

Technische Universität München

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

# **Aufreinigung und Formulierung eines therapeutischen Antikörpers mittels Kristallisation**

**Benjamin Smejkal**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. rer. nat. habil.  
Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 14.11.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 11.03.2013  
angenommen.



# Danksagung

Zu dieser Dissertation haben mehrere Personen beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz, der es mir ermöglicht hat meine Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Durch seine gerechte, zuverlässige Art, seine kompetente Unterstützung und durch die Gewährung vieler Freiräume, schuf er exzellente Arbeitsbedingungen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes Buchner für die Übernahme des Zweitprüfers und Frau Prof. Dr. rer. nat. Sonja Berensmeier für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr.-Ing. Dariusch Hekmat danke ich für die Koordination und Betreuung der Industriekooperation.

Der Novartis Pharma AG danke ich für die Finanzierung des Projekts und der materiellen Unterstützung. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Bernhard Helk, Dr. Henk Schulz und Dr. Marion Giffard für die hilfreichen Diskussionen.

Dirk Hebel, Norbert Werth und Georg Kojro danke ich für die Unterstützung bei Design und Fertigung von Teilen der Kristallisationsausrüstung.

Meinen ehemaligen Studenten Matthias Mechelke, Franziska Ortner, Sabine Anton, Angelika Wilke, Philipp Heckmeier, Peter Scheyerer und Jacqueline Fries danke ich für die fleißige Mitarbeit.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik danke ich für das sehr gute Arbeitsklima. Besonderer Dank für die schöne Zeit gilt Dirk Hebel, Ilka Sührer, Stefanie Brüning, Michael Weiner, Nils Janzen und Bernd Anselment.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken. Meine Frau Jessica hat mich immer unterstützt und stets zu mir gehalten und meine Kinder schenkten mir oft mit einem freudigen Strahlen Glück und Kraft.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
3.1	Antikörper .....	5
3.1.1	Funktion und Aufbau .....	5
3.1.2	Medizinische Anwendung .....	9
3.1.3	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	10
3.1.4	Aufreinigung monoklonaler Antikörper .....	12
3.1.5	Formulierung .....	15
3.2	Proteinkristallisation .....	18
3.2.1	Keimbildung und Kristallwachstum .....	18
3.2.2	Kristallisationsmethoden .....	21
3.2.3	Vorteile einer kristallinen Formulierung .....	24
3.3	Kristallisation im Rührkessel .....	27
3.3.1	Suspendieren .....	28
3.3.2	Mittlerer Leistungseintrag .....	29
3.3.3	Maximale lokale Energiedissipation .....	30
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
4.1	Rührkessel .....	34
4.2	Analytik .....	36

4.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	36
4.2.2	Messung von Proteinverunreinigungen aus der Zellkultur .....	39
4.2.3	Messung von DNA .....	40
4.2.4	Biologische Aktivität .....	40
4.2.5	Größenausschlusschromatografie.....	40
4.2.6	Optische Analyse .....	41
4.2.7	Messung von Injektionskräfte .....	41
4.3	Proteinkristallisation.....	44
4.3.1	Dampfdiffusion .....	44
4.3.2	Mikrosatzverfahren .....	44
4.3.3	Kristallisation im Rührkessel .....	44
4.3.4	Vorhandene Kristallisationsbedingungen.....	46
4.4	Charakterisierung der verwendeten Kristallisationssysteme.....	47
4.4.1	Berechnung der Rührerumfangsgeschwindigkeit.....	47
4.4.2	Berechnung der Reynolds-Zahl.....	47
4.4.3	Bestimmung von Mischzeiten .....	47
4.4.4	Bestimmung des Leistungseintrags .....	48
4.4.5	Tropfengrößenverteilung.....	49
4.5	Weitere Methoden.....	51
4.5.1	Sterilfiltration.....	51
4.5.2	Herstellung von Fab-Fragmenten .....	51

4.5.3	Abtrennen und Auflösen von mAb01-Kristallen.....	52
4.5.4	Aufkonzentrieren von Proteinen.....	52
4.5.5	Dialyse .....	52
4.5.6	Vorbehandlung des Zellkulturüberstand .....	53
4.5.7	Anionenaustauschchromatografie .....	53
4.5.8	Nanofiltration .....	53
4.5.9	Virusinaktivierung .....	54
<b>5</b>	<b>Proteinkristallisation im Rührkessel.....</b>	<b>55</b>
5.1	Charakterisierung .....	55
5.1.1	Mischzeiten .....	55
5.1.2	Mittlerer Leistungseintrag .....	57
5.1.3	Maximale lokale Energiedissipation .....	58
5.2	Lysozymkristallisation .....	64
5.2.1	Suspendieren von Lysozymkristallen.....	64
5.2.2	Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Kristallisation von Lysozym ..	65
5.3	Diskussion .....	70
<b>6</b>	<b>Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments .....</b>	<b>74</b>
6.1	Kristallisation im Dampfdiffusionsverfahren .....	74
6.2	Kristallisation im Mikrosatzverfahren .....	77
6.3	Kristallisation im gerührten mL-Satzverfahren .....	80
6.4	Diskussion .....	82

<b>7</b>	<b>Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01 .....</b>	<b>84</b>
7.1	Kristallisation im Mikrosatzverfahren .....	84
7.2	Kristallisation im gerührten Satzverfahren.....	88
7.2.1	Kristallisationsausbeute .....	88
7.2.2	Kristallisationsgeschwindigkeit .....	90
7.3	Temperatur- und pH-Stabilität der Kristalle.....	93
7.4	Kristallisation zur Aufkonzentrierung .....	97
7.5	Diskussion .....	98
<b>8</b>	<b>Formulierung des monoklonalen Antikörpers mAb01 als Kristallsuspension.....</b>	<b>101</b>
8.1	Kristallisation für eine pharmazeutische Formulierung .....	101
8.2	Injizierbarkeit von Kristallsuspensionen .....	104
8.3	Diskussion .....	107
<b>9</b>	<b>Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation.....</b>	<b>109</b>
9.1	Kristallisation aus vorgereinigten Lösungen .....	109
9.2	Kristallisation aus dem Zellkulturüberstand.....	114
9.2.1	Identifizierung der inhibierenden Substanzen .....	114
9.2.2	Einfluss von PEG 10000.....	116
9.2.3	Entwicklung einer Vorbehandlungsmethode.....	119
9.2.4	Kristallisationsprozess im Litermaßstab .....	121
9.3	Diskussion .....	126



<b>10 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>128</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>145</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>148</b>
A Chemikalien und Proteine .....	148
B Verbrauchsmaterial .....	150
C Geräte .....	152
D Software .....	155



# 1 Einleitung

Die Menschen streben schon immer nach einem langen und gesunden Leben. Die durchschnittliche Lebenserwartung hat sich in Deutschland seit 1871 bis heute mehr als verdoppelt. So lag sie 1871 für Männer bei 35,6 Jahren und für Frauen bei 38,4 Jahren und im Jahr 2010 für Männer bei 77,7 Jahren und für Frauen bei 82,7 Jahren (Statistisches Bundesamt, 2012).

Zu dieser positiven Entwicklung haben zu einem nicht unerheblichen Teil Fortschritte in der Medizin beigetragen. So haben Medikamente wie Antibiotika und Operationsmethoden mit Sicherheit Millionen von Menschen das Leben verlängert. Dabei geht die rasante Entwicklung der Medizin immer weiter. Bisher bestehen über 90 % der auf dem Markt befindlichen Arzneimittel aus kleinen, chemisch hergestellten Molekülen. In der letzten Zeit aber geht der Trend zur Entwicklung von Biopharmazeutika. Das sind große, biotechnologisch hergestellte Proteine, die zielgerichtet im Körper wirken können (Bayer Pharma, 2012). Damit können Krankheiten wie beispielsweise Krebs besser behandelt werden (Shuptrine *et al.*, 2012; Vanneman und Dranoff, 2012). Bekannte Beispiele solcher Medikamente sind monoklonale Antikörper oder Hormone, wie Insulin oder Erythropoetin.

Jedoch zählen Biopharmazeutika zu den teuersten Arzneimitteln. Im Jahr 2011 wurden dafür in Deutschland rund 5,4 Milliarden Euro ausgegeben (Boston Consulting Group, 2012). Es besteht also die Gefahr, dass in Zukunft neu entwickelte Medikamente dieser Art nicht mehr in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen aufgenommen werden und damit nur noch zahlungskräftigen Patienten zur Verfügung stehen. Um dies zu verhindern, müssen die Herstellungskosten von Biopharmazeutika gesenkt werden.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Therapeutische monoklonale Antikörper werden wegen ihrer hohen spezifischen Wirksamkeit bei zugleich geringen Nebenwirkungen und lang anhaltender Wirkdauer als Medikamente der Zukunft bezeichnet (Oldham und Dillman, 2008; Shukla und Thömmes, 2010). Bei der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern hat sich mittlerweile eine Plattformtechnologie etabliert, bei der Protein A-Chromatografie sowie zwei weitere Chromatografieschritte eingesetzt werden (Gottschalk, 2008; Low *et al.*, 2007; Shukla, 2007). Die Kosten für die Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers können bis zu 80 % der gesamten Herstellungskosten ausmachen (Roque *et al.*, 2004). Davon verursachen die Chromatografieschritte etwa 70 % der Kosten (Azevedo *et al.*, 2009), wobei die Protein A-Chromatografie die teuerste ist (Gottschalk, 2008; Low *et al.*, 2007; Shukla, 2007). Daher werden kostensparende Alternativen zu den Chromatografieschritten gesucht. Neben beispielsweise der wässrigen Zweiphasenextraktion (Rosa *et al.*, 2009), der Präzipitation (McDonald *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009) und einer Aufreinigung mit funktionalisierten Filtrationsmembranen (Knudsen *et al.*, 2001; Kuczewski *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010) stellt die Kristallisation eine mögliche Alternative dar (Low *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2005).

Eine technische Kristallisation findet meist in einem Rührkessel statt (Price, 1997; Schmidt *et al.*, 2005). Der genaue Einfluss des Rührens auf die Proteinkristallisation wird kontrovers diskutiert und zudem existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung der Rührerdrehzahl bei einer Maßstabsvergrößerung (Genck, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2005). Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss des Rührens auf die Proteinkristallisation in Rührkesseln untersucht und eine geeignete Methode zur Maßstabsvergrößerung identifiziert werden. Da für die Charakterisierung der Proteinkristallisation in Rührkesseln mehrere hundert Gramm Protein benötigt werden, wird dies anhand des kostengünstigen und einfach verfügbaren Enzyms Lysozym durchgeführt.

Bei einer Kristallisation im Rührkessel müssen die Proteinkristalle stabil genug sein, um die auftretenden Scherkräfte auszuhalten (Judge *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2005). Die Stabilität der Kristalle variiert dabei in Abhängigkeit von dem verwendeten Protein und dem Kristallgitter. Folglich muss für jedes Protein untersucht werden, ob eine Kristallisation im Rührkessel möglich ist. Daher soll für therapeutische monoklonale Antikörper, im speziellen den monoklonalen Antikörper mAb01 und das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörper Canakinumab<sup>1</sup>, ausgehend von Kristallisationsbedingungen in ungerührten Systemen, eine Kristallisation im Rührkessel realisiert und charakterisiert werden. Wenn möglich, soll zudem ein schneller Kristallisationsprozess mit einer hohen Ausbeute erreicht werden.

Eine Kristallisation eines Antikörpers könnte eine kostensparende Alternative zu einem Chromatografieschritt bei der Aufreinigung darstellen. Jedoch gilt die Kristallisation von Antikörpern wegen ihrer Größe, Flexibilität und Glykosylierung schon aus reinen Lösungen als sehr schwierig (Erdemir *et al.*, 2009; Harris *et al.*, 1995; Low *et al.*, 2007). Aus unreinen Lösungen ist eine Kristallisation von Proteinen oft nicht möglich und falls sie möglich ist, kann ein verlangsamtes Kristallwachstum auftreten (Jacobsen *et al.*, 1998; Zang *et al.*, 2011). In dieser Arbeit soll die Proteinkristallisation als kostensparende Aufreinigungsmethode für den therapeutischen monoklonalen Antikörper mAb01 verwendet werden. Hierfür wird eine Kristallisation aus unterschiedlich unreinen Lösungen untersucht und falls möglich soll ein Chromatografieschritt im Standardaufreinigungsprozess durch Kristallisation eingespart werden.

Die Produktformulierung ist der letzte Schritt in einem Aufreinigungsprozess. In einem Standardprozess wird mittels Ultrafiltration / Diafiltration der Puffer in den Formulierungspuffer getauscht und das Zielprotein konzentriert (van Reis *et al.*, 1997). Dabei soll eine genügend hohe Stabilität des Proteins für eine ausreichend lange Lagerung erreicht und gleichzeitig das Protein in eine medizinische Darreichungsform gebracht werden (Frokjaer und Otzen, 2005). Bei

---

<sup>1</sup> Die therapeutischen monoklonalen Antikörper Canakinumab und mAb01 wurden freundlicherweise von der Novartis Pharma AG bereitgestellt.

therapeutischen Antikörpern ist als Darreichungsform eine subkutane Injektion erwünscht, wobei oft hohe Antikörperkonzentrationen von mehr als  $100 \text{ g L}^{-1}$  benötigt werden (Miller *et al.*, 2010; Shire *et al.*, 2004). So hochkonzentrierte Proteinlösungen können aber zu instabil für die Lagerung sein. Daher werden die Antikörperlösungen bei einer niedrigen Temperatur von etwa  $-60 \text{ °C}$  gelagert (Shire, 2009). Eine Kühlung auf so niedrigen Temperaturen verursacht erhebliche Kosten. Kristalle können eine stabile und platzsparende Lagerung ermöglichen (Drenth und Haas, 1992; Schmidt *et al.*, 2005; Shenoy *et al.*, 2001) Zudem können hochkonzentrierte Proteinlösungen zu viskos für die subkutane Injektion sein. Die notwendigen Konzentrationen könnten aber mit Kristallsuspensionen erreicht werden, da sie eine reduzierte Viskosität aufweisen (Shukla *et al.*, 2007a; St Clair *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003). Daher soll eine kristalline Formulierung des monoklonalen Antikörpers mAb01 untersucht werden. Für eine platzsparende kristalline Formulierung sind die maximal erreichbare Proteinkonzentration und stabile Lagerbedingungen zu ermitteln. Des Weiteren soll eine, für eine subkutane Injektion geeignete, kristalline Formulierung des monoklonalen Antikörpers mAb01 erzeugt und diese mit der flüssigen Standardformulierung des Antikörpers verglichen werden.

## 3 Theoretische Grundlagen

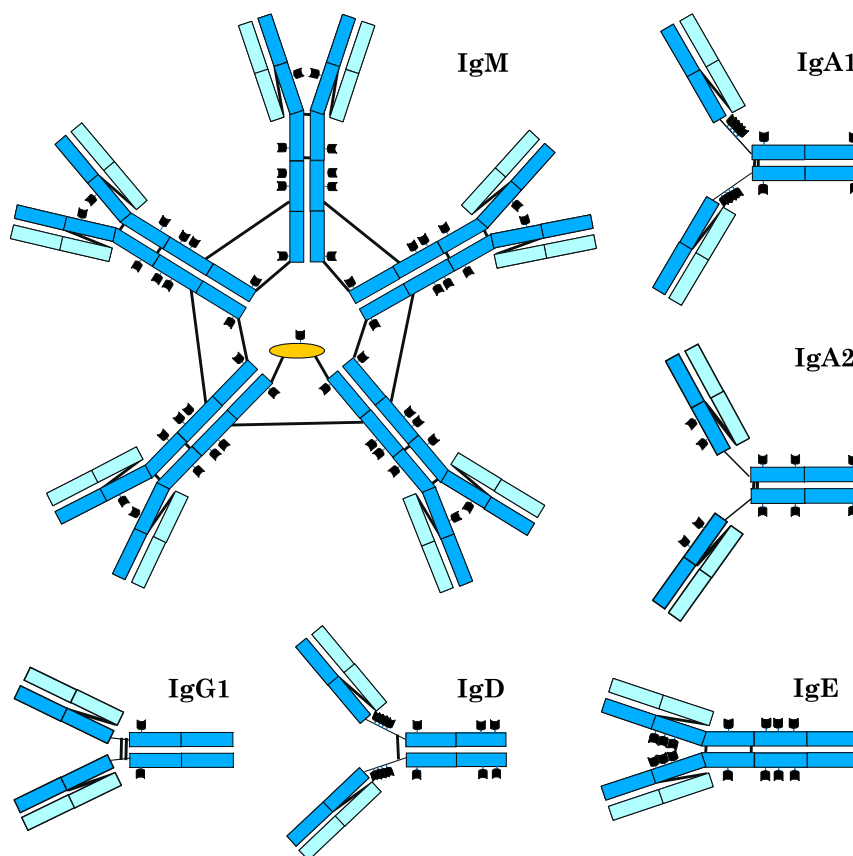
### 3.1 Antikörper

#### 3.1.1 Funktion und Aufbau

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind wichtige Proteine der erworbenen Immunantwort. Ein Fremdkörper (Antigen) wird an einer bestimmten Position (Epitop) durch die Bindestellen des Antikörpers (Paratope) mit einer hohen Affinität (Dissoziationskonstante  $K_D = 10^{-7} - 10^{-9}$  M) gebunden (Hudson und Souriau, 2003). Dadurch werden toxische Stoffe oder Viren neutralisiert (Cavacini *et al.*, 2003). Bakterien werden durch die Bindung von Antikörpern opsoniert und danach von phagozytierende Zellen des Immunsystems zerstört. Zusätzlich wird über eine Bindestelle am Antikörper das Komplementsystem aktiviert und so die Opsonierung verstärkt. Da ein Antikörper zwei Paratope besitzt, kann es zur Agglutination, einer Quervernetzung, von mehreren Antigenen kommen. Dadurch wird die Eliminierung der Antigene durch Phagozyten erleichtert. Wird eine abnormale Zelle des Organismus durch Antikörper gebunden, wird diese besser von natürlichen Killerzellen erkannt. Natürliche Killerzellen töten abnormale Zellen ab und verhindern somit das Entstehen von Tumoren (Janeway *et al.*, 2002).

Beim Menschen gibt es fünf verschiedene Immunglobulin-Klassen, die alle als Glykoproteine, jedoch mit unterschiedlichem Glykosylierungsmuster vorliegen (Abbildung 3.1, Arnold *et al.*, 2007). Immunglobulin D (IgD) kommt membranständig als Rezeptor bei B-Lymphozyten vor. Bei Kontakt mit einem Antigen proliferieren die B-Lymphozyten und differenzieren zu Plasmazellen, welche dann Antikörper produzieren (Geisberger *et al.*, 2006). Immunglobulin M (IgM) wird nach dem ersten Kontakt des Organismus mit dem Antigen produziert. Die Affinität dieser Antikörper ist wegen der kurzen Zeit der Affinitätsreifung noch nicht sehr hoch. Diese wird jedoch kompensiert indem jeweils fünf Monomere über Disulfidbrücken und ein Peptid (J-Kette) zu einem Pentamer verbunden werden (Boes, 2000). Etwa drei Wochen nach dem ersten Kontakt mit dem Antigen kommt es dann mit der Hilfe von T-Helferzellen zum

Klassenwechsel zu Immunglobulin A, Immunglobulin E oder Immunglobulin G (IgG). Immunglobulin A (IgA) wird vor allem in den Schleimhäuten sezerniert. Dort sind über Peptide meist zwei, aber auch bis zu vier Antikörper miteinander verbunden (Woof und Mestecky, 2005). Immunglobulin E (IgE) dient der Bekämpfung von Parasiten. Es wird auf den Membranen von Mastzellen gebunden und fungiert dort als Rezeptor. Die Mastzellen schütten bei Kontakt mit dem Antigen Entzündungsstoffe, wie Histamin, aus, wodurch weitere Immunzellen zu dem Parasiten kommen. Wird ein Allergen fälschlicherweise von einem Immunglobulin E gebunden, entsteht dadurch die allergische Reaktion im umliegenden Gewebe (Chang *et al.*, 2007).



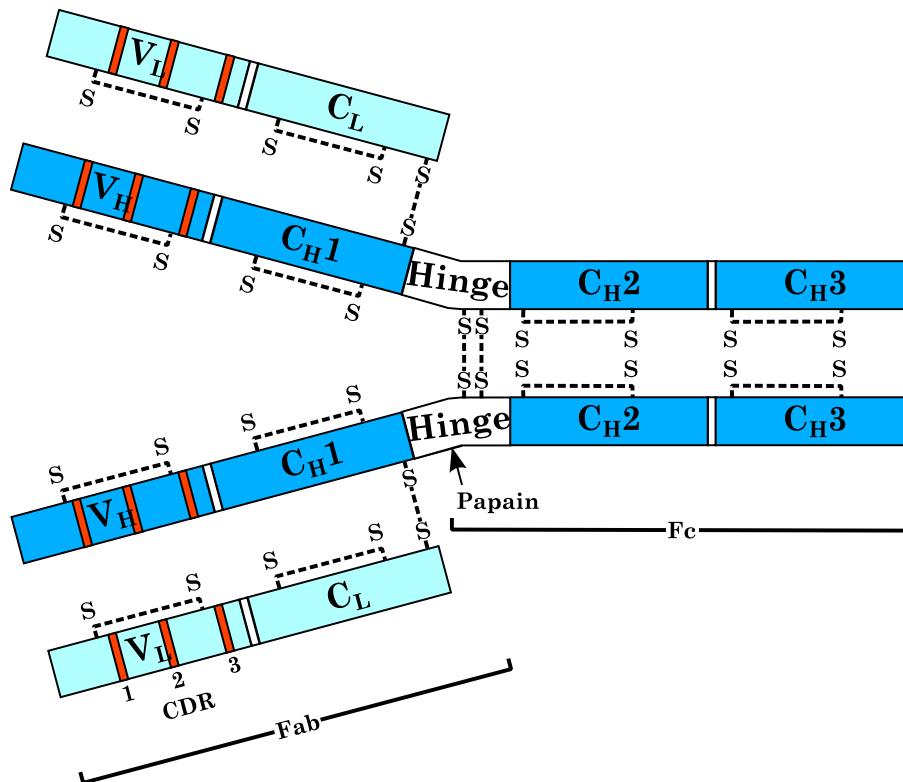
**Abbildung 3.1:** Glykosylierungsmuster der humanen Immunglobulin-Klassen. Eingezeichnet sind Glykosylierungsstellen (■), schwere Ketten (■), leichte Ketten (■) und die J-Kette (●) (nach Arnold *et al.*, 2007).

Immunglobulin G schützt aufgrund seiner hohen Serumverweilzeit vor einer erneuten Infektion (Meulenbroek und Zeijlemaker, 1996). Da sich diese Arbeit



mit Immunglobulin G befasst, wird im Folgenden näher auf diese Klasse eingegangen.

Die Immunglobulin G-Klasse wird in vier Subklassen unterteilt. Alle Immunglobulin G-Subklassen bestehen aus je zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung eines humanen Immunglobulin G. Die Papainschnittstelle, die den Antikörper in Fab- und Fc-Fragment spaltet, ist mit einem Pfeil markiert. Bei den schweren Ketten (■) sind die konstanten Domänen  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  und die variable Domäne  $V_H$  und bei den leichten Ketten (□) sind die konstante Domäne  $C_L$  und die variable Domäne  $V_L$  eingezeichnet. Die Bereiche, die die antigenbindende Tasche ausbilden sind orange markiert (CDR 1,2 und 3). Disulfidbrücken (S---S) und die hochflexible Hinge-Region sind ebenfalls eingezeichnet (nach Schroeder und Cavacini, 2010).

Eine leichte Kette besteht aus einer konstanten Domäne ( $C_L$ ) und einer variablen Domäne ( $V_L$ ). Eine schwere Kette besteht aus drei konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ) und einer variablen Domäne ( $V_H$ ). Zwischen den konstanten Domänen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  liegt ein hoch flexibler Bereich, die Hinge-Region. Die beiden schweren Ketten sind über Disulfidbrücken im Bereich der Hinge-Region

### 3 Theoretische Grundlagen

kovalent miteinander verbunden. Aufgrund von Unterschieden in der Länge der Hinge-Region bei den Immunglobulin G-Subklassen variieren die Molekülmasse, die Anzahl der Disulfidbrücken und die Serumverweilzeit (Tabelle 3.1). Jeweils eine schwere Kette und eine leichte Kette sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden. Der antigenbindende Bereich befindet sich auf der variablen Domäne der leichten und der schweren Kette ( $V_L$  und  $V_H$ ). Hier wird die antigenbindende Tasche pro Domäne aus drei kurze Bereiche (CDR 1, 2 und 3, engl. *Complementarity Determining Region*) gebildet.

**Tabelle 3.1:** Eigenschaften der Immunglobulin G-Subklassen (nach Meulenbroek und Zeijlemaker, 1996).

	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
Molekülmasse, kDa	146	146	170	146
Hinge-Region, AS	15	12	62	12
Disulfid-Brücken zwischen den schweren Ketten	2	4	11	2
Konzentration im adulten Serum, g L <sup>-1</sup>	4,9 - 11,4	1,5 - 6,4	0,11 - 0,85	0,03 - 2,0
Anteil des gesamt IgG, %	43 - 75	16 - 48	1,7 - 7,5	0,8 - 11,7
Serumhalbwertszeit, d	21	21	7	21

Durch die Protease Papain können die beiden schweren Ketten eines Antikörpers in der Hinge-Region gespalten werden. Dadurch zerfällt ein Antikörpermolekül in zwei Antigen-bindende Fragmente (Fab, engl. *antigen-binding fragment*) und in das kristallisierbare Fragment (Fc, engl. *crystallisable fragment*) (Mage, 1980). Auf jedem Fab-Fragmente liegt eine Bindestelle für das Antigen. Auf dem Fc-Fragment sind Effektorfunktionen lokalisiert, wie Komplementaktivierung oder Bindestelle des Fc-Rezeptor (Schroeder und Cavacini, 2010).

### 3.1.2 Medizinische Anwendung

Antikörper werden in der Medizin für Therapie und Diagnostik eingesetzt. Es finden sowohl polyklonale Antikörper, als auch monoklonale Antikörper (mAb) Anwendung. Bei polyklonalen Antikörpern werden Säugetiere oder Vögel mit dem Zielantigen immunisiert. Nach der Immunisierung werden die Antikörper aus dem Serum des Tieres gewonnen. Dies ist eine Mischung von Antikörpern, die verschiedene Sequenzen besitzen und unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen, weil eine Vielzahl unterschiedlicher Plasmazellen an der Produktion beteiligt waren. Bei monoklonalen Antikörpern hingegen stammen alle antikörperproduzierenden Zellen von einem einzigen Klon ab und produzieren dadurch Antikörper mit der gleichen Sequenz (Lo, 2005).

Polyklonale Antikörper sind einfacher und schneller in der Herstellung als monoklonale Antikörper (Lipman *et al.*, 2005). Bereits 1890 konnten erstmals Tiere durch Seren anderer Tiere gegen Diphtherie und Tetanus immunisiert werden (Kantha, 1991). Seither hat sich die passive Immuntherapie entwickelt, mit der Patienten geholfen werden kann, die sich durch Toxine oder Krankheitserreger in einer lebensbedrohlichen Situation befinden. Polyklonale Antikörper besitzen eine natürliche, durch die Herstellung bedingte Schwankung der Zusammensetzung. Somit können Unterschiede in der Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Produktionscharge entstehen. Dieser Nachteil gegenüber einem monoklonalen Antikörper kann aber auch ein Vorteil sein. Da polyklonale Antikörper verschiedene Epitope des Antigens erkennen, führen kleinere Veränderungen des Antigens meist zu keinem kompletten Verlust der Wirksamkeit (Lipman *et al.*, 2005). Für Langzeitanwendungen sind polyklonale Antikörper mit tierischem Ursprung nicht geeignet, da durch das eigene Immunsystem neutralisierende Antikörper gegen die tierischen Antikörper gebildet werden. Damit verlieren die tierischen Antikörper ihre Wirksamkeit und im schlimmsten Fall entwickelt der Patient einen lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock (Hansel *et al.*, 2010).

Benötigt man Antikörper mit einer spezifischen Wirkweise, werden monoklonale Antikörper verwendet. Von der US Behörde FDA sind zurzeit drei Fab-

Fragmente und 30 monoklonale Antikörper als Therapeutikum zugelassen (CenterWatch, 2012). In Deutschland sind 29 verschiedene medizinische Präparate basierend auf monoklonalen Antikörpern zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, 2012). Sie werden zur Therapie von Krebserkrankungen (wie Brustkrebs oder Non-Hodgkin-Lymphome); Autoimmunreaktionen, Allergien, Entzündungen (wie Rheumatische Arthritis oder allergisches Asthma) oder Infektionskrankheiten (wie Respiratorische-Synzytial-Viren) eingesetzt (Stockwin und Holmes, 2003).

#### 3.1.3 Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgte erstmals mittels der Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, 1975). Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler und César Milstein erhielten dafür im Jahre 1984 den Nobelpreis für Physiologie/Medizin (Nobelprize.org).

Bei der Hybridom-Technik werden antikörperproduzierende Zellen aus der Milz einer immunisierten Maus gewonnen und mit Myelomzellen fusioniert. Die Milzzellen können Antikörper sezernieren und in einem selektiven Medium überleben, jedoch sterben sie nach einigen Zellteilungen in Kultur ab. Die verwendeten Myelomzellen überleben in Kultur, können jedoch nicht in dem selektiven Medium überleben. Durch die Fusion entstehen Hybridomzellen, welche in Kultur Antikörper produzieren und in dem selektiven Medium überleben (Lo, 2005). Die Hybridomzellen werden selektiert und vereinzelt. Die einzelnen Klone werden vermehrt und die exprimierten Antikörper charakterisiert. Anschließend werden die besten Klone zur Produktion monoklonaler Antikörper verwendet (Janeway *et al.*, 2002). Auf diese Weise erhält man murine, also Maus-spezifische, monoklonale Antikörper. Solche murinen Antikörper lösen jedoch eine Immunreaktion im Menschen aus (Schroff *et al.*, 1985; Shawler *et al.*, 1985). Es werden anti-Mausantikörper gebildet, die den murinen monoklonalen Antikörper neutralisieren. Zusätzlich können noch Nebenwirkungen wie ein lebensbedrohlicher anaphylaktischer Schock auftreten.

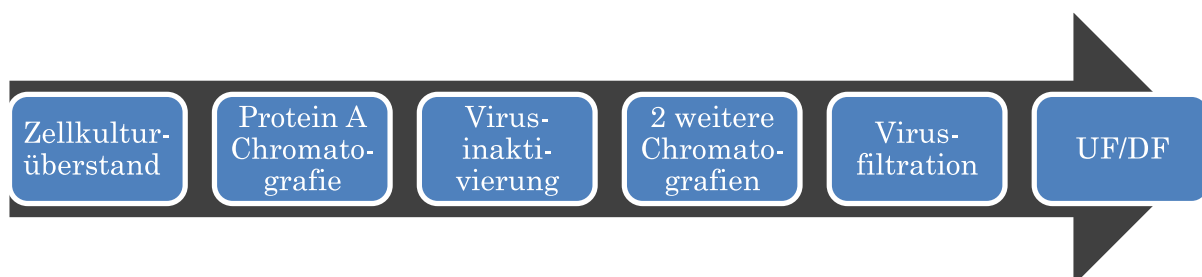
Um diese unerwünschten Immunreaktionen zu verhindern entstanden Weiterentwicklungen wie chimäre monoklonale Antikörper, humanisierte monoklonale Antikörper und humane monoklonale Antikörper. Bei einem chimären monoklonalen Antikörper werden, ausgehend von einem murinen monoklonalen Antikörper, die konstanten murinen Domänen der leichten und schweren Kette durch humane Domänen ersetzt (Boulianne *et al.*, 1984; Morrison *et al.*, 1984; Neuberger *et al.*, 1985). Durch diese Chimärisierung reduziert sich die Immunogenität (Khazaeli *et al.*, 1994). Eine weitere Verbesserung stellt ein humanisierter monoklonaler Antikörper dar. Hier ersetzt man in einem humanen monoklonalen Antikörper nur die CDR-Regionen durch entsprechenden Regionen des murinen monoklonalen Antikörpers (Jones *et al.*, 1986). Damit wird die Immunogenität im Vergleich zum chimären monoklonalen Antikörpern weiter reduziert. Jedoch ändert sich bei der Humanisierung oft unbeabsichtigt die Affinität des Antikörpers. Durch zeitaufwendige Mutationen wird dann versucht die Affinität wieder herzustellen. Eine Reduzierung der Immunogenität auf ein Minimum wird mit humanen monoklonalen Antikörpern erreicht. Diese werden entweder mit einer Phagenbibliothek oder mit transgenen Mäusen erzeugt. Bei der Phagenbibliothek werden humane CDR-Regionen randomisiert auf Phagen präsentiert und über Affinitäts-Chromatografie selektiert (Janeway *et al.*, 2002). Bei der zweiten Methode werden transgene Mäuse eingesetzt, bei denen Teile des Mausimmunsystems gegen ein menschliches Immunsystem getauscht wurden. Die Generierung der humanen monoklonalen Antikörper erfolgt dann einfach mit der Hybridom-Technik (Hudson und Souriau, 2003).

Die Verwendung von CHO-Zellen (engl. *Chinese hamster ovary cells*) ist Stand der Technik bei der Produktion monoklonaler Antikörper (Lo, 2005). Diese können Antikörper korrekt glykosylieren, wachsen auf serumfreiem Medium und sind in Suspension kultivierbar. Produkttiter von drei bis fünf Gramm pro Liter Kulturmedium sind dabei Standard (Chon und Zarbis-Papastoitsis, 2011; Wurm, 2004).

### 3.1.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Der Aufreinigungsprozess eines therapeutischen monoklonalen Antikörpers soll hohe Produktausbeuten liefern und reproduzierbar und skalierbar sein. Besonders wichtig ist zudem, dass er ein hochreines und somit für den Patienten sicheres Produkt liefert. Nach der Herstellung eines monoklonalen Antikörpers mittels Zellkultur liegen viele Verunreinigungen vor. Medienbestandteile sind im Produkt unerwünscht. Zusätzlich sind neben dem Zielprotein weitere Proteine der Zelle (HCP, engl. *host cell protein*), DNA und Zelltrümmer vorhanden, da die Zellen auch andere Proteine segregieren und da bei der Kultivierung immer ein Teil der Zellen abstirbt, wodurch der Zellinhalt freigesetzt wird. Des Weiteren entstehen während der Kultivierung Abbauprodukte und hochmolekulare Aggregate des Zielproteins. Zudem kann es während des Herstellungsprozesses zu unerkannten bakteriellen oder viralen Kontaminationen kommen. Deshalb ist standardmäßig eine Abreicherung oder Inaktivierung von Endotoxinen und Viren vorgeschrieben. (Shukla *et al.*, 2007b).

Für die Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern hat sich ein Standardprozessschema entwickelt, das in Abbildung 3.3 dargestellt ist.



**Abbildung 3.3:** Standardprozessschema der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers. Ultrafiltration / Diafiltration (UF/DF); (nach Shukla *et al.*, 2007b).

Am Ende eines solchen Prozesses sollen unter 100 ppm Zellproteine, unter 5 % hochmolekulare Aggregate des Produkts und unter 10 ng DNA pro Injektionsdosis vorliegen (Chon und Zarbis-Papastoitsis, 2011). In dem Standardprozess erfolgt als erstes die Abtrennung von Zellen und Zelltrümmer über Zentrifugation. Restliche Partikel werden mit einem Tiefenfilter und danach mit einem Membranfilter (0.2 µm Porengröße) entfernt.

Als zweiter Hauptschritt in dem Standardprozess wird eine Protein A-Affinitätschromatografie durchgeführt. Antikörper werden durch Protein A aus *Staphylococcus aureus* im Bereich des Fc-Fragments gebunden (Tashiro und Montelione, 1995). Bei neutralem pH wird der monoklonale Antikörper direkt aus geklärtem Zellkulturmedium an das immobilisierte Protein A gebunden. Anschließend wird der Antikörper bei einem sauren pH (2,5 - 4,0) wieder eluiert. Protein A-Chromatografie ist dabei so selektiv, dass eine Produktreinheit von über 95 % erreicht wird. Da der monoklonale Antikörper in einer konzentrierten Fraktion mit über 10 g L<sup>-1</sup> eluiert wird, wird zusätzlich eine Volumenreduktion erreicht.

Der größte Nachteil der Protein A-Chromatografie ist der Preis. Die Kosten für Protein A-Chromatografiemedium sind etwa 10-mal so hoch wie konventionelles Ionentaucher-Chromatografiemedium. Daher ist bei einer Maßstabsvergrößerung in der monoklonalen Antikörperaufreinigung Protein A-Chromatografie meist limitierend (Ghose *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). Zudem variiert die maximal mögliche Beladung des Protein A-Chromatografiemediums je nach Antikörper, Hersteller und verwendeter Flussrate zwischen 10 g L<sup>-1</sup> und 50 g L<sup>-1</sup>. Ein weiterer Nachteil der Protein A-Chromatografie besteht darin, dass sich stetig Protein A vom Säulenmaterial ablöst und nachträglich wieder von dem Produkt abgetrennt werden muss (Carter-Franklin *et al.*, 2007). Bei dem sauren pH der Elution aggregieren bis zu 20 % des Zielproteins, wodurch es zu Produktverlust kommen kann (Shukla *et al.*, 2005). Daher werden bei der Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern Alternativen zur Protein A-Chromatografie gesucht (Giffard *et al.*, 2011; Gottschalk, 2008).

Es ist bei der Aufreinigung eines therapeutischen monoklonalen Antikörpers vorgeschrieben, dass mindestens zwei geeignete, unabhängige Methoden Viren inaktivieren oder entfernen (FDA, 1998). Dabei muss gewährleistet werden, dass sich nach einer viralen Kontamination weniger als ein infektiöser Viruspartikel in 10<sup>6</sup> Einzeldosen befindet (Kern und Krishnan, 2006). Daher ist der dritte Hauptschritt in dem Standardprozess eine Virusinaktivierung bei niedrigem pH. Die Antikörperlösung wird bei einem pH ≤ 3,8 und einer Temperatur ≥ 14 °C

für mindestens 30 min inkubiert. Dies inaktiviert vor allem behüllte Viren wie Retroviren (Brorson *et al.*, 2003; Sofer, 2003).

Die zweite Methode ist eine Virusreduktion mittels Nanofiltration. Diese wird nach einem der letzten beiden Chromatografieschritte durchgeführt. Dabei wird wegen der geringen Flussraten durch den Filter meist der Chromatografieschritt gewählt, bei dem das Volumen geringer ist. Zum Einsatz kommen Filter mit Porengrößen von 20 nm, um auch kleinste unbehüllte Viren, wie Parvoviren, zurückzuhalten (Ireland *et al.*, 2004; Kern und Krishnan, 2006).

Um die Produktreinheit weiter zu erhöhen werden zwei zusätzliche Chromatografien durchgeführt. Hierfür werden Anionen-Austauschchromatografie (AEC), Kationen-Austauschchromatografie (CEC) oder Hydrophobe-Interaktionschromatografie (HIC) verwendet. Wie in Tabelle 3.2 dargestellt ist, reduzieren diese Chromatografiemethoden verschiedenen Verunreinigungen unterschiedlich gut. Anionen-Austauschchromatografie oder Kationen-Austauschchromatografie werden oft im Durchflussverfahren betrieben, da hier mehr Produkt mit der Säule aufgereinigt werden kann (Fahrner *et al.*, 2001). Oft ist es nötig zwischen den Chromatografiemethoden den Puffer mittels Ultrafiltration / Diafiltration (UF/DF) zu wechseln oder das Produkt zu konzentrieren.



**Tabelle 3.2:** Chromatografie-Methoden zur Reduzierung verschiedener Verunreinigungen. AEC: Anionen-Austauschchromatografie; CEC: Kationen-Austauschchromatografie; HIC: Hydrophobe-Interaktionschromatografie; HCP: Proteine aus der Zellkultur; (nach Liu *et al.*, 2010).

Verunreinigung	Geeignete Chromatografiemethode
Hochmolekulare Aggregate	AEC, CEC, HIC
HCP	AEC, HIC, teils CEC
Abgelöstes Protein A	AEC, CEC
DNA	AEC, CEC, HIC
Endotoxine	AEC, CEC
Viren	AEC

### 3.1.5 Formulierung

Die Produktformulierung ist der letzte Schritt im Aufreinigungsprozess. Hierbei wird meist mittels Ultrafiltration / Diafiltration der Puffer in den Formulierungspuffer getauscht und das Zielprotein konzentriert (van Reis *et al.*, 1997). Die Formulierung verfolgt zwei große Ziele. Zu einem soll eine genügend hohe Stabilität des Proteins für eine ausreichend lange Lagerung erreicht werden, indem Aggregation, Degradation und Denaturierung verhindert werden. Zum anderen wird das Protein in eine medizinische Darreichungsform gebracht, die für den Patienten verträglich ist und eine gute Pharmakokinetik aufweist (Frokjaer und Otzen, 2005).

Die Stabilität eines Proteins wird von der Lagertemperatur, dem pH, Additiven und der Proteinkonzentration beeinflusst (Wang, 2005). Niedrige Lagertemperaturen führen zu einer erhöhten Stabilität des Produkts (Franks, 1995). Einfrier-Auftau-Zyklen sollen jedoch wegen einer erhöhten Aggregationsbildung vermieden werden (Kerwin *et al.*, 1998; Wang, 2000). Der pH kann über geeignete Puffersysteme in einem optimalen Bereich gehalten werden. Die Zugabe von Zuckern wie Sucrose oder Trehalose, Polymeren wie

Polyethylenglykol (PEG), Cyclodextrinen wie derivatisiertem  $\beta$ -Cyclodextrin oder freien Aminosäuren, wie Arginin oder Glutamat kann Proteine stabilisieren (De Bernardez Clark *et al.*, 1999; Golovanov *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2010; Timasheff, 2002). Dabei schirmen diese Additive vermutlich Bereiche des Proteins ab, die eine Aggregation begünstigen würden. Bei hohen Proteinkonzentrationen kann es zu einer hohen Viskosität und zur Produktaggregation kommen (Shukla *et al.*, 2007b). Die finale Proteinkonzentration wird bei monoklonalen Antikörpern durch die Darreichungsform festgelegt.

Da Proteine nicht oral verabreicht werden können, werden sie parenteral verabreicht. Dies erfolgt als Injektion, Infusion oder Implantation (Frokjaer und Otzen, 2005). Von diesen Möglichkeiten ist die subkutane Injektion bevorzugt, da diese ambulant durchgeführt werden kann. Bei monoklonalen Antikörpern werden hohe Dosen von 0,1 bis 1 g benötigt. Da bei einer subkutanen Injektion das Injektionsvolumen unter 1,5 mL liegen muss, wird eine sehr hohe Proteinkonzentration von über  $100 \text{ g L}^{-1}$  benötigt (Miller *et al.*, 2010; Shire *et al.*, 2004). Proteine werden meistens als wässrige Lösungen oder Suspensionen verabreicht. Das Medikament wird gebrauchsfertig in Spritzen abgepackt oder in einer stabileren Form (z.B. als Lyophilisat) geliefert, welches kurz vor der Verabreichung rekonstituiert wird (Frokjaer und Otzen, 2005). Bei einer subkutanen Injektion gibt keine vorgeschriebenen Maximalwerte für die Kraft oder Dauer einer Injektion. Die maximale applikable Kraft bei einer manuellen Injektion wird mit 30 N angenommen (Adler, 2012; Burckbuchler *et al.*, 2010). Da sehr dünne Injektionsnadeln (Nadelgröße  $\geq 25$  Gauge, siehe Tabelle 3.3) verwendet werden, sollte die dynamische Viskosität des Präparats nicht über  $50 \text{ mPa s}$  liegen. Bei einer höheren Viskosität wird der Gegendruck bei der Injektion zu hoch oder die Injektion dauert zu lang. (Miller *et al.*, 2010; Pfutzner *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2003).

**Tabelle 3.3:** Dünne Injektionsnadeln (nach Medical Tube Technology 2012).

<b>Nadelgröße, G</b>	<b>Außendurchmesser, mm</b>	<b>Innendurchmesser, mm</b>	<b>Wandstärke, mm</b>
25	0,516	0,262	0,127
26	0,465	0,262	0,102
27	0,414	0,211	0,102
28	0,363	0,185	0,089
29	0,338	0,185	0,076
30	0,312	0,160	0,076

Kristallsuspensionen können im Vergleich zu Lösungen eine geringere Viskosität und höhere Wirkstoffkonzentrationen ermöglichen (Yang *et al.*, 2003).

Die Formulierung eines Wirkstoffs kann die Pharmakokinetik beeinflussen, immunogene Nebenwirkungen reduzieren und sogar den Wirkstoff gezielt an seinen Wirkort bringen. Durch Acylierungen wird die Affinität des Wirkstoffs zu Albumin und damit die Plasmahalbwertszeit erhöht. Dieser Effekt ist stärker bei kleinen Proteinen oder Peptiden ausgebildet. Durch PEGylierungen werden immunogene Epitope des Wirkstoffs sterisch verdeckt und die Serumhalbwertszeit verlängert (Kurtzhals *et al.*, 1995; Markussen *et al.*, 1996; Veronese und Pasut, 2005). Hydrogele, Nanokapseln, Mikrosphären, Liposome und feste Nanopartikel ermöglichen eine langsame Wirkstoff-Freisetzung oder eine bevorzugte Freisetzung am Wirkort (Coviello *et al.*, 2007; Gabizon *et al.*, 2006; Lallana *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Bei einer subkutanen Injektion können Proteinkristallsuspensionen ohne den Einsatz von Zusätzen, die Nebenwirkungen auslösen können, eine verlängerte Wirkstofffreisetzung ermöglichen (Pechenov *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003).

