

Untersuchungen zur Sterilfiltration von hochkonzentrierten pharmazeutischen Proteinlösungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Svenja Guillaume
geboren am 13.04.1989 in Langenhagen

2017

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. habil. Detlef W. Bahnemann

Tag der Promotion: 24.07.2017

Kurzfassung

Biopharmazeutika und speziell therapeutische Proteine gewinnen immer mehr an Bedeutung. Sehr hohe Proteinkonzentrationen in biopharmazeutischen Lösungen sind keine Seltenheit (Ratnaparkhi *et al.*, 2011) und gehen einher mit erhöhten Viskositäten der entsprechenden Lösungen. Dieser Aspekt sowie die limitierte kolloidale Stabilität der Lösung bzw. die eingeschränkte Konformationsstabilität der Proteinmoleküle selbst erschweren die Herstellung biopharmazeutischer Lösungen, insbesondere bei der Sterilfiltration.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zum Verblockungsverhalten bei der Sterilfiltration von hochkonzentrierten Modellproteinlösungen beschrieben. Dabei haben sich die limitierte Konformations- und Kolloidstabilität als Haupteinflussfaktoren für die Verursachung von Verblockungsprozessen herausgestellt. Untersucht werden der Einfluss des Proteintyps, der Konzentration sowie des Aggregatgehalts in der Lösung auf das Verblockungsverhalten. Größenausschluss einzelner Proteinmoleküle und Proteinadsorption sind hingegen weniger relevant.

Schlagwörter: Pharmazeutische Proteine, Sterilfiltration, Lösungsstabilität

Abstract

Biopharmaceuticals have become an important part of the medical world. New Therapeutic proteins, enzymes or antibodies are constantly being introduced to the market (Ratnaparkhi *et al.*, 2011). These protein solutions often display high protein concentrations with a limited colloidal stability. Thus, it is a challenge for the manufacturing process, especially the sterile filtration steps.

This thesis shows investigations on the blocking behavior of different highly concentrated model protein solutions during sterile filtration. The conformational destabilization of the protein molecules as well as the colloidal destabilization are found to be the main reasons for the occurring fouling process. Measurements were conducted in order to identify the most important parameters. It was discovered that intermolecular forces and distances as well as shear rates which are present inside the membrane pores during the filtration process contribute to a great extent. These effects lead to the formation of aggregates potentially blocking the membrane pores. Size exclusion of single protein molecules and protein adsorption are less relevant.

Keywords: Pharmaceutical Proteins, Sterile Filtration, Stability of Solution

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ADC	Antibody Drug Conjugate
ATR	Attenuated Total Reflection
BCA	Bicinchoninic Acid
BC Test	Bacteria Challenge Test
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Cellulose Acetat
CN	Cellulose Nitrat
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Vervy, Overbeek Theorie
DMAc	N,N-Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FDA	U.S. Food and Drugs Association
FF	Form&Fill
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
IEP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot
LAL Test	Limulus Amöbozyten Lysat Test
LRV	Log Reduction Value
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PES	Polyethersulfon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVDF _{hyd}	hydrophilisiertes Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RC	Regenerierte Cellulose
SIP	Heißdampfsterilisation
TE	Polycarbonat Track-Etch Membran
WFI	Water for Injection

Symbolverzeichnis

Symbol	Erklärung	Einheit
A	aktive Filterfläche	cm ²
A _{spez}	spezifische Membranfläche	cm ² /cm ²
B	Bedeckungsgrad der spezifischen Membranfläche	%
c	Konzentration	mg/ml
c _{Membran}	Proteinkonzentration Filtrat mit Membran	mg/ml
c _{System}	Proteinkonzentration Filtrat ohne Membran	mg/ml
cap _{Monolayer}	Bindekapazität Protein	µg/cm ²
D	intermolekulare Distanzen	m
e	Elementarladung	C
ε ₀	Permittivität im Vakuum	F/m
ε _r	Dielektrizitätskonstante von Wasser	F/m
γ̇ _{Membran}	Scherrate an Porenwand	1/s
γ̇ _{Rohr}	Scherrate an Rohrwand	1/s
I	Ionenstärke Puffer	mol/l
k	Proportionalitätskoeffizient	-
k _B	Boltzmannkonstante	J/K
κ	inverse Debyelänge	1/m
l _{Pore}	Länge Pore	m
l _{Rohr}	Länge Rohr	m
M _w	Molekulargewicht	mol/l
m _{Adsorption}	adsorbierte Proteinmenge	µg/cm ²
N _A	Avogadrokonstante	1/mol
n	Verblockungskoeffizient	-
n _{spez}	spezifische Porenanzahl	1/cm ²
η	dynamische Viskosität	cP
P	Porosität	%
P ₀	Porosität zum Zeitpunkt t=0	%
Δp	Differenzdruck	bar
ρ	Dichte	g/l
ψ	Oberflächenpotential	V
R	Membranwiderstand	10 ¹⁰ /m
r _{min}	minimaler Proteinradius	m
r _{Pore}	Radius Pore	m
r _{Protein}	Radius Proteinmolekül	m
r _{Rohr}	Radius Rohr	m
S	Dicke Proteinschicht	m
T	Temperatur	K
t	Zeit	min
τ	Tortuosität	%
V	Volumen Filtrat	ml
V _{Protein}	Volumen Proteinmolekül	m ³

$V_{1/2}$	Kapazität bei 50 %iger Verblockung	ml/cm ²
\dot{V}_{Membran}	Flussrate Membran	ml/min
$\dot{V}_{\text{Membran,spez}}$	spezifische Flussrate Membran	ml/(min·cm ²)
\dot{V}_{Pore}	Flussrate Pore	ml/min
\dot{V}_{Rohr}	Flussrate Rohr	ml/min
W_{DLVO}	DLVO-Wechselwirkung	kJ/mol
W_{dl}	Wechselwirkung der elektrischen Doppelschicht	kJ/mol
W_{vdW}	van-der-Waals-Wechselwirkung	kJ/mol
z	Proteinladung	C

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	III
Abstract	IVV
Abkürzungsverzeichnis	V
Symbolverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Theorie	2
2.1. Biopharmazeutika	2
2.1.1. Formulierung pharmazeutischer Proteinlösungen	2
2.2. Produktion therapeutischer Proteine und Filtrationsprozesse	3
2.2.1. Form & Fill - Probleme, Filteranforderungen	5
2.3. Eigenschaften von Proteinformulierungen	6
2.3.1. Konformationsstabilität von Proteinmolekülen	7
2.3.2. Kolloidstabilität von Proteinlösungen	8
2.3.3. Adsorptionsverhalten von Proteinlösungen	12
2.4. Mathematische Modellierung des Filtrationsprozesses	13
2.4.1. Stand der Technik	13
2.4.2. Weiterentwicklung der Auswertung in der aktuellen Arbeit	14
2.4.3. Definition der Flussrate	15
2.4.4. Definition des Membranwiderstands	16
2.4.5. Membranverblockung bei der Proteinfiltration	16
2.4.6. Berechnung Scherraten in den Membranporen	19
2.5. Mikrofilter - Struktur-Leistungs-Korrelation	20
3. Material und Methoden	30
3.1. Protein	30
3.2. Herstellung der Proteinlösung	30
3.3. Membran	31
3.4. Filtrationsprozesse	31
3.4.1. Dead-End	31
3.4.2. Crossflow	32
3.5. Mess- bzw. Analysemethoden	32
3.5.1. Bubble Point	32
3.5.2. Porometrie	33
3.5.3. Rasterelektronenmikroskop	33
3.5.4. Bacteria Challenge Test	33

3.5.5.	Adsorption.....	34
3.5.6.	Infrarot-Spektroskopie	36
3.5.7.	Extractables	37
3.5.8.	Endotoxine	37
3.5.9.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	38
3.5.10.	Dynamische Lichtstreuung	38
3.5.11.	Rheologie	38
3.5.12.	α -Amylase Assay.....	39
4.	Ergebnisse und Diskussion	40
4.1.	Sterilfilter für Form&Fill-Anwendungen.....	40
4.1.1.	Vergleich allgemeiner Membraneigenschaften.....	40
4.1.2.	Sterilfiltrationsvermögen	42
4.1.3.	Adsorptionseigenschaften	45
4.1.4.	Chemische Beständigkeit	46
4.1.5.	Extractables	51
4.1.6.	Endotoxine	52
4.1.7.	Sterilisierbarkeit	53
4.1.8.	Fazit zu Sterilfiltern für Form&Fill-Anwendungen	53
4.2.	Hochkonzentrierte Proteinlösungen	55
4.2.1.	Auswahl von Modellproteinen und Lösungsformulierungen	55
4.2.2.	Kolloidstabilität der Modellproteinlösung	56
4.2.3.	Rheologische Eigenschaften Konformationsstabilität	64
4.2.4.	Fazit zu hochkonzentrierten Proteinlösungen	65
4.3.	Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen.....	66
4.3.1.	Adsorption bei Filtrationsprozessen	66
4.3.2.	Einfluss des Proteintyps auf den Filtrationsverlauf	75
4.3.3.	Einfluss von Aggregaten auf das Verblockungsverhalten	81
4.3.4.	Eliminierung von Aggregaten	83
4.3.5.	Einfluss des Membrantyps auf den Filtrationsverlauf	87
4.3.6.	Einfluss der Membranstruktur auf das Verblockungsverhalten	91
4.3.7.	Einfluss der Prozessführung und Prozessparameter auf den Filtrationsverlauf 92	
4.3.8.	Analyse des Filtrats.....	105
4.3.9.	Fazit zur Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen.....	110
4.4.	Applikationsentwicklung - Sterilfiltration von Proteinlösungen	112

5. Zusammenfassung.....	115
6. Literaturverzeichnis.....	120

1. Einleitung

Der Einsatz von Proteinen ist auf dem Vormarsch in der pharmazeutischen Industrie (Ratnaparkhi *et al.*, 2011). Therapeutische Proteine weisen ein vielfältiges Anwendungsspektrum auf (Fekete und Guillarme, 2014). Sie werden zunehmend höher konzentriert verabreicht, wobei Konzentrationen von 200 mg/ml keine Seltenheit darstellen (Uchiyama, 2014). Entsprechende Lösungen besitzen eine erhöhte Viskosität sowie eine limitierte Kolloid- und Konformationsstabilität. Die hohen Kosten der Pharmazeutika sorgen für die Notwendigkeit eines Ausbeute-optimierten Herstellungsprozess. Die biopharmazeutische Fertigungskette beinhaltet mehrere Sterilfiltrationsschritte, welche nötig sind, um ein bakteriell unbelastetes Produkt gewährleisten zu können. Hier kommt es häufig zu Produktverlust in Verbindung mit dem Auftreten von Fouling Prozessen. Produktverluste durch Totvolumina, Spülschritte oder auch Adsorptionsprozesse sind ebenfalls als kritisch anzusehen. Des Weiteren können mechanische Belastungen in Form von Scherstress, wie sie auch während eines Filtrationsprozesses auftreten, problematisch sein.

Um eine gute Filtrationsleistung zu ermöglichen und gleichzeitig das Produkt zu schonen, ist ein fundiertes Wissen über Proteine und ihre Formulierungen sowie die Ursachen der Verblockung unerlässlich. Demzufolge wird in der vorliegenden Arbeit die Filtration von applikationsnahen Modellproteinlösungen untersucht mit den folgenden Schwerpunkten:

- Analyse des optimalen Eigenschaftsspektrums von Sterilfiltern für die Filtration von Proteinlösungen
- Testung mit unterschiedlichen Modellproteinen sowie entsprechender Lösungsformulierungen und Herstellungsmethoden
- Ermittlung und Weiterentwicklung von geeigneten Prüfmethode zur Charakterisierung der Proteinlösungen hinsichtlich ihrer kolloidalen Stabilität, ihres Aggregationsverhaltens und ihrer rheologischen Eigenschaften
- Untersuchungen der Filtrationsleistung und des Verblockungsverhaltens hochkonzentrierter Proteinlösungen in Abhängigkeit von den Lösungseigenschaften, der chemischen und physikalischen Membraneigenschaften sowie der Prozessbedingungen

2. Theorie

2.1. *Biopharmazeutika*

Im Jahre 1982 kam das erste rekombinante Biopharmazeutische Insulin auf den Markt (Krämer und Jelkmann, 2008). In 1986 folgte mit Orthoclone® (Registered Trademark von Janssen-Cilag GmbH) der erste monoklonale Antikörper (Goswani *et al.*, 2013). Seitdem haben sogenannte Biopharmazeutika gegenüber klassischen Pharmazeutika immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sieben der zehn gewinnträchtigsten Arzneimittel sind mittlerweile Biopharmazeutika (Subramaniam, 2016). Es handelt sich dabei um therapeutische Proteine, Vakzine, Zytokine und auch Polysaccharide (Wishart, 2013). Speziell die Gruppe der therapeutischen Proteine ist sehr vielseitig. Ihre Bandbreite reicht dabei von Enzymen über Blutproteine bis hin zu monoklonalen Antikörpern, welche häufig zum Einsatz kommen bei der Behandlung von infektiösen Krankheiten oder Immunodefizienzen (Goswani *et al.*, 2013). Insgesamt sind mittlerweile über 160 pharmazeutische Proteine zugelassen und mehrere Hundert bereits in klinischen Studien (Ratnaparkhi *et al.*, 2011).

Pharmazeutische Proteine unterscheiden sich sehr stark von den klassischen chemischen Pharmazeutika. Neben deutlichen Unterschieden in Größe und Masse der aktiven Moleküle sind sie in der Lage spezifischer, effizienter und auch verträglicher im Patienten zu agieren (Fekete und Guillarme, 2014). Die therapeutische Wirksamkeit des Proteins ist dabei direkt abhängig von der Konformation. Daher ist die Herstellung sehr komplex und kostenintensiv. Aufgrund der hohen Konzentrationen in Lösung und damit verbundenen hohen Viskositäten sowie der meist geringen Konformationsstabilität der Proteinmoleküle bzw. eingeschränkten Kolloidstabilität der Lösung gestalten sich Produktionsprozesse aufwändig (Chmiel, 2006). Hochkonzentrierte Lösungen sind aber unausweichlich, besonders wenn eine subkutane Arzneimittelgabe angestrebt wird. Dabei ist das maximale Injektionsvolumen bei subkutaner Gabe auf 1,5 ml limitiert, um langfristige Schädigungen des Gewebes zu minimieren (Inoue *et al.*, 2014).

2.1.1. *Formulierung pharmazeutischer Proteinlösungen*

Proteinlösungen, insbesondere hochkonzentrierte Lösungen, benötigen spezielle Formulierungen, um während der Herstellung und in der Anwendung die Produktstabilität zu gewährleisten. Dazu gehören neben einer allgemeinen Pufferformulierung zur pH-Stabilisierung auch weitere Zusätze wie Salze, Zucker und nicht-ionische Tenside. Während der stabilisierende Einfluss von Salz stark von dem

jeweiligen Protein abhängt, sorgen Zucker im Allgemeinen immer für eine Stabilisierung der Proteinkonformation. Der Einsatz von Tensiden führt zu einer Verringerung der Oberflächenspannung der Proteinlösung sowie zu einer Belegung von hydrophoben Oberflächen, wodurch die Formierung von Aggregaten reduziert werden kann (Goswani *et al.*, 2013).

Eine Übersicht der aktuell zugelassenen Antikörperformulierungen zeigt diese einschlägigen Trends in der Lösungsformulierung (Uchiyama, 2014). Die Antikörperkonzentrationen erstrecken sich dabei über einen Bereich von 2 bis 200 mg/ml. Als Puffersystem kommen zumeist Phosphat- oder Histidin-gepufferte Systeme mit pH-Werten zwischen 4,5 bis 7,9 zum Einsatz, die Mehrheit davon im leicht sauren Bereich. Zwischen ungefähr 20 bis 300 mM Saccharide, häufig Sucrose oder Trehalose, 0,02 bis 1 % Tween 80 und unterschiedliche Natriumchloridkonzentrationen mit maximal 0,8 % sind außerdem als Zusätze in der Formulierung enthalten. Vermehrt präsent ist hier auch die Zugabe von Arginin, zur Verringerung der Lösungsviskosität (Inoue *et al.*, 2014). Eine Besonderheit von Formulierungen, die lyophilisiert werden sollen, im Vergleich zu flüssigen Formulierungen ist die komplette Abwesenheit von Salz. Es würde die Proteinmoleküle bei der Gefriertrocknung schädigen.

2.2. Produktion therapeutischer Proteine und Filtrationsprozesse

Therapeutische Proteine werden anders als klassische Pharmazeutika nicht mittels chemischer Synthesen gewonnen, sondern über biotechnologische Verfahren. Dabei werden Bakterien, Pilze und vor allem auch eukaryotische Zellkulturen kultiviert, die das gewünschte Protein produzieren. Durch gentechnisch veränderte Organismen (GVO) ist man mittlerweile auch in der Lage, Stoffe produzieren zu lassen, die vom ursprünglichen Stoffwechsel des Wirtssystems nicht vorgesehen waren (Decker und Reski, 2008). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Herstellung von Insulin mittels modifizierter Bakterien (Sanofi-Aventis, 2016).

Im Anschluss an die Kultivierung, welche je nach eingesetztem Organismus bzw. Zelle unterschiedlich ausfällt, folgt eine relativ aufwändige Aufarbeitung, der sogenannte Downstreamprozess. Verschiedenste aneinander gereihete Filtrations- und Aufarbeitungsschritte führen am Ende zu einem reinen Produkt. Allgemein findet zunächst eine Zellabtrennung statt. Es folgen die Produktgewinnung, Aufkonzentrierung und Reinigung. Je nach Bedarf kann auch noch eine Konfektionierung angeschlossen werden (Chmiel, 2006). Zum Schluss kommt der sogenannte Form&Fill Bereich (FF). Hier wird das bereits fertige Produkt aus Sicherheitsgründen noch einmal sterilfiltriert und in die finalen Behältnisse, wie zum Beispiel Ampullen oder Fertigspritzen, abgefüllt.

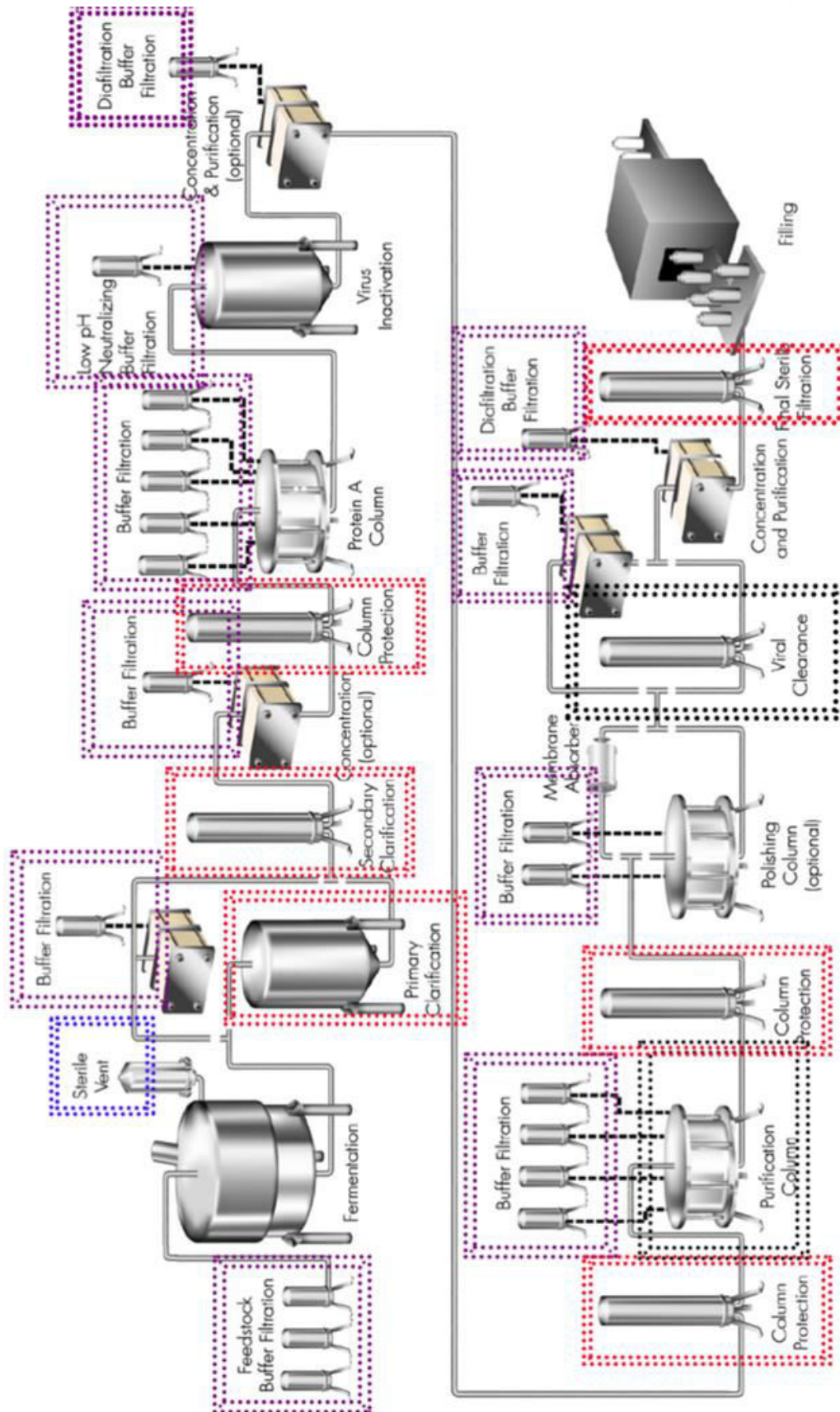


Abbildung 1: Darstellung eines typischen Herstellungsprozesses eines therapeutischen Proteins (Peinemann und Nunes, 2008).

Abbildung 1 zeigt exemplarisch einen Herstellungsprozess, wie er bei der Produktion von therapeutischen Proteinen typisch ist. Dabei wird deutlich, wie wichtig Filtrationsprozesse bei der Aufarbeitung sind. Im direkten Kontakt zum Protein sind hier mehrere Vorfilter als Säulenschutz, Steril- sowie Virusfilter zu nennen. Diese Filter müssen mit besonderer Vorsicht ausgewählt werden, um Produktverluste bzw. -schädigungen zu vermeiden. Während zu Beginn des Downstreamprozesses große Volumina mit geringen Produktkonzentrationen vorliegen, dreht sich dieses Verhältnis im weiteren Verlauf um. Dementsprechend ändern sich auch die primären Anforderungen an den Filtrationsprozess von hohen Durchsätzen hin zu hohen Ausbeuten.

Obwohl therapeutische Proteine mittlerweile seit rund 30 Jahren auf dem Markt sind, gilt die Herstellung immer noch als Herausforderung (Zydney, 2009). Innerhalb der Prozesskette befinden sich diverse Schritte, welche die Protein- bzw. die Lösungsstabilität kritisch beeinflussen können. Dazu gehören zum Beispiel Zellaufschluss, Zentrifugation, Rühren, Pumpen, Lyophilisierung, Chromatographie oder auch Filtration. Dabei spielen thermische und mechanische Einflüsse die größte Rolle. Es gilt, diese Gefahren zu identifizieren und soweit möglich zu reduzieren bzw. zu eliminieren, um eine gute Produktqualität und Ausbeute gewährleisten zu können.

2.2.1. Form & Fill - Probleme, Filteranforderungen

Im Anschluss an den Downstreamprozess erfolgt die Abfüllung des finalen Produktes. Hier findet ein letzter Sterilfiltrationsschritt statt, welcher unter anderem von der U.S. Food and Drugs Association (FDA) gefordert wird. Der Filter fungiert als sogenannter „Polizeifilter“, um sicher zu stellen, dass keine bakteriellen Verunreinigungen ins Produkt gelangen.

Der in diesem Prozessschritt eingesetzte Filter muss zunächst die allgemeinen Ansprüche, die an einen Sterilfilter gestellt werden, erfüllen. Dazu gehören, neben einem zum Prozess passenden Durchfluss bzw. einer geeigneten Filtrationsleistung, eine physikalische Stabilität und chemische Kompatibilität sowie die Sterilisierbarkeit und das Sterilfiltrationsvermögen. Als sterilfiltrierend gilt ein Filter dann, wenn er eine definierte bakterielle Belastung unter Prozessbedingungen um mindestens sieben \log_{10} -Stufen pro Quadratcentimeter Membranoberfläche reduziert, was einem Log Reduction Value (LRV) von 7 / cm^2 entspricht (ASTM International, 2013).

Beim Form&Fill-Filter (FF-Filter) ist zusätzlich zu beachten, dass das fertige Produkt unverändert hinsichtlich der Zusammensetzung und der Proteinkonformation auch in den Patienten gelangt. Dementsprechend muss ein spezieller FF-Filter noch weitere Sicherheitskriterien erfüllen. Zum einen darf er die Arzneimittelformulierung nicht beeinflussen, zum Beispiel durch Adsorption des

therapeutischen Proteins selbst sowie der weiteren Bestandteile der Formulierung. Werden während des Filtrationsprozesses strukturelle Veränderungen des Proteins verursacht, so kann die therapeutische Wirkung zerstört werden. Des Weiteren muss eine Abgabe von Partikeln, Extractables und auch Leachables ausgeschlossen werden. Diese könnten zu einer gesundheitlichen Gefährdung des Patienten führen (Jornitz und Meltzer, 2001).

2.3. Eigenschaften von Proteinformulierungen

Proteine sind essentiell für das Funktionieren eines jeden Organismus. Bei jeder chemischen Reaktion in Zellen sind Proteine involviert. Auf Grund ihrer diversen biologischen Funktionen kommen sie in einer Vielfalt an Formen und Größen vor (Abbildung 2) (Whitford, 2005). Sie können in der Größe zwischen wenigen Nanometern und Längen von über einem Mikrometer variieren (Fulton und Isaacs, 1991). Das größte und längste Blutprotein zum Beispiel, der von Willebrand Faktor, erreicht mit seinen Multimeren Molekularmassen von bis zu 20 MDa (Schneider und Schneider, 2008).

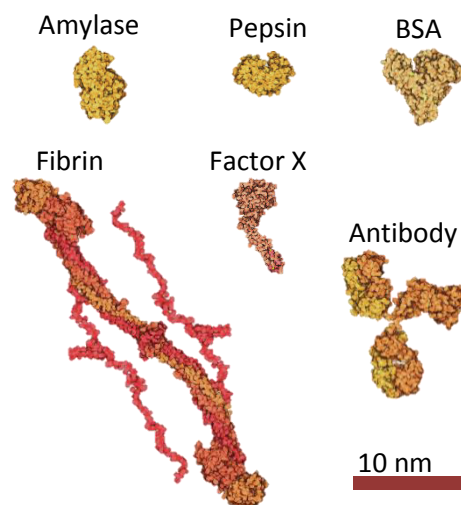


Abbildung 2: Maßstabsgetreue Darstellung einer Auswahl unterschiedlicher Proteine (The Protein Data Bank, 2016).

Trotz der großen Vielfalt an Größen und Strukturen ist der grundsätzliche Aufbau eines jeden Proteins gleich. Dementsprechend besitzen Proteinmoleküle auch eine nahezu identische Dichte von ca. $1,37 \text{ g/cm}^3$ (Erickson, 2009). Der Aufbau basiert auf der Aneinanderreihung von Aminosäuren, der Primärstruktur. Es existieren 20 proteinogene Aminosäuren, die je nach Protein in unterschiedlicher Reihenfolge über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die jeweiligen Seitenketten besitzen unterschiedlichste Eigenschaften. Dazu gehören polare, nicht-polare, geladene, ungeladene und aromatische Seitenketten, sowie Thiolgruppen, welche quervernetzen können. Die Anordnung dieser

Seitenketten bestimmt letztendlich die Faltung des Proteins und somit auch dessen Struktur. Ausgehend von der Primärstruktur werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren ausgebildet. Dadurch entstehen sogenannte α -Helices und β -Faltblätter, die Strukturelemente der Sekundärstruktur. Durch zusätzliche van der Waals Kräfte, Disulfidbrücken, ionische Wechselwirkungen sowie hydrophobe Interaktionen ordnet sich die Polypeptidkette anschließend in einer kompakten globulären Struktur an. Diese wird als Tertiärstruktur bezeichnet, bei der die hydrophoben Gruppen vorwiegend nach innen und die hydrophilen Gruppen nach außen zeigen. Manche Proteine besitzen darüber hinaus auch eine Quaternärstruktur. Sie entsteht durch die Interaktion von zwei oder mehreren gefalteten Polypeptidketten. Die dabei vorliegenden Interaktionen entsprechen denen der Tertiärstruktur (Whitford, 2005).

2.3.1. Konformationsstabilität von Proteinmolekülen

Bei Proteinen handelt es sich um vergleichsweise instabile Makromoleküle. In Lösung sind Proteine empfindlich gegenüber Hitze, Kälte, mechanischen Kräften, Strahlung, Proteasen und diversen Chemikalien. Je nach Effekt werden dabei zum Beispiel die Disulfidbrücken oder auch die Peptidbindungen angegriffen. Häufig führen äußere Einflüsse zur teilweisen oder auch vollständigen Entfaltung des Proteinmoleküls (Abbildung 3). Dieser Vorgang kann sowohl reversibel, als auch irreversibel sein. Bei einer erneuten Faltung besteht allerdings das Risiko, dass sie nicht korrekt abläuft und das Protein nicht wieder in den Ursprungszustand zurückgelangt.

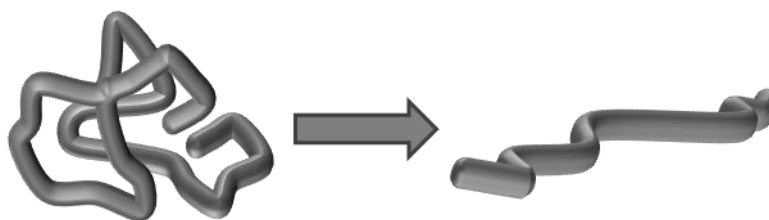


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines gefalteten (links) und entfalteten Proteinmoleküls (rechts).

Der Einfluss von mechanischen Kräften auf die Konformationsstabilität von Proteinmolekülen in Lösung lässt sich besonders bei rheologischen Untersuchungen erkennen. Zum Beispiel haben Sharma *et al.* das Verhalten von unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen (Bovine Serum Albumin) in Abhängigkeit der Scherrate mittels eines konzentrischen Doppelspalt-Zylinder-Rheometers untersucht (Sharma *et al.*, 2011). Es zeigt sich, dass die Lösungsviskosität mit zunehmender Scherrate sinkt und ab ca. 10^2 /s einen konstanten Wert annimmt. Dieses Verhalten zeigt sich unabhängig von der BSA-Konzentration für einen Bereich von 10-250 mg/ml und wird durch

Konformationsänderungen verursacht. Höhere Scherkräfte sind verantwortlich für eine stärkere Beanspruchung und somit auch für Um- bzw. Entfaltungen der Proteinmoleküle. Oberhalb einer bestimmten Belastungsgrenze sind diese Prozesse weitestgehend abgeschlossen und es kommt zu keiner erkennbaren Veränderung des Lösungsverhaltens mehr.

Da die therapeutische Aktivität eines Proteins stark abhängig von der Struktur ist, können Konformationsänderungen somit auch zu einer Inaktivierung führen. Ohne eine korrekt gefaltete Sekundär- und Tertiärstruktur ist die Funktionalität des Proteins meist nicht mehr gegeben bzw. stark eingeschränkt.

Durch eine Entfaltung gelangen zuvor innen liegende hydrophobe Regionen an die Oberfläche, wodurch das Risiko für intermolekulare Wechselwirkungen, basierend auf hydrophoben Interaktionen, stark ansteigt. Dies wiederum erhöht auch das Risiko der Aggregatbildung.

2.3.2. Kolloidstabilität von Proteinlösungen

Proteinlösungen können als Ensemble von kolloidalen Partikeln, welche in einer flüssigen Umgebung suspendiert sind, angesehen werden (Manning *et al.*, 2010). Die mathematische Simulation einer exemplarischen Proteinlösung, wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist, gibt einen Eindruck von den Verhältnissen in einer Proteinlösung. Proteinmoleküle liegen bei entsprechenden Konzentrationen in partikulärer Form in der Lösung vor, wobei die Abstände zwischen den Proteinen kleiner sind, als die Größe der Moleküle selbst. Zwischen den einzelnen Partikeln bzw. Proteinmolekülen existieren unterschiedliche anziehende und abstoßende Wechselwirkungen. Deren Zusammenspiel ist entscheidend für die Stabilität der Lösung, der sogenannten Kolloidstabilität. Die Wechselwirkungen sind unter anderem abhängig von der Oberflächenladung der Moleküle, welche wiederum abhängig vom pH-Wert der Lösung ist. Während die Moleküle bei pH-Werten unterhalb des sogenannten Isoelektrischen Punkts (IEP) insgesamt eine positive Ladung aufweisen, ist sie oberhalb des IEPs negativ. Entspricht der pH-Wert dem IEP des entsprechenden Proteinmoleküls, so besitzt es keine Nettoladung (Neergaard *et al.*, 2013). Auch die Ionenstärke der Lösungsformulierung sowie die Proteinkonzentration, welche maßgeblich für die vorherrschenden intermolekularen Distanzen ist, beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen.

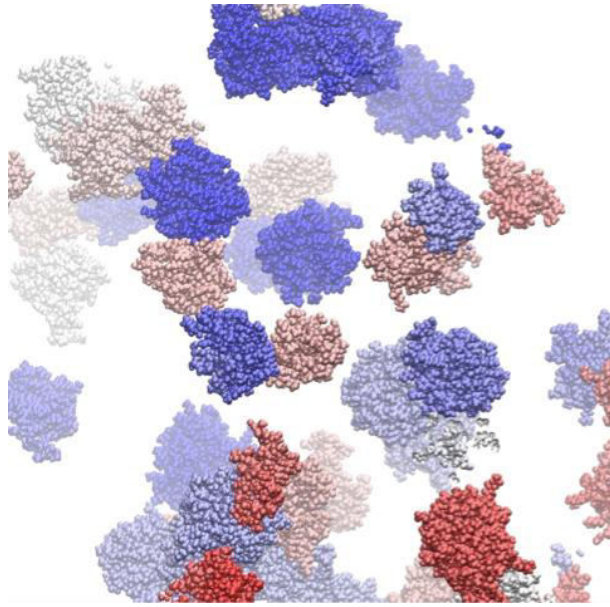


Abbildung 4: Mathematische Simulation einer exemplarischen Proteinlösung (Gauss Centre for Supercomputing, 2016).

Die Stabilität von klassischen Suspensionen und die darin vorherrschenden Kräfte bzw. Energien können mit Hilfe der sogenannten DLVO-Theorie (Derjaguin, Landau, Vervey und Overbeek) beschrieben werden (Verwey und Overbeek, 1948). Sie beschreibt die Interaktionsenergie W_{DLVO} von zwei sich annähernden Partikeln. Ursprünglich ist sie für Lösungen mit glatten und runden Partikeln mit einer gleichmäßigen Verteilung der Oberflächenladung entwickelt worden. Proteine erfüllen diese Kriterien nicht, dennoch muss diese Annahme getroffen werden, um die Energien in einer Proteinlösung berechnen zu können (Curtis *et al.*, 2002). Laut Leckband und Sivasankar ist eine entsprechende Berechnung für kolloidale Proteinlösungen möglich (Leckband und Sivasankar, 1999). Die Interaktionsenergie setzt sich zusammen aus der Summe von van-der-Waals-Wechselwirkungen W_{vdW} und Wechselwirkungen der elektrischen Doppelschicht W_{dl} in Abhängigkeit von der intermolekularen Distanz zwischen den Proteinmolekülen D :

$$W_{DLVO}(D) = W_{vdW}(D) + W_{dl}(D) \quad (1)$$

Die theoretischen intermolekularen Distanzen können mit Hilfe von Gleichung 2 berechnet werden:

$$D = \left(\frac{M_W}{cN_A} \right)^{\frac{1}{3}} - 2r_{\min} \quad (2)$$

Dabei entspricht M_W dem Molekulargewicht des Proteins, c der Proteinkonzentration in Lösung, N_A der Avogadrokonstante und r_{\min} dem minimalen Proteinradius. Dieser wird unter der Annahme bestimmt, dass die Form des Proteinmoleküls einer Kugel entspricht (Erickson, 2009):

$$r_{\min} = \left(\frac{3V_{\text{Protein}}}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3)$$

Das Volumen des Proteinmoleküls V_{Protein} kann wiederum über die mittlere Dichte von Proteinmolekülen ρ , welche ca. 1,37 g/cm³ beträgt (Erickson, 2009), beschrieben werden als:

$$V_{\text{Protein}} = \frac{M_W}{\rho N_A} \quad (4)$$

Die in der DLVO-Theorie beschriebenen van-der-Waals-Energien sind attraktive Dipol-Dipol-Wechselwirkungen die entsprechend Gleichung 5 definiert werden (Curtis *et al.*, 2002).

$$W_{\text{vdW}}(D) = -\frac{H}{12} \left(\frac{4r_{\text{Protein}}^2}{(D + 2r_{\text{Protein}})^2 - 4r_{\text{Protein}}^2} + \frac{4r_{\text{Protein}}^2}{(D + 2r_{\text{Protein}})^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{4r_{\text{Protein}}^2}{(D + 2r_{\text{Protein}})^2} \right) \right) \quad (5)$$

Die Hamakerkonstante H hat für Proteine im Mittel einen Wert von 3-5 $k_B T$ (Nir, 1976). Dabei beschreibt r_{Protein} den Radius des Proteinmoleküls und D den Abstand zwischen zwei Molekülen ausgehend vom jeweiligen Mittelpunkt des Proteins.

Die abstoßenden Energien zwischen den elektrischen Doppelschichten der Proteinmoleküle können mit Hilfe von Gleichung 6 beschrieben werden (Curtis *et al.*, 2002).

$$W_{\text{dl}}(D) = \frac{z^2 e^2 \exp \left(-\kappa(D + 2r_{\text{Protein}} - 4r_{\text{Protein}}^2) \right)}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r (1 + \kappa r_{\text{Protein}})^2} \quad (6)$$

Dabei entspricht e der Elementarladung, ϵ_0 der Permittivität im Vakuum und ϵ_r der Dielektrizitätskonstante von Wasser. Die Proteinladung z kann durch Gleichung 7 bestimmt werden (Gitlin *et al.*, 2006). Hierbei ist zu beachten, dass die geladenen Aminosäuren zum Teil inhärent sind und somit nicht zur Gesamtladung des Moleküls beitragen.

$$z = \frac{\psi 4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{\text{Protein}} (1 + \kappa r_{\text{Protein}})}{e} \quad (7)$$

ψ entspricht dem Oberflächenpotential und κ der inversen Debyelänge. Sie kann durch die folgende Gleichung beschrieben werden (Melnyk, 2015):

$$\kappa = \sqrt{\frac{2Ie^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}} \quad (8)$$

Dabei ist k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und I die Ionenstärke der Pufferlösung.

Der charakteristische Verlauf der DLVO-Energie in Abhängigkeit vom Partikelabstand wird in Abbildung 5 dargestellt. Ausgehend von größeren Abständen hin zu kleineren befindet sich zunächst ein sekundäres Minimum gefolgt von einer Energiebarriere, welche dafür sorgt, dass die Suspension ohne jeglichen Energieeintrag weitestgehend stabil ist. Wird Energie in das System eingebracht, die groß genug ist, um die Barriere zu überwinden, so werden die Moleküle gezwungen ihren Abstand drastisch zu verringern. Dies führt letztendlich zu einer irreversiblen Aggregation.

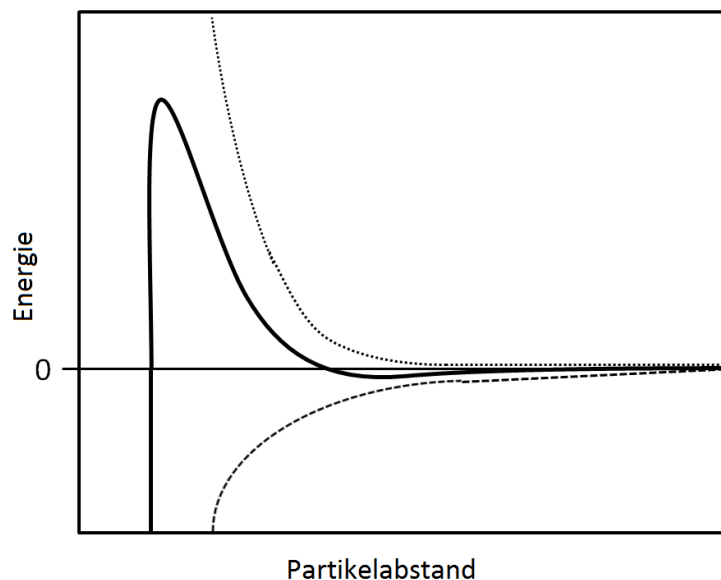


Abbildung 5: Charakteristische Darstellung der DLVO-Energie (durchgezogen), der van-der-Waals-Kräfte (gestrichelt) und der Doppelschicht-Abstoßung (gepunktet).

Bei der Betrachtung der Interaktionsenergien zwischen Proteinmolekülen sollte zusätzlich beachtet werden, dass diese sich ändern, sobald die Moleküle im teilweise oder vollständig denaturierten Zustand vorliegen. In beiden Fällen können sich kleine Aggregate ausbilden, welche wiederum als

Nukleus für die Entstehung von großen Aggregaten dienen. Dabei sind die Interaktionsenergien zwischen nativen Proteinmolekülen wesentlich schwächer. Aggregate, die lediglich aus nativen Proteinen bestehen, befinden sich im sekundären Minimum der DLVO-Kurve. Dieser Zustand ist reversibel. Durch Verdünnung zum Beispiel können native Aggregate demnach wieder aufgelöst werden (Uchiyama, 2014).

2.3.3. Adsorptionsverhalten von Proteinlösungen

Bei der Betrachtung von Proteinfiltrationen wird laut Jones und Melia das Adsorptionsverhalten als Grund für Verblockung und Produktverlust gesehen (Jones und Melia, 2000).

Adsorptionsprozesse starten mit dem Transport des Adsorptivs (Protein) zum Adsorbens (Membran). Die entscheidenden Transportmechanismen sind dabei Diffusion, freie thermische Konvektion, konvektiver Transport sowie der kombinierte Transport. Auf Grund der Ausbildung einer Grenzschicht an der Membranoberfläche reicht ein konvektiver Transport oder Fluss alleine nicht aus, damit Proteinmoleküle die Festkörpergrenzfläche erreichen können. Hier findet Massentransport lediglich durch Diffusion statt, welche primär vom Konzentrationsgradienten abhängig ist (Andrade und Hlady, 1986).

Nach Kontakt zwischen Protein und Membranoberfläche findet eine schnelle und zunächst auch reversible Adsorption des Proteins an der Membran statt. Diese Bindung kann mit der Zeit eine Konformationsänderung der Proteinmoleküle induzieren, wodurch sich hydrophobe Bereiche nach außen orientieren können. Es stärkt die Interaktion zwischen Protein und Membran und senkt somit auch die Desorptionsrate. Vollständig denaturierte Proteine können nicht mehr desorbieren, die Adsorption ist irreversibel geworden (Andrade und Hlady, 1986). Entsprechend adsorbieren hydrophobe Oberflächen Proteine wesentlich stärker als hydrophile Grenzflächen.

Der Adsorptionsprozess wird in der Literatur häufig mittels einfacher Adsorptionsmodelle wie Langmuir oder Langmuir-Freundlich beschrieben (Pitt, 1987; Zhou *et al.*, 2012). Beide Theorien sind ursprünglich für eine reversible Monolayer-Adsorption ohne laterale Einflüsse entwickelt worden (Kim und Yoon, 2002). Diese idealen Bedingungen sind bei der Filtration von Proteinlösungen allerdings nicht gegeben. Hier liegen heterogene Oberflächen vor und es kommt zu irreversiblen, aufeinanderfolgenden Reaktionen wie Proteinentfaltung und gekoppeltem Massentransport.

Der komplexe Prozess der Proteinadsorption wird durch verschiedenste Faktoren beeinflusst. Einen großen Einfluss hat der pH-Wert der Lösung. Entspricht dieser dem isoelektrischen Punkt des Proteins ist die Adsorption maximal. Bei diesem pH-Wert haben die Proteine keine Nettoladung und somit ist

die elektrische Abstoßung am geringsten (Kopac *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2002; Palecek und Zydney, 1994; Jones und Melia, 2000). Da der IEP für jedes Protein spezifisch ist, variiert daher auch der optimale pH-Wert für den jeweiligen Prozess. Abhängig vom pH-Wert ist der Einfluss der Ionenstärke der Pufferlösung auf Adsorptionsvorgänge. Bei pH-Werten unterhalb des IEPs nimmt die Adsorption mit zunehmender Ionenstärke zu, wohingegen sie oberhalb des IEPs abnimmt (Jones und Melia, 2000). Weitere Einflussfaktoren sind die Temperatur sowie das Vorhandensein von Additiven. Da es sich beim Adsorptionsvorgang um einen endothermen Prozess handelt, nimmt die Adsorption mit zunehmender Temperatur zu (Zhou *et al.*, 2012; Kopac *et al.*, 2008). Befinden sich Zusätze wie Tenside in der Pufferlösung, wird das Ausmaß der Adsorption verringert, da diese für eine zusätzliche Stabilisierung der Proteine sorgen (Mahler *et al.*, 2010).

