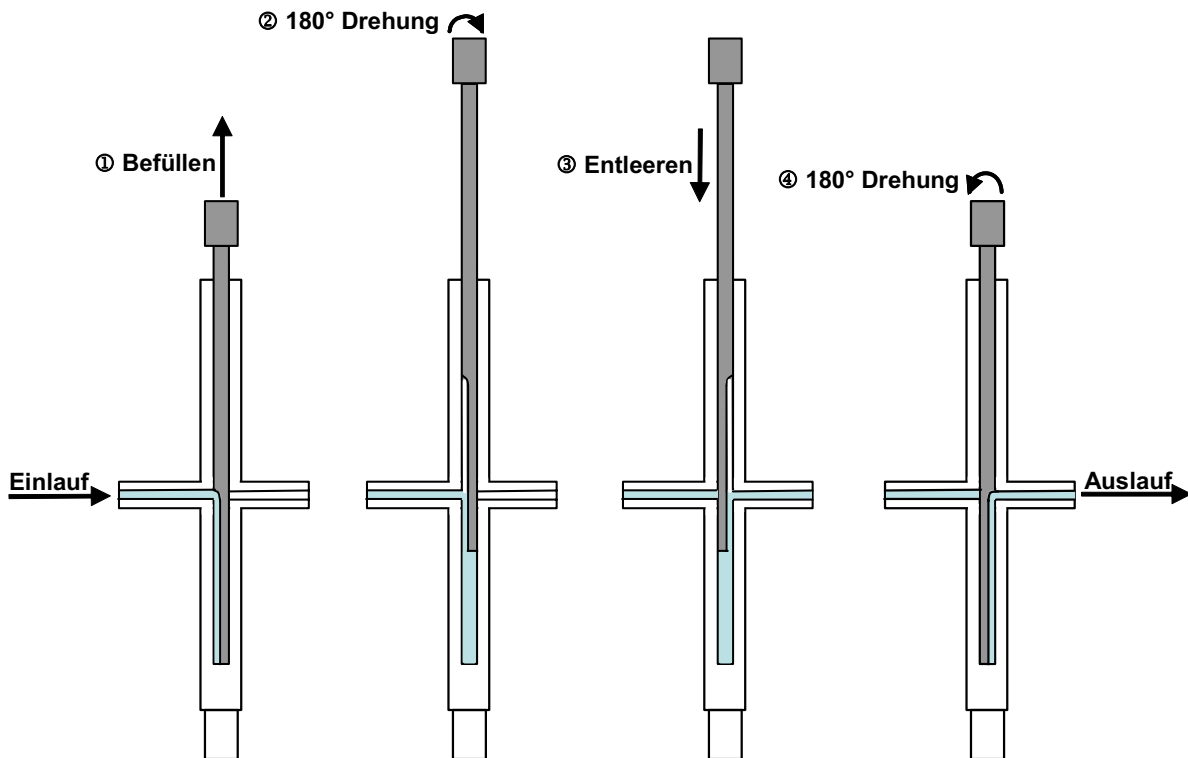


Abbildung 5-57: Schematische Darstellung des Befüllens und Entleerens der Drehkolbenpumpe
 Die Abfüllnadel war durch den Hersteller einer Oberflächenbehandlung in Form einer Passivierung unterzogen worden. Durch Passivierung werden freies Eisen und andere anodische Verunreinigungen von Edelstahloberflächen entfernt. Die Passivierung erzeugt ein kathodisches Potential der Oberfläche, verbunden mit erhöhtem Korrosionswiderstand (Henkel, 2003). Die produktberührenden Flächen des Pumpenkolbens und -zylinders waren hartverchromt. Somit lag ebenfalls ein reduzierter Eisenanteil an der Kontaktfläche zur Proteinlösung vor.

Die Abfüllnadel wurde mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm gewählt. Dies entspricht einer üblichen Abfüllnadel für kleinere Volumina im Produktionsmaßstab. Die Nadel wurde ca. zwei Zentimeter oberhalb des Bodens des Standzylinders unter dem Flüssigkeitsspiegel positioniert. Hierdurch sollte die Entstehung von Schaum vermieden werden.

Die Versuchsdauer wurde, analog der Versuche mit der Peristaltikpumpe, mit 5,5 Stunden gewählt. Die Anzahl der Zyklen war mit 300 vergleichbar mit denen im Scherstress-Modell.

5.5.2 Kenngrößen

Bei der verwendeten Abfüllmaschine entsprechen 50 % eines Abfülltaktes dem Entleeren der Pumpe. 36 % eines Taktes dauert die Pumpenbefüllung. Je zweimal 7 % des Taktes werden für die beiden 180 Grad Drehungen der Pumpe benötigt.

Die Einstellung der Abfüllgeschwindigkeit war bei dem exemplarisch vorgestellten Versuch maximal. Es wurden 35 Takte pro Minute ausgeführt.

Die Zeit für einen Takt entsprach 1,714 s (= 60 s/35 Takte). Durch die oben beschriebene Aufteilung der Zeiten ergibt sich:

Zeit Pumpenentleerung (50 % Takt) = Zeit Nadelentleerung = 0,8571 s

Zeit Pumpenbefüllung (36 % Takt) = 0,6171 s

Zeit 2 x 180° Drehung (14 % Takt) = 0,2400 s

Pro Takt wurde ein Volumen von $V = 2,1$ mL über die Pumpe gefördert.

Die zur Berechnung verwendeten Formeln sind im Kapitel 3.6, Gleichung 3.4 bis 3.10, erläutert. Die Berechnungen sind im Anhang, Kapitel 7.2.6 eingefügt und in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Übersicht Scherraten und Mass Shear bei 300 Zyklen

	Volumenstrom \dot{V} [m ³ /s]	Geschwindigkeit w [m/s]	Scherdauer t_s [s]	Scherrate $\dot{\gamma}_w$ [s ⁻¹]	Mass Wall Shear $(\gamma\theta)_w$	Mass Average Shear $(\gamma\theta)_{av}$
Abfüllnadel $r=0,0008$ m; $l=0,122$ m	$2,45 \times 10^{-6}$	1,22	30	6.093	$1,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Einlauf Pumpe $r=0,0015$ m; $l=0,046$ m	$3,40 \times 10^{-6}$	0,48	28,8	1.283	$3,7 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Auslauf Pumpe $r=0,0015$ m; $l=0,039$ m	$2,45 \times 10^{-6}$	0,35	33,4	924	$3,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
Kolbenstange + Zylinder Befüllen $r=0,001$ m, $l=0,04$ m	$3,40 \times 10^{-6}$	1,08	11,11	4.329	$4,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
Kolbenstange + Zylinder Entleeren $r=0,001$ m, $l=0,04$ m	$2,45 \times 10^{-6}$	0,78	15,38	3.119	$4,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
Kolbenpumpe gesamt	---	---	---	---	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$

Der Mass Wall Shear, der in der Abfüllnadel auftrat, war mit $(\gamma\theta)_w = 1,8 \times 10^5$ etwas höher als der Mass Wall Shear in der Kolbenpumpe ($(\gamma\theta)_w = 1,6 \times 10^5$).

Im verwendeten Modell betrug der Mass Wall Shear gesamt $(\gamma\theta)_{wGes} = 3,4 \times 10^5$ und wurde durch Addition des Mass Wall Shear in der Abfüllnadel und in der Kolbenpumpe berechnet.

Mass Wall Shear gesamt Abfüllung (Abfüllnadel + Kolbenpumpe):

$$(\gamma\theta)_{wGes} = 1,8 \times 10^5 + 1,6 \times 10^5 = 3,4 \times 10^5$$

Der Mass Wall Shear gesamt war beim Kolbenpumpen-Modell somit geringer als beim Versuch mit dem Scherstress-Modell bei der Scherrate von 72.150 s^{-1} ($(\gamma\theta)_w = 5,5 \times 10^5$), siehe Kapitel 5.1.2.

Bei nur einem Zyklus der Lösung über Abfüllnadel und Kolbenpumpe, wie dies beim Abfüllprozess der Fall ist, entspricht der Mass Wall Shear einem Wert von $(\gamma\theta)_w = 1,1 \times 10^3$.

Die Scherbeanspruchung der Lösung an der Passung zwischen Zylinder und Kolbenstange (Fläche ohne Aussparung) wurde nicht berücksichtigt. Ebenso wurde die Scherung in den Silikonschläuchen vernachlässigt.

Die Gesamtkontaktzeit der Lösung mit Silikonschläuchen betrug ca. drei Stunden. Mit der Metalloberfläche der Abfüllnadel und Kolbenpumpe war die Lösung über die Versuchsdauer insgesamt ca. fünf Minuten in Berührung. Die restliche Zeit von ca. 2 Stunden und 25 Minuten war die Lösung überwiegend mit dem Glas des Vorlagebehälters und kurze Zeit mit dem Trübungsphotometer in Kontakt.

5.5.3 Ergebnisse

Bereits fünf Minuten nach Versuchsbeginn waren Fasern in der Lösung sichtbar. Es bildete sich über die gesamte Versuchsdauer kein Schaum.

Die Trübung nahm über die gesamte Versuchsdauer linear zu (Abbildung 5-58). Das Bestimmtheitsmaß von 99 % der linearen Funktion ($y=0,0756x-0,245$) der Trübungszunahme über die Versuchsdauer spiegelt eine hohe Korrelation wider. Die Offline ermittelten Trübungswerte betragen bei Versuchsbeginn 0 FNU und am Versuchsende 34 FNU. Im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Peristaltikpumpen-Modell wurden keine Sedimentations- oder Flotations-Effekte im Vorlagebehälter beobachtet.

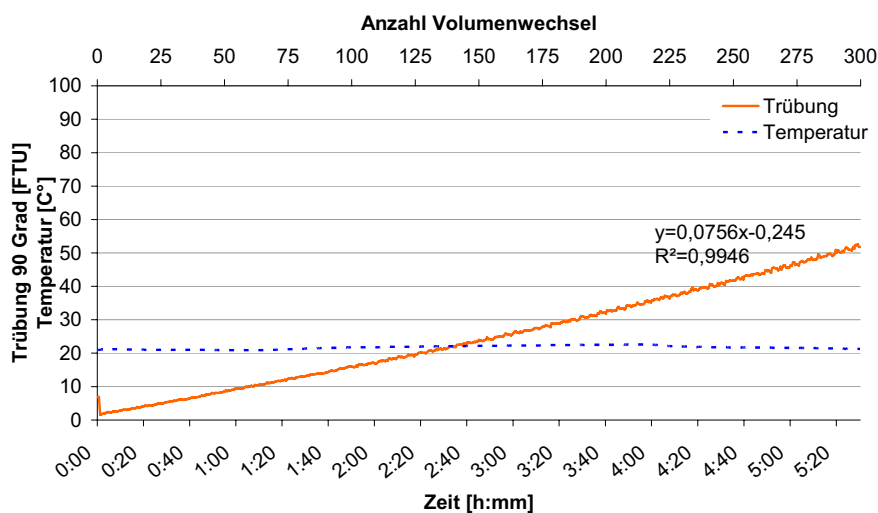


Abbildung 5-58: Ergebnisse Online-Trübungsmessung der AK-3 Lösungen, Kolbenpumpen-Modell

Die häufigste Partikelanzahl lag bei einem Durchmesser von 2 μm (Abbildung 5-59). Die Zunahme der Partikelanzahl der Lösung am Versuchsende war deutlich.

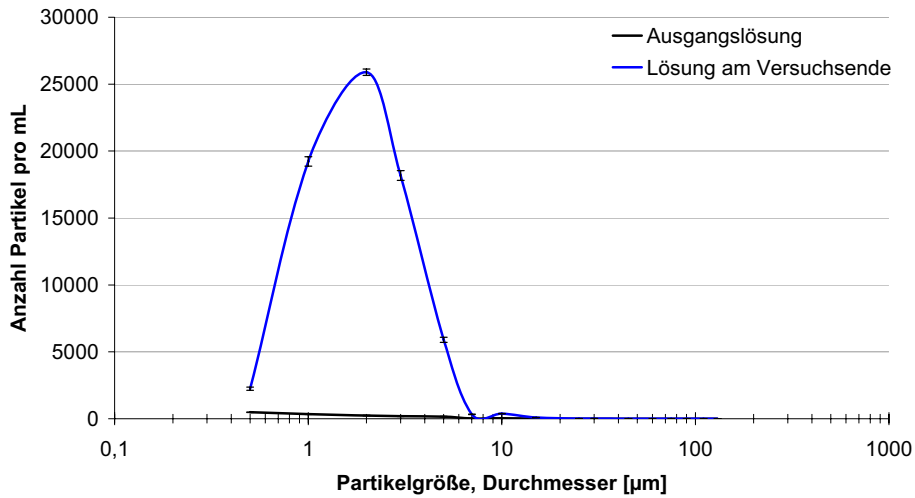


Abbildung 5-59: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-3 Lösungen, Kolbenpumpen-Modell
Die Proteinkonzentration nahm bezogen auf die Ausgangslösung aufgrund unlöslicher Aggregate, um 25 % ab.

Der Monomergehalt war nach den 300 Abfüllzyklen um 44 % reduziert (Abbildung 5-60).

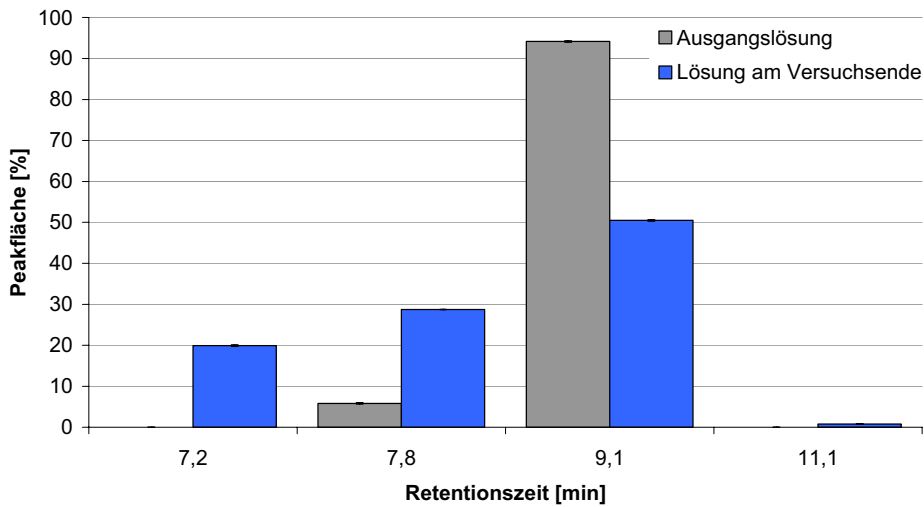


Abbildung 5-60: Ergebnisse HP-SEC Bestimmung der AK-3 Lösungen, Kolbenpumpen-Modell;
Säule bei Retentionszeit 9,1 min entspricht dem Monomer von AK-3

Der mittlere hydrodynamische Durchmesser erhöhte sich von 11 nm der Ausgangslösung auf ca. 1.200 nm der Lösung am Versuchsende. Der Polydispersitätsindex der Lösung stieg von 0,04 auf 0,92.

5.5.4 Diskussion

Die lineare Trübungszunahme über die Versuchsdauer führt zu der Folgerung, dass Partikel mit einer gleich bleibenden Größenverteilung während des Zirkulierens der Lösung entstanden sind. Die häufigste Partikelanzahl wurde mit Hilfe der Lichtblockade bei einem Durchmesser von 2 μm ermittelt. Im Vergleich hierzu lagen die Werte mit dem Peristaltikpumpen-Modell (AK-3 Lösung, ohne Luft, Raumtemperatur) bei 5 μm , ein zweites Maximum war bei 10 μm vorhanden.

Durch die in Kolbenpumpe und Abfüllnadel wirkenden Scherkräfte können größere Aggregate zerkleinert worden sein, die zu einer unveränderten Partikelgrößenverteilung über die Versuchsdauer führten.

Die ermittelte Degradation der Proteinmoleküle wurde hauptsächlich durch die Grenzflächen der Silikonschläuche verursacht. Dies wird ersichtlich, wenn man die Ergebnisse des Scherstress-Modells, Peristaltikpumpen-Modells und Kolbenpumpen-Modells vergleicht, siehe Tabelle 30. Der Mass Shear des Versuchs mit dem Kolbenpumpen-Modell war geringer als der Mass Shear bei den Versuchen mit der Scherstress-Apparatur. Dennoch trat eine deutlich stärkere Degradation auf.

Beim Peristaltikpumpen-Modell wurde das identische Schlauchmaterial, wie beim Kolbenpumpen-Modell verwendet. Die Kontaktzeit der Lösung mit den Schläuchen war mit ca. drei Stunden um 25 % höher als beim Peristaltikpumpen-Modell. Ca. die Hälfte der Kontaktzeit mit den Schläuchen wurde von der Lösung im ruhenden Zustand ausgemacht (Zeit der Pumpenbefüllung und zweifache 180 Grad Drehung der Pumpe). Im ruhenden Zustand der Lösung ist der Austausch der Moleküle an der Grenzfläche zu den Silikonschläuchen reduziert, daher werden weniger Moleküle aufgefaltet und aggregiert als beim Durchfluss der Lösung durch die Schläuche. Dies könnte die Ursache sein, weshalb die Degradation aufgrund der längeren Kontaktzeit mit den Schläuchen nicht stärker ausgeprägt war.