### 3.2 Proteinkristallisation

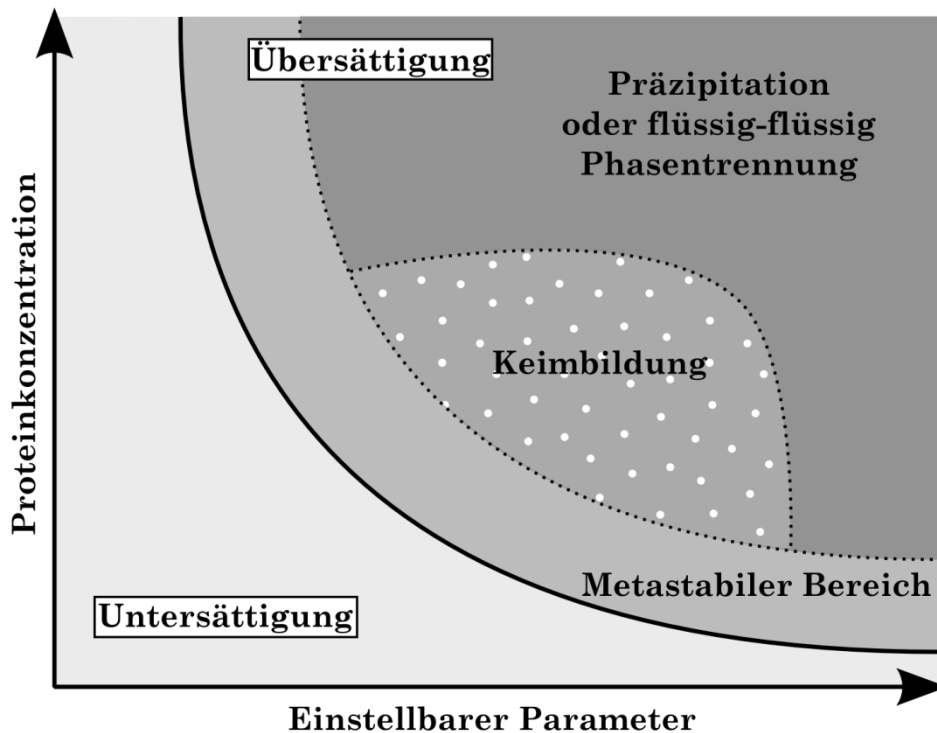
#### 3.2.1 Keimbildung und Kristallwachstum

Die Kristallisation eines Proteins unterscheidet sich nur wenig von der Kristallisation kleinerer Moleküle. Sie stellt einen Phasenübergang erster Ordnung dar und besteht aus zwei Schritten: Keimbildung und Kristallwachstum. Die Keimbildung ist der erste Übergang von einem vollkommen ungeordneten in einen geordneten Zustand. Anschließend folgt das Kristallwachstum, wobei weiterer Proteinmoleküle aus der Lösung an den Kristallkeim geordnete anlagert werden (Chayen, 2004; McPherson, 2004).

Bei der Keimbildung wird heterogene von der homogenen Keimbildung unterschieden. Eine heterogene Keimbildung erfolgt an Fremdpartikeln, falls deren Oberflächenstruktur dazu geeignet ist, das Kristallwachstum zu unterstützen. Bei der homogenen Keimbildung bestehen die Keime nur aus dem zu kristallisierenden Protein. Hier wird die primäre Keimbildung von der sekundären Keimbildung unterschieden. Bei der primären Keimbildung bilden sich die Keime spontan im Keimbildungsbereich aus einer übersättigten Lösung. Bei der sekundären Keimbildung dienen kleine Bruchstücke von bereits vorhandenen Kristallen als neue Keime (Chayen, 2004; Harrison *et al.*, 2003).

Die Übersättigung einer Proteinlösung ermöglicht erst die Keimbildung und das Kristallwachstum. Eine Übersättigung liegt vor, wenn die Proteinkonzentration der Lösung über der Konzentration der Löslichkeitsgrenze liegt. Dabei wird der Grad der Übersättigung  $S$  als Quotient der vorliegenden Proteinkonzentration und der Konzentration der Löslichkeitsgrenze definiert. (Feher und Kam, 1985). Eine übersättigte Lösung kann über viele Wege aus einer untersättigten Lösung hergestellt werden. Die Zugabe von Fällungsmitteln oder einigen Additiven steigert die Übersättigung. Die Temperatur kann ebenfalls einen Einfluss auf die Löslichkeit haben. Bei einigen Proteinen, wie bei Lysozym aus Hühnereiweiß, sinkt die Löslichkeit bei einer Temperaturerniedrigung. Andere Proteine, wie Rinder-Chymosin, zeigen keine Temperaturabhängigkeit und bei wieder anderen Proteinen, wie Albumin aus Pferdeserum, steigt die Löslichkeit mit sinkender

Temperatur (Christopher *et al.*, 1998; Rosenberger *et al.*, 1993). Der pH kann ebenfalls einen Einfluss auf die Löslichkeit eines Proteins haben. Die Löslichkeit eines Proteins ist am geringsten bei einem pH nah des isoelektrischen Punkts des Proteins (Pace *et al.*, 2009). Für die Keimbildung wird eine höhere Übersättigung benötigt als für das Kristallwachstum. In Abbildung 3.4 wird in einem Phasendiagramm der Keimbildungsbereich gezeigt.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Keimbildungsbereichs in einem Phasendiagramm. Einstellbare Parameter, die zu einer Erhöhung der Übersättigung führen, können unter anderem Fällungsmittel, Additive, pH und Temperatur sein (nach Chayen, 2004).

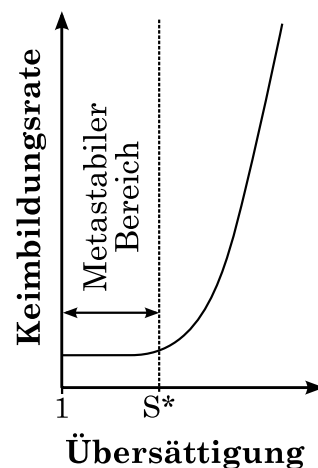
Bei einer Untersättigung liegt das Protein stabil in der Lösung vor. Bei einer Übersättigung wird die Löslichkeit überschritten. Bei leichter Übersättigung, im metastabilen Bereich, findet innerhalb einer bestimmten Zeit keine Keimbildung oder Präzipitation statt. Erst durch eine weitere Erhöhung der Übersättigung kommt es zur Ausbildung einer zweiten Phase. Je nachdem, welche Bedingungen vorliegen, kann diese zweite Phase aus amorphen Präzipitat, Flüssigkeit oder Kristallen bestehen.

Die Gibbsche freie Energie der Kristallisation kann aus einem Volumenanteil und einem Oberflächenanteil berechnet werden (Garcia-Ruiz, 2003):

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_A = -N \cdot (\mu_\alpha - \mu_\beta) + A \cdot \gamma = -N \cdot (k \cdot T \cdot \ln S) + A \cdot \gamma \quad (3.1)$$

$A$	Oberfläche des Kristalls, $\text{m}^2$
$k$	Boltzmann-Konstante, $1,3806488 \text{ J K}^{-1}$
$T$	Temperatur, $\text{K}$
$N$	Anzahl an Molekülen im Kristall, -
$S$	Übersättigung, -
$\Delta G$	Gibbssche freie Energie der Kristallisation, $\text{J}$
$\Delta G_A$	Oberflächenenergie, $\text{J}$
$\Delta G_V$	Volumenenergie, $\text{J}$
$\gamma$	spezifische Oberflächenenergie, $\text{J m}^{-2}$
$\mu_\alpha$	chemisches Potential eines Moleküls in Lösung, $\text{J}$
$\mu_\beta$	chemisches Potential eines Moleküls im Kristall, $\text{J}$

Es existiert eine Energiebarriere bei der Keimbildung, da die Anzahl der Moleküle im Keim noch sehr gering ist und damit die Oberflächenenergie noch größer ist als die Volumenenergie. Mit zunehmender Übersättigung wird die Volumenenergie größer, wodurch die Energiebarriere der Keimbildung kleiner wird. Die Keimbildungsrate steigt dadurch mit steigender Übersättigung überproportional an (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5:** Einfluss der Übersättigung auf die Keimbildungsrate.  $S^*$  markiert die minimale Übersättigung, bei der sich Kristallkeime innerhalb einer definierten Zeit bilden (nach Garcia-Ruiz, 2003).

Ist jedoch die Übersättigung zu hoch, wird die Energiebarriere verschwindend klein und es kommt zur amorphen Präzipitation des Proteins. (Garcia-Ruiz,

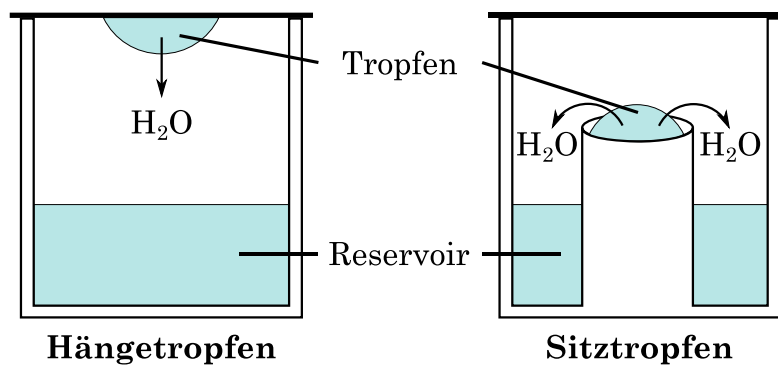
2003). Werden im Keimbildungsbereich Kristalle gebildet, so wachsen diese und reduzieren damit die Übersättigung. Die Kristalle wachsen so lange weiter bis die Proteinkonzentration der Lösung gleich der Löslichkeit ist (Asherie, 2004; McPherson, 2004). Verunreinigungen können die Geschwindigkeit des Kristallwachstums bremsen, indem sie die Diffusion zum Kristall behindern oder Kristalloberflächen blockieren (Harrison *et al.*, 2003; Sangwal, 1993).

### 3.2.2 Kristallisationsmethoden

Kristallisation von Proteinen wird hauptsächlich als Mittel der Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung verwendet. Hierbei wird man einen qualitativ hochwertiger, möglichst großer Einkristall mit guten Beugungseigenschaften benötigt (Harrison *et al.*, 2003). Daher wurden die meisten Kristallisationsmethoden für die Strukturaufklärung entwickelt. Es gibt vier grundsätzliche Kristallisationsmethoden: Die Dampfdiffusion, die Diffusion über eine Phasengrenze, die Dialyse und das Satzverfahren (Hampton Research, 2001).

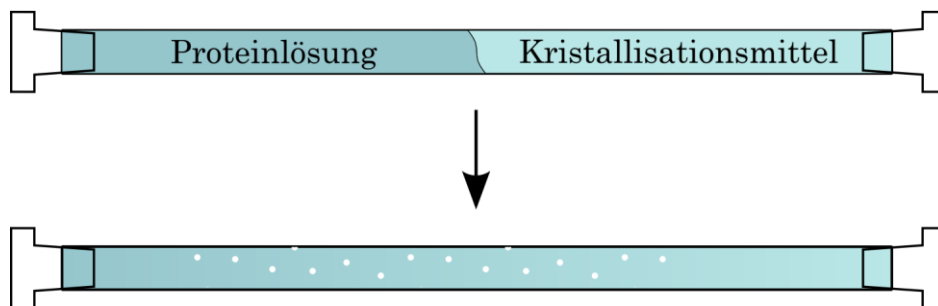
Das Dampfdiffusionsverfahren ist am gebräuchlichsten bei der Suche nach Kristallisationsbedingungen. Hier werden in einem kleinen Tropfen (1 - 40  $\mu\text{L}$ ) eine Proteinlösung und eine Reservoirlösung gemischt. Die Reservoirlösung enthält die Kristallisationsmittel wie Fällungsmittel und Additive. Ein großes Volumen an Reservoirlösung (etwa 1 mL) und der zuvor gemischte Tropfen werden räumlich getrennt in ein Gefäß gebracht und dann bei einer konstanten Temperatur aufbewahrt (Abbildung 3.6). Die Konzentration an Fällungsmittel im Tropfen ist am Anfang niedriger als in der Reservoirlösung. Wegen der unterschiedlichen Dampfdrücke von Tropfen und Reservoir diffundiert mit der Zeit das Lösungsmittel (meist Wasser) über die Gasphase aus dem Tropfen in das Reservoir. Somit steigt die Übersättigung im Tropfen an. Falls der Keimbildungsbereich durchquert wird, findet Kristallisation stattfinden. Da auf diese Weise in einem einzelnen Ansatz viele verschiedene Konzentrationen untersucht werden, eignet sich das Dampfdiffusionsverfahren besonders zum

Auffinden von Kristallisationsbedingungen. Üblicherweise werden Dampfdiffusionsversuche entweder im Hängetropfen oder im Sitztropfen durchgeführt. Im Hängetropfenversuch hängt der Tropfen an einem silikonisierten Glas im Deckel des Gefäßes. Beim Sitztropfenversuch sitzt der Tropfen auf einem Podest im Gefäß (Chayen, 1998; Hampton Research, 2001).



**Abbildung 3.6:** Kristallisation im Dampfdiffusionsverfahren (nach Hampton Research, 2001).

Bei der Kristallisation mittels Diffusion über eine Phasengrenze wird in eine kleine Kapillare die Proteinlösung und das Kristallisationsmittel gefüllt, wobei versucht wird eine möglichst scharfe Phasengrenze zu erzeugen (Abbildung 3.7).



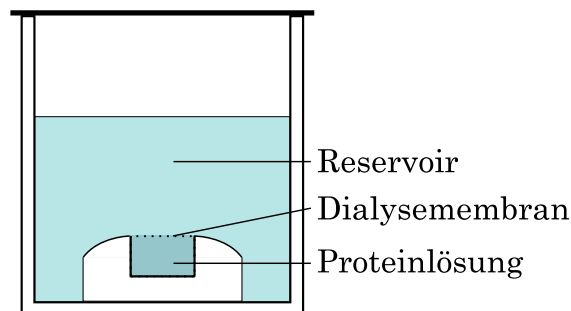
**Abbildung 3.7:** Kristallisation mittels Diffusion über eine Phasengrenze (nach Hampton Research, 2001).

Mit der Zeit diffundieren dann die beiden Lösungen ineinander, wobei sich Gradienten der Fällungsmittelkonzentration und Proteinkonzentration ausbilden. Mit dieser Technik können in einem Ansatz verschiedene Kombinationen von Fällungsmittel- und Proteinkonzentration nach Kristallisationsbedingungen untersucht werden. Diese Technik ist nicht so



verbreitet wie die Dampfdiffusionsmethoden (García-Ruiz *et al.*, 2001; Hampton Research, 2001; Littke und John, 1984).

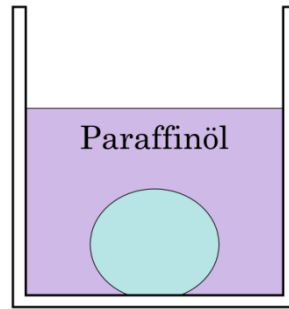
Bei der Kristallisation mittels Dialyse wird die Proteinlösung in eine Dialysekammer gefüllt und mit einer Dialysemembran verschlossen. Anschließend wird diese Dialysekammer in das Kristallisationsmittel gelegt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Kristallisation im Dialyseverfahren (nach Hampton Research, 2001).

Durch die Dialysemembran können Salze und kleinere Moleküle diffundieren, während das Protein in der Dialysekammer zurückgehalten wird. Somit bleibt die Proteinkonzentration konstant, aber die Ionenstärke und der pH der Lösung verändern sich mit der Zeit. Damit kann mit dieser Methode eine Übersättigung sowohl über den pH als auch über Aussalzeffekte erreicht werden (Hampton Research, 2001; McPherson, 2004).

Bei der Kristallisation im Mikrosatzverfahren werden beim Versuchsstart die Proteinlösung und die Kristallisationslösung homogen miteinander vermischt. Danach wird die Lösung mit Paraffinöl überschichtet, um Verdunstung zu verhindern (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Kristallisation im Mikrosatzverfahren (nach Hampton Research, 2001).

Eine weitere Veränderung der Lösung durch Diffusion findet nicht statt. Somit wird mit einem Ansatz nur eine einzige Bedingung betrachtet. Dadurch ist die Methode nicht zum Suchen von Kristallisationsbedingungen geeignet. Zudem können Substanzen die mit dem Öl interagieren nicht verwendet werden. Da diese Technik aber eine hohe Reproduzierbarkeit besitzt, eignet sie sich gut für die Erstellung von Phasendiagrammen, mit deren Hilfe die Kristallisation optimiert werden kann. (Chayen, 1998; Hampton Research, 2001). Ein weiterer großer Vorteil der Kristallisation im Satzverfahren besteht in der Möglichkeit, die Bedingungen bei einer Maßstabsvergrößerung in einen Rührkessel zu übertragen. Diese ist mit den anderen genannten Verfahren kaum zu bewerkstelligen. (Harrison *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005).

#### 3.2.3 Vorteile einer kristallinen Formulierung

Eine kristalline Formulierung von Proteinen bietet viele Vorteile gegenüber einer flüssigen oder amorphen Formulierung. Bei der Lagerung besteht eine höhere Stabilität durch die Kristallgitterenergie (Drenth und Haas, 1992) und durch hohe Proteinkonzentrationen kann Platz gespart werden (Schmidt *et al.*, 2004). Als medizinische Formulierung können die Kristalle zu einer verbesserten Pharmakokinetik führen und subkutane Injektionen mit hohen Wirkstoffdosen ermöglichen (Shukla *et al.*, 2007a; St Clair *et al.*, 1999). Jedoch dürfen bei der Kristallisation nur ungefährliche, pharmazeutisch zugelassene Chemikalien verwendet werden (Peters *et al.*, 2005).

Die Kristallgitterenergie führt zu einer höheren Stabilität kristalliner Formulierungen (Shenoy *et al.*, 2001). Drenth und Haas (1992) schätzten die Differenz der freien Energie gegenüber einer Lösung auf 3 – 6 kcal mol<sup>-1</sup>. Nach einer Lagerzeit wiesen sich kristalline Formulierungen durch eine erhöhte Stabilität, eine erhöhte Aktivität und weniger Aggregatbildung aus (*Aspergillus oryzae* Amylase (Pechenov *et al.*, 2004), Lysozym aus Hühnereiweiß (Elkordy *et al.*, 2002; Elkordy *et al.*, 2004), *Aspergillus niger* Glucoseoxidase, *Candida rugosa* Lipase (Shenoy *et al.*, 2001), ein monoklonalen Antikörper (Yang *et al.*, 2003) und Insulin (Basu *et al.*, 2004)).

Shenoy *et al.* (2001) zeigte, dass getrocknete Kristalle stabiler waren als ein entsprechendes amorphes Lyophilisat. Kristallsuspensionen und Lösungen dagegen waren nicht so stabil wie die getrockneten Formulierungen. Kristallsuspensionen zeigen aber eine höhere Stabilität als Lösungen (Abbildung 3.10). Mit Hilfsstoffen wie Trehalose, Sucrose oder Lactitol konnte die Stabilität aller Formulierungen noch erhöht werden.

### Lagerstabilität



**Abbildung 3.10:** Vergleich der Lagerstabilität von unterschiedlichen Formulierungen (nach Shenoy *et al.*, 2001)

Zusätzlich sind Proteine im Kristall geschützter vor chemischen Modifikationen und proteolytischer Degradation (Basu *et al.*, 2004; Brange *et al.*, 1992; Halban *et al.*, 1987).

Während viel Wissen zu kristallinen, medizinischen Formulierungen bei kleinen Molekülen existiert, gibt es auf dem Gebiet kristalliner, medizinischer Proteine wenig Erfahrung (Basu *et al.*, 2004; Margolin und Navia, 2001). Lediglich bei Insulin finden kristalline Formulierungen Anwendung (Low *et al.*, 2007; Merkle und Jen, 2002; Shire *et al.*, 2004). Diese zeigen eine hohe Bioverfügbarkeit und eine verlängerte Pharmakokinetik (Hallas-Moller *et al.*, 1952). Die Kristallsuspensionen können sogar in Injektionsgeräten mit sehr feinen 30 G

Nadeln verabreicht werden (Basu *et al.*, 2004). Pechenov *et al.* (2004) beschreibt Amylasekristallsuspensionen mit einer langsamen Wirkstofffreisetzung und hohen Proteinkonzentrationen von bis zu 300 g L<sup>-1</sup>. Speziell bei therapeutischen monoklonalen Antikörpern, die hohe Einzeldosen benötigen, wird ein hohes Potential für kristalline Formulierungen gesehen (Basu *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 1995; Pechenov *et al.*, 2004; Shenoy *et al.*, 2001; Shire *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003). Yang *et al.* (2003) zeigten in Tierversuchen, dass hochdosierte Formulierungen der monoklonalen Antikörper Infliximab und Trastuzumab möglich sind. Hochkonzentrierte Kristallsuspensionen von Trastuzumab mit 200 g L<sup>-1</sup> konnten injiziert werden und führten zu keinen Nebenwirkungen. Bei Infliximab-Kristallsuspensionen wurde eine deutlich geringere Viskosität als bei der flüssigen Formulierung festgestellt und die Serumverweilzeit war gegenüber der flüssigen Formulierung verlängert.

### 3.3 Kristallisation im Rührkessel

Die Kristallisation von Proteinen in einem großtechnischen Prozess wird fast ausschließlich im Satzverfahren durchgeführt. Hier muss eine aktive Durchmischung der Kristallsuspension erfolgen. Dies geschieht meist in einem Rührkessel (Price, 1997; Schmidt *et al.*, 2005). Ohne Durchmischung setzen sich die Kristalle am Boden ab und es kommt zu einer Diffusionslimitierung des Kristallwachstums. Zusätzlich wachsen die Kristalle ineinander und es entsteht ein großes Kristallagglomerat. Die Kristalloberfläche ist dadurch geringer als bei einzelnen Kristallen, wodurch der Kristallisationsprozess verlangsamt wird. Zudem bilden sich in Agglomeraten Einschlüsse von Verunreinigungen, wodurch die Aufreinigungseffizienz herabgesetzt wird (Harrison *et al.*, 2003). Für eine Abtrennung der Kristalle aus der Suspension mittels Filtration sind Agglomerate ebenfalls unvorteilhaft. Eine Grundvoraussetzung für eine aktive Durchmischung bei der Kristallisation ist, dass die Proteinkristalle stabil genug sind um den auftretenden Scherkräften standzuhalten (Judge *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2005). Die Stabilität der Kristalle variiert dabei in Abhängigkeit von Protein und Kristallgitter.

Eine Maßstabsvergrößerung der Proteinkristallisation in einem Rührkessel ist in der Literatur wenig beschrieben. Generell werden bei der Maßstabsvergrößerung geometrisch ähnliche Systeme verwendet, wobei alle einander entsprechenden Längen in einem Rührapparat in einem festen Verhältnis zueinander stehen (Stieß, 2009). Als zweiter Faktor, neben der geometrischen Ähnlichkeit des Reaktors, muss die Rührerdrehzahl angepasst werden. In der Literatur werden hierbei für die Proteinkristallisation verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Nienow (1976) empfiehlt die minimale Rührerdrehzahl zu verwenden, die ausreicht die Kristalle in Suspension zu halten. Schmidt *et al.* (2005) hält den mittleren Leistungseintrag durch den Rührer konstant. Zudem kann auch die Rührerumfangsgeschwindigkeit konstant gehalten werden, um die Scherkräfte an den Rührerspitzen konstant zu halten. Nach Stieß (2009) wird eine konstante Rührerumfangsgeschwindigkeit zum schonenden Suspendieren verwendet. Diese drei Methoden können aber nicht gemeinsam angewandt werden. Harrison *et al.*

(2003) und Genck (2003) empfehlen daher die Methode der Maßstabsvergrößerung auf Basis von experimentellen Daten auszusuchen.

#### 3.3.1 Suspendieren

Eine Maßstabsvergrößerung über die minimale Rührerdrehzahl ( $n_{\min}$ ), die ausreicht die Kristalle in Suspension zu halten, ermöglicht ein schonendes Verfahren. Bei diesem werden die empfindlichen Proteinkristalle nur geringen Scherkräften ausgesetzt. Gleichzeitig wird das Sedimentieren der Kristalle verhindert und somit die Bildung von Kristallagglomeraten reduziert. Im Labormaßstab mit gläsernen Gefäßen kann das Sedimentieren der Kristalle beobachtet werden. Bei Reaktoren aus Edelstahl ist dies nicht mehr möglich.

Theoretisch kann das Suspendieren von Partikeln auf zwei Wege beschrieben werden. Über den Sinkvorgang der Partikel in einer homogenen Suspension oder ausgehend von sedimentierten Partikeln über die Bedingung, dass alle Partikel aufgewirbelt werden müssen. Die zutreffendere Betrachtungsweise hängt vom Verhältnis aus Partikeldurchmesser und Behälterinnendurchmesser ab (Voit und Mersmann, 1985). Eine Abschätzung der minimalen Drehzahl lässt sich mit Hilfe des experimentell gefundenen Zusammenhangs von Zwietering (1958) verallgemeinert von Nienow (1968) durchführen:

$$n_{\min} = \frac{B \cdot \nu^{0,1} \cdot d_p \cdot \left(g \cdot \frac{\rho_s - \rho_L}{\rho_L}\right)^{0,45} \cdot X^{0,13}}{d^{0,85}} \quad (3.2)$$

$B$	geometrische Konstante, -
$d_p$	Partikeldurchmesser, m
$d$	Rührerdurchmesser, m
$g$	Erdbeschleunigung, 9,80665 m s <sup>-2</sup>
$n_{\min}$	Minimale Rührerdrehzahl um Kristalle in Suspension zu halten, s <sup>-1</sup>
$X$	Suspensionsdichte, kg kg <sup>-1</sup>
$\nu$	kinematische Viskosität, m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$\rho_L$	Dichte der flüssigen Phase, kg m <sup>-3</sup>
$\rho_s$	Dichte der festen Phase, kg m <sup>-3</sup>

Diese Abschätzung gilt bei einem konstanten Verhältnis von Behälterinnendurchmesser zu Abstand von Rührer zu Gefäßboden.  $B$  ist eine Konstante, die vom Rührertyp und dessen Position im Reaktor abhängig ist. Da Parameter wie die Konstante  $B$  und die Dichte der Kristalle erst bestimmt werden müssen und da sich im Laufe eines Kristallisationsprozess der Partikeldurchmesser, die Suspensionsdichte und die Viskosität verändern, ist die experimentelle Bestimmung von  $n_{\min}$  bei einer Maßstabsvergrößerung praktikabler (Voit und Mersmann, 1985). Die meisten in der Literatur betrachteten Systeme waren bewehrt, verwendeten eine Rushton-Turbine als Rührer und hatten einen flachen Boden (Brucato *et al.*, 2010). Unbewehrte Systeme und axial fördernde Rührer sind für die Proteinkristallisation von Vorteil (Hekmat *et al.*, 2007; Judge *et al.*, 1995). Unbewehrte Reaktoren lassen sich besser reinigen (Rousseaux *et al.*, 2001), wodurch die hohen Anforderungen an die Reinheit bei pharmazeutischen Produkten einfacher erfüllt werden (Assirelli *et al.*, 2008). Brucato *et al.* (2010) berichtet zudem von einem höheren Massentransferkoeffizient bei gleichem mittlerem Leistungseintrag in unbewehrten Systemen.

### 3.3.2 Mittlerer Leistungseintrag

Der mittlere Leistungseintrag  $\bar{\epsilon}$  wird zur Maßstabsvergrößerung in der Proteinkristallisation verwendet (Schmidt *et al.*, 2004). Die mittlere Leistung, die in das System durch Rühren eingetragen wird, kann leicht über das Drehmoment an der Rührerachse bestimmt werden:

$$P = M \cdot 2\pi \cdot n \quad (3.3)$$

$M$	Drehmoment, N m
$n$	Rührerdrehzahl, s <sup>-1</sup>
$P$	Leistung, W

Wird ein bewehrter Reaktor im turbulent durchmischten Bereich betrieben, kann auch die für den Rührer charakteristische Newton-Zahl zur Berechnung der mittleren Leistung verwendet werden:

$$P = Ne \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d^5 \quad (3.4)$$

$d$	Rührerdurchmesser, m
$n$	Rührerdrehzahl, s <sup>-1</sup>
$Ne$	Newton-Zahl, -
$P$	Leistung, W
$\rho$	Dichte der Flüssigkeit, kg m <sup>-3</sup>

Da Proteinkristalle recht weich sind (Chernov, 2003), wird bei der Proteinkristallisation ein ähnlicher mittlerer Leistungseintrag verwendet wie bei scherempfindlichen Säugetierzellen. Diese werden bei 1 - 50 W m<sup>-3</sup> kultiviert (Rathore *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2005). Zum Vergleich wird bei einer mikrobiellen Fermentation ein mittlere Leistungseintrag von 1000 - 8000 W m<sup>-3</sup> verwendet (Weuster-Botz *et al.*, 2005; Wilde *et al.*, 2009).

#### 3.3.3 Maximale lokale Energiedissipation

Bei Dispergiervorgängen ist eine Zerkleinerung der Partikel gewünscht. Es gibt jedoch Prozesse, wie die Kristallisation, bei denen eine Zerstörung der Partikel zu vermeiden ist (Biedermann und Henzler, 1994). Die in das Medium durch das Rühren eingetragene Leistung verteilt sich nicht gleichmäßig im Reaktor. Es entstehen Wirbel, die zu starken lokalen Schwankungen der Partikelbeanspruchung führen. Die größten Wirbel werden auf die halbe Rührerblatthöhe geschätzt. Diese zerfallen dann kaskadenartig und geben dabei ihre Bewegungsenergie an immer kleinere Wirbel weiter. Dieser Zerfall findet solange statt, bis die kinetische Energie der Wirbel über Reibung in Wärmeenergie (Dissipation) umgewandelt ist. Die maximale lokale Energiedissipation ist ein Maß für die maximale Beanspruchung, die ein Partikel in einem Rührreaktor erfahren kann (Henzler, 2000). Zur experimentellen Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation in einem Rührreaktor



bieten sich Modellpartikelsysteme mit geringer Dichtedifferenz zu Wasser an. Solche Modellpartikelsysteme sind beispielsweise ein Ton/Polymer-Flockensystem (Hoffmann *et al.*, 1992), ein Enzymharz und eine Öl/Tensid/Wasser-Emulsion Anwendung (Henzler und Biedermann, 1996). Bei der Öl/Tensid/Wasser-Emulsion besteht folgende Proportionalität zwischen dem mittleren Tropfendurchmesser und der maximalen lokalen Energiedissipation:

$$\varepsilon_{max} \propto \frac{1}{D50_v^a} \quad (3.5)$$

$a$	Exponentialfaktor, -
$D50_v$	mittlere Volumendurchmesser der Tropfen, $\mu\text{m}$
$\varepsilon_{max}$	maximale lokale Energiedissipation, $\text{W kg}^{-1}$

Bei einer höheren maximalen Energiedissipation entstehen kleinere Tropfen. Da sich die Festigkeit der Tropfen mit dem Tropfendurchmessern verändert, ist zur Beschreibung der Exponentialfaktor  $a$  nötig (Henzler und Biedermann, 1996).

Liepe *et al.* (1988) führten Experimente mit einem Öl/Tensid/Wasser-Gemisch durch. Dabei bestimmten sie die maximale lokale Energiedissipation mit Hilfe der theoretische Grundlagen von Batchelor (1953) mit folgender Gleichung:

$$\varepsilon_{max} = c_D \frac{u^3}{d} \quad (3.6)$$

$c_D$	Dissipationsbeiwert, -
$d$	Rührerdurchmesser, m
$u$	Rührerumfangsgeschwindigkeit, $\text{m s}^{-1}$
$\varepsilon_{max}$	maximale lokale Energiedissipation, $\text{W kg}^{-1}$

Dabei wurde der Dissipationsbeiwert für verschiedene Rührer und Reaktorgeometrien experimentell ermittelt, welche in Tabelle 3.4 zusammengefasst sind.

### 3 Theoretische Grundlagen

**Tabelle 3.4:** Dissipationsbeiwert  $c_D$  (nach Liepe *et al.*, 1988).

Rührer	$d/D, -$	$Ne, -$	$c_D, -$	$\epsilon_{max}/\bar{\epsilon}, -$
6-Blatt-Scheibenrührer	0,40	4,30	0,45	37
	0,25	4,80	0,50	152
6x45°-Schrägblattrührer	0,40	1,50	0,20	47
	0,25	1,70	0,17	146
3x24°-Schrägblattrührer	0,40	0,30	0,08	95
	0,25	0,36	0,10	405
Propellerrührer	0,40	0,30	0,08	95
	0,25	0,35	0,08	333

Hierbei ist ersichtlich, dass verschiedene Rührer oder ein verändertes Verhältnis von Rührerdurchmesser zu Reaktorinnendurchmesser deutliche Änderungen des Dissipationsbeiwerts zur Folge haben. Zur Berechnung der maximale lokalen Energiedissipation bei neuen Geometrien ist daher die Darstellung von Henzler und Biedermann (1996) besser geeignet, da hier viele geometrische Faktoren berücksichtigt werden:

$$\frac{\epsilon_{max}}{\bar{\epsilon}} \approx \frac{4}{\left(\frac{d}{D}\right)^2 \cdot \left(\frac{h}{d}\right)^{\frac{2}{3}} \cdot z^{0,6} \cdot (\sin\alpha)^{1,15} \cdot z_l^{\frac{2}{3}} \cdot \left(\frac{H}{D}\right)^{-\frac{2}{3}}} \quad (3.7)$$

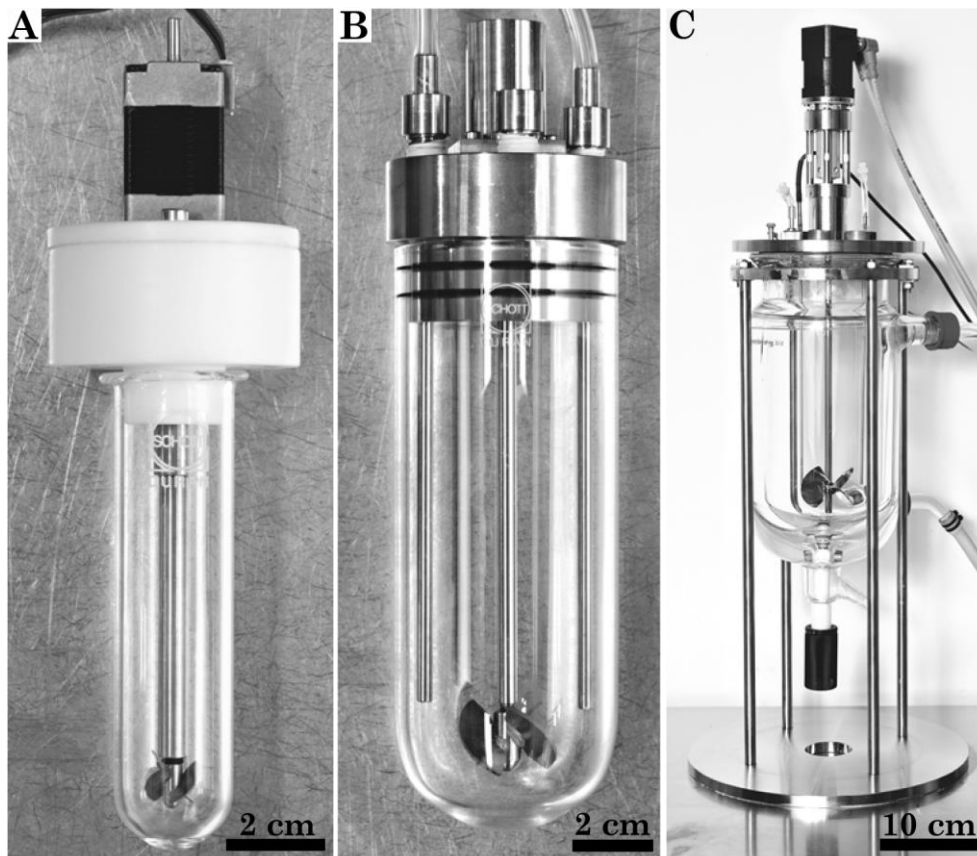
$D$	Behälterinnendurchmesser, m
$d$	Rührerdurchmesser, m
$H$	Füllhöhe, m
$h$	projizierte Rührerblatthöhe, m
$z$	Anzahl an Rührerblätter, -
$z_l$	Anzahl der Rührer auf einer Rührwelle, -
$\alpha$	Anstellwinkel der Rührerblätter, °
$\bar{\epsilon}$	mittlerer Leistungseintrag, W kg <sup>-1</sup>
$\epsilon_{max}$	maximale lokale Energiedissipation, W kg <sup>-1</sup>

Lediglich der mittlere Leistungseintrag muss zur Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation experimentell bestimmt werden. Dieser Zusammenhang gilt in einem Reaktor mit Strömungsbrechern. Henzler und Biedermann (1996) stellten fest, dass bei gleichem mittleren Leistungseintrag in einem unbewehrten Reaktor kleinere Partikel entstanden als in einem bewehrten und damit eine vierfach höhere maximale lokale Energiedissipation auftrat.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Rührkessel

In dieser Arbeit wurden geometrisch ähnliche Rührkessel mit einem Arbeitsvolumen von 6 mL, 100 mL und 1 L verwendet (Abbildung 4.1).

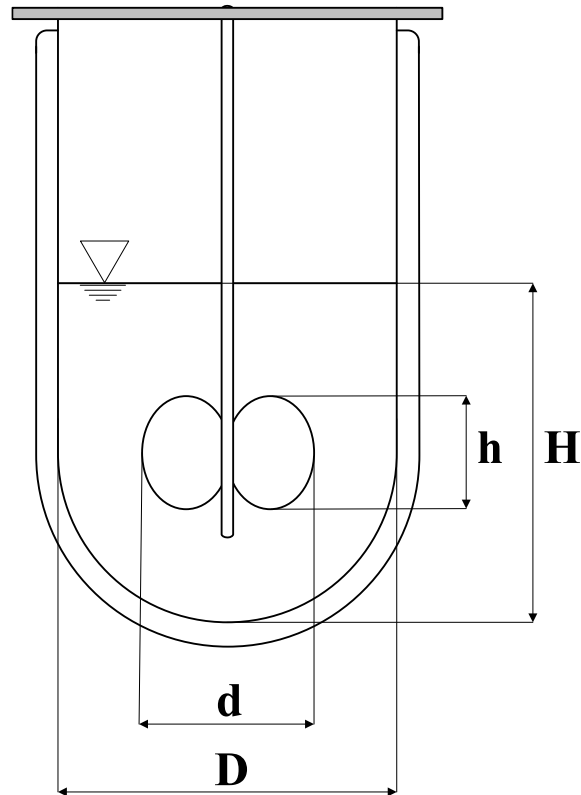


**Abbildung 4.1:** Verwendete Rührkessel. A) 6 mL; B) 100 mL; C) 1 L.

Von allen drei Reaktoren waren die Schrittmotoren und Glasgefäße und vom 1 L-Reaktor waren zusätzlich die Rührerachse mit Kupplungen und der dreiblättrige Segmentimpeller kommerziell erhältlich. Alle anderen Komponenten wurden speziell angefertigt. Die Planung und Konstruktion des 6 mL- und 100 mL-Reaktors wurde durch Dirk Hebel durchgeführt. Eine Temperierung der Reaktoren erfolgte mit einem Kältethermostat. Die Ansteuerung der Schrittmotoren erfolgte über die Software CrystalControl.

Alle Reaktoren wurden weitgehend geometrisch ähnlich gefertigt, das heißt entsprechenden Längen, wie Behälterinnendurchmesser zu Rührerdurchmesser,

standen in einem festen Verhältnis (Abbildung 4.2). Das Verhältnis der Füllhöhe zum Behälterinnendurchmesser war 1. Das Verhältnis des Rührerdurchmessers zum Behälterinnendurchmesser war 0,5.



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung eines Rührkessels. Eingezeichnet sind die Füllhöhe (H), der Behälterinnendurchmesser (D), die Rührerblatthöhe (h) und der Rührerdurchmesser (d).

Der dreiblättrige Segmentimpeller wurde mit einer Aufwärtsströmung an der Rührerachse betrieben. Die Maße der drei Reaktoren stehen in Tabelle 4.1.

**Tabelle 4.1:** Maße der verwendeten Reaktoren

Reaktor	6 mL	100 mL	1 L
Füllhöhe, mm	23	60	107
Behälterinnendurchmesser, mm	22	50	120
Rührerdurchmesser, mm	11,3	24,8	60,0
projizierte Rührerblatthöhe, mm	8,1	18,0	40,5
Anstellwinkel der Rührerblätter, °	45	45	40

## 4.2 Analytik

### 4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

#### *Manuelle Messung der Proteinkonzentration in Lösung*

Die Konzentration  $c$  reiner Proteinlösungen wurde photometrisch über die Messung der Absorption  $A$  bei einer Schichtdicke  $k$  und einer Wellenlänge  $\lambda$  von 280 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes  $A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot k$  unter Verwendung des jeweiligen proteinspezifischen Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon_\lambda$ . Die Absorptionskoeffizienten für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

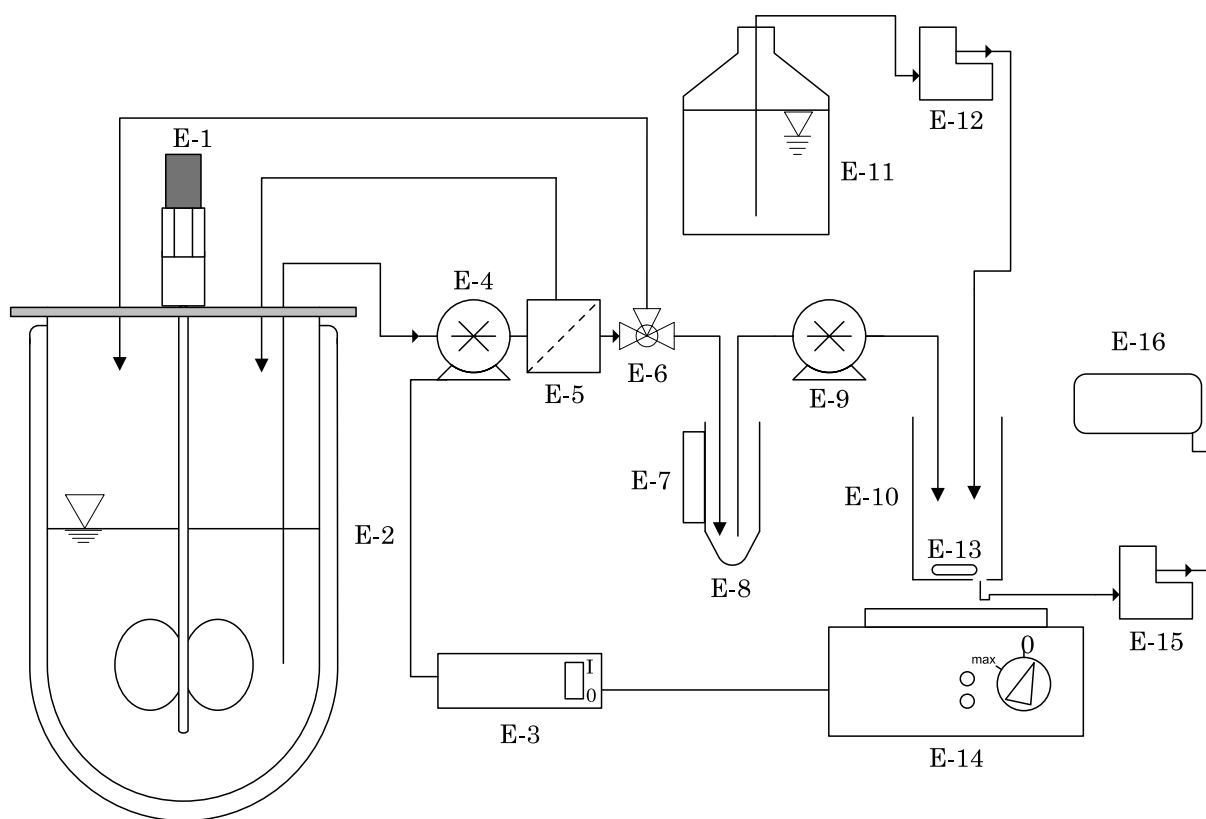
**Tabelle 4.2:** Spezifischer Absorptionskoeffizient der verwendeten Proteine bei 280 nm

<b>Protein</b>	<b>Absorptionskoeffizient <math>\varepsilon_{280\text{nm}}</math>, L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup></b>
Lysozym	2,50
Canakinumab Fab-Fragment	1,449
mAb01	1,622

Die Messung der Proteinlösung erfolgte in einem Photometer (GENESYS 10S UV-Vis) mit einer Quarzküvette (104-QS). Die Schichtdicke der Küvette betrug 10 mm. Handelte es sich bei der Probe um eine Kristallsuspension, wurden vor der Messung die Kristalle durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge 5415 R, 5 min; 16200 g) bei der entsprechenden Kristallisationstemperatur abgetrennt. Dabei ist eine präzise Messung nur bei einer Absorption bis 1,0 gewährleistet (Lottspeich und Engels, 2006). Lösungen mit einer Absorption außerhalb des linearen Messbereichs wurden entsprechend mit Wasser verdünnt.

### *Automatisierte Messung der Proteinkonzentration in Lösung im 1 L-Reaktor*

Um den Verlauf eines Kristallisationsprozesses über mehrere Tage verfolgen zu können, wurde für den 1 L-Reaktor ein automatisiertes Probenahmesystem entwickelt (Abbildung 4.3). Hiermit wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe aus dem Reaktor entnommen, die Kristalle abgetrennt, die Proteinlösung verdünnt und die Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm bestimmt.



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des automatischen Probenahmesystems. E-1 Schrittmotor; E-2 Rührkessel; E-3 Spannungsverteiler; E-4 Peristaltikpumpe Reglo Quick; E-5 Querstromfiltrationseinheit; E-6 3/2 Wegeventil; E-7 Füllstandssensor; E-8 Probereservoir; E-9 Peristaltikpumpe Reglo Digital; E-10 Mischkammer; E-11 Wasserbehälter; E-12 Membranpumpe (PP); E-13 Rührfisch; E-14 Magnetrührer; E-15 Membranpumpe (PTFE); E-16 Photometer.