Darüber hinaus beeinflussen auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Filtrationsmembranen den Grad der Adsorption. Es wurde gezeigt, dass Membranen mit Bindungsstellen für elektrostatische oder hydrophobe Interaktionen ein gesteigertes Adsorptionsverhalten aufzeigen (Mahler *et al.*, 2010). Eine größere spezifische Oberfläche, wie sie meist bei kleineren Porengrößen gegeben ist, führt ebenfalls zu einer verstärkten Proteinadsorption (Pitt, 1987).

Die Messung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen ist mit unterschiedlichen Methoden möglich. Zum einen kann im Anschluss an eine statische Inkubation der Membran in Proteinlösung die Konzentration des Proteins gemessen und die Verluste berechnet werden (Mahler *et al.*, 2009; Pitt, 1987). Zum anderen kann die Konzentrationsbestimmung einem dynamischen Filtrationsprozess nachgeschaltet werden (Bialopiotrowicz *et al.*, 2002).

2.4. Mathematische Modellierung des Filtrationsprozesses

2.4.1. Stand der Technik

Die übliche Auswertung von Filtrationsdaten beruht auf der Aufzeichnung des Filtratvolumens im Verlauf der Zeit (Abbildung 6). Davon ausgehend kann der sogenannte V_{\max} -Wert, unter der Annahme, dass eine Standard-Porenverblockung vorliegt, mit Hilfe von Linearisierungsverfahren berechnet werden. Er entspricht dem Filtratvolumen bei unendlicher Filtrationsdauer und ist somit ein theoretischer Wert, der bei einem realen Filtrationsprozess nicht erreicht werden kann. Im Wesentlichen beschreibt V_{\max} den Endpunkt des Filtrations- bzw. Verblockungsprozesses, gibt aber keinerlei Informationen über den Verlauf bzw. die Kinetik von Verblockungsprozessen.

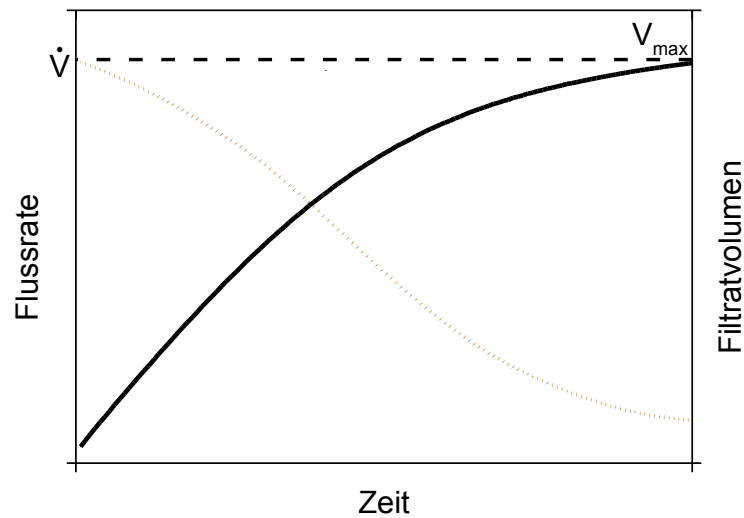


Abbildung 6: Typischer Verlauf des Filtratvolumens über der Zeit sowie der zugehörige V_{\max} Wert.

Der Leistungsvergleich zwischen verschiedenen Membranen erfolgt in der Regel mittels V_{\max} und auch Berechnungen zum Scale-Up von Filtern werden mit Hilfe von V_{\max} durchgeführt (Mok *et al.*, 2012; Rajniak *et al.*, 2008). Es kann darüber hinaus die Lagerstabilität einer monoklonalen Antikörperlösung anhand von V_{\max} beurteilt werden (Rathore *et al.*, 2008).

2.4.2. Weiterentwicklung der Berechnungen von Filtrationsprozessen

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus der Auswertung nicht auf dem Ende des Filtrationsprozesses, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, sondern auf dessen Dynamik.

Zunächst wird dazu ebenfalls das Filtratvolumen V im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Die erste Ableitung entspricht dem Volumenstrom bzw. der Flussrate in der Membran \dot{V}_{Membran} :

$$\dot{V}_{\text{Membran}} = V \frac{dV}{dt} \quad (9)$$

Geteilt durch die aktive Filterfläche A ergibt sich die spezifische Flussrate der Membran $\dot{V}_{\text{Membran, spez}}$ (Abbildung 6):

$$\dot{V}_{\text{Membran, spez}} = \frac{\dot{V}_{\text{Membran}}}{A} \quad (10)$$

Anstelle des maximalen Filtratvolumens bei unendlicher Filtrationsdauer ist in der vorliegenden Arbeit auf die Kapazität zum Zeitpunkt einer 50 %igen Abnahme des Anfangsflusses $V_{1/2}$ als charakteristische Filtrationsgröße zurückgegriffen worden. Reale pharmazeutische Filtrationsprozesse sind so ausgelegt, dass eine signifikante Verblockung der Membran nicht auftritt. Somit lässt sich der Arbeitsbereich von Sterilfiltrationsprozessen mit Hilfe der Kapazität bei 50%iger Verblockung besser bewerten und es wird ein direkter Leistungsvergleich von Membranen ermöglicht. $V_{1/2}$ ist ein direkter Messwert, wohingegen V_{max} immer eine berechnete Größe ist. Darüber hinaus können so lange Messzeiten, wie sie bei niedrigen Flussraten bei der Proteinfiltration unumgänglich sind, vermieden werden.

Ausgehend von den Filtrationsverläufen kann außerdem der Verlauf des Membranwiderstandes bestimmt werden. Die Berechnungsgrundlagen der Flussrate und des Widerstandes sind in Kapitel 2.4.3 bzw. Kapitel 2.4.4 näher beschrieben.

2.4.3. Definition der Flussrate

Zur Berechnung der während eines Filtrationsprozesses vorherrschenden Flussraten kann die vereinfachende Annahme getroffen werden, dass die komplexe Struktur eines Membranfilters einer Ansammlung mehrerer Rohre bzw. Poren in einer undurchlässigen Schicht entspricht. Nach Hagen-Poiseuille wird die Flussrate durch ein Rohr \dot{V}_{Rohr} wie folgt beschrieben (Spurk und Aksel, 2008):

$$\dot{V}_{\text{Rohr}} = \frac{\pi r_{\text{Rohr}}^4 \Delta p}{8 \eta l_{\text{Rohr}}} \quad (11)$$

r_{Rohr} beschreibt den Radius und l_{Rohr} die Länge des Rohres, Δp entspricht dem Differentialdruck und η der dynamischen Viskosität des zu filtrierenden Fluides.

Die Flussrate im Rohr entspricht im Modell der Flussrate in einer einzelnen Pore. Bei einer Membran entspricht die zur Filtration zur Verfügung stehende Fläche der Fläche einer einzelnen Pore multipliziert mit der Anzahl an Poren, oder alternativ der aktiven Membran- bzw. Filterfläche multipliziert mit der Porosität P . Außerdem muss die Länge der Poren l_{pore} mit der Tortuosität τ , dem sogenannten Umwegfaktor, verrechnet werden. Somit ergibt sich für die Flussrate durch einen Membranfilter \dot{V}_{Membran} folgender Zusammenhang:

$$\dot{V}_{\text{Membran}} = \frac{r_{\text{Pore}}^2 \Delta p P A}{8 \eta l_{\text{Pore}} \tau} \quad (12)$$

Ein alternativer Ansatz zur Flussberechnung ist von Darcy empirisch ermittelt worden:

$$\dot{V}_{\text{Membran}} = \frac{\Delta p A}{\eta R} \quad (13)$$

Dabei werden unterschiedliche Einflussfaktoren der Membran als Membranwiderstand R zusammengefasst.

2.4.4. Definition des Membranwiderstands

Der Membranwiderstand ist eine charakteristische Eigenschaft von Membranen, welche ein Maß für das Filtrationsverhalten ist. Stellt man die Gleichungen für die Flussrate durch einen Membranfilter (Gleichung 10) und Darcy (Gleichung 13) gegenüber, so zeigt sich, dass der Membranwiderstand geometrische Größen wie Porengröße, Membrandicke, Porosität sowie Tortuosität zusammenfasst:

$$R = \frac{\Delta p}{\eta \dot{V}_{\text{Membran, spez}}} = \frac{8 l_{\text{Pore}} \tau}{r_{\text{Pore}}^2 P} \quad (14)$$

Auf Grund dessen ist er spezifisch für jeden Membrantypen. Im Verlauf einer verblockendem Proteinfiltration nimmt der Membranwiderstand aus unterschiedlichen Gründen zu. Zum Membranwiderstand addieren sich in Abhängigkeit der Verblockungsart zusätzliche Widerstände. Bei einer Kuchenfiltration würde die Dicke des Kuchens zusätzlich zur Membrandicke hinzukommen. Findet die Verblockung hingegen in den Membranporen statt, so würden mit der Zeit der Porenradius und damit verbunden auch die Porosität abnehmen. Es bildet sich eine Art Sekundärstruktur aus. Filtrationselemente, wie sie bei Prozessfiltrationen zur Anwendung kommen, haben ebenfalls einen Widerstand, der sich zum Membranwiderstand hinzu addiert.

2.4.5. Membranverblockung bei der Proteinfiltration

Fouling-Phänomene in Verbindung mit der Filtration von Proteinlösungen sind in der Literatur von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Maa und Hsu, 1998; Herrero *et al.*, 1997; Bolton *et al.*, 2006). Es handelt sich dabei um einen komplexen Prozess, welcher durch die Interaktion zwischen Membraneigenschaften, Lösungszusammensetzung und Prozessparametern beeinflusst wird (Tang *et al.*, 2011).

Es wird allgemein zwischen vier verschiedenen Mechanismen unterschieden (Abbildung 7), die zu Fouling führen können (Griffiths *et al.*, 2014). Kleinere Partikel bzw. Proteinmoleküle, welche in die Membranporen eindringen, können sich dort an die Porenwände anlagern. Es kommt zu einer Verengung der Poren. Dies wird als Standard-Verblockung bezeichnet. Bei der sogenannten Intermediate-Verblockung lagern sich etwas größere Partikel, wie z. B. Proteinaggregate, auf der Membranoberfläche an und verblocken die Poren teilweise. Sind die Partikel groß genug, um die Poren vollständig zu verstopfen, so wird dieser Vorgang als komplette Verblockung bezeichnet. Eine Kuchenfiltration kommt schließlich zustande, wenn sich auf der Oberfläche im Laufe der Zeit eine mehr oder weniger poröse Schicht aus Partikeln ausbildet.

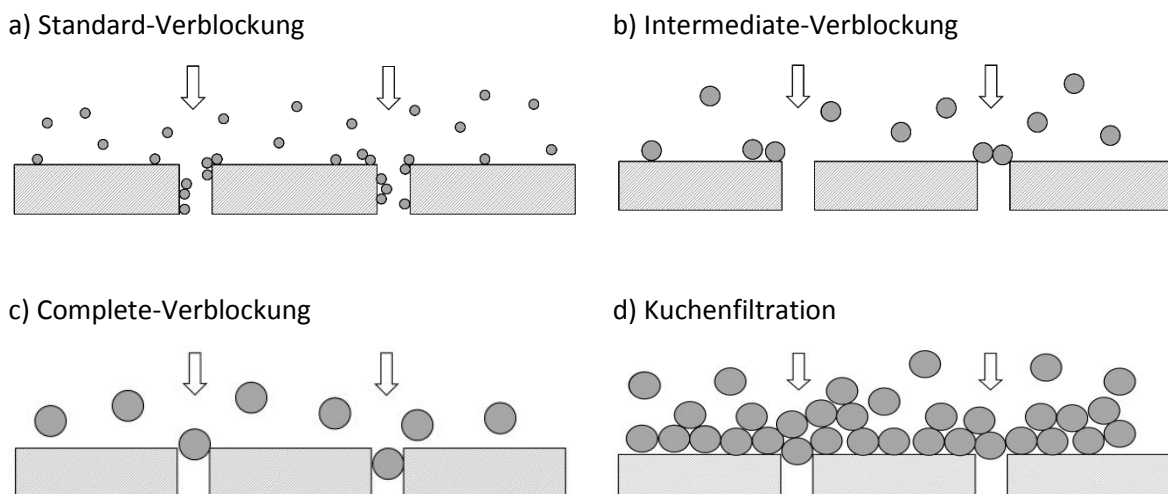


Abbildung 7: Verblockungsmechanismen nach Griffiths *et al.* (Griffiths *et al.*, 2014).

Theoretisch lässt sich über den Verlauf der zeitlichen Ableitung der Flussrate zwischen den unterschiedlichen Mechanismen unterscheiden (Gleichung 15):

$$\frac{d\dot{V}}{dt} = -k\dot{V}_{\text{Membran}}(\dot{V}_{\text{Membran}}A)^{2-n} \quad (15)$$

Dabei entspricht t der Zeit und k dem Proportionalitätskoeffizient. Der Koeffizient n beschreibt den jeweilig vorliegenden Mechanismus, mit $n=3/2$ für Standardverblockung, $n=1$ für

Intermediate-Verblockung, $n=2$ für komplette Verblockung und $n=0$ für Kuchenfiltration (Ho C, 2000). Der typische Verlauf des Filtratvolumens in Abhängigkeit des Verblockungsmechanismus ist in Abbildung 8 dargestellt.

Allerdings tritt bei realen Filtrationsprozessen selten lediglich ein Mechanismus auf, was die Betrachtung erschwert. Ho und Zydney haben eine Kombination der Mechanismen vorgeschlagen (Ho und Zydney, 2000). Beginnend mit einer Verblockung durch die Ablagerung von Proteinaggregaten auf der Membranoberfläche bzw. in den Poren der Membran folgt das Wachstum eines Kuchens oberhalb der bereits verblockten Regionen. Es wird als allgemeingültig angesehen, dass Aggregate eine Schlüsselrolle bei der Verblockung einnehmen und als Keim des Foulings dienen (Kelly *et al.*, 1993).

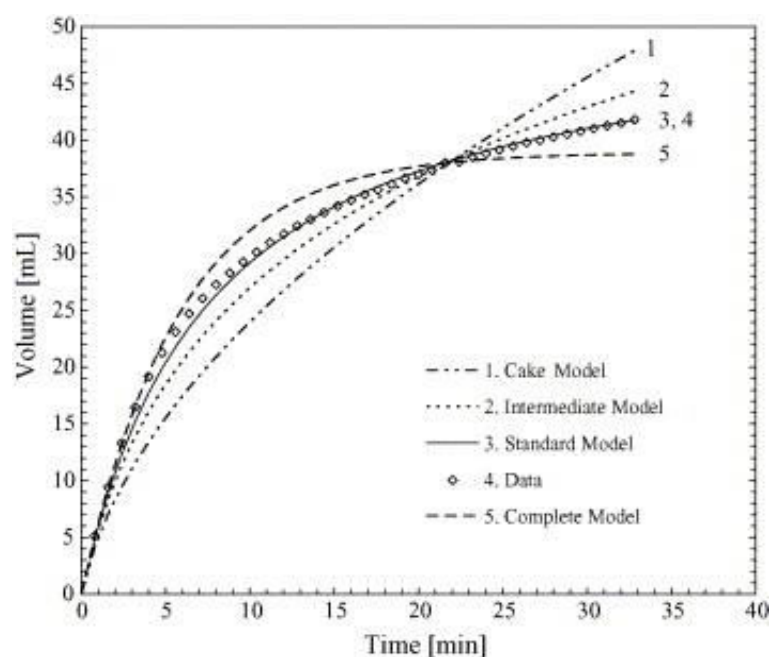


Abbildung 8: Verblockungsmechanismen nach Bolton *et al.* (Bolton *et al.*, 2005).

Der Verlauf der Verblockung während einer Filtration lässt sich ausgehend von experimentellen Daten ermitteln. Dies geschieht unter der Annahme, dass sich kein Filterkuchen bildet, sondern die Verblockung durch sich aufbauende Proteinschichten in den Poren der Membran stattfindet. Es wachsen alle Poren gleichmäßig und zeitgleich zu. Dabei bleibt die Membrandicke konstant, der freie Porenradius als auch die Porosität nehmen mit der Zeit ab. Sie stehen in folgendem Zusammenhang:

$$P = P_0 \frac{r_{\text{Pore}}^2}{r_{\text{Pore},0}^2} \quad (16)$$

Dabei beschreibt P_0 die Porosität der Membran und $r_{\text{Pore},0}$ den Porenradius jeweils zum Zeitpunkt $t=0$.

Durch Einsetzen von Gleichung 16 in Gleichung 14 und Umstellung nach r_{Pore} lässt sich die Verkleinerung des Porenradius während eines Filtrationsprozesses beschreiben:

$$r_{\text{Pore}} = \sqrt[4]{\frac{8l_{\text{Pore}}\tau r_{\text{Pore},0}^2}{P_0 R}} \quad (17)$$

Die Dicke der sich aufbauenden Proteinschicht S in den Membranporen lässt sich darüber hinaus mittels Gleichung 18 beschreiben.

$$S = r_{\text{Pore},0} - \sqrt[4]{\frac{8l_{\text{Pore}}\tau r_{\text{Pore},0}^2}{P_0 R}} \quad (18)$$

2.4.6. Berechnung Scherraten in den Membranporen

Bei der Filtration wirken infolge der Fluidbewegung durch die Membranporen mechanische Kräfte in Form von Scherung auf die Proteinmoleküle. Die Scherraten in den Membranporen können mit Hilfe der Formel für Scherraten an Rohrwänden $\dot{\gamma}_{\text{Rohr}}$ hergeleitet werden (Mezger, 2014):

$$\dot{\gamma}_{\text{Rohr}} = \frac{4\dot{V}_{\text{Rohr}}}{\pi r_{\text{Rohr}}^3} \quad (19)$$

Dabei entspricht \dot{V}_{Rohr} der Flussrate und r_{Rohr} dem Radius des Rohres. Unter der Annahme, dass die Membran aus einer Ansammlung von n Rohr-ähnlichen Poren besteht, kann die Flussrate durch eine einzelne Pore beschrieben werden durch:

$$\dot{V}_{\text{Pore}} = \frac{\dot{V}_{\text{Membran,spez}}}{n_{\text{spez}}} \quad (20)$$

Die spezifische Porenanzahl n_{spez} ist dabei definiert als:

$$n_{\text{spez}} = \frac{P}{\pi r_{\text{Pore}}^2 \tau} \quad (21)$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 20 und 21 in Gleichung 19 lässt sich die Scherrate an den Porenwänden für Filtrationsprozesse $\dot{\gamma}_{\text{Membran}}$ direkt berechnen:

$$\dot{\gamma}_{\text{Membran}} = \frac{4\tau\dot{V}_{\text{Membran,spez}}}{Pr_{\text{Pore}}} \quad (22)$$

Die Scherrate ist somit hauptsächlich abhängig von der Flussrate sowie der Porengröße der Membran.

2.5. Membranfilter - Struktur-Leistungs-Korrelation

Sartorius stellt diverse Mikrofilter auf Basis von Polyethersulfon (PES), Cellulose Acetat (CA), Regenerierte Cellulose (RC), Cellulose Nitrat (CN) und Polyamid über unterschiedliche Herstellungsverfahren her. Diese Membrantypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften, Benetzbarkeit, Struktur, Porengrößenverteilung und Leistungsdaten zum Teil stark. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit sind intern Zusammenhänge zwischen den strukturellen Membranparametern und Filtrationsdaten ermittelt worden. Diese Ergebnisse aus (Masselin *et al.*, 2015) werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Entsprechend Gleichung 12 ist die Flussrate einer Sterilfiltermembran sowohl von der Porosität und der Membrandicke als auch vom Porenradius abhängig, welcher zum Quadrat in die Gleichung eingeht. Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der Wasserflussrate vom Bubble Point für diverse Membranen. Dieser entspricht dem Mindestdruck, der angelegt werden muss, um Luft durch die mit Flüssigkeit gefüllten Poren einer Membran zu drücken.

Die Beziehung zwischen beiden Größen lässt sich mit guter Näherung durch eine Masterkurve beschreiben. Für einzelne Membrantypen ergeben sich dabei charakteristische Abweichungen bedingt durch strukturelle Unterschiede. Bei einem Bubble Point von etwa 4 bar zum Beispiel fällt die Flussrate geringfügig in der Reihenfolge PES, CA, RC ab.

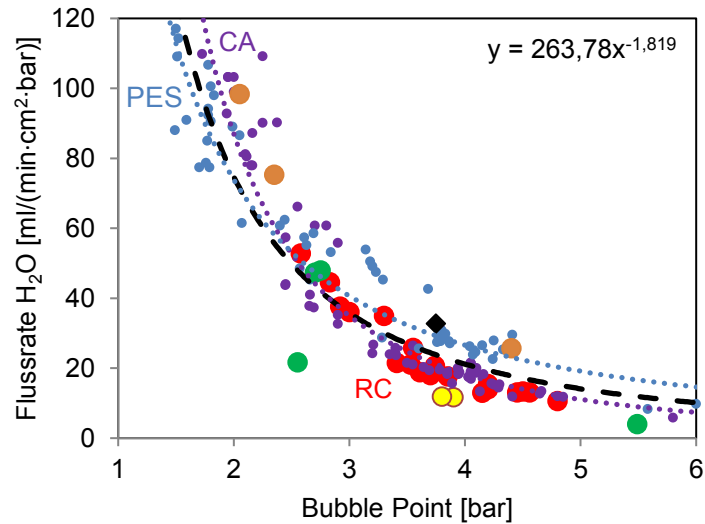


Abbildung 9: H₂O-Flussraten bei einem konstanten Differenzdruck von 1 bar in Abhängigkeit des Bubble Points verschiedener Membranen.

Die Porenradienverteilung einer Membran kann mittels Porometer per Kapillarflussmessungen charakterisiert werden. Mit Hilfe der unterschiedlichen Filter ist eine Korrelation zwischen dem Bubble Point und der größten Membranporen erstellt worden. Abbildung 10 zeigt, dass unabhängig vom Membrantyp der Bubble Point in direktem Zusammenhang mit der größten messbaren Pore steht. Die erste entstehende Luftblase bei einer Bubble Point Messung tritt immer bei Passage der größten Pore auf, da hier der geringste Druck benötigt wird.

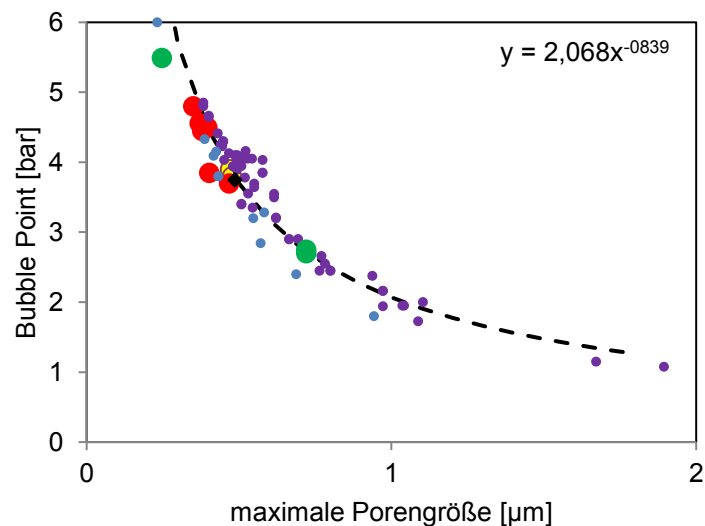


Abbildung 10: Bubble Point in Abhängigkeit von der maximalen Porengröße für verschiedene Membranen.

Die Korrelation zwischen dem Bubble Point und der bakteriellen Rückhaltung wird in Abbildung 21 dargestellt. Danach liegt die Sterilfiltrationsgrenze bei rund 3,4 bar, was einer maximalen Porengröße von ca. 0,55 μm entspricht. In der Praxis werden Membranen mit einem entsprechend höheren Bubble Point spezifiziert und hergestellt, um ein steriles Filtrationsergebnis zu garantieren. Porometer-Messungen zeigen, dass die Anzahl großer Poren relativ gering ist. Abbildung 11 zeigt die Porengrößenverteilung für eine typische Sterilfiltermembran.

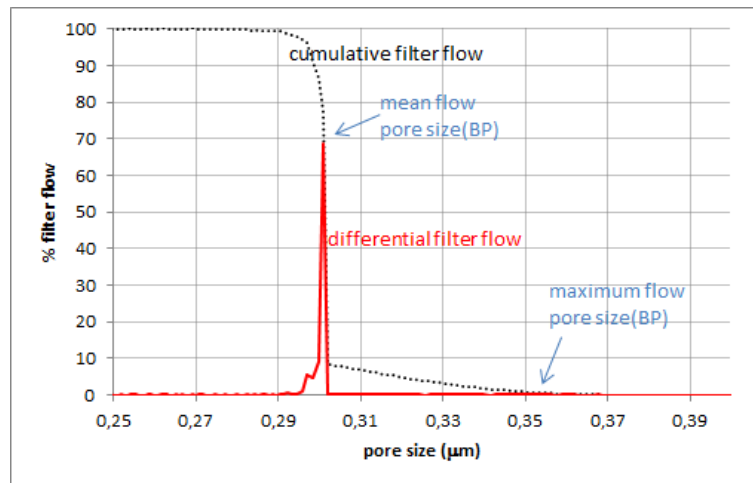


Abbildung 11: Porenradienverteilung einer typischen Sterilfiltrationsmembran mittels Kapillarfluss-Porometermessungen bestimmt.

Die Flussrate korreliert mit dem mittleren Porenradius, welcher über den mittleren Fluss bestimmt wird. Die meisten aller Poren entsprechen der mittleren Porengröße und sind somit verantwortlich für die Flussraten. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 12 dargestellt. Mit zunehmender Porengröße steigt auch der Wasserfluss an.

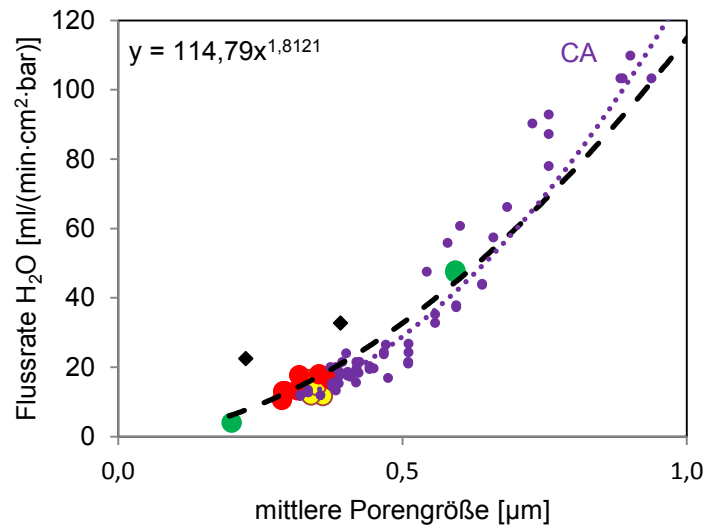


Abbildung 12: H₂O-Flussraten bei einem konstanten Differenzdruck von 1 bar in Abhängigkeit von der mittleren Porengröße für verschiedene Membranen.

Bei der Filtration von partikulären Lösungen kommt es, wie bereits in Kapitel 2.4.5 beschrieben, zur Verringerung der Flussraten durch Verblockungen. Dieses Verhalten ist anhand der Filtration einer internen, partikulären Standardlösung mit einem Differenzdruck von 1 bar untersucht worden (Abbildung 13). Bei der Standardlösung handelt es sich um eine kohlenhydrathaltige Suspension mit einer Partikelgröße von etwa 10 µm.

Dabei kommt es innerhalb von Sekunden zu einer vollständigen Verblockung, welche die Bildung von Deckschichten auf der Anströmoberfläche des Filters beinhaltet. Die Filtrationsleistung der sterilfiltrierenden Flachfilter ist abhängig von der Porengröße, der Membranstruktur, den Oberflächeneigenschaften des Filters sowie von den Prozessbedingungen. Vergleichsweise gute Leistungen können mit der RC- bzw. CA-Membran, welche ein zusätzliches Vlies zur Verstärkung enthält, erzielt werden. Membranen mit hydrophilem Charakter sowie einer vergrößerten Anströmfläche erweisen sich hier als vorteilhaft.

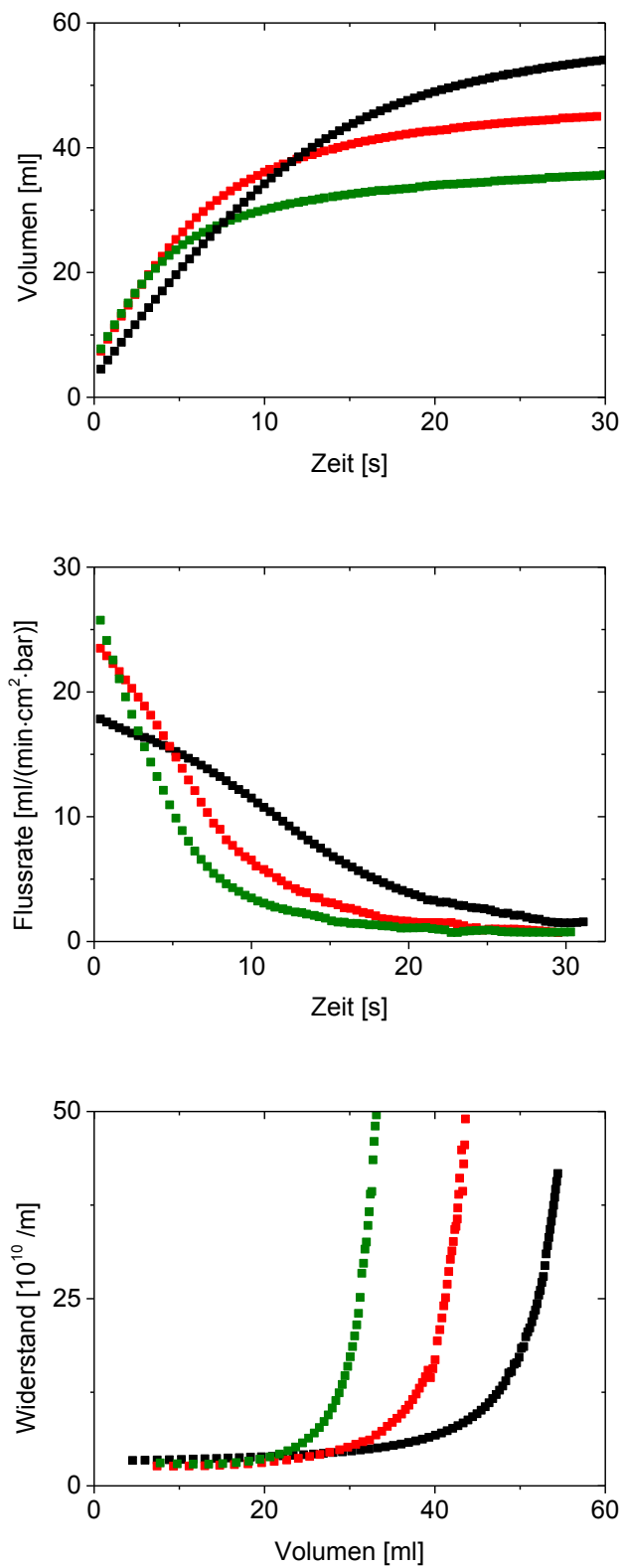


Abbildung 13: Verblockungsverhalten bei der Filtration von einer internen partikulären Standardlösung durch eine RC- (schwarz), CA- (rot) bzw. PES-Membran (grün) bei einem Differenzdruck von 1 bar.

Bei der Filtration von partikulären Lösungen wird üblicherweise ein zusätzlicher Vorfilter eingesetzt. Dieser schützt den eigentlichen Sterilfilter vor einer zu hohen Partikellast. Ein Vergleich des Filtrationsverhaltens eines Sterilfilters zu einer Vorfilter-Sterilfilter-Kombination für die interne Standardlösung ist in Abbildung 14 exemplarisch am Beispiel von CA-Membranen dargestellt. Es zeigt sich, dass der Anfangsfluss abhängig vom Membranwiderstand ist. Dieser ist auf Grund der offeneren Porenstruktur des Vorfilters geringer, was höhere Flussraten ermöglicht. Der weitere Verlauf der Filtration wird durch das Verblockungsverhalten beeinflusst. Die Schutzwirkung des Vorfilters zeigt sich deutlich in einer verzögerten Flussabnahme, welche wiederum zu höheren Filterkapazitäten führt.

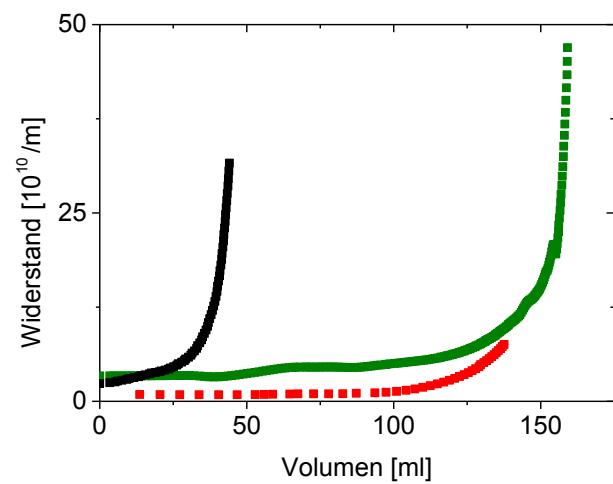
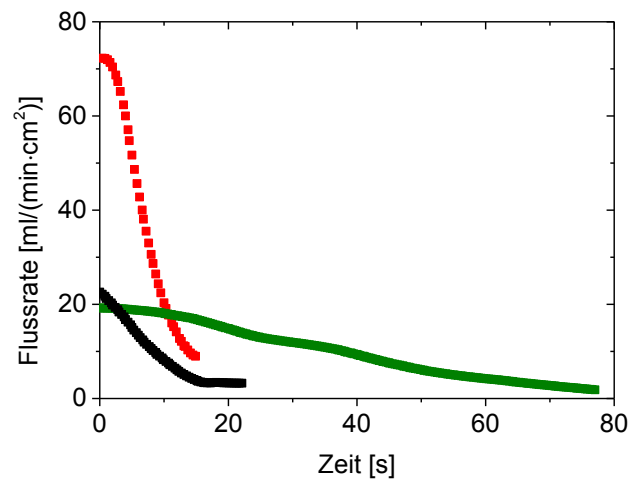
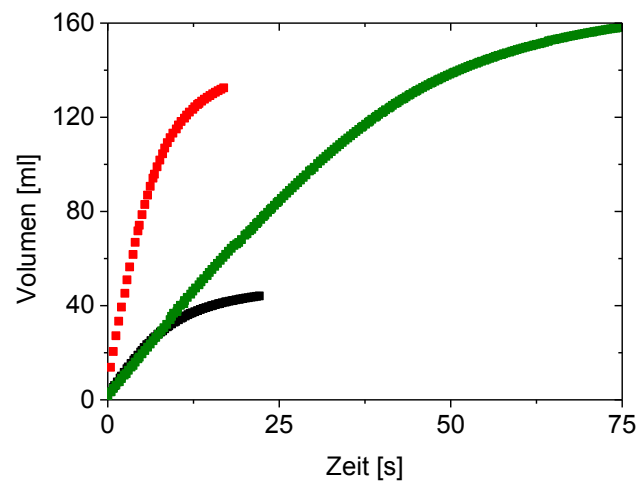


Abbildung 14: Verblockungsverhalten bei der Filtration einer internen Standardlösung bei einem konstanten Differenzdruck von 1 bar durch einen CA-Sterilfilter (schwarz), -Vorfilter (rot) bzw. Vorfilter-Sterilfilter-Kombination (grün).

Die Wahl des optimalen Vorfilters beruht auf dem Verhältnis der Porengrößen beider Filter. Abbildung 15 zeigt die $V_{1/2}$ -Werte unterschiedlicher Kombinationen von Steril- und Vorfilter. Während bei einem zu offenen Vorfilter die partikuläre Last nicht zurückgehalten wird und somit die Schutzwirkung verloren geht, wird die Verblockung bei einem zu engen Vorfilter nicht mehr auf beide Filter verteilt, sondern findet hauptsächlich im Vorfilter statt. Aus diesem Grund ergibt sich eine optimale Porengröße des Vorfilters bezogen auf die Filterkapazität.

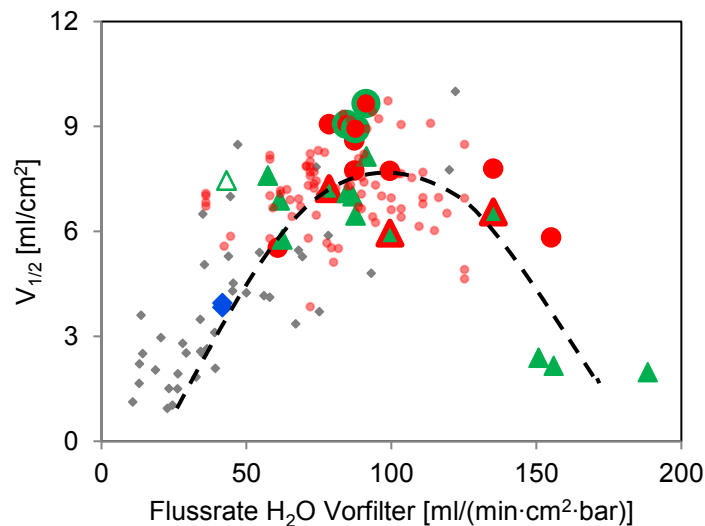


Abbildung 15: $V_{1/2}$ -Werte in Abhängigkeit vom Wasserfluss des Vorfilters für die Filtration einer internen Standardlösung bei einem konstanten Druck von 1 bar durch unterschiedliche Vorfilter-Sterilfilter-Kombinationen.

Die kombinierten Widerstände beider Membranen einer Vorfilter-Hauptfilter-Kombination haben zudem einen direkten Einfluss auf die Flussrate (Abbildung 16). Es besteht ein linearer Zusammenhang mit abnehmenden Flussraten bei steigendem Widerstand.

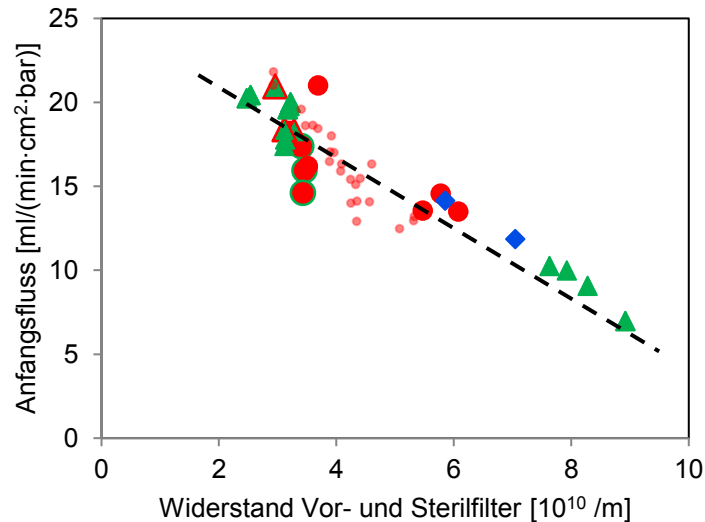


Abbildung 16: Anfänglicher Wasserfluss in Abhängigkeit der Summe der Widerstände von Vor- und Sterilfilter der Filtration einer internen Standardlösung bei einem Differenzdruck von 1 bar durch unterschiedliche Vorfilter-Sterilfilter-Kombinationen.

Ein weiterer Effekt, der in der Literatur in Zusammenhang mit der Verblockung von Membranen bei der Filtration beschrieben wird, sind elektrokinetische Wechselwirkungen sowie die Ausbildung von Oberflächenladungen (Salgin *et al.*, 2013). Elektrokinetische Effekte werden durch die Strömung wässriger Medien entlang der Membranoberfläche während eines Filtrationsvorgangs verursacht. In Folge entgegengesetzter Oberflächenladungen der Grenzflächen kann es zu Ablagerungen von Partikeln auf der Membranoberfläche kommen.

Im üblicher Weise bei biopharmazeutischen Lösungen verwendeten pH-Bereich zwischen 4 und 8 besitzen Proteine in der Regel eine negative Oberflächenladung. Messungen des Zeta-Potentials verschiedener Membrantypen zeigen ebenfalls eine negative Ladung (Abbildung 17). Das Oberflächenpotential ist dabei abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung sowie von vorhandenen Additiven wie zum Beispiel Tensiden. Es variiert demnach zwischen -60 und 5 mV. Eine mögliche Ablagerung von negativ geladenen Proteinen ändert somit nicht die negative Ladung der Membran.

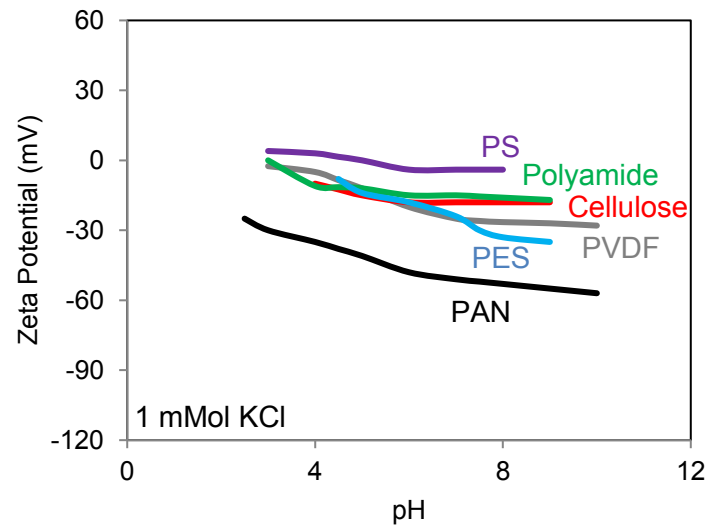


Abbildung 17: Zeta-Potential unterschiedlicher Sterilfilter in wässriger Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes, gemessen in 1 mM KCl.

3. Material und Methoden

3.1. Protein

Es sind drei unterschiedliche Modellproteine zum Einsatz gekommen. BSA, α -Amylase EC 3.2.1.1 (Taka-diastrase aus *Aspergillus oryzae*) und γ -Globulin sind als gefriergetrocknete Pulver von VWR (Deutschland) bezogen worden mit Molmassen von 67, 55 bzw. 150 kDa. Ihre Partikelgrößen sind über die minimalen Radien (Gleichung 3) berechnet worden und betragen 5,4 nm für BSA, 5,0 für α -Amylase und 7,5 nm für γ -Globulin. Die Enzymaktivität der α -Amylase liegt bei 1,5 U/mg.

3.2. Herstellung der Proteinlösung

Für die Filtrationsversuche sind die Proteinlösungen, wenn nicht anders vermerkt, in Konzentrationen zwischen 100 und 250 mg/ml angesetzt worden. Sofern nicht anders angegeben, sind die lyophilisierten Proteine jeweils in der Pufferlösung unter Rühren gelöst worden. Bei Raumtemperatur wurde solange mit einer maximalen Drehzahl von 70 rpm gerührt, bis die Proteine vollständig in Lösung übergegangen sind und die Lösungen optisch transparent sind. Als Puffer wurde eine Mischung aus gleichen Teilen von 200 mM Natriumphosphat- und Natriumsulfatpuffer eingesetzt mit einem pH-Wert von 6,9. Außerdem wurden 0,5 % Tween 80, 0,01 % NaCl und 1 % Trehalose zugesetzt. Alle Proteine wurden im gleichen Puffersystem gelöst, um Einflüsse vom Puffer auf die Filtrationsergebnisse ausschließen zu können.

Die Proteinlösungen wurden zunächst direkt und ohne weitere Vorfiltration eingesetzt, damit der Einfluss der Mikrofiltration ermittelt werden konnte, ohne dass die Lösung durch zusätzliche Prozessschritte beeinflusst wird. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sind die Proteinlösungen ebenfalls verdünnt angesetzt und mittels Crossflow-Filtration aufkonzentriert worden (Kapitel 3.4.2). Für die vergleichenden Adsorptionsmessungen sind die Lösungen von BSA und γ -Globulin in Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml angesetzt worden. Für BSA kam dabei ein 50 mM KPi-Puffer mit einem pH-Wert von 7 zum Einsatz. γ -Globulin ist in einem 20 mM Natriumacetat-Puffer mit 25 mM NaCl und pH 5 gelöst worden.