Die Wahrscheinlichkeit für eine maßgebliche Degradation durch Metallkontakt wird als gering eingestuft. Die Gesamtkontaktzeit der Lösung mit Metall war mit ca. fünf Minuten sehr gering und zusätzlich war das Risiko der Aggregation durch die Oberflächenbehandlung des Metalls (Passivierung und Hartverchromung) minimiert.

Der Eintrag von Luft in das System war nicht komplett ausgeschlossen. Die Kolbenpumpe ist nicht gedichtet bzw. besteht aus einer Passung des Edelstahlkolbens mit dem Edelstahlzylinder. Während des Versuches wurde Flüssigkeitsaustritt an der Öffnung des Zylinders festgestellt, siehe Abbildung 5-61. Ein Einsaugen von Luft konnte an dieser Stelle allerdings nicht beobachtet werden.



Abbildung 5-61: Foto der Kolbenpumpe mit Lösungsrückstand

Beim Strömen der Lösung durch die Messzelle des Online-Trübungsphotometers wurden die Moleküle einer weiteren Scherbeanspruchung und einem Kontakt zu einer hydrophoben Grenzfläche (modifiziertes PTFE) ausgesetzt. Der Anteil der Degradation der Lösung beim Passieren der Messzelle wurde in diesem Versuch nicht ermittelt. Der geringste zu durchströmende Durchmesser in der Messzelle betrug ca. 4 mm. Die in Abfüllnadel und Abfüllpumpe auftretenden Scherraten waren aufgrund der kleineren Durchmesser daher höher. Ebenfalls sollten die durch die Silikonschläuche verursachten Grenzflächeneffekte die Effekte der Messzelle, allein aufgrund der Größe der Grenzfläche, deutlich übersteigen.

5.5.5 Fazit

In Tabelle 30 sind die vorgestellten Ergebnisse des Kolbenpumpen-Modells zusammengefasst. Die analytischen Ergebnisse der Lösung am Versuchsende sind den Ergebnissen des Scherstress- und Peristaltikpumpen-Modells gegenübergestellt.

Tabelle 30: Ergebnisse Untersuchungen zur Kombination von Scherung und Grenzflächen Silikonschlauch, Metall, Glas, Luft

Prüfpunkt Methode	Kolbenpumpen- Modell Lösung am Versuchsende	Scherstress- Modell Scherrate 72.150 s^{-1}	Peristaltik- pumpen-Modell ohne Luft, AK-3
Abnahme Monomergehalt gegenüber Ausgangswert HP-SEC [%]	44	13	44
Hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	> 1.000	16	> 1.000
Trübung Offline [FNU]	34	1,9	36
Zunahme unlöslicher Aggregate gegenüber Ausgangswert UV/VIS Spektroskopie [%]	25	0,6	8
Partikelzählung $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	> 60.000	18.281	> 60.000

Die höchste Scherbeanspruchung wurde in der Abfüllnadel ermittelt mit $(\gamma\theta)_w = 1,8 \times 10^5$.

Der in der Kolbenpumpe berechnete Mass Wall Shear war mit $(\gamma\theta)_w = 1,6 \times 10^5$ etwas geringer.

Die Aggregation der Moleküle im Kolbenpumpen-Modell ist hauptsächlich auf die Grenzfläche zum Silikonschlauch zurückzuführen. Die Proteinschädigung war deutlich höher als beim Scherstress-Modell mit einem Mass Wall Shear von $(\gamma\theta)_w = 5,5 \times 10^5$. Die Kontaktzeit der Lösung mit den Schläuchen betrug ca. drei Stunden. Die Kontaktzeit der Lösung mit dem Metall der Pumpe und Nadel war mit insgesamt ca. fünf Minuten sehr gering.

Über die 300 Zyklen sind sowohl lösliche, als auch unlösliche Aggregate entstanden. Es konnte belegt werden, dass eine entscheidende Veränderung der Produktqualität durch die Abfüllmaschine entstehen kann. Allerdings sollte die Degradation nach einmaliger Passage über Abfüllpumpe und Abfüllnadel vernachlässigbar sein.

5.5.6 Bewertung des Modells

Das Modell der Kolbenpumpe bietet eine sehr gute Übertragbarkeit auf den Abfüllprozess im Produktionsmaßstab, da identische Abfüllpumpen, Abfüllnadeln und Schläuche verwendet werden können. Die ermittelte Degradation entspricht der Kombination aus Scherbeanspruchung und Grenzflächeneffekten.

Das Modell ist sehr gut geeignet, um empfindliche Proteinlösungen mit Blick auf den Abfüllprozess zu identifizieren.

Tabelle 31: Bewertung Kolbenpumpen-Modell

Parameter	Eigenschaften Modell
Scherbeanspruchung	Hoch
Anzahl Zyklen	Einstellbar (ein bis mehrere hundert Zyklen)
Versuchsdauer	Kurz (ein Tag)
Grenzflächeneffekte	
- Anteil Grenzfläche Glas	Mittel
- Anteil Grenzfläche Luft	Gering
- Anteil Grenzfläche Metall	Gering
- Anteil Grenzfläche Silikonschlauch	Hoch
Einsatzgebiet	Ermittlung der Degradation durch den Abfüllprozess unter Verwendung von Kolbenpumpen
Limitation	Evtl. nicht auf andere Abfüllprinzipien übertragbar
Übertragbarkeit Produktionsmaßstab	Ja, Abfüllprozess mit Kolbenpumpe kann simuliert werden

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung der Ursachen für physikalische Instabilität während des Abfüllprozesses von biologisch-pharmazeutischen Arzneimitteln. Nachdem mögliche Auslöser von Degradation identifiziert waren, erfolgte die Entwicklung von Modellen zur Simulation der qualitätsbeeinflussenden Prozessschritte. Anhand fünf verschiedener Versuchsdesigns wurde die Funktionalität der Modelle an Proteinen (Antikörper, Serumalbumin, Interferone) unterschiedlicher Molekülgröße überprüft und bestätigt. Die Ursachen für Auffaltung und Aggregation von Proteinmolekülen während des Fill & Finish Prozesses wurden auf Basis der Sekundärliteratur und einer ergänzenden Risikobetrachtung ermittelt. Als höchstes Risiko wurden Grenzflächeninteraktionen der Moleküle mit hydrophoben Materialien und Scherbeanspruchung identifiziert. Verschiedene Modelle wurden entwickelt, um die Auswirkung einzelner oder einer Kombination kritischer Faktoren zu untersuchen.

Als erstes wurde die Zersetzung der Proteinmoleküle durch Scherkräfte, unter Anwendung eines Scherstress-Modells am Beispiel einer Antikörperlösung, verifiziert. Scherbeanspruchung tritt bei der Filtration beim Fließen der Lösung durch Filterporen und bei der Abfüllung beim Befördern der Lösung durch Pumpen und dem Strömen durch Abfüllnadeln auf. In der Abfüllnadel mit dem Durchmesser von 1,6 mm wurde eine Scherrate von ca. 8.700 s^{-1} berechnet. Die in den Versuchen gewählten Scherraten betragen 8.696 s^{-1} und 72.150 s^{-1} . Im Scherstress-Modell wurde durch 300fachen Volumenwechsel ein Mass Shear von 1,1 bis $5,5 \times 10^5$ erzeugt. Durch die Scherbeanspruchung der Lösung mit Kontakt zu Glas- und Metalloberflächen sind lösliche Aggregate entstanden, was zu einer Reduktion des Monomergehaltes um ca. 15 % führte.

Im Modell wurden mit 300 Zyklen extreme Bedingungen gewählt. Im Produktionsprozess fließt die Lösung jeweils nur einmal über Sterilfilter, Abfüllpumpe und Abfüllnadel. Der Mass Shear von Abfüllnadel und Kolbenpumpe liegt im Größenbereich von 10^3 und ist deutlich geringer als die in den Versuchen gewählten Bedingungen (10^5). Das Risiko der Degradation durch Scherung im Fill & Finish Prozess wird daher als gering bewertet.

Die Auswirkungen des Kontaktes von Proteinmolekülen mit hydrophoben Grenzflächen wurden anhand des Peristaltikpumpen-, Schüttler- und Mischer-Modells untersucht. Degradation der Proteinlösung nach Kontakt mit Silikonschläuchen, PTFE- und silikonierten Glas-Kugeln konnte nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Degradation an Silikonschläuchen wurden Antikörper-, Serumalbumin- und Interferon-Lösungen eingesetzt. Die stärkste Aggregation konnte bei antikörperhaltigen Lösungen nachgewiesen werden. Durch den Kontakt mit Silikonschläuchen sind lösliche und unlösliche Aggregate entstanden. Silikonschläuche können im Fill & Finish Prozess Denaturierung von Proteinlösungen verursachen. Nach einer Kontaktzeit von 30 Minuten im Modell, was einer Schlauchlänge von ca. zehn Metern entspricht, war bereits ein deutlicher Anstieg der Trübung ermittelbar.

Beim Schüttler-Modell wurde durch Zusatz von PTFE-Kugeln zur Proteinlösung in Glasvials eine hydrophobe Grenzfläche geschaffen. Durch den Zusatz von sechs Kugeln wurde die Kontaktfläche eines Gummistopfens (3 cm^2) mit dem Durchmesser von 20 mm zur Proteinlösung simuliert. Das Verhältnis der PTFE-Oberfläche zum Volumen der Proteinlösung von $0,15 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ führte zu keiner zusätzlichen Schädigung im Vergleich zur Lösung ohne PTFE-Kugeln, welche mit Kontakt zu Luft geschüttelt wurde. Bei einem Verhältnis der PTFE-Oberfläche zum Volumen der Proteinlösung von $1,5 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ (entspricht 60 Kugeln in 20 mL Lösung) war eine deutliche Zunahme unlöslicher Aggregate nachweisbar.

Weitere Untersuchungen mit den hydrophoben Materialien PTFE und silikonisiertem Glas unter Ausschluss von Luft wurden mit dem Mischer-Modell durchgeführt. Hier wurde ebenfalls ein wesentlicher Anstieg unlöslicher Aggregate ermittelt. Die Auffaltung und Aggregation von Proteinmolekülen, wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte bestätigt werden (Beverung et al., 1999; Jones et al., 2005; Meng et al., 2005; Sluzky, 1991; Sluzky et al., 1992).

Die Degradation an der Grenzfläche zwischen Proteinlösung und Luft wurde mit den Peristaltikpumpen-, Schüttler- und Mischer-Modellen gezeigt. Die größte Instabilität der untersuchten Lösungen nach Luftkontakt wurde an einer Interferon-Lösung ermittelt. Dies erlaubt das Fazit, dass auch kleinere Moleküle stark an hydrophoben Grenzflächen auffalten können. Rinderserum Albumin- und eine polysorbathaltige Interferon-Lösung zeigten hingegen nur geringe Aggregation nach Luftkontakt. Der Zusatz von Polysorbat zu einer Antikörperlösung führte zu einer deutlichen Stabilisierung. Die entstandenen Aggregate der

Lösungen aus dem Schüttler- und Mischer-Modellen lagen im grob dispersen Bereich. Nach Kontakt der Lösungen mit Luft in den Versuchen mit dem Peristaltikpumpen-Modell sind zusätzlich Teilchen im kolloid dispersen Bereich entstanden. Die in der Literatur bereits beschriebene ausgeprägte Aggregation durch den Kontakt der Proteinlösungen mit Luft wurde bestätigt (Clarkson, 1999a; Colombie et al., 2001; Maa, 1997; Rathore et al., 2008; Treuheit, 2002). Je nach Molekül (z.B. Größe, Hydrophobizität, Flexibilität der Struktur) findet teilweise starke Auffaltung und Aggregation statt. Zusätzlicher Luftkontakt, beispielsweise durch Schäumen der Lösung, sollte während der Prozessierung möglichst vermieden werden.

Proteinverlust durch Anhaften der Moleküle an Grenzflächen wurde bei keinem der Versuche festgestellt. Die Stoffmengenkonzentration aller Lösungen war hier mit 0,01 mmol/L im Hinblick eines Nachweises von Adsorption sehr hoch, so dass Adsorption weniger Moleküle über die Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS Spektrometrie nicht mehr erfasst werden konnte.

Mit Hilfe des Mischer-Modells wurde eine Denaturierung der Proteinmoleküle durch Kontakt zu Metall (Material V4A) und Glas (Material Borosilikatglas) bei einem Oberflächen- zu Volumenverhältnis der Lösung von 3,8 cm²/cm³ nachgewiesen. Durch den Kontakt von Antikörpermolekülen mit nicht oberflächenbehandeltem Edelstahl sind hohe Anteile löslicher und unlöslicher Aggregate entstanden. Eine durch Metallionen verursachte Oxidation einzelner Aminosäuren ist in der Sekundärliteratur beschrieben (Khosravi et al., 2000; Rathore et al., 2008). Zu deren Vermeidung sollten Edelstahloberflächen einer Oberflächenbehandlung durch Passivierung unterzogen werden, was als gängige Praxis in der pharmazeutischen Industrie angesehen werden kann. Nach Kontakt der Proteinlösung mit Glas sind nur geringe Anteile unlöslicher Aggregate generiert worden. Glas erwies sich als Material, das die geringste Proteinzersetzung von allen untersuchten Materialien (Metall, silikonisiertes Glas, PTFE, Luft) induziert.

Im Kolbenpumpen-Modell wurde Scherbeanspruchung der Lösung durch Drehkolbenpumpe und Abfüllnadel kombiniert mit Grenzflächendenaturierung durch Kontakt zu Silikon-schlauch, Metall, Glas und Luft. Die Schädigung der Moleküle wurde hauptsächlich auf den Silikon-schlauchkontakt zurückgeführt.

Die Proteinschädigung ist anhand der verwendeten Modelle und Lösungen maßgeblich durch hydrophobe Materialien und den Kontakt zu Luft und Metall verursacht worden. In den Modellen wurden gezielt extreme Bedingungen gewählt, um kritische Proteine für den Fill & Finish Prozess identifizieren zu können. Beispiele für das Ausmaß der Degradation, durch verschiedene Auslöser im Abfüllprozess, sind im Anhang, Tabelle 35 enthalten.

Das Ausmaß der Proteinschädigung ist vor allem abhängig von:

- Hydrophobizität der Grenzfläche
- Größe der Grenzfläche
- Kontaktdauer mit der Grenzfläche
- Ausmaß des Molekülaustauschs an den Grenzflächen (Bewegung der Lösung)

Beispiele für Kontaktflächen und -zeiten im Fill & Finish Prozess sind im Anhang, Tabelle 36 zusammengestellt.

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Proteinmolekülen mit Materialien im Prozess oder im Packmittel ist das Mischer-Modell sehr gut geeignet. Proteinlösungen können hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit zu verschiedenen Kontaktmaterialien beurteilt werden. Unter Nutzung dieses Modells kann ferner eine Optimierung der Zusammensetzung von Wirkstofflösungen durchgeführt werden.

Der Einsatz des Scherstress-Modells ist zur Beurteilung der Sensitivität der Moleküle durch Scherkräfte in der Entwicklung sinnvoll.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Entwicklung der Modelle, mit denen Degradation der Proteine, wie sie im Fill & Finish Prozess auftreten kann, simuliert werden kann. Bei Anwendung der Modelle sollte die statistische Relevanz der generierten Daten geprüft werden. Des Weiteren ist bei der Fortführung dieser Arbeit eine Untersuchung der Stabilität der Proteinlösung mit passivierten Edelstahlkugeln mit dem Mischer-Modell von Interesse. Hier könnte die Fragestellung verfolgt werden, in welchem Ausmaß sich eine Oberflächenbehandlung von Metall auf die Proteindegradation auswirkt.

Durch Anwendung der Simulations-Modelle kann innerhalb weniger Tage eine erste Aussage zur Stabilität der Proteinlösungen für die Verarbeitbarkeit im Abfüllprozess getroffen werden.

Da nur wenige Milliliter der Lösungen zur Versuchsdurchführung und Bewertung der Qualität benötigt werden, ist durch Nutzung der Modelle eine kosteneffiziente Entwicklung möglich.