Die Ansteuerung der einzelnen Komponenten erfolgte mit einem Programm, das mit der Software LabVIEW erstellt wurde. Beim Start schaltete das 3/2-Wegeventil auf „Kreislauf“, so dass das Filtrat der Querstromfiltrationseinheit

zurück in den Rührkessel gelangte. Darauf wurde mit dem Spannungsverteilungsgerät die Peristaltikpumpe Reglo Quick gestartet. Dadurch wurde Flüssigkeit aus dem Rührkessel über die Querstromfiltrationseinheit gepumpt. Das Filtrat wurde zunächst wieder in den Reaktor geleitet. Nach 2 Minuten wurde das 3/2 Wegeventil auf „Probenahme“. Nun gelangte das Filtrat in ein Probereservoir, bis die Probe ein Volumen von etwa 5 mL erreichte, welches der Füllstandssensor registrierte. Darauf wurde über das Spannungsverteilungsgerät die Peristaltikpumpe Reglo Quick gestoppt und der Magnetrührer gestartet. Das Ventil wechselte wieder auf „Kreislauf“. Die Peristaltikpumpe Reglo Digital pumpte 1 mL der Probe und die Membranpumpe (PP) 14 mL Wasser in die Mischkammer, wodurch die Probe verdünnt wurde. Nach einer kurzen Mischzeit pumpte die Membranpumpe (PTFE) die verdünnte Probe durch eine Durchflussküvette (170-QS) im Photometer. Dort wurde die Absorption bei 280 nm zehnmal hintereinander gemessen und mit der Uhrzeit in eine Textdatei geschrieben. Sobald der Mischbehälter leer war, wurde der Verdünnungsvorgang der Probe noch zweimal wiederholt wobei weitere Messwerte geschrieben wurden. Danach begann die Spülung des Systems. Das Probereservoir und die Mischkammer wurden mit der Peristaltikpumpe Reglo Digital und der Membranpumpe (PTFE) vollständig geleert. Anschließend wurde beide Pumpen angehalten, 40 mL Wasser zum Spülen in die Mischkammer gepumpt und 15 mL davon mit der Peristaltikpumpe Reglo Digital in das Probereservoir gepumpt. Nun wurden das Probereservoir und die Mischkammer mit der Peristaltikpumpe Reglo Digital und der Membranpumpe (PTFE) leergesaugt. Mit dem Ausschalten des Magnetrührers wurde ein Probenahmezyklus beendet. Das Probenahmeintervall wurde wahlweise auf 30 oder 60 min eingestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Excel.

### ***Messung der mAb01-Konzentration im Kristallpellet nach Zentrifugation***

Für die Bestimmung der mAb01-Konzentration im Kristallpellet ( $c_{\text{Pellet}}$ ) musste das Volumen des Kristallpellets ( $V_{\text{Pellet}}$ ) und die Masse an mAb01 im



Kristallpellet ( $m_{mAb01}$ ) bestimmt werden. Zunächst wurde ein definiertes Volumen einer Kristallsuspension ( $V_{Suspension}$ ) genommen. Die Kristalle wurden über Zentrifugation pelletiert und das Volumen des Überstand ( $V_{Überstand}$ ) gemessen. Aus der Differenz von  $V_{Suspension}$  und  $V_{Überstand}$  wurde das Volumen des Kristallpellets ( $V_{Pellet}$ ) berechnet. Danach wurden alle Kristalle des Kristallpellet in 10 mM Histidinpuffer pH 5 gelöst. Dann wurde das gesamte Volumen der mAb01-Lösung ( $V_{Lösung}$ ) bestimmt und die Proteinkonzentration ( $c_{Lösung}$ ) photometrisch bei 280 nm gemessen. Die Masse an mAb01 im Kristallpellet ( $m_{mAb01}$ ) wurde aus dem Produkt aus  $V_{Lösung}$  und  $c_{Lösung}$  berechnet.

$$c_{Pellet} = \frac{m_{mAb01}}{V_{Pellet}} = \frac{V_{Lösung} \cdot c_{Lösung}}{V_{Suspension} - V_{Überstand}} \quad (4.1)$$

$c_{Lösung}$	Proteinkonzentration der mAb01-Lösung, g L <sup>-1</sup>
$c_{Pellet}$	mAb01-Konzentration im Kristallpellet, g L <sup>-1</sup>
$m_{mAb01}$	Masse an mAb01 im Kristallpellet, g
$V_{Pellet}$	Volumen des Kristallpellets, L
$V_{Lösung}$	Volumen der mAb01-Lösung, L
$V_{Suspension}$	Volumen des Kristallsuspension, L
$V_{Überstand}$	Volumen des Überstands nach Zentrifugation, L

#### 4.2.2 Messung von Proteinverunreinigungen aus der Zellkultur

Bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern durch tierische Zellen entstehen neben dem Zielprotein auch Verunreinigungen durch andere Proteine der Zellen (HCP, engl. *host cell protein*). Diese Proteine wurden durch den Kooperationspartner Novartis mit einem antikörperbasierten Nachweisverfahren (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) gemessen. Details sind in Rey und Wendeler (2012) beschrieben.

### 4.2.3 Messung von DNA

Bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern durch tierische Zellen entstehen neben dem Zielprotein auch Verunreinigungen durch freigesetzte DNA. Diese DNA wurde durch den Kooperationspartner Novartis durch Amplifikation repetitiver Sequenzen im Genom der Produktionszelle (Haynes und Jelinek, 1981) mittels quantitativer PCR (q-PCR, engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*) gemessen. Die Nachweisgrenze liegt hierbei bei 2 pg DNA. Weitere Details werden durch den Kooperationspartner nicht offengelegt.

### 4.2.4 Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität des Antikörpers mAb01 wurde mit einem kompetitiven ELISA gemessen. Weitere Details werden durch den Kooperationspartner nicht offengelegt.

### 4.2.5 Größenausschlusschromatografie

Durch analytische Größenausschlusschromatografie wurde durch den Kooperationspartner Novartis die Reinheit, der Anteil an Aggregaten und Abbauprodukten des monoklonalen Antikörpers mAb01 quantifiziert. Weitere Details werden durch den Kooperationspartner nicht offengelegt.

Des Weiteren wurde durch analytische Größenausschlusschromatografie die mAb01-Konzentration in unreinen Lösungen bestimmt (ähnlich Kayser *et al.*, 2011). Als Säule wurde eine Superdex 200 10/300 GL verwendet. Als Laufpuffer diente ein 150 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Die Flussrate wurde mit einer Pumpe (S1110) konstant bei  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  gehalten. Eine Entgasung des Laufpuffers erfolgte *inline* mit einem Degaser. Ein Probenvolumen von 100  $\mu\text{L}$  konnte mit einem 6-Port-3-Kanal-Ventil geladen werden. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm in einem Photometer (GENESYS 10S UV-Vis) mit einer Durchflussküvette (178.010-QS). Mit dem Programm

dhGenesysLoggerMitVentil wurde ein Absorptionswert pro Sekunde aufgezeichnet. Die mAb01-Konzentration wurde über einen Vergleich der Peakfläche mit einer reinen mAb01-Referenzlösung bestimmt.

#### 4.2.6 Optische Analyse

Kristalle konnten mit zwei verschiedenen Polarisationsmikroskopsystemen visualisiert werden. Das Nikon Mikroskopsystem bestand aus einem Nikon Eclipse 50i, mit einem 10-fach und einen 4-fach Objektiv. Bilder wurden mit einer montierten Digitalkamera (DS-2Mv) und der Software NIS Elements aufgezeichnet. Mit dieser Software konnten die Kristalle auch vermessen werden. Das Zeiss Mikroskopsystem bestand aus einem Zeiss Axioplan, mit einem 10-fach und einen 2,5-fach Objektiv. Bilder wurden mit einer montierten Digitalkamera (AxioCam ICc 3) und der Software AxioVision LE aufgezeichnet. Eine Umrechnung von Bildpixel in  $\mu\text{m}$  erfolgte mit den in Tabelle 4.3 zusammengefassten Faktoren.

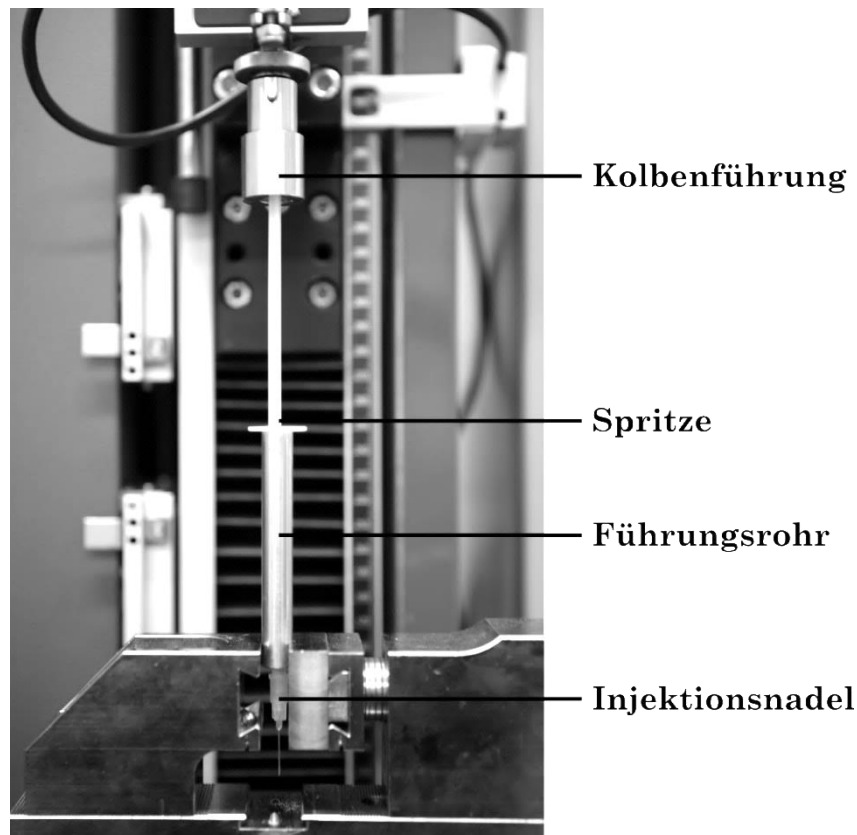
**Tabelle 4.3:** Maßstab der Mikroskopsysteme unter Verwendung der zugehörigen Digitalkamera

Mikroskop	Objektiv	Maßstab, $\mu\text{m px}^{-1}$
Zeiss Axioplan	Plan-Neofluor 2,5x/0.075	2,66
	Plan-Neofluor 10x/0.30	0,69
Nikon Eclipse 50 i	CFI Plan Achromat 4x/0.10	1,55
	CFI PlanFluor 10x/0.30	0,62

#### 4.2.7 Messung von Injektionskräfte

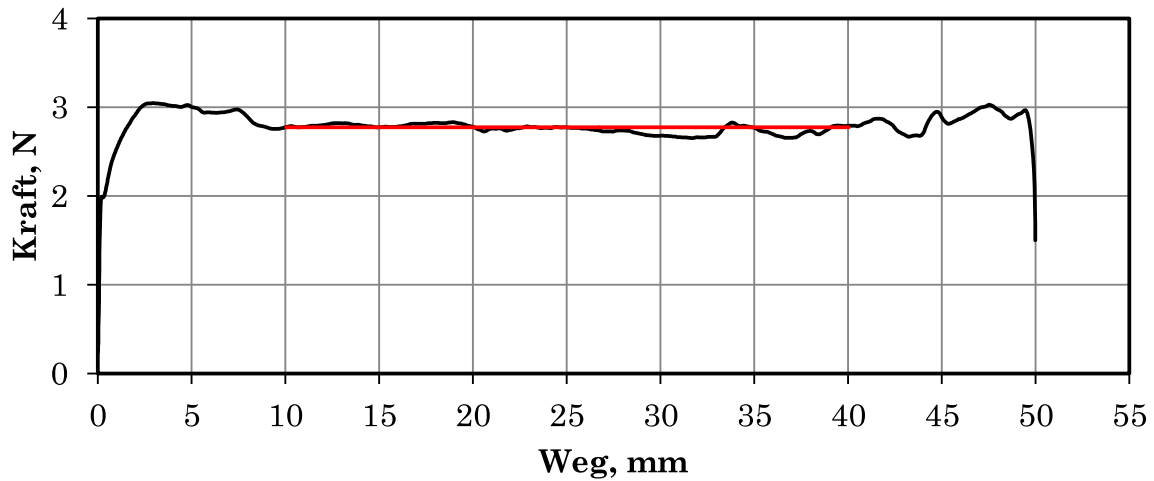
Um die Injizierbarkeit von Lösungen und Suspensionen quantifizieren zu können, wurden die Kraft auf den Spritzenkolben während der Injektion durch verschieden dünne Nadeln gemessen. Die Messung erfolgte mit einer zwicki-Line Prüfmaschine (Z2.5 TN, Kraftaufnehmer X-Force P 0,5 kN) in die eine 1 mL-

Feindosierungsspritze (Omnifix-F) spannungsfrei in ein Führungsrohr gebracht wurde (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4:** Aufbau der Prüfvorrichtung zum Messen von Injektionskräften.

Bis kurz vor der Messung wurde die Spritze und die zu messende Lösung / Suspension auf Eis gekühlt. Die Geschwindigkeit des Spritzenkolbens war konstant  $50 \text{ cm min}^{-1}$ . Nach Start der Injektion wurde die Kraft über die Software *testXpert* aufgezeichnet. Die Kraft beim Anfahren wie auch beim Abstoppen wurde nicht berücksichtigt. Die gemessenen Kräfte der Gleitphase (Verfahrweg von 10 mm - 50 mm) wurden gemittelt (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5:** Beispielhafte Messung der Kraft auf den Spritzenkolben in Abhängigkeit von dem zurückgelegten Weg. In Rot ist der Mittelwert der Gleitphase (Verfahrweg von 10 mm - 50 mm) aufgetragen.

Diese Kraft wurde noch um die Kraft, die bei einer mit Luft gefüllten Spritze auftritt bereinigt (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4:** Gemessene Kraft bei der Injektion einer mit Luft gefüllten Spritze

Injektionsnadel	Kraft, N
Ohne Injektionsnadel	$0,485 \pm 0,013$
25 G	$0,482 \pm 0,020$
26 G	$0,497 \pm 0,007$
27 G	$0,503 \pm 0,015$
30 G	$0,558 \pm 0,012$

### 4.3 Proteinkristallisation

#### 4.3.1 Dampfdiffusion

Für Dampfdiffusionsexperimente mit Hängetropfen wurde eine Hängetropfenplatte mit 24 Positionen verwendet. In eine Position wurde 1 mL der Reservoirlösung gefüllt. Der Hängetropfen wurde auf einem silikonisierten Deckglas durch das Vermischen von 5  $\mu$ L der Reservoirlösung und 5  $\mu$ L der Proteinlösung hergestellt. Das Deckglas wurde dann auf die Position der Hängetropfenplatte gelegt und leicht angedrückt. Durch Silikonfett, das zuvor auf den Rand der Position aufgetragen wurde, gelang eine luftdichte Versiegelung der Position. Die Kristallisation erfolgte bei konstanter Temperatur in einem Kühlkubator.

#### 4.3.2 Mikrosatzverfahren

Die Kristallisation im Mikrosatzverfahren erfolgte in Mikrosatzplatten mit 72 Positionen. In einer Position wurden 5  $\mu$ L einer doppelt konzentrierten Stammlösung und 5  $\mu$ L einer doppelt konzentrierten Proteinlösung vermischt und durch Überschichten mit Paraffinöl vor dem Austrocknen geschützt. Die Kristallisation erfolgte bei konstanter Temperatur in einem Kühlkubator.

#### *Der monoklonale Antikörper mAb01:*

Der für den Antikörper mAb01 verwendete Histidinpuffer hatte, falls nicht anders angegeben, einen pH von 5 der mit Essigsäure eingestellt wurde.

#### 4.3.3 Kristallisation im Rührkessel

Eine gerührte Kristallisation erfolgte in den im Kapitel 4.1 beschriebenen Rührkesseln.

### ***Lysozym:***

Die Kristallisation von Lysozym im Rührkessel fand standardisiert bei 20 °C mit 25 g L<sup>-1</sup> Lysozym, 40 g L<sup>-1</sup> Natriumchlorid, 25 mM Natriumacetatpuffer pH 4 statt. Dabei wurde die Übersättigung absichtlich gering gewählt, damit der zeitliche Verlauf des Kristallisationsprozesses gut beobachtet werden konnte.

Vor der Kristallisation wurden eine Proteinlösung und eine Pufferlösung hergestellt. Die Proteinlösung bestand aus 50 g L<sup>-1</sup> Lysozym gelöst in bidestilliertem Wasser. Die Pufferlösung bestand aus 80 g L<sup>-1</sup> Natriumchlorid, 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4 gelöst in bidestilliertem Wasser. Beide Lösungen wurden vor Gebrauch mit einem Membranfilter (0,22 µm) steril filtriert und auf 20 °C temperiert.

Zu Beginn des Versuchs wurde der Reaktor ebenfalls auf 20 °C temperiert und ein halbes Reaktor-Arbeitsvolumen der Pufferlösung in den Reaktor gefüllt. Darauf wurde mit der gewünschten Rührerdrehzahl gerührt und der Versuch durch die langsame Zugabe eines halben Reaktor-Arbeitsvolumen der Proteinlösung gestartet. Nur für die Untersuchung der ungerührten Kristallisation im Literreaktor wurde 5 min lang bei einer Rührerdrehzahl von 100 min<sup>-1</sup> gerührt, damit die beiden Lösungen homogen durchmischt waren.

Der Kristallisationsprozess wurde durch eine regelmäßige Messung der Konzentration des gelösten Lysozyms überwacht (4.2.1). Am Ende des Kristallisationsversuches wurden zusätzlich mikroskopische Aufnahmen der Kristalle gemacht (4.2.6).

### ***Der monoklonale Antikörper mAb01:***

Der für den Antikörper mAb01 verwendete Histidinpuffer hatte, falls nicht anders angegeben, einen pH von 5 der mit Essigsäure eingestellt wurde.

### 4.3.4 Vorhandene Kristallisationsbedingungen

#### ***Canakinumab Fab-Fragment:***

Kristallisationsbedingungen aus Dampfdiffusionsversuchen mit Sitztropfen für das Fab-Fragment des therapeutischen Antikörpers Canakinumab waren bereits bekannt (interne Kommunikation mit Jean-Michel Rondeau, Novartis Pharma AG am 10.06.2009): Proteinlösung: 60 g L<sup>-1</sup> Canakinumab Fab-Fragment, 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 7,4, 25mM NaCl; Reservoirlösung: 12 % PEG 5000 MME, 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5; Kristallisationstemperatur 20 °C.

#### ***Der monoklonale Antikörper mAb01:***

Bei Stabilitätsstudien der Novartis Pharma AG entstanden innerhalb von drei Wochen kristalline Nadeln. Die Bedingungen waren 10 oder 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 in einem 10 mM Histidin/Acetattpuffer pH 4,9. Der pH wurde mit der Base TRIS auf 6,0 oder 6,5 und die Konduktivität wurde mit Natriumchlorid auf 3 oder 10 mS cm<sup>-1</sup> eingestellt. Diese Bedingungen dienten als Ausgangsbasis in dieser Arbeit.

Eine Analyse von aufgelösten Kristallnadeln mittels Größenausschlusschromatografie (durchgeführt von Anke Weiss, Novartis Pharma AG) zeigte, dass die Kristalle aus dem ganzen Antikörper und nicht aus Abbauprodukten bestanden. Beugungsanalysen mittels Röntgenstrahlen (durchgeführt von Jean-Michel Rondeau, Novartis Pharma AG) erreichten nur eine geringe Auflösung von 9 Å. Es konnte jedoch bestimmt werden, dass die Kristalle einer einfachen tetragonalen Raumgruppe angehörten, mit einer Einheitszelle von 112,9 Å · 112,9 Å · 239 Å. Eine Einheitszelle bestand aus zwei asymmetrischen Einheiten mit 2 Antikörpermolekülen pro asymmetrischer Einheit.



## 4.4 Charakterisierung der verwendeten Kristallisationssysteme

### 4.4.1 Berechnung der Rührerumfangsgeschwindigkeit

Die Rührerumfangsgeschwindigkeit kann einfach aus der Rührerdrehzahl und dem Rührerdurchmesser berechnet werden:

$$u = d \cdot \pi \cdot n \quad (4.2)$$

$u$	Rührerumfangsgeschwindigkeit, m s <sup>-1</sup>
$d$	Rührerdurchmesser, m
$n$	Rührerdrehzahl, s <sup>-1</sup>

### 4.4.2 Berechnung der Reynolds-Zahl

Die Reynolds-Zahl wurde wie folgt berechnet:

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \quad (4.3)$$

$d$	Rührerdurchmesser, m
$n$	Rührerdrehzahl, s <sup>-1</sup>
$Re$	Reynolds-Zahl, -
$\eta$	dynamische Viskosität, kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
$\rho$	Dichte, kg m <sup>-3</sup>

Die Werte von Wasser bei 20 °C wurden für die Dichte ( $\rho = 998,2 \text{ kg m}^{-3}$ ) und für die dynamische Viskosität ( $\eta = 1,002 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) verwendet.

### 4.4.3 Bestimmung von Mischzeiten

Die Charakterisierung des Homogenisiervorgangs durch den Rührer in allen drei Reaktorgrößen wurde über Mischzeiten durchgeführt. Hierzu wurde in dieser Arbeit die Schlierenmethode angewandt. Hier handelt es sich um eine optische

Methode, bei der eine Schlieren bildende, oft farbige Flüssigkeit zur Hauptflüssigkeit gegeben wird. Die Mischzeit wird als die Zeit definiert, die benötigt wird, bis die Mischung homogen ist, also keine Schlieren mehr zu erkennen sind (Zlokarnik, 1967).

Zuerst wurde VE-Wasser mit Lissamingrün eingefärbt. Hierfür wurden 24 µg des Farbstoffs in 450 mL VE-Wasser gelöst. Danach wurde ein Gemisch aus gleichen Volumina Glycerol und eingefärbten VE-Wasser hergestellt. Um eine hohe Homogenität der Farbstoff-Glycerollösung zu gewährleisten, wurde diese über Nacht mit einem Magnetrührer durchmischt. Das Glycerol dient als Schlierenbildner und das Lissamingrün ermöglicht die Visualisierung der Schlieren. Der Reaktor wurde mit VE-Wasser gefüllt und anschließend die Farbstoff-Glycerollösung auf den Boden des Reaktors pipettiert. Dabei war das Volumenverhältnis von VE-Wasser zu Farbstoff-Glycerollösung 30 zu 1. Wegen der höheren Dichte des Glycerols blieb die Farbstoff-Glycerollösung bis zum Start des Rührers am Boden. Nach Start des Rührvorgangs wurde die Zeit gemessen, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Pro untersuchte Rührerdrehzahl wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

### 4.4.4 Bestimmung des Leistungseintrags

Die Bestimmung des Leistungseintrags wurde im 1 L-Reaktor durchgeführt. Hierfür wurde ein Drehmomentsensor (DRFL-I-0,05-A, ETH-messtechnik) zwischen den Schrittmotor und die Rührerachse eingebaut. Die Verbindung zur Rührerachse wurde über eine Balgkupplung, die Verbindung zwischen Schrittmotor und Drehmomentsensor wurde über einen flexiblen Silikonschlauch bewerkstelligt. Der Silikonschlauch bewirkte eine starke Dämpfung der einzelnen Schrittpulse des Schrittmotors, wodurch erst eine Drehmomentmessung ermöglicht wurde. Das Spannungssignal des Drehmomentsensors wurde mit einem Datenerfassungsmodul aufgenommen. Dabei entsprach das maximale Spannungssignal von 10 V einem Drehmoment von 50 mN m. Über die Software LabVIEW wurde ein Programm erstellt, das

den Mittelwert aus 3001 Messwerten bestimmt. Der Schrittmotor wurde im 16-Schritt Modus mit 20 % Leistung betrieben und mit der Software CrystalControl angesteuert.

Das Drehmoment des Rührers wurde unter Variation der Drehzahl gemessen. Daraus konnte mit Hilfe der Gleichung 3.3 die Leistung berechnet werden. Da nur die Leistung von Interesse war, die vom Rührer in das Rührgut eingebracht wurde, mussten noch Verluste an beispielsweise Dichtungen oder Lagern abgezogen werden. Diese Verluste wurden durch Messungen im ungefüllten Reaktor bestimmt. Nach Start des Rührers bei einer bestimmten Rührerdrehzahl wurde eine Minute gewartet, bevor die Messung erfolgte. Für jede Drehzahl wurde die Messung neunfach im gefüllten, wie im ungefüllten 1 L-Reaktor durchgeführt.

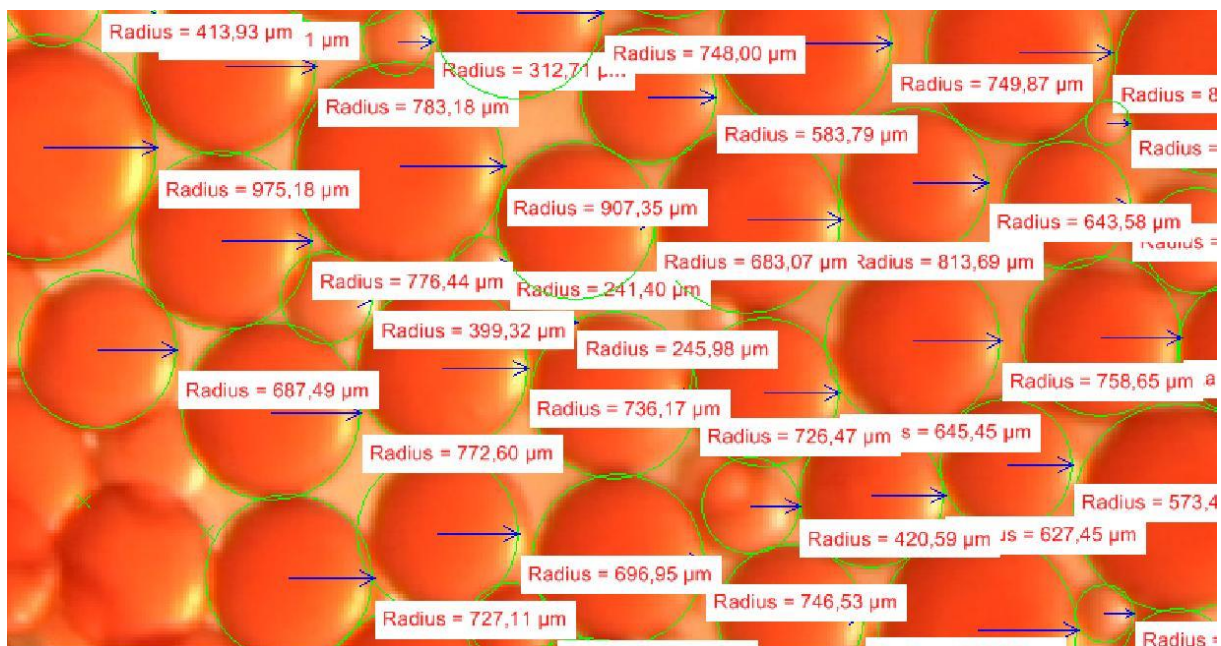
#### 4.4.5 Tropfengrößenverteilung

Die maximale lokale Energiedissipation in den Kristallisationsreaktoren wurde indirekt mit einer Silikonöl/Tensid/Wasser-Emulsion als Partikelsystem bestimmt (ähnlich Henzler und Biedermann, 1996). Diese Methode wurde angepasst, damit auch die Proteinkristallisationsreaktoren, die besonders scherarm rühren, charakterisiert werden können. Hierfür wurde anstelle des Silikonöls PH 300, welches bei 25 °C eine Viskosität von 300 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> und eine Dichte von 1,06 g cm<sup>-3</sup> besitzt, ein niederviskoseres und damit scherempfindlicheres Silikonöl (Baysilone Öl PK 20) verwendet. Dieses besitzt bei 25 °C eine Viskosität von 20 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> und eine Dichte von 0,98 g cm<sup>-3</sup>. Bei 0 °C ist die Dichte 1,00 g cm<sup>-3</sup>. Die Messung erfolgte bei 10 °C.

Vor dem Versuch wurde das Silikonöl mit dem Azofarbstoff Sudan IV eingefärbt. Dies ermöglichte eine bessere Visualisierung der Öltropfen. Hierfür wurden 0,4 g Sudan IV in 50 mL Silikonöl gegeben und 24 h lang unter Rühren bei 60 °C gelöst. Danach ungelöste Farbstoffreste wurden mittels Filtration oder Zentrifugieren entfernt. Vor Gebrauch wurde ein Teil des gefärbten Öls mit 20 Teilen ungefärbten Öl verdünnt.

Für die Messung wurde im Reaktor 90 % des Arbeitsvolumens an VE-Wasser mit 8 % v/v Triton X 100 vorgelegt und auf 10 °C temperiert. Anschließend wurden 10 % des Reaktor-Arbeitsvolumens an gefärbtem Silikonöl vorsichtig auf das Wasser geschichtet. Danach wurde das System bei der zu untersuchenden Rührerdrehzahl für 24 h gerührt, wobei sich ein Gleichgewicht der Tropfengröße einstellte. Das Triton X 100 verhinderte eine Koaleszenz der dispergierten Öltropfen.

Danach wurde der Reaktordeckel entfernt und vorsichtig eine Probe mit einer Petrischale genommen. Diese gesamte Petrischale wurde sofort mit einer Kamera (Canon EOS 10D) fotografiert. Die Auswertung der Tropfen erfolgte mit der Software NIS Elements. Zur Ermittlung des Maßstabs wurde der Durchmesser der Petrischale (55 mm) verwendet. Für eine repräsentative Aussage über die Tropfengrößenverteilung wurden pro untersuchter Drehzahl mindestens 3000 Öltropfen manuell vermessen (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6:** Vermessung von Öltropfen mit der Software NIS Elements

Aus den einzelnen Radien wurde mit der Annahme einer Kugelform eine Volumenverteilungsdichte erhalten, aus der der mittlere Volumendurchmesser  $D_{50V}$  bestimmt wurde.

## 4.5 Weitere Methoden

### 4.5.1 Sterilfiltration

Die Sterilfiltration wurde mit einem wiederverwendbaren Filtrationssystem, in dem ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22  $\mu\text{m}$  eingespannt wurde, durchgeführt. Der für die Filtration nötige Unterdruck wurde mit einer Wasserstrahlpumpe erzeugt.

### 4.5.2 Herstellung von Fab-Fragmenten

Das Canakinumab Fab-Fragment wurde aus dem ganzen humanen monoklonalen Antikörper Canakinumab hergestellt. Hierfür wurde der Antikörper mit der Protease Papain im Bereich der Hinge-Region geschnitten. Hierfür wurden 2,5 mL immobilisiertes Papain in eine Zentrifugensäule gefüllt. Das Papain wurde anschließend mit 40 mL Verdaupuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer, 10 mM EDTA, 20 mM L-Cystein-hydrochlorid, pH 7,0) equilibriert. 5 mL wurden in der Säule gelassen. Zusätzlich wurden 10 mL Verdaupuffer mit 10 g L<sup>-1</sup> des Antikörpers in die Säule gefüllt und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Fragmente mit 10 mL Waschpuffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,5) aus der Säule gewaschen. Das Papain-Säulenmaterial wurde nach weiterem Waschen mit 10 mL Waschpuffer in 5 mL Lagerpuffer (50 % v/v Glycerol, 0,1 M Natriumacetat, 0,05 % w/v Natriumazid) bei 4 °C gelagert.

Die Abtrennung der Fab-Fragmente von Fc-Fragmenten und von ungeschnittenen oder teilweise geschnittenen Antikörper erfolgte mittels Protein A-Affinitätschromatografie. Zunächst wurde die Protein A-Säule mit 50 mL Puffer A (20 mM Natriumphosphat, 20 mM Natriumacetat, pH 7,5 mit HCl) mit 2,5 mL min<sup>-1</sup> gespült. Anschließend wurde die verdaute Antikörperlösung mit 1 mL min<sup>-1</sup> über die Protein A-Säule gepumpt und die Absorption mit einem Photometer detektiert. Sobald eine Absorption bei 280 nm über 0,01 erreicht wurde, wurde die Fraktion aufgefangen bis die Absorption

wieder unter 0,015 fiel. Nun wurden mit Puffer B (20 mM Natriumcitrat, 0,1 M Natriumchlorid, pH 2,5 mit HCl) die gebundenen Fc-Fragmente von der Säule eluiert. Die Säule wurde mit 10 mL 6 M Guanidin-hydrochlorid regeneriert und anschließend mit 10 mL 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung in der Kristallisation wurde die Fab-Fragmentlösung mit einer Zentrifugen-Filtereinheit aufkonzentriert.

### 4.5.3 Abtrennen und Auflösen von mAb01-Kristallen

mAb01-Kristalle wurden mittels Zentrifugation (mL-Maßstab: 16200 g, 5 min; 1 L-Maßstab: 3200 g, 15 min) bei der jeweiligen Kristallisationstemperatur aus der Kristallisationslösung abgetrennt. Die Kristalle wurden in 10 mM Histidinpuffer pH 5 (pH eingestellt mit Essigsäure) aufgelöst. Falls nötig wurde der pH auf 5 mit 10 % Essigsäure nachtitriert.

### 4.5.4 Aufkonzentrieren von Proteinen

Das Aufkonzentrieren von Proteinlösungen erfolgte mit einer Zentrifugen-Filtereinheiten entsprechend der Herstellerangaben. Für das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers Canakinumab wurde eine Zentrifugen-Filtereinheit mit einer 3 kDa Membran, für den monoklonalen Antikörper mAb01 eine Zentrifugen-Filtereinheit mit einer 10 kDa Membran verwendet.

### 4.5.5 Dialyse

Die Dialyse des mAb01-Zellkulturüberstands erfolgte bei Raumtemperatur für 12 h unter Rühren in einem Dialyseschlauch gegen das 100-fache Volumen an 10 mM Histidinpuffer pH 5. Entstandenes Präzipitat wurde anschließend mittels Zentrifugation (3200 g, 15 min) entfernt. Danach wurde die Lösung noch sterilfiltriert.

Vor der Verwendung des Dialyseschlauchs wurde dieser für 20 min in zweifach destilliertes Wasser gelegt und 30 min in 10 mM EDTA bei 80 °C und 12 h in frischer 10 mM EDTA-Lösung bei 4 °C inkubiert. Als letztes wurde der Schlauch noch mit zweifach destilliertem Wasser gespült.

### **4.5.6 Vorbehandlung des Zellkulturüberstand**

Um eine Kristallisation von mAb01 aus Zellkulturüberstand zu ermöglichen, wurde eine Vorbehandlungsmethode entwickelt. Als erstes erfolgte eine Titration auf pH 5 mit 10 % Essigsäure. Präzipitat wurde durch Zentrifugation (3200 g, 15 min) entfernt. Mittels Diafiltration gegen 10 mM Histidinpuffer pH 5 wurde die Salzkonzentration reduziert. Die Diafiltration erfolgte bei Experiment A mit 7 Diavolumen unter Verwendung einer 30 kDa Membrankassette und bei Experiment B mit 5 Diavolumen unter Verwendung einer 10 kDa Membrankassette. Anschließend wurde Präzipitat durch Zentrifugation (3200 g, 15 min) entfernt und die Lösung noch sterilfiltriert.

### **4.5.7 Anionenaustauschchromatografie**

Die Aufreinigung einer mAb01-Lösung durch Anionenaustauschchromatografie erfolgte im Durchflussverfahren. Hierfür wurde eine Säule, die mit 50 mL eines starken Anionentauschers gepackt wurde, verwendet. Die genaue Durchführung der Anionenaustauschchromatografie unterliegt der Geheimhaltung.

### **4.5.8 Nanofiltration**

Eine Nanofiltration erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit einem Nanofilter mit der Porengröße von 20 nm.

### **4.5.9 Virusinaktivierung**

Die Vireninaktivierung erfolgte bei 20 °C bei pH 3,6 für 60 min. Der pH wurde durch eine 0,3 M Ortho-Phosphorsäure eingestellt. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung mit 1 M TRIS auf pH 6,2 titriert. Nach weiteren 30 min wurde entstandenes Präzipitat durch Zentrifugation (4960 g, 10 min) entfernt.



## 5 Proteinkristallisation im Rührkessel

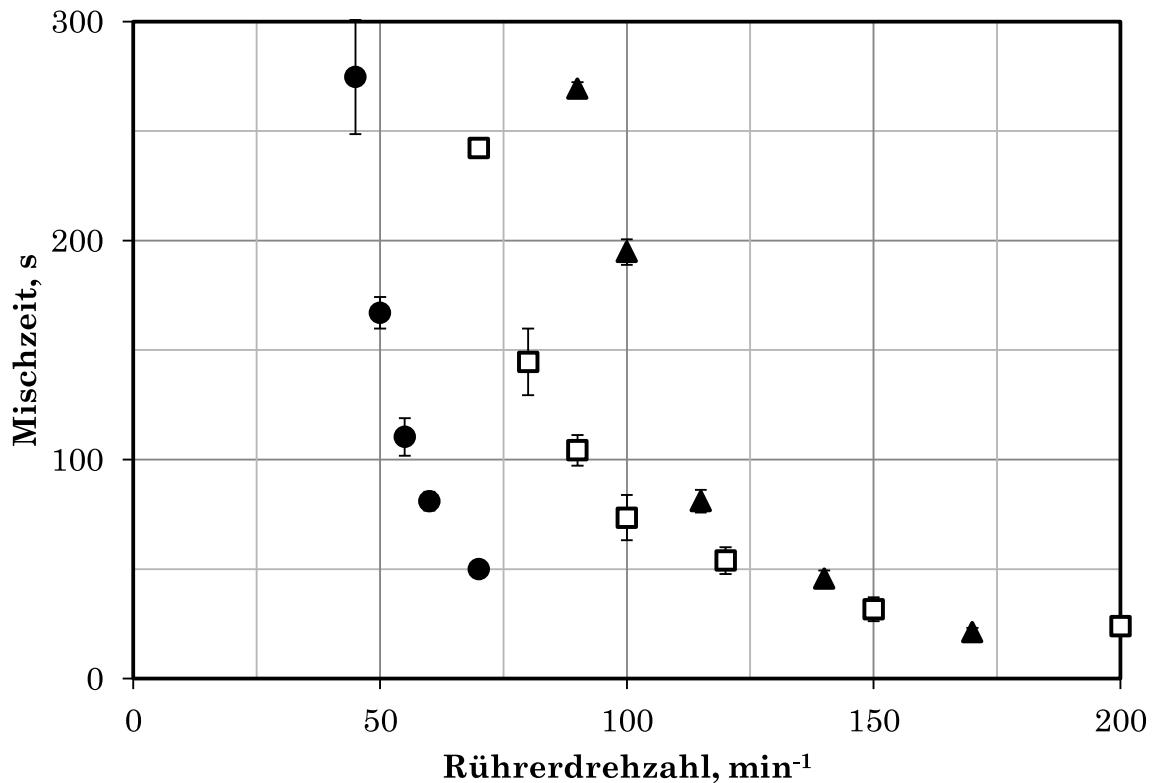
Eine technische Proteinkristallisation im Liter- bis Kubikmetermaßstab erfolgt meist in einem Rührkessel. In dieser Arbeit wurden zur Proteinkristallisation unbewehrte Rührkessel mit einem Arbeitsvolumen von 6 mL, 100 mL und 1 L verwendet. Diese Rührkessel wurden sowohl verfahrenstechnisch als auch anhand der Kristallisation von Lysozym von *Gallus gallus* charakterisiert, um Erkenntnisse für die Maßstabsvergrößerung eines Kristallisationsprozesses mit einem therapeutischen monoklonalen Antikörpers zu erlangen.

### 5.1 Charakterisierung

#### 5.1.1 Mischzeiten

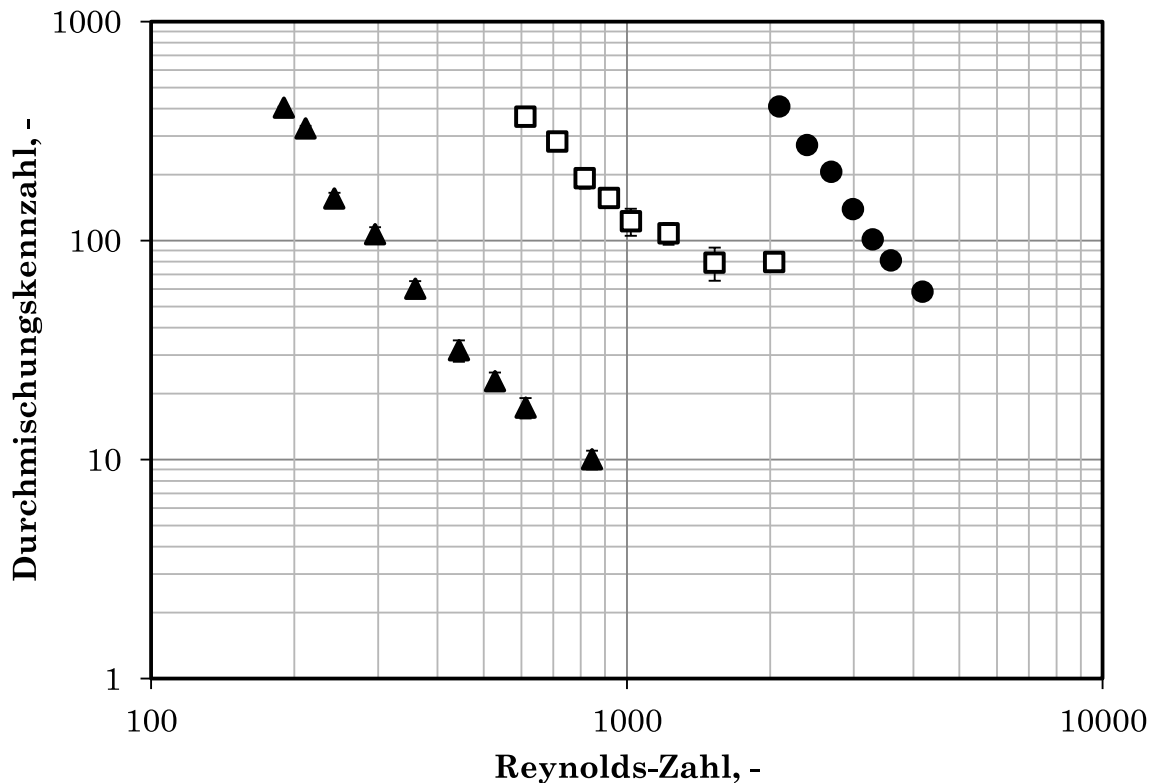
Bei der Kristallisation in Rührkesseln wird das System primär als Suspension betrachtet. Bevor Kristalle entstehen, wird jedoch zunächst eine übersättigte Lösung erzeugt, deren homogene Durchmischung gewährleistet werden muss. Ansonsten kann Präzipitation auftreten. Dieses Durchmischungsverhalten durch den Rührer kann über Mischzeiten charakterisiert werden.

Daher wurde mit der Schlierenmethode (siehe Kapitel 4.4.3) über ein Lissamingrün-Glycerin-Gemisch die Mischzeit in den 6 mL-, 100 mL- und 1 L-Reaktoren in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bestimmt (Abbildung 5.1). Zum Erreichen der gleichen Mischzeit wurde im 1 L-Reaktor die geringste Rührerdrehzahl und im 6 mL-Reaktor die höchste Rührerdrehzahl benötigt.



**Abbildung 5.1:** Mischzeit in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl. Die Mischzeiten wurden über die Schlierenmethode mit einem Lissamingrün-Glycerin-Gemisch ermittelt. 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲).

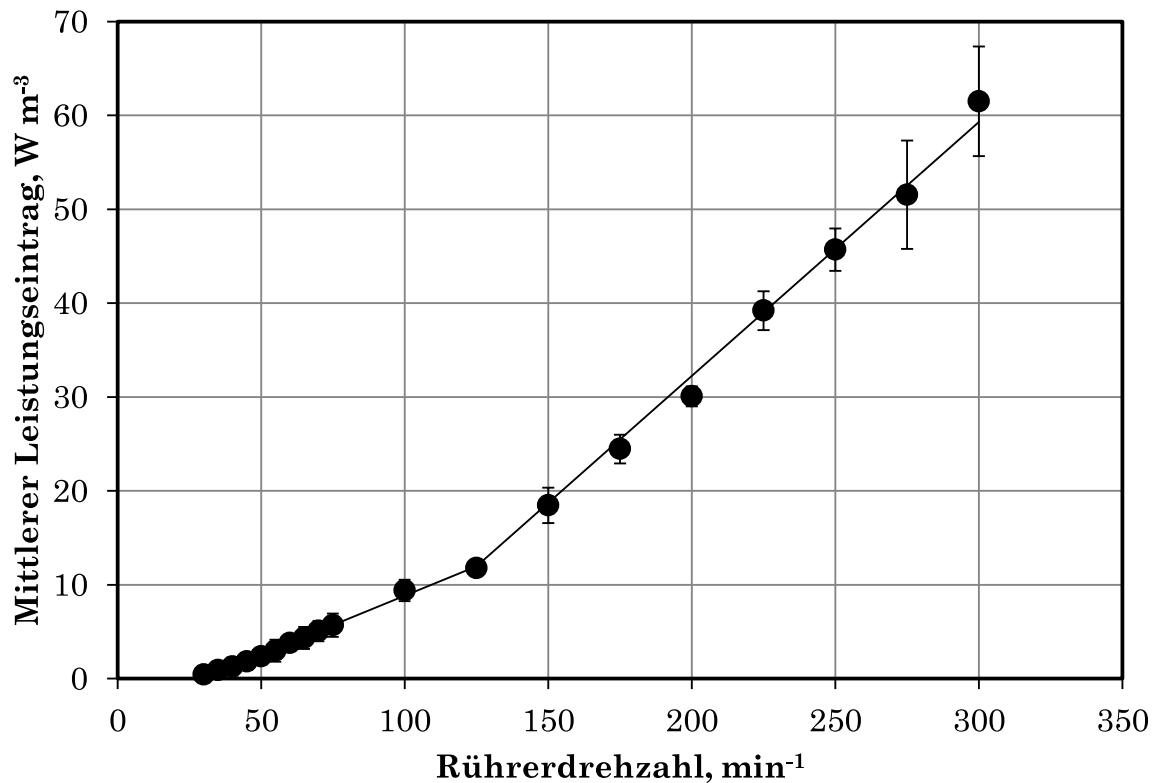
Eine dimensionslose Darstellung der Mischzeitcharakteristik wird in Abbildung 5.2 gezeigt. Hierzu wurde die Reynolds-Zahl gegen die Durchmischungskennzahl, die das Produkt aus der Rührerdrehzahl und der Mischzeit ist, aufgetragen. Die Verläufe der Datenpunkte der einzelnen Reaktorgrößen waren parallel zueinander versetzt und folgten keinem gemeinsamen Verlauf, wie es bei geometrisch ähnlichen Reaktoren zu erwarten gewesen wär. Eine mögliche Ursache hierfür sind fertigungsbedingte Abweichungen einzelner Größen von den idealberechneten Werten. So wurde aus Stabilitätsgründen die Rührerachse im 6 mL-Reaktor dicker gefertigt und die Impeller der 100 mL- und der 6 mL-Reaktoren wurden mit einem Neigungswinkel der Rührerblätter von 45° anstatt 40° im 1 L-Reaktor gefertigt. Zudem befindet sich im 1 L-Reaktor am Boden ein Ablassventil.