3.3. Membran

Diverse Mikrofiltrationsmembranen mit einer nominellen Porengröße von 0,2 μm (Tabelle 1) wurden auf ihre Eignung als FF-Filter untersucht. Dazu zählen Regenerierte Cellulose, Cellulose Acetat, Polyethersulfon und oberflächenhydrophilisiertes Polyvinylidenfluorid (PVDF_{hyd}). Des Weiteren kamen Cellulose Nitrat und Polyvinylidenfluorid (PVDF) zum Einsatz. Auf Grund ihres hydrophoben Charakters eignen sich diese Membrantypen zur Analyse des Einflusses der chemischen Membraneigenschaften. Um den Einfluss struktureller Membraneigenschaften untersuchen zu können, ist zum Teil auch auf eine Polycarbonat Track-Etch Membran zurückgegriffen worden. Zur Untersuchung des Sterilfiltrationsvermögens sind außerdem RC und CA Membranen mit einer Abstufung der Porengröße genutzt worden. Für die finalen Filtrationsversuche mit hochkonzentrierten Proteinlösungen kamen primär RC und CN zum Einsatz. Somit konnte der Einfluss des Adsorptionsverhaltens auf die Filtrationsleistung analysiert werden, da sich dieses bei den gegebenen Materialien stark unterscheidet.

Tabelle 1: Eingesetzte Referenzmembranen mit einer nominellen Porengröße von 0,2 μm .

Material	Hersteller
Regenerierte Cellulose	
Cellulose Acetat	
Polyethersulfon	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Polycarbonat	
Cellulose Nitrat	
Polyvinylidenfluorid hydrophilisiert	Merck KGaA, Deutschland
Polyvinylidenfluorid	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

3.4. Filtrationsprozesse

3.4.1. Dead-End

Alle untersuchten Proteinfiltrationen sind im Dead-End-Modus durchgeführt worden. Dabei sind die Filtrationsversuche wahlweise mit konstantem Differentialdruck oder konstanter Flussrate als Dreifachmessung erfolgt.

Für die Versuche mit konstantem Druck wurden Flachfilter mit einer aktiven Filterfläche von 13 cm^2 eingesetzt. Die Differenzdrücke wurden per Druckluft eingestellt, aufgezeichnet und je nach Experiment zwischen 0,05 und 2 bar variiert. Die entsprechenden Flussraten wurden mit Hilfe des

aufgenommenen Filtratvolumens im Verlauf der Zeit berechnet. Des Weiteren sind die Anfangsflüsse, Kapazitäten bei 50 %iger Verblockung und die Widerstandsverläufe aufgezeichnet bzw. berechnet worden.

Bei Messungen mit einer konstanter Flussrate ist auf einen Aufbau mit einer 50 ml neMESYS Spritzenpumpe (cetoni GmbH, Deutschland) zurückgegriffen worden. Es ist durch Flachfilter mit einer aktiven Filterfläche von 3 cm² und Flussraten von 0,1 bis 2 ml/(min·cm²) filtriert worden. Dies entspricht applikationsrelevanten Flussraten therapeutischer Proteinlösungen, welche meist im Bereich von 100 bis 1000 l/(h·m²) liegen. Der Druckverlauf und das Filtratvolumen sind in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet worden.

Für vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Leistungsdaten verschiedener Sterilfilter sind außerdem Filtrationen mit einer partikulären, kohlenhydrathaltigen, internen Standardlösung und einem Differenzdruck von 1 bar durchgeführt worden. Die Partikelgröße der Standardlösung beträgt rund 10 µm.

3.4.2. Crossflow

Einzelne Proteinlösungen sind nicht direkt in ihrer endgültigen Konzentration angesetzt worden, sondern mittels Tangentialfluss-Filtration aufkonzentriert worden. Dazu ist ein Sartoflow® Slice 200 Benchtop System von Sartorius Stedim Biotech GmbH (Deutschland) mit einer Sartocon® Hydrosart® Slice 200 Filtercassette mit einem Cut off von 10 kDa genutzt worden. Der eingestellte Fluss des Feedstroms betrug 20 ml/min bei einem Verhältnis zwischen Retentat- und Permeatfluss von 1 zu 19.

3.5. Mess- bzw. Analysemethoden

3.5.1. Bubble Point

Die Messungen des Bubble Points der unterschiedlichen Sterilfiltermembranen sind mit Hilfe des Sartocheck® 4 plus (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) an einem runden 142 mm Stanzling erfolgt.

3.5.2. Porometrie

Das Porometer Porolux™ 500 von POROMETER nv (Belgien) ist zur Ermittlung der Porengrößenverteilung der Membranen eingesetzt worden. Dabei ist die jeweils kleinste, mittlere, und größte Pore bestimmt worden.

3.5.3. Rasterelektronenmikroskop

Für die Analyse der Membranen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) sind zunächst die 3x10 mm großen Membranproben, welche auf einem Probenträger fixiert sind, mit Gold beschichtet worden. Dazu ist der K550 Emitech Sputter Coater (Quorum Technologies Ltd, Großbritannien) für 3 min bei 30 mA genutzt worden. Für die anschließenden Aufnahmen ist das REM Quanta 200 von FEI (USA) mit einer Spotgröße von 3, einer Spannung von 7,5 kV und einem Abstand von 10 mm eingesetzt worden. Soweit nicht anders angegeben, sind die Aufnahmen von Anströmseite und Filtratseite bei einer Vergrößerung von 4000x und Querschnitte bei 2000x erfolgt.

Für Aufnahmen nach der Filtration mit den jeweiligen Proteinlösungen sind die Membranproben zuvor bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet worden.

3.5.4. Bacteria Challenge Test

Die bakterielle Retentionsfähigkeit von sterilfiltrierenden Membranen ist mittels eines standardisierten Testverfahrens, dem sogenannten Bacteria Challenge Test (BC Test), durchgeführt worden, welches detailliert von (ASTM International, 2013) beschrieben wird. Dabei wird durch die jeweilige Membranprobe eine vitale Kultivierungslösung des Bakteriums *Brevundimonas diminuta* filtriert und mit Hilfe eines nachgeschalteten Analysefilters die bakterielle Belastung im Filtrat bestimmt. Wird dabei ein LRV größer oder gleich 7/cm² erreicht, was einer Reduktion des Bakteriengehalts um mindestens sieben log₁₀-Stufen pro cm² entspricht, so gilt die Membran als sterilfiltrierend.

Über das Standardverfahren hinaus gibt es weitere Varianten des Tests, welche als besonders kritisch bezüglich der Bakterienrückhaltung angesehen werden. Eine mögliche Alternative ist ein Langzeittest, um lange Abfüllprozesse im Pharmabereich nachzustellen. Dabei wird über einen Zeitraum von 96 h filtriert. Während dieser Dauer wird nach 48 h *B. diminuta* nachgespiked, um sicher zu stellen, dass über die gesamte Dauer der Filtration vitale Bakterien vorhanden sind.

Der sogenannte High-Challenge-BC-Test wird mit Zugabe von 10-fach PBS und 0,5 % Tween 80 zur Kultivierungslösung von *B. diminuta* filtriert. Salze und Tenside sind häufige Bestandteile der Pufferlösungen bei therapeutischen Proteinen, welche die Bakterienrückhaltung potentiell verschlechtern.

Beide Testprotokolle basieren auf den offiziellen Vorschriften des Sartorius Validierungsservice Confidence® (Deutschland, 2012).

3.5.5. Adsorption

Proteinadsorption - statischer Assay

Für die statische Untersuchung der Proteinadsorption an Filtrationsmembranen ist das Pierce™ BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit von Thermo Fischer Scientific Inc. (Deutschland) zum Einsatz gekommen. Dazu wurde von jedem Membrantyp ein Stanzling mit einem Durchmesser von 10 mm in eine 48-Well-Platte inklusive 200 µl der entsprechenden Proteinlösung platziert. Anschließend wurden die Proben für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Farbreaktion und die eigentliche photometrische Analyse bei 562 nm erfolgten schließlich entsprechend dem Userguide des BCA-kits (Pierce, 2015).

Proteinadsorption - dynamischer Assay

Alternativ zum statischen Assay sind Messungen mittels der dynamischen Adsorptionsanalyse durchgeführt worden. Diese Methode ermöglicht die Online-Messung einer Proteindurchbruchskurve während der Filtration der Proteinlösung bei konstantem Fluss. Der allgemeine Messaufbau ist im Fließschema in Abbildung 18 dargestellt. Aus einem Vorlagebehälter heraus wird die Proteinlösung durch den Membranfilter gepumpt. Die Proteinkonzentration im Filtrat wurde im Anschluss mittels eines Durchfluss-UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt.

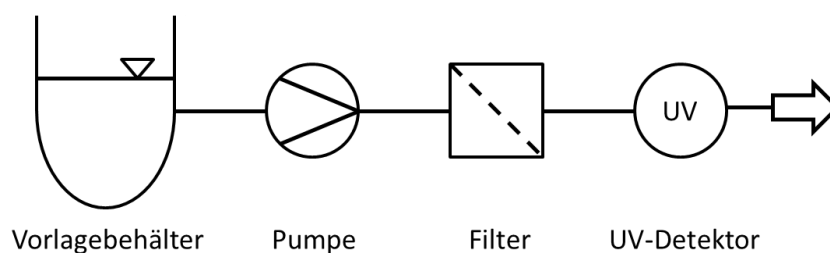


Abbildung 18: Fließschema des Aufbaus für die dynamische Adsorptionsanalyse.

Im vorliegenden Fall ist für den beschriebenen Aufbau die ÄKTAprime plus (GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland) genutzt worden. Dazu wurden Flachfilter mit einer aktiven Filterfläche von 5 cm² unter dem Einfluss verschiedenster Flussraten zwischen 0,2 und 2 ml/(min·cm²) analysiert. Um die Membranoberfläche zu vergrößern, wurden jeweils vier Flachfilterproben des gleichen Typs gestapelt eingesetzt. Die resultierende Oberfläche betrug somit 20 cm². Es ist jeweils ein Gesamtvolumen von 15 ml filtriert und die dazugehörigen Durchbruchkurven mit und ohne Membran aufgezeichnet worden (Abbildung 19).

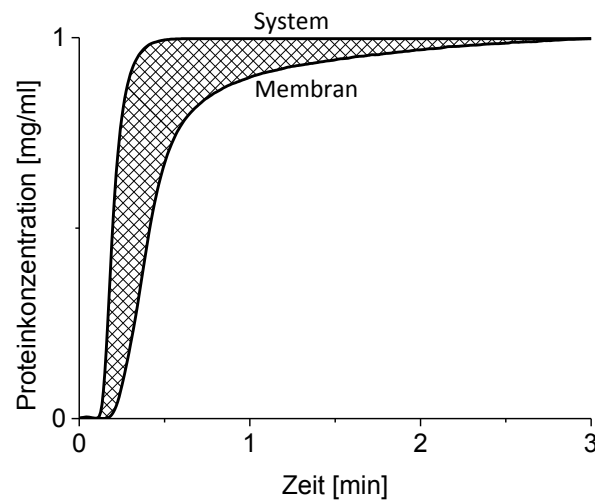


Abbildung 19: Beispielhafte Darstellung von einer Durchbruchkurve des Systems im Vergleich zur Proteinfiltration.

Die Proteinkonzentration der Lösung auf der Filtratseite ist mittels eines integrierten UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm über den Verlauf der Zeit t detektiert worden. Entsprechend Gleichung 23 kann mittels der Integrale der Durchbruchkurven des Systems ohne Membran c_{System} sowie der Proteinkonzentration c_{Membran} die adsorbierte Proteinmenge $m_{\text{Adsorption}}$ pro Membranfläche bestimmt werden. Analog zu Messungen von Bialopiotrowicz *et al.* (2002) ist der Beginn der Integration definiert worden als Zeitpunkt, wenn die Durchbruchkurve beginnt anzusteigen.

$$m_{\text{Adsorption}}(t) = \frac{\left(\int c_{\text{System}}(t) dt - \int c_{\text{Membran}}(t) dt \right)}{A} \quad (23)$$

Die maximale Menge an adsorbiertem Protein ist anschließend mittels einer mathematischen Linearisierung bestimmt worden. Dieser Wert korreliert mit der Fläche zwischen der Systemkurve und der Kurve der Proteinfiltration. Die maximalen Adsorptionswerte sind für einen direkten Vergleich mit der statischen Messmethode genutzt worden.

Die Adsorptionsrate in Abhängigkeit der Zeit ist mittels der Ableitung von $m_{\text{Adsorption}}$ über die Zeit ermittelt worden.

Außerdem ist der Bedeckungsgrad B der spezifischen Membranfläche pro Membranoberfläche $A_{\text{Membran, spez}}$ mit adsorbiertem Protein berechnet worden:

$$B = 100 \frac{m_{\text{Adsorption}}}{\text{cap}_{\text{Monolayer}} * A_{\text{spez}}} \quad (24)$$

Dabei entspricht $\text{cap}_{\text{Monolayer}}$ der Bindekapazität des jeweiligen Proteins. Für BSA entspricht sie etwa $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Bialopiotrowicz *et al.*, 2002). Für die hier untersuchten Membranen entspricht die spezifische Membranfläche A_{spez} ca. $10 \text{ m}^2/\text{g}$ Filtermaterial, was äquivalent zu 500 cm^2 pro cm^2 Membranfläche ist.

Nicht-ionische Tenside

Für Adsorptionsanalyse von nicht-ionischen Tensiden ist ebenfalls ein dynamischer Messaufbau zum Einsatz gekommen. Es ist eine wässrige Lösung mit $0,2 \text{ mg}/\text{ml}$ Tween 80 durch die jeweilige Membran mit einer aktiven Filterfläche von 25 cm^2 und einer konstanten Flussrate von $0,5 \text{ ml}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$ filtriert worden.

Eine Online-Konzentrationsmessung ist allerdings nicht möglich gewesen. Hier ist das Filtrat fraktioniert aufgefangen und nach einer Anfärbung die Tensidkonzentration photometrisch bestimmt worden. Dazu sind zunächst jeweils 2 ml der einzelnen Fraktionen über $15\text{-}18 \text{ h}$ bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingedampft worden. Anschließend sind $0,6 \text{ ml}$ einer Kobaltreagenz, bestehend aus $174 \text{ mg}/\text{ml}$ Ammoniumthiocyanat und $28 \text{ mg}/\text{ml}$ Kobalt(II)-nitrat-Hexahydrat, sowie $1,2 \text{ ml}$ Dichlormethan hinzugeben worden. Nach Schütteln ist es zu einer Phasentrennung gekommen, wobei sich das nicht-ionische Tensid in der organischen Phase wiederfindet. Eine photometrische Analyse einer Wellenlänge von 620 nm ermöglicht letztendlich die die Bestimmung der Tensidkonzentration. Somit lässt sich die Tensidkonzentration im Filtrat in Abhängigkeit des Filtratvolumens als Durchbruchskurve darstellen.

3.5.6. Infrarot-Spektroskopie

Zur Aufnahme von Infrarot-Spektren (IR) ist das Optic Tensor 27 Spektrometer von Bruker Corporation (USA) eingesetzt worden. Mittels ATR-Kristall (Attenuated Total Reflection) werden dabei Adsorptionsmessungen im Bereich von 4000 bis 650 nm bei einer Auflösung von $4 /\text{cm}$ durchgeführt.

3.5.7. Extractables

Der mögliche Anteil an Extractables der Membranen ist mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Analytik (HPLC) bestimmt worden. Dazu sind zunächst Membranproben mit einer Fläche von 6,2 cm² in 3 ml Acetonitril für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert worden. Acetonitril ist zum Einsatz gekommen, da es sich hierbei um ein sehr potentes Lösungsmittel handelt.

Die anschließende HPLC-Analytik des Überstandes ist mittels der Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, INC., USA) und einer Säulenkombination aus Kromasil 300-5-C18 und Kromasil 100-5-C18 (beide AkzoNobel, Schweden) mit nachgeschaltetem UV-Detektor durchgeführt worden. Es wurde eine Flussrate von 1 ml/min, eine Temperatur von 40 °C, eine Wellenlänge von 220 nm, ein Injektionsvolumen von 20 µl eingestellt. Im Laufe der Analyse sind die folgenden Gradienten gefahren worden:

Tabelle 2: HPLC-Gradienten bei der Extractables-Analyse.

Zeit [min]	Gradient	Eluent
0-10	isokratisch	60 % Acetonitril 40 % H ₂ O
10-30	linear	auf 95 % Acetonitril 5 % H ₂ O
30-65	linear	auf 100 % Acetonitril

3.5.8. Endotoxine

Für die Analyse auf pyrogene Bestandteile der Membranen sind zunächst die Glasflaschen für die Proben für 5 h auf 180 °C ausgebrannt worden, um sie von eventuell vorhandenen Endotoxinen zu befreien. Anschließend wurden die jeweiligen Membranproben mit einer Gesamtfläche von 70 cm² in den Probenflaschen 30 min lang bei 121 °C autoklaviert. Danach sind sie in 10 ml WFI (Water for Injection) für 24 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die eigentliche Analyse des Überstands erfolgte durch die MicroCoat Biotechnologie GmbH, Deutschland. Nach einem Zentrifugationsschritt mit 17000 g für 5 min folgte der rekombinanten Faktor C Assay EndoZyme® von Hyglos GmbH, Deutschland. Der Assay wurde inklusive einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchgeführt.

3.5.9. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Zur Untersuchung der Proteinkonzentrationen in Lösung sowie des Aggregations- und Adsorptionsverhaltens wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Dabei kam eine Kombination aus der Phenomenex Yarra 3 µm SEC 3000 und der SecurityGuard KJO-4282 Säule mit nachgeschaltetem UV-Detektor zum Einsatz. Als Prozessparameter wurden eine Flussrate von 1 ml/min, eine Temperatur von 25 °C, eine Wellenlänge von 220 nm, ein Injektionsvolumen von 5 µl und ein isokratischer Verlauf eingestellt. Der Laufpuffer entspricht dem Proteinpuffer ohne die Zusätze von Tween 80, NaCl und Trehalose.

Proben der Proteinlösungen im Ausgangszustand bzw. des Filtrats sind zum Teil verdünnt worden, um eine gute Auflösung des Signals zu gewährleisten. Die BSA-Lösung ist um Faktor 10 verdünnt worden, die γ-Globulin-Lösung um Faktor 4 und die α-Amylase-Lösung kam unverdünnt zum Einsatz.

3.5.10. Dynamische Lichtstreuung

Die Messungen mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) zur Bestimmung der Proteingrößen sind mit dem Zetasizer Nano ZSP von Malvern Instruments Ltd (Deutschland) durchgeführt worden. Dabei sind sowohl der Forward als auch der Back Scatter mit Winkeln von 175 bzw. 17 ° detektiert worden. Bei der Umrechnung der aufgezeichneten Veränderungen der Streuintensitäten in Partikelgrößen ist die Volumen- sowie die Intensitätsverteilung genutzt worden. Die Proben der Proteinlösung sind vor der Messung um Faktor 10 verdünnt worden.

3.5.11. Rheologie

Die Viskositätsmessungen der Proteinlösungen wurden mit dem Platten-Kegel-Rheometer HAAKE™ RheoStress™ 1 von Thermo Scientific™ durchgeführt. Der angewandte Kegel hatte einen Winkel von 1°. Um die Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate darzustellen, sind Messungen mit Scherraten von 10, 50, 100, 500, 1000 und 5000 /s ausgeführt worden. Im Anschluss wurden die Viskositätswerte im Bereich größer 100 /s gemittelt, wo die Viskosität einen konstanten Wert hatte.

3.5.12. α -Amylase Assay

Der Enzym-Assay von α -Amylase ermöglicht eine Untersuchung der Enzymaktivität. Er basiert auf der Spaltung von Stärke in Maltoseeinheiten, welche mit Hilfe einer Farbreagenz angefärbt und detektiert werden können.

Dazu werden 500 μ l Enzymlösung mit 500 μ l Stärkelösung (1 %ig 0,02 M NaP_i-Puffer mit 0,006 M NaCl) bei Raumtemperatur gemischt. Es folgt die Zugabe der Farbreagenz (1 % 3,5-Dinitrosalicylsäure, 30 % Natrium-Kalium-Tartrat-Tetrahydrat und 20 % 2M NaOH in Wasser) und ein fünfminütiges kochendes Wasserbad, um die enzymatische Spaltung zu stoppen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden nochmals 10 ml ROW zugesetzt. Das Intensitätssignal wird bei einer Wellenlänge von 540 nm ausgelesen. Durch einen Vergleich mit einer Standardreihe kann die Enzymaktivität berechnet werden:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{m(A_{540} - A_{\text{Blank}}) + b}{C_{\text{Enzym}} t_{\text{Reaktion}} V_{\text{Enzym}}} \quad (25)$$

Dabei beschreibt m die Steigung der Standardgraden, b den Ordinatenabschnitt, A_{540} und A_{Blank} das Intensitätssignal der Probe bzw. des Blanks, C_{Enzym} die Enzymkonzentration, t_{Reaktion} die Reaktionsdauer und V_{Enzym} das Volumen der Enzymlösung.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. *Sterilfilter für Form&Fill-Anwendungen*

Die Ansprüche, die an einen Sterilfilter im FF-Bereich gestellt werden, sind bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben worden. Im vorliegenden Kapitel wird die allgemeine Eignung verschiedener Membranmaterialien für diesen Prozessschritt untersucht.

4.1.1. *Vergleich allgemeiner Membraneigenschaften*

RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen werden auf ihre allgemeine Eignung als FF-Filter untersucht (Kapitel 3.3). Bei der RC-Membran handelt es sich um einen Membrantypen aus vernetzter regenerierter Cellulose, der häufig in Crossflow-Anwendungen eingesetzt wird. Das Material ist bekannt für seine niedrigen Adsorptionseigenschaften. CA und PVDF_{hyd} hingegen sind bereits als Sterilfilter etablierte Membrantypen. Alle Membranen kommen zum Teil bereits seit vielen Jahren in Herstellungsprozessen der biopharmazeutischen Industrie zum Einsatz. Während die CA- und RC-Membranen zum Sartorius Membranportfolio gehören, handelt es sich bei der PVDF_{hyd}-Membran um eine kommerziell erhältliche Vergleichsmembran (Tabelle 1).

REM-Aufnahmen der untersuchten Membranstrukturen sind in Abbildung 20 zusammengefasst. Die Anström- und Filtratseiten der jeweiligen Membran haben eine in sich homogene Porenstruktur, wobei die Porengrößen herstellungsbedingt leicht abweichen können. Dieser Effekt lässt sich auch im Querschnitt erkennen. Bei der CA-Membran kommt außerdem ein Vlies zur Verstärkung der Membran zum Einsatz und die Membrandicke ist deutlich höher als die der Vergleichsmembranen.

Über den optischen Vergleich hinaus sind charakteristischen Membranrößen wie Bubble Point, mittlere Porengröße und Membrandicke bestimmt worden. Sie sind zusammen mit den zugehörigen Wasserflüssen und Kapazitäten bei 50 %iger Verblockung bei der Filtration mit einer verblockenden partikulären Standardlösung (Kapitel 3.4.1) in Tabelle 3 dargestellt.

Die Membranen weisen vergleichbare Bubble Point-Werte nahe 4 bar und mittlere Porengrößen zwischen 0,34 bis 0,38 µm auf. Diese geringen Unterschiede spiegeln die engen Spezifikationen von Sterilfiltrationsmembranen wider. Die leicht verringerten Porengrößen der PVDF_{hyd}-Membran sind auf die Oberflächenbeschichtung zurückzuführen. Die Acrylatbeschichtung verleiht der Membran ihre hydrophilen Eigenschaften, führt gleichzeitig aber auch zu einer Verengung der Poren.

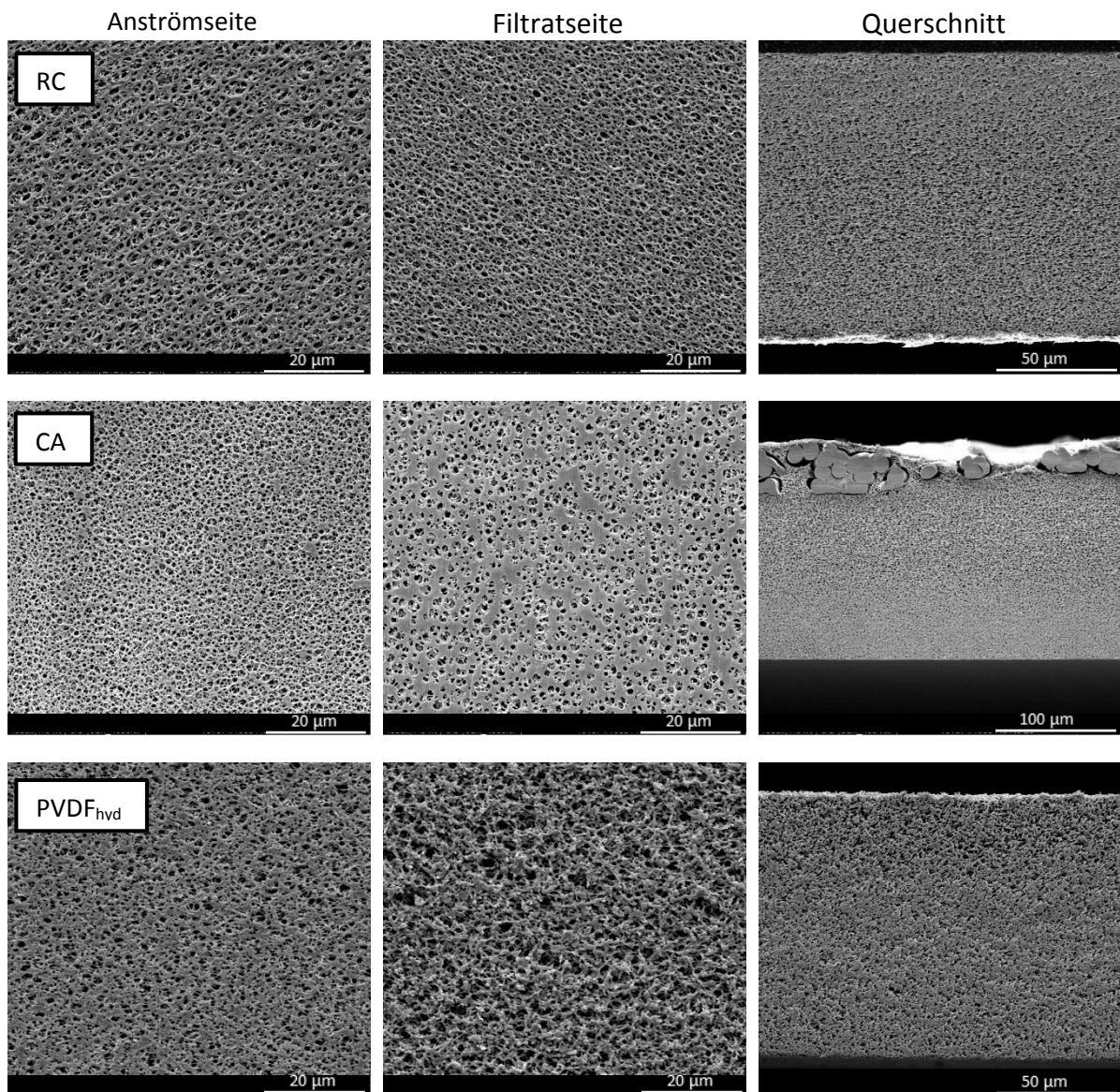


Abbildung 20: REM-Aufnahmen von RC- (oben), CA- (mitte) und PVDF_{hyd}-Membranen (unten). Die Vergrößerung der Anströmseite (links) und der Filtratseite (mitte) beträgt 4000x, die des Querschnittes (rechts) 2000x für RC und PVDF_{hyd} bzw. 1000x für CA.

Der Wasserfluss wird hauptsächlich von der mittleren Porengröße sowie der Porosität der Membran bestimmt, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Die geringen Unterschiede in den Porengrößen spiegeln sich demnach auch im gleichen Verhältnis in den Wasserflüssen wider. Die Filtrationsleistung der unterschiedlichen Membranen bei Filtration der verblockenden Standardlösung ist mit $V_{1/2}$ -Werten von rund 2 ml/cm² vergleichbar.

Tabelle 3: Charakteristische Membrangrößen von RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen.

	Bubble Point	mittlere Porengröße	Membrandicke	Wasserfluss	V _{1/2} Standard
	[bar]	[µm]	[nm]	[ml/(min·cm ² ·bar)]	[ml/cm ²]
RC	4,0	0,37	120	16	2,3
CA	3,8	0,38	183	24	1,7
PVDF _{hyd}	3,9	0,34	119	12	2,0

4.1.2. Sterilfiltrationsvermögen

Bacteria Challenge-Test

Das Sterilfiltrationsvermögen eines Filters lässt sich mit Hilfe des BC-Tests bestimmen (Kapitel 3.5.4). Abbildung 21 zeigt die logarithmische Rückhalterate der Testmembranen aus RC, CA und PVDF_{hyd} in Abhängigkeit von ihrem Bubble Point. Die Sterilfiltrationsgrenze liegt bei einem Bubble Point von ca. 3,4 bar. Membranen mit einem Bubble Point dieser Größe oder höher sind somit sterilfiltrierend. Eine Sterilfiltration mit den untersuchten Vergleichsmembranen (Tabelle 3) ist somit möglich.

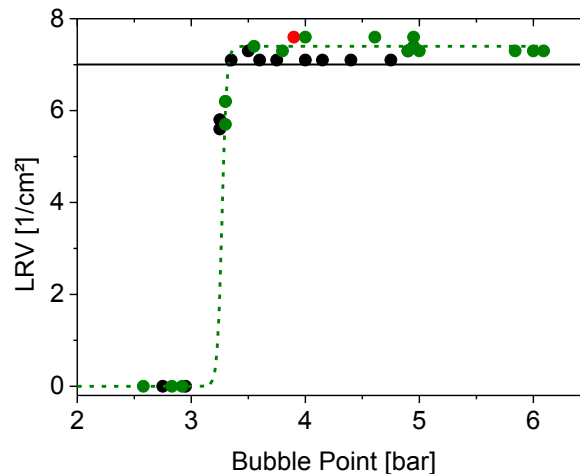


Abbildung 21: LRV des Standard-BC-Tests von RC- (grün), CA- (schwarz) und PVDF_{hyd}-Membranen (rot) in Abhängigkeit des Bubble Points mit Sterilitätsgrenze.

Hohe Salz- und Tensidkonzentration

Bei der Herstellung von hochkonzentrierten Proteinlösungen muss auf spezielle Puffer mit zum Teil relativ hohen Salzkonzentrationen und Zusätzen wie nicht-ionische Tenside, Zucker oder ähnlichem zurückgegriffen werden. Lösungen wie diese können eine besondere Herausforderung für die Bakterienrückhaltung eines Sterilfilters darstellen. Die Bakterienrückhaltung unter diesen

Bedingungen wird mit Hilfe des sogenannten High-Challenge-BC-Test getestet, wobei eine Kultivierungslösung von *B. diminuta* mit zehnfach konzentrierter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 0,5 % Tween 80 filtriert wird.

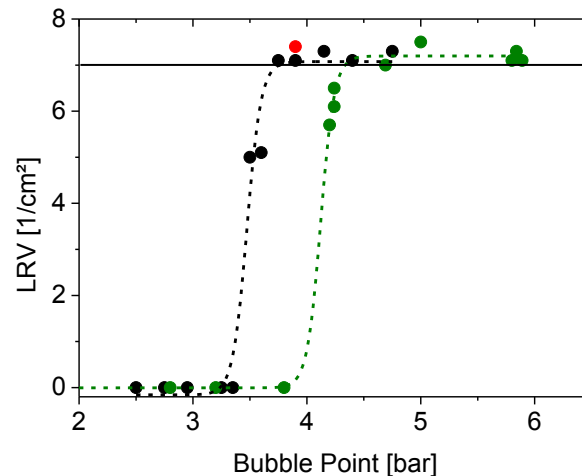


Abbildung 22: LRV des High-Challenge-BC-Tests von RC- (grün), CA- (schwarz) und PVDF_{hyd}-Membranen (rot) in Abhängigkeit des Bubble Points mit Sterilitätsgrenze.

Abbildung 22 zeigt die logarithmische Rückhalterate für die RC- bzw. CA-Membranen in Abhängigkeit ihres Bubble Points sowie für die Vergleichsmembran aus PVDF_{hyd}. Es lassen sich dabei deutliche Unterschiede zum Standard-BC-Test (Abbildung 21) feststellen. Unter den Bedingungen des High-Challenge-BC-Tests verschiebt sich die Sterilfiltrationsgrenze für die RC- und CA-Membranen in Richtung höherer Bubble Points. Der Grad der Verschiebung ist abhängig vom Membrantyp bzw. der Stärke der Wechselwirkung des Polymers mit Wasser. Entsprechend benötigen die RC-Membranen einen deutlich höheren Bubble Point, um unter den gegebenen Bedingungen steril filtrierend zu sein. Onreadt *et al.* konnten ebenfalls ein vermindertes Sterilfiltrationsvermögen für Flüssigkeiten mit einer niedrigen Oberflächenspannung, wie sie durch den Einsatz von Tensiden entsteht, verzeichnen (Onreadt *et al.*, 2010). Eine Reduzierung der Bakterienrückhaltung auf Grund von hohen Salzkonzentrationen konnte auch von Mittelman *et al.* beobachtet werden (Mittelman *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass unter den gegebenen Bedingungen die Bakterien selbst kleiner sind als unter normalen Kultivierungsbedingungen. Bei hohen Salzkonzentrationen wird den Zellen auf Grund des osmotischen Effekts Wasser entzogen, wodurch sie schrumpfen. Somit sind sie leichter in der Lage den Filter zu passieren.

Langzeitfiltration

Eine weitere Herausforderung für das Sterilfiltrationsvermögen einer Membran stellen lange Abfüllzeiten im FF-Bereich dar. Abfüllungen, welche zum Teil mehrere Tage kontinuierlich laufen, sind hier nicht unüblich. Diese Bedingungen werden im Langzeit-BC-Test nachgestellt (Kapitel 3.5.4). Die ermittelten LRV-Werte für unterschiedliche RC-Membranen sowie die PVDF_{hyd}-Membran für einen Zeitraum von 48 bzw. 96 h sind in Abbildung 23 dargestellt.

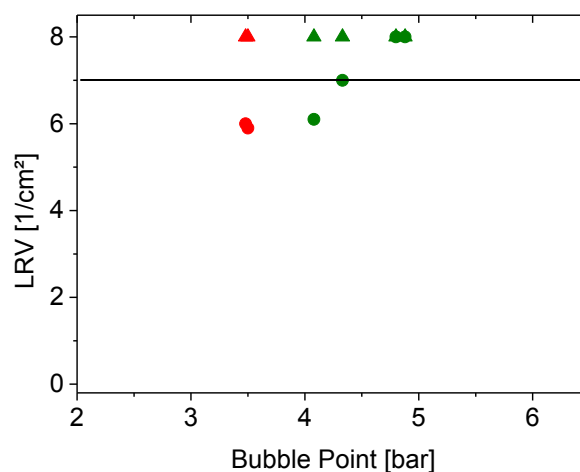


Abbildung 23: LRV des Langzeit-BC-Tests von RC- (grün) bzw. PVDF_{hyd}-Membranen (rot) in Abhängigkeit des Bubble Points mit Sterilitätsgrenze. Die Analysen sind jeweils nach 48 h (Dreieck) und nach 96 h (Kreis) durchgeführt worden.

Im Falle einer 48 stündigen Filtration ist für beide Membranen ein ausreichend großer LRV zu verzeichnen. Erst bei 96 h zeigen sich Unterschiede in der bakteriellen Rückhaltung. Die PVDF_{hyd}-Membran erreicht mit seinem vergleichsweise niedrigen Bubble Points lediglich einen LRV von 6. Auch die RC Membran mit einem Bubble Point von 4,2 bar kann den Langzeit-BC-Test nicht bestehen, erreicht aber oberhalb eines Bubble Points von 4,4 bar eine Rückhaltung, welche den Anforderungen der Sterilfiltration genügt.

Auch bei dieser Variante des BC-Tests zeigt sich, dass mit einem entsprechend hohen Bubble Point ein LRV von 7 erzielt werden kann. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass ein hoher Bubble Point mit kleineren Poren und somit auch mit niedrigeren Flussraten einhergeht. Es bleibt im Einzelfall abzuwägen, wie kritisch die Bedingungen hinsichtlich der bakteriellen Rückhaltung sind, um mögliche Leistungseinbußen bei der Filtration zu minimieren.

4.1.3. Adsorptionseigenschaften

Adsorption von Proteinen

Das Adsorptionsverhalten von therapeutischen Proteinen an Oberflächen kann zu einem möglichen Produktverlust während einer Filtration führen. Eine Membran mit niedriger Proteinbindekapazität wäre demnach für die Prozessfiltration zu bevorzugen.

Es sind verschiedene Sterilfiltrationsmembranen mit eher hydrophilem Charakter hinsichtlich der Proteinadsorption mittels statischem Adsorptionsassays untersucht worden (Kapitel 3.5.5). Dazu zählen PES-, CA-, RC- und PVDF_{hyd}-Membranen. Als Positivkontrolle sind Membranen aus CN und PVDF, beide mit hydrophobem Charakter, zum Einsatz gekommen. Die Absolutmengen an adsorbiertem BSA und γ -Globulin für diese unterschiedlichen Membrantypen sind in Tabelle 4 dargestellt. Dabei lässt sich unabhängig vom eingesetzten Protein ein genereller Trend zu einer stärkeren Adsorption bei den hydrophoben Materialien erkennen. Während die Adsorptionsmengen der eher hydrophilen Membranen aus CA, RC, PVDF_{hyd} bzw. PES sowohl für BSA als auch für γ -Globulin im einstelligen μg -Bereich liegen, erreichen sie bei der CN- und PVDF -Membran Werte zwischen 80 bis 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dieser Zusammenhang wird so auch in der Literatur für unterschiedliche Proteine beschrieben (Mahler *et al.*, 2010). Wie in Kapitel 2.3.3 dargestellt, binden Proteine bevorzugt an hydrophobe Oberflächen, wobei die Wechselwirkungen mit dem Substrat nach Adsorption durch Konformationsänderungen des Proteinmoleküls und Ausrichtung hydrophober Bereiche nach außen verstärkt werden.

Dementsprechend ist bei der Filtration von Proteinen der Einsatz einer Membran mit hydrophilen Oberflächeneigenschaften zu bevorzugen. Bei der Auslegung von Anlagentechnik für die Prozessfiltration muss somit neben der Membran auch die Oberflächenchemie von Konstruktionswerkstoffen beachtet werden und die Adsorptionsneigung sämtlicher Anlagenteile mit berücksichtigt werden

Tabelle 4: Adsorption von BSA bzw. γ -Globulin an unterschiedlichen Membranmaterialien ermittelt mittels statischem Adsorptionsassay.

	m_{adsorbiert} BSA [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	m_{adsorbiert} γ-Globulin [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
CN	91	100
PVDF	89	80
PES	5	6
CA	4	3
RC	1	2
PVDF_{hyd}	2	2

Adsorption von nicht-ionischen Tensiden

Des Weiteren ist das adsorptive Verhalten der Sterilfiltrationsmembranen hinsichtlich nicht-ionischer Tenside, welche häufiger Bestandteil von Proteinpuffern sind, am Beispiel von Tween 80 untersucht worden (Kapitel 3.5.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 in Form von Durchbruchkurven dargestellt. Dabei weisen sowohl die RC- als auch die PVDF_{hyd}-Membran einen vergleichbaren Verlauf auf, wie die Leerwertmessung. Es ist somit insgesamt keine signifikante Adsorption von Tween 80 an die untersuchten Membranen zu verzeichnen. Die leicht verringerte Anfangskonzentration im Filtrat ist erklärbar mit der Adsorption an der Apparatur.

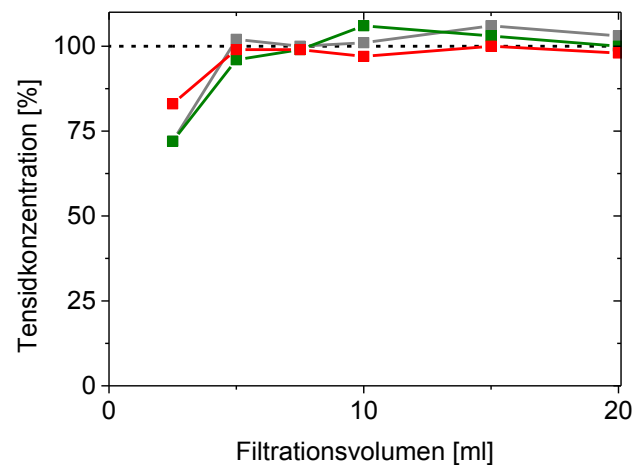


Abbildung 24: Adsorption von 0,02 % Tween 80 während der Filtration bei einer Flussrate von 0,5 ml/(min·cm²). Es wurden die RC- (grün) und PVDF_{hyd}-Membran (rot) verglichen mit dem Leerwert der Messapparatur (grau).

4.1.4. Chemische Beständigkeit

Membranen im FF-Bereich müssen beständig sein gegenüber den im Prozess auftretenden pH-Werten, Chemikalien oder auch speziellen Lösungszusätzen, wie z.B. dem Konservierungsmittel m-Cresol. Eine Veränderung oder gar Zersetzung der Membran gefährdet das bakterielle Retentionsvermögen bzw. die Proteinformulierung und ist somit nicht zulässig. Die hier vorliegenden Untersuchungen sind mittels IR-Spektroskopie erfolgt (Kapitel 3.5.4).

pH-Wert

Um den Einfluss des pH-Wertes näher zu untersuchen, sind die RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen in wässriger Ameisensäure bzw. NaOH-Lösung inkubiert worden. Abbildung 25 zeigt die vor bzw. nach der Inkubation aufgenommenen IR-Spektren der Membranen im Bereich von 2000-1500 /cm bei pH 1,9 bzw. 14 und einer Dauer von 24 h. Bei der CA-Membran wird hingegen das IR-Spektrum nach 1 h

Inkubationszeit bei pH 14 gezeigt, da es nach 24 h bereits zu einer vollständigen Zersetzung gekommen ist.

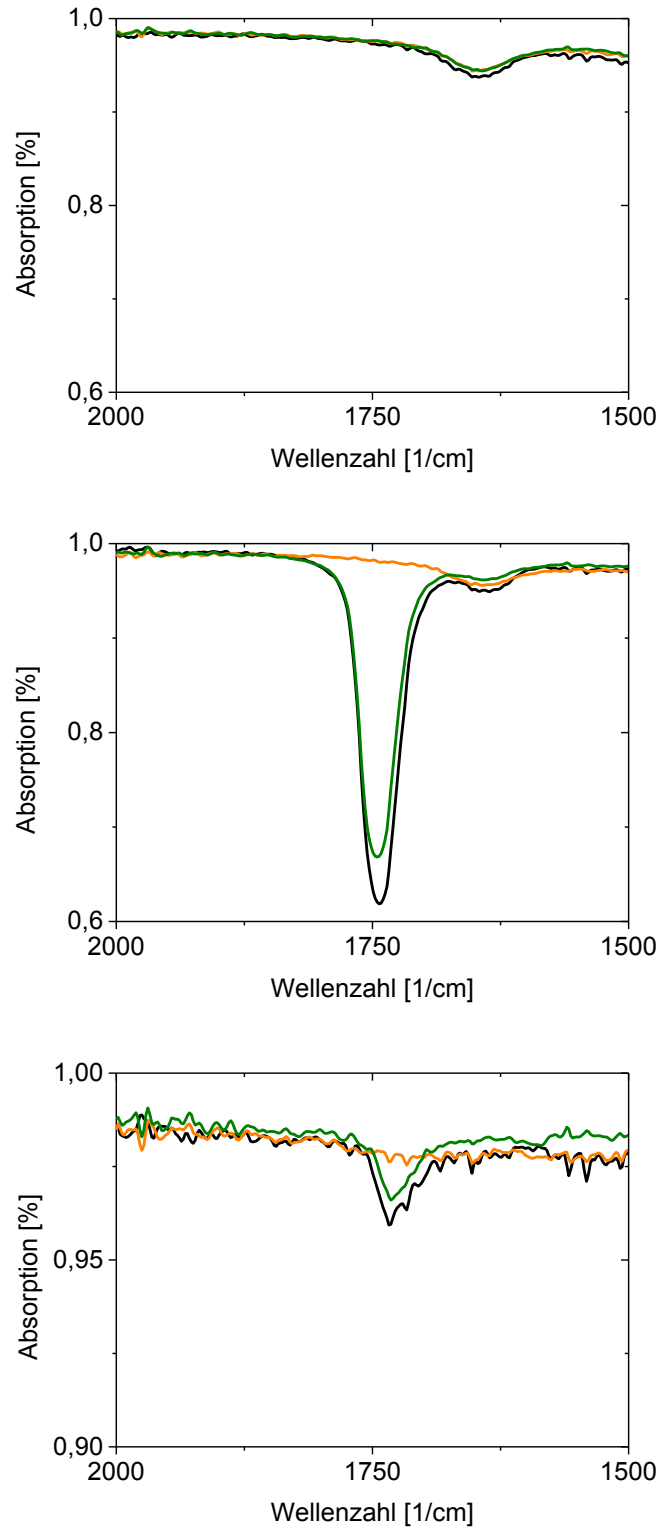


Abbildung 25: IR-Spektren der RC- (oben), CA- (mitte) und PVDF_{hyd}-Membran (unten) nach 24 h Inkubation bei pH 14 (orange), pH 1,9 (grün) bzw. unbehandelt (schwarz).