7 Anhang

7.1 Geräte und Materialien

7.1.1 Geräte

7.1.1.1 Analysengeräte und Zubehör

- Dichte-Messgerät - Density Meter, Typ DMA 4500
Firma Anton Paar Germany GmbH, 73760 Ostfildern, Deutschland
- DSC - Kapillar-Zell-Mikrokalorimeter mit Autosampler, Typ VP-DSC
Firma MicroCal LL, Northampton, MA 01060, USA
- HP-SEC - Äkta Purifier 10 UV-900
Firma GE Healthcare, 79111 Freiburg, Deutschland
- Säule TSK-Gel G2000 SWXL, 7,8 × 3000 mm, Trennung 5 bis 150 kDa, Interferon- und BSA-Lösungen
Firma Tosoh Bioscience GmbH, 70567 Stuttgart, Deutschland
- Säule TSK-Gel G3000 SWXL, 7,8 × 3000 mm, Trennung 10 bis 500 kDa, Antikörperlösungen
Firma Tosoh Bioscience GmbH, 70567 Stuttgart, Deutschland
- Mobile Phase: 29,22 g/L NaCl, 8,80 g/L Na₂HPO₄ × 2H₂O, pH 7,0, Fließrate 1 mL/min
- Elutionslänge: 1,5 und 1,8 Säulenvolumen Antikörperlösungen, 1,5 Säulenvolumen BSA- und IFN-2 Lösungen, 2,0 Säulenvolumen IFN-1 Lösungen
- Vorlagebehälter: konisches PP Vial mit Septum
- Mikroskop - Olympus BX 50, Durchlichtmikroskop mit Digitalkamera DG-03
Firma Olympus, 20097 Hamburg, Deutschland
- Osmometer - Cryoscopic Osmometer, Osmomat 030
Firma GONOTEC GmbH, 10553 Berlin, Deutschland

Partikelzähler	<ul style="list-style-type: none">- FSV 0,5 - 100, Serien-Nr. 348, Messprinzip Lichtblockade, max. Konzentration 60.000 Partikel/mL Firma SfP GmbH, 75446 Wiernsheim, Deutschland- Messbereich: 0,5 bis 130 µm mit 16 Partikelgrößenkanälen- Fließgeschwindigkeit Lösung: 0,25 mL/s- Vorlagebehälter: 8 mL Rundbodenröhrchen
PCS	<ul style="list-style-type: none">- Zetasizer Nano ZS, Messbereich 0,6 nm bis 6 µm hydrodynamischer Durchmesser, Helium-Neon-Gas Laser 633 nm, Messwinkel 173° Firma Malvern Instruments Ltd., Worcestershire WR14 XZ, Großbritannien- Vorlagebehälter: Polystyrol Einmalküvette, halbmikro, 12,5 × 12,5 × 45 mm Firma Brand GmbH & Co. KG, 97861 Wertheim, Deutschland
pH-Meter	<ul style="list-style-type: none">- pH 340, Serien-Nr. 01050005 Firma WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, 82362 Weilheim, Deutschland
Temperaturmessgerät	<ul style="list-style-type: none">- testo 526 Firma testo AG, 79853 Lenzkirch, Deutschland
Tensiometer	<ul style="list-style-type: none">- DCAT 21 Firma DataPhysics Instruments GmbH, 70794 Filderstadt, Deutschland- Wasserbad F12 Firma Julabo Labortechnik GmbH, 77960 Seelbach, Deutschland

- Trübungsphotometer - Photometer 2100 AN, Wolframlampe, Wellenlängenfilter
Offline 400-600 nm, Genauigkeit laut Hersteller: $\pm 2 \%$ von 0 bis 1000 NTU
und $\pm 5 \%$ von 1000 bis 4000 NTU
- Vorlagebehälter: Rundküvette, Rollrandflasche $84 \times 13,3$ mm,
Glasart 1, klar
Firma Hach Lange GmbH, 40549 Düsseldorf, Deutschland
- Trübungsphotometer - Sensor DTF16-O, Halogenlampe, Wellenlängenbereich
Online 590-1100 nm, Detektor: drei Silizium-Photodioden, optische
Pfadlänge 80 mm
Firma optek-Danulat GmbH, 45356 Essen, Deutschland
- UV/VIS - Lambda 20, Zweistrahlenspektrometer, Monochromator mit
Spektrometer holographischem Gitter mit 1053 Linien/mm im Zentrum,
Deuterium- und Halogenlampe, Photodioden für Proben-
und Referenzstrahl, Wellenlängenbereich 190 bis 1100 nm
Firma Perkin Elmer GmbH, 88647 Überlingen, Deutschland
- Vorlagebehälter: Polystyrol Einmalküvette, halbmikro,
 $12,5 \times 12,5 \times 45$ mm
Firma Brand GmbH & Co. KG, 97861 Wertheim, Deutschland

7.1.1.2 Geräte und Zubehör Modellierung

- Abfüllmaschine - Typ EMD, ID 500087, Regler 10, Dosierung 310,0
- Abfüllpumpe 0,3 - 2,1 mL, NT 449518010L/0306, ID 21595,
Material hartverchromter Edelstahl
- Abfüllnadel Nr. 443200L, Innendurchmesser 1,6 mm,
Außendurchmesser 2,0 mm, Länge 122 mm, Material passivierter
Edelstahl
Firma Bausch & Ströbel, 74532 Ilshofen, Deutschland
- Durchflussregler - Schwebekörper, 0-2 L/h und 0-250 L/h
Firma Porter, Hatfield, Pennsylvania 19440-0907, USA

Dampfautoklav	- Dampfsterilisator, Typ Systec D Firma Systec GmbH, 35435 Wettenberg, Deutschland
Heißluftofen	- Typ T5050 E, Fabrik-Nr. 8615409 , Nenntemperatur 250 °C Firma Heraeus Holding GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Mischer	- Schüttelmischer, Turbula, System Schatz, Typ T2F mit Frequenzumrichter und Timer Firma Willy A. Bachofen AG, 4005 Basel, Schweiz
Peristaltikpumpe	- L/S, Einstellung Int, Size 14 Firma Masterflex, 77674 Kehl/Rhein, Deutschland
Scherstressapparatur	- Geräte-Nr. UH-PSA1 Firma BI (Eigenbau), 88397 Biberach, Deutschland
Schüttler	- Horizontalschüttler Firma Edmund Bühler GmbH, 72379 Hechingen, Deutschland
Waage	- AT261 Delta Range, Min. 1 mg, Max. 205 g Firma Mettler Toledo GmbH, 8606 Greifensee, Schweiz
Wasserbad	- Thermo Haake C25P, Nr. 12429, Typ F34 Firma Julabo Labortechnik GmbH, 77960 Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	- Biofuge primo Firma Heraeus, Buckinghamshire MK16 9QS, Großbritannien

7.1.2 Materialien

7.1.2.1 Substanzen

AK-1 (Modellprotein)	Stammlösung 54 mg/mL, Nr. 703201 Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
AK-2 (Modellprotein)	Stammlösung 10 mg/mL, Nr. 92078 Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
AK-3 (Modellprotein)	Stammlösung 2 mg/mL, Nr. 608098 und 608714 Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
Bernsteinsäure	$C_4H_6O_4$, CAS-Nr. 110-15-6, EG-Nr. 203-740-4, Art.-Nr. 42949, Lot-Nr. 707291, Order-Nr. 4884 Firma Kraemer & Martin GmbH, 53757 Sankt Augustin, Deutschland
BSA (Modellprotein)	CAS-Nr. 9048-46-8, EG-Nr. 232-936-2, Art.-Nr. 23517, Lot-Nr. 600778 + 702071 Firma Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, 30918 Seelze, Deutschland
Di-Natriumsuccinat-Hexahydrat	$C_4H_4Na_2O_4 \times 6H_2O$, CAS-Nr. 6106-21-4, EG-Nr. 205-778-7, Art.-Nr. 42950, Lot-Nr. 605857, Order-Nr. 43510 Firma Dr. Paul Lohmann GmbH KG, 31860 Emmerthal, Deutschland
Druckluft	Hausversorgung Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
Glycin	$C_2H_5NO_2$, CAS-Nr. 56-40-6, EG-Nr. 200-272-2, Art.-Nr. 26, Lot-Nr. 705216, Order-Nr. 47502 Firma Tessenderlo Group, 1050 Brüssel, Belgien

HA	20 %, 0,2 g/mL, Mat.-Nr. 35432, Ch.-B. 400003, WE-Datum 05.01.2004 Firma Grifols S.A., 08005 Barcelona, Spanien
IFN-1 (Modellprotein)	Stammlösung, 0,25 mg/mL, Nr. 46137 Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
IFN-2 (Modellprotein)	Stammlösung, 0,21 mg/mL, Nr. 403836 Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland
L-Histidin	$C_6H_9N_3O_2$, CAS-Nr. 71-00-1, EG-Nr. 200-745-3, Art.-Nr. 41774, Lot- Nr. 701397, Order-Nr. 48515 Firma S.A. Ajinomoto Omnicem N.V., 1348 Louvain-la-Neuve, Belgien
L-Histidin HCl- Monohydrat	$C_6H_9N_3O_2 \times HCl \times H_2O$, CAS-Nr. 5934-29-2, EG-Nr. 211-438-9, Art.-Nr. 63266, Lot-Nr. 601397 Firma S.A. Ajinomoto Omnicem N.V., 1348 Louvain-la-Neuve, Belgien
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$, CAS-Nr. 69-65-8, EG-Nr. 200-711-8, Art.-Nr. 41660 + 61212, Lot-Nr. 702874 + 706786, Order-Nr. 46503 + 46828 Firma Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Molekularmarker	Gel Filtration Standard, Kat.-Nr. 151-1901, Kontrolle 310005081 Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl, CAS-Nr. 7647-14-5, EG-Nr. 231-598-3, Art.-Nr. 41781, Lot- Nr. 704595 + 800536, Order-Nr. 46068 + 51558 + 51608 Firma Südsalz GmbH, 74076 Heilbronn, Deutschland

Natrium-Di-Hydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, CAS-Nr. 13472-35-0, Art.-Nr. 23898 + 67673, Lot-Nr. 703192 + 801015, Order Nr. 49846 Firma Dr. Paul Lohmann GmbH KG, 31860 Emmerthal, Deutschland
Natrium-Mono-Hydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, CAS-Nr. 10028-24-7, EG-Nr. 231-448-7, Art.-Nr. 23899, Lot-Nr. 705256, Order-Nr. 46532 Firma Chemische Fabrik Budenheim KG, 55257 Budenheim, Deutschland
PBS Dulbecco	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , Kat.-Nr. L182-50, Lot-Nr. 04585H Firma Biochrom AG, 12247 Berlin, Deutschland
Polysorbat 20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$, TW20, CAS-Nr. 9005-64-5, Art.-Nr. 39381, Lot-Nr. 600252, Order-Nr. 42687 Firma Dr. W. Kolb AG, 8908 Hedingen, Schweiz
Salzsäure	1 N, Charge HC747930, UN 1789 Firma Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Silikonölemulsion	Verdünnung 1:90 (w/w; Silikonöl : WFI), 35 % Dow Corning 365, Polydimethylsiloxan NF Emulsion, Zusammensetzung: Wasser, Polydimethylsiloxan, Natriumbenzoat, Propyl- und Methyl-Paraben, Sorbinsäure, Batch Nr. 0002048543, Mat.-Nr. 03126501, 1000 mm ² /s (\cong cSt), Art.-Nr. 32128, Ch.-B. 30656 Firma Biesterfeld Spezial-Chemie GmbH, 20095 Hamburg, Deutschland
Stickstoff	Hausversorgung Firma BI, 88397 Biberach, Deutschland

7.1.2.2 Materialien Modellierung

- Begasung**
- Kanüle Microlance 3, 20G 1 ½, 0,9 × 40, BD Plastipak 1 mL
Firma Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
- Deckglas**
- Verschluss Vials Mischer-Modell, rund, Durchmesser 16 mm
Firma Linkam Scientific Instruments, Surrey KT20 5LR,
Großbritannien
- Filter**
- 0,2 µm, Acrodisc, Supor Membran, Spritzenfilter, 13 mm, Low Protein Binding, steril, Filtration vor UV/VIS- und HP-SEC-Messung
Firma Pall GmbH, 63303 Dreieich, Deutschland
 - 0,2 µm, FP 30/0,2, CA-S, 7 bar max., Spritzenfilter, steril, Filtration vor UV/VIS- und HP-SEC-Messung
Firma Whatman GmbH, 37586 Dassel, Deutschland
 - 0,22 µm, Sterivex, GP, Kat.-Nr. SVGPB 1010, SVGPO 1050, steril, Filtration der Lösungen vor Versuchsbeginn
Firma Millipore S.A.S., 67124 Molsheim Cedex, Frankreich
- Glasbehälter**
- 20/25 mL Vials, Glasart 1, Röhrenglas, Art.-Bez. CRP-NBB-20 mL, 55,0 x 30,0 x 1,20, 25.04.2008, Clearline FC
Firma Schott AG, 55122 Mainz, Deutschland
 - 20 mL Ganzglasspritzen, Fortuna Optima, Luer-Lock-Metallkonus, Durobax, Glasart 1
Firma Poulten & Graf GmbH, 97877 Wertheim, Deutschland
 - 25 mL Glas Standzylinder, Duran
Firma Schott AG, 55122 Mainz, Deutschland
 - 100/120 mL Vials, Glasart 1, Röhrenglas, SAP-Nr. 36979, WE 606574 + 606575 + 606576 + 702643
Firma Schott AG, 55122 Mainz, Deutschland
 - 100 mL Glasflasche, Duran
Firma Schott AG, 55122 Mainz, Deutschland

- 250 mL Glas Standzylinder, Duran, verkürzt auf 110 mL
Firma Schott AG, 55122 Mainz, Deutschland
Chemische Zusammensetzung Glasart 1, Borosilikatglas (Kettelhoit, 2008)
 - 70 - 80 % SiO₂
 - 12 - 13 % B₂O₃
 - 2 % Al₂O₃
 - < 7 % Na₂O, K₂O
 - 0 % MgO, CaO, BaO

Kanüle Scherstress- - Innendurchmesser 0,6 mm, Länge 138 mm
apparatur - Innendurchmesser 2,0 mm, Länge 139 mm
Material nicht passivierter Edelstahl
Firma Askea Feinmechanik GmbH, 88279 Amtzell, Deutschland

Kugeln Präzisionskugeln

- PTFE, Durchmesser 4 mm +/- 0,025 mm, Lot Nr. 30409971-01
- Nicht passivierter Edelstahl, Niro AISI 316-L, V4A, Durchmesser 4 mm +/- 0,02 mm, Lot Nr. LA2/1274,
Chemische Zusammensetzung V4A (Henkel, 2003)
 - ca. 65 % Fe
 - 16 - 18 % Cr
 - 10 - 15 % Ni
 - 2- 3 % Mo
 - ≤ 0,02 % C
- Borosilikatglas, Durchmesser 4 mm +/- 0,02 mm, Lot Nr. 0337,
poliert
Firma Spherotech, 36041 Fulda, Deutschland

Parafilm - Parafilm M, Paraffin-Wachs und Polyolefin-Folie
Firma Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, 30918 Seelze,
Deutschland

-
- Pipetten
- Multipipette EDOS 5222 mit Combitip 50 mL, DNA frei
Firma Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
 - Pipette Reference und entsprechende Pipettenspitzen
 - 2 bis 20 μL
 - 10 bis 100 μL
 - 100 bis 1000 μL
 - 500 bis 2500 μLFirma Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland
 - 4 mL Vollpipette, EM, Techcolor, AS
Firma Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt, Deutschland
 - Einmalpipette costar, 10 mL in 1/10, steril
Firma Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, 30918 Seelze, Deutschland
- Probenahmebehälter
- 8 mL Rundbodenröhrchen Falcon, Polystyrol, steril
Firma Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
 - 15 mL, Polypropylen Röhrchen, steril
Firma Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
 - 50 mL Cellstar, Polypropylen Test Röhrchen, steril
Firma Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
 - 60 mL, 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL Flaschen, PETG (Nalgene), natur mit Verschluss, steril
Firma Thermo Fisher Scientific, New York 14625, USA
- Schläuche
- platin-katalysierte Silikonschläuche, Sani-Tech STHT-C
 - Innendurchmesser 3,3 mm, Außendurchmesser 7,85 mm, Länge 112,2 cm, Totvolumen 9,6 cm^3
 - Innendurchmesser 3,3 mm, Außendurchmesser 7,85 mm, Länge 150 cm, Totvolumen 12,83 cm^3
 - Innendurchmesser 4,75 mm, Außendurchmesser 9,47 mm, Länge 150 cm, Totvolumen 26,58 cm^3

- Innendurchmesser 5 mm, Außendurchmesser 9,4 mm, Länge 51,2 cm, Totvolumen 10,05 cm³

Firma ITE Intertechnik Elze, 31008 Elze, Deutschland

Spritzen

- Plastipak, 5, 10, 20, 50 mL, steril

Firma Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland

Stopfen

- Gummistopfen S10-F451 RS D777-1, B2-40, teflonisiert, Lot 710003

Firma West Pharmaceutical Services Deutschland GmbH & Co. KG, 52249 Eschweiler, Deutschland

7.2 Berechnungen

7.2.1 Reynolds-Zahlen

Ist die Reynolds-Zahl kleiner 2.320, dann ist der Verlauf der Rohrströmung laminar. Bei einer Reynolds-Zahl größer 2.320 liegt meist turbulente Strömung vor.