**Abbildung 5.2:** Mischzeitcharakteristik der verwendeten Reaktoren.  
1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲).

### 5.1.2 Mittlerer Leistungseintrag

Der mittlere Leistungseintrag wird oftmals bei der Proteinkristallisation zur Maßstabsvergrößerung konstant gehalten. Daher wurde dieser für den 1 L-Reaktor durch einen Drehmomentsensor zwischen Motor und Rührerachse bestimmt (Kapitel 4.4.4). Für Rührerdrehzahlen von  $30 \text{ min}^{-1}$  bis  $300 \text{ min}^{-1}$  wurden im ungefüllten Reaktor Drehmomente zwischen  $6,4 \text{ mN m}$  und  $13,8 \text{ mN m}$  und im gefüllten Reaktor zwischen  $6,5 \text{ mN m}$  und  $15,8 \text{ mN m}$  ermittelt. Aus der Differenz der Drehmomente wurde der mittlere Leistungseintrag in das Rührgut über Gleichung 3.3 berechnet (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3:** Mittlerer Leistungseintrag durch Rühren im 1 L-Reaktor. Der mittlere Leistungseintrag wurde aus dem Drehmoment an der Rührerachse ermittelt. Die Linie ist eine lineare Annäherung an den Verlauf der Datenpunkte. Bei einer Rührerdrehzahl von  $125 \text{ min}^{-1}$  änderte sich die Steigung der Gerade, was auf das Ende der laminaren Strömung hinweist.

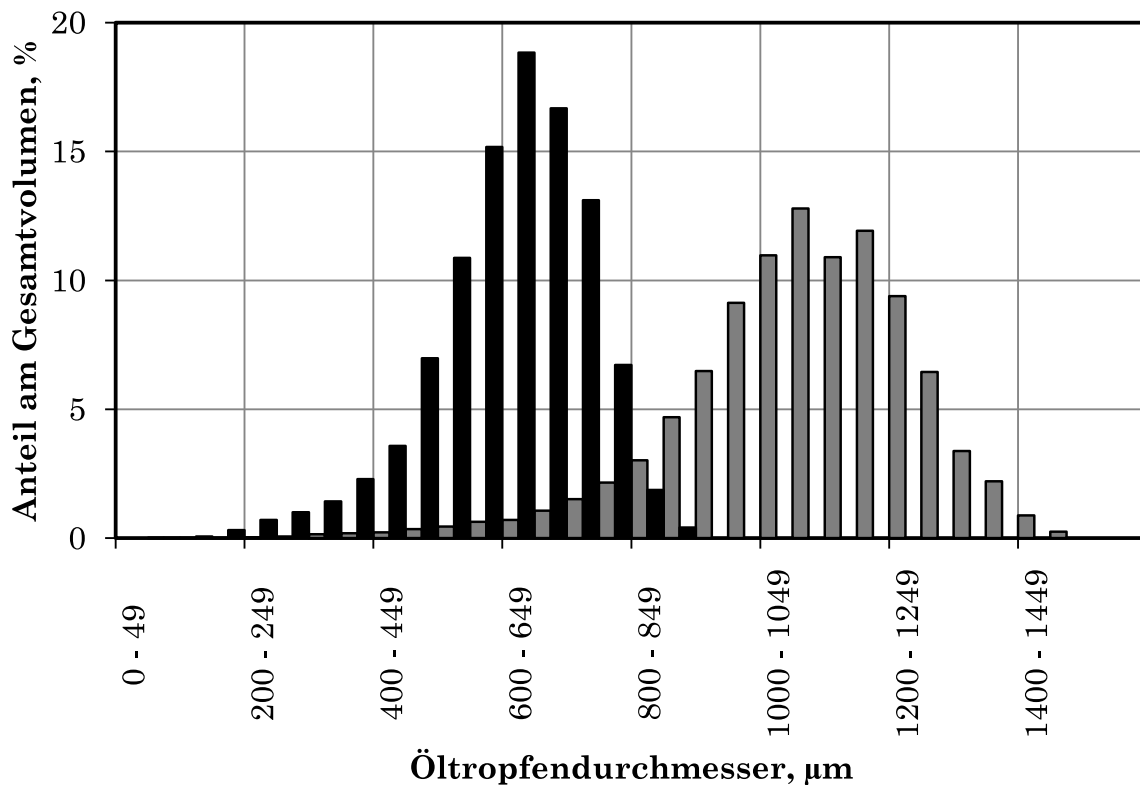
Der mittlere Leistungseintrag stieg von unter  $1 \text{ W m}^{-3}$  bei einer Rührerdrehzahl von  $30 \text{ min}^{-1}$  auf  $61 \text{ W m}^{-3}$  bei einer Rührerdrehzahl von  $300 \text{ min}^{-1}$ . Somit lag der mittlere Leistungseintrag bei den untersuchten Rührerdrehzahlen in einer Größenordnung, wie beim schonenden Rühren von Säugetierzellen üblich ist ( $1 - 50 \text{ W m}^{-3}$ ).

### 5.1.3 Maximale lokale Energiedissipation

Bei einem Kristallisationsprozess soll die hydrodynamische Beanspruchung der Proteinkristalle klein gehalten werden um eine Zerkleinerung der Kristalle zu vermeiden. Die maximale lokale Energiedissipation, die ein Maß für die maximale hydrodynamische Beanspruchung darstellt, wurde für die drei

verwendeten Reaktorgrößen bestimmt. Als Modell-Partikelsystemen diente eine Silikonöl/Tensid/Wasser-Emulsion (Kapitel 4.4.5).

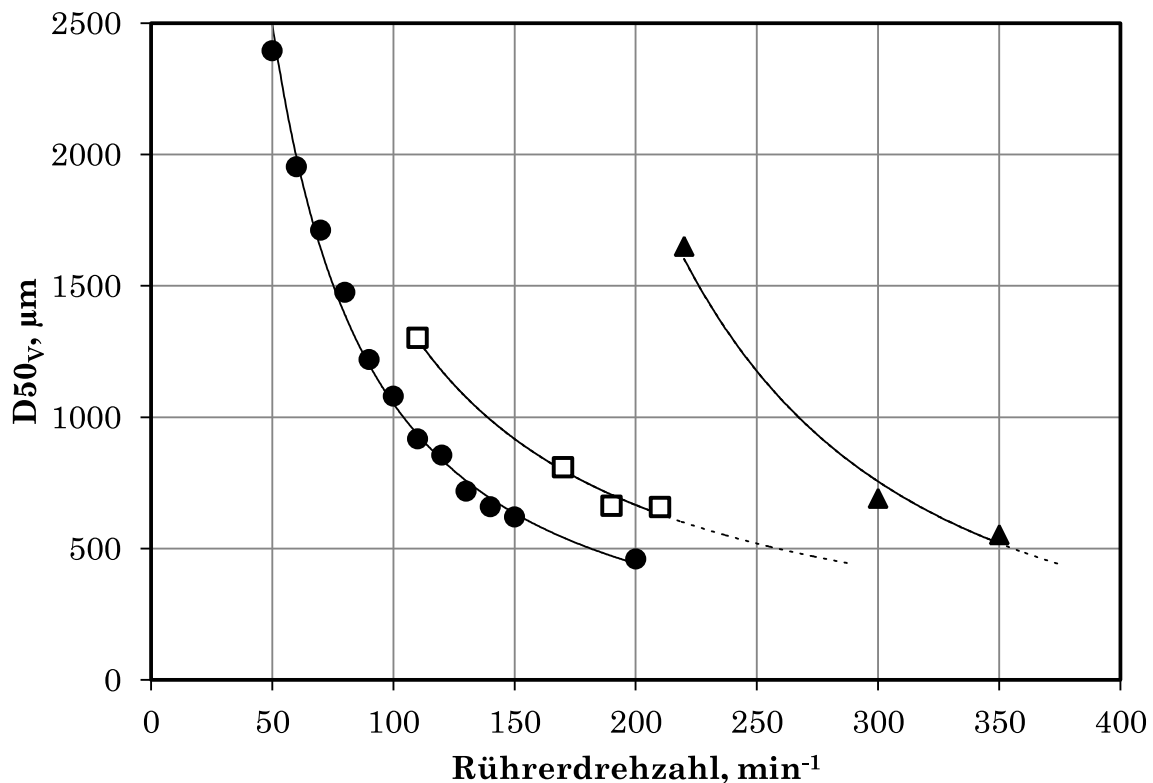
Durch Scherkräfte zerteilte sich das Silikonöl in kleine Tropfen. In Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl und der Reaktorgröße entstanden dadurch charakteristische Größenverteilungen der Öltropfen. Eine höhere Rührerdrehzahl führte zu kleineren Öltropfen. In Abbildung 5.4 sind zwei Öltropfenverteilungen im 1 L-Reaktor dargestellt.



**Abbildung 5.4:** Beispielhafte Größenverteilung der Silikonöltropfen nach 24 h Rühren im 1 L-Reaktor. Öltropfen in einem Intervall von jeweils  $50 \mu\text{m}$  wurden zusammengefasst. Rührerdrehzahl von  $100 \text{ min}^{-1}$  (graue Balken) bzw.  $150 \text{ min}^{-1}$  (schwarze Balken).

Für alle Größenverteilungen wurde der zugehörige mittlere Volumendurchmesser  $D_{50v}$  ermittelt. Dieser Wert ist spezifisch für die maximale lokale Energiedissipation (siehe Gleichung 3.5) im Reaktor. Bei einem identischen mittleren Volumendurchmesser lag die gleiche maximale lokale Energiedissipation vor. Die für die drei Reaktorgrößen ermittelten mittleren

Volumendurchmesser  $D_{50V}$  sind in Abbildung 5.5 gegen die zugehörige Rührerdrehzahl aufgetragen.



**Abbildung 5.5:** Mittlerer Volumendurchmesser  $D_{50V}$  der Silikonöltropfen in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl. 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Die Linien sind Anpassungen durch Potenzfunktionen an die Messwerte. Der gestrichelte Bereich stellt eine Extrapolation dar.

Für eine identische maximale lokale Energiedissipation musste der 6 mL-Reaktor mit der höchsten Rührerdrehzahl und der 1 L-Reaktor mit der niedrigste Rührerdrehzahl betrieben werden. Der Verlauf der Messwerte der einzelnen Reaktoren ließ sich mit einer Potenzfunktion beschreiben:

$$D_{50V} = i \cdot n^r \tag{5.1}$$

- $D_{50V}$  mittlere Volumendurchmesser der Öltropfen,  $\mu\text{m}$
- $i$  Konstante
- $n$  Rührerdrehzahl,  $\text{min}^{-1}$
- $r$  Exponent

Die erhaltenen Konstanten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

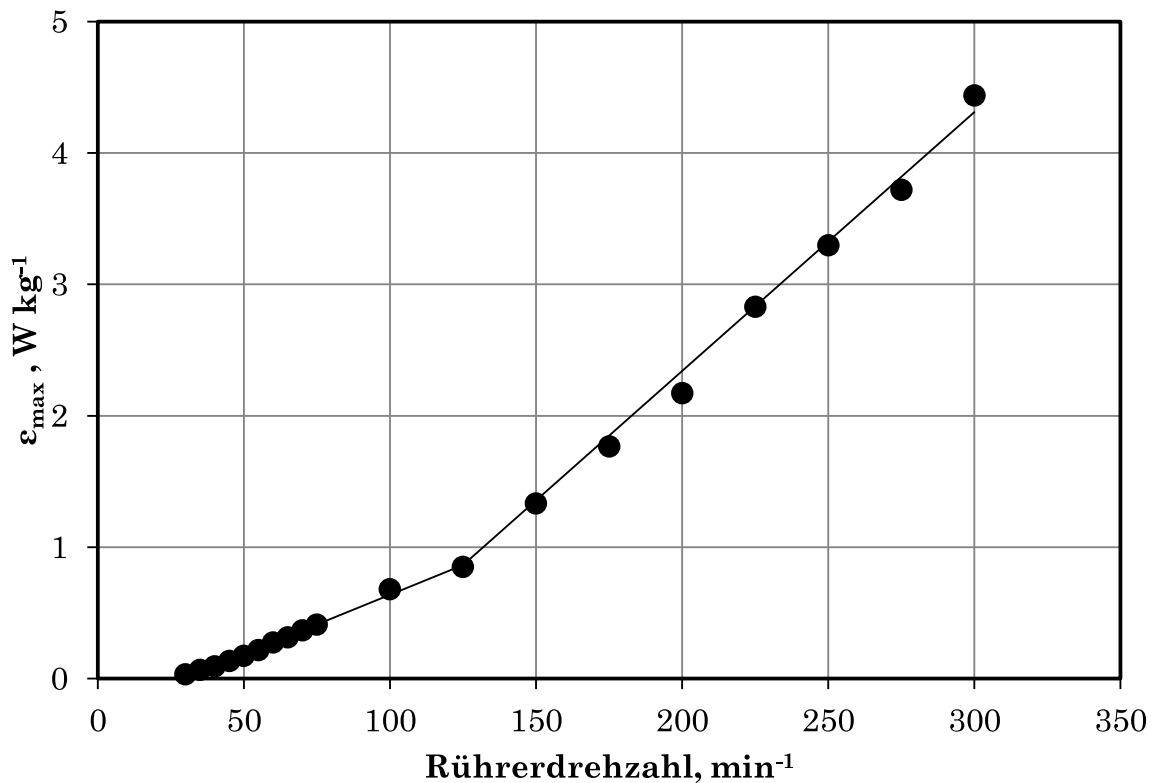
**Tabelle 5.1:** Konstanten der Potenzfunktionen zur Beschreibung des Tropfendurchmessers  $D50v$  durch die Rührerdrehzahl.

Reaktor	Konstante $i$	Exponent $r$	Bestimmtheitsmaß $R^2$
6 mL	$7,623 \cdot 10^8$	-2,424	0,981
100 mL	$2,435 \cdot 10^5$	-1,114	0,981
1 L	$3,306 \cdot 10^5$	-1,249	0,994

Durch Gleichsetzen des mittleren Tropfendurchmessers  $D50v$  lassen sich mit diesen Funktionen für die drei untersuchten Reaktoren die Rührerdrehzahlen berechnen, bei denen eine gleichgroße maximale lokale Energiedissipation auftritt.

Der mittlere Tropfendurchmesser  $D50v$  konnte über die Gleichung 3.7 und über den gemessenen mittleren Leistungseintrag  $\bar{\varepsilon}$  mit der maximalen lokalen Energiedissipation  $\varepsilon_{max}$  korreliert werden. Für den 1 L-Reaktor wurde mit der Gleichung 3.7, unter Berücksichtigung des Faktors vier für unbewehrte Reaktoren, ein Verhältnis von  $\frac{\varepsilon_{max}}{\bar{\varepsilon}} \approx 72,1$  berechnet.

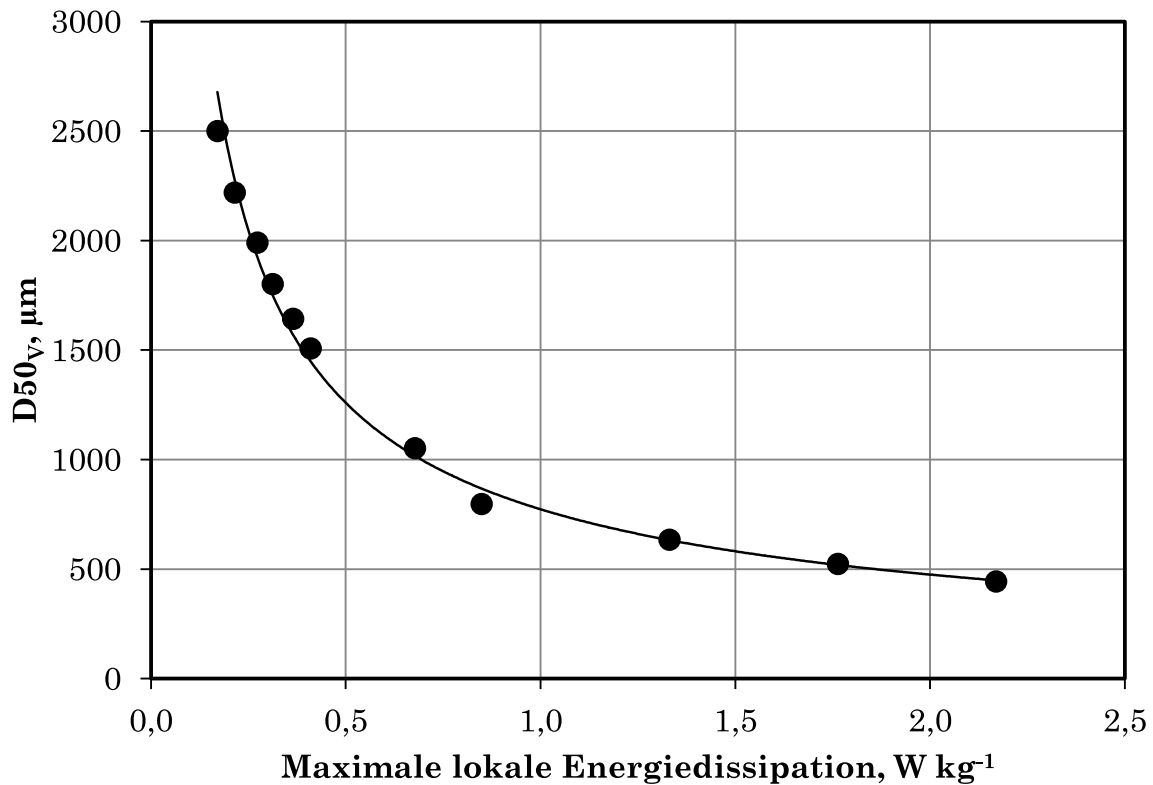
Da für den 1 L-Reaktor in Kapitel 5.1.2 der mittlere Leistungseintrag in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bestimmt wurde, konnte die maximale lokale Energiedissipation berechnet werden (Abbildung 5.6).



**Abbildung 5.6:** Maximale lokale Energiedissipation  $\epsilon_{max}$  in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl im 1 L-Reaktor. Die Linie ist eine lineare Annäherung an den Verlauf der Datenpunkte. Bei einer Rührerdrehzahl von  $125 \text{ min}^{-1}$  änderte sich die Steigung der Gerade, was auf das Ende der laminaren Strömung hinweist.

Basierend auf diesen Werten erfolgte eine Zuordnung der maximalen lokalen Energiedissipation zu dem experimentell ermittelten mittleren Öltropfendurchmesser  $D_{50V}$  (Abbildung 5.7).





**Abbildung 5.7:** Zuordnung einer maximalen lokalen Energiedissipation zu dem mittleren Öltropfendurchmesser  $D50_v$ . Die Linie ist eine Anpassung einer Potenzfunktion.

Wie anhand Gleichung 3.5 theoretisch erwartet wurde, konnten die Werte durch eine Potenzfunktion beschrieben werden:

$$\varepsilon_{max} \approx 12169 \cdot D50_v^{-1,415}; R^2 = 0,995$$

$D50_v$  mittlerer Volumendurchmesser,  $\mu\text{m}$

$R^2$  Bestimmtheitsmaß, -

$\varepsilon_{max}$  maximale lokale Energiedissipation,  $\text{W kg}^{-1}$

Diese Abschätzung gilt für das verwendete Silikonöl unter den Versuchsbedingungen.

### 5.2 Lysozymkristallisation

Zusätzlich zur verfahrenstechnischen Charakterisierung wurden die drei unterschiedlich großen Rührreaktoren anhand der Proteinkristallisation eines Proteins charakterisiert. Hierfür wurde Lysozym aus Hühnereiweiß verwendet, da hierfür Kristallisationsbedingungen bekannt waren und es günstig zur Verfügung stand ( $4 \text{ € g}^{-1}$ ).

#### 5.2.1 Suspendieren von Lysozymkristallen

Die minimale Rührerdrehzahl wurde für die verwendeten Reaktorgrößen mit einer Lysozymkristallsuspension ermittelt. Die Kristallsuspension stammte aus einer Kristallisation im 1 L-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $150 \text{ min}^{-1}$ . Nach Ausschalten des Rührers, wurde eine sichtbare Sedimentation von Kristallen im Reaktor abgewartet. Dann wurde die Rührerdrehzahl in Schritten von  $5 \text{ min}^{-1}$  erhöht, bis sich alle Kristalle in Suspension befanden. Für die Bestimmungen im 100 mL-Reaktor und im 6 mL-Reaktor wurde anschließend ein Teil dieser Kristallsuspension verwendet. In Tabelle 5.2 sind die ermittelten minimalen Rührerdrehzahlen zusammengefasst. Zum Suspendieren der Lysozymkristalle wurde im 1 L-Reaktor die geringste Rührerdrehzahl und im 6 mL-Reaktor die höchste Rührerdrehzahl benötigt. Die zugehörige Reynolds-Zahl ist im 6 mL-Reaktor  $Re = 222$ . Im 1 L-Reaktor ist sie mit  $Re = 2989$  mehr als 13-mal so hoch. Mit der Gleichung 3.2 kann die minimale Rührerdrehzahl auch berechnet werden. Da bei der experimentellen Bestimmung der minimalen Rührerdrehzahl geometrisch ähnliche Reaktoren und die gleich Kristallsuspension verwendet wurden, sollten alle Variablen der Gleichung 3.2, außer dem Rührerdurchmesser  $d$  und der minimale Rührerdrehzahl  $n_{min}$ , konstant sein. Damit wäre auch  $n_{min} \cdot d^{0,85}$  konstant. Wie in Tabelle 5.2 zu sehen ist, verdoppelt sich dieses Produkt jedoch vom 6 mL-Reaktor zum 1 L-Reaktor.

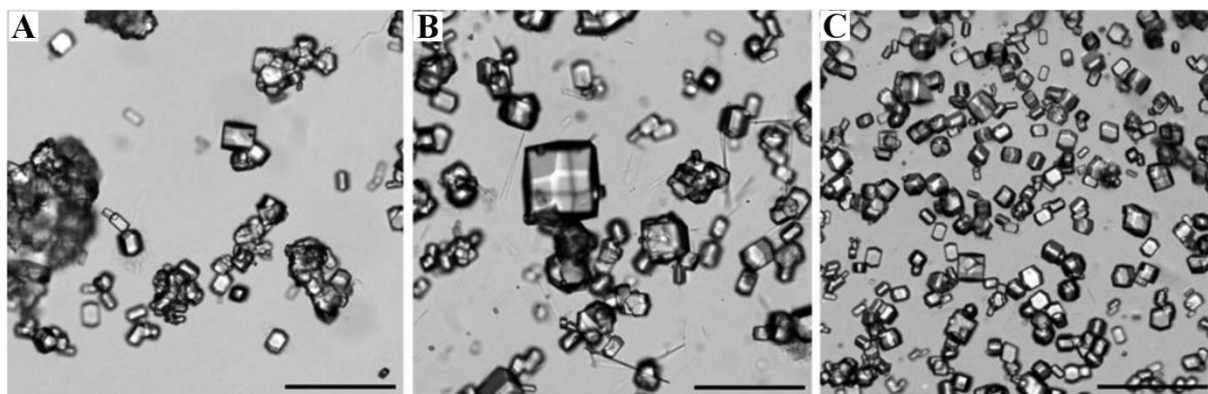
**Tabelle 5.2:** Minimale Rührerdrehzahl  $n_{min}$ , um Lysozymkristalle in Suspension zu halten. d: Rührerdurchmesser.

Reaktor	$n_{min}, \text{min}^{-1}$	Reynolds-Zahl, -	d, mm	$d^{0,85} \cdot n_{min}$
6 mL	105	222	11,3	825
100 mL	80	816	24,8	1226
Liter	50	2989	60,0	1623

Somit wäre bei der Lysozymkristallisation über den theoretischen Ansatz nur eine sehr grobe Abschätzung der minimalen Rührerdrehzahl möglich gewesen.

### 5.2.2 Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Kristallisation von Lysozym

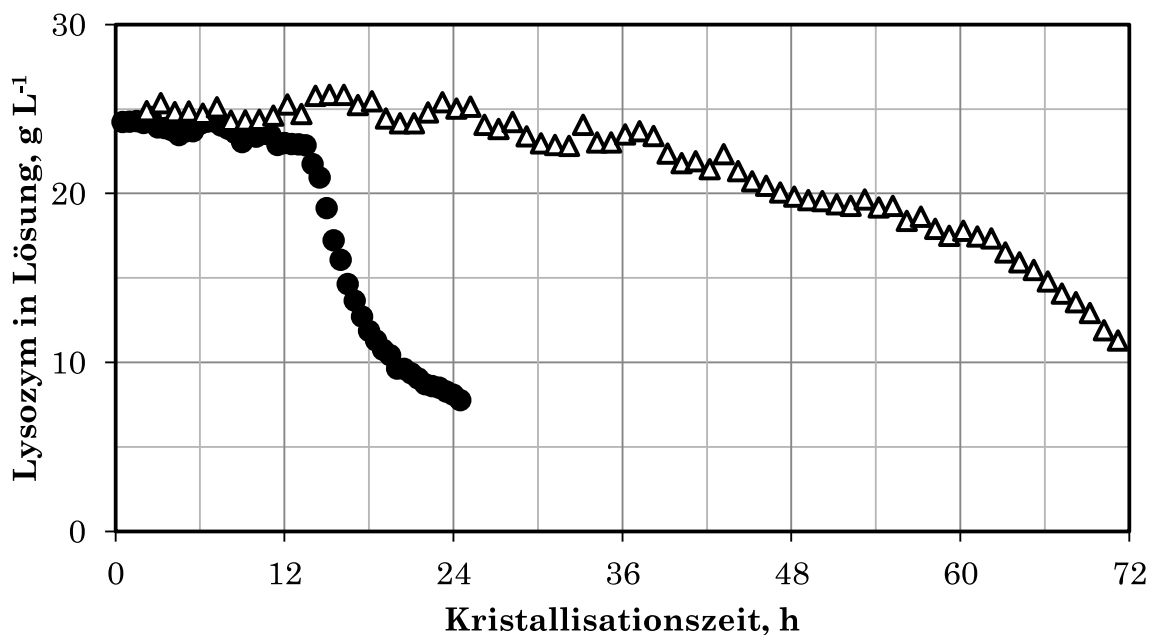
Der Einfluss eines Rührvorgangs auf die Proteinkristallisation ist bisher unzureichend untersucht. Daher wurden in dieser Arbeit Kristallisationen im 1 L-Reaktor bei unterschiedlichen Rührerdrehzahlen durchgeführt und anschließend die entstandenen Kristalle mikroskopisch betrachtet (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8:** Mikroskopische Aufnahmen von Lysozymkristallen nach der Kristallisation im 1 L-Reaktor . Rührerdrehzahl:  $50 \text{ min}^{-1}$  (A),  $100 \text{ min}^{-1}$  (B) und  $200 \text{ min}^{-1}$  (C). Der Maßstabsbalken entspricht  $100 \mu\text{m}$ .

Bei einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  waren die meisten Kristalle ineinander verwachsen und es bildeten sich Kristallagglomerate (Bild A). Bei einer Rührerdrehzahl von  $100 \text{ min}^{-1}$  waren immer noch Kristallagglomerate vorhanden, jedoch waren diese kleiner als bei  $50 \text{ min}^{-1}$  (Bild B). Bei einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  lagen die Kristalle vereinzelt vor (Bild C).

Der zeitliche Verlauf der Lysozymkristallisation wurde im 1 L-Reaktor ungerührt und mit einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  untersucht. In Abbildung 5.9 sind zwei beispielhafte Verläufe dargestellt.

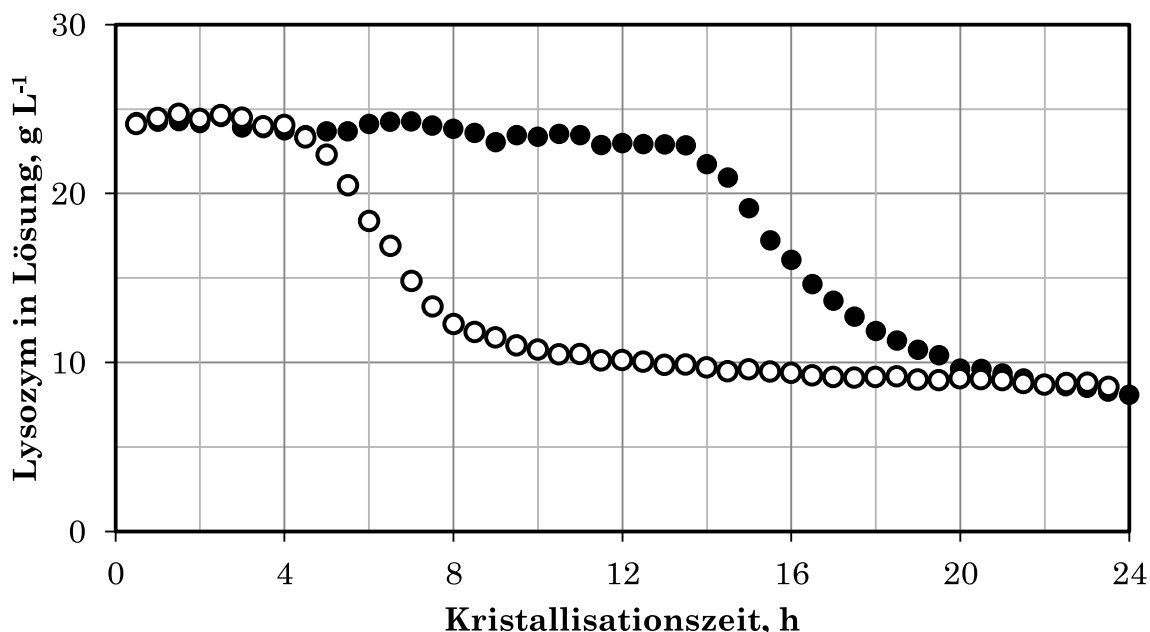


**Abbildung 5.9:** Beispielhafter Verlauf der Lysozymkristallisation im 1 L-Reaktor. Ungerührt ( $\Delta$ ) und einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  ( $\bullet$ ).

Im ungerührten System nahm die Lysozymkonzentration in Lösung deutlich langsamer ab als im gerührten Reaktor. Ungerührt wurde eine maximale Kristallisationsgeschwindigkeit von durchschnittlich  $0,9 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$  gemessen. Bei einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  war die maximale Kristallisationsgeschwindigkeit durchschnittlich  $2,4 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Somit lag wahrscheinlich eine Diffusionslimitierung im ungerührten System vor, die das Kristallwachstums inhibierte. Zusätzlich dauerte der Kristallisationsstart, der durch ein dauerhaftes Absinken der gelösten Lysozymkonzentration unter  $23 \text{ g L}^{-1}$  definiert wurde, ohne Durchmischung deutlich länger als im gerührten

Reaktor. Im 1 L-Reaktor ohne Durchmischung erfolgte der Kristallisationsstart durchschnittlich nach 40,1 h. Zum Vergleich fand der Kristallisationsstart bei einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  durchschnittlich nach bereits 10,9 h statt.

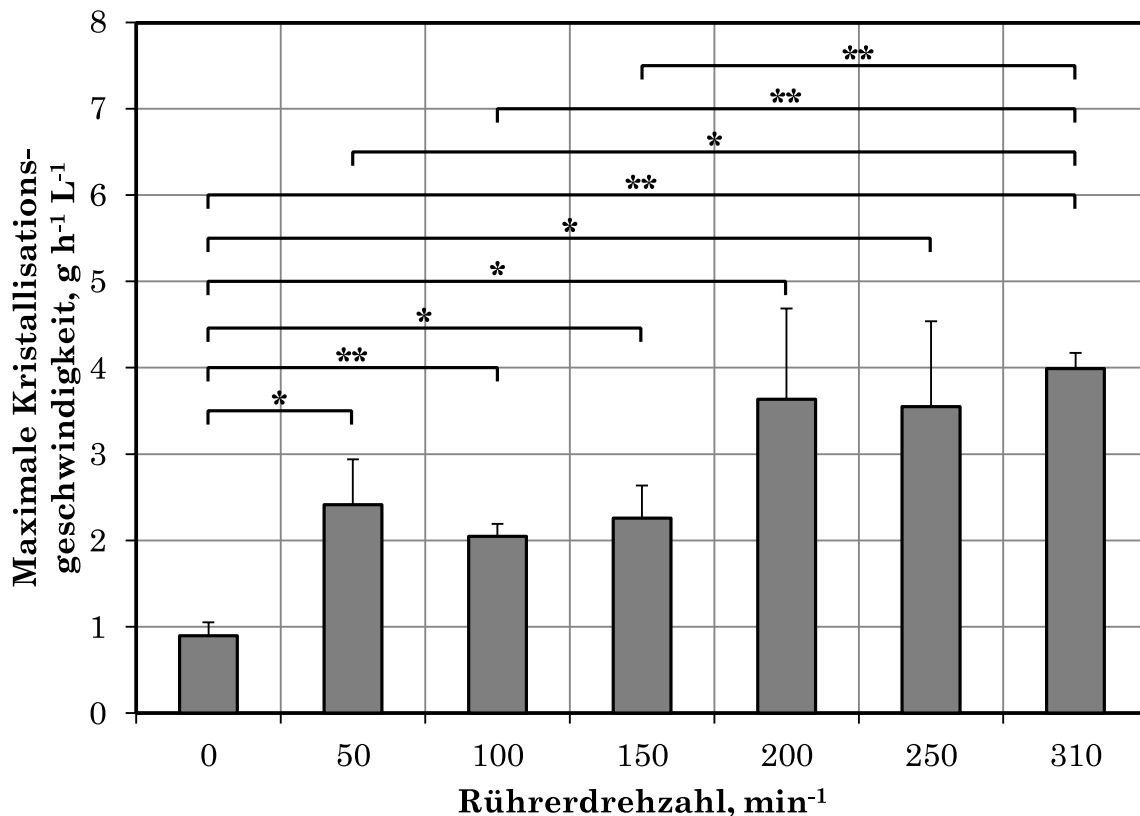
Durch eine weitere Erhöhung der Rührerdrehzahl auf  $200 \text{ min}^{-1}$  fand der Kristallisationsstart noch schneller statt. In Abbildung 5.10 sind beispielhafte Verläufe der Lysozymkristallisation im 1 L-Reaktor mit einer Rührerdrehzahl von  $50 \text{ min}^{-1}$  und einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  dargestellt.



**Abbildung 5.10:** Beispielhafter Verlauf der Lysozymkristallisation im 1 L-Reaktor bei verschiedenen Rührerdrehzahlen.  $50 \text{ min}^{-1}$  (●) und  $200 \text{ min}^{-1}$  (○).

Bei einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  war der Kristallisationsstart im Mittel bereits nach 3,7 h und eine maximale Kristallisationsgeschwindigkeit von durchschnittlich  $3,6 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$  wurde erreicht.

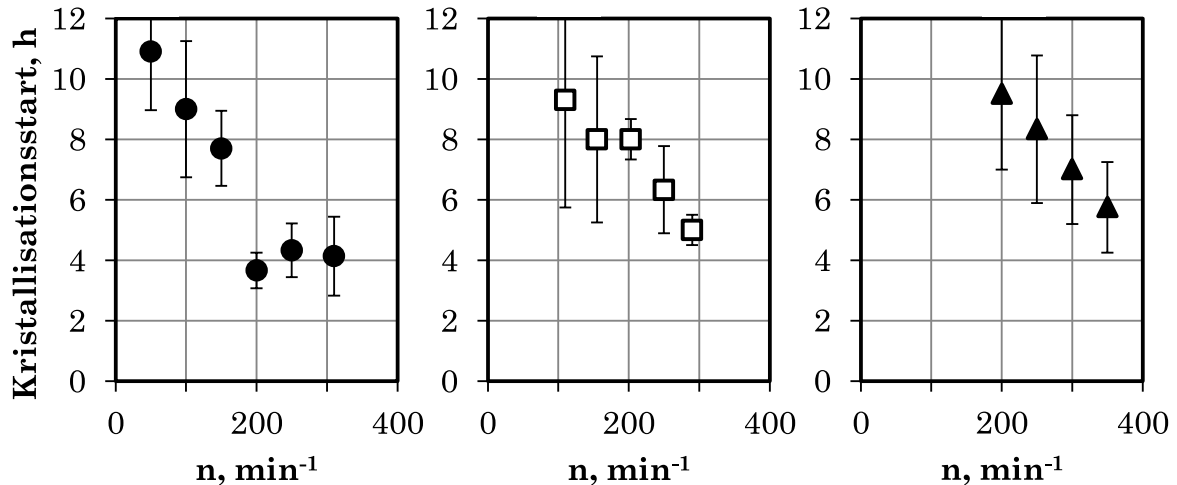
Durch einen schnellen Kristallisationsstart und durch eine hohe maximale Kristallisationsgeschwindigkeit kann ein schneller Kristallisationsprozess erreicht werden. Daher wurde die maximale Kristallisationsgeschwindigkeit bei der Lysozymkristallisation im 1 L-Reaktor für mehrere Rührerdrehzahlen bestimmt (Abbildung 5.11).



**Abbildung 5.11:** Einfluss der Rührerdrehzahl auf die maximale Kristallisationsgeschwindigkeit von Lysozym im 1 L-Reaktor. Statistische Signifikanz: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  (Zweistichprobent-Test für unabhängige Stichproben). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von 3 bis 6 Experimenten mit der Mittelabweichung als Fehlerindikator.

Ungerührt war die maximale Kristallisationsgeschwindigkeit signifikant langsamer als bei allen gerührten Kristallisationen. Die höchste Kristallisationsgeschwindigkeit war  $4 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$  bei einer Rührerdrehzahl von  $310 \text{ min}^{-1}$ . Bei der Kristallisation mit einer Rührerdrehzahl von  $310 \text{ min}^{-1}$  lag im Vergleich zu den Rührerdrehzahlen  $50 \text{ min}^{-1}$ ,  $100 \text{ min}^{-1}$  oder  $150 \text{ min}^{-1}$  ein signifikanter Unterschied der Kristallisationsgeschwindigkeit vor. Eine einfaktorielle Varianzanalyse bestätigte die Signifikanz der steigenden Kristallisationsgeschwindigkeit mit steigender Rührerdrehzahl im Bereich von  $50 \text{ min}^{-1}$  bis  $310 \text{ min}^{-1}$ .

Die Zeit bis zum Kristallisationsstart wurde für alle verwendeten Reaktorgrößen in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bestimmt (Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.12:** Kristallisationsstart von Lysozym in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl  $n$ . 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert von 3 bis 6 Experimenten mit der Mittelabweichung als Fehlerindikator.

Im 1 L-Reaktor setzte der Kristallisationsstart bis zu einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  mit steigender Rührerdrehzahl schneller ein. Eine einfaktorielle Varianzanalyse bestätigte die Signifikanz dieses Trends in Bereich von  $50 \text{ min}^{-1}$  bis  $200 \text{ min}^{-1}$  ( $p = 0,005$ ). Ab einer Rührerdrehzahl von  $200 \text{ min}^{-1}$  trat keine signifikante Änderung des Kristallisationsstarts mehr auf ( $p = 0,778$ ). Der Kristallisationsstart stagnierte bei 4 h. Es wurden im 100 mL-Reaktor Rührerdrehzahlen von  $110 \text{ min}^{-1}$  bis  $290 \text{ min}^{-1}$  und im 6 mL-Reaktor von  $200 \text{ min}^{-1}$  bis  $350 \text{ min}^{-1}$  untersucht. Eine einfaktorielle Varianzanalyse dieser Bereiche zeigte einen Trend zu einem schnelleren Kristallisationsstarts mit steigender Rührerdrehzahl (100 mL:  $p = 0,303$ ; 6 ml:  $p = 0,206$ ).

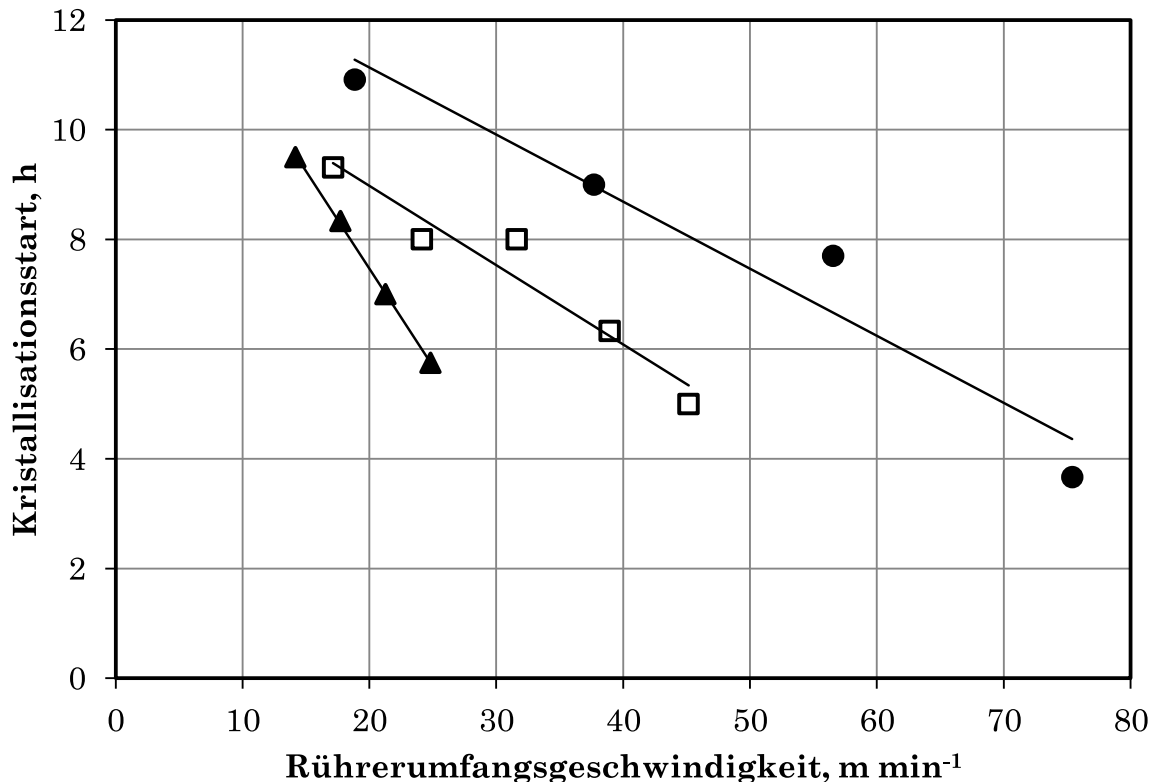
### 5.3 Diskussion

Für eine Proteinkristallisation im technischen Maßstab soll eine Durchmischung stattfinden (Schmidt *et al.*, 2005). Falls keine Durchmischung erfolgt, sedimentieren die Kristalle, wachsen ineinander und es tritt eine Diffusionslimitierung des Kristallwachstums auf (Grant und Saville, 1995). Dies wurde auch in dieser Arbeit bei ungerührter Kristallisation von Lysozym im Liter-Maßstab beobachtet. In dieser Arbeit führte schnelleres Rühren zu einem schnelleren Start der Kristallisation. Dies weist auf eine Erhöhung der Keimbildungsrate hin.

Bei der Maßstabsvergrößerung eines Proteinkristallisationsprozesses können unterschiedliche Kriterien verwendet werden. Nienow (1976) verwendete die minimale Rührerdrehzahl, die benötigt wird, um die Kristalle in Suspension zu halten. Über die theoretische Berechnung der minimalen Rührerdrehzahl (Gleichung 3.2) nach Nienow (1968) konnte keine Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Daten der drei Reaktoren erreicht werden. Die minimale Rührerdrehzahl entsprach in allen drei Reaktoren einer experimentell bestimmten Mischzeit von etwa 150 s. Bei einer Kristallisation von Lysozym traten bei der minimalen Rührerdrehzahl im 1 L-Reaktor Kristallagglomerate auf. Diese sind bei einer Kristallisation unerwünscht, da sie die Kristalloberfläche verringern und dadurch die Kristallisationsgeschwindigkeit reduzieren. Zusätzlich können Einschlüsse entstehen, die bei einem Aufreinigungsprozess durch Kristallisation die Reinigungseffizienz reduzieren (Funakoshi *et al.*, 1999; Funakoshi *et al.*, 2000; Judge *et al.*, 1995; Sangwal, 1993). Deshalb war bei der Kristallisation von Lysozym die minimale Rührerdrehzahl als Kriterium für eine Maßstabsvergrößerung nicht geeignet. Die zweite Möglichkeit für eine Maßstabsvergrößerung der Proteinkristallisation ist ein konstanter mittlerer Leistungseintrag (Harrison *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2005). Dieses Kriterium konnte nicht verwendet werden, da in den kleineren 100 mL- und 6 mL-Reaktoren die eingebrachte Leistung mit den vorhandenen Mitteln nicht mehr messbar war. Im 6 mL-Reaktor hätten Leistungen von 12 - 360  $\mu$ W gemessen werden müssen. Die dritte Möglichkeit für eine



Maßstabsvergrößerung ist eine konstante Rührerumfangsgeschwindigkeit (Stieß, 2009). Die Rührerumfangsgeschwindigkeit lässt sich aus der Rührerdrehzahl und dem Rührerdurchmesser berechnen (Gleichung 4.2). In Abbildung 5.13 wurde die Rührerumfangsgeschwindigkeit gegen den Kristallisationsstart der drei Reaktorgrößen aufgetragen um zu überprüfen, ob eine konstante Rührerumfangsgeschwindigkeit zur Maßstabsvergrößerung geeignet wäre.