Im dargestellten Wellenzahl-Bereich befindet sich bei 1850-1550 /cm (Socrates, 2001) die Carbonylbande. Bei CA beschreibt die Intensität dieser Bande den Acetylierungsgrad der Membran. Ein vollständiges Fehlen der Carbonylbande bedeutet vollständige Verseifung unter Bildung von Cellulose. Bei PVDF_{hyd} ist die Carbonylbande charakteristisch für die hydrophile Acrylatbeschichtung der Membran (Steuck, 1986). Dies lässt sich ebenfalls im direkten Vergleich mit einem Spektrum einer nicht-modifizierten PVDF-Membran erkennen (Abbildung 26), wo keine Carbonylbande zu sehen ist. Die RC-Membran weist weder bei stark basischem noch bei saurem pH-Wert eine Veränderung im IR-Spektrum auf. Die regenerierte Cellulose zeigt sich somit stabil gegenüber extremen pH-Werten. Ein anderes Bild zeigt sich bei den Membranen aus CA bzw. PVDF_{hyd}. Hier verringert sich die Ausprägung der Carbonylbande beider Membranen leicht bei saurem pH-Wert. Unter den basischen Bedingungen (pH 14) verschwindet die Bande sogar gänzlich. Bei der CA-Membran kommt es bei basischem pH-Wert zu einer Verseifung der Acetatgruppen. Entsprechend wird in der Produktbeschreibung der CA-Membran empfohlen sie nur im pH-Bereich von 4-8 einzusetzen (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 2016). Bei der PVDF_{hyd}-Membran deutet das Fehlen der Carbonylbande nach Inkubation in basischer Lösung auf eine Beschädigung der hydrophilen Beschichtung hin.

Ein saurer pH-Wert scheint demnach bei allen untersuchten Membranen die chemische Beständigkeit nicht zu beeinflussen. Bei basischen pH-Werten hingegen muss, wenn es sich nicht um RC handelt, im Einzelfall ermittelt werden, ob eine chemische und eine mechanische Beständigkeit unter den entsprechenden Bedingungen gegeben ist.

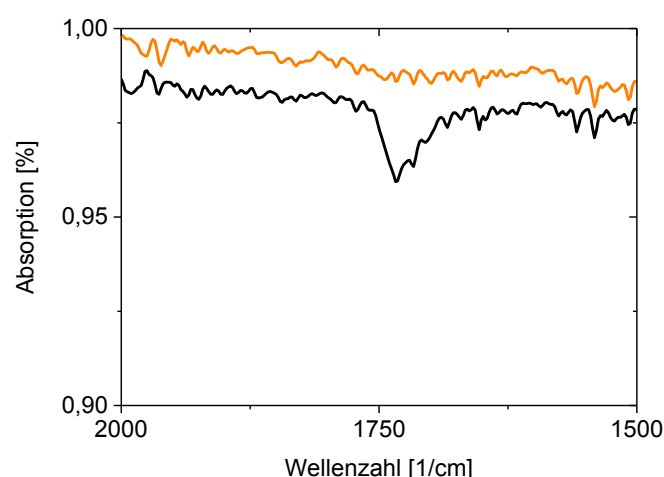


Abbildung 26: Carbonylbande der hydrophilen Beschichtung der PVDF_{hyd}-Membran (schwarz) des IR-Spektrums im Vergleich zur nicht-modifizierten PVDF-Membran (orange).

Lösungsmittel

Zur Untersuchung der Lösungsmittelbeständigkeit ist eine Inkubation der jeweiligen Membran für 1 h in Acetonitril durchgeführt worden. Alle untersuchten Membranen sind nicht löslich in Acetonitril. Die anschließend ermittelten IR-Spektren weisen im gesamten untersuchten Frequenzbereich bei allen drei Membrantypen keine sichtbaren Unterschiede zur Ausgangsmembran auf, wobei der Bereich der Carbonylschwingung von 2000 bis 1500 /cm gezeigt ist (Abbildung 27).

Dies deutet auf eine chemische Beständigkeit gegenüber Acetonitril hin. Da Acetonitril als sehr potentes Lösungsmittel angesehen wird, ist anzunehmen, dass dies auch bei anderen, weniger potenten Lösungsmitteln der Fall ist.

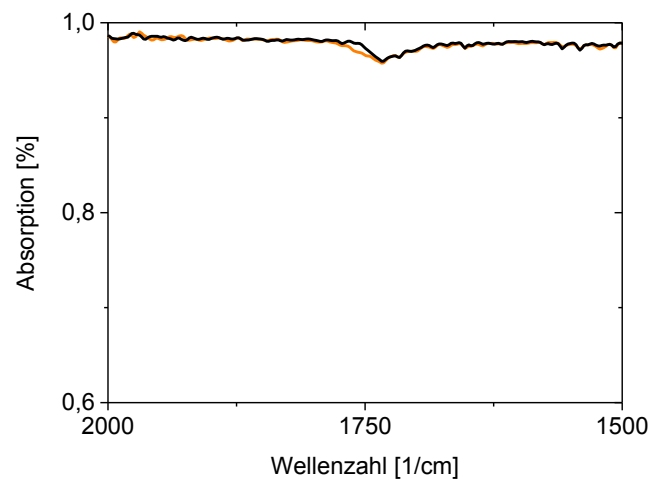
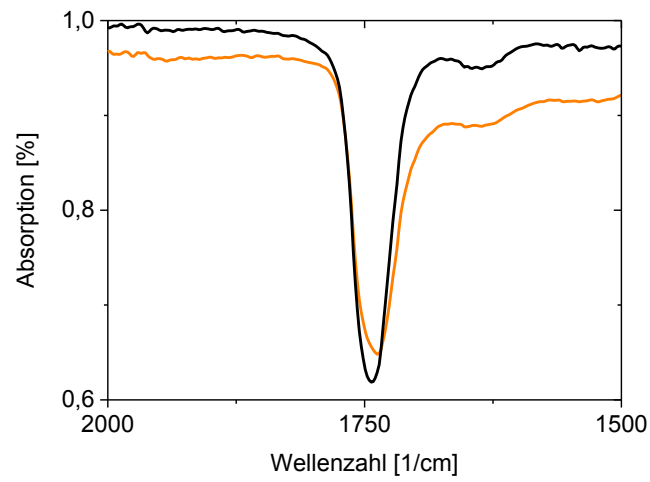
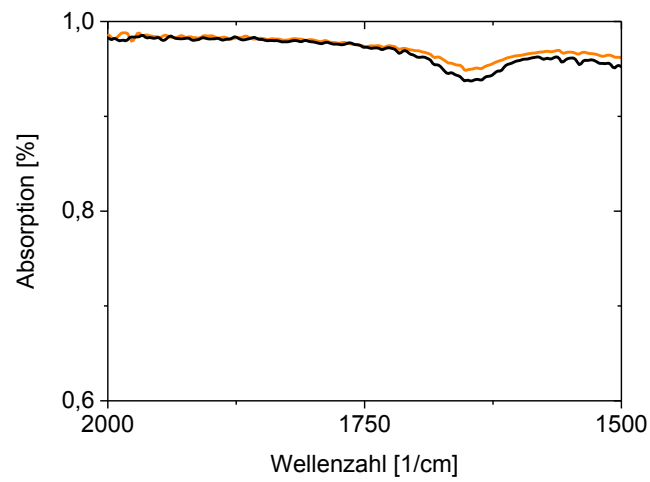


Abbildung 27: IR-Spektren der RC- (oben), CA- (mitte) und PVDF_{hyd}-Membran (unten) nach 1 h Inkubation in Acetonitril (orange) bzw. unbehandelt (schwarz).

DMSO und DMAc

Eine besondere Ausnahme stellen Dimethylsulfoxid (DMSO) und N,N-Dimethylacetamid (DMAc) dar. Beide Lösungsmittel werden speziell bei der Herstellung von Antibody Drug Conjugates (ADC) eingesetzt (Ebens *et al.*, 2014). Ein optischer Vergleich der RC- und PVDF_{hyd}-Membran nach einer 96 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur ist in Abbildung 28 gezeigt. Die RC-Membran zeigt sich diesen speziellen Lösungsmitteln gegenüber inert. Die PVDF_{hyd}-Membran quillt in diesen Lösungsmitteln bzw. lösen sich auf. Eine Beständigkeit der PVDF_{hyd}-Membran gegenüber üblichen ADC-Medien ist somit in Frage zu stellen.

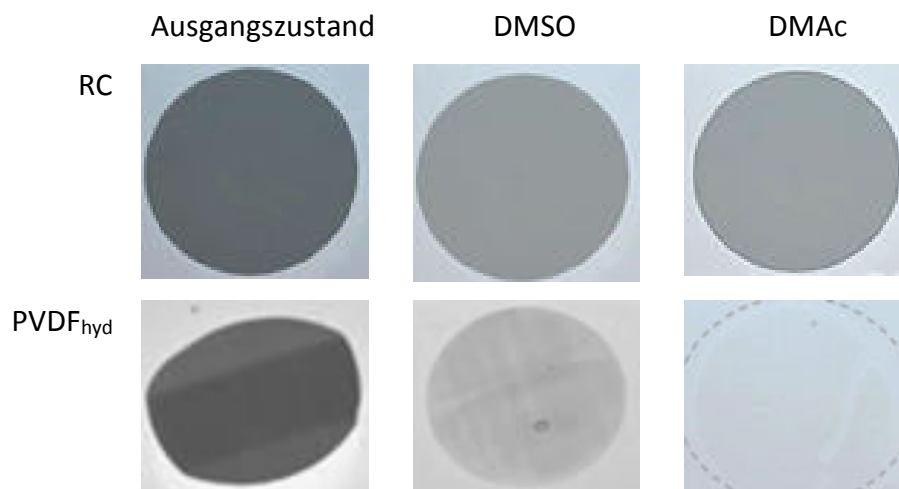


Abbildung 28: Optische Analyse von RC (oben) und PVDF_{hyd} (unten) vor (links) und nach der Inkubation mit DMSO (mitte) bzw. DMAc (rechts).

m-Cresol

m-Cresol findet im Bereich von Biopharmazeutika häufig Einsatz als Konservierungsmittel, zum Beispiel bei verschiedenen Insulinpräparaten (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 2016). Die Beständigkeit der RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membran gegenüber m-Cresol ist mittels IR-Spektroskopie untersucht worden. Alle untersuchten Membranen weisen nach einer 24-stündigen Inkubation in 1 % m-Cresol keine signifikanten Veränderungen in den jeweiligen IR-Spektren im gesamten untersuchten Frequenzbereich auf. Dies deutet darauf hin, dass zumindest eine chemische Beständigkeit gegenüber m-Cresol gegeben ist.

4.1.5. Extractables

Extrahierbare Bestandteile, sogenannte Extractables, sind im FF-Bereich von Pharmazeutika kritisch zu betrachten. Würden diese ins fertige Produkt und somit später auch in den Patienten gelangen,

können sie zu gesundheitlichen Unverträglichkeiten führen. Die vorliegenden Untersuchungen sind exemplarisch mit Acetonitril als Extraktionsmittel durchgeführt worden, da es als sehr potentes Lösungsmittel gilt (Kapitel 3.5.7). Die HPLC Analyse der Extractables bei Acetonitril ist in Abbildung 29 dargestellt.

Es zeigt sich, dass bei allen untersuchten Membranen nur innerhalb der ersten 5 ml sichtbare Signale auftreten, welche dem System zuzuordnen sind. Im weiteren Verlauf sind keinerlei Peaks mehr zu erkennen. RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen weisen somit einen vergleichbar niedrigen Gehalt an UV-aktiven Extractables.

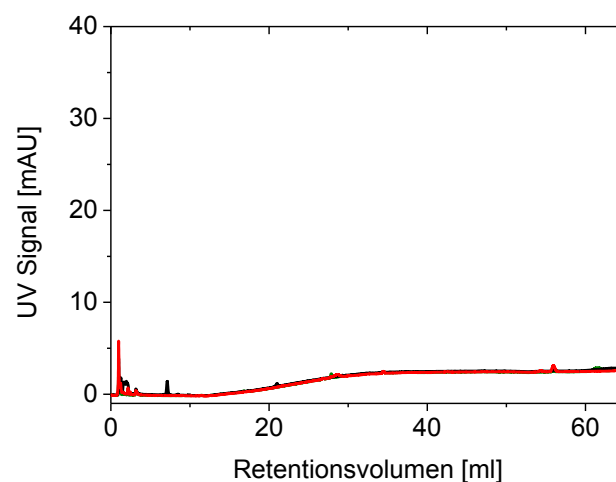


Abbildung 29: HPLC Analyse der Extractables der RC- (grün), CA- (schwarz) und PVDF_{hyd}-Membran (rot) nach vorheriger Extraktion in Acetonitril.

4.1.6. Endotoxine

Endotoxine können beim Patienten Fieber auslösen und sind somit ebenfalls bedenklich bei final sterilfiltrierten Produkten. Standardmäßig wird für die Bestimmung von pyrogenen Bestandteilen der sogenannte LAL Test (Limulus Amöbozyten Lysat Test) genutzt. Er basiert auf einer durch Endotoxine hervorgerufenen Gerinnungsreaktion des Zelllysats aus dem Blut der Pfeilschwanzkrabbe (*Limulus polyphemus*). Diese Reaktion kann allerdings auch von β -Glucanen induziert werden. Da es sich bei β -Glucanen um die Untereinheiten von Cellulose handelt, kann es zu falschpositiven Ergebnissen führen bei der Analyse von Cellulose-basierten Membranen. Dementsprechend ist auf eine alternative Analysemethode zurückgegriffen worden, dem rekombinanten Faktor C Assay (Kapitel 3.5.12). Dieser hat den Vorteil, dass eine Aktivierung durch β -Glucan nicht möglich ist.

Die Ergebnisse der Analyse auf pyrogenen Bestandteile mittels rekombinatem Faktor C Assay der RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen sind in Tabelle 5 dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich alle Membranmaterialien im Bereich der Negativkontrolle mit einem Endotoxingehalt von unter 0,02 EU/ml bewegen. Eine Produktverunreinigung mit Endotoxinen durch die untersuchten Membranen kann somit ausgeschlossen werden.

Tabelle 5: Endotoxingehalt verschiedener Sterilfiltrationsmembranen bestimmt mittels rekombinatem Faktor C Assay.

Membrantyp	Endotoxingehalt [EU/ml]
RC	<0,02
CA	<0,02
PVDF_{hyd}	<0,02
Negativkontrolle	<0,02

4.1.7. Sterilisierbarkeit

Um eine Sterilfiltrationsmembran im Prozess nutzen zu können, muss sie zunächst sterilisiert werden. Eine Sterilisierbarkeit muss demnach unter allen Umständen möglich sein. Sie kann entweder mittels Autoklavieren, Heißdampf (SIP) oder γ -Bestrahlung erfolgen. Im vorliegenden Fall ist die Beständigkeit der RC-, CA- und PVDF_{hyd}-Membranen gegenüber γ -Bestrahlung untersucht worden.

Die drei untersuchten Membranen weisen nach γ -Bestrahlung mit einer Intensität von 25 kGy keine optischen Schäden auf. Des Weiteren sind die IR-Spektren im direkten Vergleich zur nicht-bestrahlten Membran untersucht worden. Bei keinem Membrantyp lässt sich eine signifikante Änderung des IR-Spektrums im gesamten untersuchten Frequenzbereich erkennen. Ausgehend von den Untersuchungen ist eine Beständigkeit gegenüber γ -Strahlung mit 25 kGy in allen Fällen gegeben.

4.1.8. Fazit zu Sterilfiltern für Form&Fill-Anwendungen

Mit RC, CA und PVDF_{hyd} sind drei Membrantypen auf ihre Eignung als Sterilfilter für die FF-Filtration von Proteinlösungen untersucht worden. Die Filtrationsleistungen bei der Filtration von partikulären Lösungen ist vergleichbar. Die PVDF_{hyd}-Membran weist auf Grund ihrer Oberflächenbeschichtung etwas geringere Leistungsdaten bei der Filtration auf im Vergleich zur RC- und CA-Membran.

Eine ausreichende bakterielle Rückhaltung ist bei allen Membranen gegeben auch bei der Filtration von Lösungen mit hoher Tensid- und Salzfracht bzw. bei Langzeitfiltrationen bis zu 48 h.

Die untersuchten Membranen können mittels γ -Bestrahlung bei 25 kGy sterilisiert werden, ohne Veränderungen der Membranchemie hervorzurufen. Es sind in keinem Fall signifikante Mengen an Extractables oder auch Endotoxine detektiert worden.

Die Beurteilung der chemischen Beständigkeit fällt nicht bei allen Membranen gleich aus. Die RC-Membranen sind mit allen untersuchten Medien, das heißt Säure, Lauge und organischen Lösungsmitteln kompatibel. CA- und PVDF_{hyd}-Membranen sind nicht beständig in basischen Lösungsmitteln. Da sich PVDF_{hyd} in DMAC auflöst, sollte diese Membran nicht für die Filtration von ADC-Medien verwendet werden.

Alle untersuchten Membranen zeichnen sich durch eine niedrige Adsorptionsneigung gegenüber Proteinen aus. Die Adsorption von BSA und γ -Globulin blieb in allen Fällen im einstelligen $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Bereich. Im Fall von Tween 80 weisen die RC- und PVDF_{hyd}-Membranen keine signifikanten Adsorptionswerte auf.

4.2. Hochkonzentrierte Proteinlösungen

Hochkonzentrierte Proteinlösungen verhalten sich physikalisch anders als Lösungen mit niedriger Proteinkonzentration, da die geringeren intermolekularen Abstände zu stärkeren Interaktionen zwischen den Proteinmolekülen sorgen. Zudem stellen sie andere Ansprüche an die chemische Zusammensetzung der Lösungsformulierung. Beides kann Auswirkungen auf den Filtrationsprozess haben, sodass eine genaue Betrachtung dieser speziellen Effekte notwendig ist.

4.2.1. Auswahl von Modellproteinen und Lösungsformulierungen

Um hochkonzentrierte Proteinlösungen und ihre physikalischen Eigenschaften näher untersuchen zu können, ist zunächst die Entwicklung einer geeigneten Prüflösung notwendig. Dazu gehört sowohl die Auswahl von Modellproteinen als auch von entsprechenden Puffersystemen, welche eine ausreichende kolloidale Stabilität im hohen Konzentrationsbereich bieten.

Zur Abdeckung eines möglichst großen Feld an Proteintypen sind mit BSA, α -Amylase und γ -Globulin drei unterschiedliche Modellproteine ausgewählt worden. Bei BSA handelt es sich um ein Blutprotein, welches hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und den Transport von wasserunlöslichen Bestandteilen in den Blutbahnen verantwortlich ist. Es zeichnet sich besonders durch die sehr hohe Stabilität, Verfügbarkeit in hoher Reinheit und gute Löslichkeit in Wasser aus (Kopac *et al.*, 2008). Deshalb wird BSA in wissenschaftlichen Untersuchungen häufig als Testprotein verwendet. Diese Tatsache ermöglicht einen Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Literaturdaten. In der Biopharmazie kommen verschiedenste Enzyme zur Anwendung. Stellvertretend für therapeutische Proteine ist α -Amylase als zweites Modellprotein gewählt worden. Es handelt sich dabei um ein Enzym, welches 1,4-glykosidische Bindungen von Oligosacchariden spalten kann. Mittels Aktivitätsuntersuchungen kann hierbei leicht der Zustand der Proteinlösung bzw. die Faltung der Proteinmoleküle selbst untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Typ biopharmazeutischer Proteine sind Antikörper. Ursprünglich Bestandteil des Immunsystems, eignen sie Antikörper auf Grund ihrer spezifischen Antigenbindungsstellen besonders für den therapeutischen Einsatz. Untersucht worden sind hierbei γ -Globulin-Lösungen.

Der für die vorliegenden Untersuchungen gewählte Konzentrationsbereich ist möglichst applikationsnah ausgewählt worden. In der biopharmazeutischen Industrie nimmt der Anteil an hochkonzentrierten Proteinlösungen mit zum Teil hohen Viskositäten von bis zu 50 cP zu. Dies ist der

empirisch ermittelte Grenzwert für subkutane Injektionen (Inoue *et al.*, 2014). Um eine Proteinlösung mit einer Viskosität deutlich höher als von Wasser untersuchen zu können ist für die BSA-Lösung eine Konzentration von 250 mg/ml gewählt worden. Bei der α -Amylase- und γ -Globulin-Lösung hingegen konnte auf Grund einer geringeren Löslichkeit eine Konzentration von jeweils 100 mg/ml nicht überschritten werden.

Die Zusammensetzung der Pufferformulierung ist entsprechend der Literatur über gängige Formulierungen, wie sie in Kapitel 2.1.1 dargestellt sind, auf die hier vorliegenden Modellproteine angepasst worden. Dies resultiert in einem 200 mM Puffer mit pH 6,9. Er setzt sich zusammen aus gleichen Anteilen von Natriumphosphat- und Natriumsulfatpufferlösungen. Als stabilisierende Zusätze sind 0,5 % Tween 80, 0,01 % NaCl und 1 % Trehalose gewählt worden. Diese Zusätze und deren Konzentrationen liegen damit im Bereich von bereits existenten pharmazeutischen Antikörperformulierungen.

Auf eine Zugabe von zum Beispiel Arginin ist verzichtet worden, um den Effekt höherer Viskositäten bei der Filtration näher analysieren zu können. Kapitel 4.2.3 zeigt außerdem, dass die vorliegenden Lösungsviskositäten unterhalb des Grenzwertes für spritzbare Flüssigkeiten von 50 cP (Inoue *et al.*, 2014) liegen und eine Verringerung der Viskosität somit nicht zwingend notwendig ist.

Eine proteinspezifische Optimierung der Lösungsformulierung ist nicht durchgeführt worden. Dies hat den Vorteil, dass eventuelle Einflüsse der Lösungsbestandteile auf die Filtrationsperformance nicht zum Tragen kommen. Allerdings kann es dadurch auch zu einer geringeren Stabilität der jeweiligen Lösungen kommen. Demzufolge werden die Proteinlösungen hinsichtlich ihrer kolloidalen Stabilität untersucht, um die experimentellen Filtrationsverläufe besser bewerten zu können. Dies ermöglicht so eine Aussage über die Bedeutung der Lösungsformulierung für einen Filtrationsprozess.

4.2.2. Kolloidstabilität der Modellproteinlösung

Intermolekulare Distanzen zwischen Proteinmolekülen

Zur Beurteilung der Kolloidstabilität der hochkonzentrierten Modellproteinlösungen (Kapitel 4.2.1) sind zunächst die intermolekularen Distanzen der Proteinmoleküle in Abhängigkeit der Konzentration mittels Gleichung 2 berechnet worden. Abbildung 30 zeigt die theoretischen Abstände der jeweiligen Proteine in Lösung. Unabhängig von der Art des Proteins ist eine exponentielle Abnahme der Distanzen mit ansteigender Konzentration zu verzeichnen. Im Bereich zwischen 30 und 50 mg/ml werden bereits Abstände im einstelligen Nanometer-Bereich erreicht, was in der Größenordnung der Proteinmoleküle selbst liegt.

Auf Grund ihres ähnlichen Molekulargewichtes sind die Partikelabstände in der BSA- und α -Amylase-Lösung vergleichbar. Für α -Amylase ist die Annahme eines kugelförmigen Proteinmoleküls zur Berechnung eine gute Näherung. α -Amylase besitzt eine relativ kompakte, runde Struktur (Abbildung 2). BSA weist ebenfalls eine recht kompakte Struktur auf, allerdings ähnelt die Form eher einem Herzen, als einer Kugel. In diesem Fall sind die reellen Abmessungen leicht größer als r_{\min} und somit sollte der Abstand zwischen den Proteinmolekülen in der Realität etwas geringer ausfallen, als berechnet.

Im Vergleich dazu weist die γ -Globulin-Lösung, auf Grund des größeren Molekulargewichtes, bei gleicher Konzentration größere Abstände auf. Da die Y-förmige Struktur des Proteins signifikant von einer Kugel abweicht, sollten die Partikelabstände in realer Lösung wesentlich geringer ausfallen, als in der Berechnung.

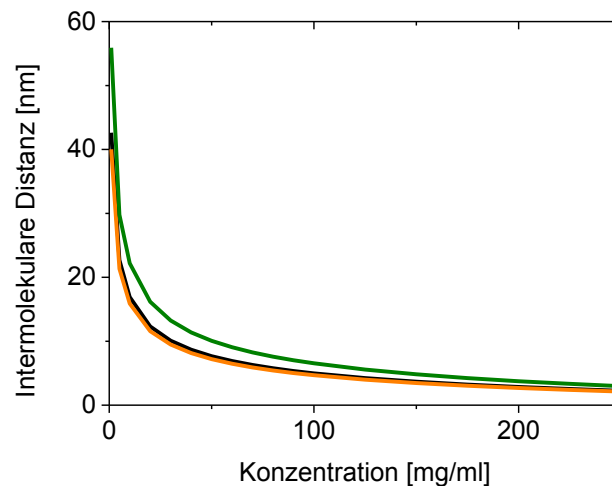


Abbildung 30: Theoretisch berechnete intermolekulare Distanzen zwischen Proteinmolekülen in Lösungen von BSA (schwarz), α -Amylase (orange) und γ -Globulin (grün) als Funktion der Proteinkonzentration.

In Abbildung 31 ist eine schematische, maßstabsgetreue Anordnung von BSA-Molekülen in Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 10 bzw. 250 mg/ml dargestellt. Bei der hohen Konzentration von 250 mg/ml sind die Abstände zwischen den einzelnen Molekülen kleiner als die eigentliche Größe der Proteine. Das bedeutet, dass der Platz bei dieser Verdichtung theoretisch nicht dafür ausreicht, dass sich die Moleküle ungehindert in der Lösung bewegen können. Im Falle einer Filtration durch eine sterilfiltrierende Membran muss es deshalb zwangsläufig zu Kontakten zwischen den Proteinmolekülen kommen. Dies erhöht das Risiko der Aggregatbildung.

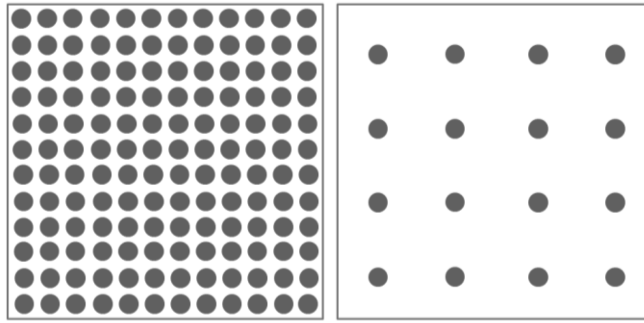


Abbildung 31: Schematische, maßstabsgetreue Anordnung von BSA-Molekülen in Lösungen mit Konzentrationen von 250 mg/ml (links) und 10 mg/ml (rechts).

Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen

Abbildung 32 zeigt die berechneten DLVO-Kurven (Kapitel 2.3.) für die hier verwendeten Modellproteinlösungen. Die Berechnungen sind für Raumtemperatur, eine Ionenstärke des Puffers von 0,65 mol/l, ein Oberflächenpotential von -10 mV und eine Hamakerkonstante von $1,65 \cdot 10^{-20}$ J durchgeführt worden. Die für die Berechnung benötigten Proteingrößen sind mittels Gleichung 3 bestimmt worden und in Kapitel 3.1 beschrieben.

Im Ergebnis aller Berechnungen zeigt sich der für die DLVO-Energie charakteristische Verlauf, wie er bereits in Abbildung 5 dargestellt worden ist. In allen Modellproteinlösungen sind die Partikelabstände kleiner als die Proteinmoleküle. Für größere Abstände zwischen den Proteinmolekülen existieren zunächst keine Interaktionsenergien. Ab einem Abstand von 2 nm beginnen die Proteine miteinander zu interagieren und es entsteht eine Energiebarriere. Deren Größe ist für die untersuchten Systeme unterschiedlich und im Fall der γ -Globulin-Lösung am niedrigsten. Bei der 250 mg/ml BSA-Lösung beginnt die Energiebarriere bei Partikelabständen vergleichbar mit den theoretisch in der Lösung vorherrschenden intermolekularen Distanzen. Beide Systeme sollten somit eine hohe Neigung zur Aggregation zeigen.

Während eines Filtrationsprozesses wird eine Proteinlösung hauptsächlich durch zwei Einflüsse destabilisiert. Zum einen wird durch die angelegte Flussrate kinetische Energie in das System eingebracht. Diese wiederum ermöglicht eine Überwindung der Energiebarriere. Zum anderen kann es zu einer Aufkonzentrierung der Proteine an der Membranoberfläche kommen, wodurch die intermolekularen Distanzen verkleinert werden. Beides sorgt besonders bei hochkonzentrierten Proteinlösungen für ein hohes Aggregationsrisiko.

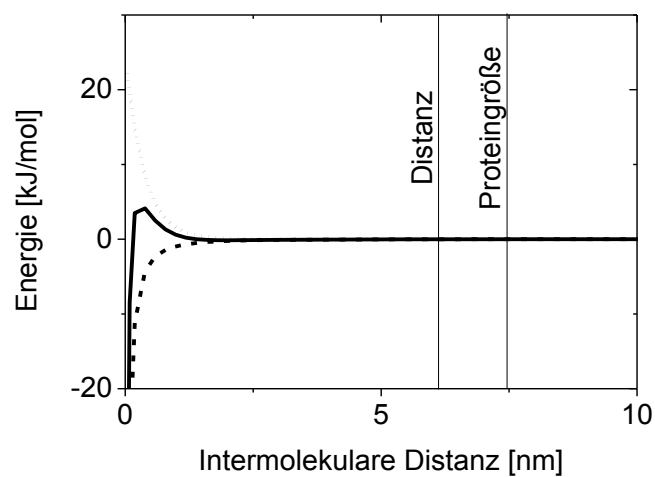
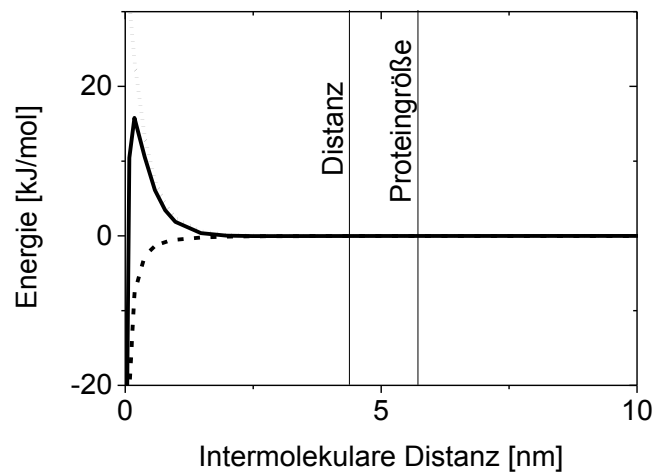
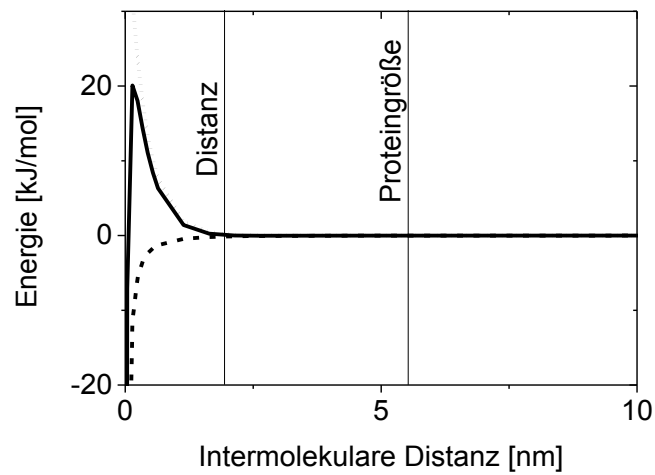


Abbildung 32: Berechnete van der Waals Kräfte (gestrichelt), Dielektrische Kräfte (gepunktet) und DLVO-Kräfte (durchgezogen) von 250 mg/ml BSA- (oben), 100 mg/ml α -Amylase- (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulinlösungen (unten) sowie die zugehörigen theoretischen intermolekularen Distanzen und die jeweiligen Proteingrößen.

Aggregatanteil in den Modellproteinlösungen

Ein möglicher Aggregatanteil in den unterschiedlichen Proteinlösungen auf Grund einer limitierten Kolloidstabilität ist mittels HPLC-Analyse untersucht worden (Kapitel 3.5.9). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und die zugehörigen HPLC-Chromatogramme in Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht zur Proteinaggregation in Lösungen mit 250 mg/ml BSA, 100 mg/ml α -Amylase bzw. 100 mg/ml γ -Globulin bestimmt mittels HPLC-Analyse.

Protein	Retentionsvolumen [ml]	Molekularmasse [mol/l]	Art	Anteil [%]
BSA	9,5	67	Monomer	84,9
	8,6	140	Dimer	12,7
	8,0	260	Tetramer	2,4
α -Amylase	10,0	55	Monomer	98,8
	9,2	110	Dimer	1,2
γ -Globulin	8,5	120	Monomer	77,8
	7,5	300	Dimer	18,6
	5,4	3400	höhermolekulare Aggregate	3,6

Die γ -Globulin-Lösung weist den höchsten Aggregationsgrad auf. Das Chromatogramm der γ -Globulin-Lösung setzt sich aus insgesamt vier Peaks zusammen. Mit fast 78 % liegt der Hauptanteil des Proteins in Lösung in Form von Monomeren vor. Hinzu kommen noch Dimere, Tetramere sowie Aggregate mit einem großen Molekulargewicht von etwa 3400 kDa. Dagegen ist das Ausmaß der Proteinaggregation in Proteinlösungen mit BSA bzw. α -Amylase geringer. Höhermolekulare Aggregate werden hier nicht detektiert. Der Anteil an Monomeren ist deutlich höher. Beide Lösungen enthalten einen geringen Anteil an Dimeren. Bei der BSA-Lösung befinden sich außerdem geringe Mengen Tetramere in der Lösung.

HPLC-Analysen zur Untersuchung der Proteinaggregation weisen einige Nachteile auf. Zum einen müssen die Lösungen für die Messungen verdünnt werden. Zum anderen können nicht vollständig gelöste Aggregate nicht detektiert werden. Außerdem beträgt die nominelle Porengröße der eingesetzten HPLC-Säule 0,029 μm . Mögliche Aggregate, die größer als die Porengröße der Säule sind, können diese nicht passieren und somit ebenfalls nicht detektiert werden. Die absoluten Größenangaben von Poren- bzw. Proteingrößen können lediglich als Richtwert betrachtet werden, da sie stark von der Messmethode abhängen.

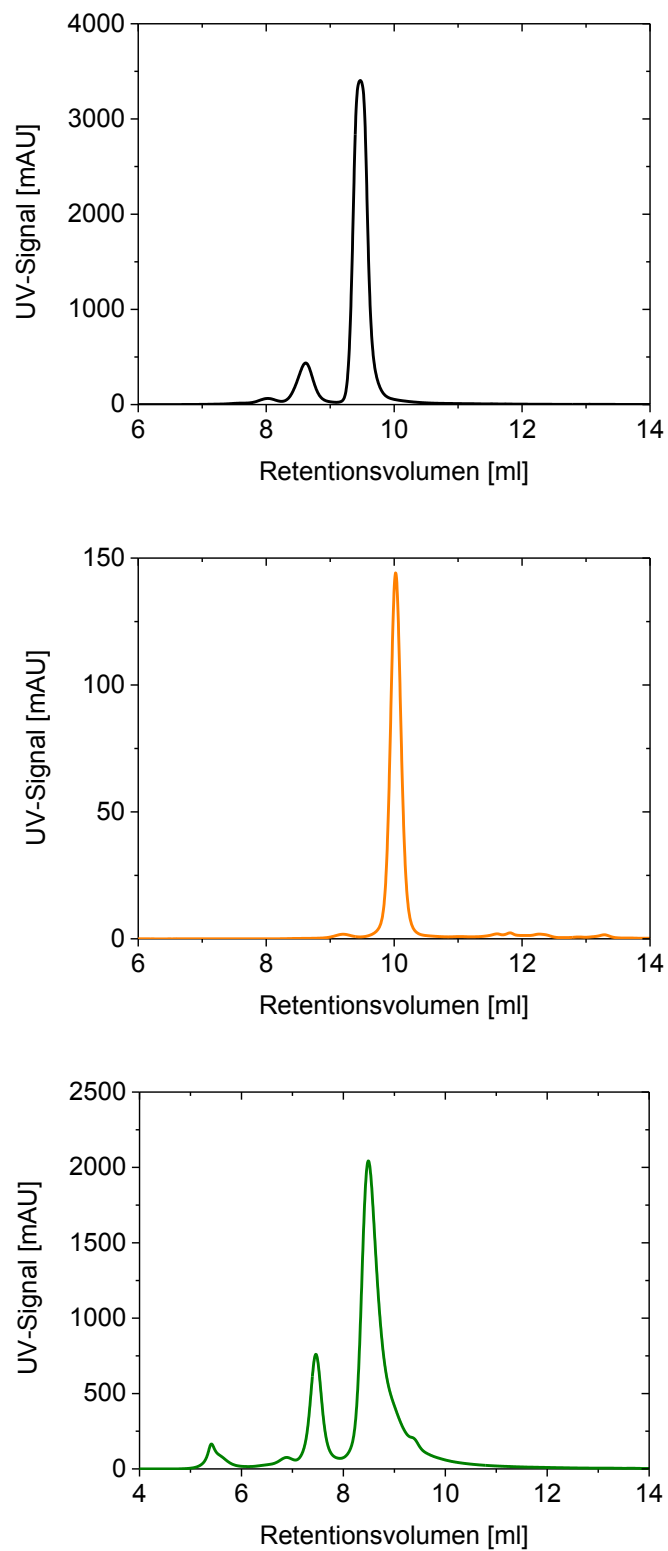


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten).

Entsprechend werden auch DLS-Messungen zur Analyse des Aggregatanteils durchgeführt (Kapitel 3.5.10). Für die gewählten Modellproteinlösungen sind die entsprechenden Ergebnisse in

Abbildung 34 gezeigt. Dabei werden sowohl Proteingrößen dargestellt, welche mittels Volumenverteilung als auch mittels Intensitätsverteilung berechnet worden sind. Somit entstehen unterschiedliche Gewichtungen der erfassten Ablenkungen, wodurch die Volumenverteilung eher viele Monomere und die Intensitätsverteilung wenige hochmolekulare Aggregate zeigt.

Betrachtet man beide Verteilungen gemeinsam, so ergeben sich für alle Proteinlösungen jeweils zwei Peaks (Tabelle 7). Sie sind auf das Vorhandensein zum einen von Monomeren und niedrigmolekularen Aggregaten, wie Di- oder Tetramere und zum anderen von hochmolekularen Aggregaten zurückzuführen. Eine Differenzierung zwischen Mono-, Di- und Tetrameren ist bei Messungen mit DLS nicht möglich. Dementsprechend sind die ermittelten Proteingrößen etwas größer, als die in Kapitel 3.1 vorgestellten berechneten Werte für das jeweilige Monomer. Entgegen den Ergebnissen der HPLC-Analyse zeigt sich hier allerdings, dass in allen Proteinlösungen ein gewisser Anteil an hochmolekularen Aggregaten vorhanden ist. Bei der BSA- und γ -Globulin-Lösung ist die ermittelte Aggregatgröße mit über 500 nm größer als die Porengröße der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Membranen. In der α -Amylase-Lösung bewegt sich die Größe im Bereich der mittleren Porengröße von Sterilfiltrationsmembranen (Tabelle 3). Eine quantitative Aussage über den Gehalt an Aggregaten ist allerdings nur schwer möglich, da diese Methode für homogene, niedrigkonzentrierte Lösungen geeignet ist. Bei heterogenen Lösungen, wie sie hier vorliegen, tritt vermehrt eine Mehrfachstreuung auf, wodurch entsprechende Berechnungen sehr komplex und auch ungenau werden.

Tabelle 7: Aggregatzusammensetzung von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA, 100 mg/ml α -Amylase bzw. 100 mg/ml γ -Globulin mittels DLS-Messungen bestimmt.

Protein	Größe [nm]	Art
BSA	5	Mono-, Di- bzw. Tetramer
	600	höhermolekulare Aggregate
α-Amylase	7,5	Mono- bzw. Dimer
	350	höhermolekulare Aggregate
γ-Globulin	11,7	Mono- bzw. Dimer
	530	höhermolekulare Aggregate

Sowohl bei der Analyse mittels HPLC als auch bei DLS-Messungen müssen die hochkonzentrierten Proteinlösungen verdünnt werden. Laut Uchiyama kann sich dadurch die Zusammensetzung der Lösung verändern und Aggregate sich wieder auflösen und somit das Messergebnis verfälschen (Uchiyama, 2014). Eine Analyseverfahren für die direkte Messung hochkonzentrierter Proteinlösungen ist zum momentanen Zeitpunkt nicht bekannt.

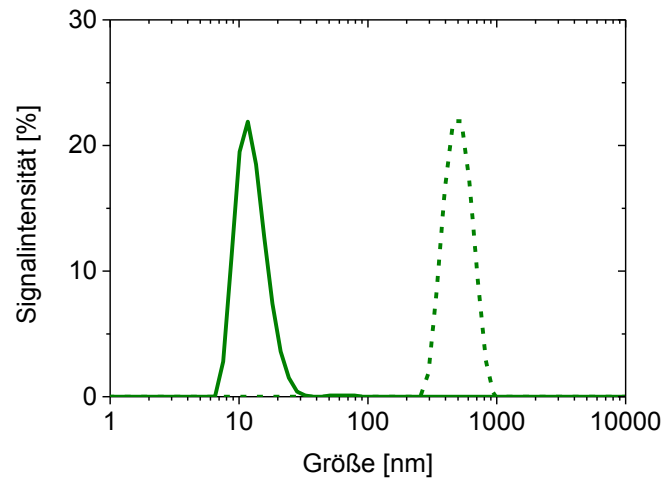
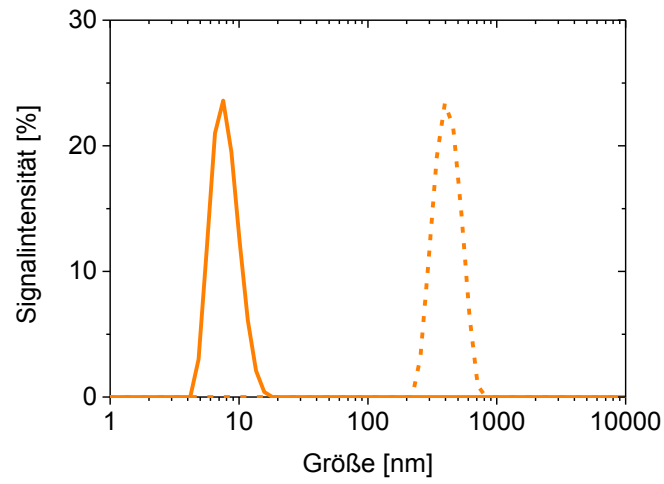
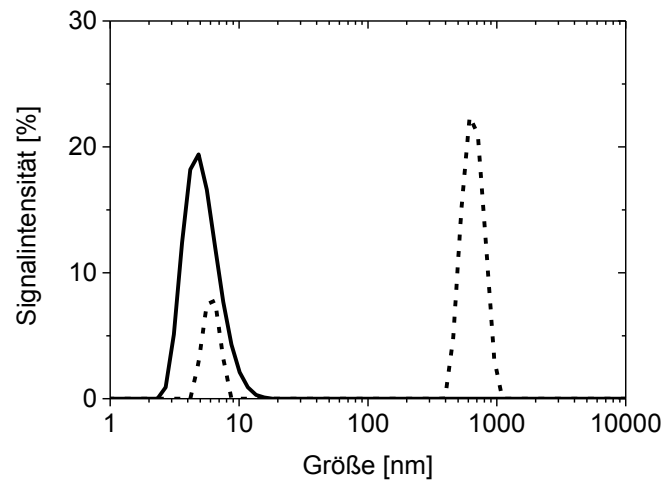


Abbildung 34: DLS-Messungen von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten), berechnet mittels einer Volumenverteilung (durchgezogen) bzw. einer Intensitätsverteilung (gestrichelt).

Fasst man die vorhandenen Ergebnisse zusammen, so zeigt sich für alle Proteinlösungen ein großer Monomeranteil in Lösung sowie die Existenz von niedrig- und hochmolekularen Aggregaten. Diese sind durch die geringen intermolekularen Distanzen zwischen den einzelnen Proteinmolekülen in Lösung und der limitierten Kolloidstabilität erklärbar. Die Tatsache, dass sowohl bei der DLS-Messung als auch mittels HPLC-Analyse hochmolekulare Aggregate in der γ -Globulin-Lösung gefunden werden konnten, deutet auf einen höheren Aggregatanteil hin.