Die **Reynolds-Zahl** ist wie folgt definiert (Stricker, 1987):

$$Re = \frac{w \times d \times \rho}{\eta_{Dyn}} \quad \text{Gl. 7.1}$$

Re	Reynolds-Zahl	[]
w	Mittlere Geschwindigkeit	[m/s]
d	Rohrdurchmesser	[m]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
η_{Dyn}	Dynamische Viskosität	[kg/ms]

Dynamische Viskosität AK-3 Lösung bei 20 °C: $\eta_{Dyn} = 1,04 \text{ mPas} = 1,04 \times 10^{-3} \text{ kg/ms}$

Dichte AK-3 Lösung bei 20 °C: $\rho = 1,006 \text{ g/mL} = 1.006 \text{ kg/m}^3$

Tabelle 32: Reynolds-Zahlen zur Strömung der AK-3 Lösung

	d [m]	w [m/s]	Re
Scherstress-Modell			
Abfüllnadel	0,0016	1,74	2.693
Scherrate 8.696 s ⁻¹	0,002	2,17	4.198
Scherrate 72.150 s ⁻¹	0,0006	5,41	3.140
Peristaltikpumpen-Modell			
Schlauch Zulauf Trübungsphotometer	0,0033	0,02	64
Schlauch Rücklauf Trübungsphotometer	0,00475	0,01	46
Kolbenpumpen-Modell			
Abfüllnadel	0,0016	1,22	1.888
Pumpe Einlauf	0,003	0,48	1.393
Pumpe Auslauf	0,003	0,35	1.016
Kolben Befüllen	0,002	1,08	2.089
Kolben Entleeren	0,002	0,78	1.509

7.2.2 Scherung im Scherstress-Modell

7.2.2.1 Abfüllnadel im Produktionsmaßstab

Radius Abfüllnadel $r = 0,0008 \text{ m}$

Länge Abfüllnadel $l = 0,122 \text{ m}$

Volumenstrom

$$\dot{V} = 50 \frac{\text{Takte}}{30\text{s}} \times 2,1 \frac{\text{mL}}{\text{Takt}} = 3,5 \text{ mL/s} = 3,5 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$$

Geschwindigkeit

$$w = \frac{\dot{V}}{\pi \times r^2} = \frac{3,5 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (0,0008 \text{ m})^2} = 1,74 \text{ m/s} = 6,27 \text{ km/h}$$

Scherdauer

$$t_s = N \times \frac{l}{w} = 1 \times \frac{0,122 \text{ m} \times \text{s}}{1,74 \text{ m}} = 0,07 \text{ s}$$

Scherrate

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} = \frac{4 \times 3,5 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (0,0008 \text{ m})^3} = 8.704 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear

$$(\gamma\theta)_w = \dot{\gamma}_w \times t_s = 8.704 \text{ s}^{-1} \times 0,07 \text{ s} = 609$$

Mass Average Shear

$$(\gamma\theta)_{av} = \frac{16}{3} \times \frac{l}{d} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,122 \text{ m}}{0,0016 \text{ m}} \times 1 = 407$$

7.2.2.2 Scherrate 8.696 s^{-1}

Durchmesser Kanüle $d = 0,002 \text{ m}$ $r = 0,001 \text{ m}$

Länge Kanüle $l = 0,139 \text{ m}$

Volumenstrom $\dot{V} = 6,83 \text{ mL/s} = 6,83 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$

Geschwindigkeit

$$w = \frac{\dot{V}}{\pi \times r^2} = \frac{6,83 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2} = 2,17 \text{ m/s} = 7,83 \text{ km/h}$$

Scherrate

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} = \frac{4 \times 6,83 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (0,001 \text{ m})^3} = 8.696 \text{ s}^{-1}$$

Scherdauer

$$t_s = N \times \frac{l}{w} = 300 \times \frac{0,139 \text{ m} \times s}{2,17 \text{ m}} = 19,22 \text{ s}$$

Mass Wall Shear

$$(\gamma\theta)_w = \dot{\gamma}_w \times t_s = 8.696 \text{ s}^{-1} \times 19,22 \text{ s} = 1,67 \times 10^5$$

Mass Average Shear

$$(\gamma\theta)_{av} = \frac{16}{3} \times \frac{l}{d} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,139 \text{ m}}{0,002 \text{ m}} \times 300 = 1,11 \times 10^5$$

7.2.2.3 Scherrate 72.150 s⁻¹

Durchmesser Kanüle $d = 0,0006 \text{ m}$ $r = 0,0003 \text{ m}$

Länge Kanüle $l = 0,138 \text{ m}$

Volumenstrom $\dot{V} = 1,53 \text{ mL/s} = 1,53 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$

Geschwindigkeit

$$w = \frac{\dot{V}}{\pi \times r^2} = \frac{1,53 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 0,3^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 5,41 \text{ m/s} = 19,48 \text{ km/h}$$

Scherrate

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} = \frac{4 \times 1,53 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (0,0003 \text{ m})^3 \text{ s}} = 72.150 \text{ s}^{-1}$$

Scherdauer

$$t_s = N \times \frac{l}{w} = 300 \times \frac{0,138 \text{ m} \times s}{5,41 \text{ m}} = 7,65 \text{ s}$$

Mass Wall Shear

$$(\gamma\theta)_w = \dot{\gamma}_w \times t_s = 72.150 \text{ s}^{-1} \times 7,65 \text{ s} = 5,52 \times 10^5$$

Mass Average Shear

$$(\gamma\theta)_{av} = \frac{16}{3} \times \frac{l}{d} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,138 \text{ m}}{0,0006 \text{ m}} \times 300 = 3,68 \times 10^5$$

7.2.3 Scherraten und Kontaktzeiten im Peristaltikpumpen-Modell

7.2.3.1 Versuche mit und ohne Luftdurchfluss

Schlauch Zulauf (Z) Trübungsphotometer $d_Z = 0,0033 \text{ m}$ $r_Z = 0,00165 \text{ m}$

(ohne Luft) $l_Z = 1,122 \text{ m}$

Schlauch Rücklauf (R) Vorlagebehälter $d_R = 0,00475 \text{ m}$ $r_R = 0,002375 \text{ m}$

(mit Luft) $l_R = 1,5 \text{ m}$

Volumenstrom

$$\dot{V} = 10,7 \text{ mL} / \text{min} = 1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{s}$$

Scherrate

$$\dot{\gamma}_{WZ} = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r_Z^3} = \frac{4 \times 1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,00165 \text{ m})^3 \text{ s}} = 50,5 \text{ s}^{-1}$$

$$\dot{\gamma}_{WR} = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r_R^3} = \frac{4 \times 1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,002375 \text{ m})^3 \text{ s}} = 17,0 \text{ s}^{-1}$$

Geschwindigkeit

$$w_Z = \frac{\dot{V}}{\pi \times r_Z^2} = \frac{1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,00165 \text{ m})^2 \text{ s}} = 0,02 \text{ m} / \text{s} = 0,08 \text{ km} / \text{h}$$

$$w_R = \frac{\dot{V}}{\pi \times r_R^2} = \frac{1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,002375 \text{ m})^2 \text{ s}} = 0,01 \text{ m} / \text{s} = 0,04 \text{ km} / \text{h}$$

Anzahl Volumenwechsel (= Zyklen)

Die Anzahl der Volumenwechsel über die Schläuche wird über die Versuchsdauer, den Volumenstrom und das Gesamtvolumen definiert.

$$N = \frac{t \times \dot{V}}{V} \quad \text{Gl. 7.2}$$

N Anzahl Volumenwechsel/Zyklen

Passagen durch die Testsektion []

t Versuchsdauer $t = 330 \text{ min} = 19.800 \text{ s}$

\dot{V} Volumenstrom $\dot{V} = 1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{s}$

V Gesamtvolumen $V = 80 \text{ mL} = 80 \times 10^{-6} \text{ m}^3$

$$N = \frac{19.800 \text{ s} \times 1,783 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{80 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ s}} = 44,13$$

Kontaktzeit

$$t_{kZ} = N \times \frac{l_Z}{w_Z} = 44,13 \times \frac{1,122 \text{ ms}}{0,02 \text{ m}} = 2.476 \text{ s} = 41 \text{ min}$$

$$t_{kR} = N \times \frac{l_R}{w_R} = 44,13 \times \frac{1,5 \text{ ms}}{0,01 \text{ m}} = 6.620 \text{ s} = 1 \text{ h } 50 \text{ min}$$

Entsprechende Schlauchlänge nach Versuchsdauer von 30 Minuten

$$l_{Ges} = l_Z + l_R = 1,122 \text{ m} + 1,5 \text{ m} = 2,622 \text{ m}$$

$$N_{30 \text{ min}} = \frac{N \times 30 \text{ min}}{t} \quad \text{Gl. 7.3}$$

$N_{30 \text{ min}}$ Volumenwechsel nach 30 min []

t Versuchsdauer $t = 330 \text{ min}$

N Anzahl Volumenwechsel/Zyklen Passagen durch die Testsektion

$$N = 44,13$$

$$N_{30 \text{ min}} = \frac{N \times 30 \text{ min}}{t} = \frac{44,13 \times 30 \text{ min}}{330 \text{ min}} = 4,0$$

$$l_{30 \text{ min}} = l_{Ges} \times N_{30 \text{ min}} \quad \text{Gl. 7.4}$$

$l_{30 \text{ min}}$ Schlauchlänge nach 30 min [m]

l_{Ges} Schlauchlänge gesamt $l_{Ges} = 2,622 \text{ m}$

$$l_{30 \text{ min}} = 2,622 \text{ m} \times 4,0 = 10,5 \text{ m}$$

7.2.3.2 Versuche mit Erwärmen

Schlauch Zulauf (Z) Trübungsphotometer $d_Z = 0,0033 \text{ m}$ $r_Z = 0,00165 \text{ m}$

(ohne Luft) $l_Z = 1,5 \text{ m}$

Schlauch Rücklauf (R) Vorlagebehälter $d_R = 0,0033 \text{ m}$ $r_R = 0,00165 \text{ m}$

(mit Luft) $l_R = 1,122 \text{ m}$

Volumenstrom

$$\dot{V} = 17,83 \text{ mL} / \text{min} = 2,972 \times 10^{-7} \text{ m}^3 / \text{s}$$

Scherrate

$$\dot{\gamma}_W = \frac{4 \times \dot{V}}{\pi \times r^3} = \frac{4 \times 2,972 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,00165 \text{ m})^3 \text{ s}} = 84,24 \text{ s}^{-1}$$

Geschwindigkeit

$$w = \frac{\dot{V}}{\pi \times r^2} = \frac{2,972 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{\pi \times (0,00165 \text{ m})^2 \text{ s}} = 0,035 \text{ m/s} = 0,13 \text{ km/h}$$

Anzahl Volumenwechsel (= Zyklen)

$$\text{Versuchsdauer} \quad t = 150 \text{ min} = 9.000 \text{ s}$$

$$\text{Gesamtvolumen} \quad V = 40 \text{ mL} = 40 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$N = \frac{t \times \dot{V}}{V} = \frac{9.000 \text{ s} \times 2,972 \times 10^{-7} \text{ m}^3}{40 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ s}} = 66,87$$

Kontaktzeit

$$t_{kZ} = N \times \frac{l_Z}{w_Z} = 66,87 \times \frac{1,5 \text{ ms}}{0,035 \text{ m}} = 2.865,9 \text{ s} = 48 \text{ min}$$

$$t_{kR} = N \times \frac{l_R}{w_R} = 66,87 \times \frac{1,122 \text{ ms}}{0,035 \text{ m}} = 2.143,7 \text{ s} = 36 \text{ min}$$

7.2.4 Kugeln- und Gummistopfen-Oberflächen im Schüttler-Modell

Die für die Lösung zugängliche **Gesamtoberfläche** (A_{Ges}) eines Gummistopfens setzt sich zusammen aus:

- Fläche Halbkugel (HK) mit Radius $r_{HK} = 4,65 \text{ mm}$
- Mantelfläche (M) Kegelstumpf mit Außenradius $r_{Ma} = 6,6 \text{ mm}$, Innenradius $r_{Mi} = 5,8 \text{ mm}$, Höhe $h_M = 2,8 \text{ mm}$
- Fläche Kreisring (KR) mit Außenradius $r_{KRa} = 5,8 \text{ mm}$ und Innenradius $r_{KRi} = 4,5 \text{ mm}$

Die nicht vom Hersteller angegebenen Abmaße wurden aus der Zeichnung, Abbildung 7-19 abgemessen.

Fläche Halbkugel A_{HK}

$$A_{HK} = 2 \times \pi \times r_{HK}^2 \quad \text{Gl. 7.5}$$

$$A_{HK} = 2 \times \pi \times (4,65 \text{ mm})^2 = 135,86 \text{ mm}^2$$

Mantelfläche Kegelstumpf A_M

$$A_M = (r_{Ma} + r_{Mi}) \times \pi \times m \quad \text{Gl. 7.6}$$

m Länge Mantellinie [mm]

$$m = \sqrt{(r_{Ma} - r_{Mi})^2 + h_M^2} \quad \text{Gl. 7.7}$$

$$m = \sqrt{(6,6 \text{ mm} - 5,8 \text{ mm})^2 + (2,8 \text{ mm})^2} = 2,91 \text{ mm}$$

$$A_M = (6,6 \text{ mm} + 5,8 \text{ mm}) \times \pi \times 2,91 \text{ mm} = 113,36 \text{ mm}^2$$

Fläche Kreisring A_{KR}

$$A_{KR} = \pi \times (r_{KRa}^2 - r_{KRi}^2) \quad \text{Gl. 7.8}$$

$$A_{KR} = \pi \times ((5,8 \text{ mm})^2 - (4,5 \text{ mm})^2) = 42,07 \text{ mm}^2$$

Gesamtoberfläche A_{Ges}

$$A_{Ges} = A_{HK} + A_M + A_{KR} \quad \text{Gl. 7.9}$$

$$A_{Ges} = 135,86 \text{ mm}^2 + 113,36 \text{ mm}^2 + 42,07 \text{ mm}^2 = 291,29 \text{ mm}^2$$

Kugeloberfläche A_K

r_K Kugelradius $r_K = 2 \text{ mm}$

$$A_K = 4 \times \pi \times r_K^2 \quad \text{Gl. 7.10}$$

$$A_K (1 \text{ Kugel}) = 4 \times \pi \times (2 \text{ mm})^2 = 50,27 \text{ mm}^2$$

$$A_K (6 \text{ Kugeln}) = 301,62 \text{ mm}^2$$

$$A_K (60 \text{ Kugeln}) = 3.016,20 \text{ mm}^2$$

Kugelvolumen V_K

$$V_K = \frac{4}{3} \times \pi \times r_K^3 \quad \text{Gl. 7.11}$$

$$V_K (1 \text{ Kugel}) = \frac{4}{3} \times \pi \times (2 \text{ mm})^3 = 33,51 \text{ mm}^3$$

$$V_K (6 \text{ Kugeln}) = 201,06 \text{ mm}^3 = 0,2 \text{ mL}$$

$$V_K (60 \text{ Kugeln}) = 2.010,62 \text{ mm}^3 = 2,0 \text{ mL}$$

Innendurchmesser Vial $d_V = 4,46 \text{ cm}$ $r_V = 2,23 \text{ cm}$

Füllvolumen (0 Kugeln) $V_v(0 \text{ Kugeln}) = 20,0 \text{ cm}^3$

Füllvolumen (6 Kugeln) $V_v(6 \text{ Kugeln}) = 20,2 \text{ cm}^3$

Füllvolumen (60 Kugeln) $V_V(60 \text{ Kugeln}) = 22,0 \text{ cm}^3$

Füllhöhe Vial h_V

$$V_V = \pi \times r_V^2 \times h_V \quad \text{Gl. 7.12}$$

$$h_V = \frac{V_V}{\pi \times r_V^2} \quad \text{Gl. 7.13}$$

$$h_V(0 \text{ Kugeln}) = \frac{20,0 \text{ cm}^3}{\pi \times (2,23 \text{ cm})^2} = 1,28 \text{ cm}$$

$$h_V(6 \text{ Kugeln}) = \frac{20,2 \text{ cm}^3}{\pi \times (2,23 \text{ cm})^2} = 1,29 \text{ cm}$$

$$h_V(60 \text{ Kugeln}) = \frac{22,0 \text{ cm}^3}{\pi \times (2,23 \text{ cm})^2} = 1,41 \text{ cm}$$

Benetzte Glasoberfläche Vial A_V , Kontaktfläche im ruhenden Zustand

$$A_V = (2 \times \pi \times r_V \times h_V) + (\pi \times r_V^2) \quad \text{Gl. 7.14}$$

$$A_V(0 \text{ Kugeln}) = (2 \times \pi \times 2,23 \text{ cm} \times 1,28 \text{ cm}) + (\pi \times (2,23 \text{ cm})^2) = 33,56 \text{ cm}^2$$

$$A_V(6 \text{ Kugeln}) = (2 \times \pi \times 2,23 \text{ cm} \times 1,29 \text{ cm}) + (\pi \times (2,23 \text{ cm})^2) = 33,70 \text{ cm}^2$$

$$A_V(60 \text{ Kugeln}) = (2 \times \pi \times 2,23 \text{ cm} \times 1,41 \text{ cm}) + (\pi \times (2,23 \text{ cm})^2) = 35,38 \text{ cm}^2$$

7.2.5 Kugeloberflächen und -Volumen im Mischer-Modell

Die zur Berechnung von Kugeloberfläche und -Volumen verwendeten Formeln sind in Kapitel 7.2.4, Gl. 7.8 und Gl. 7.9 beschrieben.