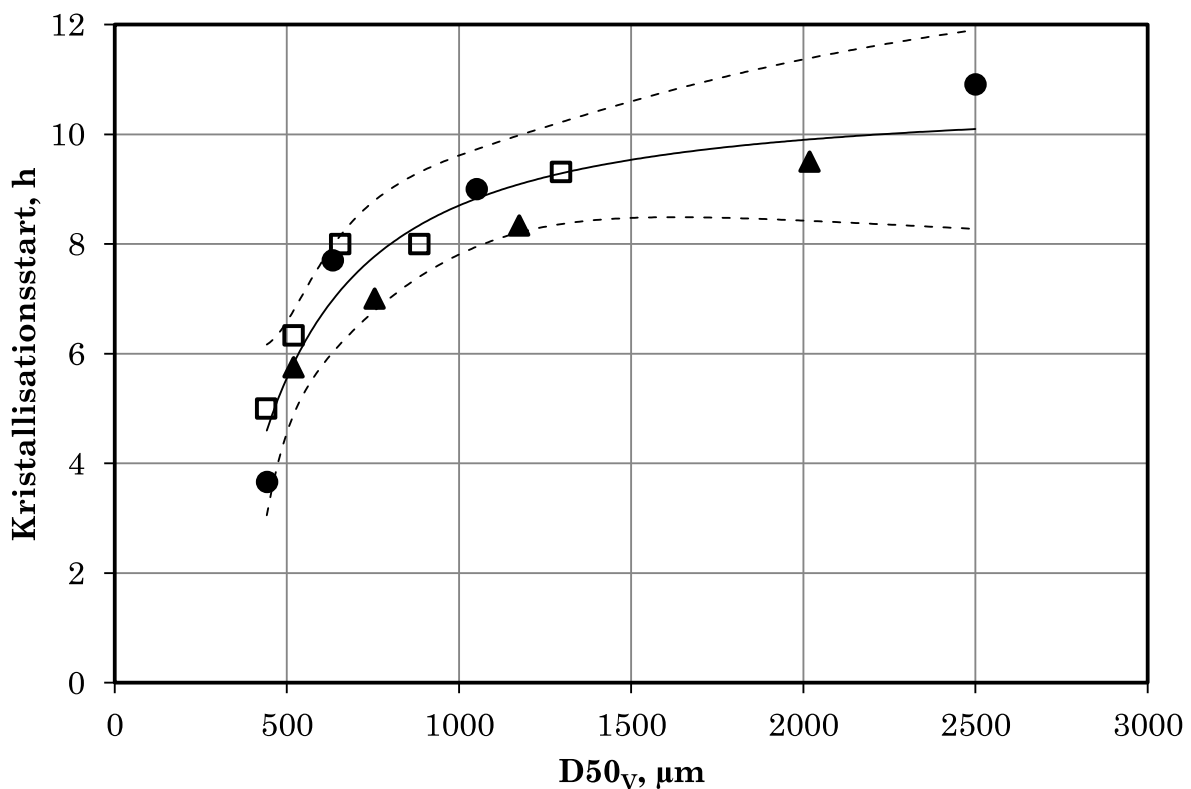


**Abbildung 5.13:** Zeitpunkt des Kristallisationsstarts von Lysozym in Abhängigkeit von der Rührerumfangsgeschwindigkeit. 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Die Linien sind lineare Annäherungen an den Verlauf der Datenpunkte der einzelnen Reaktoren.

Es wurde kein gemeinsamer Verlauf der Datenpunkte der drei unterschiedlich großen Reaktoren festgestellt. Daher war eine konstante Rührerumfangsgeschwindigkeit kein geeignetes Kriterium für die Maßstabsvergrößerung des Lysozymkristallisationsprozesses.

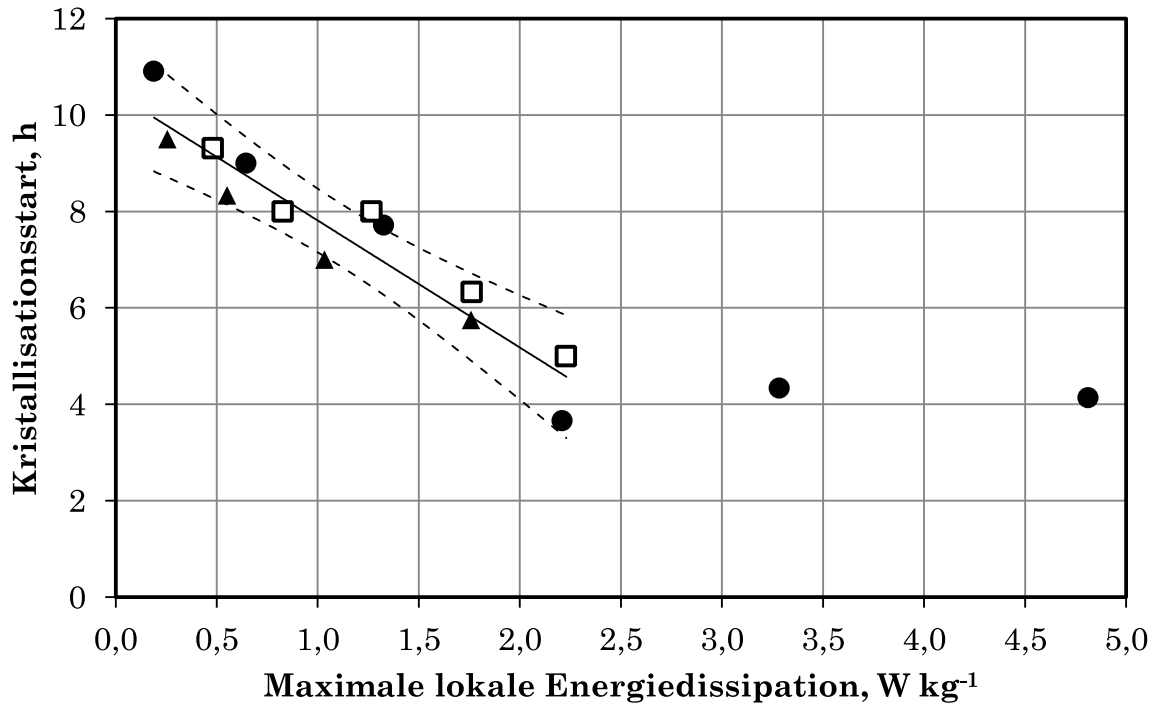
Als neue Möglichkeit für die Maßstabsvergrößerung wurde die Verwendung einer konstanten maximalen lokalen Energiedissipation untersucht. Dieser Parameter

wird bei scherkraftsensitiven Prozessen, wie der Kultivierung tierischer Zellen, verwendet (Henzler, 2000; Hortsch und Weuster-Botz, 2010; Kaiser *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2006; Venkat und Chalmers, 1996). Für eine Maßstabsvergrößerung in der Proteinkristallisation wurde dieser Parameter bisher nicht eingesetzt. In Abbildung 5.14 ist der mittlere Volumendurchmesser  $D_{50v}$  der Öltropfen, als Maß für die maximale lokale Energiedissipation, gegen die Zeit des Kristallisationsstarts für die drei unterschiedlich großen Reaktoren aufgetragen.



**Abbildung 5.14:** Mittlerer Kristallisationsstart von Lysozym in Abhängigkeit des mittleren Öltropfendurchmesser  $D_{50v}$ . 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Die durchgezogene Linie ist eine Regression einer Potenzfunktion an alle Datenpunkte. Gestrichelt ist das 95 % Konfidenzintervall eingezeichnet.

Die Datenpunkte der drei Reaktoren konnten mit einer gemeinsamen Potenzfunktion beschrieben werden. Somit war eine konstante maximale lokale Energiedissipation das beste Kriterium für eine Maßstabsvergrößerung. In Abbildung 5.15 wurde der mittlere Volumendurchmesser  $D_{50v}$  durch die in Kapitel 5.1.3 abgeschätzte maximale lokale Energiedissipation ersetzt.



**Abbildung 5.15:** Abhängigkeit des Kristallisationsstarts bei Lysozym von der maximalen lokalen Energiedissipation. 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Die durchgezogene Linie ist eine lineare Regression im Bereich der maximalen lokalen Energiedissipation von 0,2 bis 2,2  $W\ kg^{-1}$ . Gestrichelt ist das 95 % Konfidenzintervall eingezeichnet.

Das Optimum der Lysozymkristallisation lag bei einer maximalen lokalen Energiedissipation von 2,2  $W\ kg^{-1}$ . Bei einer höheren maximalen lokalen Energiedissipation konnte die Zeit bis zum Kristallisationsstart nicht weiter verkürzt werden und die Kristalle wurden unnötig hohen Scherkräften ausgesetzt. Das Optimum entspricht einer Rührerdrehzahl von 200  $min^{-1}$  im 1 L-Reaktor, von 290  $min^{-1}$  im 100 mL-Reaktor und von 375  $min^{-1}$  im 6 mL-Reaktor.

Nach Henzler (2000) steht in geometrisch ähnlichen Reaktoren der mittlere Leistungseintrag und die maximale lokale Energiedissipation in einem konstanten Verhältnis. Daher ist anzunehmen, dass eine Maßstabsvergrößerung bei geometrischer Ähnlichkeit auch über den mittleren Leistungseintrag möglich ist. Sobald jedoch geometrische Parameter verändert werden, sollte bei der Proteinkristallisation die maximale lokale Energiedissipation für die Maßstabsvergrößerung verwendet werden.

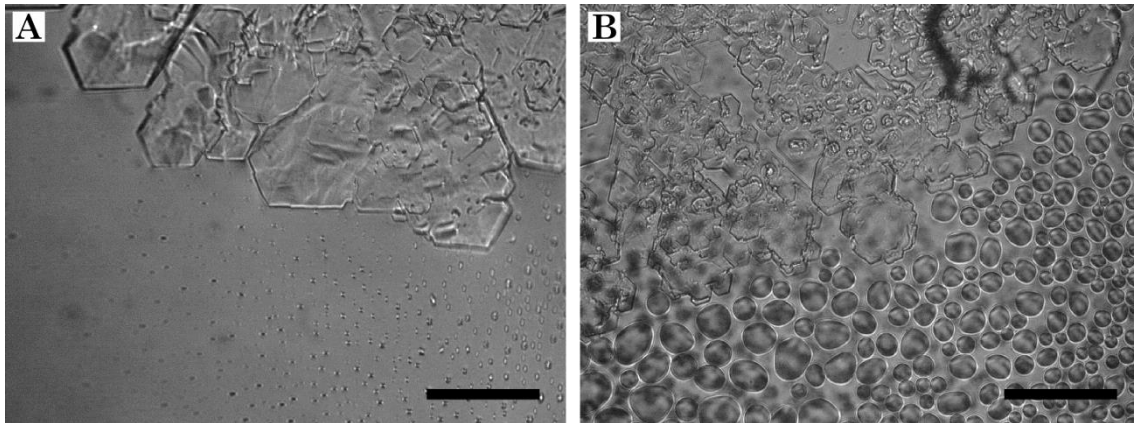
## 6 Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments

Canakinumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der gegen das Interleukin-1 $\beta$  gerichtet ist und damit entzündungshemmend wirkt. Für den ganzen Antikörper sind keine Kristallisationsbedingungen bekannt. Für das Canakinumab Fab-Fragment dagegen waren Kristallisationsbedingungen bekannt. Da dieses Fab-Fragment als diagnostisches Mittel wertvoll sein könnte, wurde dessen Kristallisation bis in den gerührten 6 mL-Maßstab durchgeführt.

### 6.1 Kristallisation im Dampfdiffusionsverfahren

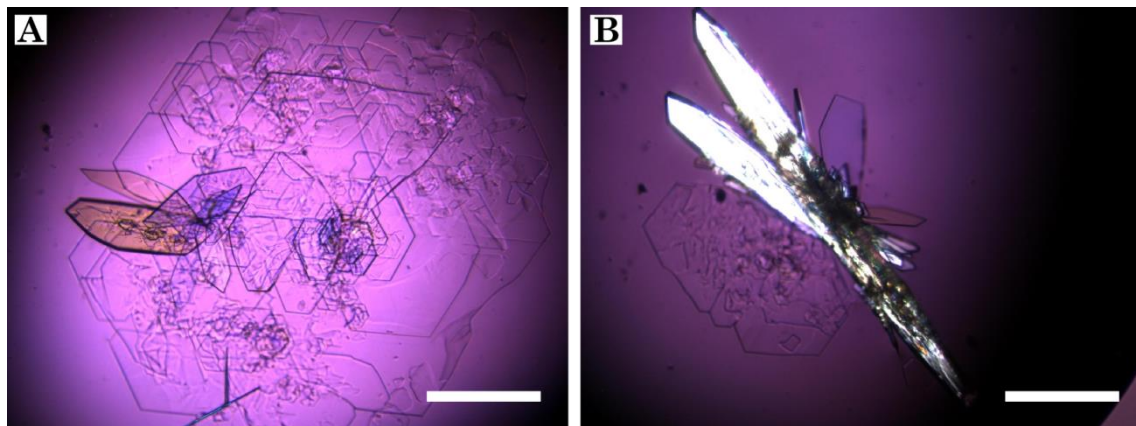
Als Ausgangsbasis für die Kristallisation des Fab-Fragment des therapeutischen Antikörpers Canakinumab wurden Kristallisationsbedingungen verwendet, die im Rahmen einer Strukturaufklärung in Dampfdiffusionsversuchen (Sitztropfen) entstanden waren (interne Kommunikation mit Jean-Michel Rondeau, Novartis Pharma AG am 10.06.2009). Proteinlösung: 60 g L<sup>-1</sup> Canakinumab Fab-Fragment, 10 mM TRIS/HCl Puffer pH 7,4, 25 mM NaCl; Reservoirolösung: 12 % PEG 5000 MME, 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5; Kristallisationstemperatur 20 °C.

Da Canakinumab nur begrenzt zur Verfügung stand und das Fab-Fragment erst durch Papainverdau des ganzen monoklonalen Antikörpers hergestellt werden musste, wurde eine Proteinlösung mit 15 g L<sup>-1</sup> Fab-Fragment statt 60 g L<sup>-1</sup> verwendet. Ebenso wurde die Konzentration der Reservoirolösung variiert: 8 % - 14 % PEG MME 5000, 50 mM Natriumcitrat pH 4,5 - 5,5. Nach fünf Tagen bei 20 °C wurden nur klare Tropfen oder flüssig-flüssig Phasentrennung beobachtet. Nach Erhöhung der Kristallisationstemperatur auf 28 °C bildeten sich plattenartige Kristalle (Abbildung 6.1).



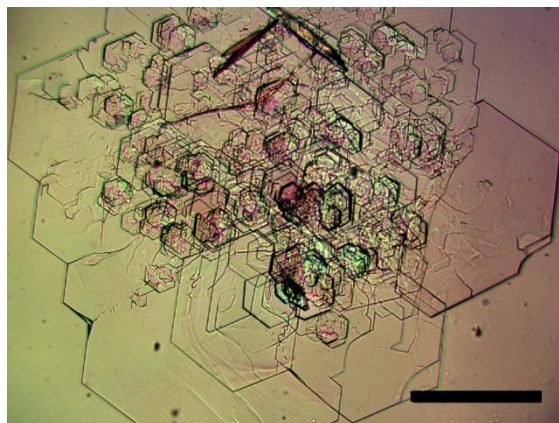
**Abbildung 6.1:** Kristalle des Canakinumab Fab-Fragments nach einer Temperaturerhöhung auf 28 °C im Hängetropfen nach anfänglicher flüssig-flüssig Phasentrennung bei 20 °C. Proteinlösung: 15 g L<sup>-1</sup> Fab-Fragment. Reservoirolösung: A) 10 % PEG MME 5000, 50 mM Natriumcitrat pH 5,0 und B) 14 % PEG MME 5000, 50 mM Natriumcitrat pH 5,5. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Durch Variation verschiedener Substanzen und der Temperatur, wurde versucht eine kürzere Kristallisationszeit ohne flüssig-flüssig Phasentrennung zu erreichen. PEG MME 5000 konnte nicht durch andere Fällungsmittel, wie PEG 3000, PEG 4000 oder Ammoniumsulfat, ersetzt werden. Anstelle des Natriumcitratpuffers konnte auch Natriumacetatpuffer oder Natriummalonatpuffer verwendet werden. Bei 28 °C trat keine flüssig-flüssig Phasentrennung mehr auf. Bei 20 °C entstanden nur mit dem Natriummalonatpuffer Kristalle, aber auch flüssig-flüssig Phasentrennung. Der Natriummalonatpuffer wurde von pH 5,0 bis pH 8,0 variiert. Bei pH 5,0 und pH 6,0 wurden Kristalle nach sechs Tagen beobachtet, bei pH 7,0 und pH 8,0 schon nach zwei Tagen (Abbildung 6.2). Die Kristallmorphologie zeigte jedoch Unregelmäßigkeiten an den Kanten der Kristalle.



**Abbildung 6.2:** Kristalle des Canakinumab Fab-Fragments im Hängetrophen bei 28 °C. Proteinlösung: 8,1 g L<sup>-1</sup> Fab-Fragment. Reserviörlösung: A) 12 % PEG MME 5000, 50 mM Natriummalonatpuffer pH 8,0 und B) 14 % PEG MME 5000, 50 mM Natriummalonat pH 8,0. Aufnahmen entstanden nach sechs Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Der Einsatz von 50 mM Natriumchlorid in der Reserviörlösung führte zu gleichmäßigen hexagonalen Kristallen (Abbildung 6.3).



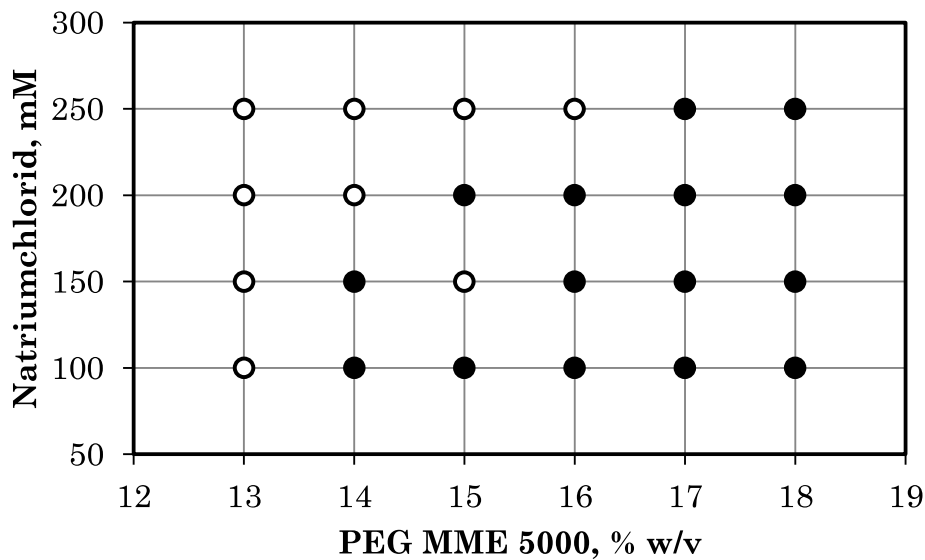
**Abbildung 6.3** Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments im Hängetrophen bei 28 °C mit Natriumchlorid. Proteinlösung: 4 g L<sup>-1</sup> Fab-Fragment. Reserviörlösung: 50 mM Natriumchlorid, 14 % PEG MME 5000 und 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0. Aufnahme nach fünf Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Diese Bedingung wurde für den Transfer in das Mikrosatzverfahren verwendet.

## 6.2 Kristallisation im Mikrosatzverfahren

Ausgehend von den Kristallisationsbedingungen im Hängetropfen (Proteinlösung:  $4 \text{ g L}^{-1}$  Fab-Fragment; Reservoirolösung:  $50 \text{ mM}$  Natriumchlorid,  $14 \%$  PEG MME 5000 und  $50 \text{ mM}$  Natriummalonatpuffer pH 7,0) wurde ein Transfer in das Mikrosatzverfahren durchgeführt.

Folglich war im Tropfen des Dampfdiffusionsexperiments die Startkonzentrationen  $2 \text{ g L}^{-1}$  Fab-Fragment,  $7 \%$  PEG MME 5000,  $25 \text{ mM}$  Natriumchlorid und  $25 \text{ mM}$  Natriummalonatpuffer pH 7,0. Der Tropfen reduzierte mit der Zeit durch die Dampfdiffusion sein Volumen auf etwa das halbe Volumen. Dadurch war die Endkonzentration doppelt so hoch wie die Startkonzentration. Dies wurde in einer Mikrotiterplatte im Satzverfahren über 24 Schritte im Dreifachansatz nachgestellt. Eine Kristallisation erfolgte erst bei der Höchstkonzentration. Daher wurden noch höhere Natriumchlorid- und PEG MME 5000-Konzentrationen untersucht (Abbildung 6.4).



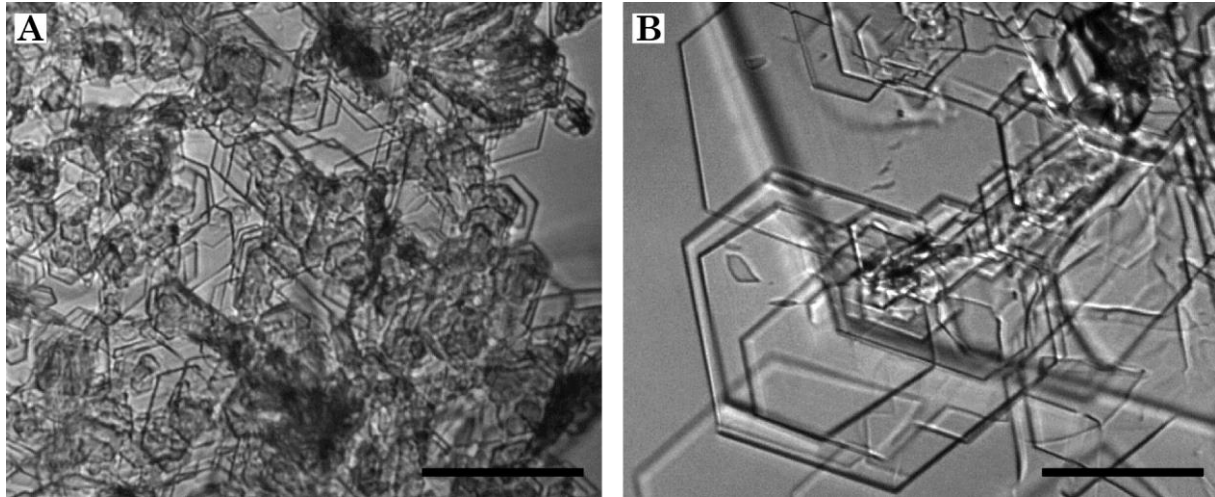
**Abbildung 6.4:** Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragment im Mikrosatzverfahren bei  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $3 \text{ g L}^{-1}$  Canakinumab Fab-Fragment und  $50 \text{ mM}$  Natriummalonatpuffer pH 7,0. Die PEG MME 5000 und Natriumchlorid wurden variiert. Die Auswertung erfolgte nach vier Tagen: Kristalle (●); klare Flüssigkeit (○).

Bei hohen Natriumchloridkonzentration von  $250 \text{ mM}$  wurde mindestens  $17 \%$  PEG MME 5000 benötigt, damit es zur Bildung von Kristallen kam. Bei  $17 \%$

## 6 Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments

---

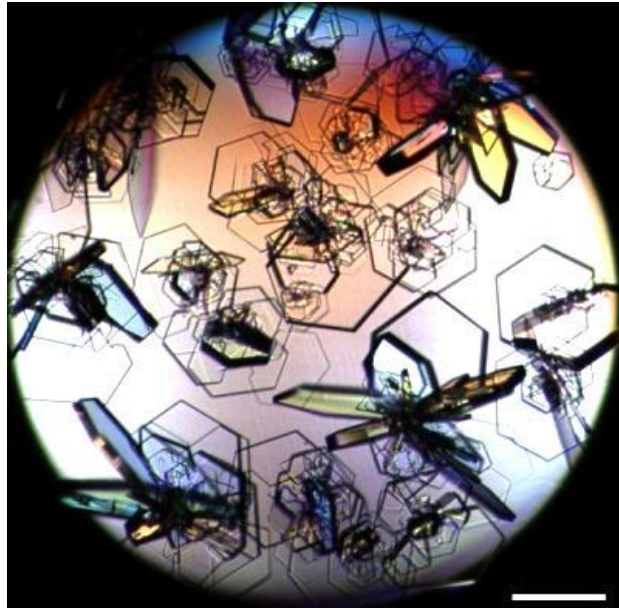
PEG MME 5000 entstanden bei 100 mM Natriumchlorid viele kleine Kristalle und bei 250 mM wenige große Kristalle (Abbildung 6.5). Die Zugabe von Natriumchlorid reduzierte somit die Keimbildungsrate.



**Abbildung 6.5:** Einfluss von Natriumchlorid auf die Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragment. Mikrosatzverfahren bei 28 °C, 3 g L<sup>-1</sup> Canakinumab Fab-Fragment, 17 % PEG MME 5000, 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0 und A) 100 mM NaCl bzw. B) 250 mM NaCl. Die Aufnahme erfolgte nach vier Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Für den Transfer in das gerührte 6 mL-Satzverfahren wurde eine Bedingung ausgewählt, bei der weder flüssig-flüssig Phasentrennung noch Präzipitation stattfand und die Kristalle eine intakte hexagonale Morphologie hatten (Abbildung 6.6). Diese Bedingung war 3 g L<sup>-1</sup> Canakinumab Fab-Fragment, 14 % PEG MME 5000, 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0 und 100 mM Natriumchlorid bei 28°C. Ersten Kristalle wurden nach drei Tagen beobachtet.

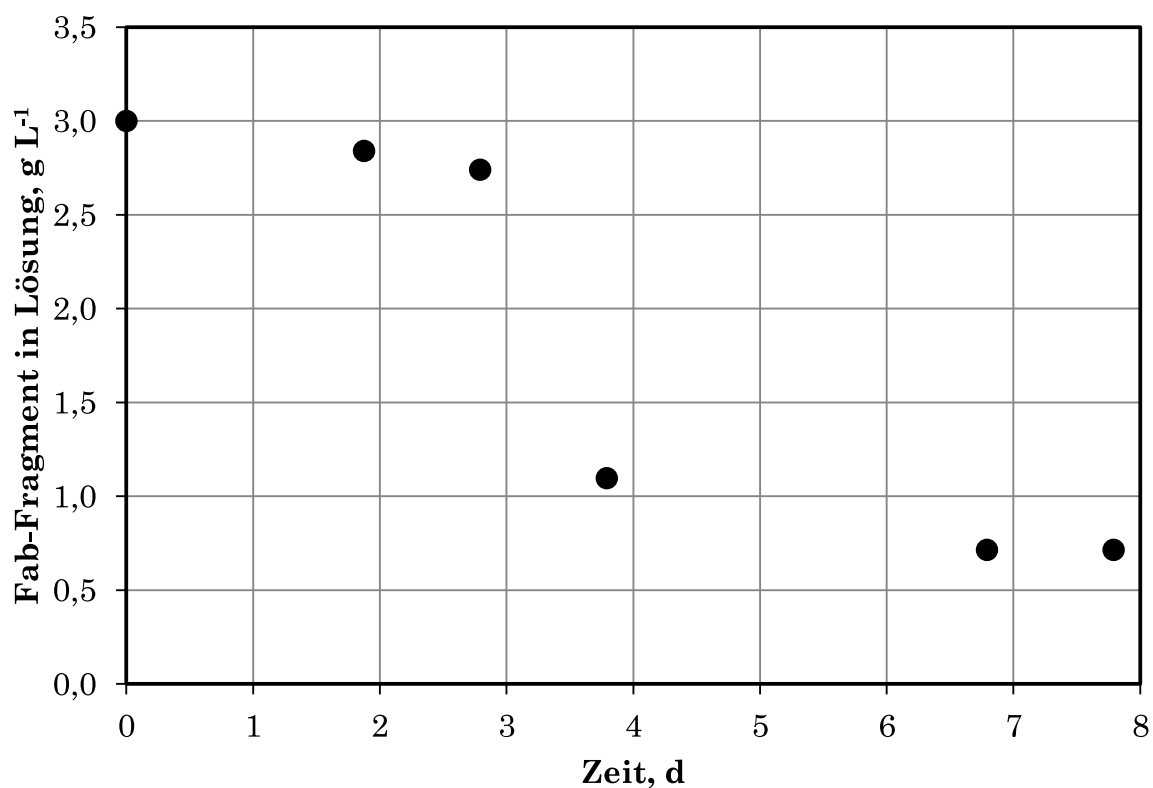




**Abbildung 6.6:** Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments im Mikrosatzverfahren. 10  $\mu\text{L}$  Ansatz, 3  $\text{g L}^{-1}$  Canakinumab Fab-Fragment, 14 % PEG MME 5000, 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0 und 100 mM Natriumchlorid bei 28 °C. Die Aufnahme erfolgte nach 11 Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

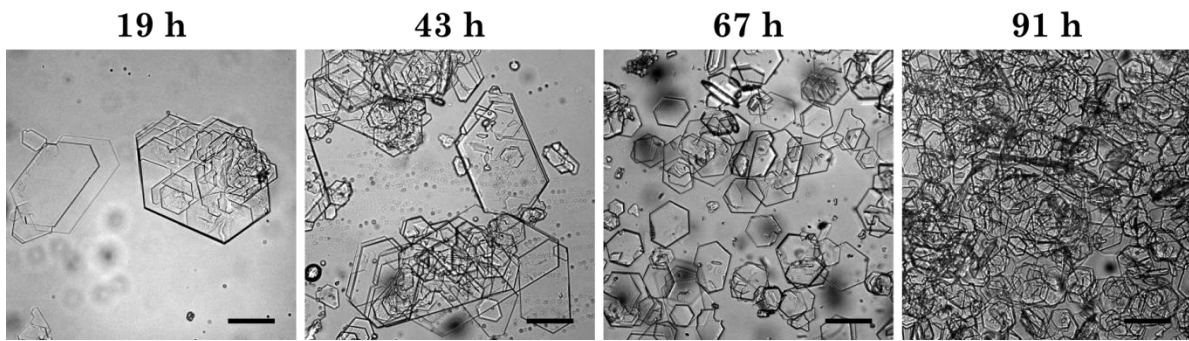
### 6.3 Kristallisation im gerührten mL-Satzverfahren

Für das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers Canakinumab sollte gezeigt werden, dass eine Kristallisation im gerührten mL-Satzverfahren möglich ist. Die Kristallisation erfolgte im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $115 \text{ min}^{-1}$  bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Eingesetzt wurden  $3 \text{ g L}^{-1}$  Canakinumab Fab-Fragment, 14 % PEG MME 5000; 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0 und 100 mM Natriumchlorid. Der Verlauf des Kristallisationsprozesses ist in Abbildung 6.7 dargestellt.



**Abbildung 6.7:** Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragment im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $115 \text{ min}^{-1}$ .  $3 \text{ g L}^{-1}$  Canakinumab Fab-Fragment; 14 % PEG MME 5000; 50 mM Natriummalonatpuffer pH 7,0; 100 mM Natriumchlorid;  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nach sieben Tagen befanden sich noch  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  Canakinumab Fab-Fragment in der Lösung. Es wurde eine Kristallisationsausbeute von 77 % erreicht. Abbildung 6.8 zeigt die im gerührten 6 mL-Reaktor entstandenen Kristalle im zeitlichen Verlauf.



**Abbildung 6.8:** Canakinumab Fab-Fragment Kristalle im gerührten Satzverfahren. Anfangs (19 h) bildeten sich wenige große Kristalle (Durchmesser bis zu 300  $\mu\text{m}$ ), später (91 h) hatten die Kristalle einen durchschnittlichen Durchmesser von 80  $\mu\text{m}$ . Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Erste Kristalle wurden nach 19 Stunden beobachtet. Die Kristalle waren bis zu 300  $\mu\text{m}$  groß und hatten deutliche Bruchstellen. Nach 91 Stunden hatten die Kristalle einen mittleren Durchmesser von etwa 80  $\mu\text{m}$ .

### 6.4 Diskussion

Ausgehend von einer Kristallisationsbedingung, die aus Dampfdiffusionsversuchen (Sitztropfen) stammte, wurden die Bedingungen schrittweise für eine Kristallisation im Rührkessel angepasst. Flüssig-flüssig Phasentrennung konnte durch eine Temperaturerhöhung von 20 °C auf 28 °C verhindert werden. Es ist bekannt, dass höhere Temperaturen flüssig-flüssig Phasentrennung auch bei der Proteinkristallisation reduzieren oder verhindern können (Asherie, 2004; Jion *et al.*, 2006). Für die Kristallisation des Canakinumab Fab-Fragments erwies sich ein Natriummalonatpuffer geeigneter als der ursprüngliche Natriumcitratpuffer. Der Transfer von den Dampfdiffusionsbedingungen in das Mikrosatzverfahren wurde erfolgreich durchgeführt. Im Mikrosatzverfahren konnte der Einfluss von Natriumchlorid (50 - 250 mM) näher charakterisiert werden. Die Zugabe von Natriumchlorid reduzierte die Keimbildungsrate.

Der Transfer in das gerührte 6 mL-Satzverfahren war erfolgreich. Im gerührten System wurden die Kristalle wegen der auftretenden sekundären Keimbildung kleiner als im Mikrosatzverfahren. (Hekmat *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2005; Tait *et al.*, 2009). Erste Kristalle waren bereits nach 19 Stunden sichtbar. Zum Vergleich war dies im ungerührten Mikrosatzverfahren erst nach drei Tagen der Fall. Dies weist auf eine erhöhte Keimbildungsrate durch das Rühren hin. Dieser Einfluss wurde bereits im Kapitel 5.2.2 bei der Lysozymkristallisation gesehen und deckt sich mit den Arbeiten von Judge *et al.* (1995), Parambil *et al.* (2011) und Yaoi *et al.* (2004). Die anfänglich bis zu 300 µm großen Kristalle zerbrachen durch die Scherkräfte im Rührkessel und es kam zur sekundären Keimbildung (Tait *et al.*, 2009). Somit lassen sich die vielen morphologisch intakten Kristalle mit einem viel kleineren Durchmesser von etwa 80 µm nach 91 Stunden erklären. Am Ende des Kristallisationsprozesses im 6 mL-Reaktor lagen noch 0,7 g L<sup>-1</sup> des Fab-Fragments in Lösung vor. Folglich konnte eine Ausbeute von 77 % erreicht werden, obwohl nur eine geringe Proteinkonzentration von 3 g L<sup>-1</sup> beim Start eingesetzt werden konnte, da das Fab-Fragment nur begrenzt zur Verfügung stand. Ein Kristallisationsprozess stoppt nach Erreichen der

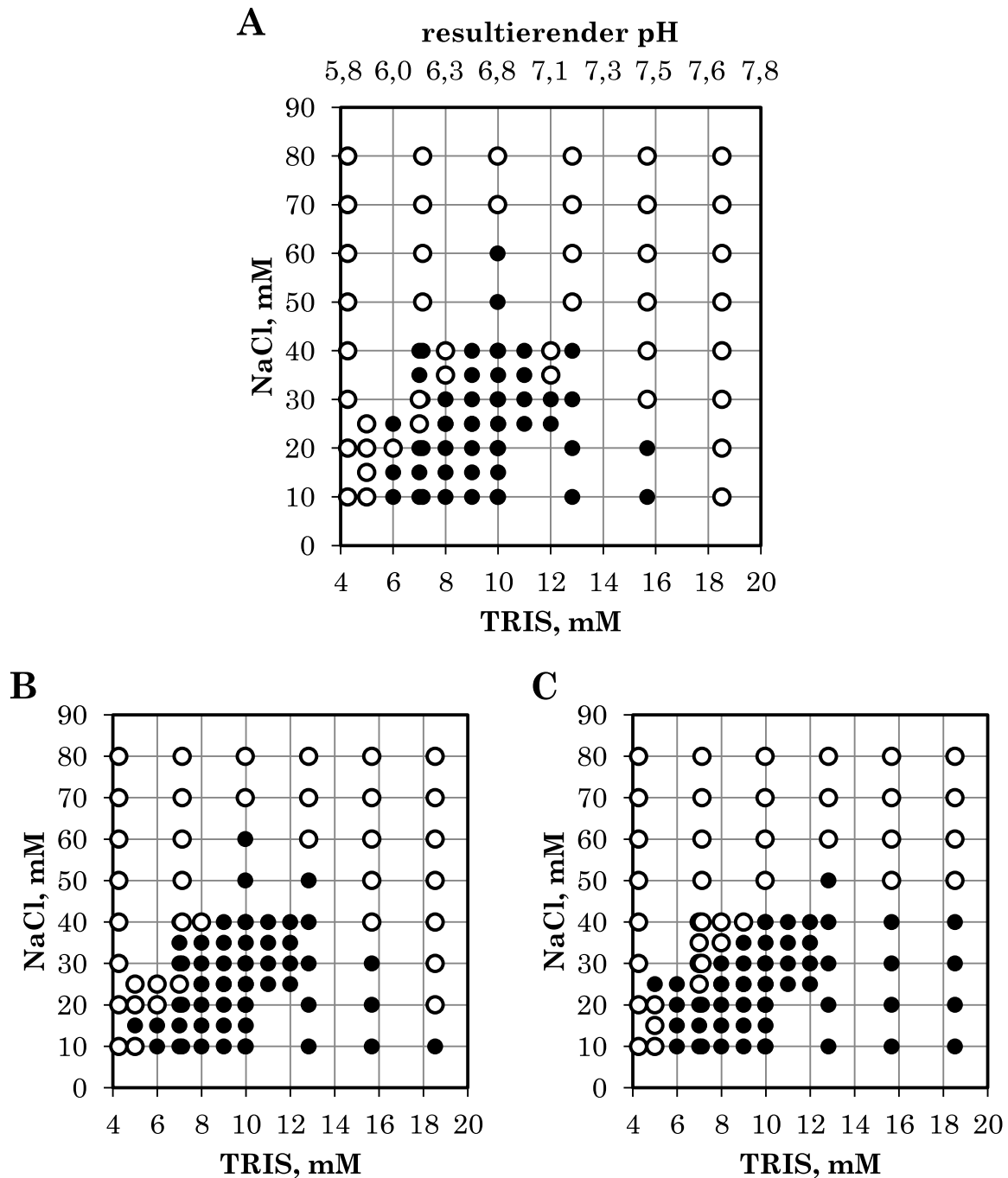
Gleichgewichtskonzentration, welche von den Kristallisationsbedingungen, aber nicht von der eingesetzten Proteinkonzentration abhängt (Chayen, 1998). Bei einer Startkonzentration von  $20 \text{ g L}^{-1}$  wäre damit theoretisch eine Ausbeute von 97 % zu erwarten, falls es nicht durch die erhöhte Übersättigung zu Produktverlust durch Präzipitation kommt.

## **7 Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01**

Der monoklonale IgG1 Antikörper mAb01 ist ein therapeutischer Antikörper in der klinischen Erprobung. Der Antikörper hat im Vergleich zu anderen Antikörpern einen niedrigen pI von 6,8 und eine niedrige Hydrophilie. Es waren bereits Kristallisationsbedingungen bekannt (10 g L<sup>-1</sup> oder 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 in einem 10 mM Histidin/Acetatpuffer pH 4,9. Der pH wurde mit der Base TRIS auf pH 6,0 oder pH 6,5 und die Konduktivität wurde mit Natriumchlorid auf 3 mS cm<sup>-1</sup> oder 10 mS cm<sup>-1</sup> eingestellt).

### **7.1 Kristallisation im Mikrosatzverfahren**

Ausgehend von bekannten Bedingungen im Satzverfahren wurde im Mikrosatzverfahren bei 10 °C der Kristallisationsbereich des monoklonalen Antikörpers mAb01 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration, der Natriumchloridkonzentration und des pH untersucht (Abbildung 7.1). Variiert wurden die Proteinkonzentration (10 g L<sup>-1</sup>, 25 g L<sup>-1</sup> und 50 g L<sup>-1</sup>), die Natriumchloridkonzentration (10 mM bis 80 mM) und die TRIS-Konzentration (4,3 mM bis 18,5 mM). Über die Base TRIS wurde der pH erhöht. Da der pH in dem Volumen von 10 µL nicht direkt gemessen werden konnte, wurde der pH nachträglich in 0,5 mL-Ansätzen für 10 g L<sup>-1</sup> mAb01 in 10 mM Histidinpuffer pH 5,0 und verschiedenen TRIS-Konzentrationen ermittelt. Der Kristallisationsbereich von mAb01 war vom pH und der Natriumchloridkonzentration abhängig. Bei über 60 mM Natriumchlorid entstanden im Zeitraum von einer Woche keine Kristalle. Bei 60 mM Natriumchlorid traten nur bei 10 mM TRIS, was einem pH von 6,8 entsprach, Kristalle auf. Bei 10 mM Natriumchlorid entstanden Kristalle zwischen pH 6,0 und pH 7,5.



**Abbildung 7.1:** Keimbildungsbereich von mAb01 bei 10 °C im Mikrosatzverfahren. Die Auswertung erfolgte nach einer Woche: Kristalle (●); klare Lösung (○). Durch die Base TRIS wurde der pH erhöht. Der resultierende pH wurde für 10 g L<sup>-1</sup> mAb01 ohne Natriumchlorid in 0,5 mL-Ansätzen gemessen. 10 mM Histidinpuffer pH 5,0; A) 10 g L<sup>-1</sup> mAb01; B) 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 und C) 50 g L<sup>-1</sup> mAb01.

Mikroskopaufnahmen von ausgewählten Bedingungen sind in Abbildung 7.2 dargestellt. Bei jeweils 10 g L<sup>-1</sup> mAb01, 10 mM Histidinpuffer und 25 mM Natriumchlorid und lediglich einer Variation des pH entstanden bei 7 mM TRIS

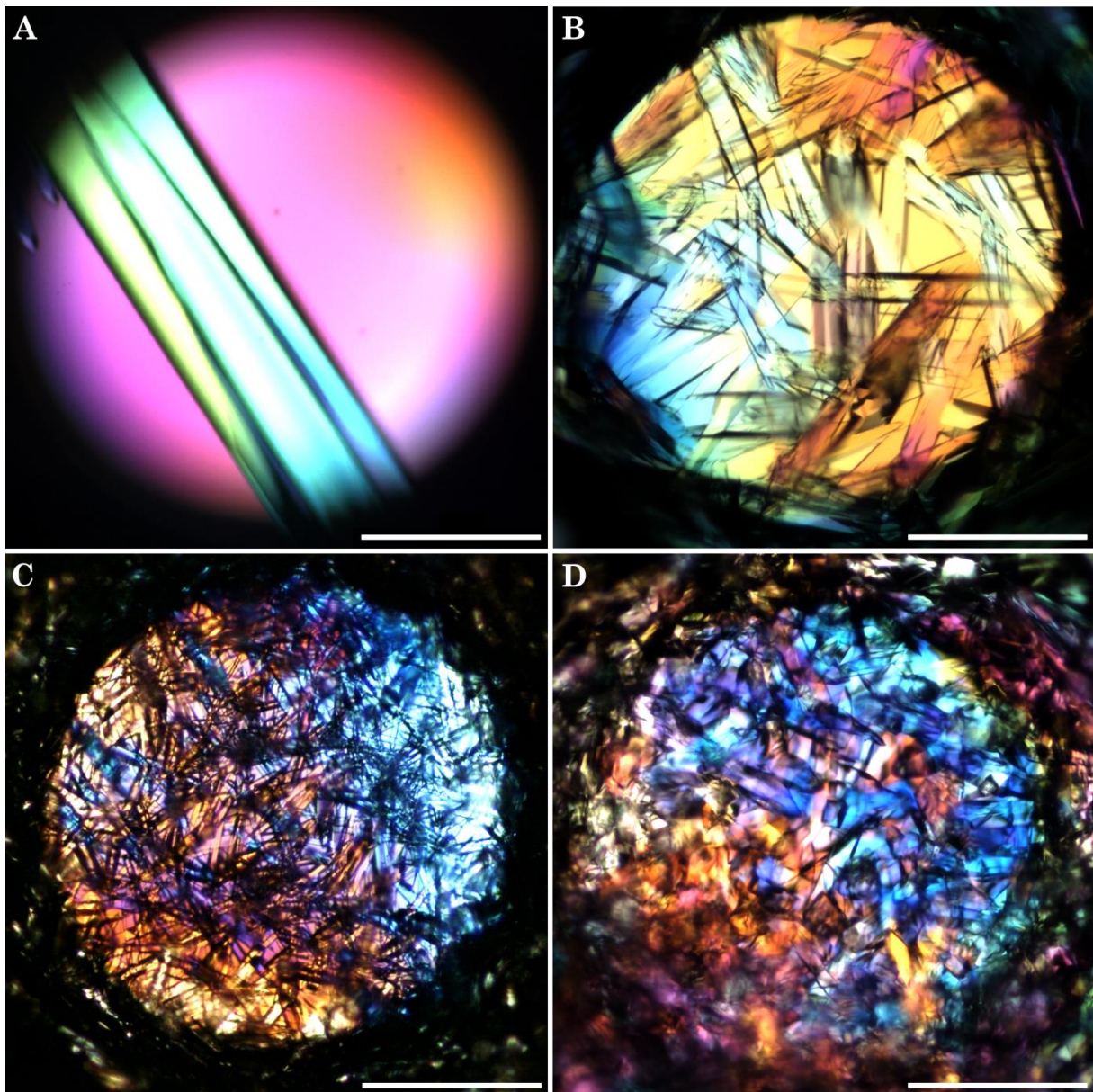
## 7 Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01

---

(pH 6,2) ein sehr großer Kristall (Abbildung 7.2 A), bei 8 mM TRIS (pH 6,3) viele große Kristalle (Abbildung 7.2 B), bei 10 mM TRIS (pH 6,8) viele kleine Kristalle (Abbildung 7.2 C). Auch bei höheren Proteinkonzentrationen wie 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 (Abbildung 7.2 D) und 50 g L<sup>-1</sup> mAb01, trat keine Präzipitation auf.

Somit wurde der Keimbildungsbereich für den Antikörper mAb01 erfolgreich im Mikrosatzverfahren bei 10 °C in Abhängigkeit vom pH und der Natriumchloridkonzentration für drei verschiedene Proteinkonzentrationen bestimmt.