4.2.3. Rheologische Eigenschaften und Konformationsstabilität

Die Viskosität der Modellproteinlösungen und der Einfluss der Scherrate auf die Konformationsstabilität der Proteinmoleküle ist durch rheologische Messungen mit einem Rotationsviskosimeter untersucht worden (Kapitel 3.5.11). Für die Modellproteinlösungen sind Messungen bei einer Reihe von Scherraten zwischen 5 bis 5000 /s durchgeführt worden. Die Abhängigkeit der Viskosität von der Scherrate ist in Abbildung 35 dargestellt. Unabhängig vom Typ des Proteins nimmt die Viskosität der jeweiligen Lösung mit zunehmender Scherrate ab. Ab Scherraten von 100 /s bleiben die Viskositätswerte weitestgehend konstant bei 10, 1,7 und 4 cP für die Lösungen von BSA, α -Amylase bzw. γ -Globulin. Diese Viskositätswerte werden späteren Berechnungen zu Grunde gelegt.

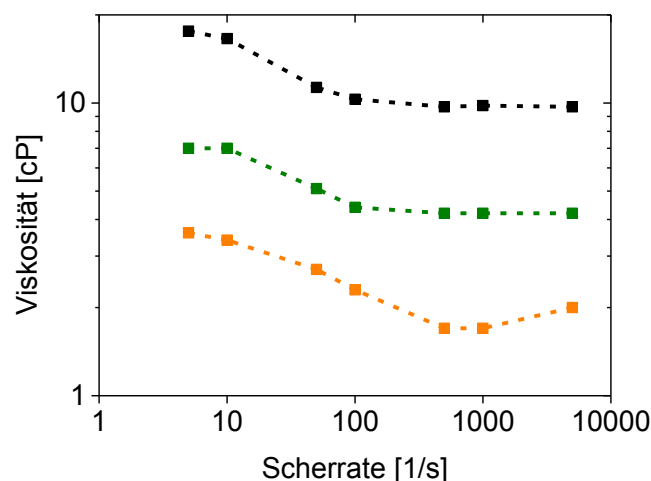


Abbildung 35: Viskositäten von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) in Abhängigkeit der Scherrate.

Ein vergleichbares viskoelastisches Verhalten wird auch von Sharma *et al.* für unterschiedlich konzentrierte BSA-Lösungen zwischen 10 und 250 mg/ml beschrieben (Sharma *et al.*, 2011). Wie in

Kapitel 2.3.1 beschrieben kann die Abnahme der Lösungsviskosität bei steigender Scherrate erklärt werden mit einer Entfaltung der Proteinmoleküle auf Grund der Scherung, wodurch die hydrophoben Bindestellen des Proteinmoleküls freigelegt werden.

4.2.4. Fazit zu hochkonzentrierten Proteinlösungen

Im Rahmen der Untersuchungen sind drei hochkonzentrierte Modellproteinlösungen ausgewählt worden (Tabelle 8). Die Zusammensetzung der Proteinlösungen ist in Anlehnung an reale pharmazeutische Formulierungen einheitlich für alle Modelllösungen festgelegt worden. Tabelle 8 fasst außerdem wichtige Lösungseigenschaften, wie Aggregationsgrad und rheologische Eigenschaften zusammen.

Die kolloidale Stabilität ist darüber hinaus durch DLVO-Modell-Rechnungen bewertet worden. Demnach sind ein höherer Aggregationsgrad im Fall der BSA- bzw. γ -Globulin-Lösung zu erwarten. Es kann experimentell mittels HPLC-Analysen bzw. DLS-Messungen bestätigt werden. Dabei können spezifisch für die unterschiedlichen Lösungen Aggregate mit einer Größenordnung von 300 bis 600 nm detektiert werden.

Tabelle 8: Zusammensetzung und Eigenschaften der ausgewählten Modellproteinlösungen.

	BSA	α-Amylase	γ-Globulin
c_{Protein} [mg/ml]	250	100	100
Puffer	200 M Natriumphosphatpuffer 200 M Natriumsulfatpufferlösungen 0,5 % Tween 80 0,01 % NaCl 1 % Trehalose pH 6,9		
Aggregatgehalt (HPLC)	85 % Monomer 15 % Di- und Tetramer	99 % Monomer 1 % Dimer	78 % Monomer 18 % Di- und Tetramere 4 % höhermolekulare Aggregate
Aggregatgröße (DLS) [nm]	600	350	530
Viskosität [cP]	10	1,7	4
kritische Scherrate [/s]	100	100	100

4.3. Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen

Die Untersuchungen zum Verblockungsverhalten bei der Sterilfiltration von Proteinlösungen umfassen die Analyse des Adsorptionsvermögens unterschiedlicher Membranfilter sowie umfangreiche Filtrationsversuche. Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen auf sterilfiltrierende RC-Membranen, die sich auf Grund ihrer hydrophilen Oberflächeneigenschaften besonders für die Filtration von Proteinlösungen eignen sollten. Dabei ist von der in Kapitel 4.1. untersuchten RC-Membran mit einem Bubble Point von 4 bar und einem Wasserfluss von $16 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ sowie den beschriebenen Modelllösungen (Kapitel 4.2.) ausgegangen worden. Alle angegebenen Filterkapazitäten beziehen sich, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, auf das kumulierte Filtratvolumen zum Zeitpunkt einer 50 %igen Abnahme der anfänglichen Flussrate.

Die durchgeführten Filtrationsuntersuchungen sind inhaltlich wie folgt aufgeteilt:

- Untersuchung des Verblockungsverhaltens in Abhängigkeit des Proteintyps
- Einfluss der Proteinaggregation auf das Verblockungsverhalten
 - Filtrationen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 250 mg/ml
 - Eliminierung von Proteinaggregaten durch eine verbesserte Lösungsherstellung bzw. den Einsatz eines vorgeschalteten Vorfilters
- Untersuchung des Einflusses der Adsorptionseigenschaften der Membran auf das Verblockungsverhalten am Beispiel von RC- und CN-Membranen
- Einfluss der Membranstruktur und Permeabilität auf das Verblockungsverhalten untersucht durch vergleichende Filtrationen mit einer Track-Etch-Membran
- Beeinflussung des Verblockungsverhaltens durch die Prozessführung
 - Filtrationen bei konstanten Differenzdrücken zwischen 0,1 und 2 bar
 - Filtrationen bei konstanter Flussrate zwischen $0,1$ und $2 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$

4.3.1. Adsorption bei Filtrationsprozessen

Im Ergebnis von Adsorptionsuntersuchungen mit Hilfe eines klassischen statischen Assays ist festgestellt worden, dass RC-Membranen, wie auch andere Sterilfilter-Membranen eine sehr geringe Proteinadsorption aufweisen (Kapitel 4.1.3). Bei der Filtration von hochkonzentrierten Proteinlösungen spielen allerdings noch weitere Einflussfaktoren eine Rolle. Ein dynamischer Filtrationsprozess unterscheidet sich von einer statischen Inkubation hinsichtlich der möglichen

Zeitskala für Wechselwirkungen zwischen Protein und Membran. Zum anderen kommen bei der Prozessfiltration vielfach höhere Konzentrationen zum Einsatz.

Einfluss des Filtrationsprozess

Um den Einfluss des Filtrationsprozesses zu untersuchen, ist das Adsorptionsverhalten zusätzlich zu den statischen Tests mittels eines dynamischen Assays bestimmt worden (Kapitel 3.5.5). Dabei wird die Proteinadsorption im Ergebnis der Messung von Durchbruchkurven bei der Filtration mit konstanter Flussrate analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gegenübergestellt. Die geringen Adsorptionswerte der Sterilfiltermembranen konnten hier bestätigt werden. Höhere Adsorptionswerte werden für hydrophobe Membranen auf Basis von CN- und PVDF ermittelt.

Tabelle 9: Adsorptionsmenge von BSA bzw. γ -Globulin für Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml an unterschiedlichen Membranmaterialien ermittelt mittels eines statischen bzw. eines dynamischen Adsorptionsassays mit einer Flussrate von 1 ml/(min·cm²).

	m_{adsorbiert} BSA [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]		m_{adsorbiert} γ-globulin [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	
	statisch	dynamisch	statisch	dynamisch
CN	91	22	100	70
PVDF	89	21	80	73
PES	5	1	6	1
CA	4	3	3	2
RC	1	2	2	2
PVDF_{hyd}	2	3	2	1

Die Größenordnung an adsorbiertem Protein ist dabei bei beiden Analysemethoden für die eher hydrophilen Sterilfiltrationsmembranen vergleichbar. Bei den hydrophoben Membranen aus CN bzw. PVDF gilt dies zumindest auch für die Adsorption von γ -Globulin. Bei der BSA-Lösung hingegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Analysemethoden. Hier sind die absoluten Adsorptionsmengen beim dynamischen Assay wesentlich geringer als bei der statischen Methode. Van den Oetelaar *et al.* hatte in früheren Versuchen allerdings höhere Werte für die dynamische Methode gemessen (Van den Oetelaar *et al.*, 1989). Dies wurde den verhältnismäßig höheren Proteinmengen während der Filtrationsexperimente zugeschrieben. Pitt hingegen hat keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden detektieren können (Pitt, 1987).

Wie in Kapitel 2.3.3 dargelegt, handelt es sich bei der Proteinadsorption um einen komplexen Prozess, der über die Adsorptionsschritte hinaus, Konformationsänderungen des Proteins umfasst. Alle zur Adsorption gehörenden Teilschritte unterliegen einer Kinetik und erfordern daher Zeit, um zum Abschluss zu kommen.

Bei einer Flussrate von $1 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ beträgt die Verweilzeit des Proteins in den Membranporen etwa $0,7 \text{ s}$. Die Unterschiede in den Ergebnissen vom statischen bzw. dynamischen Assay sind somit durch die geringe Verweildauer des Proteins an der Membranoberfläche erklärbar. Dies kann dazu führen, dass Adsorptionsprozesse nicht zum Abschluss kommen. Der statische Adsorptionsassay kann somit als Worst-Case-Szenario mit Bedingungen, die während eines Filtrationsprozesses nicht auftreten, angesehen werden.

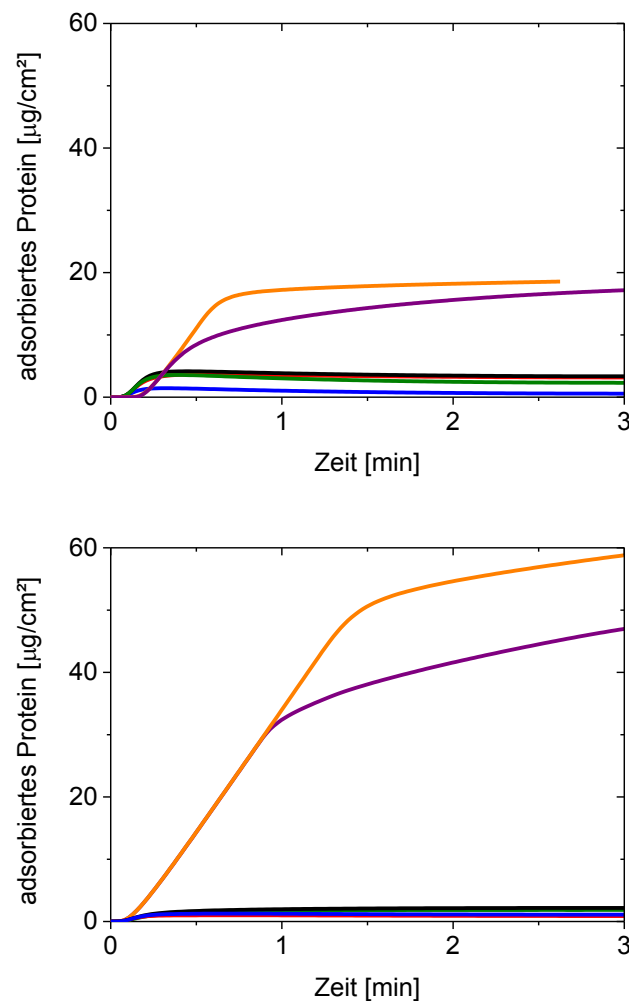


Abbildung 36: Adsorption von BSA (oben) bzw. γ -Globulin (unten) während der Filtration von Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei einer Flussrate von $1 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$. Es wurden CN- (lila), PVDF- (orange), PES- (blau), CA- (schwarz), RC- (grün) und PVDF_{hyd}-Membranen (rot) genutzt.

Der dynamische Assay hat gewisse Vorteile gegenüber der statischen Analyse. Er ermöglicht Untersuchungen zur Adsorptionskinetik über den Verlauf der Zeit.

Abbildung 36 stellt den Verlauf des Adsorptionsprozesses von BSA- bzw. γ -Globulin-Molekülen während der Filtration dar. Bei den eher hydrophilen Sterilfiltern ist bereits nach 15 s der maximale Bedeckungsgrad erreicht und adsorptive bzw. desorptive Vorgänge halten sich im Gleichgewicht. Bei

den eher hydrophoben Materialien CN bzw. PVDF hingegen ist die Adsorption der dominierende Prozess. Ein Sättigungszustand ist auch nach 3 min, was einem Filtrationsvolumen von 15 ml entspricht, noch nicht erreicht. Dies fällt bei der γ -Globulin-Lösung besonders auf. Dementsprechend sind die berechneten maximalen Adsorptionswerte aus Tabelle 9 auch höher, als es in Abbildung 36 zu erkennen ist.

Die jeweiligen Geschwindigkeiten der Adsorptionsprozesse werden in Abbildung 37 gezeigt. Zu Beginn ist in allen Fällen ein deutlicher Anstieg der Adsorptionsgeschwindigkeit zu erkennen. Es deutet darauf hin, dass im Anschluss an den Transport der Proteinmoleküle an die Membranoberfläche eine schnelle und reversible Adsorption stattfindet. Diese Phase wurde bereits von Andrade und Hlady (1986) beschrieben und findet innerhalb der ersten Minute des Kontaktes statt. Sie wird für alle untersuchten Proteine und Membranen beobachtet, daher ist zu vermuten, dass die Anfangsphase primär vom Transport des Proteins zur Membranoberfläche kontrolliert wird.

Die maximalen Adsorptionsgeschwindigkeiten liegen zwischen 10 und 25 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ für die hydrophilen und etwa 40 $\mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ für die hydrophoben Membranen. Wie lange der Adsorptionsprozess mit maximaler Geschwindigkeit weiterläuft, scheint dabei primär von den Membran- sowie Proteineigenschaften abhängig zu sein. Zwischen den eher hydrophilen Sterilfiltermembranen und den Proteinmolekülen existieren keine starken Interaktionen und demnach nimmt die Adsorptionsgeschwindigkeit sehr schnell wieder ab. Bei den hydrophoben Membranen hingegen dauert es länger bis die Adsorptionsgeschwindigkeit wieder sinkt, bei der γ -Globulin-Lösung noch mehr als bei der BSA-Lösung. Vorgänge wie Desorption, die zunehmende Belegung der Membranoberfläche und ein schwindender Konzentrationsgradient, sorgen dafür, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit wieder abnimmt.

Mit Hilfe der Schichtdicke eines Monolayers lässt sich die Oberflächenbelegung der Membran berechnen (Gleichung 18). Für BSA beträgt sie laut Bialopiotrowicz *et al.* ungefähr 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Bialopiotrowicz *et al.*, 2002). Für die eher hydrophilen Sterilfiltrationsmembranen beträgt die Belegung somit rund 10 %. Bei der CN- und PVDF-Membran sind nach 3 min ca. 84 % der Membranoberfläche mit Protein belegt. Hier nähert sich der Wert mit zunehmender Filtrationsdauer der Ausbildung eines kompletten Monolayers an. Auch bei der γ -Globulin-Lösung verhält es sich entsprechend.

Die absoluten Adsorptionswerte des statischen Tests zeigen für BSA eine komplette Oberflächenbelegung mit einer Dicke, welche etwa 3,5 Monolayern entsprechen würde. Hier ist also nicht nur das Adsorptionsverhalten des Proteins an der Membran beobachtet worden. Im weiteren

Verlauf wird vor allem die Adsorption an die bereits entstandenen Proteinschichten betrachtet. Dies ist die Ursache dafür, dass die Werte so viel höher sind als beim dynamischen Assay.

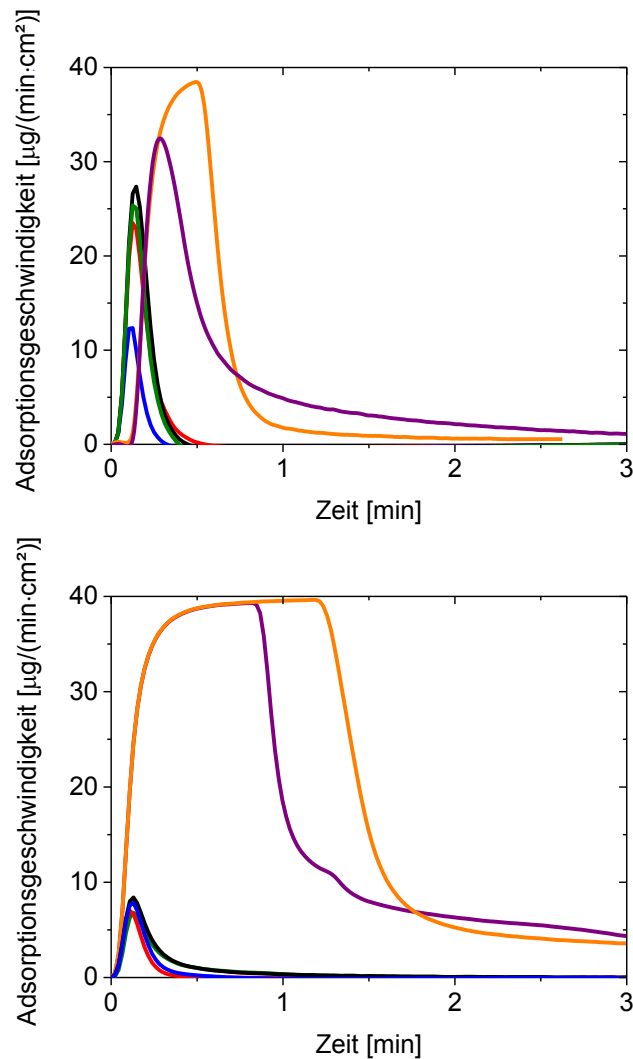


Abbildung 37: Geschwindigkeit der Adsorption von BSA (oben) bzw. γ -Globulin (unten) während der Filtration von Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei einer Flussrate von 1 ml/(min·cm²). Es wurden CN- (lila), PVDF- (orange), PES- (blau), CA- (schwarz), RC- (grün) und PVDF_{hyd}-Membranen (rot) genutzt.

Ein Vorteil des dynamischen Adsorptionsassays ist seine Nähe zum realen Filtrationsprozess. Das Protein wird entsprechend dem angelegten Fluss durch die Membran transportiert, was den Zeitraum für Adsorptionsprozesse limitiert. Des Weiteren können die Messparameter an die entsprechenden Filtrationsparameter angepasst werden, um so ein möglichst realistisches Bild der Adsorption während des jeweiligen Filtrationsprozesses zu erlangen.

Da auf Grund der unterschiedlichen Verweilzeiten von statischem bzw. dynamischem Assay zum Teil bereits Unterschiede im Adsorptionsverhalten zu verzeichnen sind, ist zu erwarten, dass auch die

Flussrate bei der Filtration einen Einfluss hat. Dies ist mit einer 1 mg/ml BSA-Lösung, filtriert durch die RC- bzw. CN-Membran, für Flussraten von 0,2 bis 2 ml/(min·cm²) untersucht worden (Abbildung 38). Diese Flussraten liegen im typischen Bereich von 100 bis 1000 l/(h·m²), in dem auch pharmazeutische Proteine filtriert werden.

Für die hydrophile RC-Membran zeigt sich eine maximale Adsorption von etwa 2 µg/cm² für Flussraten größer als 1 ml/(min·cm²). Bei niedrigeren Flussraten erhöht sich dieser Wert auf bis zu 15,7 µg/cm². Bei der CN-Membran verhält es sich analog. Die Adsorptionswerte nehmen mit abnehmender Flussrate von 8 auf 84 µg/cm² zu. Dieser Effekt lässt sich somit unabhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der Membran erkennen. Einzig der Adsorptionsgrad hängt vom Membrantyp ab. Je hydrophober das Material, desto größer ist auch die Zunahme der Proteinadsorption mit abnehmender Flussrate.

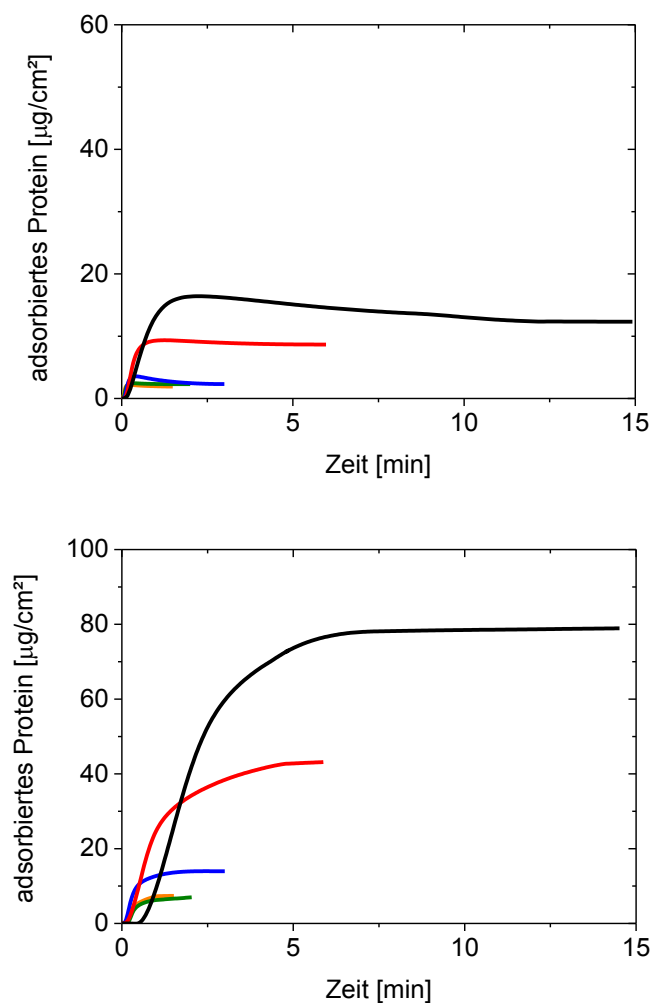


Abbildung 38: Adsorption von BSA an der RC- (oben) bzw. CN-Membran (unten) während der Filtration von Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei unterschiedlichen Flussraten von 0,2 (schwarz), 0,5 (rot), 1 (blau), 1,5 (grün) und 2 ml/(min·cm²) (orange).

Bei niedrigen Flussraten sind die potentiellen Kontaktzeiten von Protein mit der Membranoberfläche erhöht, wodurch eine vermehrte Adsorption ermöglicht wird. Dennoch sollte bedacht werden, dass die höheren Adsorptionswerte bei der CN-Membran nur erreicht werden können, wenn sich mehrere Proteinschichten übereinander anlagern. In diesem Fall ist die Analyse nicht mehr auf die adsorptiven Eigenschaften der Membran beschränkt. Bei höheren Flussraten können die Proteinmoleküle mögliche Interaktionen mit Oberflächen über freiliegende Bindestellen nach Entfaltungen nicht verstärken. Dadurch ist die Adsorption meist reversibel. Dies ist ebenfalls von Bowen und Gan (1992) bei einem zirkulierendem System mit sehr niedrigen Flüssen beobachtet worden. Andrade und Hlady (1986) beschreiben dieses Verhalten als Pseudo-Equilibrium.

Folglich wären höhere Flussraten bei der Filtration von Proteinlösungen zu empfehlen, um die Menge an adsorbiertem Protein zu reduzieren. Jedoch handelt es sich bei Proteinadsorption nicht um die einzige potentielle Ursache, die zu Produktverlust führen kann. Effekte wie die Kolloid- und Konformationsstabilität, welche in Kapitel 4.2.1 bzw. 4.2.3 näher beschrieben werden, müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Hier sind im Allgemeinen eher niedrigere Flussraten von Vorteil. Eine Optimierung der Flussrate für Prozessfiltrationen sollte demzufolge unter Berücksichtigung aller Einflussparameter erfolgen.

Einfluss der Proteinkonzentration

Eine variierende Proteinkonzentration kann sich bei der Filtration ebenfalls auf die Adsorption auswirken. Zur Untersuchung dieses Effekts ist die Adsorption von BSA an der RC- bzw. CN-Membran in Abhängigkeit der Konzentration zunächst für Bereiche zwischen 0,1 und 1 mg/ml, einem für Adsorptionsmessungen typischen Bereich, analysiert worden. Abbildung 39 zeigt den Adsorptionsverlauf bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/(min·cm²).

Bei der RC-Membran lassen sich keine Unterschiede in den Adsorptionsverläufen oder auch der Gesamtmenge an adsorbiertem Protein nachweisen. Unabhängig von der Konzentration steigt der Adsorptionswert innerhalb der ersten 15 s an und bleibt im weiteren Verlauf konstant bei ca. 1,3 bis 3,5 µg/cm². Bei der CN-Membran verhält es sich anders. Hier nimmt die Adsorption mit steigender Konzentration von 11,5 auf 21,6 µg/cm² zu. Da sich innerhalb von 3 min noch kein vollständiges Gleichgewicht eingestellt hat, sind die Gesamtmengen an adsorbiertem Protein berechnet worden. Zusätzlich zeigt sich durch den steileren Kurvenanstieg eine Zunahme der Adsorptionsgeschwindigkeit. Ein Zustand der Sättigung wird innerhalb von drei Minuten nicht erreicht

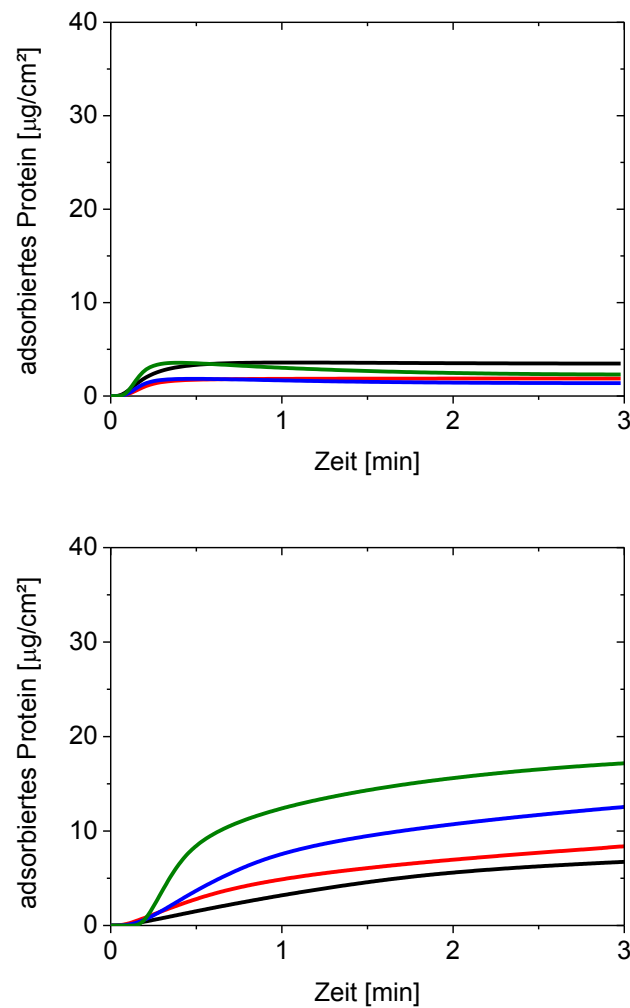


Abbildung 39: Adsorption von BSA an der RC- (oben) bzw. CN-Membran (unten) während der Filtration mit einer konstanten Flussrate von $1 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ und Proteinkonzentrationen von 0,1 (schwarz), 0,25 (rot), 0,5 (blau) und 1 mg/ml (grün).

Pitt und Bialopiotrowicz *et al.* haben den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Adsorption ebenfalls für unterschiedliche Membranen, Proteine und pH-Werte untersucht (Pitt, 1987; Bialopiotrowicz *et al.*, 2002). Dabei haben sie herausgefunden, dass sich die Menge an adsorbiertem Protein direkt proportional zu der Proteinkonzentration verhalten hat. Lediglich bei höheren Konzentrationen um die 2 mg/ml ist eine vollständige Sättigung aufgetreten und die Menge an adsorbiertem Protein nicht weiter angestiegen.

Die in der Literatur beschriebenen Trends sind somit auch mit den hier vorliegenden Ergebnissen für die CN-Membran vergleichbar. Eine BSA-Konzentration von 1 mg/ml ist in diesem Fall nicht ausreichend, um eine vollständige Sättigung zu erzielen. Die Membranoberfläche ist zu diesem Zeitpunkt zu 80 % mit Protein bedeckt. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration könnte zur Ausbildung eines kompletten Monolayers und somit auch zu einem Sättigungszustand führen.

Bei der RC-Membran scheint auf Grund der geringen Absolutwerte die Proteinkonzentration im vorliegenden Bereich keinen signifikanten Einfluss auf die Adsorption zu haben. Adsorptions- und Desorptionsprozesse befinden sich im Gleichgewicht.

Hochkonzentrierte Proteinlösungen

Hochkonzentrierte Proteinlösungen, wie es die vorliegenden Modelllösungen sind, lassen sich mit der beschriebenen Methode nicht mehr hinsichtlich ihres Adsorptionsverhaltens untersuchen. Das entstehende Signal würde das Detektionslimit des UV-Detektors bei weitem übersteigen. Für den in Tabelle 10 dargestellten Vergleich ist auf Daten der HPLC-Analyse des Filtrats zurückgegriffen worden (Kapitel 3.5.9).

Tabelle 10: Adsorptionsverhalten von BSA als Funktion der Proteinkonzentration und Membraneigenschaften.

Proteinkonzentration [mg/ml]	CN		RC	
	Proteinadsorption			
	Absolutmenge [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Relative Menge [%]	Absolutmenge [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Relative Menge [%]
1	22	2,1	1	0,03
100	340	0,03	80	0,007

Zunächst zeigt sich, dass die Gesamtmengen an adsorbiertem Protein bei der hydrophilen RC-Membran unabhängig von der Proteinkonzentration wesentlich niedriger sind, als bei der hydrophoben CN-Membran. Des Weiteren zeigt der Vergleich zwischen den Proteinkonzentrationen, dass sich bei einer hohen Proteinkonzentration von 100 mg/ml in Lösung insgesamt auch mehr Protein auf der Membranoberfläche ablagert.

Betrachtet man allerdings den prozentualen Anteil an adsorbiertem Protein, so ist er bei 100 mg/ml deutlich niedriger, als bei 1 mg/ml. Der Unterschied in den adsorbierten Absolutmengen an Protein zwischen beiden Membrantypen verringert sich darüber hinaus von einem Faktor von 22 auf 4 bei erhöhter Proteinkonzentration. In der vorliegenden hochkonzentrierten Proteinlösung befinden sich so viele Proteinmoleküle, dass sie sich gegenseitig nach außen hin abschirmen. Viele Proteinmoleküle werden beim Passieren der Membran keinerlei Einfluss der Membranoberfläche erfahren und somit auch nicht daran adsorbieren. Dies reduziert den relativen Anteil an adsorbiertem Protein.

Außerdem sorgt die Ausbildung einer ersten Proteinschicht auf der Membranoberfläche für neue Oberflächeneigenschaften, wie bereits beschrieben. Diese kann sich bei erhöhter Proteinkonzentration entsprechend schneller ausbilden, da insgesamt eine größere Menge Protein die Membran passiert. Bereits nach den ersten filtrierte Millilitern ist ein Monolayer ausgebildet.

Verblockungseffekte, welche möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt der Filtration auftreten, können somit nicht durch die Adsorption von Protein an der Membranoberfläche erklärt werden.

4.3.2. Einfluss des Proteintyps auf den Filtrationsverlauf

Die Verläufe der Flussraten von Filtrationen der zuvor beschriebenen hochkonzentrierten Modellproteinlösungen (Kapitel 4.2) bei konstantem Differenzdruck von 0,1 bar durch die bereits in Kapitel 4.1 vorgestellten RC-Membran sind in Abbildung 40 dargestellt. Bei allen untersuchten Proteinlösungen mit BSA, α -Amylase bzw. γ -Globulin, zeigt sich eine deutliche Abnahme der Flussrate vom Ausgangswert mit fortschreitender Filtration, allerdings in unterschiedlichen Verlaufsformen. Die Art der Verblockung ist je nach Proteintyp unterschiedlich. Die Anfangsflüsse variieren zwischen 0,2, 1,3 und 0,5 ml/(min·cm²) für die BSA-, α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Lösung. Sie liegen somit im Bereich von applikationsrelevanten Flussraten bei der Filtration von therapeutischen Proteinen mit rund 100 bis 1000 l/(h·m²) und verhalten sich antiproportional zu den entsprechenden Viskositäten der Lösungen mit 10, 1,7 bzw. 4 cP für die BSA-, α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Lösung (Kapitel 4.2.3).

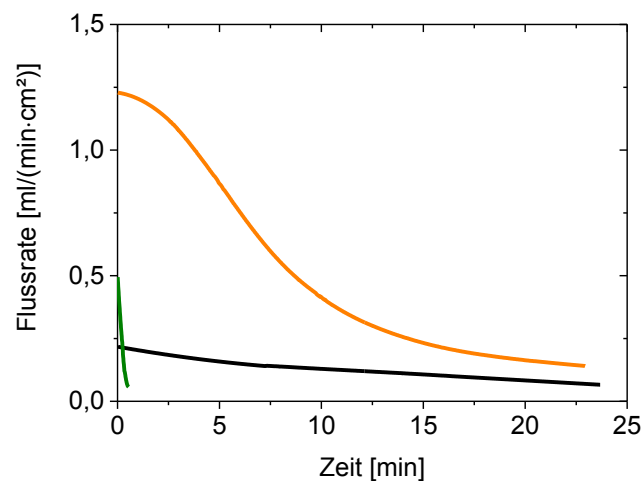


Abbildung 40: Verlauf der Flussrate in Abhängigkeit der Zeit für die Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Bei der Filtration der γ -Globulin-Lösung kommt der Fluss bereits nach einer Minute zum Erliegen, da die Verblockung der Membran direkt und ohne Verzögerung einsetzt. Hierbei wird lediglich ein $V_{1/2}$ -Wert von 0,1 ml/cm² zum Zeitpunkt der Halbierung des Anfangsflusses erreicht (Tabelle 11). Die Filtration der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung erstreckt sich über einen Zeitraum von etwa 25 min. Hier geht die Verblockung wesentlich langsamer von statten. Dementsprechend sind auch die erzielten

$V_{1/2}$ -Werte mit 2,1 bzw. 7,2 ml/cm² größer. Der höhere Wert für die Filtration der α -Amylase-Lösung hängt hauptsächlich mit der im Vergleich zur BSA-Lösung niedrigeren Konzentration und der entsprechend höheren Flussrate zusammen.

Die Betrachtung der $V_{1/2}$ -Werte ist für eine spätere Applikation im Herstellungsprozess therapeutischer Proteine anwendungstechnisch sinnvoller als die alleinige Bewertung des V_{max} -Wertes. Prozessfiltrationen werden nicht bis zur vollständigen Verblockung der verwendeten Membranfilter durchgeführt, sondern so ausgelegt, dass eine Filtration ohne signifikante Abnahme des Anfangsflusses möglich ist. Da bei der Proteinfiltration abhängig vom Proteintypen und der Konzentration auch unterschiedliche Verblockungsverläufe beobachtet werden, können die Verhältnisse der erreichten Filtrationsvolumina zu diversen Zeitpunkten der Filtration voneinander abweichen. Die Definition der Kapazitäten bei 50%iger Verblockung ermöglicht eine genauere Beschreibung des Ergebnisrelevanten Anfangsbereiches der Filtration.

Tabelle 11: $V_{1/2}$ - und V_{max} -Werte für die Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA, 100 mg/ml α -Amylase bzw. 100 mg/ml γ -Globulin durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Protein	$V_{1/2}$	V_{max}
	[ml/cm²]	[ml/cm²]
BSA	2,1	7,5
α -Amylase	7,2	15,6
γ -Globulin	0,1	0,2

Für die Auslegung realer Prozesse ist nicht nur die Filtrationsdauer, sondern auch das erzielte Filtratvolumen von Bedeutung. Dementsprechend sind in Abbildung 41 die Verläufe der Flussraten der Modellproteinlösungen in Abhängigkeit vom Filtratvolumen dargestellt.

Der Verlauf der Flussrate für die γ -Globulin-Lösung verändert sich dabei kaum im Vergleich zur Auftragung über der Zeit (Abbildung 40). Eine vollständige Verblockung der Membran tritt bereits nach wenigen Millilitern filtrierter Lösung auf. Dieses Verblockungsverhalten ist typisch für die Verblockung partikulärer Lösungen, wie zum Beispiel der Standardlösung von Sartorius (Abbildung 13). Die schnelle Abnahme der Flussrate kann somit auf das Vorhandensein von größeren Aggregaten in der Lösung zurückgeführt werden. Diese konnten für die Modelllösung per HPLC-Analyse bzw. DLS-Messungen auch experimentell nachgewiesen werden (Kapitel 4.2.2). Ein Vergleich mit Ergebnissen von Jiang *et al.* (2011) stützt diese These. Hier ist eine γ -Globulin-Lösung mit einer Konzentration von 186 mg/ml über eine 0,22 μ m PVDF-Membran mit einem Differenzdruck von 0,7 bar filtriert worden. Während die auf Druck und Viskosität normierten Anfangsflüsse mit den hier beschriebenen Ergebnissen vergleichbar sind, nimmt die Flussrate im Verlauf der Filtration bei Jiang *et al.* (2011)

deutlich langsamer ab. Der Anfangsfluss wird durch die Fluidphase bestimmt. Aggregate, welche sich während der Herstellung der Proteinlösung gebildet haben, bewirken Änderungen des weiteren Filtrationsverlaufs. Jiang *et al.* haben offensichtlich Lösungen mit einem geringeren Aggregationsgrad filtrierte.

Auch die Filtration mit der BSA-Lösung weist unabhängig von der Darstellung einen ähnlichen Filtrationsverlauf auf. Es können insgesamt ca. 50 ml BSA-Lösung filtrierte werden bis es zu einer vollständigen Verblockung kommt.

Bei der Filtration der α -Amylase-Lösung lässt sich über die Zeit gesehen ein deutlicher Abfall der Flussrate beobachten. Betrachtet man allerdings das in dieser Zeit filtrierte Volumen, so zeigt sich, dass eine signifikante Verblockung nicht sofort, sondern erst nach der Filtration von ca. 50 ml einsetzt. Weitere 100 ml Lösung können nachfolgend noch filtrierte werden, bis die Flussrate zum Erliegen kommt.

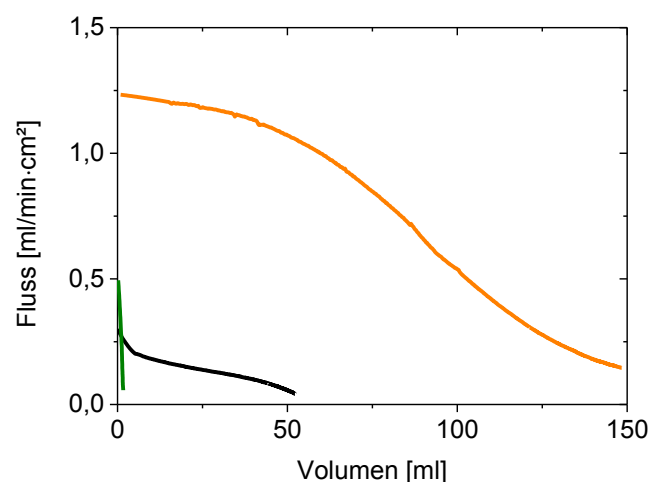


Abbildung 41: Verlauf der Flussrate in Abhängigkeit des Filtratvolumens für die Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Entsprechend den Flussverläufen der Filtrationen kann auch die Veränderung des Membranwiderstandes (Gleichung 14) während des Filtrationsprozesses betrachtet werden (Abbildung 42). Zu Beginn der Filtration beträgt der Widerstand in allen Fällen ca. $2,5 \cdot 10^{10}$ /m, dem reinen Membranwiderstand. Mit fortlaufender Filtration nimmt der Widerstand in Folge des ablaufenden Verblockungsprozess zu. Durch Ablagerungen der Proteine verändern sich geometrische Parameter wie Porengröße, Porosität oder auch Membrandicke, welche einen direkten Einfluss auf den Widerstand haben.

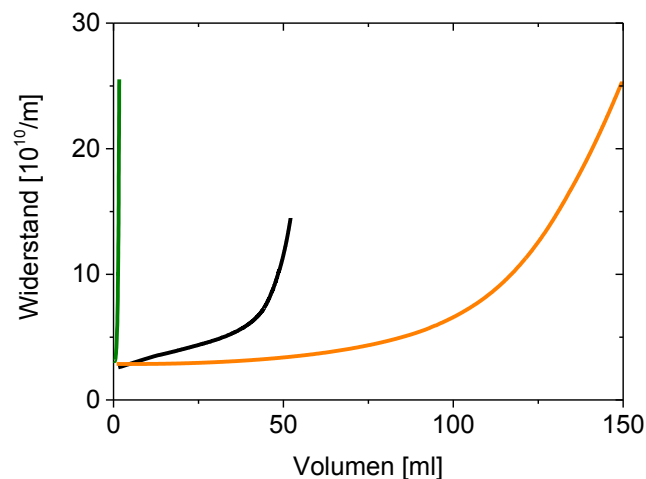


Abbildung 42: Filtrationswiderstände von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) aufgetragen über dem Filtratvolumen. Die Filtrationen wurden mit einer RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Die sofortige Abnahme der Flussrate bei der Filtration der γ -Globulin-Lösung spiegelt sich hier durch den unverzögerten Anstieg des Widerstandes wider. Im Falle der α -Amylase-Lösung erfolgt ein signifikanter Anstieg des Widerstandes nach rund 50 ml Filtratvolumen, analog zum Abfall der Flussrate. Die Widerstandskurve der BSA-Lösung weist bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Filtration einen stetigen Anstieg des Widerstandes auf gefolgt von einer vollständigen Verblockung nach der Filtration von ca. 50 ml Lösung.

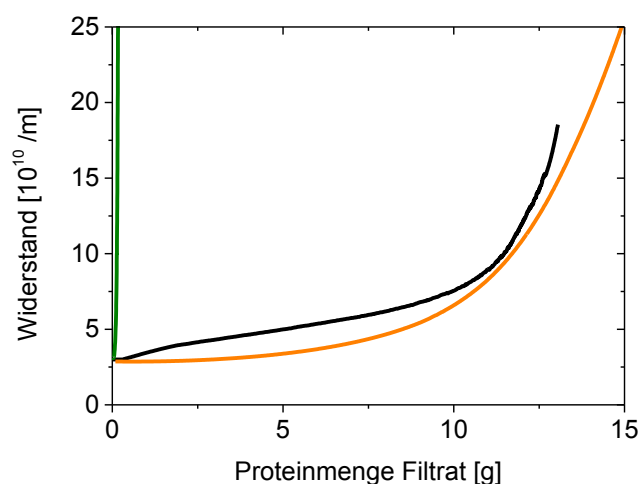


Abbildung 43: Verlauf des Filtrationswiderstandes in Abhängigkeit von der filtrierten Proteinmenge für die Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

In Abbildung 43 wird die Entwicklung des Widerstandes in Abhängigkeit der Proteinmenge im Filtrat dargestellt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Bei der Filtration der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung tritt eine vollständige Verblockung nach der Filtration einer vergleichbaren Menge an Protein ein.

Wichtigster Verblockungsmechanismus im Verlauf der Filtration ist die Ablagerung von Protein auf der spezifischen Membranoberfläche bedingt durch die kolloidale Instabilität der untersuchten hochkonzentrierten Proteinlösungen. Daraus resultiert eine langsame Verengung des Porenquerschnitts gefolgt von einer allmählichen Abnahme der Flussrate bzw. Zunahme des Filtrationswiderstandes. Die Gegenwart einer geringen Zahl von Proteinaggregaten in der Lösung bewirkt zusätzlich eine graduelle Porenverblockung, gekennzeichnet durch einen stetigen Anstieg des Widerstandes zu Beginn der Filtration, wie es im Falle der Filtration der BSA-Lösung beobachtet werden kann. Die spontane Verblockung im Fall der Filtration der γ -Globulinlösung wird mit einer vollständigen Porenverblockung erklärt, bedingt durch den nachweislich höheren Anteil hochmolekularer Proteinaggregate in der Lösung.