Kugeloberfläche A_K

$$r_K \quad \text{Kugelradius} \quad r_K = 2 \text{ mm}$$

$$A_K(1 \text{ Kugel}) = 4 \times \pi \times r_K^2 = 4 \times \pi \times (2 \text{ mm})^2 = 50,27 \text{ mm}^2$$

$$A_K(150 \text{ Kugeln}) = 7.540,5 \text{ mm}^2 = 75,4 \text{ cm}^2$$

Kugelvolumen V_K

$$V_K(1 \text{ Kugel}) = \frac{4}{3} \times \pi \times r_K^3 = \frac{4}{3} \times \pi \times (2 \text{ mm})^3 = 33,51 \text{ mm}^3$$

$$V_K(150 \text{ Kugeln}) = 5.026,5 \text{ mm}^3 = 5,0 \text{ cm}^3 = 5,0 \text{ mL}$$

7.2.6 Scherung im Kolbenpumpen-Modell

7.2.6.1 Abfüllnadel

Innendurchmesser Nadel (N) $d_N = 1,6 \text{ mm}$ $r_N = 0,8 \text{ mm}$

Länge Abfüllnadel $l_N = 122 \text{ mm}$

Zeit Nadelentleerung $t_N = 0,8571 \text{ s}$

Volumenstrom in der Nadel und im Auslauf der Pumpe

$$\dot{V}_N = \dot{V}_{AP} = \frac{V}{t_N} = \frac{2,1 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{0,8571 \text{ s}} = 2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3 / \text{s}$$

Geschwindigkeit in der Nadel

$$w_N = \frac{\dot{V}_N}{\pi \times r_N^2} = \frac{2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 0,8^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 1,22 \text{ m/s} = 4,39 \text{ km/h}$$

Scherdauer in der Nadel

$$t_{sN} = N \times \frac{l_N}{w_N} = 300 \times \frac{0,122 \text{ m} \times \text{s}}{1,22 \text{ m}} = 30 \text{ s}$$

Scherrate in der Nadel

$$\dot{\gamma}_{WN} = \frac{4 \times \dot{V}_N}{\pi \times r_N^3} = \frac{4 \times 2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 0,8^3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}} = 6.093 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear in der Nadel

$$(\gamma\theta)_{WN} = \dot{\gamma}_{WN} \times t_{sN} = 6.093 \text{ s}^{-1} \times 30 \text{ s} = 1,8 \times 10^5$$

Mass Average Shear in der Nadel

$$(\gamma\theta)_{avN} = \frac{16}{3} \times \frac{l_N}{d_N} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,122 \text{ m}}{0,0016 \text{ m}} \times 300 = 1,2 \times 10^5$$

7.2.6.2 Abfüllpumpe

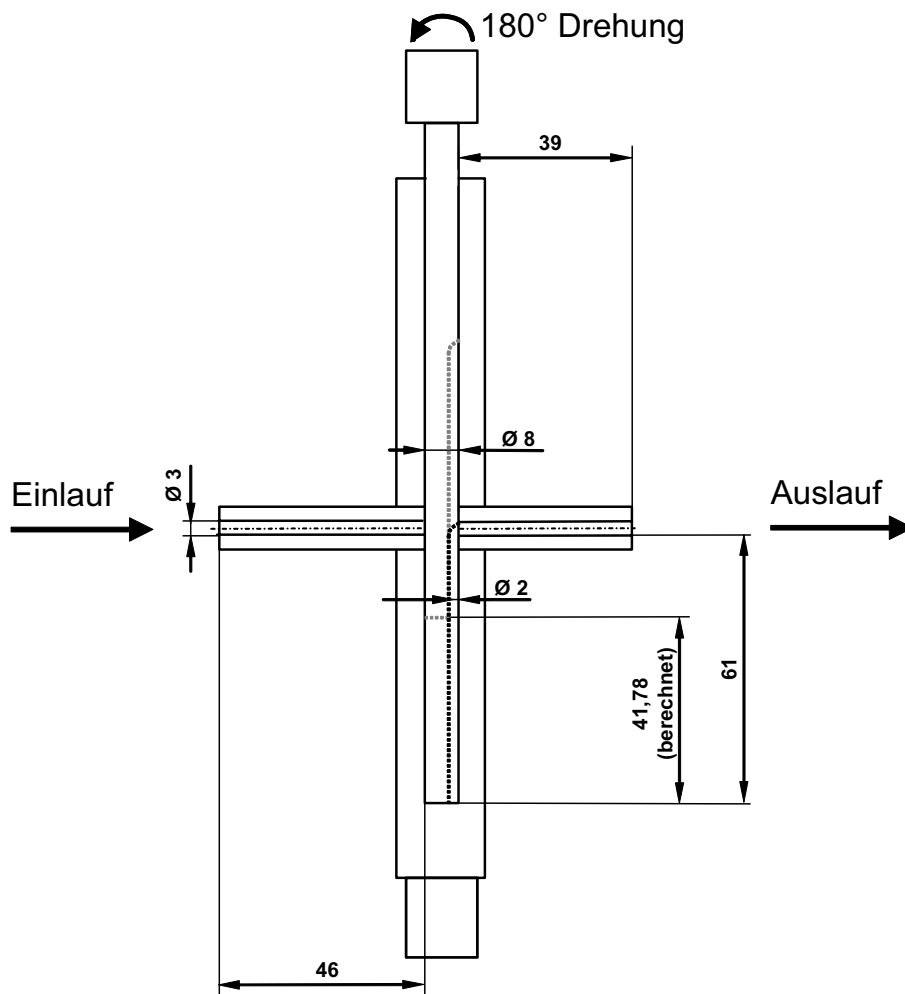


Abbildung 7-1: Zeichnung Drehkolbenpumpe; Maße in Millimeter; Maße wurden an der Pumpe ausgemessen und berechnet

Ein- und Auslauf Pumpe

Innendurchmesser Ein- und Auslauf Pumpe (P) $d_P = 3,0 \text{ mm}$ $r_P = 1,5 \text{ mm}$

Länge Pumpeneinlauf (EP) $l_{EP} = 0,046 \text{ m}$

Länge Pumpenauslauf (AP) $l_{AP} = 0,039 \text{ m}$

Zeit Pumpenbefüllung (P) $t_P = 0,6171 \text{ s}$

Einlauf PumpeVolumenstrom im Einlauf der Pumpe

$$\dot{V}_{EP} = \frac{V}{t_P} = \frac{2,1 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{0,6171 \text{ s}} = 3,40 \times 10^{-6} \text{ m}^3 / \text{s}$$

Geschwindigkeit im Einlauf der Pumpe

$$w_{EP} = \frac{\dot{V}_{EP}}{\pi \times r_p^2} = \frac{3,40 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,5^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 0,48 \text{ m/s} = 1,73 \text{ km/h}$$

Scherdauer im Einlauf der Pumpe

$$t_{sEP} = N \times \frac{l_{EP}}{w_{EP}} = 300 \times \frac{0,046 \text{ m} \times \text{s}}{0,48 \text{ m}} = 28,8 \text{ s}$$

Scherrate im Einlauf der Pumpe

$$\dot{\gamma}_{WEP} = \frac{4 \times \dot{V}_{EP}}{\pi \times r_p^3} = \frac{4 \times 3,40 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,5^3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}} = 1.283 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear im Einlauf der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{WEP} = \dot{\gamma}_{WEP} \times t_{sEP} = 1.283 \text{ s}^{-1} \times 28,8 \text{ s} = 3,7 \times 10^4$$

Mass Average Shear im Einlauf der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{avEP} = \frac{16}{3} \times \frac{l_{EP}}{d_p} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,046 \text{ m}}{0,003 \text{ m}} \times 300 = 2,5 \times 10^4$$

Auslauf PumpeGeschwindigkeit im Auslauf der Pumpe

$$w_{AP} = \frac{\dot{V}_{AP}}{\pi \times r_p^2} = \frac{2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,5^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 0,35 \text{ m/s} = 1,25 \text{ km/h}$$

Scherdauer im Auslauf der Pumpe

$$t_{sAP} = N \times \frac{l_{AP}}{w_{AP}} = 300 \times \frac{0,039 \text{ m} \times \text{s}}{0,35 \text{ m}} = 33,4 \text{ s}$$

Scherrate im Auslauf der Pumpe

$$\dot{\gamma}_{WAP} = \frac{4 \times \dot{V}_{AP}}{\pi \times r_p^3} = \frac{4 \times 2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,5^3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}} = 924 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear im Auslauf der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{WAP} = \dot{\gamma}_{WAP} \times t_{sAP} = 924 \text{ s}^{-1} \times 33,4 \text{ s} = 3,1 \times 10^4$$

Mass Average Shear im Auslauf der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{avAP} = \frac{16}{3} \times \frac{l_{AP}}{d_p} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,039 \text{ m}}{0,003 \text{ m}} \times 300 = 2,1 \times 10^4$$

→ Die Scherrate und der Mass Shear in der Abfüllnadel sind höher als im Pumpenein- und Auslauf.

Kolbenstange und Zylinder

Die Höhe des Kolbenhubs wurde mit dem eingestellten Volumen von 2,1 mL nach Gleichung 7.11 berechnet.

Innendurchmesser Zylinder $d = 8 \text{ mm}$ $r = 4 \text{ mm}$

$$h = \frac{V}{\pi \times r^2} = \frac{2,1 \text{ cm}^3}{\pi \times (4 \text{ mm})^2} = 41,78 \text{ mm}$$

Der Abstand des Pumpenein- und Auslaufs bis zum Boden des Zylinders beträgt 61 mm, Abbildung 7-1.

Die Kolbenstange bewegt sich beim Befüllen und Entleeren jeweils mit konstanter Geschwindigkeit nach oben und unten.

Die Lösung durchfließt zum Zeitpunkt Null des Befüllens 61 mm der Aussparung zwischen Kolbenstange und Zylinder. Bei einem Volumen von 2,1 mL im Zylinder, durchfließt die Lösung noch 19,22 mm (= 61 mm - 41,78 mm). Hieraus ergibt sich eine mittlere Weglänge von 40,11 mm (Mittelwert aus 61 mm + 19,22 mm) beim Befüllen und Entleeren des Zylinders. Für den Abstand zwischen Zylinder und Kolbenstange wurden 2,0 mm abgeschätzt und ein Kreis als Querschnitt angenommen.

Innendurchmesser Aussparung Kolbenstange (K) und Zylinder $d_K = 2 \text{ mm}$ $r_K = 1 \text{ mm}$

Mittlere Länge Kolbenstange (K) und Zylinder $l_K = 40,11 \text{ mm} = 0,040 \text{ m}$

Befüllen der Pumpe (KB)*Geschwindigkeit zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Befüllen der Pumpe*

$$w_{KB} = \frac{\dot{V}_{EP}}{\pi \times r_K^2} = \frac{3,40 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,0^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 1,08 \text{ m/s} = 3,90 \text{ km/h}$$

Scherdauer zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Befüllen der Pumpe

$$t_{sKB} = N \times \frac{l_K}{w_{KB}} = 300 \times \frac{0,040 \text{ m} \times \text{s}}{1,08 \text{ m}} = 11,11 \text{ s}$$

Scherrate zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Befüllen der Pumpe

$$\dot{\gamma}_{WKB} = \frac{4 \times \dot{V}_{EP}}{\pi \times r_K^3} = \frac{4 \times 3,40 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,0^3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}} = 4.329 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Befüllen der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{WKB} = \dot{\gamma}_{WKB} \times t_{sKB} = 4.329 \text{ s}^{-1} \times 11,11 \text{ s} = 4,8 \times 10^4$$

Mass Average Shear zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Befüllen der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{avKB} = \frac{16}{3} \times \frac{l_K}{d_K} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,040 \text{ m}}{0,002 \text{ m}} \times 300 = 3,2 \times 10^4$$

Entleeren der Pumpe (KE)Geschwindigkeit zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Entleeren der Pumpe

$$w_{KE} = \frac{\dot{V}_{AP}}{\pi \times r_K^2} = \frac{2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,0^2 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}} = 0,78 \text{ m/s} = 2,81 \text{ km/h}$$

Scherdauer zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Entleeren der Pumpe

$$t_{sKE} = N \times \frac{l_K}{w_{KE}} = 300 \times \frac{0,040 \text{ m} \times \text{s}}{0,78 \text{ m}} = 15,38 \text{ s}$$

Scherrate zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Entleeren der Pumpe

$$\dot{\gamma}_{WKE} = \frac{4 \times \dot{V}_{AP}}{\pi \times r_K^3} = \frac{4 \times 2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times 1,0^3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ s}} = 3.119 \text{ s}^{-1}$$

Mass Wall Shear zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Entleeren der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{WKE} = \dot{\gamma}_{WKE} \times t_{sKE} = 3.119 \text{ s}^{-1} \times 15,38 \text{ s} = 4,8 \times 10^4$$

Mass Average Shear zwischen Kolbenstange und Zylinder beim Entleeren der Pumpe

$$(\gamma\theta)_{avKE} = \frac{16}{3} \times \frac{l_K}{d_K} \times N = \frac{16}{3} \times \frac{0,040 \text{ m}}{0,002 \text{ m}} \times 300 = 3,2 \times 10^4$$

Mass Wall Shear Kolbenpumpe Gesamt

$$(\gamma\theta)_{WKGes} = (\gamma\theta)_{WKE} + (\gamma\theta)_{WKB} + (\gamma\theta)_{WEP} + (\gamma\theta)_{WAP} \quad \text{Gl. 7.15}$$

$$(\gamma\theta)_{WKGes} = 3,7 \times 10^4 + 3,1 \times 10^4 + 4,8 \times 10^4 + 4,8 \times 10^4 = 1,6 \times 10^5$$

Mass Average Shear Kolbenpumpe Gesamt

$$(\gamma\theta)_{avKGes} = (\gamma\theta)_{avKE} + (\gamma\theta)_{avKB} + (\gamma\theta)_{avEP} + (\gamma\theta)_{avAP} \quad \text{Gl. 7.16}$$

$$(\gamma\theta)_{avKGes} = 2,5 \times 10^4 + 2,1 \times 10^4 + 3,2 \times 10^4 + 3,2 \times 10^4 = 1,1 \times 10^5$$

7.2.6.3 Kontaktzeiten mit Silikonschläuchen und Metall (Pumpe und Nadel)

Silikonschläuche

Der mittlere Volumenstrom ergibt sich durch Halbierung des Volumenstroms von $2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3 / \text{s}$ beim Entleeren der Pumpe, da sich die Lösung zu 50 % der Taktzeit im ruhenden Zustand in den Schläuchen befindet.

Versuchdauer $t = 5 \text{ h } 30 \text{ min} = 330 \text{ min} = 19.800 \text{ s}$

Gesamtvolumen $V = 80 \text{ mL}$

Mittlerer Volumenstrom Schlauch (S) $\dot{V}_S = \frac{2,45 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{2 \text{ s}} = 1,225 \times 10^{-6} \text{ m}^3 / \text{s}$

$$N = \frac{t \times \dot{V}_S}{V} = \frac{19.800 \text{ s} \times 1,225 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{80 \times 10^{-6} \text{ m}^3} = 303$$

Es wurde mit 300 Volumenwechseln gerechnet.

Zulauf Kolbenpumpe Schlauch 1: $r_1 = 2,5 \text{ mm}$ $l_1 = 0,512 \text{ m}$

Auslauf Kolbenpumpe Schlauch 2: $r_2 = 1,65 \text{ mm}$ $l_2 = 1,122 \text{ m}$

Auslauf Trübungssensor Schlauch 3: $r_3 = 2,375 \text{ mm}$ $l_3 = 1,5 \text{ m}$

Mittlere Geschwindigkeiten der drei Schläuche

$$w_1 = \frac{\dot{V}_S}{\pi \times r_1^2} = \frac{1,225 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (2,5 \text{ mm})^2 \text{ s}} = 0,062 \text{ m} / \text{s}$$

$$w_2 = \frac{\dot{V}_S}{\pi \times r_2^2} = \frac{1,225 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (1,65 \text{ mm})^2 \text{ s}} = 0,143 \text{ m} / \text{s}$$

$$w_3 = \frac{\dot{V}_S}{\pi \times r_3^2} = \frac{1,225 \times 10^{-6} \text{ m}^3}{\pi \times (2,375 \text{ mm})^2 \text{ s}} = 0,069 \text{ m} / \text{s}$$

Kontaktzeit der Lösung mit den drei Schläuchen

$$t_{k1} = N \times \frac{l_1}{w_1} = 300 \times \frac{0,512 \text{ ms}}{0,062 \text{ m}} = 41 \text{ min}$$

$$t_{k2} = N \times \frac{l_2}{w_2} = 300 \times \frac{1,122 \text{ ms}}{0,143 \text{ m}} = 39 \text{ min}$$

$$t_{k3} = N \times \frac{l_3}{w_3} = 300 \times \frac{1,50 \text{ ms}}{0,069 \text{ m}} = 109 \text{ min}$$

Gesamtkontaktzeit der Lösung mit Silikonschläuchen

$$t_{kGes} = t_{k1} + t_{k2} + t_{k3} \quad \text{Gl. 7.17}$$

$$t_{kGes} = 41 \text{ min} + 39 \text{ min} + 109 \text{ min} = 3 \text{ h } 9 \text{ min}$$

MetallGesamtkontaktzeit der Lösung mit Metall

Die Gesamtkontaktzeit mit Metall setzt sich zusammen aus der Kontaktzeit im ruhenden Zustand und im dynamischen Zustand der Lösung.

$$t_{kGes} = 2 \times t_{sN} + 2 \times t_{sEP} + 2 \times t_{sAP} + 2 \times t_{180^\circ \text{ Drehung}} + t_{sZB} + t_{sZE} \quad \text{Gl. 7.18}$$

$$t_{kGes} = 2 \times 30 \text{ s} + 2 \times 28,8 \text{ s} + 2 \times 33,4 \text{ s} + 300 \times 0,24 \text{ s} + 11,11 \text{ s} + 15,38 \text{ s} = 4 \text{ min } 43 \text{ s}$$

7.3 Weitere Tabellen und Abbildungen

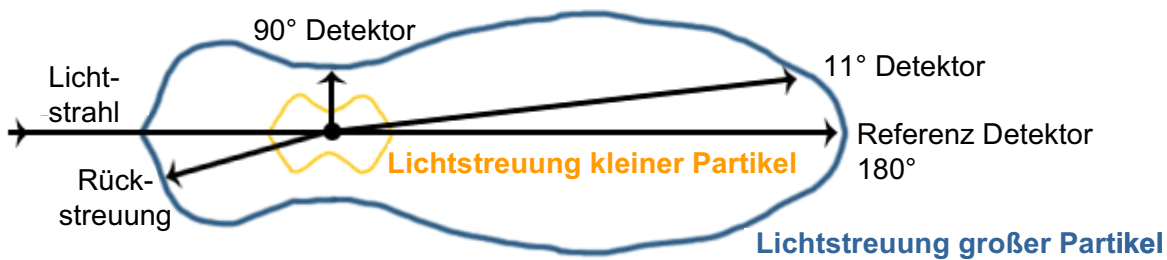


Abbildung 7-2: Messwinkel Trübungssensor (optek-Danulat GmbH, 2009)

Tabelle 33: Makroskopische Beurteilung der Lösungen während und nach den Versuchen mit dem Peristaltikpumpen-Modell; rot = Versuche mit Erwärmen, grün = Versuch ohne Luft, blau = Versuch mit Kontakt zu Luftblasen

Versuchs-Nr.	Farbe, Aussehen	Faserartige Partikel	Kugelförmige Partikel	Schaum	Rückstand am Flüssigkeitsspiegel
AK-1_T	Leicht milchig	---	---	Einzelne Blasen	---
AK-1	Leicht milchig	---	---	---	---
AK-1_L	Leicht milchig	---	---	Einzelne Blasen	Lässt sich durch Schwenken lösen
AK-2_T	Milchig	---	---	---	lässt sich z.T. durch Schwenken lösen
AK-2	Leicht bläulich	---	---	---	---
AK-2_L	Leicht Milchig	9 min nach Versuchsbeginn	---	Einzelne Blasen	Lässt sich durch Schwenken lösen
AK-3_T	Milchig	---	---	---	---
AK-3	Milchig	---	Mehrere (Abbildung 5-8)	Einzelne Blasen	---
AK-3_L1 bis L3	Leicht milchig	Mehrere lange, flotieren nach wenigen Minuten nach Versuchsbeginn (Abbildung 5-8)	---	Einzelne Blasen	Lässt sich durch Schwenken lösen
AK-3_L_Tween ¹⁴	Farblos, Klar	Einzelne Fasern am Versuchs-ende	---	---	leichter „Fett-Rand“

¹⁴ Luftblasen in Schlauch: Anfang Versuch ca. 4 mm Durchmesser, Ende Versuch ca. 20 mm.