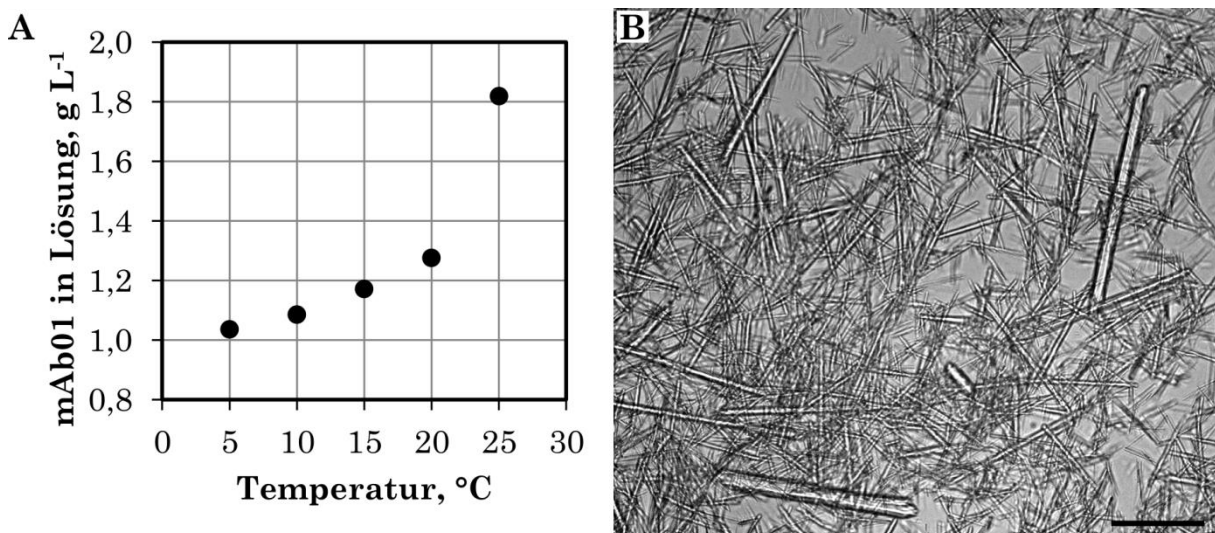
**Abbildung 7.2:** Kristallisation von mAb01 im Mikrosatzverfahren bei 10 °C. A) 10 g L<sup>-1</sup> mAb01; 10 mM Histidin; 25 mM NaCl; 7 mM TRIS; pH 6,2. B) 10 g L<sup>-1</sup> mAb01; 10 mM Histidin; 25 mM NaCl; 8 mM TRIS; pH 6,3. C) 10 g L<sup>-1</sup> mAb01; 10 mM Histidin; 25 mM NaCl; 10 mM TRIS; pH 6,8. D) 25 g L<sup>-1</sup> mAb01; 10 mM Histidin; 20 mM NaCl; 10 mM TRIS; pH 6,8. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

## 7.2 Kristallisation im gerührten Satzverfahren

Nach der Bestimmung des Keimbildungsbereichs im Mikrosatzverfahren wurde eine die Kristallisation von mAb01 in den gerührten 6 mL-Reaktor und 1 L-Reaktor durchgeführt. Dabei wurden die Kristallisationsausbeute und Kristallisationsgeschwindigkeit bestimmt.

### 7.2.1 Kristallisationsausbeute

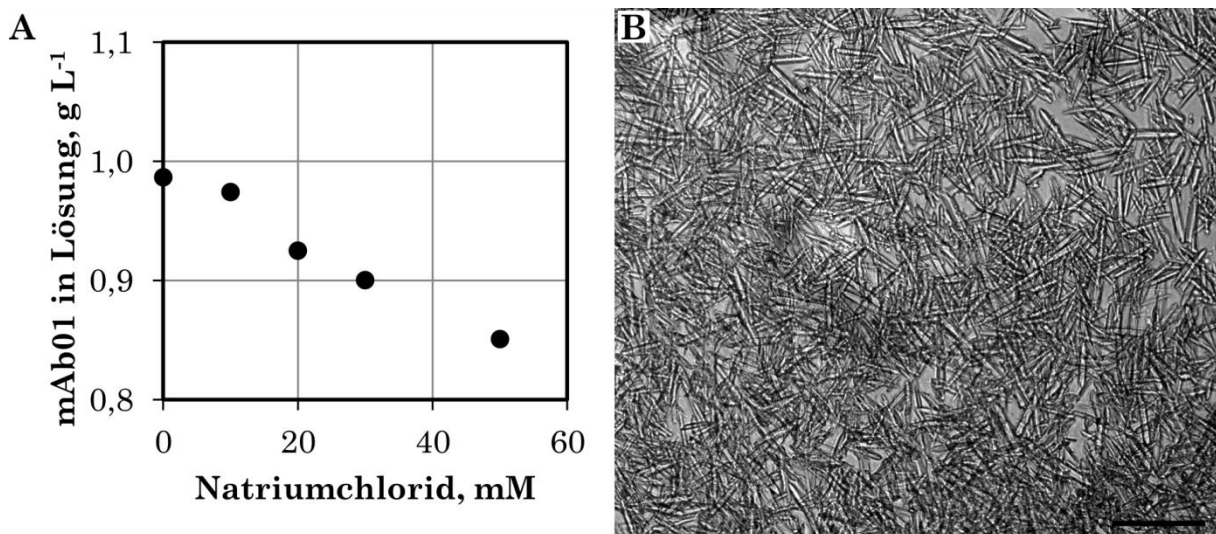
Die Kristallisationsausbeute wurde in Abhängigkeit von der Temperatur und der Natriumchloridkonzentration untersucht. Zuerst wurde der Einfluss der Temperatur auf die Kristallisationsausbeute betrachtet. Im 6 mL-Reaktor wurden  $25 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 mit 10 mM Histidinpuffer und 11 mM TRIS bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und pH 6,8 kristallisiert. Die Kristallisation erfolgte über Nacht bei einer Rührerdrehzahl von  $120 \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 7.3).



**Abbildung 7.3:** Kristallisation von mAb01 im 6 mL-Reaktor bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $25 \text{ g L}^{-1}$  mAb01; 10 mM Histidinpuffer; 11 mM TRIS; pH 6,8; Rührerdrehzahl  $120 \text{ min}^{-1}$ ; Kristallisation über Nacht. Danach erfolgte eine Temperaturerniedrigung. A) Löslichkeit von mAb01 in Abhängigkeit von der Temperatur. B) Kristalle aus dem Prozess bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Maßstabsbalken entspricht  $100 \mu\text{m}$ .

Mikroskopaufnahmen zeigten, dass nur Kristalle und kein Präzipitat entstanden. Bei 25 °C wurde eine Ausbeute von 92,7 % erreicht. Durch Senkung der Temperatur auf 5 °C wurde die Ausbeute um 3,1 % auf 95,8 % gesteigert.

Als nächstes wurde der Einfluss von Natriumchlorid auf die Kristallisationsausbeute untersucht. Startbedingung war 25 g L<sup>-1</sup> mAb01, 10 mM Histidinpuffer und 8 mM TRIS, pH 6,4. Die Kristallisation erfolgte über Nacht bei 10 °C bei einer Rührerdrehzahl von 120 min<sup>-1</sup> (Abbildung 7.4).



**Abbildung 7.4:** Kristallisation von mAb01 im 6 mL-Reaktor bei 10 °C. 25 g L<sup>-1</sup> mAb01; 10 mM Histidinpuffer; 8 mM TRIS; pH 6,4; Rührerdrehzahl 120 min<sup>-1</sup>; Kristallisation über Nacht. Danach erfolgte eine Zugabe von Natriumchlorid. A) Löslichkeit von mAb01 in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration. B) Kristalle aus dem Prozess bei 10 mM Natriumchlorid. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

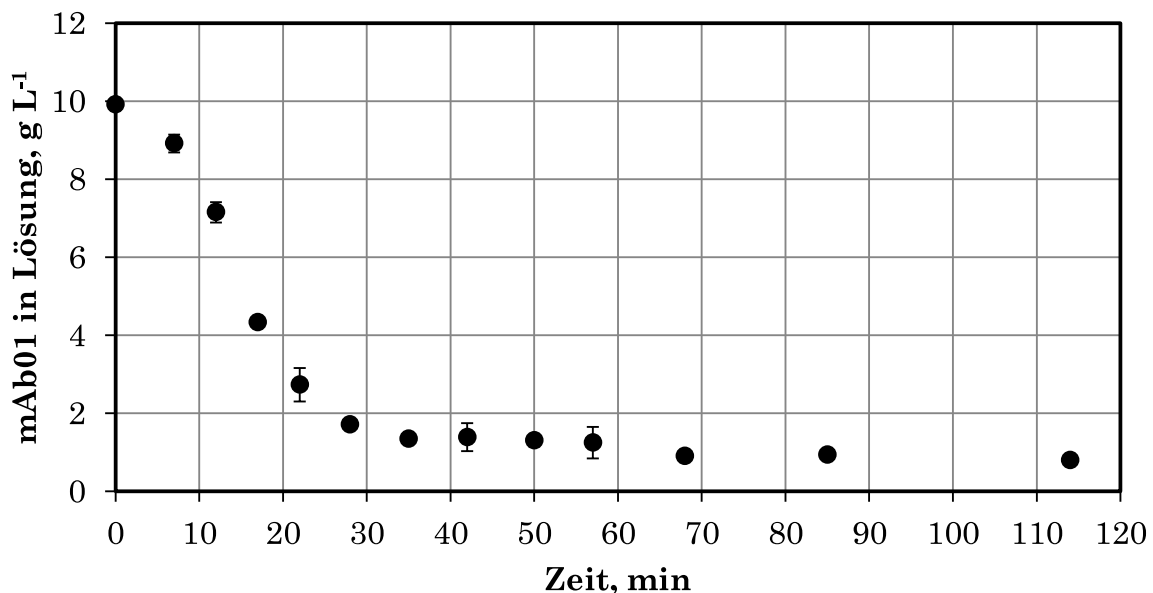
Es entstanden nur Kristalle und kein Präzipitat. Die Kristallisationsausbeute ohne Zugabe von Natriumchlorid betrug 96,1 %. Durch eine Erhöhung der Natriumchloridkonzentration auf 50 mM wurde die Löslichkeit von mAb01 um 0,1 g L<sup>-1</sup> reduziert, wodurch die Ausbeute um 0,5 % auf 96,6 % gesteigert werden konnte.

Die Kristallisationsausbeute konnte sowohl durch eine Temperaturerniedrigung als auch durch eine Erhöhung der Natriumchloridkonzentration gesteigert werden.

### 7.2.2 Kristallisationsgeschwindigkeit

Die Kristallisationsgeschwindigkeit wurde sowohl im 6 mL-Reaktor als auch im 1 L-Reaktor bestimmt. Der Kristallisationsverlauf wurde anhand der mAb01-Konzentration in der Lösung verfolgt.

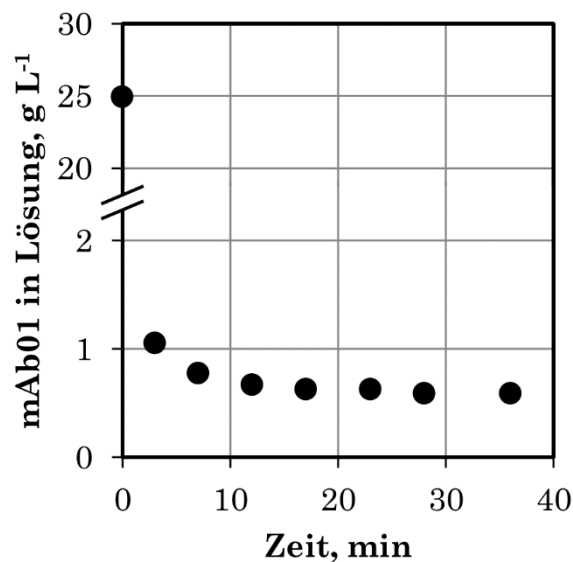
Im 6 mL-Reaktor wurden bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup> ( $\epsilon_{\max} = 0,55 \text{ W kg}^{-1}$ ) 10 g L<sup>-1</sup> mAb01 in 10 mM Histidinpuffer und 20 mM Natriumchlorid kristallisiert. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit 1 M TRIS gestartet. Die Abnahme der mAb01-Konzentration in der Lösung über die Zeit ist in Abbildung 7.5 dargestellt.



**Abbildung 7.5:** Kristallisationsverlauf von mAb01 im 6 mL-Reaktor bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup>. 10 g L<sup>-1</sup> mAb01 in 10 mM Histidinpuffer ; 20 mM Natriumchlorid. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit 1 M TRIS gestartet.

Bereits nach 35 Minuten waren von den anfänglichen 10 g L<sup>-1</sup> nur noch 1,3 g L<sup>-1</sup> mAb01 in der Lösung vorhanden. Nach 114 Minuten waren es 0,8 g L<sup>-1</sup>. Nach 21 Stunden waren 0,7 g L<sup>-1</sup> mAb01 in der Lösung. Somit war die Kristallisation nach 35 Minuten zu 93,0 % und nach 114 Minuten bereits zu 98,9 % abgeschlossen. Es wurde eine Kristallisationsausbeute von 93,1 % erreicht.

Im 1 L-Reaktor wurde die Kristallisationsgeschwindigkeit bei einer höheren Übersättigung bestimmt. Es wurde eine Startkonzentration von  $25 \text{ g L}^{-1}$  statt der  $10 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 im 6 ml-Reaktor eingesetzt. Da somit für den 1 L-Versuch  $25 \text{ g}$  des Antikörpers benötigt wurden, musste eine neue Charge des Proteins verwendet werden, in der sich  $0,25 \text{ M}$  Trehalose befanden. Bei  $10 \text{ °C}$  und einer Rührerdrehzahl von  $150 \text{ min}^{-1}$  ( $\bar{\epsilon} = 18 \text{ mW L}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{max}} = 1,3 \text{ W kg}^{-1}$ ) wurden  $25 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in  $10 \text{ mM}$  Histidinpuffer und  $52 \text{ mM}$  Trehalose kristallisiert. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit  $1 \text{ M}$  TRIS gestartet. Die Abnahme der mAb01-Konzentration in der Lösung über die Zeit ist in Abbildung 7.6 dargestellt.



**Abbildung 7.6:** Kristallisationsverlauf von mAb01 im 1 L-Reaktor bei  $10 \text{ °C}$ .  $25 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in  $10 \text{ mM}$  Histidinpuffer;  $52 \text{ mM}$  Trehalose. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit  $1 \text{ M}$  TRIS gestartet. Rührerdrehzahl von  $150 \text{ min}^{-1}$ .

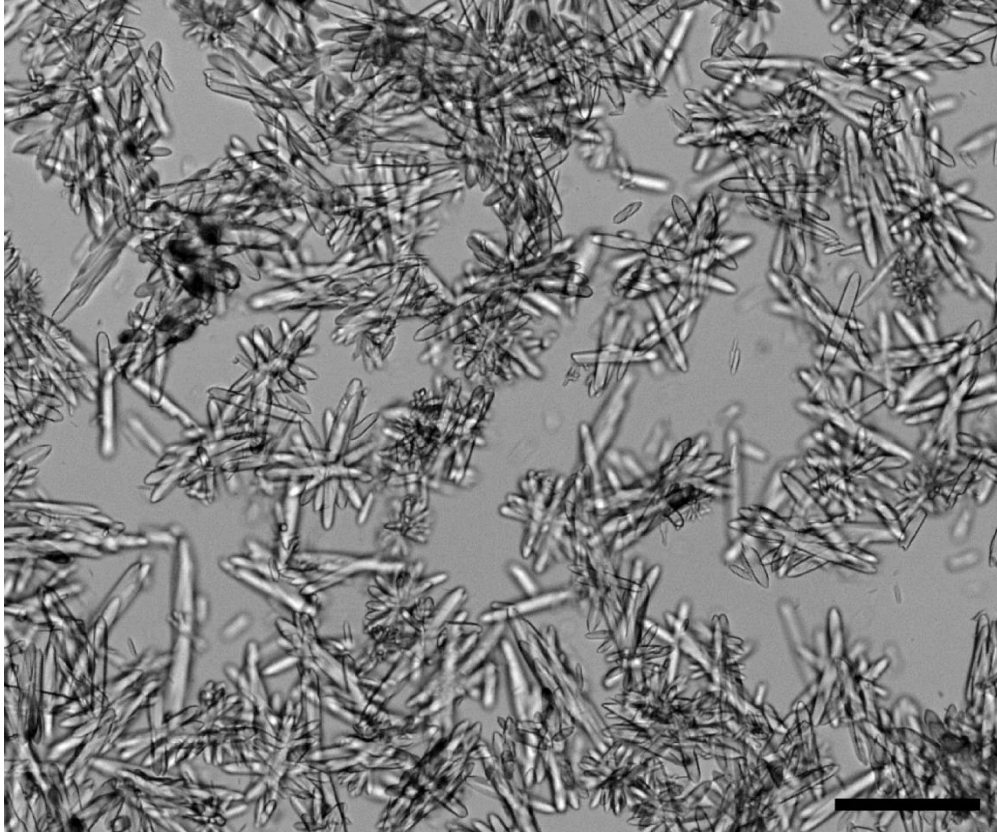
Die Kristallisationsgeschwindigkeit im 1 L-Reaktor war noch schneller als im 6 mL-Reaktor. Bereits nach drei Minuten waren von den anfänglichen  $25 \text{ g L}^{-1}$  nur noch  $1,1 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in der Lösung. Nach 17 Minuten waren es noch  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ . Nach 18 Stunden waren  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in der Lösung, was einer Kristallisationsausbeute von  $98,3 \%$  entspricht. Somit war die Kristallisation bereits nach drei Minuten zu  $97,4 \%$  und nach 17 Minuten zu  $99,2 \%$  abgeschlossen.



## 7 Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01

---

Nach der Kristallisation wurden Proben der Suspension im Mikroskop untersucht. Wie in Abbildung 7.7 zu sehen ist, lagen trotz des extrem schnellen Prozesses ausschließlich Kristalle und kein Präzipitat vor.



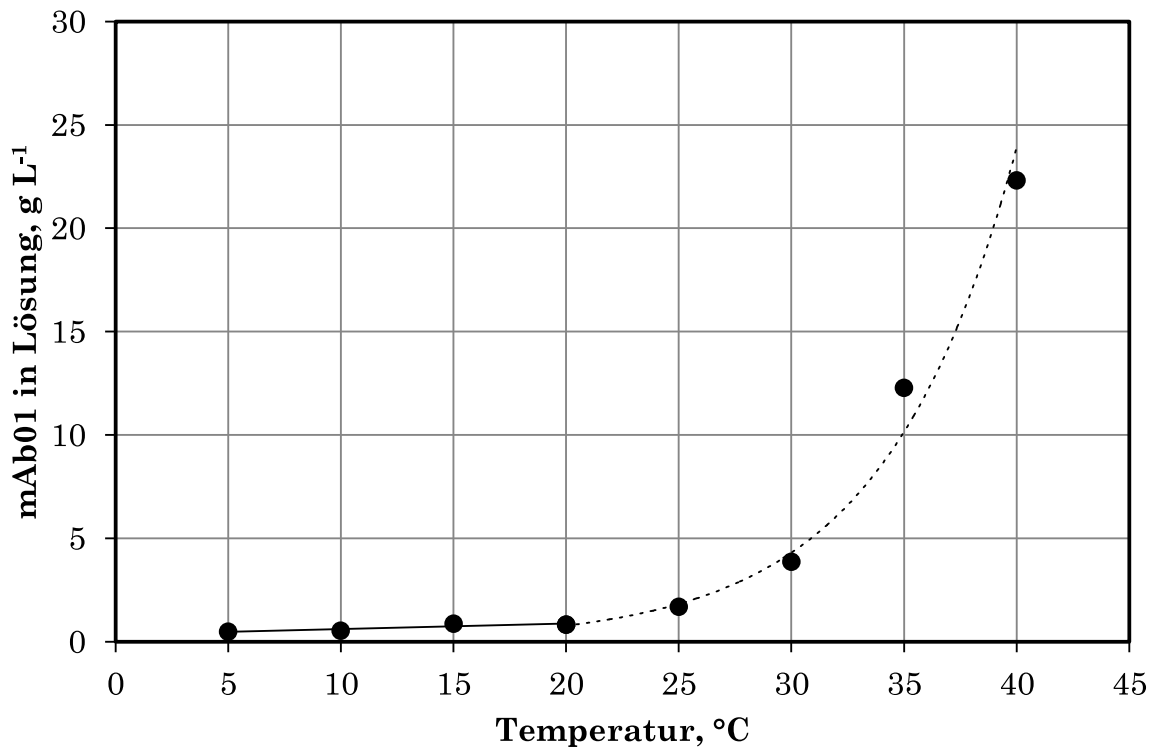
**Abbildung 7.7:** mAb01 Kristalle aus dem 1 L-Reaktor. 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 in 10 mM Histidinpuffer; 52 mM Trehalose; Rührerdrehzahl 150 min<sup>-1</sup>; 10 °C. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit 1 M TRIS gestartet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Im 1 L-Reaktor konnten 95,8 % des eingesetzten Proteins ohne die Bildung von Präzipitat innerhalb der ersten drei Minuten kristallisiert werden.

### 7.3 Temperatur- und pH-Stabilität der Kristalle

In Kristallen wird das Protein vor Denaturierung und Degradation geschützt. Dies geschieht über die Kristallgitterenergie. Jedoch müssen für diesen positiven Effekt die Kristalle unter den Lagerbedingungen stabil sein. Daher wurde untersucht, in welchem Temperatur- und pH-Bereich mAb01-Kristalle stabil waren. Als stabil wurde definiert, wenn sich weniger als  $2 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in Lösung befanden und die Kristallmorphologie unverändert war. Zusätzlich sollte der stabile Bereich mindestens eine pH-Einheit umfassen.

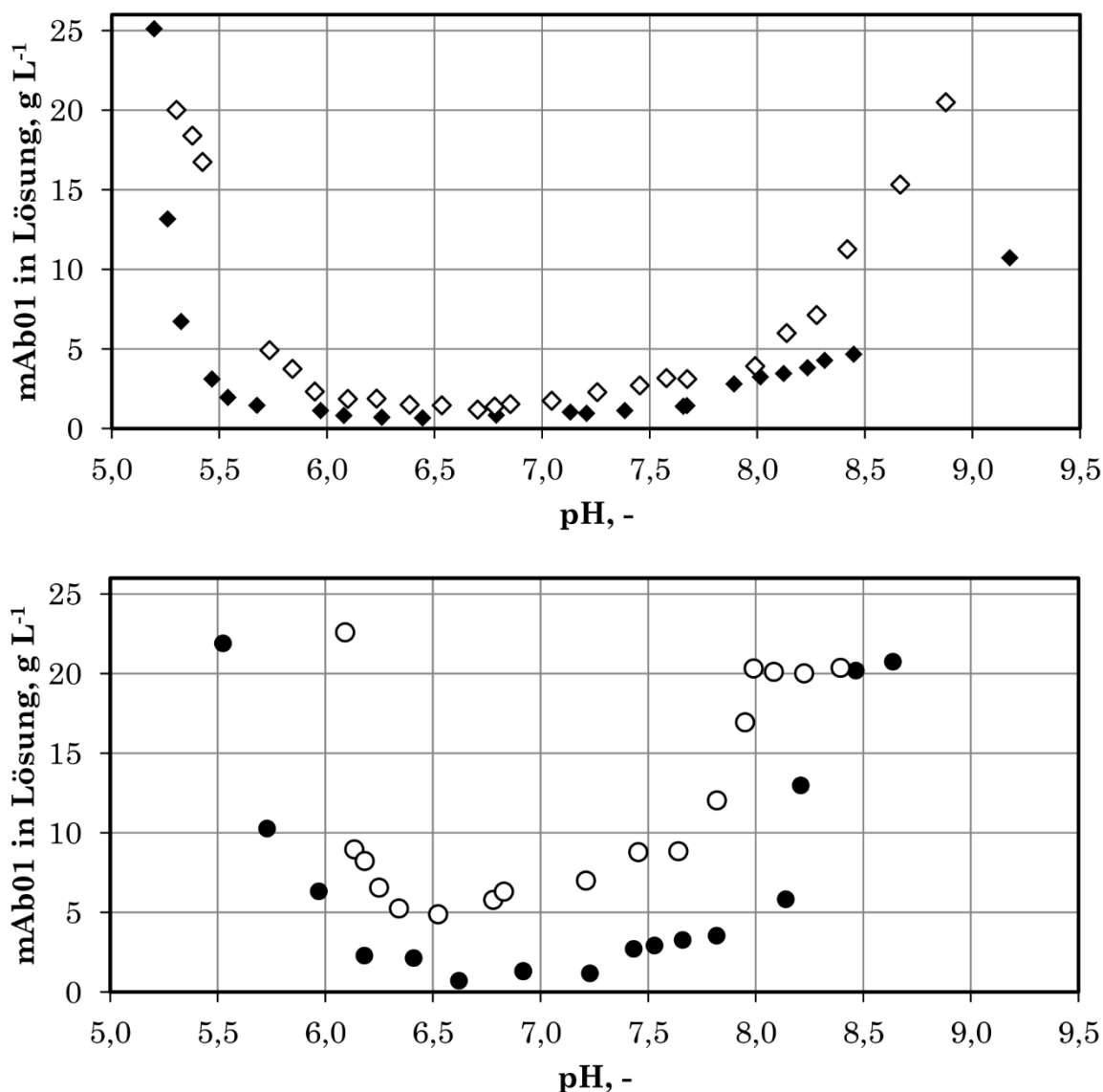
Als erstes wurde der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Kristalle untersucht. Hierfür wurde eine Kristallsuspension des monoklonalen Antikörpers mAb01 (10 mM Histidinpuffer; 20 mM Natriumchlorid; mit TRIS auf pH 6,8) im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $250 \text{ min}^{-1}$  Temperaturen von  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ausgesetzt und dabei die gelöste mAb01-Konzentration bestimmt (Abbildung 7.8). Bei  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  lagen  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 gelöst vor. Bei  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  waren  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 gelöst. Bei noch höheren Temperaturen waren die Kristalle instabil. Beispielsweise lagen bei  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $12,3 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in Lösung vor. Im Bereich von  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  war die Löslichkeit linear von der Temperatur abhängig. Die Steigung der linearen Gleichung betrug  $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ . Im Bereich von  $20$  -  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  lösten sich die Kristalle schneller als zuvor auf. Hier wurde eine exponentielle Abhängigkeit der Löslichkeit mit steigender Temperatur festgestellt.



**Abbildung 7.8:** Aus Kristallen gelöstes mAb01 in einem Temperaturbereich von 5 - 40 °C. Die durchgezogene Linie ist eine lineare Anpassung im Bereich von 5 °C - 20 °C. Die gestrichelte Linie ist eine exponentielle Anpassung im Bereich von 20 °C - 40 °C.

Da die Kristallisation über eine Annäherung des pH an den isoelektrischen Punkt des Proteins erfolgte, war anzunehmen, dass die Stabilität der mAb01-Kristalle stark vom pH abhängt. Die Stabilität der Kristalle vom pH wurde bei den Temperaturen 10 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup> bestimmt. Es wurde eine mAb01-Kristallsuspension (20 mM NaCl, 10 mM Histidinpuffer, mit TRIS auf pH 6,7) eingesetzt, die zu untersuchende Temperatur eingestellt und der pH schrittweise mit 1 M Natronlauge bzw. 10 % Essigsäure geändert. Wie in Abbildung 7.9 gezeigt wird, wurde bei allen untersuchten Temperaturen mAb01 am wenigsten bei einem pH von pH 6,5 bis pH 6,7 gelöst.





**Abbildung 7.9:** Stabilität von mAb01-Kristallen in Abhängigkeit von dem pH bei verschiedenen Temperaturen. 10 °C (◆); 20 °C (◇); 25 °C (●); 30 °C (○). Eine mAb01-Kristallsuspension wurde im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup> gerührt und dabei der pH schrittweise mit 1 M Natronlauge bzw. 10 % Essigsäure geändert.

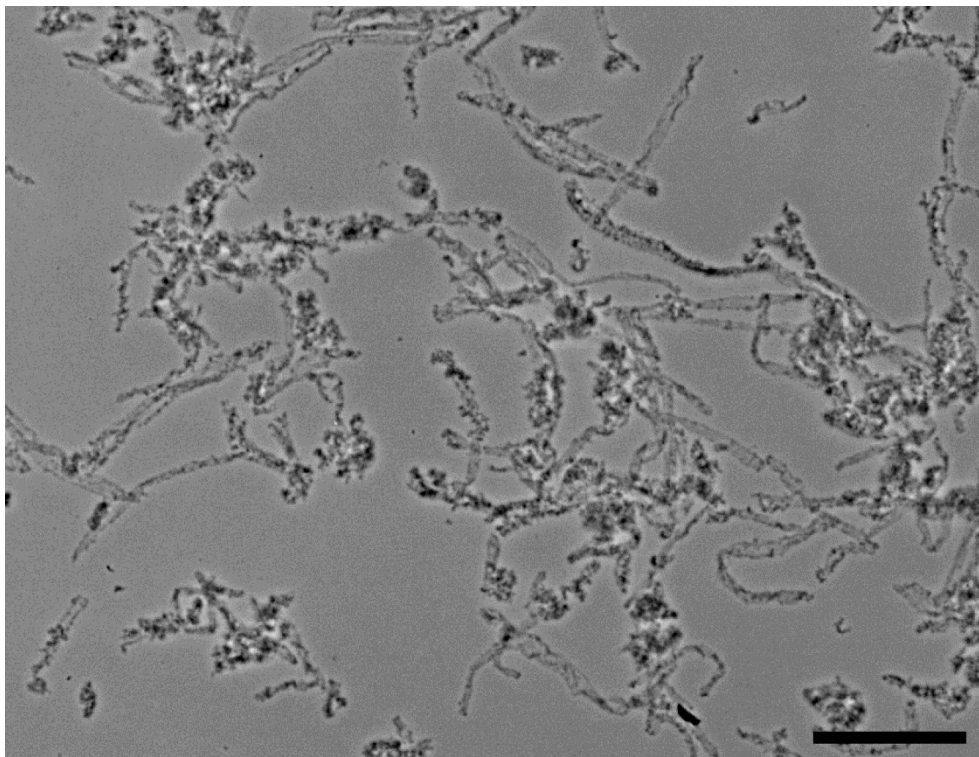
Die gelöste mAb01-Konzentration unterschied sich in Abhängigkeit von der Temperatur. Beispielsweise waren bei pH 6,5 bei 10 °C 0,7 g L<sup>-1</sup> mAb01 und bei 30 °C 4,9 g L<sup>-1</sup> mAb01 gelöst. Der für die Kristalle stabile pH-Bereich wurde mit steigender Temperatur kleiner und umfasste bei 25 °C weniger als eine pH-Einheit. Bei 30 °C waren die Kristalle instabil. Die pH-Bereiche sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

## 7 Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01

**Tabelle 7.1:** Stabiler pH-Bereich für mAb01-Kristalle in Abhängigkeit von der Temperatur. Als stabil wurde eine Konzentration von weniger als  $2 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in Lösung definiert.

Temperatur, °C	Stabiler pH-Bereich, -
10	5,5 - 7,7
20	6,1 - 7,2
25	6,5 - 7,2
30	instabil

Bei pH 5 wurden die Kristalle unabhängig von der Temperatur aufgelöst und das Protein aus den Kristallen lag in Lösung vor. Bei einem pH über 8 stieg die mAb01-Konzentration in Lösung nicht über  $20,5 \text{ g L}^{-1}$  an. Wie in Abbildung 7.10 zu sehen ist, lag die Ursache in der Bildung von Präzipitat.



**Abbildung 7.10:** Präzipitatbildung von mAb01 bei  $30 \text{ °C}$  und pH 8,4. Der Maßstabsbalken entspricht  $100 \text{ }\mu\text{m}$ .

## 7.4 Kristallisation zur Aufkonzentrierung

Proteinkristalle stellen eine höchst konzentrierte Form eines Proteins dar. Daher kann über Kristallisation ein Protein aus der Lösung konzentriert werden. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von mAb01 (Kapitel 7.3) können die mAb01-Kristalle auch durch Erniedrigung des pH auf pH 5 gelöst werden. Bei pH 5 ist der Antikörper mAb01 in der Lösung stabil (interne Kommunikation mit Marion Giffard, Novartis Pharma AG). Es wurde untersucht, welche maximale Proteinkonzentration mit mAb01-Kristalle erreicht werden konnte.

Die mAb01-Kristalle wurden durch Zentrifugation aus der Kristallsuspension abgetrennt. Dabei entstanden bei verschiedenen Zentrifugalkräften Kristallpellets mit verschiedener mAb01-Konzentration (Tabelle 7.2).

**Tabelle 7.2:** Einfluss der Zentrifugalkraft auf die mAb01-Konzentration im Kristallpellet

Suspensionsvolumen, mL	Zentrifugation	mAb01-Konzentration im Kristallpellet, g L <sup>-1</sup>
50	5252 g, 15 min	214
1,5	16100 g, 3 min	220
1,5	44000 g, 3 min	315

Durch das Auflösen eines Kristallpellets wurde eine hochkonzentrierte mAb01-Lösung hergestellt. Dabei entstand eine klare Lösung mit 200 g L<sup>-1</sup> mAb01. Die Konsistenz der Lösung war hochviskos.

Analysen mittels Größenausschlusschromatografie zeigten, dass es beim Aufkonzentrieren von mAb01 über Kristallisation und dem anschließenden Lösen der Kristalle bei pH 5 weder zu Aggregation noch zur Bildung von Abbauprodukten kam. Damit war Kristallisation zum Aufkonzentrieren von mAb01 gut geeignet.

### 7.5 Diskussion

Ausgehend von bekannten Bedingungen wurde der Keimbildungsbereich erfolgreich für den monoklonalen Antikörper mAb01 im Mikrosatzverfahren bestimmt. Über den pH wurde die Übersättigung des Proteins verändert, da die Löslichkeit eines Proteins am isoelektrischen Punkt am geringsten ist (Pace *et al.*, 2009). Damit war die Löslichkeit von mAb01 bei einem pH von 6,8 am geringsten und die Übersättigung am höchsten. Der Einfluss von Natriumchlorid wurde im 6 mL-Reaktor charakterisiert. Durch Zugabe von 50 mM Natriumchlorid wurde die Löslichkeit von mAb01 um  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  reduziert. Damit erhöhte Natriumchlorid die Übersättigung geringfügig. Da aber über 60 mM Natriumchlorid keine Kristallisation mehr auftrat, wurde die Keimbildung durch Natriumchlorid inhibiert.

Für mAb01 wurden die höchste Kristallisationsausbeute (98,3 %) und die schnellste Kristallisationsgeschwindigkeit im 1 L-Reaktor erreicht. Die Kristallisationsgeschwindigkeit war so schnell, dass nach 17 Minuten die Kristallisation zu 99,2 % abgeschlossen war. Diese schnelle Kristallisation kann auf drei Faktoren zurückgeführt werden: i) Es wurde kein Natriumchlorid der Lösung zugegeben, wodurch keine Inhibierung der Keimbildung auftrat; ii) Die Übersättigung wurde im Vergleich zum 6 mL-Reaktor erhöht, indem die Proteinkonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  auf  $25 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert wurde. Dadurch wurde auch die Keimbildungsrate und das Kristallwachstum erhöht (Garcia-Ruiz, 2003); iii) Durch das Vorhandensein von 52 mM Trehalose wurde die Löslichkeit von mAb01 von sonst  $0,7 \text{ g L}^{-1}$  auf  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  reduziert, wodurch wiederum die Übersättigung erhöht wurde. Zum Vergleich erreichte Zang *et al.* (2011) mit dem reinen monoklonalen Antikörper mAb04c eine hohe Ausbeute von 95 %, die Kristallisation setzte jedoch erst nach 10 Stunden ein und über die Gesamtzeit wurde nicht berichtet. Wegen der langen Zeit bis zur Keimbildung wurde im Ausblick der Einsatz von Impfkristallen vorgeschlagen. Durch den Einsatz von Impfkristallen kann ein Prozess um die Zeit der Keimbildung verkürzt werden (Lee *et al.*, 2000; Przybycien, 1998; Stura *et al.*, 1994; Weuster-Botz *et al.*, 2007). Der Einsatz von Impfkristallen birgt jedoch das Risiko der Verschleppung einer

unbemerkt bakteriellen oder viralen Kontamination, da Kristallsuspensionen nicht sterilfiltriert werden können. Angesichts der extrem schnellen Kristallisation von mAb01, die in dieser Arbeit erreicht wurde, konnte auf den Einsatz von Impfkristallen verzichtet werden.

In Kristallen wird das Protein vor Denaturierung und Degradation geschützt (Shenoy *et al.*, 2001). Durch eine Änderung der Umgebungsbedingung können die Kristalle jedoch aufgelöst werden und das Protein wird nicht mehr durch den Kristall stabilisiert. Daher wurde die Stabilität von mAb01-Kristallen in Abhängig der Temperatur und des pH der Lösung untersucht. Kristalle sollten als Suspension unter 20 °C und einem pH von etwa 6,6 gelagert werden. Zusätzlich wäre die Stabilität von mAb01-Kristallen über eine Lagerzeit von 3 Jahren von Interesse. Diese wird über die Lagerung bei einer erhöhten Temperatur von 40 °C simuliert (FDA, 2003). Bei einer Temperatur von 40 °C lösen sich mAb01-Kristalle jedoch auf, wodurch eine beschleunigte Messung der Lagerzeit mit dieser Methode nicht möglich war.

In dieser Arbeit wurden Kristalle aus einer Kristallsuspension mittels Zentrifugation abgetrennt. Bei 5252 g enthielt das Kristallpellet 214 g L<sup>-1</sup> mAb01, bei 44000 g enthielt das Kristallpellet 315 g L<sup>-1</sup>. Somit befand sich bei 5252 g noch Kristallisationslösung zwischen den einzelnen Kristallen. Aus den Daten der Beugungsanalysen mittels Röntgenstrahlen (durchgeführt von Jean-Michel Rondeau, Novartis Pharma AG) konnte die Proteindichte im mAb01-Kristall berechnet werden.

$$c_{\text{Protein}} = \frac{M_{\text{IgG1}} \cdot Z_{\text{Einheitszelle}}}{V_{\text{Einheitszelle}} \cdot N_A} = \frac{M_{\text{IgG1}} \cdot Z_{\text{Einheitszelle}}}{a^2 \cdot b \cdot N_A} \quad (7.1)$$

$a$  Länge  $a$  der Einheitszelle, 112,9 Å = 1,129·10<sup>-7</sup> dm

$b$  Länge  $b$  der Einheitszelle, 239,0 Å = 2,390·10<sup>-7</sup> dm

$c_{\text{Protein}}$  Proteindicht im Kristall, g L<sup>-1</sup>

$M_{\text{IgG1}}$  Molekülmasse eines IgG1-Antikörpers, 146·10<sup>3</sup> g mol<sup>-1</sup>

$N_A$  Avogadrokonstante, 6,02214129·10<sup>23</sup> mol<sup>-1</sup>

$V_{\text{Einheitszelle}}$  Volumen der Einheitszelle, dm<sup>3</sup>

$Z_{\text{Einheitszelle}}$  Anzahl der IgG1-Moleküle in der Einheitszelle, 4

## 7 Kristallisation des reinen monoklonalen Antikörpers mAb01

---

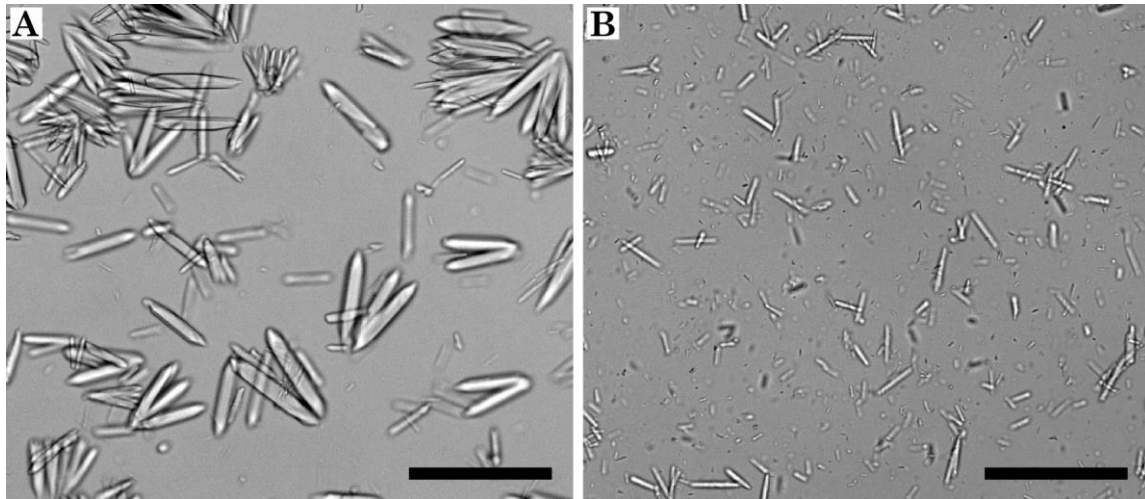
Daraus folgte für einen mAb01-Kristall eine Dichte von  $318 \text{ g L}^{-1}$ . Dieser Wert stimmte gut mit der Konzentration des Kristallpellets bei  $44000 \text{ g}$  überein. Bei dieser Zentrifugalkraft wurden somit die Kristalle zerbrochen und verformt, wodurch eine Pellet ohne größere Einschlüsse von Kristallisationslösung entstand. Nach Fischer *et al.* (2004) ist die Dichte eines  $146 \text{ kDa}$  Proteins etwa  $1,4 \text{ g mL}^{-1}$ . Damit bestehen nur  $23 \%$  des mAb01-Kristallvolumens aus Protein und die restlichen  $77 \%$  sind Kristallwasser.

## **8 Formulierung des monoklonalen Antikörpers mAb01 als Kristallsuspension**

### **8.1 Kristallisation für eine pharmazeutische Formulierung**

Es sollte eine mAb01-Kristallsuspension für eine mögliche subkutane Darreichung hergestellt werden. Für eine pharmazeutische Formulierung dürfen nur Substanzen verwendet werden, die als pharmazeutische Hilfsstoffe nach § 55 des deutschen Arzneimittelgesetzes zugelassen sind. Bei der Kristallisation von mAb01 entsprachen bereits alle verwendeten Stoffe (Histidinpuffer, Acetat und TRIS) diesen Anforderungen. Damit eine mAb01-Kristallsuspension subkutan injizierbar wäre, musste die Osmolarität vor der Kristallisation mit 0,25 M Trehalose angepasst werden. Der Zucker Trehalose ist ein üblicher und zusätzlich stabilisierender Zusatz bei der Formulierung von therapeutischen Proteinen.

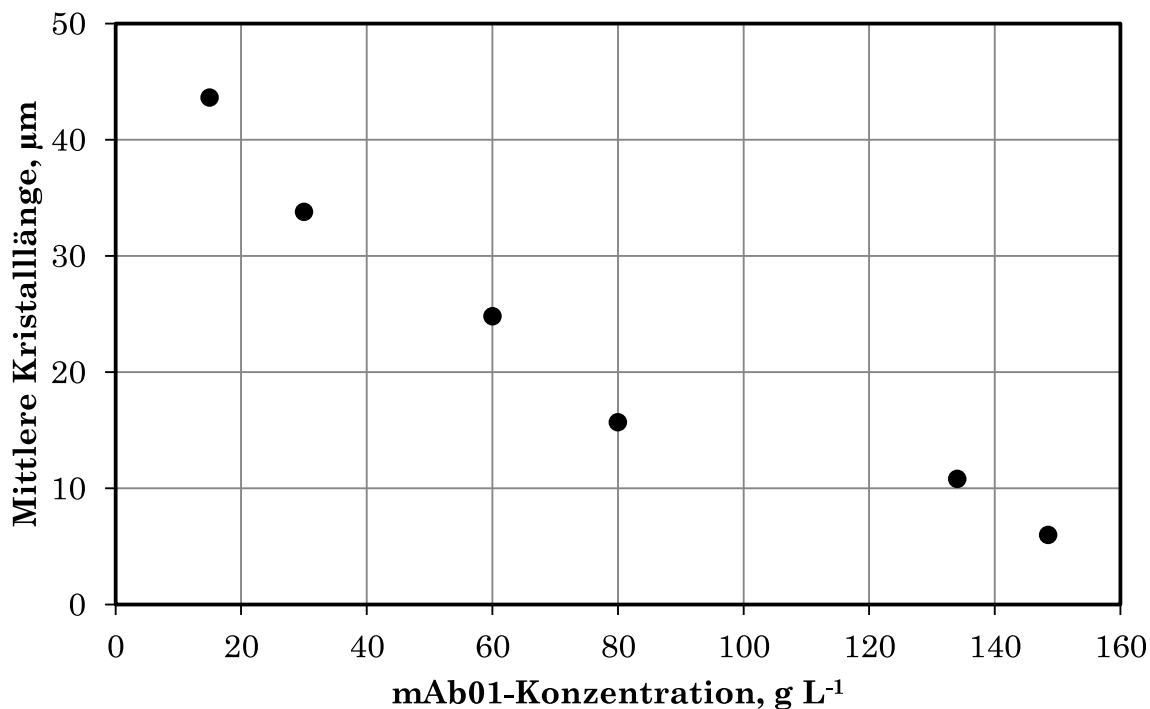
Zudem sollte bei der Kristallisation für eine Formulierung die Kristallgröße verändert werden können. Hierfür wurden Kristallisationen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen im 6 mL-Reaktor bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Kristallisationsbedingungen waren 10 mM Histidinpuffer, 0,25 M Trehalose und TRIS zum Starten der Kristallisation bei pH 6,8. Eine Kristallisation in Gegenwart von 0,25 M Trehalose war möglich und über die Proteinkonzentration ließ sich die Kristallgröße variieren. In Abbildung 8.1 sind Kristalle zu sehen, die bei einer Proteinkonzentration von 15 g L<sup>-1</sup> (A) und 134 g L<sup>-1</sup> (B) entstanden waren. Bei der niedrigen mAb01-Konzentration entstanden Kristalle, die deutlich größer waren als bei der hohen mAb01-Konzentration.



**Abbildung 8.1:** Steuerung der Kristallgröße über die mAb01-Konzentration. Kristallisation erfolgte im 6 mL-Reaktor bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 250 min<sup>-1</sup> mit 10 mM Histidinpuffer, 0,25 M Trehalose, TRIS zum Einstellen des pH auf pH 6,8 und A) 15 g L<sup>-1</sup> mAb01; B) 134 g L<sup>-1</sup> mAb01. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm.

Die Quantifizierung der Kristallgröße erfolgte anhand der mittleren Kristalllänge. Dies wurde für sechs Proteinkonzentrationen zwischen 15 g L<sup>-1</sup> und 149 g L<sup>-1</sup> durchgeführt. Dabei wurde bei 15 g L<sup>-1</sup> mAb01 eine mittlere Kristalllänge von 44 μm und bei 149 g L<sup>-1</sup> mAb01 eine mittlere Kristalllänge von 6 μm bestimmt (Abbildung 8.2).