Alle Proteine weisen eine vergleichbare Dichte von $1,37 \text{ g/cm}^3$ auf (Erickson, 2009). Daher ist es plausibel, dass nach Ablagerung der gleichen Menge Protein auf der Membranoberfläche im Verlauf der Filtration durch die gleiche Membran bei entsprechender Verengung des Porenquerschnittes ein vergleichbarer Widerstand resultiert.

Das Zuwachsen der Poren durch Proteinablagerungen ist mittels Berechnung der Entwicklung der verblockenden Proteinschicht im Verlauf der Filtration (Gleichung 18) analysiert worden (Abbildung 44). Dies geschieht unter der Annahme, dass die Membranporen kontinuierlich durch Ablagerung einzelner Proteinmoleküle zuwachsen. Das Wachstum der Schichtdicke verhält sich dabei analog zum Anstieg der Widerstände. Zum Endzeitpunkt der Filtration, wenn die Flussrate nahezu vollständig zum Erliegen gekommen ist, beträgt die berechnete Schichtdicke in den Poren unabhängig vom Proteintypen etwa $0,075 \mu\text{m}$. Dies ist gleichzusetzen mit rund 11 bis 15 Proteinschichten bzw. einer Verblockung von etwa 65 % des ursprünglichen Porenvolumens. Der dominierende Verblockungsmechanismus bei Filtration der γ -Globulin-Lösung ist eine komplette Porenverblockung. Deshalb kommt es zum abweichenden Kurvenverlauf und spontanen Anstieg des Widerstandes.

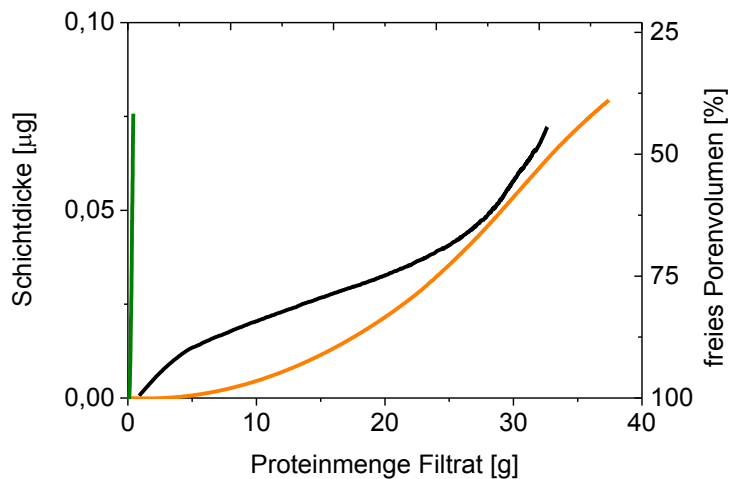


Abbildung 44: Berechnung der Dicke der in den Membranporen aufgebauten Proteinschichten und des freien Porenvolumens im Verlauf der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Die Analyse des Verblockungsverhaltens mittels REM-Aufnahmen der genutzten RC-Membranen nach der Filtration ist in Abbildung 45 dargestellt. Eine Darstellung der Membran im Ausgangszustand ist bereits in Abbildung 20 zu sehen. Nach der Filtration zeigt sich in allen Fällen eine mit Protein bedeckte Anströmseite der Membran. Bei der α -Amylase-Lösung ist die Membranoberfläche vollständig bedeckt. Der Querschnitt zeigt allerdings, dass es sich dabei nur um eine sehr dünne Deckschicht handelt und nicht um einen ausgebildeten Filterkuchen. Bei den Membranen mit denen die BSA- bzw. γ -Globulin-Lösung filtriert worden ist, ist die Oberflächenbelegung nach der Filtration nicht vollständig. Die Membranstruktur ist noch erkennbar und es sind einzelne offene Poren sichtbar. Auf der Filtratseite der Membran ist im Fall der α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Filtration keinerlei Protein sichtbar. Lediglich BSA ist nach der Filtration auf der Filtratseite der Membran, in Form einzelner verblockter Poren, wiederzufinden. Im Membranquerschnitt ist hingegen keine signifikante Porenverblockung zu erkennen. Bei der Filtration der BSA-Lösung dringt die Verblockung bei vergleichbaren Prozessparametern weiter in den Filter vor als bei der α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Lösung. Bei der γ -Globulin-Filtration findet die Verblockung auf Grund des hohen Aggregatanteils bereits an der Membranoberfläche statt.

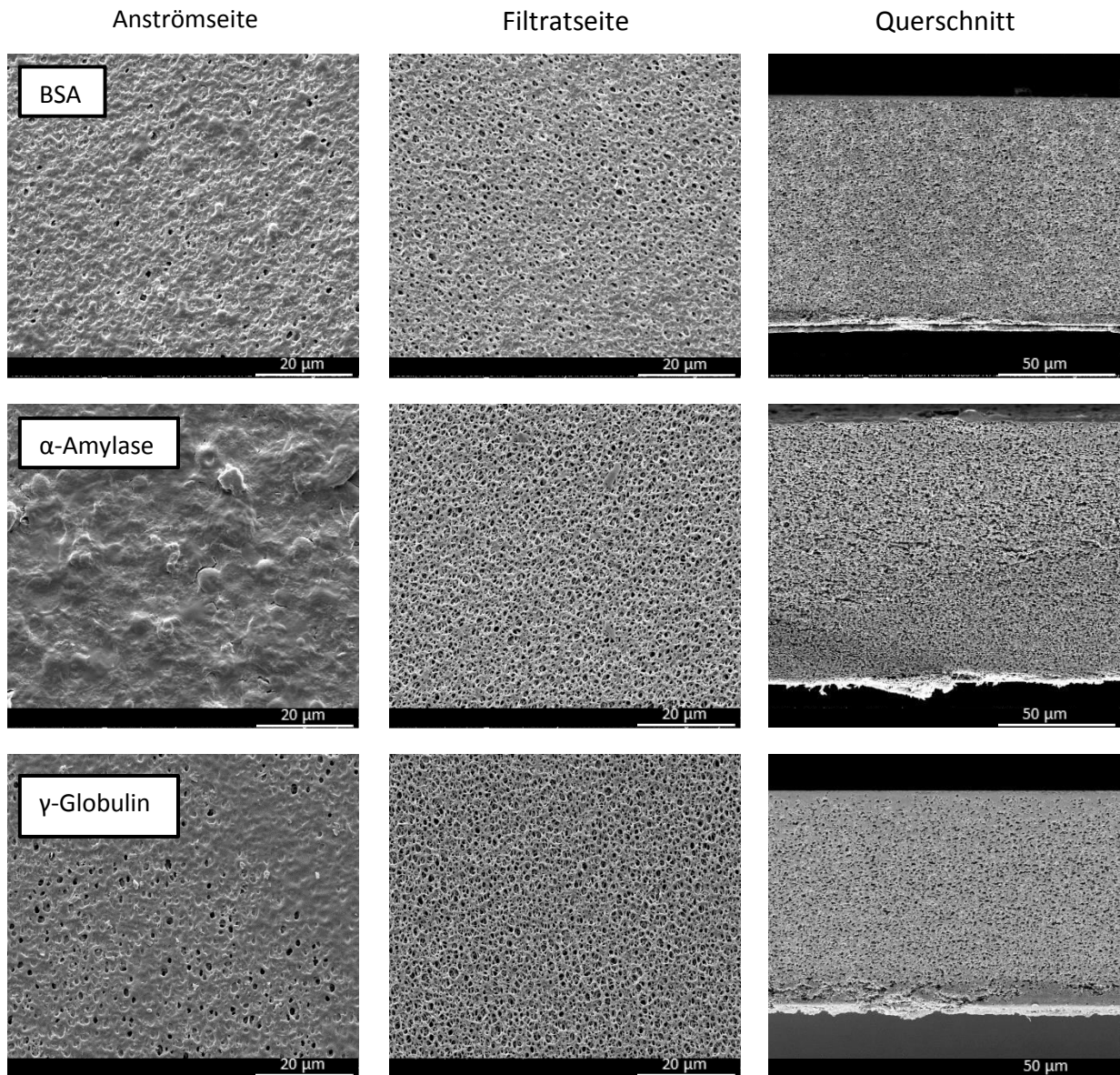


Abbildung 45: REM-Aufnahmen von RC-Membranen nach der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) bei einem Differenzdruck von 0,1 bar. Die Vergrößerung der Anströmseite (links) und der Filtratseite (mitte) beträgt 4000x, die des Querschnittes (rechts) 2000x.

4.3.3. Einfluss von Aggregaten auf das Verblockungsverhalten

Ausgehend von der DLVO-Theorie (Kapitel 2.3.2) beeinflusst die Proteinkonzentration die kolloidale Stabilität der Proteinlösung und somit auch die Aggregatbildung. Die intermolekularen Abstände zwischen den Proteinmolekülen (Gleichung 2) sind in niedriger konzentrierten Lösungen größer. Dies wiederum zieht niedrigere Interaktionsenergien (Gleichung 1) nach sich und verringert somit das Risiko der Aggregatbildung.

Um diesen Zusammenhang genauer zu analysieren, sind eine Reihe von BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 10, 50, 100 bzw. 250 mg/ml und einem Differenzdruck von 0,1 bar durch eine

RC-Membran filtriert worden (Abbildung 46). Dabei zeigt sich zunächst eine deutliche Abnahme des Anfangsflusses mit zunehmender Proteinkonzentration. Mit Werten von etwa 0,2 bis 1,6 ml/(min·cm²) verhalten sich die Anfangsflüsse umgekehrt proportional zu den Proteinkonzentrationen und damit verbunden auch zu den dynamischen Viskositäten der jeweiligen Lösung mit 1; 1,1; 2 bzw. 10 cP.

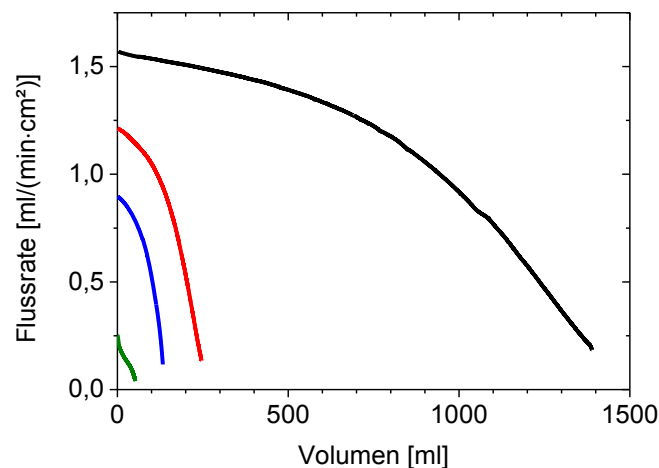


Abbildung 46: Filtrationsverläufe von Proteinlösungen mit 10 (schwarz), 50 (rot), 100 (blau) bzw. 250 mg/ml BSA (grün) aufgetragen über dem Filtratvolumen. Die Filtrationen wurden mit einer RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Die Kapazitäten nehmen ebenfalls mit zunehmender Proteinkonzentration ab (Tabelle 12). Die erreichten Werte liegen dabei zwischen 87,0 und 1,8 ml/cm², wobei eine signifikante Abnahme bereits bei einer Konzentration von 50 mg/ml BSA zu verzeichnen ist.

Tabelle 12: $V_{1/2}$ -Werte erzielt bei der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA. Die Filtrationen wurden mit einer RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Proteinkonzentration [mg/ml]	$V_{1/2}$ [ml/cm ²]
10	87,0
50	14,6
100	8,2
250	2,1

In Abbildung 47 sind die Membranwiderstände im Verlauf der Filtration über der absoluten Proteinmenge im Filtrat aufgetragen. Für den Konzentrationsbereich zwischen 10 bis 100 mg/ml BSA ergibt sich ein vergleichbarer Verlauf, mit einem Widerstand im Bereich des Membranwiderstandes gefolgt von einer vollständigen Verblockung ab einer Proteinmenge im Filtrat von ca. 11 g. Bei der höchsten BSA-Konzentration von 250 mg/ml hingegen wird der in Kapitel 4.3.2 bereits diskutierte

stetige Anstieg des Widerstandes auf rund das doppelte des Membranwiderstandes beobachtet, gefolgt von einer vollständigen Verblockung nach ebenfalls rund 11 g.

Das bedeutet, dass auch im Bereich niedriger BSA-Konzentrationen eine Verblockung des Filters beobachtet werden kann, da es zu einer Ablagerung von Proteinen auf der Membranoberfläche kommt. Diese ist bedingt durch die thermodynamische Instabilität der kolloidalen Lösungen. Die resultierende Verengung des Porenquerschnitts wird nur langsam wirksam, wobei der exponentielle Kurvenverlauf entsteht, da sich die Porengröße quadratisch auf den Widerstand auswirkt (Gleichung 12). Dieser entspricht den Beschreibungen von Ho und Zydney (Ho und Zydney , 2000). Solange keine zusätzlichen Verblockungsereignisse stattfinden, wird dieser Kurvenverlauf unabhängig von der Konzentration und filtrierter Proteinlösung beobachtet, wie zum Beispiel auch bei der Filtration der α -Amylase-Lösung in Kapitel 4.3.2.

Mit steigender Proteinkonzentration in der Lösung nimmt die Zahl der Proteinaggregate bzw. deren Größe zu. Es kommt zu gradueller Porenverblockung, verbunden mit einer Änderung des Kurvenverlaufs, welcher durch einen stetigen Anstieg ab Beginn der Filtration gekennzeichnet ist.

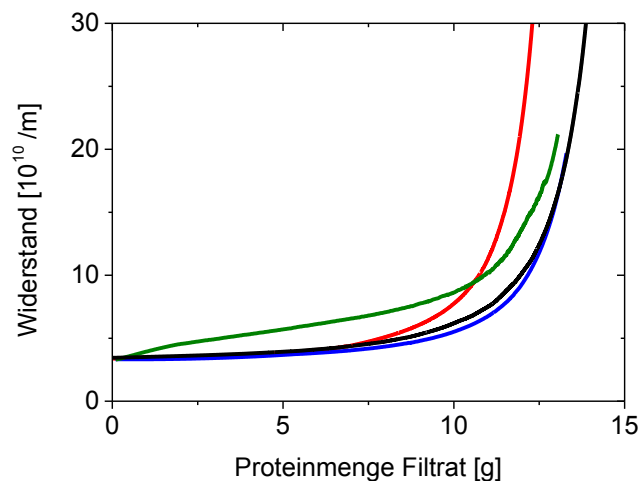


Abbildung 47: Filtrationswiderstände von Proteinlösungen mit 10 (schwarz), 50 (rot), 100 (blau) bzw. 250 mg/ml BSA (grün) aufgetragen über der Proteinmenge im Filtrat. Die Filtrationen wurden mit der RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

4.3.4. Eliminierung von Aggregaten

Vorfiltration

Um eine bessere Filtrationsleistung bei verblockenden Lösungen zu erzielen, kommen häufig Vorfilter zum Einsatz. Ziel ist es dabei den eigentlichen Sterilfilter vor größeren Partikeln bzw. Aggregaten zu

schützen. Für die Filtration einer partikulären Standardlösung ist der positive Einfluss eines geeigneten Vorfilters bereits in Kapitel 2.5 beschrieben worden. Zur Überprüfung, ob dies auch bei hochkonzentrierten Proteinlösungen effektiv ist, sind vergleichende Filtrationen mit einer 250 mg/ml BSA-Lösung durchgeführt worden (Abbildung 48). Bei Differenzdrücken von 0,1 bzw. 2 bar kam die RC-Membran einmal mit und einmal ohne Vorfilter zum Einsatz. Als Vorfilter ist eine Membran aus RC mit einer mittleren Porengröße von 0,43 µm verwendet worden.

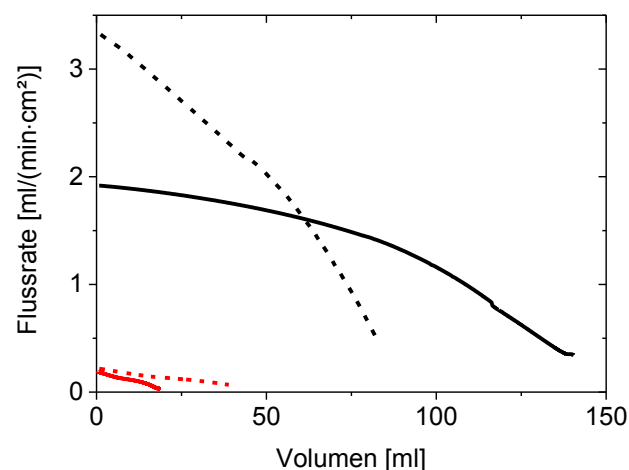


Abbildung 48: Filtrationsverläufe einer Proteinlösung mit 250 mg/ml BSA mit einem RC-Sterilfilter (gestrichelt) und einer RC-Vorfilter-Sterilfilter-Kombination (durchgezogen) bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar (rot) bzw. 2 bar (schwarz).

Wie Abbildung 48 zeigt, ist es von der Prozessführung abhängig in wie fern durch den Vorfilter eine Verbesserung der Filtrationsleistung erzielt werden kann. Bei der Filtration mit einem Differenzdruck von 0,1 bar ist bei der Kombination aus Vorfilter und Sterilfilter ein stärkeres Verblockungsverhalten zu beobachten, als für den Einzelfilter. Dementsprechend ist der erzielte $V_{1/2}$ -Wert mit 1,6 ml/cm² etwas geringer als beim Einzelfilter mit 2,1 ml/cm².

Bei einem Differenzdruck von 2 bar hingegen wird durch Einsatz des Vorfilters eine Steigerung des $V_{1/2}$ -Wertes von etwa 4,5 auf 8,2 ml/cm² erreicht. Die Flussrate der Vorfilter-Sterilfilter-Kombination fällt bis zu einem Filtratvolumen von 50 ml nur unmerklich ab, wie es bereits bei der Filtration der α -Amylase-Lösung in Kapitel 4.3.2 beobachtet worden ist. Dies zeigt, dass der Vorfilter in der Lage ist, die in der Proteinlösung vorhandenen hochmolekularen Aggregate (Kapitel 4.2.1) wirksam zurückzuhalten und der Sterilfilter somit langsamer verblockt. Der niedrigere Anfangsfluss der Vorfilter-Sterilfilter-Kombination ist durch den höheren Widerstand der Filterkombination gegenüber dem Einzelfilter zu erklären. Ein weiterer Vorteil des Vorfilters kann darin bestehen, dass sich die Proteinablagerungen auf einer größeren Membranoberfläche verteilen und somit die Querschnittsverengung der Poren verlangsamt wird.

Demnach kann der Einsatz eines geeigneten Vorfilters auch bei hochkonzentrierten Proteinlösungen einen positiven Effekt haben. Dass sich diese Effekte bei einem Differenzdruck von 0,1 bar nicht auswirken, hängt wahrscheinlich mit der geringen Flussrate von anfänglich 0,5 ml/(min·cm²) zusammen. Die resultierende Verweilzeit von rund 15 s kann zu einem verstärkten Verblockungsverhalten führen. Der Einfluss der Prozessbedingungen wird in Kapitel 4.3.6 ausführlich beschrieben.

Optimierte Lösungsherstellung

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, dass bei der direkten Herstellung der hochkonzentrierten Proteinlösungen durch einfaches Einrühren von lyophilisiertem Protein in die Pufferlösung (Kapitel 3.2) Aggregate entstehen, welche das Proteinfouling bei der Filtration verstärken. Speziell die hochmolekularen Aggregate, wie sie in der γ -Globulin-Lösung existieren (Kapitel 4.2.2), können in Folge der Scherung beim Rührvorgang entstanden sein.

Es ist zu erwarten, dass die Aggregatbildung vermindert werden kann, wenn die Lösungen geringer konzentriert angesetzt und nachfolgend mittels Crossflow-Filtration aufkonzentriert werden. Dieses Vorgehen entspricht außerdem der Prozessführung während eines typischen Downstreamprozesses.

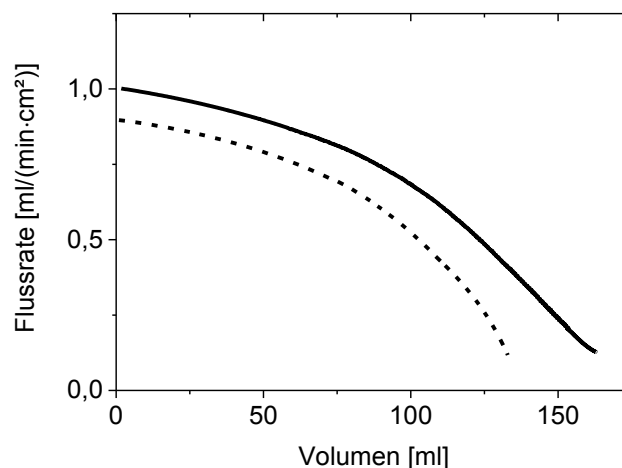


Abbildung 49: Filtrationsverläufe der Filtration einer Proteinlösung mit 100 mg/ml BSA direkt angesetzt (gestrichelt) bzw. von 50 auf 100 mg/ml aufkonzentriert (durchgezogen) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Zur Überprüfung dieser These ist zunächst eine Aufkonzentrierung einer 50 mg/ml BSA-Lösung auf 100 mg/ml durchgeführt worden. Abbildung 49 zeigt den Filtrationsverlauf der aufkonzentrierten Proteinlösung im Vergleich mit einer direkt angesetzten Lösung bei der Filtration mit einem Differenzdruck von 0,1 bar durch die RC-Membran. Die Flusskurven der Filtrationen der

unterschiedlich hergestellten Proteinlösungen weisen einen sehr ähnlichen Verlauf auf. Beginnend mit 1,0 bzw. 0,9 ml/(min·cm²) nehmen die Flussraten im gleichen Maße ab und sind nach rund 12 min bzw. etwa 120 ml Filtratvolumen um die Hälfte verringert. Die Kapazität bei 50 % Verblockung, welche mit der aufkonzentrierten Proteinlösung erreicht wird, ist mit 10,6 ml/cm² nur leicht erhöht im Vergleich zur direkt angesetzten Proteinlösung mit 8,2 ml/cm².

Ein signifikant positiver Effekt durch die alternative Lösungsherstellung kann somit bei der BSA-Lösung unter den gegebenen Bedingungen nicht erzielt werden. Wie Abbildung 47 zeigt, hat der Aggregatanteil einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml ohnehin nur einen geringen Einfluss auf das Verblockungsverhaltens bei der Filtration.

Bei besonders instabilen Proteinlösungen könnte sich die veränderte Lösungsherstellung deutlicher auswirken. Entsprechend ist der Versuch mit einer γ -Globulin-Lösung wiederholt worden, welche sich in den bisherigen Versuchen als besonders instabil erwiesen hat. Es sind zwei verschiedene Aufkonzentrierungen von 50 auf 100 mg/ml bzw. von 25 auf 100 mg/ml durchgeführt worden. Diese Lösungen sowie eine direkt angesetzte Lösung mit 100 mg/ml sind bei 0,1 bar mit der RC-Membran filtriert und verglichen worden (Abbildung 50). Im Gegensatz zu den Versuchen mit der BSA-Lösung zeigt sich hier ein deutlicher Unterschied zwischen den Herstellungsmethoden. Zwar sind die Anfangsflüsse mit 0,3 ml/(min·cm²) bei den aufkonzentrierten Lösungen leicht geringer als bei der direkt angesetzten Proteinlösung mit 0,4 ml/(min·cm²), aber die anschließende Verblockung ist deutlich verlangsamt. Daraus resultieren letztendlich signifikant höhere $V_{1/2}$ -Werte mit rund 0,4 ml/cm² im Vergleich zu 0,1 ml/cm² bei der direkt angesetzten Lösung.

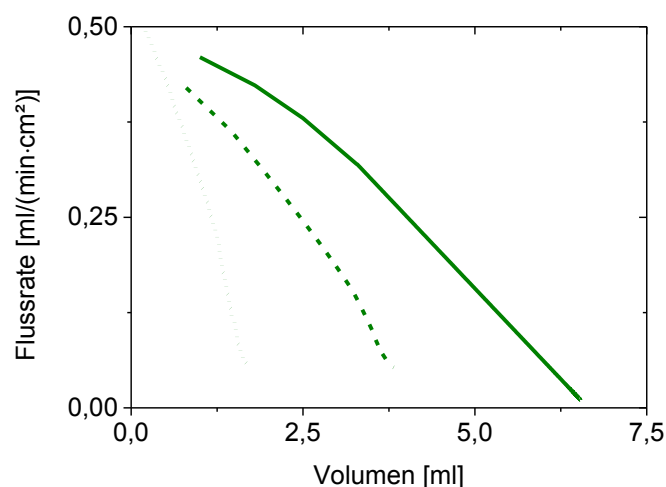


Abbildung 50: Filtrationsverlauf der Filtration einer 100 mg/ml γ -Globulin-Lösung direkt angesetzt (gepunktet), von 50 auf 100 mg/ml aufkonzentriert (gestrichelt) bzw. von 25 auf 100 mg/ml aufkonzentriert (durchgezogen) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Es zeigt sich deutlich, dass ein schonenderes Herstellungsverfahren für instabile, hochkonzentrierte Proteinlösungen zu einer besseren Filtrationsleistung führen kann. Bei Untersuchungen bezüglich der Filtration von therapeutischen Proteinen muss demnach auch der Herstellprozess der Lösung bzw. der dadurch entstehende Grad an Proteinaggregation mit berücksichtigt werden. Andernfalls sind ermittelte Messdaten nicht zwangsläufig übertragbar und vergleichbar.

Hinsichtlich der γ -Globulin-Lösung sollte im Rahmen nachfolgender Untersuchungen auch die chemische Zusammensetzung der Lösungsformulierung auf den Proteintyp angepasst werden.

4.3.5. Einfluss des Membrantyps auf den Filtrationsverlauf

Der Einfluss von Membrantypen mit unterschiedlicher Oberflächenchemie auf die Filtrationsleistung ist für die Modellproteinlösungen mit einer Membran aus RC bzw. CN untersucht worden. Die CN-Membranen sind bekanntermaßen hoch adsorptiv gegenüber Proteinen (Kapitel 4.3.1). Beide Membranen besitzen ähnliche charakteristische Membrangrößen. Die CN-Membran weist mit $23 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ im Vergleich zu $16,5 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ lediglich eine etwas größere Flussrate für Wasser auf.

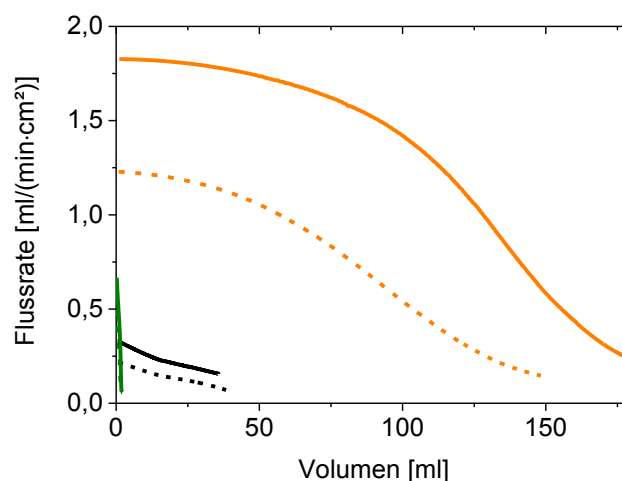


Abbildung 51: Filtrationsverläufe der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) aufgetragen über dem Filtratvolumen. Die Filtrationen wurden mit der RC- (gestrichelt) bzw. CN-Membran (durchgezogen) bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse der Filtrationsversuche bei einem Differenzdruck von 0,1 bar. Bei allen Proteinlösungen ist der Verlauf der Flussraten der RC- und CN-Membran jeweils vergleichbar. Die absoluten Flussraten der CN-Membran sind dabei leicht erhöht im Vergleich zur RC-Membran.

Somit sind auch die $V_{1/2}$ -Werte der CN-Membran etwas größer als die der RC-Membran, was durch die etwas offenere Struktur der CN-Membran erklärt werden kann (Tabelle 13).

Tabelle 13: Kapazitäten bei 50 %iger Verblockung von der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA, 100 mg/ml α -Amylase bzw. 100 mg/ml γ -Globulin. Die Filtrationen wurden mit der RC- bzw. CN-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Protein	$V_{1/2}$ [ml/cm ²]	
	RC	CN
BSA	2,1	2,5
α -Amylase	7,2	9,5
γ -Globulin	0,1	0,1

Bei der Betrachtung der Widerstände in Abhängigkeit von der Proteinmenge, die den Filter passiert hat, zeigen sich ebenfalls vergleichbare Verläufe. Wobei die Widerstände im Fall der CN-Membran bedingt durch die etwas offenerporigere Struktur langsamer zunehmen (Abbildung 52).

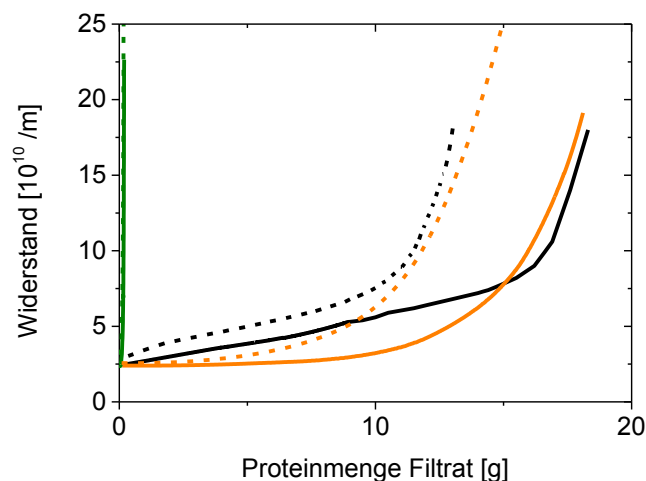


Abbildung 52: Filtrationswiderstände von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün). Die Filtrationen wurden mit der RC- (gestrichelt) bzw. CN-Membran (durchgezogen) bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Es zeigt sich, dass das Verblockungsverhalten der untersuchten hochkonzentrierten Proteinlösungen maßgeblich von der Membranstruktur abhängt. Geometrische Parameter wie zum Beispiel die Porengröße spiegeln sich merklich in den Fluss- bzw. Widerstandsverläufen wider. Die Oberflächenchemie der Membranen und ihre Adsorptionseigenschaften haben keinen Einfluss auf das Verblockungsverhalten.

REM-Aufnahmen der Filtratseiten der RC- bzw. CN-Membranen nach der Filtration mit den Modellproteinlösungen zeigen keine sichtbaren Unterschiede (Abbildung 53). Dies deutet auf eine Ablagerung von Protein auf der gesamten Membranoberfläche und in den Poren hin.

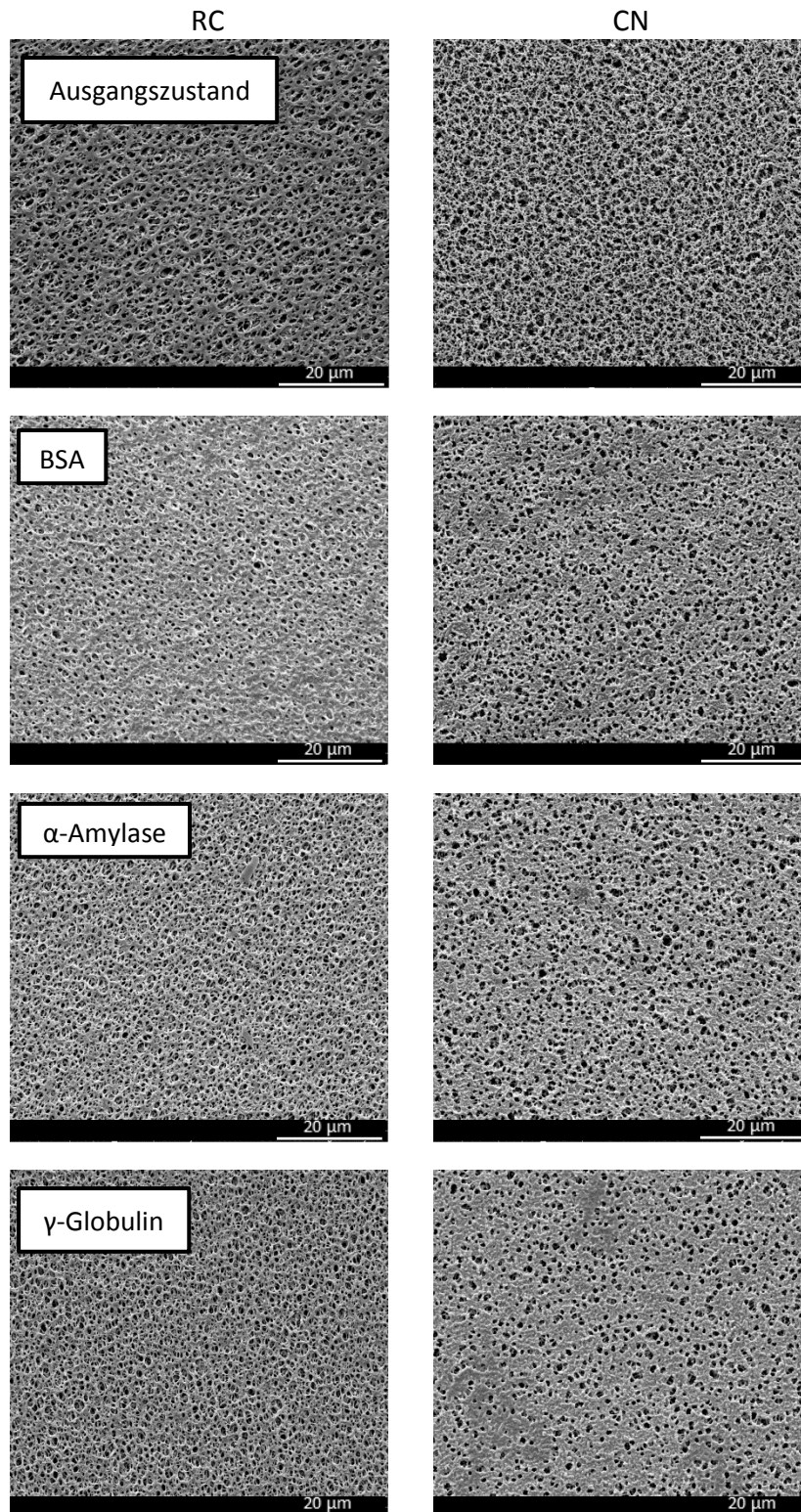


Abbildung 53: REM-Aufnahmen der Filtratseite von RC- (links) bzw. CN-Membranen (rechts) nach der Filtration einer Proteinlösung mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) bei einem Differenzdruck von 0,1 bar. Die Vergrößerung der Filtratseite beträgt 4000x.

Insbesondere im Querschnitt der CN-Membran von der Filtration der BSA-Lösung ist eine vollständige Verblockung des Porenraumes durch Proteinlösung (Abbildung 54) zu erkennen. Während auf der rechten Seite der REM-Aufnahme eine glatte Schnittkante zu sehen ist, zeigt sich links eine gebrochene Kante. Hier ist die Membranstruktur klar erkennbar und nicht durch den Schneidvorgang verschmiert. Die Stege der Membran erscheinen dabei in Weiß und diese umgebend die Proteinlösung in dunkel.

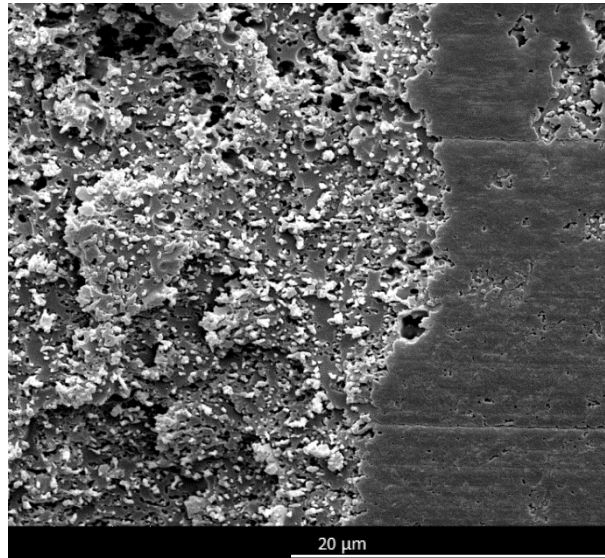


Abbildung 54: REM-Aufnahme einer CN-Membran nach der Filtration einer Proteinlösung mit 250 mg/ml BSA bei einem Differenzdruck von 0,1 bar. Die Vergrößerung des Querschnittes beträgt 8000x.

Die Ablagerung von Proteinmolekülen auf der Membranoberfläche während der Filtration, welche als Hauptverblockungsmechanismus identifiziert worden sind (Kapitel 4.3.2), erfolgt auf Grund der kolloidalen Instabilität der Proteinlösungen.

Bedingt durch die besonderen energetischen Bedingungen an der Grenzfläche zwischen Proteinlösung und Festkörperoberfläche werden die Proteinmoleküle in Nachbarschaft zur Membranoberfläche destabilisiert. Sie gehen Konformationsänderungen ein und lagern sich auf der Oberfläche ab. Wichtig sind dabei die physikalischen Eigenschaften der Grenzfläche und nicht ihre chemische Natur. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.3.1 zeigen, bauen sich Proteinmultilayer im Verlauf der Filtration auf, die die Membranoberflächen vollständig bedecken und somit deren möglichen Einfluss auf das Verblockungsverhalten maskieren.

4.3.6. Einfluss der Membranstruktur auf das Verblockungsverhalten

Um den in Kapitel 4.3.5 beobachteten Einfluss der Membranstruktur auf das Verblockungsverhalten näher zu untersuchen sind exemplarisch Filtrationen der 100 mg/ml α -Amylase-Lösung mit Track-Etch-Membranen aus Polycarbonat durchgeführt worden. Dazu sind zwei Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,4 bzw. 1 μm eingesetzt worden (Abbildung 55). Zunächst zeigen sich auf Grund der größeren Poren etwa um Faktor 4 bzw. 17 erhöhte Anfangsflüsse im Vergleich zur RC- bzw. CN-Membran. Im Vergleich zu den Filtrationen durch die RC- bzw. CN-Membran nehmen die Flussraten schneller ab, bei einer Porengröße von 1 μm noch wesentlich deutlicher als bei 0,4 μm . Dies spiegelt sich auch in den $V_{1/2}$ -Werten wider, welche lediglich 2,2 ml/cm² bei einer Porengröße von 1 μm bzw. 4,5 ml/cm² bei einer Porengröße von 0,4 μm betragen.

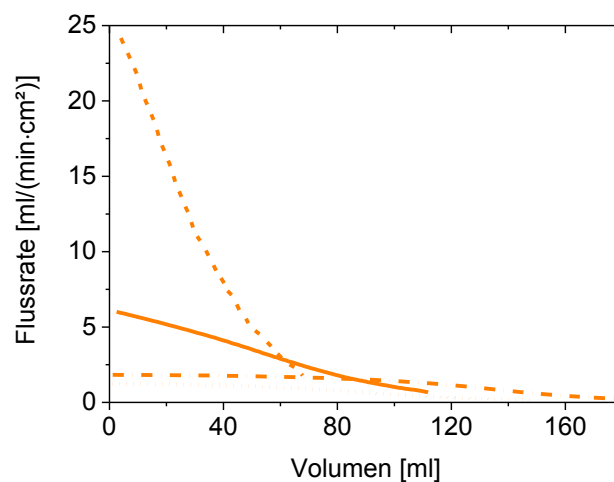


Abbildung 55: Filtrationsverläufe einer Proteinlösung mit 100 mg/ml α -Amylase aufgetragen über dem Filtratvolumen. Die Filtrationen wurden mit einer Track-Etch-Membran mit einer Porengröße von 0,4 (durchgezogen) bzw. 1 μm (gestrichelt) sowie der RC- (gepunktet) und CN-Membran (gepunktet-gestrichelt) bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar durchgeführt.

Ausgehend von den bereits beschriebenen Ergebnissen kann der Unterschied in den Filtrationsverläufen wie folgt beschrieben werden. Im Gegensatz zu Sterilfiltermembranen, welche sich durch eine Schwammartige Struktur mit hoher Porosität auszeichnen, enthalten Track-Etch-Membranen herstellungsbedingt zylindrische Poren bei deutlich niedriger Porosität und spezifischer Oberfläche. Dies hat zur Folge, dass die Fließgeschwindigkeiten in den Poren und somit auch die Scherraten deutlich höher sind. Gleichzeitig steht eine deutlich geringere spezifische Oberfläche zur Verfügung. Das bedeutet, dass die Ablagerungen von Proteinmolekülen, welche im Verlauf der Filtration erfolgt, schneller zur vollständigen Verblockung führt.

Die REM-Aufnahmen der Track-Etch-Membran nach der Filtration mit der α -Amylase-Lösung zeigen, ähnlich wie bereits die Filtrationsverläufe, ein anderes Bild als für die Sterilfilter beobachtet worden ist. Hier ist eine dicke Deckschicht aus Protein auf der Membranoberfläche zu sehen. Auf der Filtratseite lässt sich direkt kein Protein erkennen, bei vielen Poren ist aber zu sehen, dass sie nicht mehr frei sind. Dies bestätigt die Annahme, dass die Verblockung auf Grund der niedrigen Porosität primär an der Membranoberfläche stattfindet.

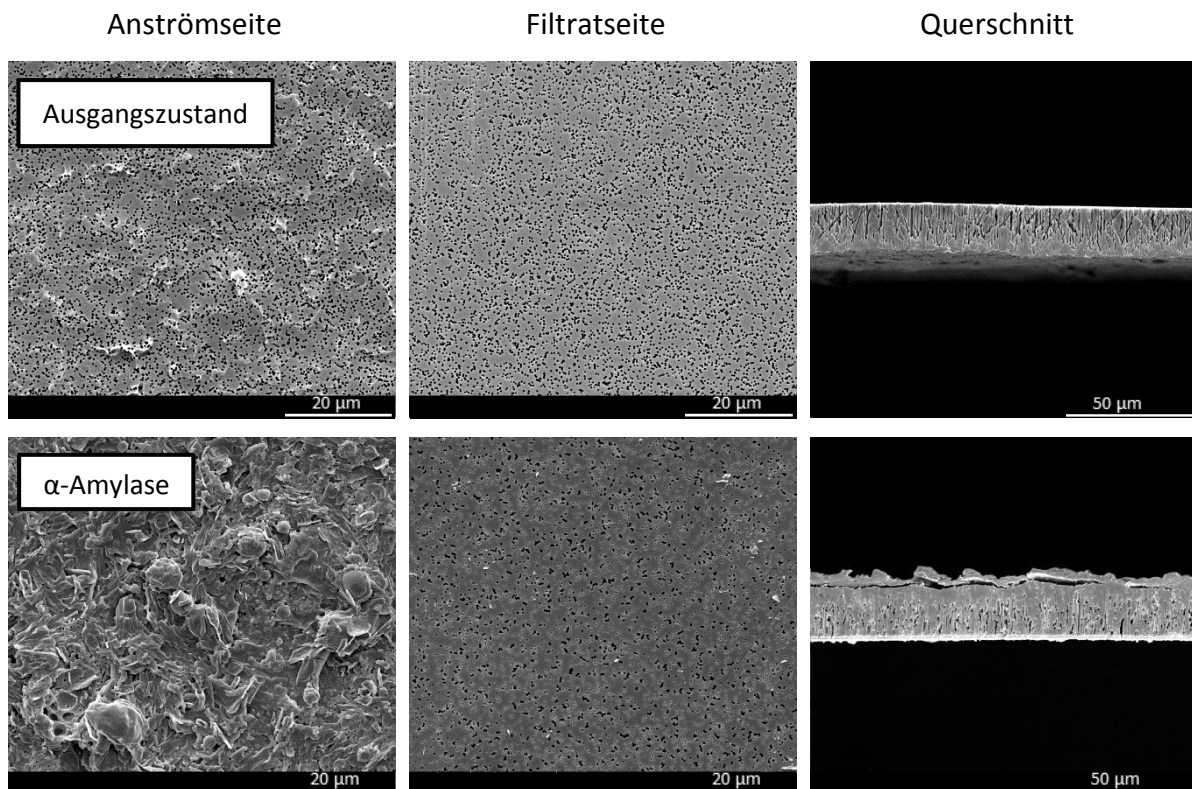


Abbildung 56: REM-Aufnahmen von einer 0,4 μm Track-Etch-Membran vor (oben) und nach (unten) der Filtration einer Proteinlösung mit 100 mg/ml α -Amylase bei einem Differenzdruck von 0,1 bar. Die Vergrößerung der Anströmseite (links) und der Filtratseite (mitte) beträgt 4000x, die des Querschnittes (rechts) 2000x.