Tabelle 33: Makroskopische Beurteilung der Lösungen während und nach den Versuchen mit dem Peristaltikpumpen-Modell; rot = Versuche mit Erwärmen, grün = Versuch ohne Luft, blau = Versuch mit Kontakt zu Luftblasen (Fortsetzung)

Versuchs-Nr.	Farbe, Aussehen	Faserartige Partikel	Kugelförmige Partikel	Schaum	Rückstand am Flüssigkeitsspiegel
IFN-1_T	Leicht milchig	---	---	Oberfläche bedeckt	lässt sich nicht durch Schwenken lösen
IFN-1	Leicht milchig	---	---	Mehrere cm über Flüssigkeitsspiegel	---
IFN-1_L	Leicht milchig	---	---	Stark zu Versuchsbeginn, ca. 6 cm über Flüssigkeitsspiegel, kleine Luftblasen in Schlauch ca. 2 mm	---
BSA_T	Leicht milchig	---	---	---	lässt sich z.T. durch Schwenken lösen
BSA	Farblos, Klar	---	---	Oberfläche bedeckt	---
BSA_L	Leicht milchig	---	---	Mehrere cm über Flüssigkeitsspiegel	---
IFN-2_T	Farblos, Klar	---	Wenige	---	leichter „Fett-Rand“
IFN-2	Farblos, Klar	---	---	---	---
IFN-2_L	Farblos, Klar	7 min nach Versuchsbeginn einzelne Fasern	---	---	---

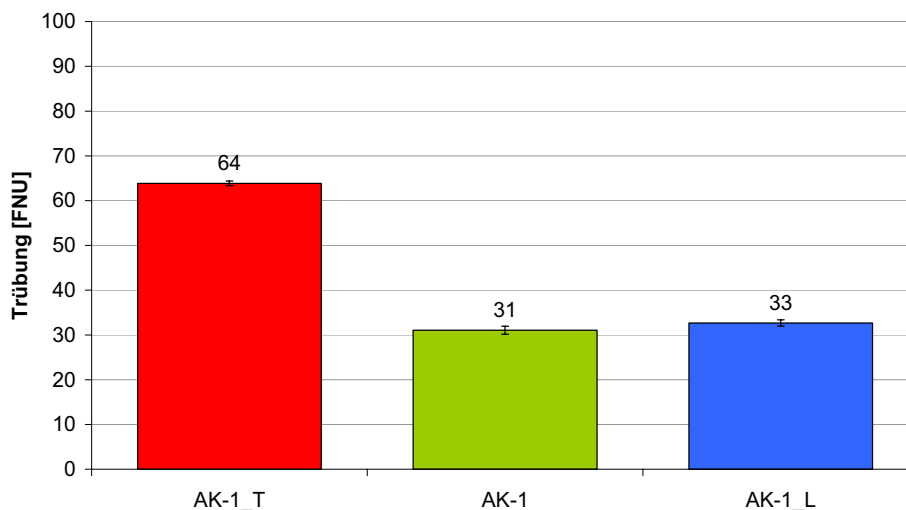


Abbildung 7-3: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der AK-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

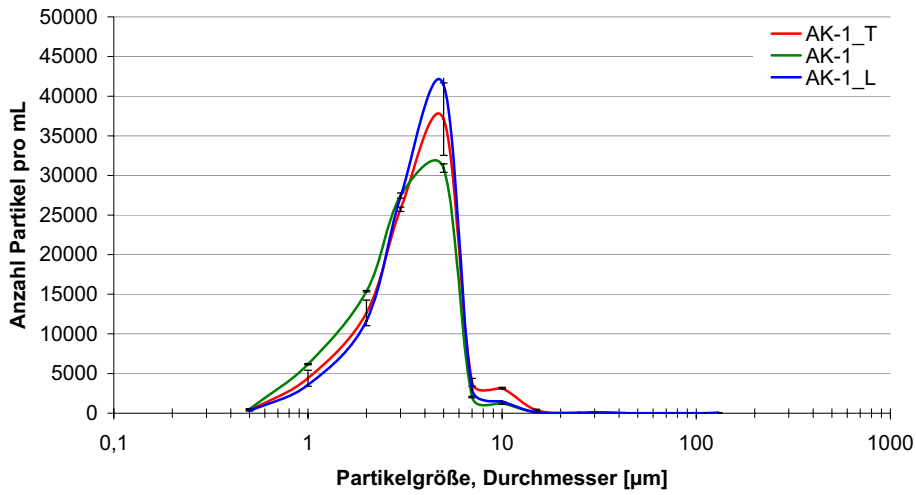


Abbildung 7-4: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

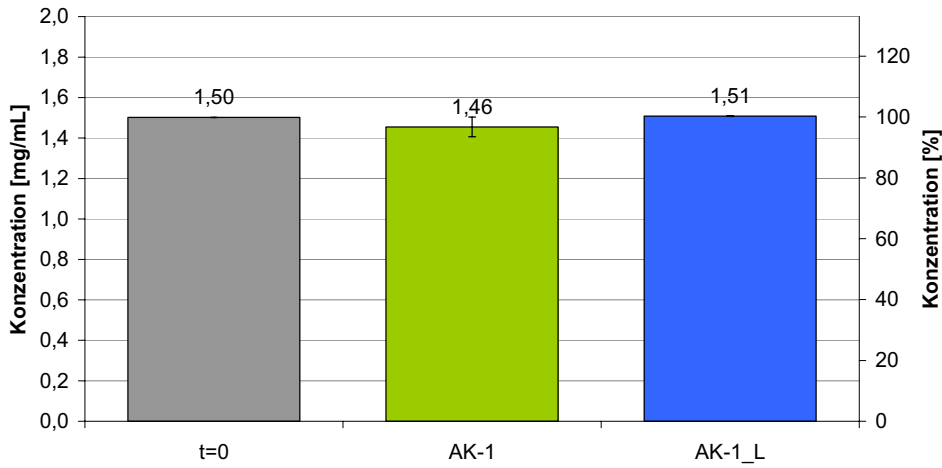


Abbildung 7-5: Ergebnisse Proteinkonzentrationen der AK-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; die Probe AK-1_T war nicht auswertbar, aufgrund erhöhten Streulichtanteils

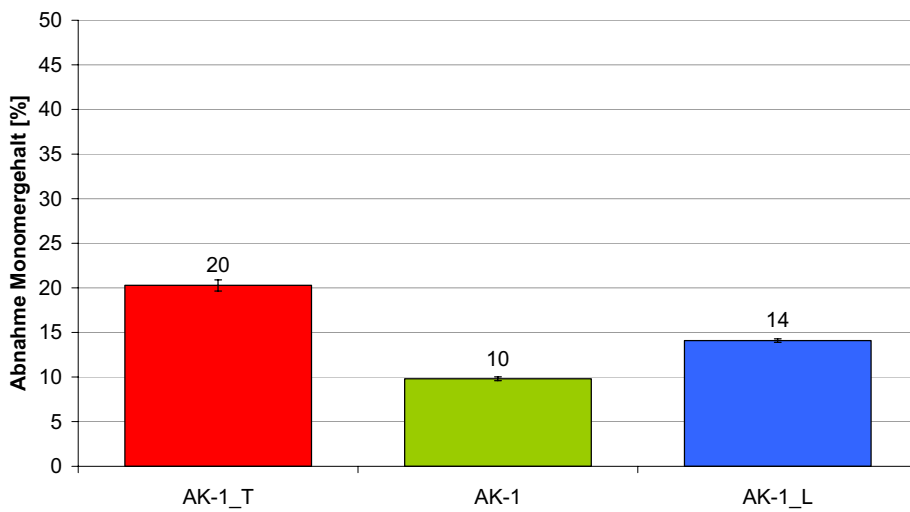


Abbildung 7-6: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt der AK-1 Lösungen bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

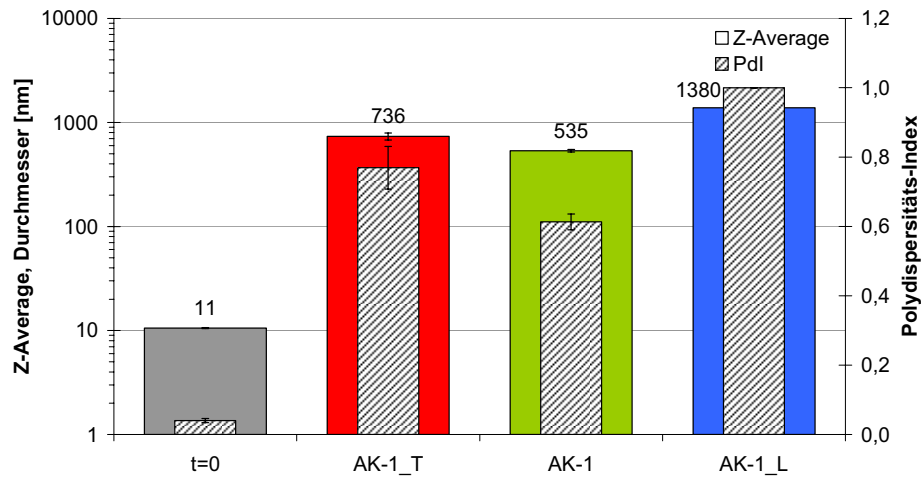


Abbildung 7-7: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der AK-1 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

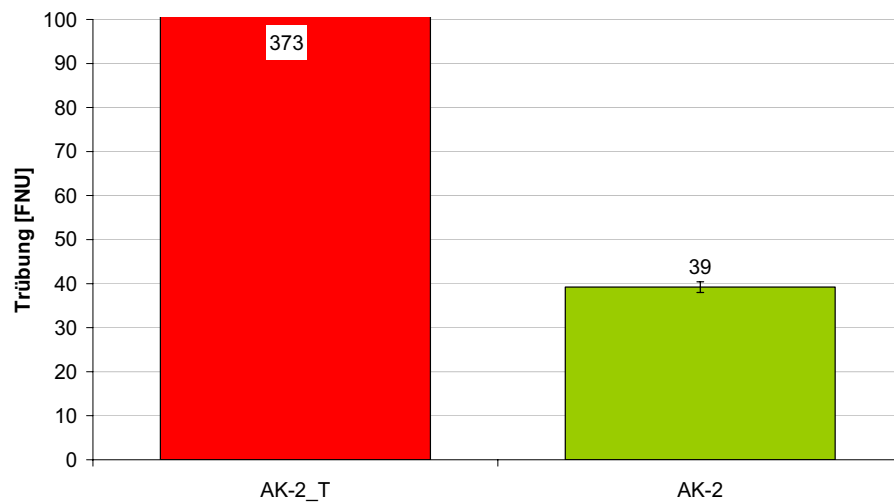


Abbildung 7-8: Ergebnisse Offline-Trübungsmessung der AK-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; die Probe AK-2_L war nicht auswertbar, aufgrund von Sedimentation

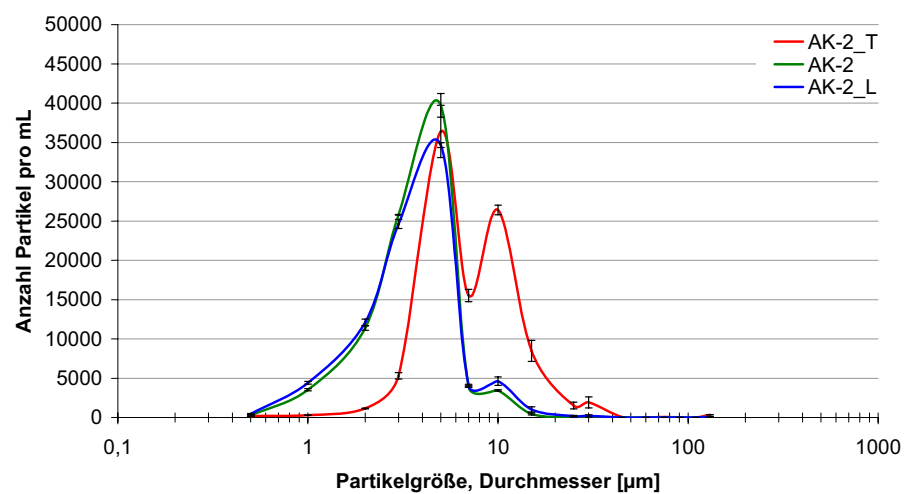


Abbildung 7-9: Ergebnisse Partikelbestimmung der AK-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

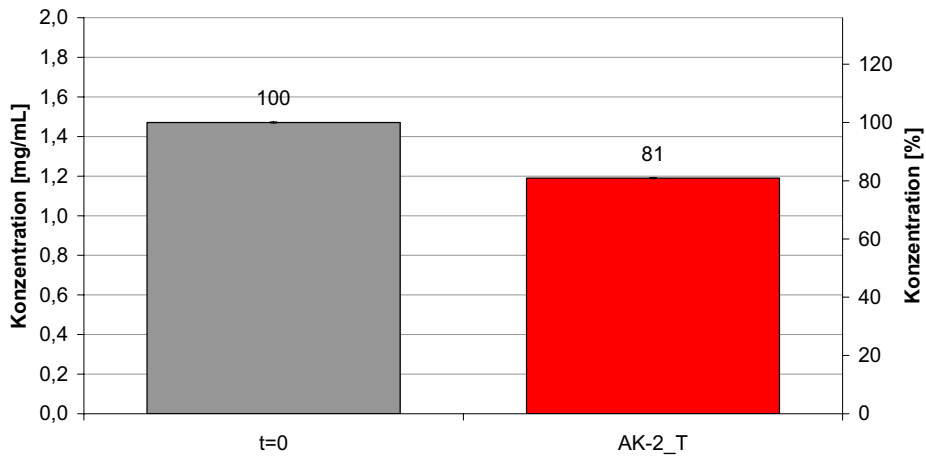


Abbildung 7-10: Ergebnisse Bestimmung der Proteinkonzentrationen der AK-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell; die Proben AK-2 und AK-2_L waren nicht auswertbar, aufgrund erhöhter Streulichtanteile

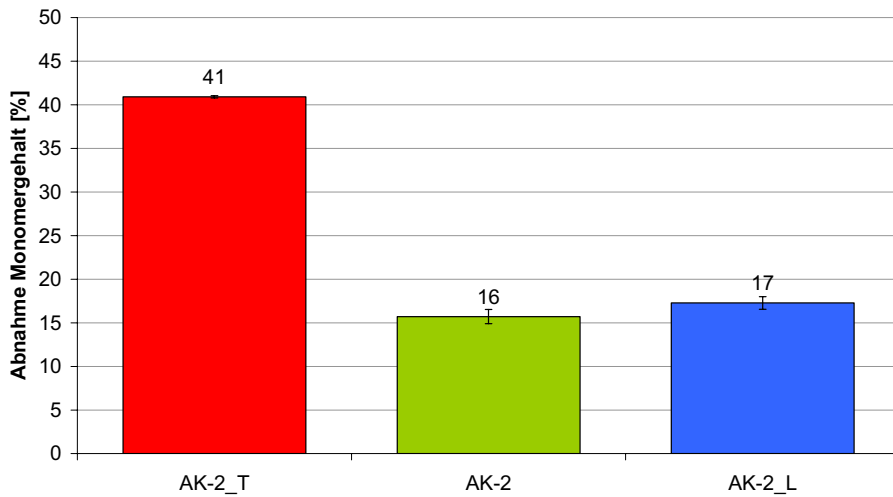


Abbildung 7-11: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt der AK-2 Lösungen bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