**Abbildung 8.2:** Abhängigkeit der mittleren Kristalllänge von der eingesetzten mAb01-Konzentration. Kristallisation erfolgte im 6 mL-Reaktor bei  $10\text{ }^\circ\text{C}$  und einer Rührerdrehzahl von  $250\text{ min}^{-1}$  mit  $10\text{ mM}$  Histidinpuffer pH 5,  $250\text{ mM}$  Trehalose und TRIS zum Einstellen des pH auf 6,8.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Kristallisation von mAb01 mit ausschließlich pharmazeutisch zugelassenen Hilfsstoffen, wie  $0,25\text{ M}$  Trehalose, erfolgreich war. Durch die Trehalose wurde eine biologische Osmolarität erreicht, welche eine Voraussetzung bei der subkutanen Injektion ist. Die mittlere Kristalllänge konnte in einem Bereich von  $6\text{ }\mu\text{m}$  -  $44\text{ }\mu\text{m}$  über die mAb01-Konzentration variiert werden.

## 8.2 Injizierbarkeit von Kristallsuspensionen

Kristallsuspensionen weisen eine niedrigere Viskosität als vergleichbare Proteinlösungen auf. Dadurch kann mit einer Kristallsuspension eine höhere Dosis eines therapeutischen Proteins als mit einer Lösung subkutan injiziert werden. Eine niedrigere Viskosität ermöglicht auch die Verwendung von dünneren Kanülen, wodurch die Injektion für den Patienten erträglicher wird.

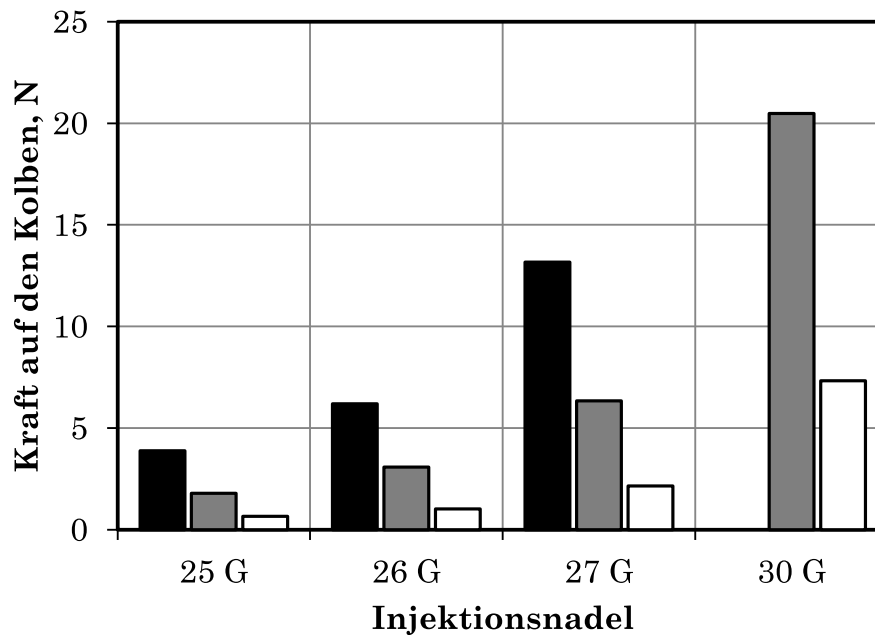
Es wurde untersucht, ob mAb01-Kristallsuspensionen durch dünne Injektionsnadeln injizierbar sind und ob die Kristalle durch die Passage der Injektionsnadel verändert werden. Des Weiteren wurden die Kräfte auf den Spritzenkolben bei der Injektion einer flüssigen Formulierung mit einer Kristallsuspension verglichen. Dabei wurden sehr dünne Injektionsnadeln verwendet, wie sie zur subkutanen Injektion von Heparin (Nadelgröße: 25 G) oder Insulin (Nadelgröße: 26 G, 27 G und 30 G) üblich sind (vergleiche Tabelle 3.3).

Je ein Milliliter der mAb01-Kristallsuspensionen, mit denen in Kapitel 8.1 die mittlere Kristalllänge bestimmt wurde, wurde mit einer Spritze durch Injektionsnadeln mit 25 G, 26 G, 27 G oder 30 G injiziert. Danach wurde erneut die mittlere Kristalllänge der mAb01-Kristalle ermittelt. Bei der Injektion wurden die Kristalle in Abhängigkeit der verwendeten Kanüle zerkleinert. Ausgehend von einer mittleren Kristalllänge von 44  $\mu\text{m}$  wie auch von 34  $\mu\text{m}$  entstanden bei einer 30 G Kanüle eine mittlere Kristalllänge von 16  $\mu\text{m}$ , bei einer 27 G Kanüle eine mittlere Kristalllänge von 20  $\mu\text{m}$  und bei einer 26 G und 25 G Kanüle eine mittlere Kristalllänge von 21  $\mu\text{m}$ . Wurde eine Kristallsuspension mit einer mittleren Kristalllänge von 11  $\mu\text{m}$  oder 6  $\mu\text{m}$  verwendet, fand bei keiner Injektionsnadel eine messbare Zerkleinerung statt. Somit wurden nur große Kristalle nach einer Passage durch eine Injektionsnadel auf eine nadelabhängige maximale mittlere Länge zerkleinert (Tabelle 8.1).

**Tabelle 8.1:** Maximale mittlere mAb01-Kristalllänge nach einer Passage durch eine Injektionsnadel.

Injektionsnadel	Maximale mittlere Kristalllänge nach der Injektion, $\mu\text{m}$
25 G	21
26 G	21
27 G	20
30 G	16

Die Injizierbarkeit einer Kristallsuspension und einer entsprechenden Standardformulierung von mAb01 wurde verglichen. Kristallsuspension und Standardformulierung wurden mit  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 hergestellt. Beide enthielten  $10 \text{ mM}$  Histidinpuffer und  $0,25 \text{ M}$  Trehalose. Lediglich der pH unterschied sich. Bei der Standardformulierung war der pH  $5,0$  und bei Kristallsuspension wurde der pH mit TRIS auf pH  $6,8$  eingestellt. Als Kontrolle diente nur der Puffer der Standardformulierung ohne mAb01. Die Kraft auf den Spritzenkolben wurde bei einer konstanten Geschwindigkeit von  $50 \text{ cm min}^{-1}$  in Abhängigkeit der verwendeten Injektionsnadel gemessen (Abbildung 8.3). Bei der Injektion der Standardformulierung mit  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 durch eine 30 G-Nadel konnte die Messung nicht beendet werden, da sich die Nadel bei einer Kraft von  $38 \text{ N}$  von der Spritze löste. Mit der 25 G-Nadel wurde für die Injektion der Standardformulierung eine Kraft von  $3,9 \text{ N}$  und für die Kristallsuspension eine Kraft von  $1,8 \text{ N}$  gemessen. Mit der 27 G-Nadel wurde für die Injektion der Standardformulierung eine Kraft von  $13,2 \text{ N}$  und für die Kristallsuspension eine Kraft von  $6,3 \text{ N}$  gemessen.



**Abbildung 8.3:** Kraft auf den Spritzenkolben einer 1 mL-Spritze bei der Injektion mit einer konstanten Geschwindigkeit von  $50 \text{ cm min}^{-1}$  in Abhängigkeit von der verwendeten Injektionsnadel. Schwarze Balken: Standardformulierung mit  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01; Graue Balken: Kristallsuspension mit  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01; Weiße Balken: Kontrolle (Standardformulierung ohne mAb01). Die Kraft bei der Injektion der Standardformulierung mit  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 und der 30 G Nadel konnte nicht bestimmt werden, da sich die Nadel bei einer Kraft von 38 N von der Spritze löste.

Kristallsuspensionen bis zu einer mAb01-Konzentration von  $149 \text{ g L}^{-1}$  konnten durch dünne Injektionsnadeln injiziert werden, ohne dabei die Nadeln zu verstopfen. Bei der Passage der Kristalle durch die Injektionsnadeln wurden große mAb01-Kristalle auf eine nadelabhängige Länge zerkleinert, kleine Kristalle dagegen blieben unverändert. Im Vergleich einer Standardformulierung und einer Kristallsuspension mit je  $118 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 wurde für die Kristallsuspension bei der Injektion immer nur die halbe Kraft auf den Spritzenkolben benötigt.

### 8.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde der Einsatz von mAb01-Kristallsuspensionen als pharmazeutische Formulierung für eine mögliche subkutane Injektion untersucht. Für diesen Zweck durften bei der Kristallisation ausschließlich Substanzen verwendet werden, die als pharmazeutische Hilfsstoffe nach § 55 des deutschen Arzneimittelgesetzes zugelassen sind. Die für die Kristallisation des monoklonalen Antikörpers mAb01 verwendeten Substanzen entsprachen bereits alle diesem Kriterium. Eine weitere Voraussetzung bei einer Injektion ist, dass die injizierte Lösung eine Osmolarität aufweist, die biologisch verträglich ist. Bei der flüssigen Standardformulierung von mAb01 wird die Osmolarität durch die Zugabe von 0,25 M Trehalose eingestellt. Zusätzlich wirkt die Trehalose stabilisierend auf den Antikörper (Andya *et al.*, 2003; Shenoy *et al.*, 2001). Eine Kristallisation von mAb01 in Anwesenheit von 0,25 mM Trehalose war problemlos möglich. Somit konnte eine Kristallsuspension hergestellt werden, die für eine subkutane Injektion geeignet wäre.

Als nächstes wurde die Kristallgröße in der Formulierung variiert. Hierfür wurden bei der Kristallisation mAb01-Konzentrationen von  $15 \text{ g L}^{-1}$  -  $149 \text{ g L}^{-1}$  eingesetzt. Dies variierte die Übersättigung  $S$  von 38 - 371 (Löslichkeit von  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ). Da die Keimbildungsrate  $J$  überproportional zu der Übersättigung ansteigt (Garcia-Ruiz, 2003), bildeten sich bei höheren Proteinkonzentration überproportional viele Kristallkeime. Dadurch konnte über die Proteinkonzentration die mittlere mAb01-Kristalllänge erfolgreich in einem Bereich von  $6 \mu\text{m}$  -  $44 \mu\text{m}$  variiert werden.

Selbst mit der dünnsten verwendeten Injektionsnadel (30 G) konnte kein Verstopfen mit Kristallsuspensionen beobachtet werden. Die Ursache hierfür liegt wohl in der Konsistenz von Proteinkristallen. Proteinkristalle sind sehr weich und zerbrechen recht leicht (Chernov, 2003). Bei der Passage der mAb01-Kristalle durch die Injektionsnadel wurden große mAb01-Kristalle auf eine nadelabhängige Länge zerkleinert, kleine Kristalle dagegen blieben unverändert. Diese nadelabhängige mittlere Kristalllänge war um die Größenordnung 10 kleiner als der Innendurchmesser der Injektionsnadel. Da die Zerkleinerung der

## 8 Formulierung des monoklonalen Antikörpers mAb01 als Kristallsuspension

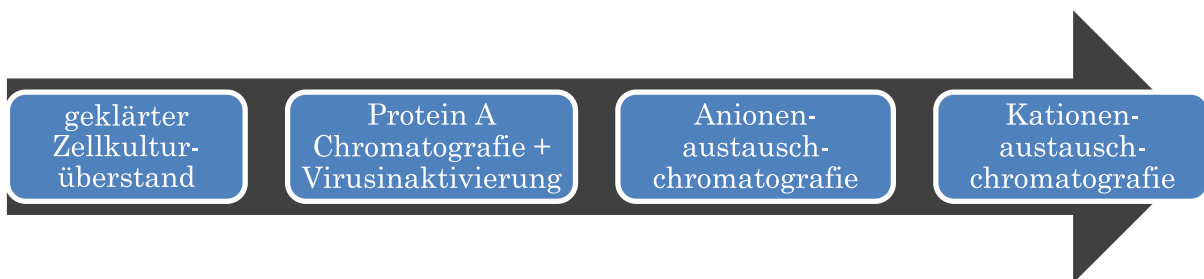
Kristalle bei der Injektion zusätzliche Kraft benötigt, sollten die Kristalle kleiner als die nadelabhängige Kristalllänge sein. Für die 25 G- bis 27 G-Nadeln bedeutet dies eine mittlere mAb01-Kristalllänge von weniger als 20  $\mu\text{m}$ . Damit sollte die Proteinkonzentration bei der Kristallisation über 70  $\text{g L}^{-1}$  liegen. Für die 30 G-Nadel, bei der die Kristalllänge unter 16  $\mu\text{m}$  liegen sollte, wird eine Proteinkonzentration bei der Kristallisation von über 80  $\text{g L}^{-1}$  benötigt.

Von mAb01 konnten injizierbare Kristallsuspensionen mit maximal 149  $\text{g L}^{-1}$  hergestellt werden. Im Vergleich zu den maximalen 125  $\text{g L}^{-1}$  der Standardformulierung war dies nur eine Erhöhung von 19 %. Die Ursache hierfür lag in dem hohen Kristallwasseranteil von 77 % der mAb01-Kristalle. Somit war bei 149  $\text{g L}^{-1}$  der Volumenanteil der Kristalle 47 %. Zum Vergleich wurde im Kapitel 7.4 durch Zentrifugation mit 5252 g ein festes Kristallpellet mit 214  $\text{g L}^{-1}$  generiert, das einen Volumenanteil der Kristalle von 67 % entspricht.

Der Vergleich einer Standardformulierung und einer Kristallsuspension mit je 118  $\text{g L}^{-1}$  mAb01 zeigte, dass bei der Injektion der Kristallsuspension weniger als die halbe Kraft auf den Spritzenkolben benötigt wurde. Es konnte sogar eine dünnere 30 G-Nadel mit der Kristallsuspension verwendet werden, welches mit der Standardformulierung nicht möglich war. Da eine dünnere Nadel verwendet werden konnte, sind geringere Schmerzen für den Patienten bei der Injektion zu erwarten. Zusätzlich ist der pH der Kristallsuspension mit pH 6,8 wesentlich näher am physiologischen pH 7,4, als die Standardformulierung mit pH 5. Somit sollten auch dadurch weniger Schmerzen verursacht werden. Zurzeit gibt es für kristalline Proteinsuspensionen keine Sterilisationsmethode, weshalb der Kristallisations- und Verpackungsprozess aseptisch erfolgen müsste. Pharmakokinetische Studien werden zeigen, ob eine mAb01-Kristallsuspension, ebenso wie der kristalline Antikörper Infliximab (Yang *et al.*, 2003), eine verbesserte Pharmakokinetik hat und damit der flüssigen Standardformulierung deutlich überlegen ist.

## 9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation

Kristallisation gehört zu den ältesten Aufreinigungsmethoden von Proteinen. Bereits 1840 wurde das Protein Hämoglobin von Friedrich Ludwig Hünefeld durch Kristallisation gewonnen. In diesem Kapitel wurde Kristallisation als Aufreinigungsmethode von mAb01 aus Lösungen verschiedener Reinheit untersucht. Als Grundlage für die verschiedenen Reinheitsstufen wurde ein Standardaufreinigungsprozess, wie er in Kapitel 3.1.4 beschrieben ist, verwendet. Die untersuchten Prozessstufen sind in Abbildung 9.1 dargestellt.



**Abbildung 9.1:** Mittels Kristallisation untersuchte Reinheitsstufen eines Standardaufreinigungsprozesses von mAb01.

### 9.1 Kristallisation aus vorgereinigten Lösungen

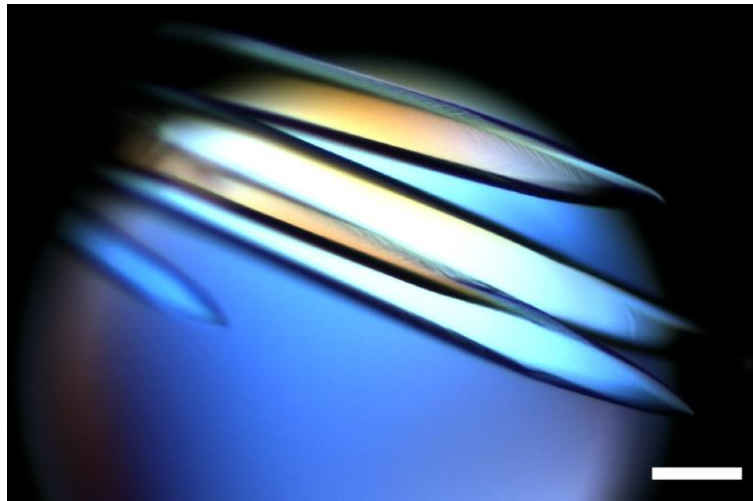
Kristallisation funktioniert besser mit reinen als mit unreinen Lösungen. In den vorangegangenen zwei Kapiteln wurde die Kristallisation des reinen Antikörper mAb01 untersucht. Im Gegensatz dazu sollte hier das Aufreinigungspotential einer Kristallisation in späten Prozessschritten eines Standardaufreinigungsprozesses betrachtet werden.

Als erstes wurde eine durch Protein A-Chromatografie gereinigte und durch einen niedrigen pH virusinaktivierte Lösung untersucht. Im Folgenden wird diese Lösung als VIN bezeichnet. Zuerst wurde die Lösung VIN, die eine mAb01 Konzentration von  $15,7 \text{ g L}^{-1}$  besaß, im Mikrosatzverfahren bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  kristallisiert. Es entstanden bei verschiedenen Bedingungen innerhalb eines Tages Kristalle, so beispielsweise bei  $8 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 aus VIN,

## 9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation

---

10 mM Histidinpuffer, 18 mM TRIS (Abbildung 9.2). Also war eine direkte Kristallisation von mAb01 aus der unreinen Lösung VIN möglich.



**Abbildung 9.2:** Kristallisation von mAb01 aus der unreinen Lösung VIN (durch Protein A-Chromatografie gereinigte und durch einen niedrigen pH virusinaktivierte Lösung) im Mikrosatzverfahren bei 10 °C. 8 g L<sup>-1</sup> mAb01 aus VIN, 10 mM Histidinpuffer, 18 mM TRIS. Die Aufnahme erfolgte nach drei Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Die Kristallisationsbedingung von Abbildung 9.2 wurde parallel in drei gerührte 6 mL-Reaktoren überführt. In den 6 mL-Reaktoren stellte sich pH 6,6 ein. Die Kristallisation konnte nach vier Stunden beendet werden. Die Kristalle wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Die Kristalle aus dem zweiten Reaktor wurden aufgelöst und erneut im 6 mL-Reaktor kristallisiert. Die Kristalle aus dem dritten Reaktor wurden zum Waschen in Kristallisationspuffer (20 mM Natriumchlorid; 10 mM Histidinpuffer mit TRIS auf pH 6,7) resuspendiert und im 6 mL-Reaktor eine Stunde gerührt. Die Kristalle aus allen Reaktoren wurden auf ihre Reinheit und biologische Aktivität hin analysiert und die Ausbeuten der einzelnen Schritte bestimmt (Tabelle 9.1).

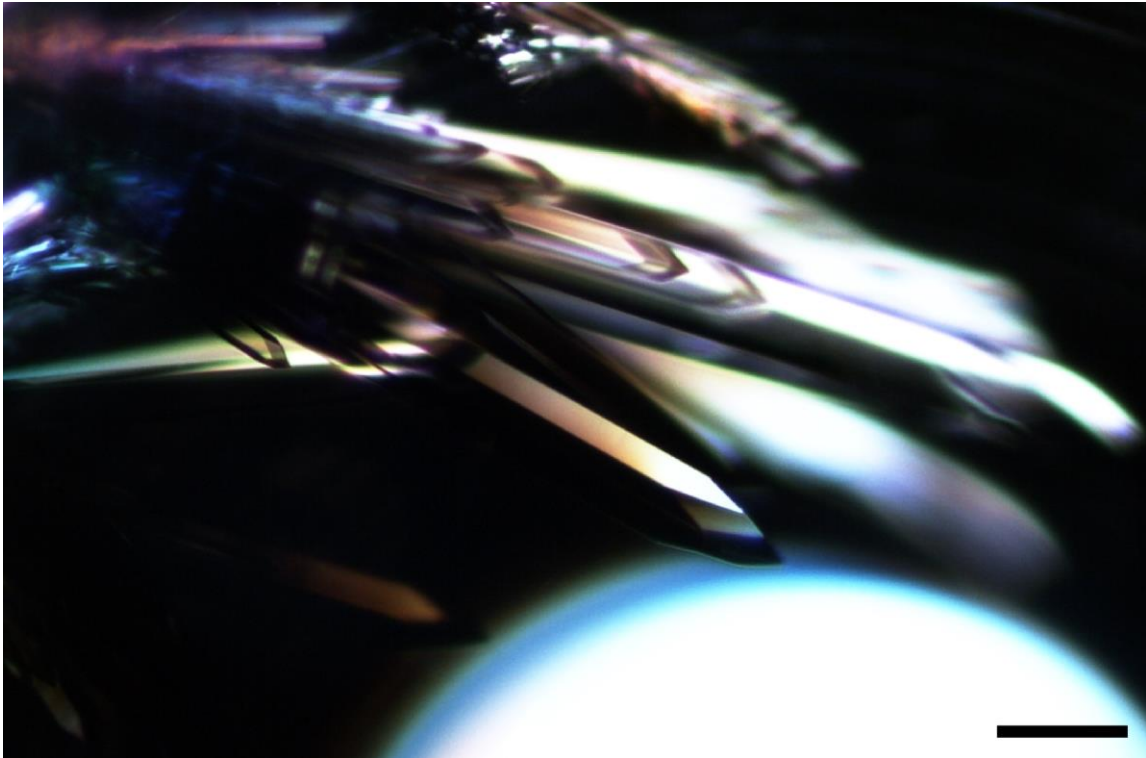


**Tabelle 9.1:** Ausbeute, Reinheit und biologische Aktivität ausgehend von der Lösung VIN (durch Protein A-Chromatografie gereinigte und durch einen niedrigen pH virusinaktivierte Lösung). SEC: Größenausschlusschromatografie; HCP: Verunreinigung durch Proteine aus der Zellkultur.

<b>Probe</b>	<b>Ausbeute des Schritts, %</b>	<b>Reinheit (SEC), %</b>	<b>HCP, ng pro mg mAb01</b>	<b>Biologische Aktivität, %</b>
VIN		98,8	2656	89,3
Kristallisation	94,4	98,8	1935	93,8
Umkristallisation	96,8	99,0	1290	96,4
Waschen	97,0	98,8	1489	95,0

Die Ausbeuten aller Teilschritte lagen zwischen 94 % und 97 %. Die Reinheit mittels Größenausschlusschromatografie, lag konstant bei 99 %. Verunreinigungen durch Proteine aus der Zellkultur konnten von 2656 ppm auf 1290 ppm durch zwei Kristallisationen reduziert werden. Dies entspricht einer Halbierung. Die biologische Aktivität des Antikörpers wurde durch die einzelnen Schritte nicht beeinträchtigt.

Als nächstes wurde eine wie VIN behandelte, aber zusätzlich durch Anionenaustauschchromatografie (Durchflussverfahren) gereinigte Lösung untersucht. Im Folgenden wird diese Lösung als AEC bezeichnet. AEC besaß eine mAb01-Konzentration von 12,7 g L<sup>-1</sup>. Das Vorgehen entsprach dem wie bei der Lösung VIN. Im Mikrosatzverfahren bei 10 °C entstanden innerhalb eines Tages Kristalle, beispielsweise bei 8 g L<sup>-1</sup> mAb01 aus AEC, 10 mM Histidinpuffer, 20 mM TRIS (Abbildung 9.3). Somit war eine direkte Kristallisation von mAb01 aus der unreinen Lösung AEC möglich.



**Abbildung 9.3:** Kristallisation von mAb01 aus der unreinen Lösung AEC (durch Protein A-Chromatografie gereinigte, durch einen niedrigen pH virusinaktivierte und durch Anionenaustauschchromatografie gereinigte Lösung) im Mikrosatzverfahren bei 10 °C. 8 g L<sup>-1</sup> mAb01 aus AEC, 10 mM Histidinpuffer, 20 mM TRIS. Die Aufnahme erfolgte nach drei Tagen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Die Kristallisationsbedingung von Abbildung 9.3 wurde parallel in drei gerührte 6 mL-Reaktoren überführt. In den 6 mL-Reaktoren stellte sich pH 6,5 ein. Die Kristallisation konnte nach vier Stunden erfolgreich beendet werden. Wie zuvor bei der Lösung VIN wurde entweder eine Umkristallisation oder ein Waschschrift durchgeführt. Die Reinheit, biologische Aktivität und die Ausbeuten der einzelnen Schritte sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst.

## 9.1 Kristallisation aus vorgereinigten Lösungen

**Tabelle 9.2:** Ausbeute, Reinheit und biologische Aktivität ausgehend von der Lösung AEC (durch Protein A-Chromatografie gereinigte, durch einen niedrigen pH virusinaktivierte und durch Anionenaustauschchromatografie gereinigte Lösung). SEC: Größenausschlusschromatografie; HCP: Verunreinigung durch Proteine aus der Zellkultur.

Probe	Teilausbeute, %	Reinheit (SEC), %	HCP, ng pro mg mAb01	Biologische Aktivität, %
AEC		99,1	29	88,7
Kristallisation	93,1	99,2	8	93,0
Umkristallisation	95,5	99,2	5	91,9
Waschen	96,5	99,2	7	90,9

Die Ausbeuten aller Teilschritte lagen zwischen 93 % und 97 %. Die bereits hohe Reinheit ermittelt durch Größenausschlusschromatografie wurde um 0,1 % auf 99,2 % gesteigert. Verunreinigungen durch Proteine aus der Zellkultur konnten von 29 ppm durch eine Kristallisation auf 8 ppm reduziert werden, was einer Reduktion um den Faktor 3,6 entspricht. Die biologische Aktivität des Antikörpers wurde durch die einzelnen Schritte nicht beeinträchtigt.

Für eine wie AEC, aber zusätzlich durch Kationenaustauschchromatografie gereinigte Lösung (18,4 g L<sup>-1</sup> mAb01) konnten keine Kristallisationsbedingung im Mikrosatzverfahren identifiziert werden. Dies lag an der hohen Natriumchloridkonzentration der Proteinlösung von etwa 80 mM, die für die Elution des Antikörpers von der Kationenaustauschsäule benötigt wurde. Da mAb01 bereits aus den beiden vorangegangenen unreineren Lösungen kristallisiert werden konnte, wurde diese Lösung nicht weiter untersucht.

Kristallisation von mAb01 konnte erfolgreich aus zwei späten Lösungen des Standardaufreinigungsprozesses von Abbildung 9.1 durchgeführt werden. Durch die Kristallisation wurden Verunreinigungen durch Proteine aus der Zellkultur reduziert. Dabei blieb die biologische Aktivität des Antikörpers erhalten und es wurden keine Aggregate oder Abbauprodukte von mAb01 gebildet.

## 9.2 Kristallisation aus dem Zellkulturüberstand

Eine Kristallisation des monoklonalen Antikörpers mAb01 direkt aus dem Zellkulturüberstand konnte, wie es in Kapitel 9.1 mit reineren Lösungen möglich war, nicht erreicht werden. Daher mussten zuerst die Faktoren, die die Kristallisation aus dem Zellkulturüberstand inhibierten, identifiziert werden und anschließend entfernt werden.

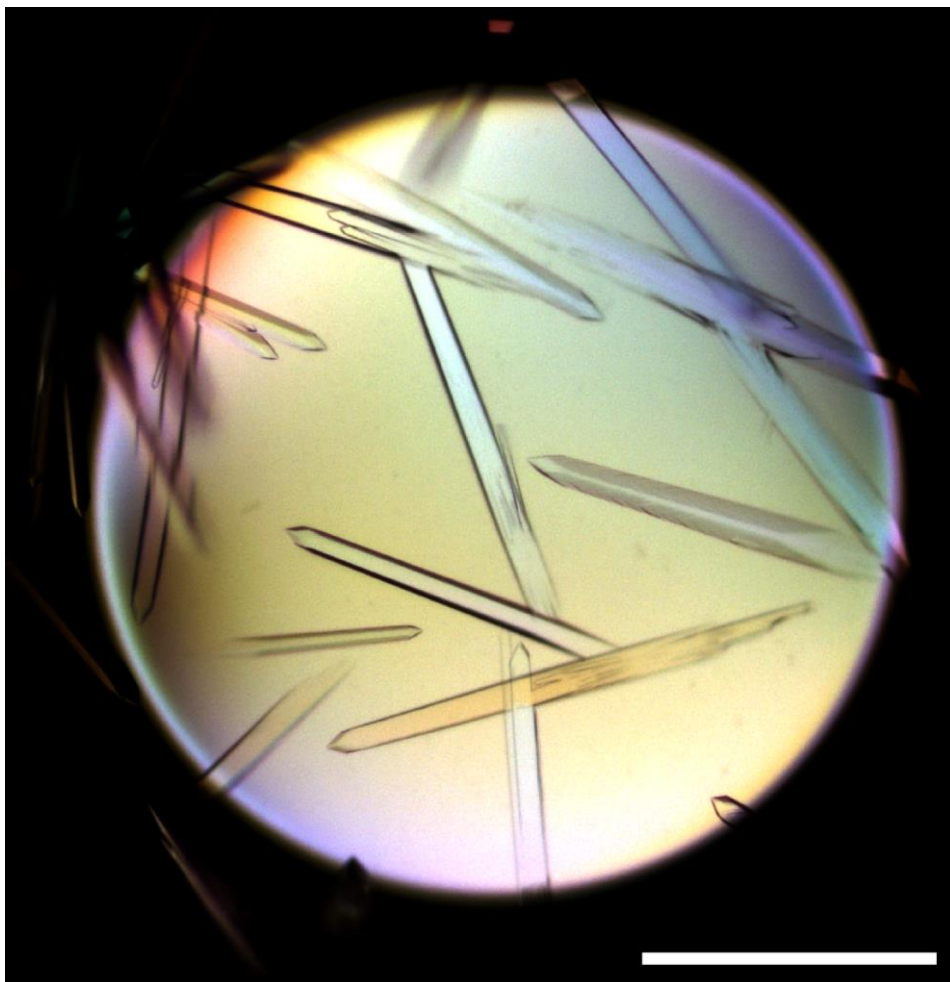
### 9.2.1 Identifizierung der inhibierenden Substanzen

Die Kristallisation von mAb01 direkt aus dem Zellkulturüberstand konnte durch mehrere Faktoren inhibiert worden sein. Möglichen Faktoren waren die niedrige mAb01-Konzentration von zwei bis drei Gramm pro Liter und aus der Zellkultur vorhandene Proteine, Peptide, DNA, RNA und Salze.

Die Proteinkonzentration als alleiniger Faktor konnte ausgeschlossen werden, da eine Kristallisation von reinem mAb01 bei einer Konzentration von  $1 \text{ g L}^{-1}$  möglich war (Daten nicht gezeigt). Der Faktor Salze wurde untersucht, indem im Mikrosatzverfahren bei einer Kristallisation einer reinen mAb01-Lösung einzelne Salze, die sich auch im Zellkulturmedium befanden, hinzugegeben wurden. mAb01 wurde in einem Zellkulturmedium hergestellt, dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt war. Es enthielt jedoch die Salze Calciumchlorid, Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Magnesiumsulfat. Somit wurden diese Salze in einer für die Zellkultur üblichen Konzentrationen basierend auf dem Standardmedium DMEM (1,8 mM Calciumchlorid, 109,5 mM Natriumchlorid, 5,4 mM Kaliumchlorid und 0,81 mM Magnesiumsulfat) eingesetzt. Die Salze Magnesiumsulfat (0,8 mM und 1,6 mM) und Kaliumchlorid (5,4 mM und 10,8 mM) hatten keinen Einfluss auf die Kristallisation. Calciumchlorid (1,8 mM und 3,6 mM) hingegen hatte einen inhibierenden Effekt. Wie bereits in Kapitel 7.1 beschrieben, war eine Kristallisation von mAb01 nur bis zu einer Natriumchloridkonzentration von 60 mM möglich. Folglich störten

im Zellkulturmedium die Salze Natriumchlorid und Calciumchlorid die Kristallisation von mAb01.

Durch eine Dialyse des Zellkulturüberstandes wurden diese Salze zusammen mit anderen niedermolekularen Substanzen entfernt. Bei der Dialyse gegen 10 mM Histidinpuffer pH 5 entstand auch Präzipitat, das entfernt wurde. Wie in Abbildung 9.4 zu sehen ist, konnte mAb01 aus dem dialysierten Zellkulturüberstand im Mikrosatzverfahren bei 10 °C kristallisiert werden. Erste kleine Kristalle wurden bereits nach einem Tag beobachtet.

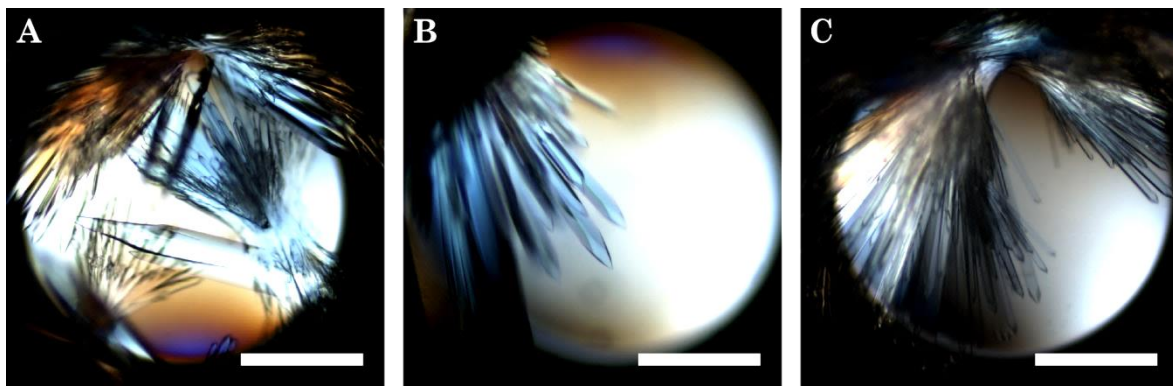


**Abbildung 9.4:** Kristallisation von mAb01 aus dialysiertem Zellkulturüberstand. 1,6 g L<sup>-1</sup> mAb01; 5 mM Histidinpuffer; 8 mM TRIS, 10 °C. Die Aufnahme erfolgte nach einer Woche. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Eine weitere Untersuchung sollte klären, um welchen Anteil die inhibierenden Substanzen in dem Zellkulturüberstand reduziert werden mussten um eine

## 9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation

Kristallisation von mAb01 zu ermöglichen. Hierfür wurde im Mikrosatzverfahren bei 10 °C zu einer Kristallisation von reinem mAb01 unbehandelter Zellkulturüberstand zugegeben. Die Kristallisation erfolgte mit 10 g L<sup>-1</sup> mAb01, 10 mM Histidinpuffer, 10 mM TRIS und variable Mengen an Zellkulturüberstand. Bei 15 % - 25 % Zellkulturüberstand entstanden Kristalle.



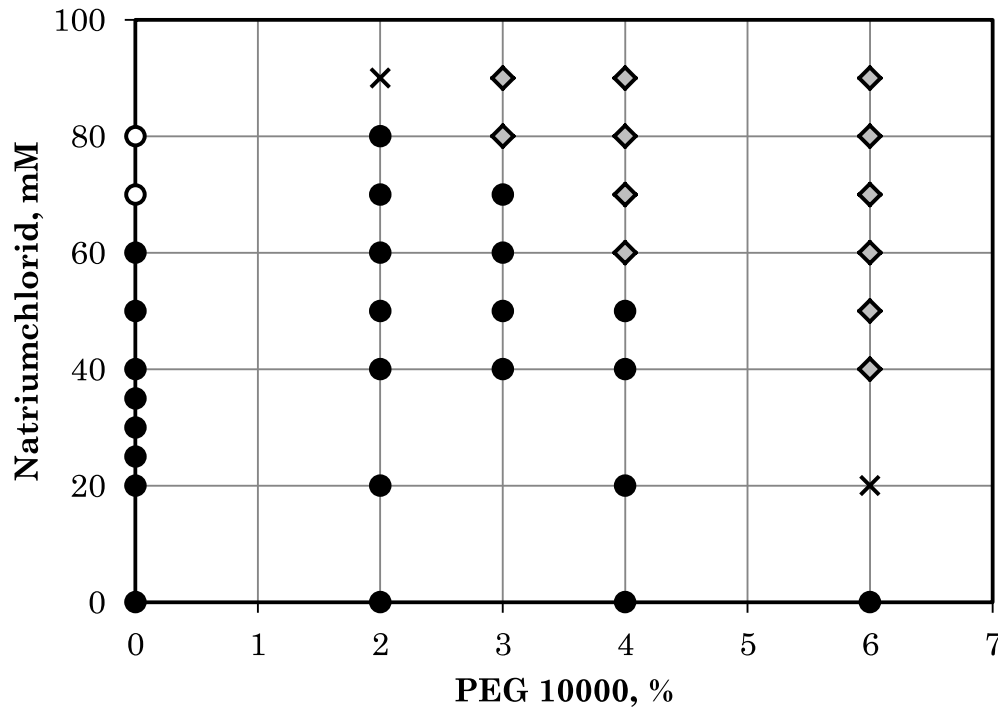
**Abbildung 9.5:** Kristallisation von mAb01 zusammen mit Zellkulturüberstand. Die Kristallisation erfolgte im Mikrosatzverfahren bei 10 °C mit 10 g L<sup>-1</sup> mAb01, 10 mM Histidinpuffer, 10 mM TRIS und variable Mengen an Zellkulturüberstand. A) 15 % Zellkulturüberstand; B) 20 % Zellkulturüberstand; C) 25 % Zellkulturüberstand. Die Aufnahmen erfolgten nach einer Woche. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Bei 30 % - 40 % Zellkulturüberstand blieb die Lösung klar. Somit mussten die inhibierenden Substanzen, hauptsächlich Natriumchlorid und Calciumchlorid, im Zellkulturüberstand um mindestens den Faktor 4 reduziert werden um eine Kristallisation von mAb01 zu ermöglichen.

### 9.2.2 Einfluss von PEG 10000

Wie im Kapitel 9.2.1 beschrieben, musste für eine Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand der Einfluss von inhibierenden Salzen reduziert werden. Für das zweiwertige Calciumion war eine Reduktion der inhibierenden Wirkung durch Komplexbildung mit EDTA möglich. EDTA wirkte sich aber auch leicht inhibierend auf die Kristallisation aus (Daten nicht gezeigt). Für Natriumchlorid zeigte der Einsatz von PEG 10000 eine Reduzierung des inhibierenden Effekts bei der Kristallisation. Der Einfluss von PEG 10000 wurde

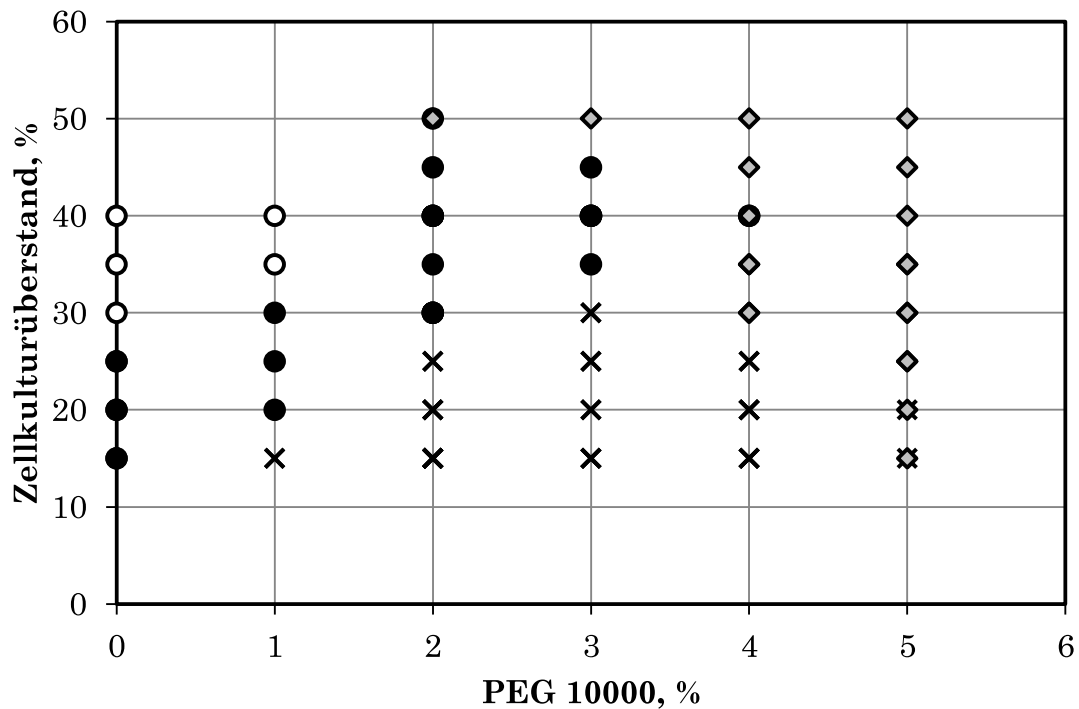
charakterisiert, indem eine reine mAb01-Lösung mit verschiedenen Konzentrationen von PEG 10000 und Natriumchlorid kristallisiert wurde (Abbildung 9.6).



**Abbildung 9.6:** Einfluss von PEG 10000 auf die mAb01-Kristallisation.  $10 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 wurden mit  $10 \text{ mM}$  Histidinpuffer und  $10 \text{ mM}$  TRIS im Mikrosatzverfahren bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  kristallisiert. Die Konzentration von PEG 10000 und Natriumchlorid wurde variiert. Die Auswertung erfolgte nach einer Woche: Kristalle (●); klare Lösung (○); flüssig-flüssig Phasentrennung (◇); Präzipitat (×).

Ohne PEG 10000 war eine Kristallisation von mAb01 nur bis zu einer Natriumchloridkonzentration von  $60 \text{ mM}$  möglich. Durch die Zugabe von  $2 \%$  PEG 10000 war eine Kristallisation noch mit  $80 \text{ mM}$  Natriumchlorid möglich. Eine weitere Reduktion des inhibierenden Effekts von Natriumchlorid bei der Kristallisation durch eine weitere Erhöhung der PEG 10000-Konzentration konnte nicht erreicht werden, da flüssig-flüssig Phasentrennung auftrat.

Wie in Kapitel 9.2.1 wurde im Mikrosatzverfahren bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  der Anteil an unbehandeltem Zellkulturüberstand bestimmt bei dem eine Kristallisation von mAb01 möglich war. Diesmal wurden zusätzlich verschiedene Konzentrationen von PEG 10000 zugegeben (Abbildung 9.7).



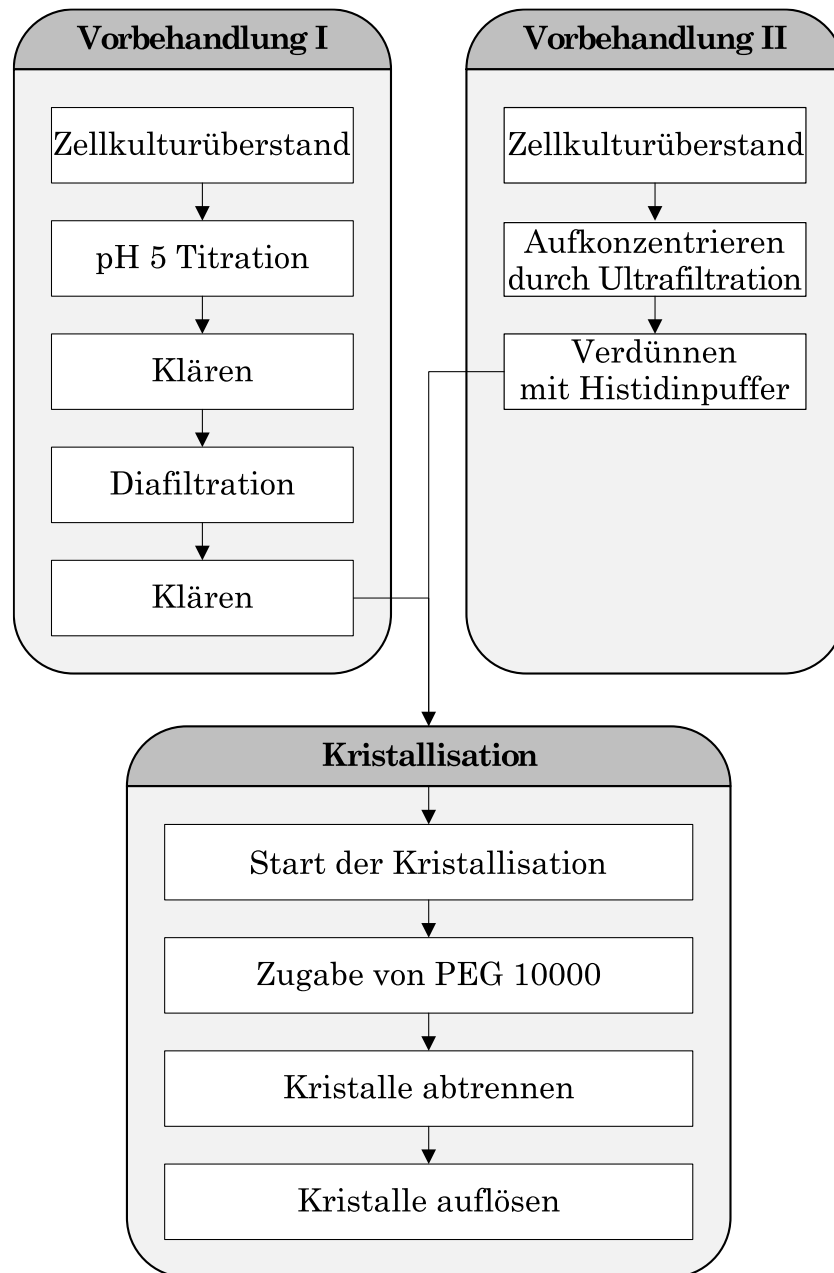
**Abbildung 9.7:** Einfluss von PEG 10000 auf die mAb01-Kristallisation. 10 g L<sup>-1</sup> mAb01 wurden mit 10 mM Histidinpuffer und 10 mM TRIS im Mikrosatzverfahren bei 10 °C kristallisiert. Die Konzentration von PEG 10000 und Zellkulturüberstand wurde variiert. Die Auswertung erfolgte nach einer Woche: Kristalle (●); klare Lösung (○); flüssig-flüssig Phasentrennung (◇); Präzipitat und Kristalle (×).