4.3.7. Einfluss der Prozessführung und Prozessparameter auf den Filtrationsverlauf

Filtration bei konstantem Differenzdruck

Der Einfluss von mechanischem Stress auf die Konformationsstabilität der Proteine ist bereits in Kapitel 4.2.3 betrachtet worden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Sensibilität gegenüber Scherung für jedes Protein spezifisch ist. Mit zunehmendem Differenzdruck steigt bei der Filtration die Flussraten und damit auch die Scherraten in den Membranporen, was sich auch in den Filtrationsverläufen widerspiegeln sollte.

Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die Flussraten bzw. die Entwicklung des Filtrationswiderstandes über dem Filtratvolumen für die drei hochkonzentrierten Modellproteinlösungen bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1, 1 bzw. 2 bar filtriert mit der RC-Membran. Bei allen Proteinlösungen ist zunächst erwartungsgemäß ein erhöhter Anfangsfluss mit steigendem Differenzdruck zu sehen. Für die Filtration der BSA-Lösung steigen die Werte von 0,3 bis auf 3,4 ml/(min·cm²) und bei der α -Amylase-Lösung von 1,2 bis auf 19 ml/(min·cm²). Die Filtration der γ -Globulin-Lösung weist allerdings auf Grund der bereits erwähnten schnellen Verblockung nur geringe Unterschiede auf. Im Fall der BSA-Lösung führt die Filtration bei höherem Differenzdruck zu einer deutlichen Verbesserung der Filtrationsleistung. Der Kurvenverlauf fällt deutlich langsamer ab, der Widerstand nimmt deutlich langsamer zu und der $V_{1/2}$ -Wert steigt von 1,8 auf 5,5 ml/cm² an. Dagegen wird bei Filtration der α -Amylase-Lösung mit zunehmendem Differenzdruck eine Abnahme der Filtrationsleistung festgestellt, verbunden mit einem deutlich schnelleren Anstieg des Widerstandes und einer Abnahme des $V_{1/2}$ -Wertes von 8,5 auf 5,5 ml/cm².

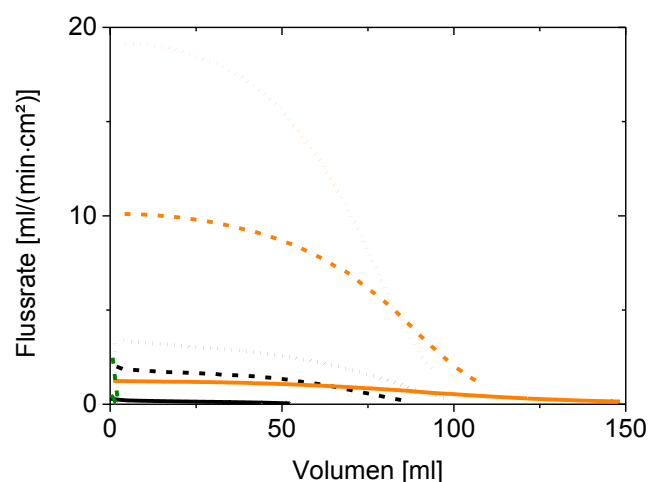


Abbildung 57: Filtrationsverläufe der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 (durchgezogen), 1 (gestrichelt) bzw. 2 bar (gepunktet) durchgeführt.

In Abbildung 57 wird deutlich, dass im Fall der Filtration der α -Amylase-Lösung, bedingt durch die niedrigere Viskosität, bei gleichem Druck deutlich höhere Flussraten erzielt werden. Entsprechend resultieren deutlichen höhere anfänglichen Scherraten von $6 \cdot 10^3$ bis $9 \cdot 10^4$ /s für den untersuchten Druckbereich von 0,1 bis 2 bar im Vergleich zur Filtration der BSA-Lösung mit Scherraten zwischen $2 \cdot 10^3$ bis $1,5 \cdot 10^4$ /s.

Bei der Filtration der Modellproteinlösungen mittel CN-Membranen ist übereinstimmend der gleiche Einfluss des Differenzdrucks auf das Verblockungsverhalten zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt).

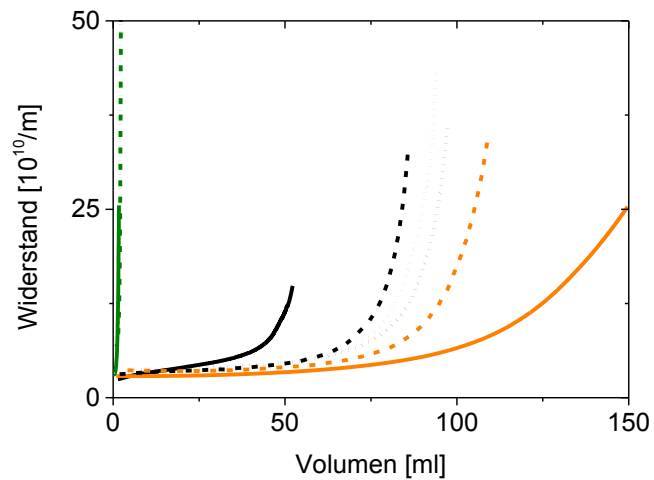


Abbildung 58: Verlauf der Filtrationswiderstände der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) einer RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 (durchgezogen), 1 (gestrichelt) bzw. 2 bar (gepunktet).

REM-Aufnahmen der Filteroberflächen nach Filtration der BSA-Lösung sind in Abbildung 59 und Abbildung 60 dargestellt. Sie zeigen eine Zunahme von Proteinablagerungen bei der Filtration mit höheren Differenzdrücken. Auf der Anströmseite ist eine dickere Deckschicht sichtbar. Die Dicke dieser Schicht beträgt bei der Filtration mit 2 bar in etwa 12 μm . Die sichtbaren Risse in der Deckschicht sind durch den Trocknungsprozess während der Probenvorbereitung entstanden. Sie lassen sich ebenfalls im Querschnitt erkennen. Auch auf der Filtratseite der Membran ist eine vermehrte Proteinablagerung zu erkennen.

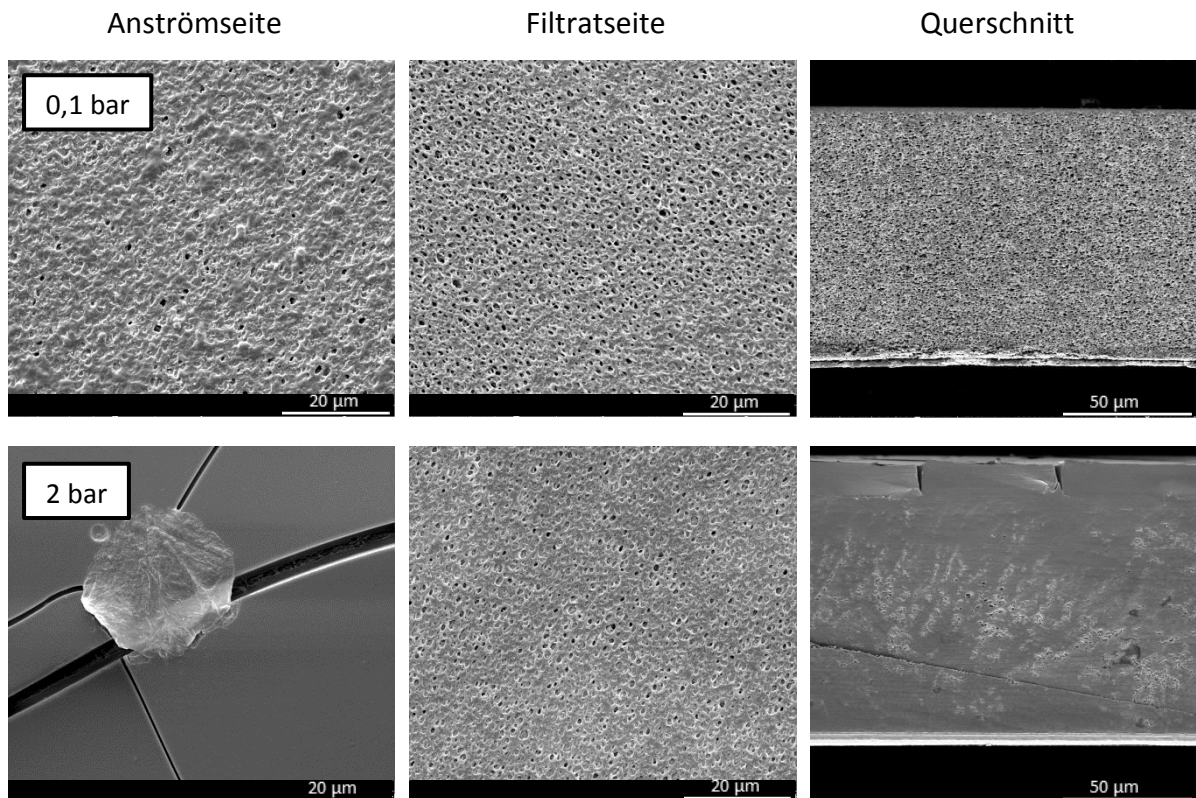


Abbildung 59: REM-Aufnahmen von RC-Membranen nach der Filtration einer Proteinlösung mit 250 mg/ml BSA bei einem Differenzdruck von 0,1 bar (oben) bzw. 2 bar (unten). Die Vergrößerung der Anströmseite (links) und der Filtratseite (mitte) beträgt 4000x, die des Querschnittes (rechts) 2000x.

Eine Detailansicht des Querschnittes zeigt darüber hinaus, dass über die gesamte Höhe der Membran Proteinlösung in den Poren wiederzufinden ist. Dabei ist die Membranstruktur in Weiß zu sehen und die Proteinlösung in Grau darum herum.

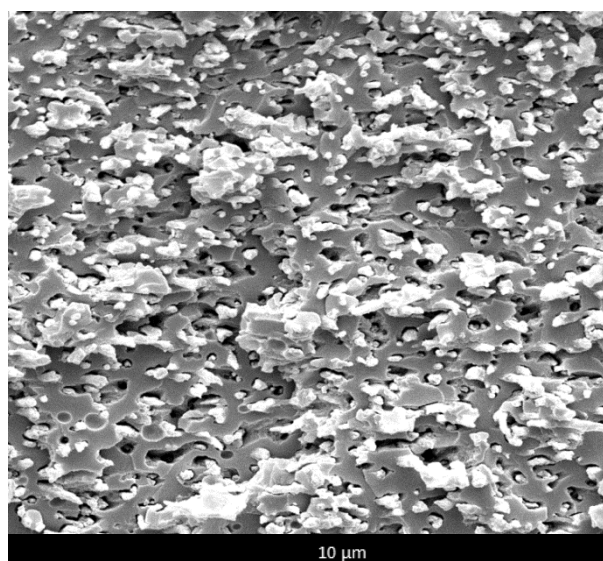


Abbildung 60: REM-Aufnahme einer RC-Membran nach der Filtration einer Proteinlösung mit 250 mg/ml BSA bei einem Differenzdruck von 2 bar. Die Vergrößerung des Querschnittes beträgt 16000x.

Wie in Abbildung 57 und Abbildung 58 zu sehen, sind alle Filtrationen bis zur vollständigen Verblockung geführt worden. Dies bedeutet, bei Filtrationen der BSA-Lösung mit einem Differenzdruck von 0,1 bar wird die Verblockung zu einem hohen Grad durch Proteinaggregation und Porenverblockung bestimmt.

Hinsichtlich der Auslegung von Prozessfiltrationsschritten bedeuten diese Ergebnisse, dass bei der Filtration von Proteinlösungen zur Vermeidung von Verblockungsprozessen einerseits auf eine ausreichend hohe Flussrate zu achten ist. Das ist insbesondere bei der Filtration von Proteinlösungen mit hoher Viskosität wichtig. Weiterhin sollte die Flussrate so eingestellt werden, dass Scherraten von über 10^4 /s vermieden werden. Beide Maßnahmen sorgen für eine höhere Konformationsstabilität der Proteinmoleküle bei Wechselwirkungen mit anderen Proteinmolekülen, der Membrangrenzfläche sowie bei Einwirkung von Scherstress und führt somit insgesamt zu einer höheren Filtrationsleistung

Filtration bei konstanter Flussrate

Alternativ zur Prozessführung bei konstantem Differenzdruck kann eine Filtration auch mit dem Anlegen einer konstanten Flussrate durchgeführt werden. Therapeutische Proteine werden im Herstellungsprozess häufig bei konstanter Flussrate filtriert, zum Beispiel bei der finalen Abfüllung. Zur Beurteilung der Filtrationsleistungen bei konstantem Fluss sind die drei hochkonzentrierten Modell-Proteinlösungen mit der RC-Membran bei konstanten Flussraten im Bereich von 0,1 bis 2 ml/(min·cm²) filtriert worden, was den Flussraten in applikationsrelevanten Prozessen entspricht. Entgegen den Verläufen der Flussrate bei konstantem Druck wird bei der Filtration mit konstanter Flussrate die Veränderung des Differenzdrucks im Verlauf der Filtration aufgezeichnet und dargestellt (Abbildung 61). Dieser verhält sich direkt proportional zum Widerstand.

Bei der γ -Globulin-Lösung ist in Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Ergebnissen ein sofortiger Anstieg des Drucks zu verzeichnen, gleichbedeutend mit einer schnellen Verblockung. Größere Aggregate in der Proteinlösung (Kapitel 4.2.1) lagern sich bereits zu Beginn der Filtration in den Membranporen an und sorgen für einen raschen Anstieg des Widerstandes und somit auch des Differenzdrucks. Signifikante Unterschiede zwischen den Flussraten können auf Grund der niedrigen Filtratvolumina nicht verzeichnet werden. Die erzielten $V_{1/2}$ -Werte liegen dabei im Bereich von 0,1 bis 0,2 ml/cm² (Tabelle 14).

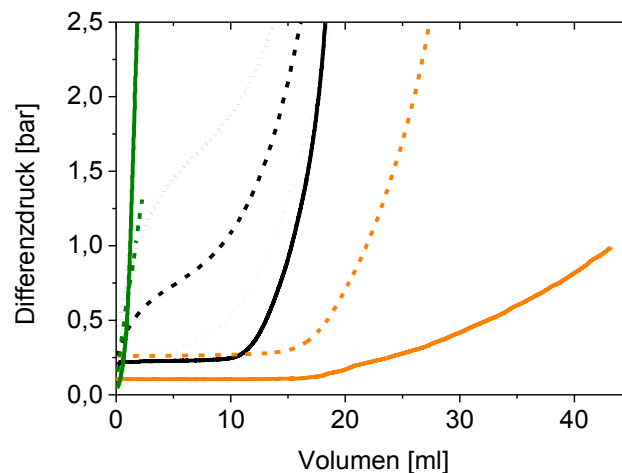


Abbildung 61: Druckverläufe der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (grün) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Fluss von 0,1 (durchgezogen), 1 (gestrichelt) bzw. 2 ml/(min·cm²) (gepunktet).

Die Druckverläufe der Filtrationen mit der BSA- bzw. α -Amylase-Lösungen hingegen weisen eine deutliche Abhängigkeit des Verblockungsverhaltens von der Flussrate auf. Allgemein ist eine schnellere Druckzunahme bei höheren Flussraten zu erkennen, was auf die größere mechanische Belastung der Proteinmoleküle bei erhöhten Scherraten zurückzuführen ist. Dieses Verhalten findet sich auch in der Literatur für Filtrationen mit 2 mg/ml BSA wieder (Ho und Zydney, 2002). Bei der Filtration der α -Amylase-Lösung ist der Differenzdruck zu Beginn konstant und steigt erst nach Filtration eines entsprechenden Volumens an, wobei die Verblockung mit steigender Flussrate früher einsetzt und eine geringere Kapazität erreicht wird.

Tabelle 14: $V_{1/2}$ -Werte der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA, 100 mg/ml α -Amylase bzw. 100 mg/ml γ -Globulin durch eine RC-Membran bei konstanter Flussrate.

Flussrate [ml/(min·cm ²)]	$V_{1/2}$ [ml/cm ²]		
	BSA	α -Amylase	γ -Globulin
0,1	4,9	8,3	0,1
1	3,9	6,9	0,1
2	1,8	6	0,2

Bei der Filtration der BSA-Lösung wird bei einer niedrigen Flussrate von 0,1 ml/(min·cm²) ein ähnlicher Verlauf beobachten. Bei 1 bzw. 2 ml/(min·cm²) erfolgt eine spontane Verblockung durch einen sofortigen Anstieg des Differenzdrucks mit Beginn der Filtration. Der Einfluss von Proteinaggregaten auf das Verblockungsverhaltens ist offensichtlich abhängig von der Flussrate und bei hohen Flussraten dominanter.

Insgesamt führt eine niedrige konstante Flussrate zu einer langsameren Verblockung und dadurch auch zu besseren Filtrationsleistungen.

Bei Filtrationen mit konstanter Flussrate ist zusätzlich zum Filter auch der Einfluss der eingesetzten Pumpe zu betrachten. Scherung tritt auch bei Pumpen auf und kann somit die Proteinkonformation beeinflussen. Je nach Art der Pumpe und eingestellter Flussrate fallen die Scherraten unterschiedlich hoch aus. Schlauchpumpen zum Beispiel sind bekannt für hohe Scherung. Speziell bei großen Flussraten kann es zu Rückflüssen kommen bei denen sehr hohe Scherraten auftreten. Bei der hier verwendeten Spritzenpumpe betragen die auftretenden Scherraten nicht mehr als $1,1 \cdot 10^4$ /s. Die mechanische Belastung ist somit wesentlich niedriger als in den Membranporen.

Einfluss der Prozessführung

Ein direkter Vergleich der Filtrationsverläufe mit konstantem Druck bzw. konstanter Flussrate als Triebkraft ist notwendig, um zu beurteilen, welche Prozessführung bei der Sterilfiltration von therapeutischen Proteinen zu bevorzugen ist. Dazu sind in Abbildung 62 zunächst die Zusammenhänge zwischen Anfangsdruck, Anfangsfluss und anfänglicher Scherrate basierend auf experimentell durchgeführten Filtrationsversuchen dargestellt. Dabei steigt die Flussrate erwartungsgemäß mit zunehmendem Differenzdruck bzw. umgekehrt der Druck mit steigender Flussrate. Entsprechend dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gleichung 11) verhalten sich der Differenzdruck und die Flussrate direkt proportional zueinander. Der Anstieg ist dabei abhängig von der Viskosität der jeweiligen Proteinlösung. Weitere Abweichungen sind mit dem unterschiedlichen Anlagenaufbau für Filtrationen mit konstantem Druck bzw. Fluss erklärbar (Kapitel 3.4.1). Die resultierende Scherrate ist nach Gleichung 22 abhängig von den anliegenden Flussraten. Die Flussrate hat somit über die Scherrate einen direkten Einfluss auf die Konformationsstabilität der einzelnen Proteine und somit auch auf die Filtrationsleistung.

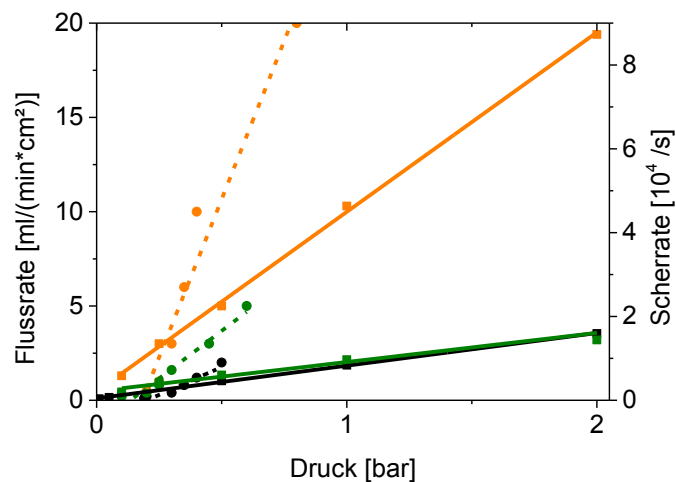


Abbildung 62: Abhängigkeit zwischen Differenzdruck, Flussrate und Scherrate zu Beginn der Filtrationen von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (schwarz), 100 mg/ml α -Amylase (orange) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin durch eine RC-Membran bei konstantem Druck (Quadrat) oder konstantem Fluss (Kreis).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Prozessführungen der Filtrationsversuche auf das Verblockungsverhalten kann über die Darstellung der Entwicklung des Widerstandes im Verlauf der Filtration erfolgen (Abbildung 63).

Das Verblockungsverhalten der γ -Globulin-Lösung wird von der Porenverblockung durch Proteinaggregate dominiert, wodurch sich kein signifikanter Einfluss der Scherrate erkennen lässt. Es wird allerdings deutlich, dass die Anwendung einer konstanten Flussrate vorteilhaft für die Filtration dieser Proteinlösung ist.

Das Verblockungsverhalten der α -Amylase-Lösung ist deutlich Scherratenabhängig. Die Widerstände steigen mit zunehmendem Druck bzw. Fluss stärker an, was auf die höheren Scherraten zurückzuführen ist. Das Verblockungsverhalten bei der Filtration mit einer konstanten Flussrate von 2 ml/min·cm² weicht von den anderen Ergebnissen ab. Bedingt durch graduelle Porenverblockung auf Grund von Proteinaggregaten steigt der Widerstand mit Beginn der Filtration stetig an und erreicht bereits nach einem vergleichsweise geringen Filtratvolumens von 50 ml einen relativ hohen Wert von $10 \cdot 10^{10}$ /m.

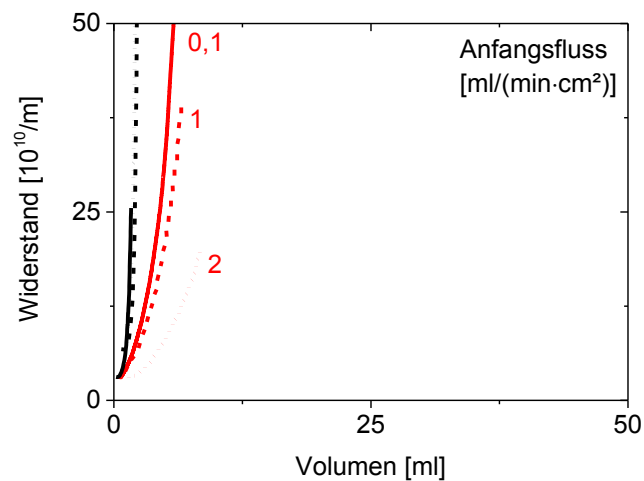
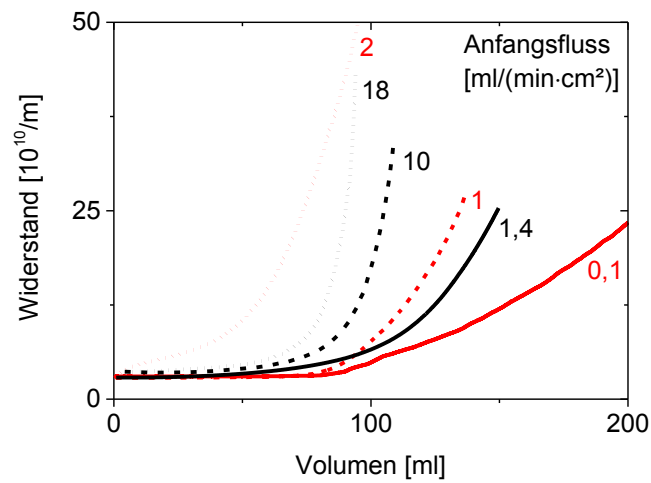
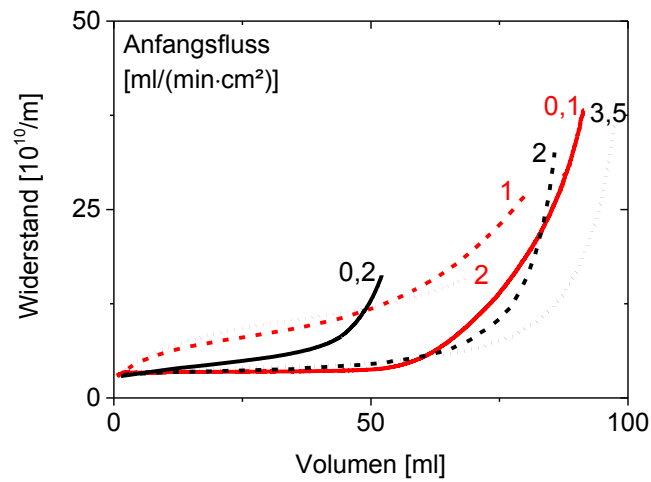


Abbildung 63: Filtrationswiderstände der Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) mit konstantem Druck (schwarz) bzw. konstantem Fluss (rot) durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 (durchgezogen), 1 (gestrichelt) und 2 bar (gepunktet) bzw. einem konstantem Fluss von 0,1 (durchgezogen), 1 (gestrichelt) und 2 ml/(min·cm²) (gepunktet) durchgeführt.

Bei der Filtration der BSA-Lösung zeigt sich ein komplexes Verhalten. Wird mit einer konstanten Flussrate von 1 bzw. 2 ml/(min·cm²) filtriert, wird das Verblockungsverhalten entscheidend geprägt von gradueller Porenverblockung verursacht durch Aggregate. Wird dagegen bei konstantem Differenzdruck filtriert, so nimmt die Filtrationsleistung mit steigendem Differenzdruck und steigender anfänglicher Flussrate zu. Dabei wird das Verblockungsverhalten nur bei niedrigem Differenzdruck durch Proteinaggregate geprägt. Bei hohen Differenzdrücken bzw. hohen anfänglichen Flussraten zeigen die Widerstandskurven maßgeblich Verblockung in Folge von Proteinablagerungen auf der Membranoberfläche.

In Abbildung 64 sind die Kapazitäten aller durchgeführten Filtrationen mit konstantem Differenzdruck und konstanter Flussrate in Abhängigkeit der anfänglichen Scherrate dargestellt. Die Scherraten sind hierzu mit Hilfe der experimentell bestimmten Flussraten und Gleichung 22 für unterschiedliche Prozessparameter und Membrantypen berechnet worden. Die in Verbindung mit Abbildung 63 diskutierten Zusammenhänge werden deutlich.

Im Fall der Filtration der α -Amylase-Lösung ist die Scherratenabhängigkeit für beide Prozessführungen deutlich erkennbar. Die Proteinlösung hat im Vergleich zu den anderen Modellproteinlösungen mit 1,7 cP die niedrigste Viskosität. Entsprechend werden bei gleichen Prozessbedingungen höhere anfängliche Flussraten realisiert. Die Filtration bei konstantem Differenzdruck ist im Fall der α -Amylase-Lösung gegenüber der Filtration bei konstanter Flussrate zu bevorzugen. Während die erzielten Kapazitätswerte bei niedriger Fluss- bzw. Scherrate gut übereinstimmen, sinken die Kapazitäten bei der Filtration mit konstanter Flussrate überdurchschnittlich stark ab, was mit der Zunahme gradueller Porenverblockung erklärt werden kann.

Die kritische Scherrate in den Membranporen, ab der sich die Proteinmoleküle während der Filtration entfalten, beträgt für α -Amylase etwa 10^4 /s. Dies entspricht einem Differenzdruck von 0,25 bar bzw. einer Flussrate von 2 ml/(min·cm²). Die Größenordnung kritischer Scherraten anderer Proteine entspricht dem hier gefundenen Wert. Während für den von Willebrand Faktor eine Scherrate von $5 \cdot 10^3$ /s ausreicht, um eine spontane Entfaltung zu initiieren (Schneider *et al.*, 2007), liegen die Werte für Katalase bei 10^4 /s (Charm und Wong, 1970) und für Urease bei 10^5 /s (Tirrell und Middleman, 1975).

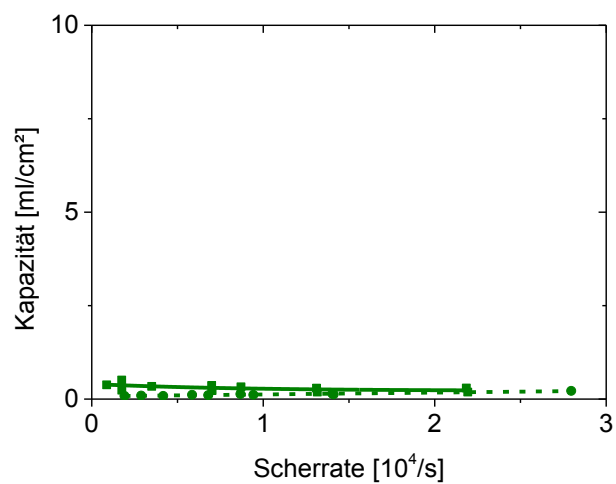
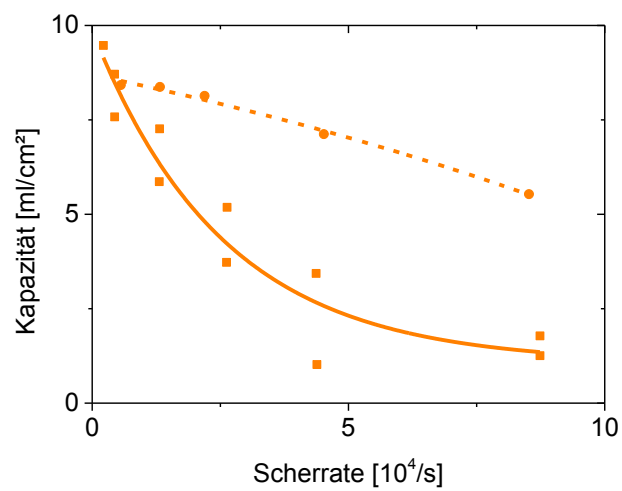
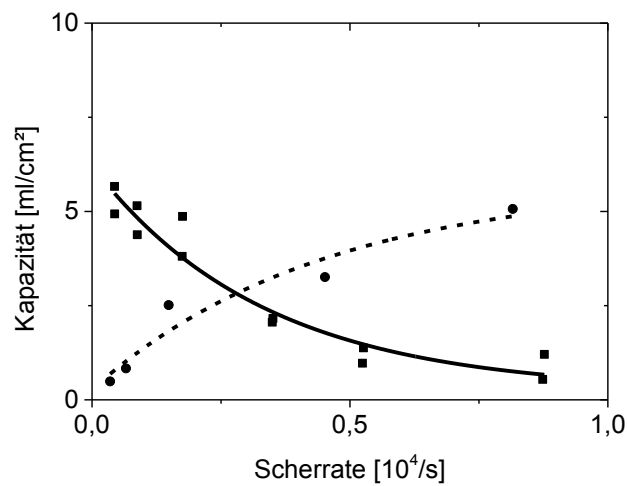


Abbildung 64: $V_{1/2}$ -Werte in Abhängigkeit von der anfänglichen Scherrate für die Filtration von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) bei konst. Druck (gestrichelt) bzw. konst. Flussrate (durchgezogen).

Für die BSA-Lösung ergeben sich in Abhängigkeit von der Prozessführung unterschiedliche Ergebnisse. Dabei ist zu beachten, dass die BSA-Lösung unter den untersuchten Modellproteinlösungen mit 10 cP

die höchste Viskosität besitzt. Daher werden bei den verwendeten Prozessbedingungen geringere anfängliche Flussraten erreicht und die Scherbelastung ist deutlich geringer als im Fall der α -Amylase-Lösung.

Während der $V_{1/2}$ -Wert bei der Filtration mit konstantem Differenzdruck mit zunehmender Scherrate zunächst ansteigt und ab ca. $2 \cdot 10^4$ /s mit einem maximalen Wert von $6,5 \text{ ml/cm}^2$ abflacht, ist bei konstanter Flussrate eine exponentielle Abnahme zu verzeichnen. Dies ist bei einem schersensitiven Verhalten zu erwarten. Die Sättigung der Kurve bei der Filtration mit konstantem Differenzdruck deutet darauf hin, dass es bereits zu einer Entfaltung einzelner Proteinmoleküle gekommen ist. Es ist demnach zu erwarten, dass eine weitere Erhöhung der Scherrate auch bei der Filtration mit konstantem Differenzdruck zu einer vermehrten Proteinentfaltung und somit auch einer verminderten Kapazität führt. Weiterhin fällt auf, dass beide Kurvenverläufe ein unterschiedliches Anfangsverhalten aufweisen. Bei der Filtration mit konstanter Flussrate resultieren bei niedriger Flussrate von $0,1 \text{ ml}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$ vergleichbare Kapazitäten, wie bei der Filtration mit konstantem Druck aber bei wesentlich höheren Scherraten.

Für die γ -Globulin-Lösung kann eine Abhängigkeit der Kapazität von der Scherrate nicht detektiert werden. Aus Abbildung 63 geht aber hervor, dass die Filtration bei konstanter Flussrate hier von Vorteil ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Prozessführung bei der Proteinfiltration großen Einfluss auf das Verblockungsverhalten hat. Wichtige Parameter sind aber auch die Viskosität der Proteinlösung, die Proteinkonzentration und der Aggregationsgrad sowie die Gestalt der Proteine. Eine Proteinlösung mit hoher Viskosität wird bei vergleichbaren Prozessbedingungen mit niedriger Flussrate filtriert und mit entsprechend geringerer Scherbelastung. Proteine mit irregulärer Molekülgestalt wie γ -Globulin neigen verstärkt zur Proteinaggregation.

Eine Verminderung der Kapazitäten bei erhöhten Scherraten lässt sich auf die limitierte Konformationsstabilität der Proteinmoleküle zurückführen. Scherraten oberhalb von 10^4 /s sind für alle Proteine kritisch. Wenn sich die Proteinmoleküle durch große Scherung entfalten, kommt es zu der Freilegung hydrophober Regionen. Diese sind in einem korrekt gefalteten Protein ins Molekülinnere orientiert, wo sie durch hydrophobe Interaktionen zur Stabilität der Faltung beitragen. Nach außen orientiert, können hydrophobe Regionen allerdings zu einer stärkeren Anlagerung an vorhandene Oberflächen sowie zu hydrophoben Interaktionen zwischen Proteinmolekülen führen. Das wiederum resultiert in einer Entstehung von Aggregaten, welche ein verstärktes Verblockungsverhalten während der Filtration und niedrige Kapazitäten hervorrufen.

Graduelle Porenverblockung durch Proteinaggregate wird bei der Filtration mit konstantem Differenzdruck insbesondere bei anfänglichen niedrigen Flussraten bei BSA gesehen und ist bei der Filtration bei konstanter Flussrate bei höheren Flussraten für α -Amylase besonders deutlich.

Ist ein konstanter Differenzdruck angelegt, so verringert sich auf Grund von Verblockung im Laufe der Filtration der Porenquerschnitt. Die Flussrate sinkt, aber nur mit höherer Scherrate bedingt durch den abnehmenden Porenquerschnitt (Gleichung 18). Gleichzeitig führt die Verengung des Porenquerschnittes zu einer höheren Rückhaltung von Proteinaggregaten.

Bei der Filtration mit konstanter Flussrate führt Verblockung ebenfalls zu einer Verengung des Porenquerschnitts verbunden mit einer höheren Rückhaltung von gegebenenfalls vorhandenen Proteinaggregaten aber mit einer deutlichen Zunahme der Scherrate.

Entsprechend wird die Proteinkonformation bei der Filtration mit konstanter Flussrate eventuell stärker belastet als bei Filtration mit konstantem Differenzdruck. Überraschender Weise führte gerade die Filtration bei konstanter Flussrate bei der γ -Globulin-Lösung zu einer höheren Kapazität, obwohl dieses Protein bekanntermaßen sehr scherempfindlich ist und die Lösung einen deutlich höheren Aggregationsgrad aufweist.

Insgesamt lassen sich mit beiden Prozessführungen gute Filtrationsleistungen erzielen. Filtrationen mit konstantem Fluss haben allerdings im Bereich von niedrigen Flussraten mehr Potential für höhere Kapazitäten.

Es zeigt sich, dass die Empfindlichkeit von Proteinen gegenüber Scherung durchaus einen großen Einfluss auf die Leistung des Filters hat. Je nach Art des Proteins ist das Maß der Empfindlichkeit allerdings unterschiedlich und die kritische Scherrate muss individuell bestimmt werden. Für eine verbesserte Filtrationsleistung müssen die Prozessparameter dementsprechend angepasst werden, um unterhalb der kritischen Scherrate zu operieren.

Einen zusätzlichen Einfluss hat auch die Viskosität der Proteinlösung. Hohe Werte resultieren bei vergleichbaren Prozessbedingungen in niedrigeren Fluss- und Scherraten. Die Scherbelastung hochviskoser Lösungen während einer Filtration ist dementsprechend limitiert.

Ausgehend von den Ergebnissen der Filtration der BSA-Lösung bei konstantem Differenzdruck sind niedrige anfängliche Flussraten zu vermeiden, um die Verweilzeit der Proteinlösung an der Filteroberfläche zu minimieren.

4.3.8. Analyse des Filtrats

Proteinausbeute

Die Filtration von biopharmazeutischen Proteinen ist stark Ausbeutegetrieben. Abbildung 65 zeigt exemplarisch die HPLC-Chromatogramme der Filtrate der in Kapitel 4.3.2 vorgestellten Modellproteinlösungen, welche mit einer RC-Membran bei einem Differenzdruck von 0,1 bar filtriert worden, im direkten Vergleich zur Ausgangslösung. Dabei ist die Gesamtmasse an Protein im Filtrat der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung unverändert im Vergleich zum Ausgangszustand. Lediglich im Fall der γ -Globulin-Lösung ist die Konzentration im Filtrat mit einer Wiederfindungsrate von 93 % etwas geringer.

Vergleichbare Ergebnisse werden auch bei der Filtration durch eine CN-Membran erzielt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der Filtration der α -Amylase-Lösung durch die RC-Membran bei einem Differenzdruck von 0,1 bar ist die Proteinkonzentration im Filtrat über den Verlauf der Filtration gemessen (Abbildung 66) worden. Es ist erkennbar, dass lediglich innerhalb der Filtration der ersten Milliliter Verluste bei der Proteinkonzentration im Filtrat auftreten. Im weiteren Verlauf pendelt sich die Proteinkonzentration auf den Wert der Ausgangslösung ein.

Die auftretenden minimalen Verluste sind allerdings nicht alleine auf die Membran zurückzuführen. Alle in der Prozessapparatur vorhandenen Oberflächen sind potentielle Oberflächen für die Ablagerung von Proteinen. Speziell bei Proteinlösungen mit limitierter Kolloidstabilität, wie es bei hohen Konzentrationen der Fall ist, neigen die Proteinmoleküle dazu sich an Ober- bzw. Grenzflächen anzulagern. Sobald die vorhandenen Oberflächen mit einer ersten Proteinschicht bedeckt sind, findet keine signifikante Veränderung der Proteinkonzentration mehr statt.

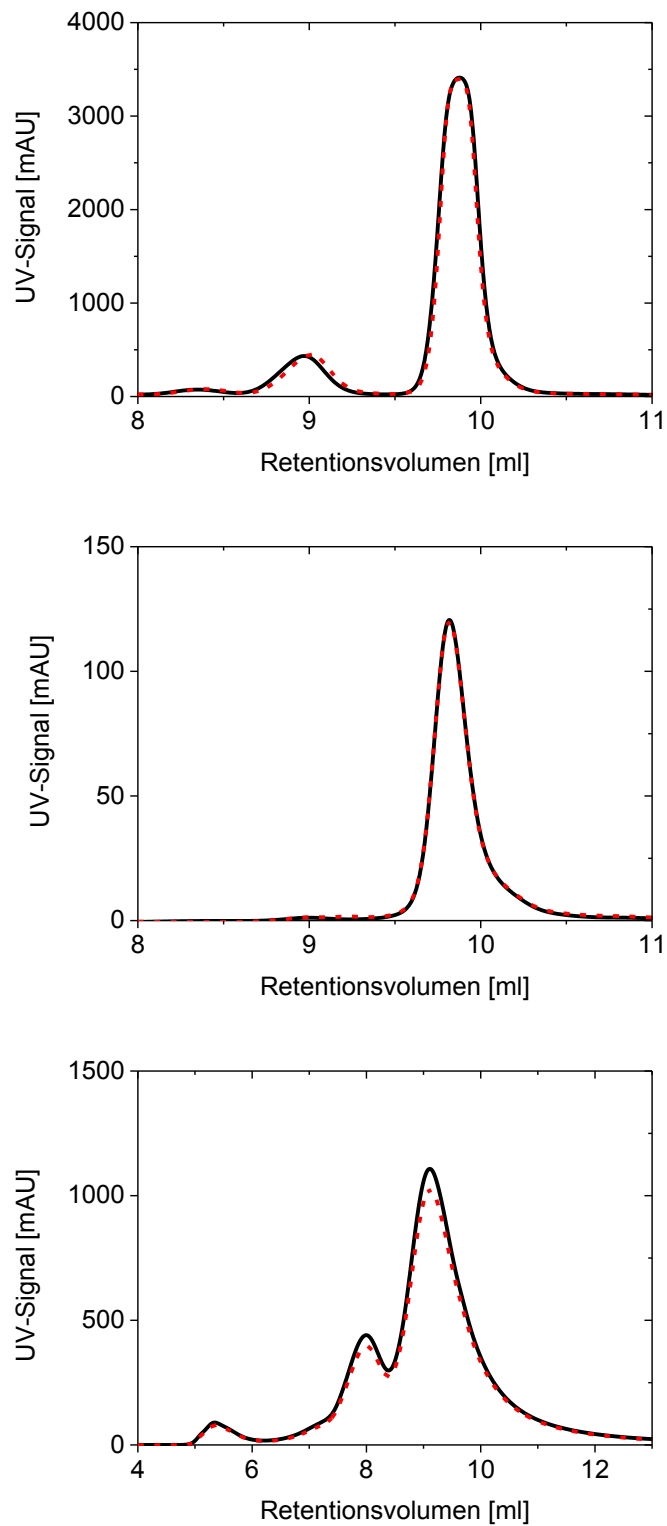


Abbildung 65: HPLC-Chromatogramme von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) vor (durchgezogen) bzw. nach der Filtration mit der RC-Membran bei einem Differenzdruck von 0,1 bar (gestrichelt).

Die Abweichung in der Proteinkonzentration bei der Filtration der γ -Globulin-Lösung lässt sich im Wesentlichen auf das geringe Filtratvolumen zurückführen. Während das Filtratvolumen mit über

100 ml bei der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung zu einem nachträglichen Verdünnungseffekt führt, beträgt es bei der γ -Globulin-Lösung lediglich wenige Milliliter. Der prozentuale Anteil an Proteinverlust wird somit ungemein deutlicher. Ein direkter Vergleich zu den Filtraten der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung ist hier nur schwer möglich.

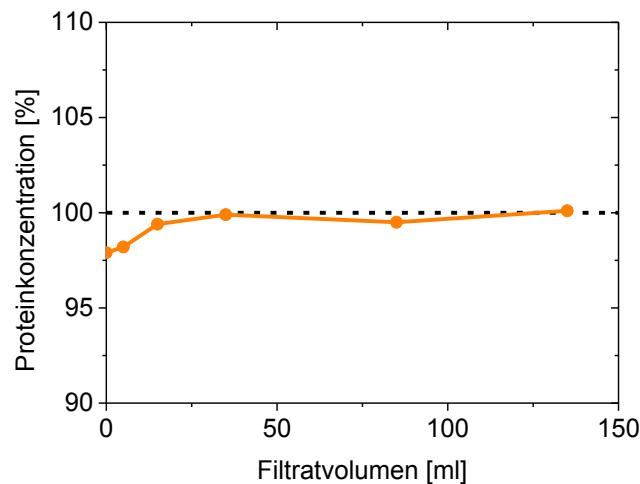


Abbildung 66: Prozentuale Proteinkonzentration bezogen auf die Konzentration der unfiltrierten Ausgangslösung von einer 100 mg/ml α -Amylase-Lösung nach der Filtration durch eine RC-Membran bei einem konstanten Differenzdruck von 0,1 bar.

Kolloidstabilität des Filtrats

In Kapitel 4.2.2 ist bereits die Kolloidstabilität der Proteinlösungen im Ausgangszustand beschrieben worden. Dabei konnten auf Grund limitierter Kolloidstabilität der vorliegenden Lösungen im hohen Konzentrationsbereich hochmolekulare Aggregate mittels HPLC-Analyse bzw. DLS-Messungen detektiert werden. Abbildung 65 zeigt über die reinen Proteinkonzentrationen hinaus auch das Verhältnis der vorliegenden Aggregate im HPLC-Chromatogramm. Unabhängig vom Proteintyp ist dabei vor und nach der Filtration die gleiche Verteilung der niedrigmolekularen Aggregate sichtbar.

Betrachtet man ergänzend auch die DLS-Messungen der entsprechenden Filtrate (Abbildung 67), so ist im Bereich der hochmolekularen Aggregate bei der BSA-Lösung eine Veränderung zum Ausgangszustand zu verzeichnen. Nach der Filtration zeigt sich eine geringere Intensität der Aggregat-Peaks, was darauf hinweist, dass ein Teil der hochmolekularen Aggregate bei der Filtration zurückgehalten wird. Bei der α -Amylase- und γ -Globulin-Lösung hingegen besitzt der Aggregatpeak die gleiche Intensität wie vor der Filtration, er verschiebt sich lediglich minimal. Diese Verschiebung sollte aber nicht überbewertet werden, da sie im Bereich der Messungengenauigkeit der DLS-Messung liegt.