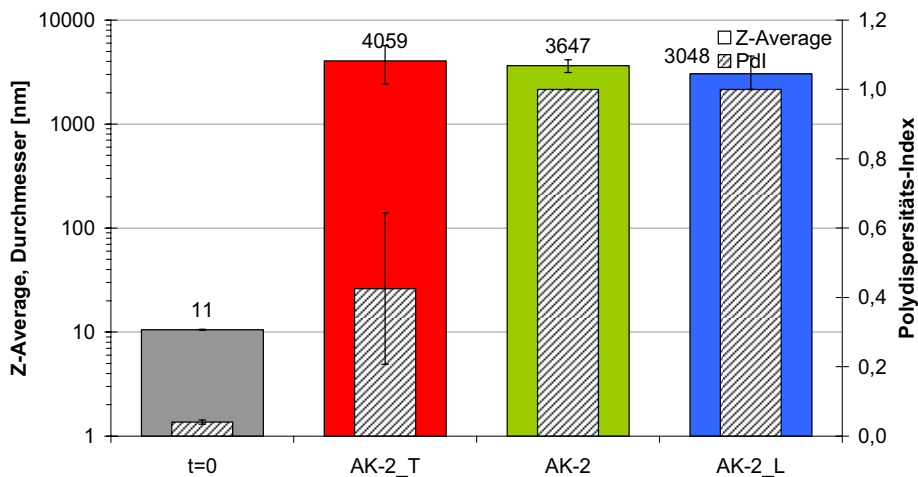


Abbildung 7-12: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der AK-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

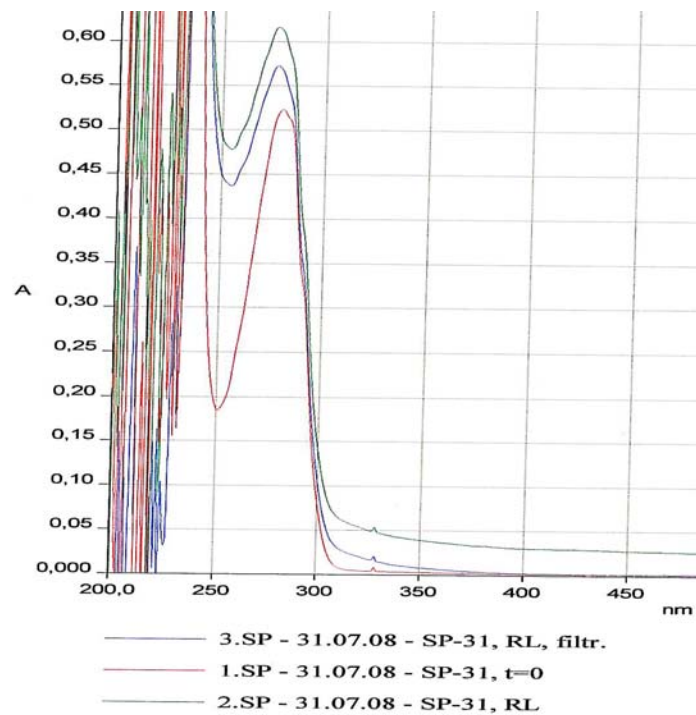


Abbildung 7-13: UV/VIS-Spektren der AK-2 Lösungen mit Kontakt zu Luftblasen (AK-2_L), Peristaltikpumpen-Modell; „RL, filtr.“ (blaue Linie) entspricht filtrierte Lösung nach Versuchsende; „t=0“ (rote Linie) entspricht Ausgangslösung (eingescanntes Spektrum von Ausdruck)

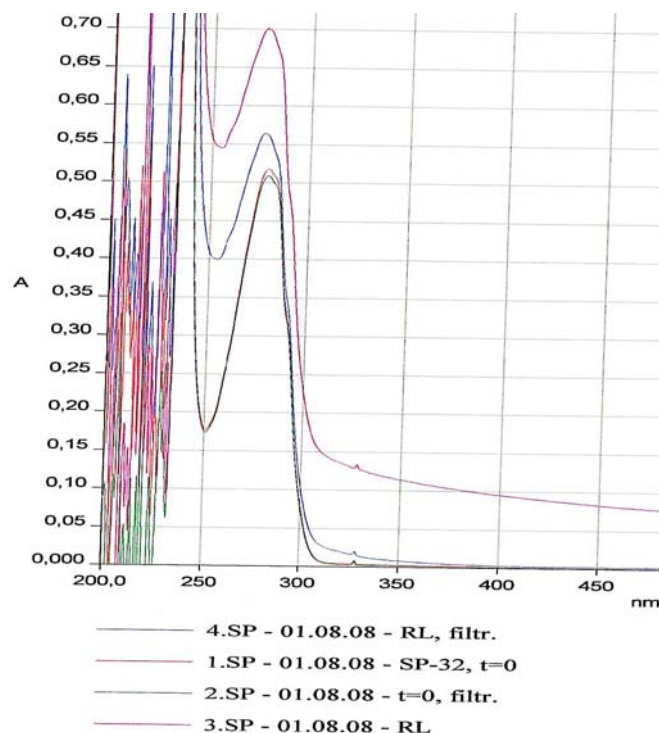


Abbildung 7-14: UV/VIS-Spektren der AK-2 Lösungen ohne Kontakt zu Luftblasen bei RT (AK-2), Peristaltikpumpen-Modell; „RL, filtr.“ (blaue Linie) entspricht filtrierte Lösung nach Versuchsende; „t=0“ (rote Linie) und „t=0, filtr.“ (grüne Linie) entsprechen Ausgangslösungen (eingescanntes Spektrum von Ausdruck)

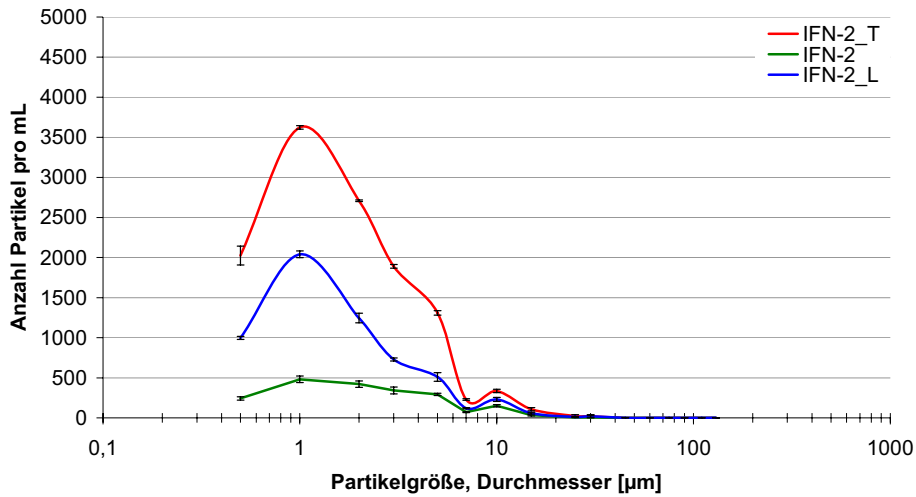


Abbildung 7-15: Ergebnisse Partikelbestimmung der IFN-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

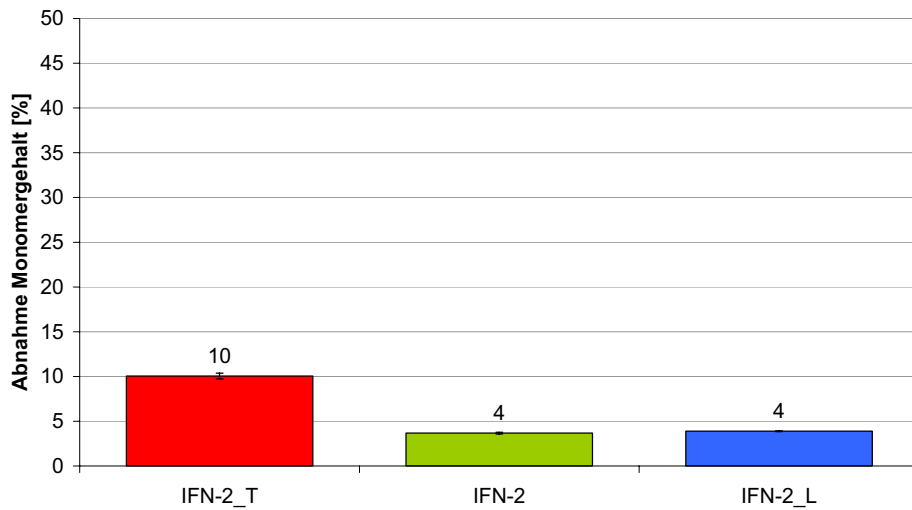


Abbildung 7-16: Ergebnisse Abnahme Monomergehalt der IFN-2 Lösungen bezogen auf die Ausgangslösung, Peristaltikpumpen-Modell

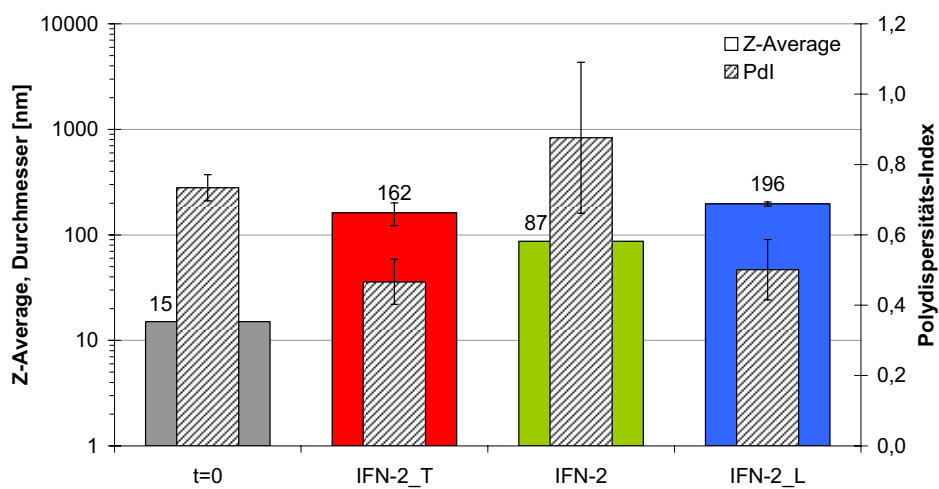


Abbildung 7-17: Ergebnisse mittlere hydrodynamische Durchmesser, Z-Average (ausgefüllte Säulen) und PDI (schraffierte Säulen) der IFN-2 Lösungen, Peristaltikpumpen-Modell

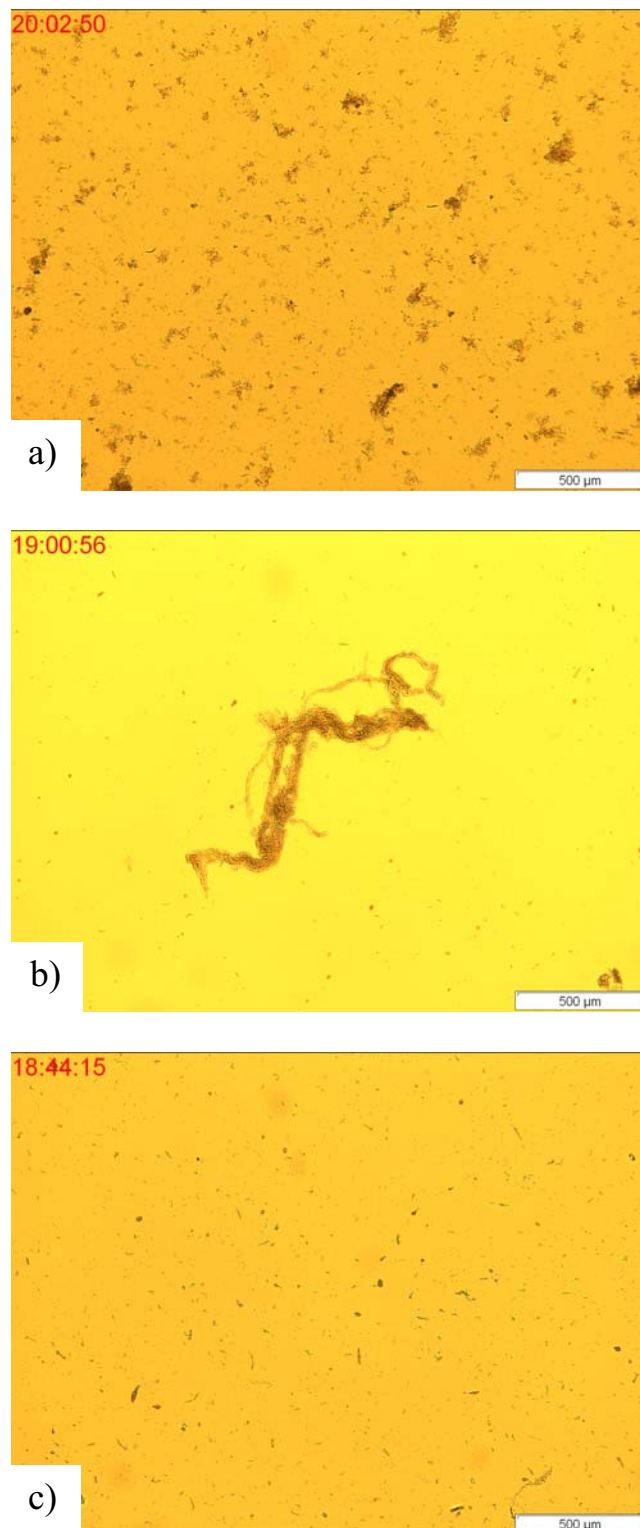
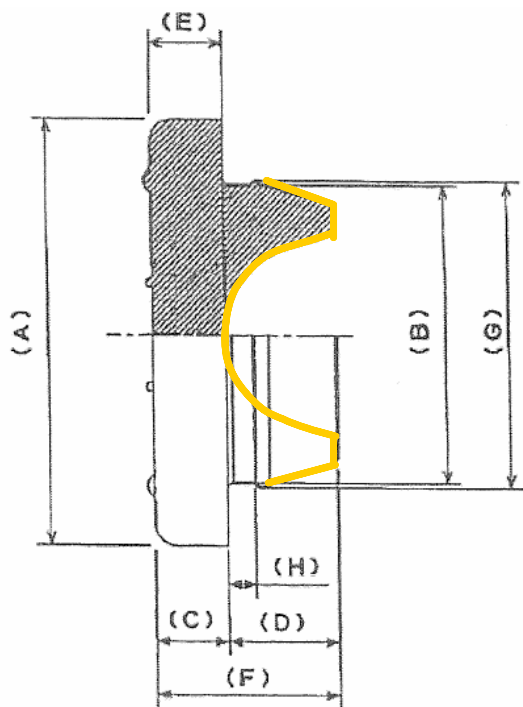


Abbildung 7-18: Lichtmikroskopische Aufnahmen, Peristaltikpumpen-Modell; Lösung am Ende der Versuche; 100fache Vergrößerung; a) Erhitzt 60 °C; b) mit Luftblasenkontakt; c) ohne Luftblasenkontakt



Formulation: D777-1			
* A	B	* C	D
18.80	13.20	3.30	5.00
* E	* F	G	H
9.30	8.30	13.50	1.90

Abbildung 7-19: Gummistopfen S10-F451 RS D777-1; produktberührender Bereich ist gelb markiert; Maße der Tabelle in Millimeter; Zeichnung der Firma West Pharmaceutical Services Deutschland GmbH & Co. KG

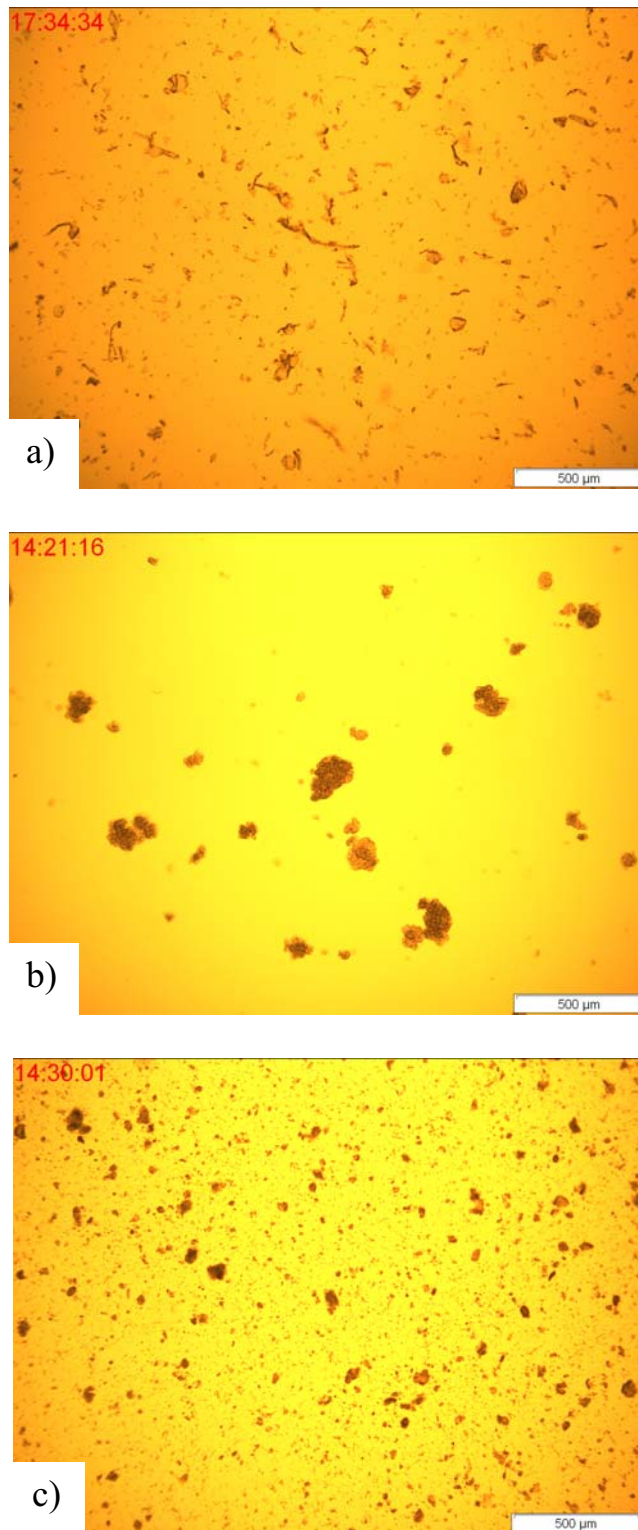


Abbildung 7-20: Lichtmikroskopische Aufnahmen, Schüttler-Modell; Lösungen nach 27 bzw. 28 Tagen Schütteln; 100fache Vergrößerung; a) 0 Kugeln; b) 6 PTFE-Kugeln; c) 60 PTFE-Kugeln

Tabelle 34: Makroskopische Beurteilung der Lösungen des Mischer-Modells über die Versuchsdauer bis sieben Tage

Kontaktmaterial	Anzahl Kugeln	Farbe, Aussehen	Faserartige Partikel	Kugelförmige Partikel
--- (voll befüllt)	0	Klar, farblos	Keine	Keine
Luft	0	Milchig	Viele (sedimentieren, flotieren)	Viele (sedimentieren, flotieren)
Glas	1	Klar, farblos	Mehrere	Mehrere
Metall	1	Klar, farblos	Mehrere	Mehrere
Glas	150	Klar, farblos	Keine	Keine
Silikonisiertes Glas	150	Milchig	Keine	Keine
PTFE	150	Milchig	Keine	Keine
Metall	150	Milchig, leicht gelblich bis bräunlich	Keine	Keine

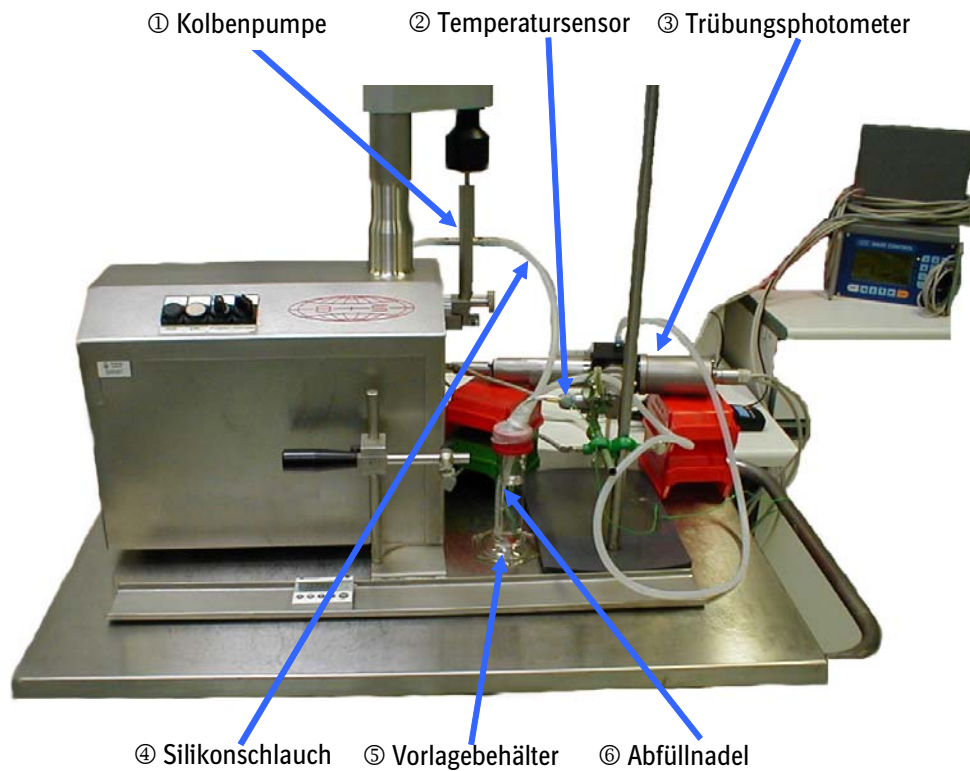
**Abbildung 7-21:** Foto des Versuchsaufbaus Kolbenpumpen-Modell; halbautomatische Kolbenpumpen-Abfüllmaschine

Tabelle 35: Beispiele für Degradation im Fill & Finish Prozess; Ergebnisse Antikörperlösung (AK-3); Werte übernommen bzw. abgeschätzt, unter der Annahme von linearer Zersetzung über die Versuchsdauer

Prüfpunkt Methode	Abfüllpumpe, - Nadel, Silikon- schlauch ca. 3 m	Silikon- schlauch, ca. 10 m	PTFE beschichteter Gummistopfen, $d=20$ mm, mit Luftkontakt, <math>A(\text{Stopfen})/ V(\text{Lösung}) =</math> $3 \text{ cm}^2/20 \text{ mL}$	Schäumen in Behälter, Grenzfläche Luft, $V(\text{Luft})/V$ $(\text{Lösung}) =$ $5 \text{ mL}/20 \text{ mL}$
Datenquelle	Kolbenpumpen- Modell, ein Zyklus	Peristaltik- pumpen- Modell, nach 30 min ohne Luftzusatz	Schüttler- Modell, ein Tag, 6 PTFE Kugeln	Mischer- Modell, ein Tag, Luft
Abnahme Monomergehalt HP-SEC [%]	0,1 ¹⁵	4 ¹⁵	0	0
Zunahme hydrodynamischer Durchmesser, Z-Average PCS [nm]	4 ¹⁵	620 ¹⁵	1	> 1.000
Zunahme Trübung Offline [FNU]	0,1 ¹⁵	3 ¹⁵	8	21
Zunahme unlösliche Aggregate UV/VIS Spektroskopie [%]	0,1 ¹⁵	0,7 ¹⁵	10	12
Zunahme Partikel $\geq 0,5 \mu\text{m}$ Lichtblockade [Anzahl Partikel/mL]	200 ¹⁵	8.000 ¹⁵	12.000	> 60.000

¹⁵ Schätzwerte unter der Annahme linearer Zersetzung.

Tabelle 36: Beispiele für Grenzflächen und Kontaktzeiten zwischen Materialien und Proteinlösung im Fill & Finish Prozess und als Vergleich im Mischer-Modell

Beispiele	Material	Oberfläche [cm ²]	Volumen Lösung [cm ³]	A/V [cm ² /cm ³]	Kontaktdauer
Gummistopfen auf Vial, $d=20$ mm (lösungsberührender Bereich)	PTFE	3	20	0,15	Sekunden bis Jahre (je nach Lagerposition)
100 mL Vial mit 20 mL Lösung	Luft	16	20	0,8	Monate bis Jahre
100 mL Vial mit 20 mL Lösung	Glas	30	20	1,5	Monate bis Jahre
Silikonschlauch, $d=3,3$ mm, $l=10$ m	Silikon- schlauch	1.037	86	13	Sekunden bis Minuten
Abfüllnadel, $r=0,8$ mm, $l=122$ mm	Metall	6	0,25	24	Sekunden
Mischer-Modell, 150 Kugeln	Metall, Glas, PTFE	75	20	3,8	Tage

8 Literaturverzeichnis

Banga, A. K.; 2005. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. CRC Taylor & Francis: New York. Edition: 2. ISBN: 0-8493-1630-8.

Beverung, C. J., Radke, C. J., Blanch, H. W.; 1999. *Protein adsorption at the oil/water interface: Characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements*. *Biophysical Chemistry*, 81 (1): 59-80.

Bohl, W.; 1982. *Technische Strömungslehre*. Vogel-Buchverlag: Würzburg. Edition: 5. ISBN: 3-8023-0036-X.

Böhme, G.; 2000. *Strömungsmechanik nichtnewtonscher Fluide*. B. G. Teubner: Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden. Edition: 2. ISBN: 3-519-12354-1.

Burke, C. J.; 1992. *The adsorption of proteins to pharmaceutical container surfaces*. *International Journal of Pharmaceutics*, 86 (1): 89-93.

Carpenter, J. F., Randolph, T. W., Jiskoot, W. I. M., Crommelin, D. J. A., Middaugh, C. R., Winter, G., Ying-Xin, F. A. N., Kirshner, S., Verthelyi, D., Kozlowski, S., Clouse, K. A., Swann, P. G., Rosenberg, A. M. Y., Cherney, B.; 2009. *Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (4): 1201-1205.

Charm, S. E., Wong, B. L.; 1970a. *Enzyme inactivation with shearing*. *Biotechnology and Bioengineering*, 12 (6): 1103-1109.

Charm, S. E., Wong, B. L.; 1970b. *Shear degradation of fibrinogen in the circulation*. *Science*, 170 (3956): 466-468.

Charm, S. E., Wong, B. L.; 1981. *Shear effects on enzymes*. *Enzyme and Microbial Technology*, 3 (2): 111-118.

Chen, T.; 1992. *Formulation concerns of protein drugs*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18 (11-12): 1311-1354.

Clarkson, J. R. C.; 1999a. *Protein denaturation in foam: I. Mechanism study*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215 (2): 323-332.

Clarkson, J. R. C.; 1999b. *Protein denaturation in foam: II. Surface activity and conformational change*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215 (2): 333-338.

Cleland, J. L., Powell, M. F., Shire, S. J.; 1993. *The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation*. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10 (4): 307-377.

Colombie, S., Gaunand, A., Lindet, B.; 2001. *Lysozyme inactivation under mechanical stirring: Effect of physical and molecular interfaces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (9-10): 820-826.

- Cordoba-Rodriguez, R. V.; 2008. *Aggregates in MAbs and Recombinant Therapeutic Proteins: A Regulatory Perspective*. BioPharm International, (November 2008): 44-53.
- Deutsches Institut für Normung e.V.; 2000. *DIN EN ISO 7027 Bestimmung der Trübung*. Beuth Verlag GmbH: Berlin.
- European Pharmacopoeia; 2008. *2.9.19 Particulate Contamination: Sub-visible Particles*. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: Strasbourg. Edition: 6.3. ISBN: 978-92-871-6312-7.
- Henkel, G.; 2003. *Die Passivierung von austenitischen Edelstahloberflächen in der pharmazeutischen Industrie unter Berücksichtigung von Rougingphänomenen*. Technical Bulletin, Nr. 58 (Rev. 00).
- Jaspe, J., Hagen, S. J.; 2006. *Do protein molecules unfold in a simple shear flow?* Biophysical Journal, 91 (9): 3415-3424.
- Jones, L. S., Kaufmann, A., Middaugh, C. R.; 2005. *Silicone oil induced aggregation of proteins*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 94 (4): 918-927.
- Kawasaki, K., Kambara, M., Matsumura, H.; 1999. *Wettability of proteins adsorbed on silica glasses treated with fluorosurfactants*. Colloid and Polymer Science, 277 (11): 1058-1064.
- Kerwin, B. A.; 2008. *Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 97 (8): 2924-2935.
- Kettelhoit, S.; 2008. *Industrial production of glass syringes*. Pharmazeutische Industrie, 70 (10): 1261-1269.
- Khosravi, M., Borchardt, R. T.; 2000. *Chemical pathways of peptide degradation. X: Effect of metal-catalyzed oxidation on the solution structure of a histidine-containing peptide fragment of human relaxin*. Pharmaceutical Research, 17 (7): 851-858.
- Kiese, S., Pappenberg, A., Friess, W., Mahler, H. C.; 2008. *Shaken, not stirred: Mechanical stress testing of an IgG1 antibody*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 97 (10): 4347-4366.
- Maa, Y.-F.; 1996. *Effect of high shear on proteins*. Biotechnology and Bioengineering, 51 (4): 458-465.
- Maa, Y.-F.; 1997. *Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface*. Biotechnology and Bioengineering, 54 (6): 503-512.
- Mackie, A., Wilde, P.; 2005. *The role of interactions in defining the structure of mixed protein-surfactant interfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 117 (1-3): 3-13.

- Manning, M. C.; 1989. *Stability of Protein Pharmaceuticals*. Pharmaceutical Research, 6 (11): 903-918.
- Meng, G., Chan, J. C. K., Rousseau, D., Li-Chan, E. C. Y.; 2005. *Study of Protein-Lipid Interactions at the Bovine Serum Albumin/Oil Interface by Raman Microspectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (4): 845-852.
- Michl, D., Heinemann, A., 2009. *Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2009; Wirtschaftsdaten von Biopharmazeutika und Therapiefortschritt durch Antikörper*. The Boston Consulting Group: München. vfa. bio.
- Nobbmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Sheng, F., Yi, J., Harding, S. E.; 2007. *Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 24: 117-128.
- Norde, W., Lyklema, J.; 1991. *Why proteins prefer interfaces*. Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition, 2 (3): 183-202.
- Norde, W., MacRitchie, F., Nowicka, G., Lyklema, J.; 1986. *Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects*. Journal of Colloid and Interface Science, 112 (2): 447-456.
- optek-Danulat GmbH; 2009. *Prozessstrübungsmessgeräte*. (Stand 03.05.2009). http://www.optek.com/de/Turbidity_Meters.asp.
- Organisation Intergouvernementale de la Convention Du Mètre; 2006. *The International System of Units (SI)*. Stedi Media: Paris. Edition: 8.
- Patro, S. Y., Freund, E., Chang, B. S.; 2002. *Protein formulation and fill-finish operations*. Biotechnology Annual Review, 8: 55-84.
- Philo, J. S.; 2006. *Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?* AAPS Journal, 8 (3): 564-571.
- Rathore, N., Rajan, R. S.; 2008. *Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations*. Biotechnology Progress, 24 (3): 504-514.
- Ruiz, L., Reyes, N., Aroche, K., Tolosa, V., Simanca, V., Rogriguez, T., Hardy, E.; 2005. *Influence of packaging material on the liquid stability of interferon-alpha2b*. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 8 (2): 207-216.
- Schmidt, W.; 2000. *Streuung, Brechung, Reflexion. Optische Spektroskopie: Eine Einführung*. WILEY-VCH: Weinheim. Edition: 2 (7): 273-308. ISBN: 3-527-29828-2.
- Schwarzenbach, M. S., Reimann, P., Thommen, V., Hegner, M., Mumenthaler, M., Schwob, J., Guntherodt, H.-J.; 2002. *Interferon alpha-2a interactions on glass vial surfaces measured by atomic force microscopy*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 56 (2): 78-89.

Sluzky, V. K.; 1991. *Kinetics of Insulin Aggregation in Aqueous Solutions upon Agitation in the Presence of Hydrophobic Surfaces*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88 (21): 9377-9381.

Sluzky, V. K.; 1992. *Mechanism of insulin aggregation and stabilization in agitated aqueous solutions*. Biotechnology and Bioengineering, 40 (8): 895-903.

Stricker, H.; 1987. *Physikalische Pharmazie; Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart. Edition: 3. ISBN: 3-8047-0893-5.

Treuheit, M. J.; 2002. *Inverse relationship of protein concentration and aggregation*. Pharmaceutical Research, 19 (4): 511-516.

Truskey, G. A., Gabler, R., DiLeo, A., Manter, T.; 1987. *The effect of membrane filtration upon protein conformation*. Journal of Parenteral Science & Technology, 41 (6): 180-193.

Tyagi, A. K., Randolph, T. W., Dong, A., Maloney, K. M., Hitscherich, J., Carpenter, J. F.; 2008. *IgG particle formation during filling pump operation: a case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 98 (1): 94-104.

United States Pharmacopeia; 2008. *788 Particulate Matter in Injections*. USP 31 NF 26. The United States Pharmacopeial Convention: Rockville. Edition: 31: 311-313. ISBN: 1-889788-53-8.

Vermeer, A. W. P., Giacomelli, C. E., Norde, W.; 2001. *Adsorption of IgG onto hydrophobic teflon. Differences between the Fab and Fc domains*. Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects, 1526 (2001): 61-69.

Wang, W., Wang, Y. J., Wang, D. Q.; 2008. *Dual effects of Tween 80 on protein stability*. International Journal of Pharmaceutics, 347 (1-2): 31-38.

Wang, W.; 1999. *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics (Amsterdam), 185 (2): 129-188.

Wierenga, P. A. E.; 2006. *The adsorption and unfolding kinetics determines the folding state of proteins at the air-water interface and thereby the equation of state*. Journal of Colloid and Interface Science, 299 (2): 850-857.