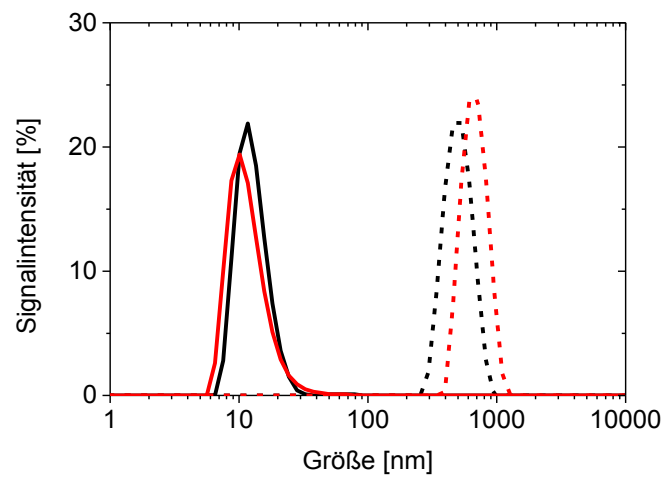
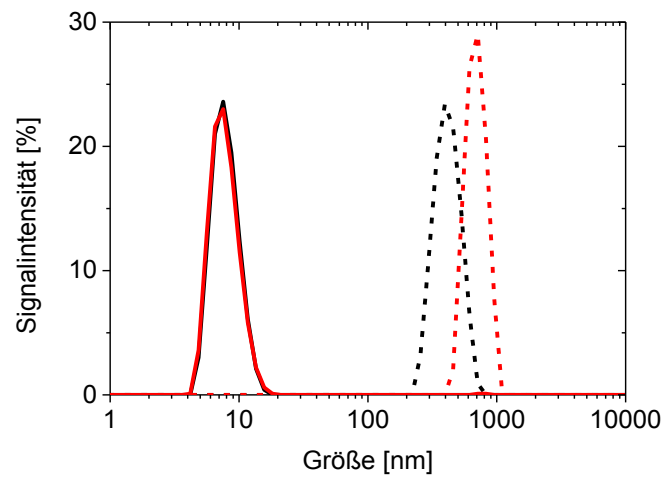
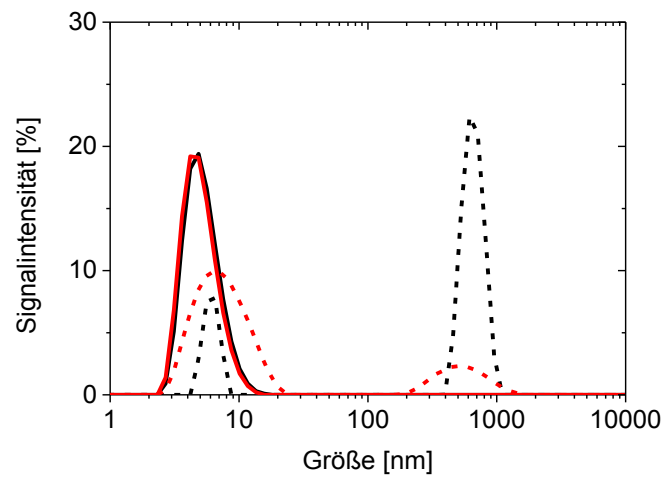


Abbildung 67: DLS-Messungen der Partikelgrößenverteilung von Proteinlösungen mit 250 mg/ml BSA (oben), 100 mg/ml α -Amylase (mitte) bzw. 100 mg/ml γ -Globulin (unten) vor (schwarz) bzw. nach der Filtration durch eine RC-Membran bei einem Differenzdruck von 0,1 bar (rot), berechnet mittels einer Volumverteilung (durchgezogen) bzw. einer Intensitätsverteilung (gestrichelt).

Insbesondere bei der γ -Globulin-Lösung ist dieses Ergebnis zunächst überraschend, da die Filtrationsverläufe eindeutig auf eine Verblockung durch Aggregate hingewiesen haben. Da die Proteinkonzentrationen im Filtrat nahezu identisch mit der Konzentration in der Ausgangslösung sind kommt es wahrscheinlich mit der Zeit zu einer erneuten Ausbildung von Aggregaten.

Konformationsstabilität der Modellproteine im Filtrat

Die Filtration der α -Amylase-Lösung ermöglicht über die bisherigen Analysen hinaus die Bewertung der Enzymaktivität und somit indirekt auch der Konformationsstabilität. Die Enzymaktivität ist abhängig von der korrekten Proteinfaltung und stellt somit ein Maß für die Intaktheit der einzelnen Proteinmoleküle im Filtrat. Abbildung 68 stellt die experimentell ermittelten Enzymaktivitäten der α -Amylase-Lösung nach der Filtration mit sowohl der RC- als auch der CN-Membran bei unterschiedlichen Differenzdrücken bzw. Flussraten dar. Die spezifischen Aktivitäten bewegen sich im Bereich von 1,3 bis 1,9 U/mg, ohne dabei eine Abhängigkeit von der Prozessführung aufzuzeigen. Die mittlere spezifische Aktivität der unfiltrierten Ausgangslösung beträgt 1,6 U/mg. Die Proteine zeigen also nur eine sehr geringe Abweichung vom Ausgangswert. Es bleibt festzustellen, dass sich die Aktivitäten an der unteren Detektionsgrenze bewegen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivität der α -Amylase nicht durch die Filtration beeinflusst wird.

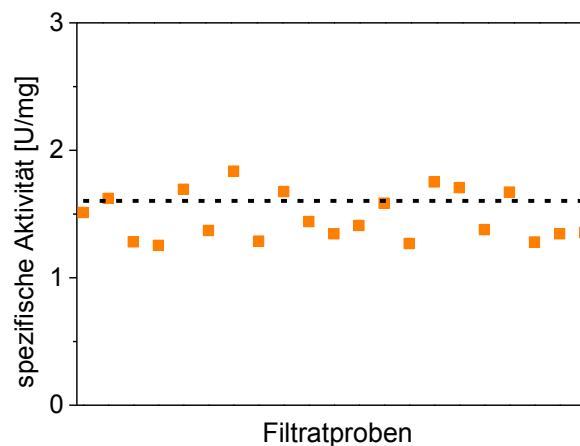


Abbildung 68: Spezifische Enzymaktivität von einer 100 mg/ml α -Amylase-Lösung vor (schwarz) und nach der Filtration (orange) mit der RC- bzw. CN-Membran bei konstanten Differenzdrücken von 0,1 bis 2 bar bzw. konstanten Flussraten von 0,1 bis 2 ml/(min·cm²).

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.2.3 weisen darauf hin, dass bei höheren Scherraten Konformationsänderungen der α -Amylase stattfinden. Die Tatsache, dass sich keinerlei Änderung in der Aktivität nach der Filtration feststellen lässt, zeigt das mögliche um- bzw. entfalten Proteine

größtenteils vom Filter zurückgehalten werden und nicht ins Filtrat gelangen bzw. die Konformationsänderungen reversibel sind.

4.3.9. Fazit zur Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen

Die adsorptiven Eigenschaften gegenüber Proteinen von verschiedenen Sterilfiltermembranen sind am Beispiel von BSA und γ -Globulin mit Hilfe unterschiedlicher Assays untersucht worden. Sterilfiltermembranen auf Basis von RC, CA und PES sind vergleichbar niedrig adsorbierend.

Mit Hilfe der Aufzeichnungen von Durchbruchkurven (dynamischer Assay) konnte gezeigt werden, dass Adsorptionsvorgänge im Rahmen eines Filtrationsprozesses stark abhängig sind von den Prozessbedingungen und insbesondere mit sinkender Flussrate zunehmen. Dagegen ist die Abhängigkeit der Adsorption von der Konzentration der Lösung deutlich geringer ausgeprägt.

Die Adsorption an Membranfiltern wird üblicherweise mit statischen Assays untersucht. Unter diesen Versuchsbedingungen besteht genügend Zeit für die Ausbildung von starken adsorptiven Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Membran. Bei Filtrationsprozessen ist die Kontaktzeit für die Wechselwirkungen bei den üblichen Flussraten ab $100 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ mit einer Verweilzeit von unter 1 s stark limitiert. Entsprechend werden mit Hilfe des dynamischen Assays bei prozessrelevanten Flussraten deutlich geringere Adsorptionswerte gemessen als mit Hilfe des statischen Assays. Das bedeutet, dass Adsorptionsvorgänge bei der Prozessfiltration von Proteinlösungen allgemein überschätzt werden.

Andererseits werden im Ergebnis eines Filtrationsprozesses auf einer Membran bzw. in deren innerer Struktur deutliche Ablagerungen von Proteinen beobachtet. Diese Ablagerungen werden gleichermaßen bei der Filtration von Proteinlösungen durch Membranen mit hoher Adsorptionsneigung, als auch mit niedriger Adsorptionsneigung festgestellt. Diese Ablagerungen sind nicht Ergebnis von Adsorptionsprozessen, sondern Ergebnis der geringen thermodynamischen Stabilität sämtlicher kolloidaler Lösungen, denen auch Proteinlösungen zuzurechnen sind und welche das Verblockungsverhalten hochkonzentrierter Proteinlösungen entscheidend beeinflussen.

Das Verblockungsverhalten von drei Modellproteinlösungen mit Proteinkonzentrationen zwischen 100 und 250 mg/ml ist bei der Filtration durch eine RC-, CN-, und Track-Etch-Membran untersucht worden. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss der Oberflächenchemie der Membran auf das Verblockungsverhalten festgestellt werden. Die Membranstruktur hat über den Porenquerschnitt, die Porosität sowie die spezifische Oberfläche aber einen Einfluss auf das Verblockungsverhalten.

Hauptursache von Verblockungsprozessen bei der Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen sind die eingeschränkte kolloidale Stabilität der Proteinlösung, insbesondere ihre Neigung zur Bildung von Proteinaggregaten und die eingeschränkte Konformationsstabilität von Proteinen hinsichtlich ihrer Scherempfindlichkeit. Wichtigster Verblockungsprozess ist die Bildung von Ablagerungen auf der Membranoberfläche und damit verbunden die Abnahme des Porenquerschnitts. Vollständige Verblockung wird daher für eine gegebene Membran nach Passage einer vergleichbaren Menge Protein durch die Membran erreicht, relativ unabhängig von der Proteinkonzentration in Lösung und der Art des Proteins, sofern nicht andere Verblockungsprozesse hinzukommen.

Im Fall einer γ -Globulin-Lösung ist der Verblockungsprozess durch Porenverblockung infolge von der Rückhaltung von Proteinaggregaten innerhalb kürzester Zeit abgeschlossen und dominiert. In der Regel wird bei der Herstellung der Proteinlösung darauf geachtet, einen möglichst geringen Grad an Proteinaggregation zu erreichen. Aggregation kann aber nicht vollständig vermieden werden. Sie kann zum Beispiel bei Lagerung der Lösung nachträglich eintreten oder als Folge von kritischen Prozessbedingungen bei der Filtration. Entsprechend neigen hochkonzentrierte Proteinlösungen zu gradueller Porenverblockung verbunden mit einem systemspezifischen Anstieg des Widerstandes, je nach Konzentration bzw. Größe der Aggregate. Dies ist insbesondere im Fall der 250 mg/ml BSA-Lösung festgestellt worden.

Der Verblockungsprozess kann durch die Wahl von Prozessparametern zum Beispiel die Filtration bei konstantem Druck bzw. konstanter Flussrate bei unterschiedlicher Flussrate beeinflusst werden. Sie müssen spezifisch auf die jeweilige Proteinlösung abgestimmt werden. Gegebenenfalls ist auch die Verwendung eines Vorfilters sinnvoll. Scherraten oberhalb von 10^4 /s sind für alle Proteine kritisch. Das Verblockungsverhalten der α -Amylase-Lösungen ist deutlich abhängig von der Flussrate und somit auch von der Scherrate. Scherraten oberhalb von 10^4 /s werden allerdings für Proteinlösungen mit einer Viskosität größer als 10 cP bei üblichen Prozessbedingungen nicht erreicht. Das Verblockungsverhalten der BSA-Lösung ist durch graduelle Porenverblockung in Folge von Proteinaggregation gekennzeichnet. Die Filtration bei konstantem Differenzdruck führt zu höherer Leistung bei höherer anfänglicher Flussrate und minimaler Verweilzeit der Proteinlösung in der Membranstruktur.

Bei der Filtration von α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Lösungen sind keine signifikanten Veränderungen der Filtrate im Vergleich zu den Ausgangslösungen festgestellt worden. Lediglich bei der Filtration der BSA-Lösung konnte ein verringerter Aggregatanteil im Filtrat nachgewiesen werden.

4.4. Applikationsentwicklung - Sterilfiltration von Proteinlösungen

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit werden nachfolgend Grundsätze der weiteren Applikationsentwicklung mit dem Ziel der Auslegung von Filtrationsprozessen für die Proteinfiltration zusammengefasst.

Da Proteinformulierungen jeweils spezifisch für das Protein und seine therapeutische Anwendung sind, existieren eine große Variationsbreite hinsichtlich der Zusammensetzung, Konzentration und Eigenschaften der resultierenden Proteinlösungen. Bedingt durch die limitierte kolloidale Stabilität solcher Lösungen und somit begrenzter Haltbarkeit ist es nicht sinnvoll, Proteinlösungen zu Testzwecken zu verschicken. Somit müssten Untersuchungen zur Auslegung von Filtrationsprozessen direkt beim Kunden durchgeführt werden oder alternativ das Verblockungsverhalten von Kundenlösungen auf der Grundlage bekannter Korrelationen über die Filtration von Modellproteinlösungen im Labor simuliert werden. In jedem Fall müssen Filtrationsuntersuchungen mit minimalen Probenmengen auskommen. Entsprechend werden für die Testung vor Ort und im Labor entsprechende kleinflächige standardisierte Labor-Flachfilterdevices und automatisierte Teststände für die Filtration kleiner Volumina mit minimalen Volumenströmen benötigt. Ziel der Entwicklungsarbeiten sind Struktur-Eigenschafts-Korrelationen für die Sterilfiltration von Proteinlösungen, die eine mathematische Beschreibung des Verblockungsverhaltens ermöglichen. Sie müssen es außerdem gestatten, Untersuchungsergebnisse an Flachfiltermodulen mit kleinen Volumina im ml-Bereich auf die Prozessfiltration unter Verwendung von Filtrationsdevices mit großen Volumina im l-Bereich zu skalieren.

Dazu ist es sinnvoll, die Bewertung des Verblockungsverhaltens auf den Beginn und den Ablauf von Verblockungsreaktionen zu konzentrieren. Wichtige Kenngrößen sind dabei die anfängliche Flussrate, die Kapazität bei 50%iger Verblockung, der Membran- bzw. Device-Widerstand und die Entwicklung des Filtrationswiderstandes in Abhängigkeit von der Proteinmenge, die den Filter im Verlauf der Filtration passiert hat, wie in Kapitel 4.3.2 und folgende demonstriert.

Zur Durchführung von Filtrationsuntersuchungen werden in der vorliegenden Arbeit drei Modellproteinlösungen mit einheitlicher Formulierung für Testzwecke präsentiert (Tabelle 8). Damit stehen erste Modelllösungen insbesondere für Untersuchungen zur Auslegung von Filtrationsprozessen für hochviskose Proteinlösungen oder scherempfindliche Proteinlösungen zur Verfügung. γ -Globulin-Lösungen, die als Modell für Antikörperlösungen dienen, neigen vergleichsweise stark zur Aggregation. Zur Herstellung entsprechender Modelllösungen mit

niedrigerem Aggregationsgrad ist es im Rahmen nachfolgender Arbeiten notwendig, sowohl die Proteinformulierung hinsichtlich pH-Wert und Additiven als auch das Herstellungsverfahren zum Beispiel mittels Aufkonzentrierung per Crossflow-Filtration zu optimieren.

Zur Beurteilung der Ursache von Verblockungsprozessen ist es notwendig, Filter und Proteinlösungen umfassend zu charakterisieren.

Die kolloidale Stabilität einer Proteinlösung bzw. der Grad der Proteinaggregation, die Größe von Aggregaten und auch die Proteinkonzentration können, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, mittels HPLC und DLS vor und nach Filtration untersucht werden. Rheologische Untersuchungen mittels Rotationsviskosimeter geben Auskunft über Viskosität und Scherempfindlichkeit der Lösung (Kapitel 4.2.3). Durch enzymatische Assays lässt sich, falls vorhanden, die jeweilige enzymatische Aktivität bzw. biologische Funktion bestimmen.

Sterilfilter haben über ihre Struktur, die Porenradienverteilung und die spezifische Oberfläche Einfluss auf das Verblockungsverhalten von Proteinlösungen, wie in Kapitel 4.3.5 und Kapitel 4.3.6. beschrieben. Für maximale Filtrationsleistungen sollten die Membranfilter möglichst offenporig mit engem Spezifikationsfenster ausgelegt werden. Dabei muss die notwendige Sicherheit hinsichtlich der Bakterienrückhaltung durch eine höhere Reproduzierbarkeit und Konsistenz des Herstellungsverfahrens im Rahmen einer entsprechenden Verfahrensentwicklung gewährleistet werden.

Adsorptive Eigenschaften von Sterilfiltermembranen in Zusammenhang mit Filtrationsprozessen sollten durch dynamische Assays, vergleichbar der in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Methode untersucht werden, wobei diese nicht nur zur Untersuchung der Proteinadsorption geeignet ist, sondern auch zur Messung der Adsorption weiterer Formulierungsbestandteile, wie zum Beispiel Tenside. Auch Kompatibilitätsuntersuchungen oder Beständigkeitsuntersuchungen, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, können damit durchgeführt werden, wobei Degradationseffekte nachfolgend durch Analyse von Membran und Lösung nachgewiesen werden können.

Sämtliche hier vorgestellte Untersuchungsmethoden erfordern eine nachfolgende Weiterentwicklung von instrumenteller analytischer Messtechnik sowie eine Standardisierung von Messmethoden, um die Aussagekraft und Belastbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Daneben sind weitere Untersuchungsmethoden zu etablieren, wie zum Beispiel Untersuchungen zur Oberflächenladung von Sterilfiltermembranen und Proteinen im Rahmen von Zeta-Potential-Messungen. Dabei handelt es sich allerdings nicht, wie vielfach angenommen, um Materialeigenschaften, sondern um elektrokinetische Größen und Effekte, welche neben der chemischen Natur der Festkörperoberfläche

und experimentellen Bedingungen auch maßgeblich von der Zusammensetzung der Lösung und der Ionenstärke abhängig sind.

Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt betrifft die Auslegung von Devices für die Prozessfiltration von Proteinlösungen. Neben hohen Anforderungen an Extractable- und Partikelfreiheit ist die Fluidodynamik der Devices auf die Filtration hochviskoser Lösungen zu optimieren. Dabei ist es wichtig, eine homogene Fluidströmung zu erreichen, um die Proteinlösung nicht zusätzlich zu scheren und deren Kontakt mit Luft im System auch durch eine entsprechende Prozessführung zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist die Sterilfiltration von applikationsnahen hochkonzentrierten Modellproteinlösungen untersucht worden, wobei die folgenden Arbeitsschwerpunkte gesetzt wurden:

- Analyse des optimalen Eigenschaftsspektrum von Sterilfiltern für die Filtration von Proteinlösungen und FF-Anwendungen
- Auswahl von Proteinen sowie geeigneten Formulierungen für die Herstellung von Modellproteinlösungen für Testzwecke
- Ermittlung und Weiterentwicklung von geeigneten Prüfmethode zur Charakterisierung der Proteinlösungen hinsichtlich ihrer kolloidalen Stabilität, ihres Aggregationsverhaltens und ihrer rheologischen Eigenschaften
- Untersuchung der Adsorptionseigenschaften von Sterilfiltrationsmembranen für Proteine
- Untersuchung des Verblockungsverhaltens bei der Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen in Abhängigkeit der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Membran und Proteinlösungen sowie den Prozessbedingungen

Für das Ergebnis der Prozessfiltration von Proteinlösungen sind, über die Eigenschaften der Membran hinaus, vor allem die Eigenschaften der jeweiligen Proteine und ihrer Lösung von entscheidender Bedeutung. Der komplexe Aufbau von Proteinmolekülen ermöglicht verschiedenste Formen und biologische Funktionen, welche zu vielfältigen Lösungseigenschaften und unterschiedlichen Oberflächenaktivitäten führen. Proteinlösungen sind kolloidale Lösungen mit limitierter thermodynamischer Stabilität. Entsprechend sind Filtrationsprozesse auf die Eigenschaften von Proteinen und ihrer Lösungen abzustimmen.

In Bezug auf die genannten Arbeitsschwerpunkte können folgende Ergebnisse zusammengefasst werden.

Unterschiedliche Sterilfiltermembranen auf Basis von RC, CA und PVDF_{hyd} sind hinsichtlich ihrer Eignung für die FF-filtration untersucht worden.

Eine ausreichende bakterielle Rückhaltung ist bei allen Membranen gegeben auch unter erschwerten Bedingungen mit hohen Salz- und Tensidkonzentrationen bzw. bei einer Langzeitfiltration von bis zu 48 h.

Alle untersuchten Membranen können mittels γ -Bestrahlung sterilisiert werden, ohne merkliche Veränderungen der Membranchemie detektieren zu können, weisen keine signifikanten Mengen an Extractables auf und sind frei von Endotoxinen.

Unterschiede ergeben sich hinsichtlich der chemischen Beständigkeit. Die RC-Membran ist gegenüber sauren und basischen Medien, Acetonitril, m-Cresol, DMAc und DMSO beständig. Die CA- bzw. PVDF_{hyd}-Membran sind nicht mit basischen wässrigen Medien, DMAc und DMSO kompatibel. Diese Membranen sollten somit nicht für die Filtration von ADC-Medien eingesetzt werden.

Alle untersuchten Membranen zeichnen sich durch eine niedrige Adsorptionsneigung gegenüber Proteinen aus. Die Adsorption von BSA und γ -Globulin bleibt in allen Fällen im einstelligen $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Bereich. Auch die Adsorption von Tween 80 an RC- und PVDF_{hyd}-Membranen ist vernachlässigbar gering.

Die PVDF_{hyd}-Membran weist auf Grund ihrer hydrophilen Oberflächenbeschichtung etwas geringere Leistungsdaten bei der Filtration auf im Vergleich zu RC- bzw. CA-Membranen.

RC-Membranen stehen in ihren Leistungsdaten den Vergleichsmembranen nicht nach, zeichnen sich aber durch eine wesentlich höhere Chemikalienbeständigkeit aus, sodass auch Medien mit organischen Lösungsmittelbestandteilen filtriert werden können.

Im Rahmen der Untersuchungen sind drei hochkonzentrierte Modellproteinlösungen in einem Phosphatpuffer mit pH-Wert 6,9 und Zusatz von Tween 80, Trehalose und Natriumchlorid definiert und hergestellt worden. Dabei handelt es sich um eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 250 mg/ml und eine α -Amylase- sowie γ -Globulin-Lösung mit jeweils einer Konzentration von 100 mg/ml, was den jeweiligen maximal erreichbaren Proteinkonzentrationen entspricht.

Die Herstellung der Lösungen erfolgt durch Einrühren lyophilisierter Pulver in den Phosphatpuffer. Der Herstellungsprozess hat einen signifikanten Einfluss auf die Proteinassoziation und ist besonders kritisch hinsichtlich der γ -Globulin-Lösung zu sehen, welche eine besonders hohe Neigung zur Aggregation aufweist. Erste orientierende Untersuchungen zeigen, dass es zur Erzielung eines niedrigeren Aggregationsgrades vorteilhaft ist, niedrig konzentrierte Proteinlösungen per Crossflow-Filtration aufzukonzentrieren.

Die kolloidale Stabilität der Modellproteinlösungen ist ausgehend von der DLVO-Theorie bewertet worden. Entsprechend sind die Proteinabstände und Interaktionsenergien berechnet worden. Dabei zeigt sich, dass die intermolekularen Abstände zwischen den Proteinmolekülen in allen Lösungen kleiner sind als die Proteine selbst. Daher ist von einer niedrigen kolloidalen Stabilität der Lösungen und einer hohen Tendenz zur Proteinaggregation auszugehen.

Das Aggregationsverhalten der Lösungen ist mittels HPLC und DLS untersucht worden. Alle Lösungen weisen einen spezifischen Grad an Proteinaggregation auf. Mittels DLS konnten für alle Modellproteinlösungen makromolekulare Aggregate mit einer Größe von bis zu 600 nm analysiert werden. Durch HPLC sind makromolekulare Aggregate nur für die γ -Globulin-Lösung nachgewiesen worden. In der BSA- bzw. α -Amylase-Lösung sind maximal Tetramere detektiert worden.

Rheologische Untersuchungen mit einem Rotationsviskosimeter zeigen, wie zu erwarten, eine deutliche Scherempfindlichkeit. Die Viskosität der Lösungen sinkt mit steigender Scherrate und erreicht bei Scherraten größer 100 /s ein Plateau. Die Plateau-Werte werden nachfolgenden Berechnungen zu Grunde gelegt und betragen 10 cP, 1,7 cP und 4 cP für die BSA-, α -Amylase- bzw. γ -Globulin-Lösungen.

Die Proteinadsorption an verschiedenen Sterilfiltermembranen sind mittels eines statischen und eines dynamischen Assays untersucht worden. Beim dynamischen Assay wird das Adsorptionsverhalten als Ergebnis von Durchbruchkurven bei der Filtration betrachtet. Die untersuchten Membranen umfassen hydrophobe Membranen mit hoher Proteinbindekapazität wie CN und PVDF sowie reguläre Sterilfiltrationsmembranen auf Basis von RC, CA, PES und PVDF_{hyd}, welche mit Werten kleiner 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ alle gleichermaßen niedrigadsorbierend sind für Proteine. Da es sich bei der Proteinadsorption um einen komplexen dynamischen Prozess handelt, führen unterschiedliche experimentelle Bedingungen zu abweichenden Ergebnissen. Mit Hilfe des dynamischen Assays wird gezeigt, dass die Proteinadsorption bei Filtrationsprozessen stark von der Flussrate abhängt und mit steigender Flussrate abnimmt. Die Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen Membranoberfläche und Protein erfordert eine minimale Verweilzeit, welche bei applikationsrelevanten Flussraten von größer 100 l/(h·m²) und Verweilzeiten von unter 1 s nicht gegeben ist.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Adsorptionsprozesse bei der Verblockung von Filteroberflächen durch hochkonzentrierte Proteinlösungen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die wichtigsten Einflussgrößen auf Verblockungsprozesse bei der Filtration hochkonzentrierter Proteinlösungen sind die Konformationsstabilität des Proteins und die kolloidale Lösungsstabilität. Beide Größen sind Proteinspezifisch und können durch die Formulierung der Lösung sowie durch die Prozessbedingungen bei der Filtration beeinflusst werden. Wichtige Einflussgrößen der Membran auf Verblockungsprozesse sind strukturelle Parameter, wie Porenquerschnitt, Porosität und die spezifische Oberfläche.

Die bei der Filtration ablaufenden Verblockungsprozesse sind komplexer Natur und können nicht durch ein einheitliches Verblockungsmodell beschrieben werden. Wichtigster Verblockungsprozess ist

die Ablagerung von Proteinmolekülen auf der Membranoberfläche, bedingt durch die thermodynamische Instabilität der kolloidalen Proteinlösungen. Die Ablagerung von Proteinmolekülen auf der Membranoberfläche ist unabhängig von der chemischen Natur der Membranoberfläche und deren adsorptiven Eigenschaften. Sie wird dementsprechend gleichermaßen für die hochadsorbierende CN-Membran sowie die niedrigadsorbierende RC-Membran beobachtet. Infolge der Ablagerungen von Proteinmolekülen auf der Membranoberfläche verengt sich der Porenquerschnitt, was zu einer langsamen Abnahme der Flussrate führt. Daher erstreckt sich der Verblockungsprozess über die Filtration größerer Volumina und einen vergleichsweise langen Zeitraum von mehreren Minuten.

Proteinlösungen können einen hohen Anteil an Proteinaggregaten aufweisen. Die Rückhaltung dieser Aggregate führt ebenfalls zu Verblockungserscheinungen, deren Auswirkungen abhängig sind von der Zahl und Größe der Aggregate in Lösung. Im Fall der BSA-Lösung ist eine graduelle Porenverblockung beobachtet worden, gekennzeichnet durch einen langsamen aber konstanten Anstieg des Filtrationswiderstands. Eine spontane Verblockung durch Proteinaggregate innerhalb weniger Sekunden kennzeichnet das Verblockungsverhalten bei der Filtration der γ -Globulin-Lösung, mit einem nachweislich größeren Anteil von Höhermolekularen Aggregaten in Lösung.

Die mit der Filtration verbundene Fluidodynamik wirkt zusätzlich auf die Proteinkonformation. So ist die Überschreitung einer Scherrate von etwa 10^4 /s in den Membranporen für viele Proteine kritisch und kann während der Filtration zur Entfaltung von Proteinmolekülen führen. Dadurch können sich zuvor nach Innen gerichtete hydrophobe Bereiche nach außen orientieren. Konsequenzen sind eine verstärkte Interaktionen zwischen den Proteinmolekülen und zusätzliche Aggregatbildung bzw. eine verstärkte Ablagerung von Proteinmolekülen auf der Membranoberfläche.

Filtrationsverfahren müssen deshalb so ausgelegt werden, dass die kolloidale Stabilität der Lösung bzw. die Konformationsstabilität des Proteins durch die Prozessbedingungen nicht zusätzlich destabilisiert werden, wobei spezifische Lösungen gefunden werden müssen. Scherstress kann durch die Anwendung niedriger Flussraten vermindert werden. Eine entsprechend vergrößerte Filterfläche kann schließlich trotz niedriger Flussraten eine ausreichende Leistung ermöglichen. Bei besonders hochkonzentrierten Lösungen mit Viskositäten über 10 cP werden kritische Scherraten bei anwendungsrelevanten Prozessbedingungen nicht erreicht. In diesem Fall ist es insbesondere wichtig, durch entsprechende Wahl der Prozessbedingungen zusätzliche Proteinaggregation zu vermeiden. Bei scherunempfindlicheren Proteinen wie BSA ist die Anwendung einer höheren Flussrate eher vorteilhaft, da sie die Verweilzeit an der Membrangrenzfläche reduziert.

Besonders starke Verblockungserscheinungen sind bei der Filtration der γ -Globulin-Lösung beobachtet worden, erklärbar durch die starke Aggregationsneigung der Lösung. Im Gegensatz zu den

anderen Modellproteinlösungen wird der Verblockungsprozess hier durch die Filtration bei einer konstanten Flussrate von $2 \text{ ml}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)$ am wirksamsten verzögert. Zusätzlich konnte das Verblockungsverhalten auch durch Prozessoptimierung im Bereich der Formulierungsherstellung verbessert werden.

Das Beispiel zeigt deutlich, dass valide Untersuchungsergebnisse zur Auslegung von Prozessfiltrationen nur erarbeitet werden können, wenn valide applikationsrelevante Proteinformulierungen zur Verfügung stehen. Entsprechend liefert die vorliegende Arbeit viele richtungsweisende Ansätze für nachfolgende Arbeiten inklusive reproduzierbarer Herstellungsprozesse für Modellproteinlösungen im Labormaßstab und belastbare Rezepturen sowie Arbeitsanweisungen zur Kontrolle der Lösungsqualität und Aggregatbildung.

Lebenslauf

Persönliches

Name: M.Sc. Biotechnologie Svenja Guillaume

Geburtstag/-ort: 13. April 1989 in Langenhagen

Wohnhaft: Brüderweg 5, 37176 Nörten-Hardenberg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Werdegang

seit Mrz 2016 Anstellung als Inhouse Application Specialist Filtration Technologies bei der Sartorius Stedim Biotech GmbH

seit Jul 2013 Promotion bei der Sartorius Stedim Biotech GmbH mit Schwerpunkt Proteinfiltration in Zusammenarbeit mit der Leibniz Universität Hannover

Nov 2012- Apr 2013 Masterarbeit bei der Sartorius Stedim Biotech GmbH mit dem Titel „The influence of surfactants on nitrocellulose membrane characteristics applied in protein microarrays“

2008-2013 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig mit Abschluss M.Sc. Biotechnologie

2005-2006 Auslandsjahr, Huntsville High School, Huntsville, Ontario, Kanada

1999-2005/2006-2008 Städt. Heinrich-Heine-Gymnasium, Mettmann mit dem Abschluss des Abiturs (Abitur mit Auszeichnung, Abiturpreis der Deutschen Mathematiker-Vereinigung)

Weitere Tätigkeiten

2011-2013 Sartorius Bioscience Scholarship

2011 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig

2009-2011 Leitung des Tutoriums zu der Vorlesung „Mathematische Methoden der Chemie“ an der TU Braunschweig

2002-2005 Verwaltung der Lehrmittelbücherei (Heinrich-Heine-Gymnasium)

Qualifikationen

Sprachkenntnisse: Englisch (verhandlungssicher), Französisch (Grundkenntnisse)

IT-Kenntnisse: Fachwissen: Origin, Sigma-Plot

Führerschein: Klasse B

Wissenschaftliche Publikationen und betreute Abschlussarbeiten

Vorträge auf Tagungen

Guillaume S (2015) Description of Microfiltration of Biopharmaceutical Applications. Euromembrane 2015, Aachen.

Posterbeiträge auf Tagungen

Masselin I, van der Kruijs S, Guillaume S, Metze M und Reiche A (2015) Monitoring of Sterile Filtration Capability within Membrane Production. Euromembrane 2015, Aachen.

Betreute Abschlussarbeiten

Etl R (2016) Sterilfiltration therapeutischer Proteine – Untersuchungen zur Prozessführung. Bachelorarbeit, Technische Hochschule Mittelhessen.

Literaturverzeichnis

- Andrade J und Hlady V (1986) Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses. *Adv. Pol. Sci.*
- ASTM International (2013) Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration. F838 – 05 2013.
- Atkins P und Paula J (2008) *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, 4. Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bialopiotrowicz T, Blanpain P, René F und Lalande M (2002) An Adsorption of Bovine Serum Albumin on Carbon/Zirconium Oxide Microfiltration Membranes at different pH's as determined from Breakthrough Curves. *ARS Separatoria ACTA*.
- Bolton G, LaCasse D und Kuriyal R (2006) Combined models of membrane fouling: Development and application to microfiltration and ultrafiltration of biological fluids. *J. Membr. Sci.*
- Bowen R und Gan Q (1992) Properties of Microfiltration Membranes: The Effects of Adsorption and Shear on the recovery of an Enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*
- Charm S und Wong B (1970) Enzyme inactivation with shearing. *Biotechnol. Bioeng.*
- Chmiel H (2006) *Bioprozesstechnik*, 2. Edition. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Cromwell M, Hilario E und Jacobson F (2006) Protein Aggregation and Bioprocessing. *The AAPS Journal*.
- Curtis R, Ulrich J, Montaser A, Prausnitz J und Blanch H (2002) Protein-Protein Interactions in Concentrated Electrolyte Solutions. *Biotechnol. Bioeng.*
- Decker E und Reski R (2008) Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosys Eng.*
- Ebens A, Jacobson F, Polakis P, Schwall R, Sliwkowski M, Spencer S (2014) US Patent 20140128580 A1.
- Erickson H (2009) Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online*.
- Fekete S und Guillaume D (2014) Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins. *Trends Anal. Chem.*
- Fulton A und Isaacs W (1991) Titin, a huge, elastic sarcomeric protein with a probable role in morphogenesis. *BioEssays*.
- Gauss Centre for Supercomputing (2016) Molecular Dynamics Simulation of Protein-Protein Complex Formation in a Crowded Environment. http://www.gauss-centre.eu/gauss-centre/EN/Projects/LifeSciences/2014/zacharias_crowded_enviroment.html?nn=1361034.
- Gitlin I, Garbeck J und Whitesides G (2006) Why are Proteins Charged? Networks of Charge-Charge Interactions in Proteins Measured by Charge Ladders and Capillary Electrophoresis. *Angew. Chem., Int. Ed.*
- Goswami S, Wang W, Arakawa T und Ohtake S (2013) Developments and Challenges for mAB-Based Therapeutics. *Antibodies*.
- Griffiths I, Kumar A und Stewart P (2014) A combined network model for membrane fouling. *J Colloid Interface Sci.*
- Herrero C, Prádanos P, Calvo J, Tejerina F und Hernández A (1997) Flux Decline in Protein Microfiltration: Influence of Operative Parameters. *J Colloid Interface Sci.*

- Ho C und Zydney A (2000) A combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration. *J Colloid Interface Sci.*
- Ho C und Zydney A (2002) Transmembrane pressure profiles during constant flux microfiltration of bovine serum albumin. *J Membr. Sci.*
- Inoue N, Takai E, Arakawa T und Shiraki K (2014) Specific Decrease in Solution Viscosity of Antibodies by Arginine for Therapeutic Formulations. *Mol. Pharmaceutics.*
- Jiang G, Thummala A und Wadhwa M (2011) Applications of Statistical Regression and Modeling in Fill-Finish Process Development of Structurally Related Proteins. *J. Pharm. Sci.*
- Jones K und Melia C (2000) Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *J Membr. Sci.*
- Jornitz M und Meltzer T (2001) *Sterile Filtration A Practical Approach.* Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kanani D, Sun X und Ghosh R (2008) Reversible and irreversible membrane fouling during in-line microfiltration of concentrated protein solutions. *J Membr. Sci.*
- Kelly S, Senyo Opong W und Zydney A (1993) The influence of protein aggregates on the fouling of microfiltration membranes during stirred cell filtration. *J Membr. Sci.*
- Kim J und Yoon J (2002) Protein Adsorption on Polymer Particles. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science.* Marcel Dekker, Inc, New York.
- Kopac T, Bozgeyik K und Yener J (2008) Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.*
- Krämer I, Jelkmann W (2008) *Rekombinante Arzneimittel - medizinischer Fortschritt durch Biotechnologie.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Leckband D und Sivasankar S (1999) Forces controlling protein interactions: theory and experiment. *Colloids Surf.*
- Maa Y und Hsu C (1998) Investigation on Fouling Mechanisms for Recombinant Human Growth Hormone Sterile Filtration. *J Pharm. Sci.*
- Mahler H, Huber F, Kishore R, Reindl J und Rückert P (2010) Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters. *J Pharm. Sci.*
- Manning M, Chou D, Murphy B, Payne R und Katayama D (2010) *Pharm. Res.*
- Melnyk R (2015) Theoretical study of phase behaviour of DLVO model for lysozyme and γ -crystalline aqueous electrolyte solutions. *Condens. Matter Phys.*
- Masselin I, van der Kruijs S, Guillaume S, Metze M und Reiche A (2015) Monitoring of Sterile Filtration Capability within Membrane Production. *Euromembrane 2015, Aachen.*
- Mezger T (2014) *Angewandte Rheologie.* Anton Paar GmbH.
- Mittelman M, Jornitz M und Meltzer T. 1998. Bacterial Cell Size and Surface Charge Characteristics Relevant to Filter Validation Studies. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.*
- Mok Y, Besnard L, Pattnaik P und Raghunath B (2012) Sterilizing-Grade Filter Sizing Based on Permeability. *BioProcess International.*
- Neergaard M, Kalonia D, Parshad H, Nielsen A, Moller E und van de Weert M (2013) Viscosity of high concentration protein formulation of monoclonal antibodies of the IgG1 and IgG4 subclass - prediction of viscosity through protein-protein interaction measurements. *Eur J Pharm Sci.*
- Nir S (1976) Van-der-Waals interactions between surfaces of biological interest. *Prog. Surf. Sci.*

- Onreadt A, Folmsbee M, Kumar A und Martin J (2010) Sterilizing Filtration of Adjuvanted Vaccines: Ensuring Successful Filter Qualification. *BioPharm International Supplements*.
- Palacio L, Ho C und Zydney A (2002) Application of a Pore-Blockage-Cake-Filtration Model to Protein Fouling During Microfiltration. *Biotechnol. Bioeng.*
- Palecek S und Zydney A (1994) Intermolecular Electrostatic Interaction and their Effect on Flux and Protein Deposition during Protein Filtration. *Biotechnol. Progr.*
- Parenteral Drug Association (2008) Sterilizing Filtration of Liquids. Technical Report No. 26.
- Peinemann K und Pereira Nunes S (2008) *Membranes for the Life Sciences*. Wiley-VCH.
- Pitt A (1987) The Nonspecific Protein Binding of Polymeric Microporous Membranes. *J Parenter Sci Technol.*
- Rajniak J, Tsinontides S, Pham D, Hunke W, Reynolds S und Chern R (2008) Sterilizing filtration - Principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *J Membr. Sci.*
- Rathore A, Anderson S und Sharma A (2008) Filter Cloggin Issues in Sterile Filtration. *BioPharm International*.
- Ratnaparkhi M, Chaudhari S und Pandya V (2011) Peptides and Proteins in Pharmaceuticals. *Int. J. Curr. Pharm.*
- Salgin S, Salgin U und Soyer N (2013) Streaming Potential Measurements of Polyethersulfone Ultrafiltration Membranes to Determine Salt Effects on Membrane Zeta Potential. *Int. J. Electrochem. Sci.*
- Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (2016) Mein Sanofi. www.mein.sanofi.de/Produkte/Lantus.
- Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (2016) Insulin - Eine biotechnologische Erfolgsgeschichte für dich und deine Gesundheit. www.sanofi.de/l/de/de/download.jsp?file=1F92A983-78D3-459E-99E3-BFE630C2306A.pdf.
- Sartorius Stedim Biotech GmbH (2016) Datenblatt Sartobran P.
- Schneider M und Schneider S (2008) Der von Willebrand-Faktor: ein intelligenter Gefäßkleber. *BIOspektrum*.
- Schneider S, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz R und Schneider M (2007) Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Sharma V, Jaishankar A, Wang Y und McKinley G (2011) Rheology of globular proteins: apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions. *Soft Matter*.
- Socrates G (2001) *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts*, 3. Edition. John Wiley & Sons Ltd, London.
- Spurk J und Aksel N (2008) *Fluid Mechanics*, 2. Edition. Springer-Verlag, Berlin.
- Steuck M (1986) Porous membrane having hydrophilic surface and process of its manufacture. Patent 0186758 A2 EP.
- Subramaniam K (2016) Perspectives on Technology Trends in Biopharmaceuticals Manufacture. In: *The Mind of an Engineer*. Springer, Singapore.
- Tang C, Chong T und Fane A (2011) Colloidal interactions and fouling of NF and RO membranes: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*
- The Protein Data Bank (2016) Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. www.rcsb.org.

- Tirrell M und Middleman S (1975) Shear modification of enzyme kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*
- Uchiyama S (2014) Liquid formulation for antibody drugs. *Biochimica et Biophysica Acta.*
- User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit (2015)
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf.
- van den Oetelaar P, Mentink I und Brinks G (1989) Loss of Peptides and Proteins upon Sterile Filtration due to Adsorption to Membrane Filters. *Drug Dev Ind Pharm.*
- Verwey E und Overbeek J (1948) Theory of stability of lyophobic colloids. Elsevier, Amsterdam.
- Whitford D (2005) *Proteins - Structure and Function*. John Wiley & Sons Ltd.
- Wishart D (2013) Characterization of biopharmaceuticals by NMR spectroscopy. *Trends Anal. Chem.*
- Zhang J, Cai Z, Cong W, Su Z und Ouyang F (2002) Mechanisms of Protein Fouling in Microfiltration. *Separ Sci Technol.*
- Zhou Y, Wang Z, Zhang Q, Xi X, Zhang J und Yang W (2012) Equilibrium and thermodynamic studies on adsorption of BSA using PVDF microfiltration membrane. *Desalination.*
- Zydney A (2009) *Membrane Technology for Purification of Therapeutic Proteins*. *Biotechnol. Bioeng.*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Sartorius Stedim Biotech GmbH in der Membranentwicklung in Zusammenarbeit mit der Leibniz Universität Hannover. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Kollegen, Freunden und Bekannten bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Scheper für die engagierte und interessierte Begleitung der Arbeit.

Prof. Dr. Bahnemann für die freundliche Übernahme des Koreferats bzw. die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Prof. Dr. Alves, dass er sich als zusätzlicher Prüfer zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. Reiche für die fachliche Betreuung der vorliegenden Forschungsarbeit, verbunden mit aufschlussreichen Diskussionen und der gewährten Freiheit bei der Umsetzung eigener Ideen und Konzepte.

Dr. Dieter Melzner und Dr. Mathias Siebner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern aus der Membranverdunstung für die fachlichen und nichtfachlichen Gespräche und eine ausgesprochen angenehme Atmosphäre.

Allen Studenten, deren Praktika bzw. Abschlussarbeiten ich betreuen durfte, für die gute Zusammenarbeit und den Beitrag zu dieser Arbeit.

Meiner Familie, die in jeglicher Hinsicht den Grundstein für meine Entwicklung gelegt hat und immer hinter mir stand.

Meinem Mann für den bedingungslosen Rückhalt und die unermüdliche Unterstützung.