Durch die Zugabe von PEG 10000 konnte mAb01 in Anwesenheit von höheren Anteilen von Zellkulturüberstand kristallisiert werden. Jedoch trat mit steigender PEG 10000-Konzentration auch flüssig-flüssig Phasentrennung und Präzipitation auf. Somit lag die beste PEG 10000-Konzentration bei 2 %. Hier konnten 30 % - 45 % Zellkulturüberstand zugegeben werden, ohne dass die mAb01-Kristallisation inhibiert wurde. Im Präzipitationsbereich entstanden auch mAb01-Kristalle. Daher wird angenommen, dass durch die hohe Verdünnung des Zellkulturüberstands andere Substanzen präzipitierten und der Antikörper mAb01 kristallisierte. Für eine Kristallisation ohne Präzipitation wurden 40 % Zellkulturüberstand mit 2 % PEG 10000 als geeignet angesehen.



### 9.2.3 Entwicklung einer Vorbehandlungsmethode

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 9.2.1 und 9.2.2 war eine Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand nur möglich, wenn eine Vorbehandlung stattfand, die die Salzkonzentrationen genügend reduzierte. Somit wurden zwei Vorbehandlungsmethoden entwickelt, die dies ermöglichten (Abbildung 9.8).



**Abbildung 9.8:** Überblick über zwei Methoden zur Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand.

## 9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation

In der Vorbehandlungsmethode I fand zuerst eine Änderung des pH des Zellkulturüberstands von pH 7,2 auf pH 5,0 statt, da hier der Antikörper mAb01 gut löslich war und somit Produktverluste vermieden wurden. Bei der Änderung des pH entstand Präzipitat, weshalb die Lösung mittels Zentrifugation geklärt wurde. Die Reduktion der Salze, die die Kristallisation inhibierten, wurde durch eine Diafiltration gegen 10 mM Histidinpuffer pH 5,0 erreicht. Dabei wurde die Konduktivität von  $10 \text{ mS cm}^{-1}$  auf  $2 \text{ mS cm}^{-1}$  gesenkt, wobei nochmals Präzipitat entstand. Dieses wurde durch Zentrifugation entfernt. Die anschließende Kristallisation erfolgte durch eine Erhöhung des pH auf 6,8 mit 1 M TRIS und durch Zugabe von 2 % PEG 10000. Somit fand eine Kristallisation im 6 mL-Reaktor mit  $3,3 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in 10 mM Histidinpuffer pH 6,8 und 2 % PEG 10000 statt. 2 % PEG 10000 hatte in vorangegangenen Experimenten im 6 mL-Reaktor den Kristallisationsstart von einem Tag auf vier Stunden reduziert (Daten nicht gezeigt).

In der Vorbehandlungsmethode II wurde der Zellkulturüberstand auf pH 6,8 titriert und mittels Ultrafiltration vierfach aufkonzentriert, wodurch eine konzentrierte Lösung mit  $12,4 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 entstand. Dabei blieb die Lösung klar. Die anschließende Kristallisation erfolgte durch eine Verdünnung der konzentrierten Lösung auf 40 % mit Histidinpuffer pH 6,8 und einer Zugabe von 2 % PEG 10000. Die resultierende Konduktivität betrug  $2 \text{ mS cm}^{-1}$ . Somit fand die Kristallisation im 6 mL-Reaktor mit  $5 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 in 10 mM Histidinpuffer pH 6,8 und 2 % PEG 10000 statt.

Diese beiden Methoden wurden in Bezug auf Ausbeute und Reinheit miteinander verglichen (Tabelle 9.3). Die Kristallisationen erfolgten bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht im 6 mL-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $250 \text{ min}^{-1}$ . Die Vorbehandlungsmethode I lieferte gegenüber der Vorbehandlungsmethode II eine 7 % höhere Reinheit. Dies ließ sich durch das zweimalige Entfernen von Präzipitat erklären. Obwohl Vorbehandlungsmethode I mehrere Teilschritte umfasste, war die Ausbeute lediglich 2 % geringer als die der Vorbehandlungsmethode II. Bei Verwendung der Vorbehandlungsmethode I setzte der Kristallisationsstart innerhalb von vier Stunden ein und die Ausbeute

der Kristallisation lag bei 90 %. Nach der Vorbehandlungsmethode II setzte der Kristallisationsstart zwischen vier bis acht Stunden ein. Im Gegensatz zu Vorbehandlungsmethode I entstand beim Lösen der Kristalle bei pH 5 Präzipitat. Die Ausbeute der Kristallisation betrug nur 66 %, da 16 % des eingesetzten mAb01 nicht mehr gelöst werden konnten.

**Tabelle 9.3:** Vergleich der beiden Vorbehandlungsmethoden für die Kristallisation von mAb01 aus Zellkulturüberstand

	Vorbehandlung I	Vorbehandlung II
Reinheit nach der Vorbehandlung	92 %	85 %
Ausbeute nach der Vorbehandlung	95 %	97 %
Reinheit nach der Kristallisation	96 %	94 %
Ausbeute der Kristallisation	90 %	66 %
Gesamtausbeute	86 %	64 %

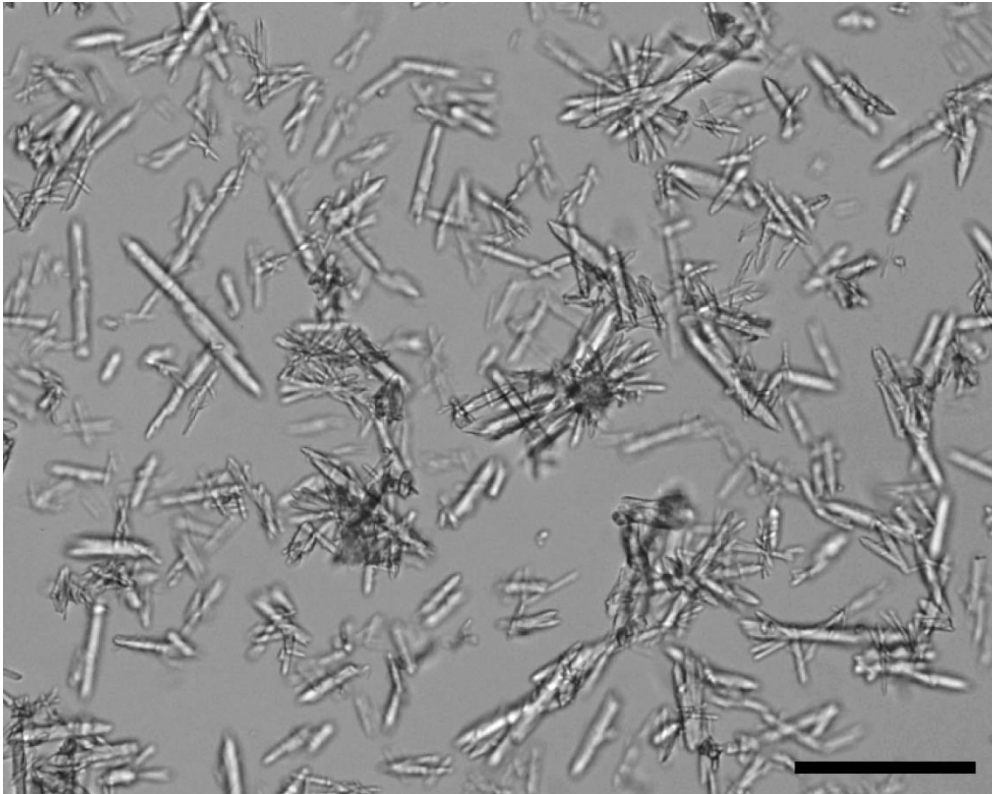
Die Gesamtausbeute nach Vorbehandlung und Kristallisation war nach Vorbehandlungsmethode I 22 % höher als bei Vorbehandlungsmethode II. Gleichzeitig wurde eine 2 % höhere Reinheit erreicht. Deshalb wurde nachfolgend die Vorbehandlungsmethode I verwendet.

#### 9.2.4 Kristallisationsprozess im Litermaßstab

Um das Aufreinigungspotential der Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand zu untersuchen, wurden zwei Experimente im 1 L-Reaktor bei einer Rührerdrehzahl von  $150 \text{ min}^{-1}$  ( $\bar{\epsilon} = 18 \text{ mW L}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{max}} = 1,3 \text{ W kg}^{-1}$ ) durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Produktionen von Zellkulturüberstand verwendet, die unterschiedliche Konzentrationen an Produkt und Verunreinigungen enthielten. Bei Experiment A wurden eine Vorbehandlung des Zellkulturüberstands, eine Kristallisation im 1 L-Reaktor und eine Umkristallisation eines Teils des Produkts im 6 mL-Reaktor durchgeführt. Bei Experiment B fand eine Vorbehandlung des

Zellkulturüberstands, eine Kristallisation im 1 L-Reaktor, eine Umkristallisation im 100 mL-Reaktor, drei Schritte aus einem Standardaufreinigungsprozess und eine Produktformulierung durch Kristallisation im 100 mL-Reaktor statt. Die drei Schritte aus dem Standardaufreinigungsprozess waren Virusinaktivierung bei niedrigem pH, Anionenaustauschchromatografie (Durchflussbetrieb) und Nanofiltration. In dieser Arbeit sollte nur gezeigt werden, dass eine Kombination von Kristallisation mit diesen Schritten möglich ist. Deshalb wird auf die damit erreichten Ausbeuten und Reinheitswerte nicht näher eingegangen. Die Diafiltration bei der Vorbehandlung erfolgte in Experiment A mit sieben Diavolumen und einer 30 kDa Membran und in Experiment B mit fünf Diavolumen und einer 10 kDa Membran, weshalb bei der Vorbehandlung unterschiedlich hohe Ausbeuten erreicht wurden (87 % bei A und 94 % bei B).

In beiden Experimenten wurde nach Einstellen auf pH 6,8 bei der ersten Kristallisation 2 % PEG 10000 zugegeben. Die Startkonzentration von mAb01 bei der Kristallisation war in Experiment A  $2,2 \text{ g L}^{-1}$  und in Experiment B  $4,0 \text{ g L}^{-1}$ . Erste Kristalle waren nach einer Stunde in Experiment A und nach 1,5 Stunden in Experiment B sichtbar. Nach einer Kristallisation über Nacht wurden die Kristalle durch Zentrifugation abgetrennt. Abbildung 9.9 zeigt Kristalle aus Experiment A nach der ersten Kristallisation.



**Abbildung 9.9:** mAb01 Kristalle aus Experiment A nach der ersten Kristallisation. Die Kristallisation erfolgte über Nacht im 1 L-Reaktor bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 150 min<sup>-1</sup> mit 2,2 g L<sup>-1</sup> mAb01 aus vorbehandeltem Zellkulturüberstand, TRIS zum Einstellen auf pH 6,8, 2 % w/v PEG 10000. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Bei Experiment A blieben 0,3 g L<sup>-1</sup> mAb01 und bei Experiment B 0,4 g L<sup>-1</sup> mAb01 in Lösung. Somit wurden für die erste Kristallisation Ausbeuten von 88 % (A) und 90 % (B) erreicht. Die Ausbeuten der Teilschritte und die jeweils erreichte Reinheit sind in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

## 9 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers mAb01 mittels Kristallisation

**Tabelle 9.4:** Ausbeute und Reinheit des Kristallisationsprozess im 1 L-Reaktor. Experiment A wurde bis zur Umkristallisation durchgeführt. SEC: Größenausschlusschromatografie; HCP: Verunreinigung durch Proteine aus der Zellkultur. n.b.: Wert nicht bestimmt.

	Teilausbeute,		Reinheit (SEC),		HCP, ng pro mg	
	%		%		mAb01	
Experiment	A	B	A	B	A	B
Zellkulturüberstand			n.b.	n.b.	81752	266719
Vorbehandlung	87	94	n.b.	n.b.	n.b.	222830
Kristallisation	88	90	92,9	96,9	11259	39070
Umkristallisation	98	88	98,5	97,3	4733	17354
Virusinaktivierung		98		97,7		13864
Anionenaustausch- chromatografie		89		99,0		1506
Nanofiltration		94		n.b.		1289
Produktformulierung durch Kristallisation		93		n.b.		88

Nach der Umkristallisation wurde eine Reinheit von 98,5 % (A) bzw. 97,3 % (B) erreicht. Bis zu diesem Punkt wurde die Konzentration von verunreinigenden Proteinen aus der Zellkultur (HCP, engl. *host cell protein*) 17-fach auf 4733 ppm in Experiment A und 15-fach auf 17354 ppm in Experiment B reduziert. In Experiment B wurde zusätzlich die DNA-Konzentration nach der Umkristallisation bestimmt. Die DNA wurde mehr als 39000-fach bis unter die Nachweisgrenze von 2 ppb reduziert. Als Produktformulierung wurde eine Kristallisation durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte im 100 mL-Reaktor bei 10 °C und einer Rührerdrehzahl von 200 min<sup>-1</sup> ( $\epsilon_{\max} = 1,3 \text{ W kg}^{-1}$ ) unter Zugabe von 250 mM Trehalose. Der pH wurde anstelle der Base TRIS mit Natriumhydroxid auf pH 6,8 eingestellt. Die Startkonzentration war 11,6 g L<sup>-1</sup> mAb01. Die Kristallisation wurde nach vier Stunden beendet. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 0,79 g L<sup>-1</sup> mAb01 in der Lösung. Dies entsprach

einer Ausbeute von 93 %. HCPs wurden durch diesen Schritt um das 15-fache reduziert. Die biologische Aktivität nach Auflösen der Kristalle wurde auf 107 % bestimmt.

Die Kristallisation von mAb01 aus vorbehandeltem Zellkulturüberstand konnte erfolgreich im Litermaßstab durchgeführt werden und ersetzte dabei die Protein A-Chromatografie im Standardaufreinigungsprozess. Des Weiteren konnte die Kristallisation problemlos mit den Standardprozessschritten Virusinaktivierung bei niedrigem pH, Anionenaustauschchromatografie (Durchflussbetrieb) und Nanofiltration kombiniert werden.

### 9.3 Diskussion

Eine Kristallisation von mAb01 direkt aus vorgereinigten Lösungen war möglich, solange die Natriumchloridkonzentration niedrig genug war. Dabei wurde pro Kristallisationsschritt eine Reduktion der unerwünschten Proteine aus der Zellkultur (HCP, engl. *host cell protein*) zwischen 27 % und 72 % erreicht. Ausgehend von einer Startkonzentration von  $8 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 und einem Kristallpellet von etwa  $214 \text{ g L}^{-1}$  mAb01 (siehe Kapitel 7.4) wäre allein durch die Volumenreduktion eine HCP-Reduktion von mindestens 96 % zu erwarten gewesen. Folglich lagen die HCPs nicht gelöst vor, sondern es bestand wohl eine Affinität zu den Antikörpermolekülen. Durch den hohen Kristallwasseranteil von 77 % (siehe Kapitel 7.5) war genug Platz, so dass diese Proteine auch im Kristall eingelagert werden konnten. Des Weiteren brachte die erste Kristallisation jeweils eine um 2,4 % geringere Ausbeute als die anschließende Umkristallisation. Anscheinend kristallisierte eine Subpopulation des Antikörpers nicht und wurde dadurch selektiv entfernt. Dies würde auch erklären, warum nach der Kristallisation die biologische Aktivität um etwa 4 % höher war als im Ausgangsmaterial.

Eine direkte Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand war nicht möglich. Als hauptsächliche Ursache wurden die zu hohen Konzentrationen von Natriumchlorid und Calciumchlorid identifiziert. Somit mussten die Salze im Zellkulturüberstand vor der Kristallisation reduziert werden. Eine Vorbehandlung bestehend aus pH-Titration und Diafiltration war dafür geeignet. Zusätzlich konnte durch die Zugabe von 2 % PEG 10000 die Keimbildung erhöht und damit die Zeit bis zum Kristallisationsstart verkürzt werden. Ein positiver Einfluss von Polyethylenglykol auf die Proteinkristallisation wurde bereits in der Literatur beschrieben (Crisman und Randolph, 2010; Jion *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2008). Die erste Kristallisation lieferte eine Reinheit von 93 % - 97 % und eine Ausbeute von 88 % - 90 %. Angesichts der niedrigen verbleibenden mAb01-Konzentration in Lösung von  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  -  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  wurde die maximale Ausbeute erreicht. Höhere Ausbeuten wären nur durch eine höhere Startkonzentration möglich. Die Kristallisation startete zuverlässig nach



1 bis 1,5 Stunden. Durch eine Kombination aus Vorbehandlung, Kristallisation und Umkristallisation konnte die kostenintensive Protein A-Chromatografie erfolgreich ersetzt werden. Die Reinheit nach der Umkristallisation lag zwischen 97,3 % und 98,5 %. Bei der Protein A-Chromatografie wird eine Reinheit von mehr als 95 % erreicht (Shukla *et al.*, 2007b). Zum Vergleich kristallisierten Zang *et al.* (2011) den monoklonalen Antikörper mAb04c aus diafiltriertem und konzentriertem Zellkulturüberstand. Dabei wurden eine Reinheit von 90 % und eine Ausbeute von 31,3 % erreicht, erste Kristalle wurden nach 48 Stunden beobachtet und die Kristallisation dauerte fünf Tage. In allen Punkten war die Kristallisation von mAb01 aus dem vorbehandelten Zellkulturüberstand überlegen.

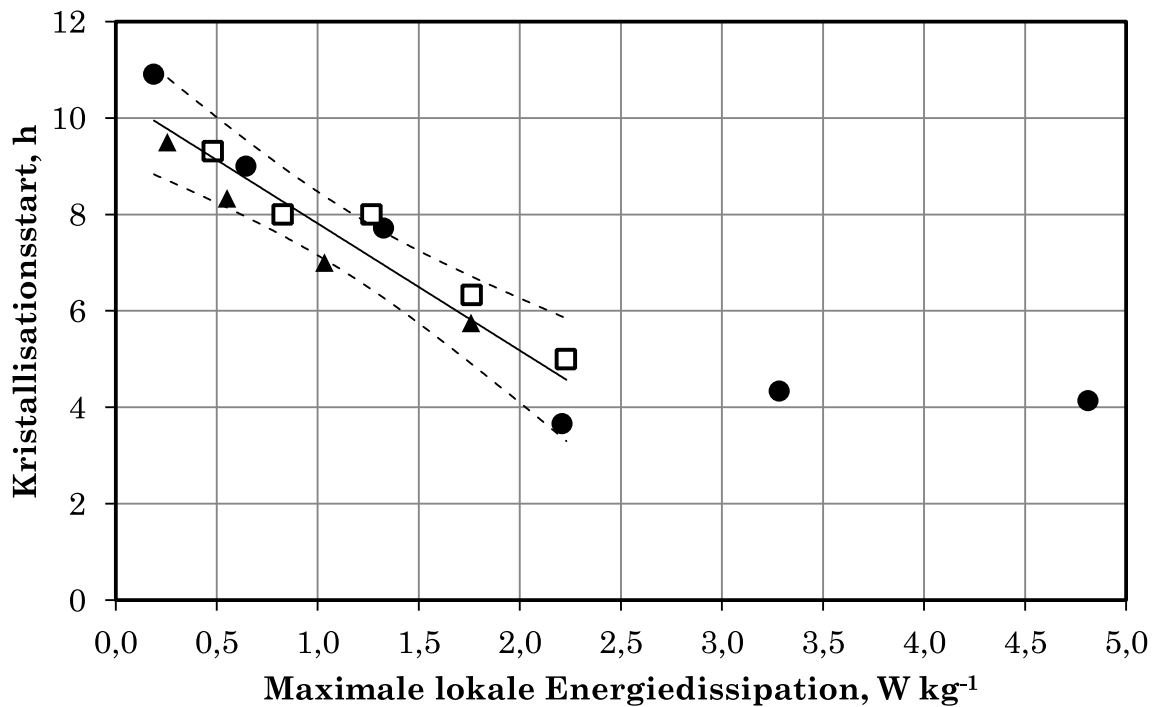
Durch die erste Kristallisation aus vorbehandeltem Zellkulturüberstand im 1 L-Reaktor (Experiment B, Kapitel 9.2.4) wurde eine HCP-Reduktion um 82 % erreicht. Ausgehend von einer Startkonzentration von 4 g L<sup>-1</sup> mAb01 und einem Kristallpellet von etwa 214 g L<sup>-1</sup> mAb01 wäre allein durch die Volumenreduktion eine Reduktion von mehr als 98 % zu erwarten gewesen. Da dies nicht erreicht wurde, lag wohl auch hier eine Affinität der HCPs zu dem Antikörper vor. Überraschenderweise wurden bei der Produktformulierung durch Kristallisation die HCPs von 1289 ppm auf 88 ppm reduziert. Dies entspricht einer Reduktion um 93,2 %. Ausgehend von einer Startkonzentration von 11,6 g L<sup>-1</sup> und einem Kristallpellet nach dem Abtrennen der Kristalle von 214 g L<sup>-1</sup> wäre durch die Volumenreduktion eine Reduktion von 94,6 % zu erwarten gewesen. Diese sehr ähnlichen Werte sprechen dafür, dass durch die 0,25 M Trehalose die meisten an die Antikörper angelagerten Proteine verdrängt wurden.

## 10 Zusammenfassung und Ausblick

Biopharmazeutika, wie therapeutische monoklonale Antikörper, wirken hoch spezifisch und langanhaltend bei zugleich geringen Nebenwirkungen (Oldham und Dillman, 2008; Shukla und Thömmes, 2010). Medikamente dieser Art zählen jedoch zu den teuersten Arzneimitteln auf dem Markt (Boston Consulting Group, 2012). Die Kosten für die Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers können bis zu 80 % der gesamten Herstellungskosten ausmachen (Roque *et al.*, 2004). Daher werden günstigere Methoden zur Aufreinigung und Formulierung gesucht. In dieser Arbeit wurde die Proteinkristallisation als Methode zur kostensparenden Aufreinigung und Formulierung eines therapeutischen monoklonalen Antikörpers näher untersucht.

Die technische Proteinkristallisation wird in einem Rührkessel durchgeführt. Jedoch ist der Einfluss des Rührens auf die Proteinkristallisation und deren Maßstabsvergrößerung bisher unzureichend untersucht (Genck, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst anhand des kostengünstigen und einfach verfügbaren Enzyms Lysozym der Einfluss der Rührerdrehzahl auf die Proteinkristallisation im 6 mL-, 100 mL- und 1 L-Maßstab charakterisiert. Eine Erhöhung der Rührerdrehzahl führte zu einem beschleunigten Kristallisationsstart, wodurch ein schneller Kristallisationsprozess ermöglicht werden kann.

Mit den in der Literatur beschriebenen Kriterien zur Maßstabsvergrößerung von Proteinkristallisationsprozessen (wie die minimale Rührerdrehzahl, um die Kristalle in Suspension zu halten oder eine konstante Rührerumfangsgeschwindigkeit) konnten in den drei Reaktoren keine vergleichbaren Ergebnisse hinsichtlich der Zeit bis zum Kristallisationsstart erzielt werden. In dieser Arbeit wurde erstmalig eine konstante maximale lokale Energiedissipation als geeignetes Kriterium für die Maßstabsvergrößerung eines Proteinkristallisationsprozesses identifiziert. Das Optimum der Lysozymkristallisation, bei dem der schnellste Kristallisationsstart mit minimalen Scherkräften erreicht wurde, fand bei einer maximalen lokalen Energiedissipation von  $2,2 \text{ W kg}^{-1}$  statt (siehe Abbildung 10.1).

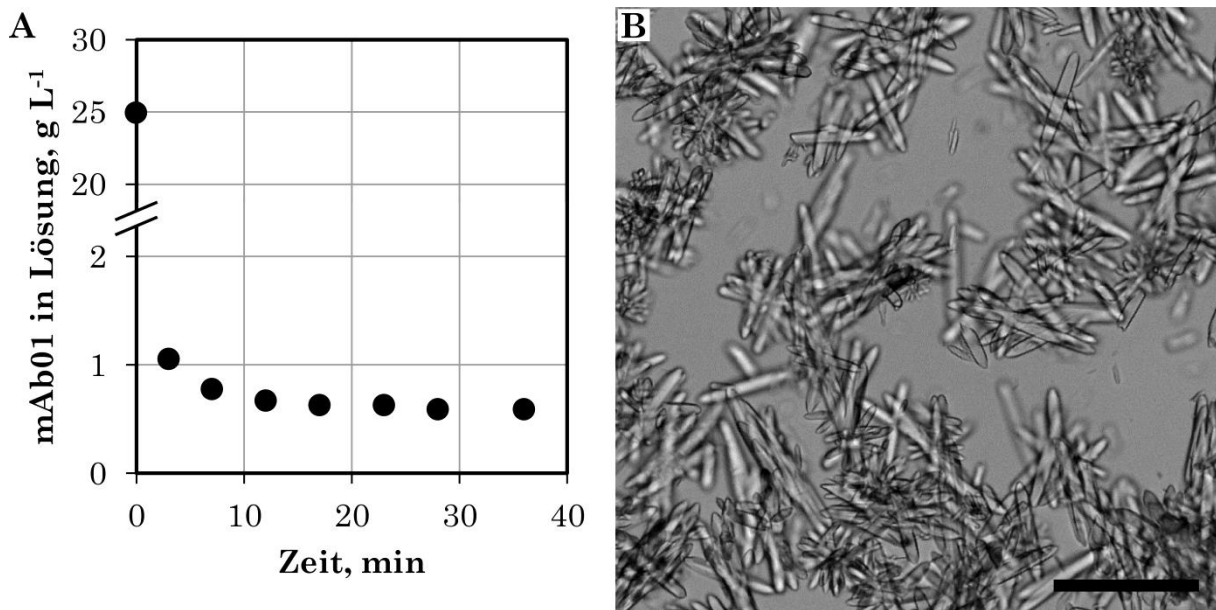


**Abbildung 10.1:** Abhängigkeit des Kristallisationsstarts bei Lysozym von der maximalen lokalen Energiedissipation. 1 L-Reaktor (●); 100 mL-Reaktor (□); 6 mL-Reaktor (▲). Die durchgezogene Linie ist eine lineare Regression im Bereich der maximalen lokalen Energiedissipation von 0,2 bis 2,2  $W\ kg^{-1}$ . Gestrichelt ist das 95 % Konfidenzintervall eingezeichnet.

Für das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers Canakinumab und für den monoklonalen Antikörper mAb01 wurde, ausgehend von bekannten Kristallisationsbedingungen, gezeigt, dass eine Kristallisation im gerührten Satzverfahren möglich ist:

Für das Fab-Fragment des therapeutischen Antikörpers Canakinumab waren Kristallisationsbedingungen aus Dampfdiffusionsexperimenten bekannt. Die Kristallisationsbedingungen wurden durch Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 28 °C und durch Verwendung eines Malonatpuffers verbessert, wodurch im Mikrosatzverfahren eine schnelle Kristallisation innerhalb von drei Tagen stattfand. Anschließend erfolgte eine Kristallisation im gerührten 6 mL-Reaktor, bei der sich bereits nach 16 Stunden Kristalle bildeten und nach einer Woche eine Ausbeute von 77 % erzielt wurde.

Für den therapeutischen Antikörper mAb01 erfolgte eine Charakterisierung des Kristallisationsbereiches im Mikrosatzverfahren. Damit war ein Transfer der Kristallisation über den gerührten 6 mL-Reaktor bis in den gerührten 1 L-Reaktor erfolgreich möglich. Hier wurden 25 g des reinen Antikörpers mAb01 mit einer hohen Ausbeute von 98,3 % kristallisiert. Bereits nach 17 Minuten war dieser sehr schnelle Kristallisationsprozess zu 99,2 % abgeschlossen (siehe Abbildung 10.2).



**Abbildung 10.2:** Kristallisation von mAb01 im 1 L-Reaktor bei 10 °C. 25 g L<sup>-1</sup> mAb01 in 10 mM Histidinpuffer; 52 mM Trehalose. Die Kristallisation wurde durch Einstellen des pH auf pH 6,8 mit 1 M TRIS gestartet. Rührerdrehzahl von 150 min<sup>-1</sup> ( $\bar{\epsilon} = 18 \text{ mW L}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{max}} = 1,3 \text{ W kg}^{-1}$ )  
A) Kristallisationsverlauf; B) mAb01-Kristalle aus dem 1 L-Reaktor. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Inwieweit Proteinkristalle als platzsparende und stabile Formulierung für die Lagerung geeignet sein könnten, wurde anhand des Antikörpers mAb01 untersucht. Für diesen Antikörper wurde die maximal erreichbare Proteinkonzentration durch Kristallisation nach Verdichtung durch Zentrifugation auf 315 g L<sup>-1</sup> bestimmt. Es wurden zusätzlich Lagerbedingungen identifiziert, bei denen die Kristalle in Suspension stabil blieben ( $T < 20 \text{ °C}$ ; pH 6,6). Zusätzlich konnte der monoklonale Antikörper durch Senken des pH auf pH 5,0 sehr effizient wieder in Lösung gebracht werden, wodurch eine hochkonzentrierte Lösung mit 200 g L<sup>-1</sup> erzeugt werden konnte.

Des Weiteren wurde die Eignung von mAb01-Kristallsuspensionen als pharmazeutische Formulierung für eine mögliche subkutane Injektion untersucht. Da bei therapeutischen Antikörpern oft eine hohe Dosis von 0,1 g - 1,0 g benötigt wird, das Volumen einer subkutanen Injektion jedoch auf 1,5 mL begrenzt ist, werden Formulierungen mit mehr als 100 g L<sup>-1</sup> Antikörper benötigt. Die maximale Konzentration der flüssigen mAb01-Standardformulierung liegt bei 125 g L<sup>-1</sup>. Als Alternative wurde eine mAb01-Kristallsuspension hergestellt, die als pharmazeutische Formulierung verwendet werden könnte. Eine Kristallisation nur mit medizinisch zugelassenen Hilfsstoffen war möglich, wobei eine biologische Osmolarität durch Zugabe von 0,25 M Trehalose erreicht wurde. Die mittlere Kristalllänge konnte im Bereich von 6 µm bis 44 µm durch eine Veränderung der Proteinkonzentration beim Kristallisieren von 149 g L<sup>-1</sup> bis 15 g L<sup>-1</sup> erfolgreich variiert werden. Es wurde eine injizierbare Kristallsuspension mit maximal 149 g L<sup>-1</sup> hergestellt. Beim Injizieren einer Kristallsuspension (118 g L<sup>-1</sup> mAb01) durch dünne Injektionsnadeln (Nadelgröße: 25 G, 26 G und 27 G) wurde jeweils nur die halbe Kraft auf den Spritzenkolben benötigt wie mit einer entsprechenden Standardformulierung. Die Kristallsuspension ließ sich zudem durch eine dünnere 30 G Nadel injizieren. Dies war mit der Standardformulierung nicht mehr möglich.

Aufgrund der hohen Anforderungen an die Reinheit therapeutischer Proteine werden zur Aufreinigung eines therapeutischen monoklonalen Antikörpers nach dem Stand der Technik Protein A-Chromatografie sowie zwei weitere Chromatografieschritte eingesetzt. Dies verursacht hohe Kosten bei der Herstellung. Daher wurde Proteinkristallisation als kostengünstige Alternative für die Aufreinigung von mAb01 untersucht. Eine direkte Kristallisation von mAb01 aus dem Zellkulturüberstand war nicht möglich. Daraufhin wurden als die Keimbildung inhibierende Substanzen Natriumchlorid und Calciumchlorid identifiziert. Es wurde eine Methode entwickelt, die eine Kristallisation von mAb01 aus Zellkulturextrakt ermöglichte. Diese bestand aus einem Pufferaustausch bei pH 5 und der Zugabe von 2 % PEG 10000 bei der Kristallisation. Im 1 L-Reaktor entstanden bereits nach 1,5 Stunden Kristalle. Nach 12 h Kristallisation (über Nacht) betrug die Kristallisationsausbeute 90 %

und es wurde eine Reinheit von 96,9 % erreicht. Die Reinheit konnte durch eine Umkristallisation auf 97,3 % gesteigert werden. Unerwünschte Proteine aus der Zellkultur wurden um 93 % reduziert und der DNA-Gehalt lag unterhalb der Nachweisgrenze von 2 ppb. Somit wurde DNA höchst effektiv um mindestens den Faktor 39000 reduziert. Es wurden weder eine erhöhte Aggregation noch die Bildung von Abbauprodukten festgestellt und der Antikörper hatte eine hohe biologische Aktivität. Damit konnte für mAb01 ein neuer Weg gefunden werden, die kostenintensive Protein A-Chromatografie mittels Kristallisation aus vorbehandeltem Zellkulturüberstand erfolgreich zu ersetzen.

In Zukunft wäre damit ein chromatografiefreier und somit kostensparender Aufreinigungsprozess des monoklonalen Antikörpers mAb01 möglich, wenn die Kristallisation mit anderen alternativen Reinigungsverfahren kombiniert würde. Funktionalisierte Filtrationsmembranen könnten beispielsweise die Anionenaustauschchromatografie ersetzen (Knudsen *et al.*, 2001; Kuczewski *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010). Eine Fällung von mAb01 vor der Kristallisation könnte auch einen schnellen und günstigen Pufferaustausch ermöglichen. Zurzeit ist ein Kristallisationsschritt in einem übertragbaren Aufreinigungsprozess von monoklonalen Antikörpern noch nicht möglich. Dies liegt daran, dass die Kristallisationsbedingungen für jeden Antikörper erst individuell gefunden werden müssen. Um in Zukunft für verschiedene Antikörper einen gemeinsamen Kristallisationsprozess zu ermöglichen, müssten durch eine Analyse kristallisierbarer Antikörper die Aminosäuren identifiziert werden, die für die Kristallisation nötig sind. Damit wäre es vielleicht möglich ein kristallisierbares Antikörpergrundgerüst zu konstruieren.

## Literaturverzeichnis

- Adler M. 2012. Challenges in the Development of Pre-filled Syringes for Biologics from a Formulation Scientist ' s Point of View. American Pharmaceutical Review.
- Andya JD, Hsu CC, Shire SJ. 2003. Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations. AAPS PharmSci 5(2):21-31.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol 25:21-50.
- Asherie N. 2004. Protein crystallization and phase diagrams. Methods 34(3):266-272.
- Assirelli M, Bujalski W, Eaglesham A, Nienow AW. 2008. Macro- and micromixing studies in an unbaffled vessel agitated by a Rushton turbine. Chem Eng Sci 63(1):35-46.
- Azevedo AM, Rosa PA, Ferreira IF, Aires-Barros MR. 2009. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. Trends Biotechnol 27(4):240-247.
- Basu SK, Govardhan CP, Jung CW, Margolin AL. 2004. Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals. Expert Opin Biol Ther 4(3):301-317.
- Batchelor GK. 1953. The theory of homogeneous turbulence. Cambridge: Cambridge Univ. Press. XI, 197 S p.
- Bayer Pharma. Von kleinen und großen Molekülen: Arzneimittel auf chemischer und biologischer Basis. <http://www.bayerpharma.com/de/forschung-und-entwicklung/technologien-trends/kleine-molekuele-grosse-molekuele/index.php>.
- Biedermann A, Henzler H-J. 1994. Beanspruchung von Partikeln in Rührreaktoren. Chem Ing Tech 66(2):209-211.
- Boes M. 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol Immunol 37(18):1141-1149.
- Boston Consulting Group. Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2012 - Biopharmazeutika: Wirtschaftsdaten und neue Anwendungsgebiete zum Nutzen für die Patienten. <http://www.vfa-bio.de/download/bcg-report-2012.pdf>.
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. Nature 312(5995):643-646.

- Brange J, Langkjaer L, Havelund S, Vølund A. 1992. Chemical Stability of Insulin. 1. Hydrolytic Degradation During Storage of Pharmaceutical Preparations. *Pharm Res* 9(6):715-726.
- Brorson K, Krejci S, Lee K, Hamilton E, Stein K, Xu Y. 2003. Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng* 82(3):321-329.
- Brucato A, Cipollina A, Micale G, Scargiali F, Tamburini A. 2010. Particle suspension in top-covered unbaffled tanks. *Chem Eng Sci* 65(10):3001-3008.
- Burckbuchler V, Mekhloufi G, Giteau AP, Grossiord JL, Huille S, Agnely F. 2010. Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. *Eur J Pharm Biopharm* 76(3):351-356.
- Carter-Franklin JN, Victa C, McDonald P, Fahrner R. 2007. Fragments of protein A eluted during protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A* 1163(1-2):105-111.
- Cavacini LA, Kuhrt D, Duval M, Mayer K, Posner MR. 2003. Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19(9):785-792.
- CenterWatch. 24.08.2012. FDA Approved Drugs. <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approvals/>.
- Chang TW, Wu PC, Hsu CL, Hung AF. 2007. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. *Adv Immunol* 93:63-119.
- Chayen NE. 1998. Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 1):8-15.
- Chayen NE. 2004. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Curr Opin Struct Biol* 14(5):577-583.
- Chernov AA. 2003. Protein crystals and their growth. *J Struct Biol* 142(1):3-21.
- Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G. 2011. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *N Biotechnol* 28(5):458-463.
- Christopher GK, Phipps AG, Gray RJ. 1998. Temperature-dependent solubility of selected proteins. *J Cryst Growth* 191(4):820-826.
- Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. 2007. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release* 119(1):5-24.



- Crisman RL, Randolph TW. 2010. Crystallization of recombinant human growth hormone at elevated pressures: pressure effects on PEG-induced volume exclusion interactions. *Biotechnol Bioeng* 107(4):663-672.
- De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* 309:217-236.
- Drenth J, Haas C. 1992. Protein Crystals and Their Stability. *J Cryst Growth* 122(1-4):107-109.
- Elkordy AA, Forbes RT, Barry BW. 2002. Integrity of crystalline lysozyme exceeds that of a spray-dried form. *Int J Pharm* 247(1-2):79-90.
- Elkordy AA, Forbes RT, Barry BW. 2004. Stability of crystallised and spray-dried lysozyme. *Int J Pharm* 278(2):209-219.
- Erdemir D, Lee AY, Myerson AS. 2009. Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. *Acc Chem Res* 42(5):621-629.
- Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, Blank GS. 2001. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev* 18:301-327.
- FDA. 1998. Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin - <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073454.pdf>.
- FDA. 2003. Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products - <http://www.fda.gov/downloads/regulatoryinformation/guidances/ucm128204.pdf>.
- Feher G, Kam Z. 1985. Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. *Methods Enzymol* 114:77-112.
- Fischer H, Polikarpov I, Craievich AF. 2004. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci* 13(10):2825-2828.
- Franks F. 1995. Protein destabilization at low temperatures. *Adv Protein Chem* 46:105-139.
- Frokjaer S, Otzen DE. 2005. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 4(4):298-306.
- Funakoshi K, Takiyama H, Matsuoka M. 1999. Purity of m-Chloronitrobenzene Agglomerates from Batch Seeded Suspension Crystallization. *J Chem Eng Jpn* 32(4):527-529.

- Funakoshi K, Takiyama H, Matsuoka M. 2000. Agglomeration Kinetics and Product Purity of Sodium Chloride Crystals in Batch Crystallization. *J Chem Eng Jpn* 33(2):267-272.
- Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S. 2006. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J Liposome Res* 16(3):175-183.
- Garcia-Ruiz JM. 2003. Nucleation of protein crystals. *J Struct Biol* 142(1):22-31.
- García-Ruiz JM, Otálora Fn, Novella ML, Gavira JA, Sauter C, Vidal O. 2001. A supersaturation wave of protein crystallization. *J Cryst Growth* 232(1-4):149-155.
- Geisberger R, Lamers M, Achatz G. 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 118(4):429-437.
- Genck WJ. 2003. Optimizing crystallizer scaleup. *Chem Eng Prog* 99(6):36-44.
- Ghose S, Hubbard B, Cramer SM. 2007. Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials. *Biotechnol Bioeng* 96(4):768-779.
- Giffard M, Ferte N, Ragot F, El Hajji M, Castro B, Bonnete F. 2011. Urate oxidase purification by salting-in crystallization: towards an alternative to chromatography. *PLoS One* 6(5):e19013.
- Golovanov AP, Hautbergue GM, Wilson SA, Lian LY. 2004. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J Am Chem Soc* 126(29):8933-8939.
- Gottschalk U. 2008. Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. *Biotechnol Prog* 24(3):496-503.
- Grant ML, Saville DA. 1995. Long-term studies on tetragonal lysozyme crystals grown in quiescent and forced convection environments. *J Cryst Growth* 153(1-2):42-54.
- Halban PA, Mutkoski R, Dodson G, Orci L. 1987. Resistance of the insulin crystal to lysosomal proteases: implications for pancreatic B-cell crinophagy. *Diabetologia* 30(5):348-353.
- Hallas-Moller K, Petersen K, Schlichtkrull J. 1952. Crystalline and amorphous insulin-zinc compounds with prolonged action. *Science* 116(3015):394-398.
- Hampton Research. 2001. Crystal Growth 101 - Crystal Growth Techniques. [http://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/2.pdf](http://hamptonresearch.com/documents/growth_101/2.pdf).
- Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9(4):325-338.

- Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. 1995. Crystallization of intact monoclonal antibodies. *Proteins* 23(2):285-289.
- Harrison RG, Todd P, Rudge SR, Petrides DP. 2003. *Bioseparations science and engineering*. New York: Oxford Univ. Press. 406 p.
- Haynes SR, Jelinek WR. 1981. Low molecular weight RNAs transcribed in vitro by RNA polymerase III from Alu-type dispersed repeats in Chinese hamster DNA are also found in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10):6130-6134.
- Hekmat D, Hebel D, Schmid H, Weuster-Botz D. 2007. Crystallization of lysozyme: From vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. *Process Biochem* 42(12):1649-1654.
- Henzler HJ. 2000. Particle stress in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 67:35-82.
- Henzler HJ, Biedermann A. 1996. Model studies on particle stress in reactors. *Chem Ing Tech* 68(12):1546-1561.
- Hoffmann J, Tralles S, Hempel DC. 1992. Testsystem zur Untersuchung der mechanischen Beanspruchung von Partikeln in Bioreaktoren. *Chem Ing Tech* 64(10):953-956.
- Hortsch R, Weuster-Botz D. 2010. Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnol Prog* 26(2):595-599.
- Hudson PJ, Souriau C. 2003. Engineered antibodies. *Nat Med* 9(1):129-134.
- Ireland T, Lutz H, Siwak M, Bolton G. 2004. Viral Filtration of Plasma-Derived Human IgG: A Case Study using Viresolve NFP. *Biopharm Int* 11:38-43.
- Jacobsen C, Garside J, Hoare M. 1998. Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. *Biotechnol Bioeng* 57(6):666-675.
- Janeway CA, Beutner L, Rajewsky K. 2002. *Immunologie*. Heidelberg [u.a.]: Spektrum. XXVI, 777 S. p.
- Jion AI, Goh L-T, Oh SKW. 2006. Crystallization of IgG1 by mapping its liquid-liquid phase separation curves. *Biotechnol Bioeng* 95(5):911-918.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321(6069):522-525.
- Judge RA, Johns MR, White ET. 1995. Protein purification by bulk crystallization: the recovery of ovalbumin. *Biotechnol Bioeng* 48(4):316-323.

- Kaiser SC, Löffelholz C, Werner Sr, Eibl D. 2011. CFD for Characterizing Standard and Single-use Stirred Cell Culture Bioreactors. In: Minin IV, Minin OV, editors. Computational Fluid Dynamics Technologies and Applications: InTech.
- Kantha SS. 1991. A centennial review; the 1890 tetanus antitoxin paper of von Behring and Kitasato and the related developments. *Keio J Med* 40(1):35-39.
- Kayser V, Chennamsetty N, Voynov V, Forrer K, Helk B, Trout BL. 2011. Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol J* 6(1):38-44.
- Kern G, Krishnan M. 2006. Virus Removal by Filtration: Points to Consider. *Biopharm Int* 19(10).
- Kerwin BA, Heller MC, Levin SH, Randolph TW. 1998. Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 degrees C of a recombinant hemoglobin. *J Pharm Sci* 87(9):1062-1068.
- Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15(1):42-52.
- Knudsen HL, Fahrner RL, Xu Y, Norling LA, Blank GS. 2001. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *J Chromatogr A* 907(1-2):145-154.
- Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495-497.
- Kuczewski M, Fraud N, Faber R, Zarbis-Papastoitsis G. 2010. Development of a polishing step using a hydrophobic interaction membrane adsorber with a PER.C6-derived recombinant antibody. *Biotechnol Bioeng* 105(2):296-305.
- Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen UD, Ribøl U, Markussen J. 1995. Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. *Biochem J* 312 ( Pt 3):725-731.
- Lallana E, Sousa-Herves A, Fernandez-Trillo F, Rigüera R, Fernandez-Megia E. 2012. Click chemistry for drug delivery nanosystems. *Pharm Res* 29(1):1-34.
- Lee TS, Vaghjiani JD, Lye GJ, Turner MK. 2000. A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. *Enzyme Microb Technol* 26(8):582-592.

- Liepe F, Platzer B, Weiß S, Berghoff W. 1988. Stoffvereinigen in fluiden Phasen : Ausrüstungen und ihre Berechnung. Leipzig: Dt. Verl. für Grundstoffindustrie. 232 S p.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* 46(3):258-268.
- Littke W, John C. 1984. Protein single crystal growth under microgravity. *Science* 225(4658):203-204.
- Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. 2010. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs* 2(5):480-499.
- Lo BKC. 2005. Protein Therapeutics: Mouse, Humanized, and Human Antibodies. In: Walker JM, Rapley R, editors. *Medical Biomedical Handbook*: Humana Press. p 429-446.
- Lottspeich F, Engels JW. 2006. *Bioanalytik*. München: Spektrum Akad. Verl. XXIV, 1119 S. p.
- Low D, O'Leary R, Pujar NS. 2007. Future of antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848(1):48-63.
- Lu Z, Cheng B, Hu Y, Zhang Y, Zou G. 2009. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chem* 113(1):17-20.
- Mage MG. 1980. Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. *Methods Enzymol* 70(A):142-150.
- Margolin AL, Navia MA. 2001. Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Angew Chem Int Ed Engl* 40(12):2204-2222.
- Markussen J, Havelund S, Kurtzhals P, Andersen AS, Halstrom J, Hasselager E, Larsen UD, Ribel U, Schaffer L, Vad K and others. 1996. Soluble, fatty acid acylated insulins bind to albumin and show protracted action in pigs. *Diabetologia* 39(3):281-288.
- McDonald P, Victa C, Carter-Franklin JN, Fahrner R. 2009. Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: a novel approach to the purification of monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng* 102(4):1141-1151.
- McPherson A. 2004. Introduction to protein crystallization. *Methods* 34(3):254-265.
- Medical Tube Technology 03.09.2012. Hypodermic Needle Gauge Chart. [http://www.medtube.com/hypo\\_chrt.htm](http://www.medtube.com/hypo_chrt.htm).
- Merkle HP, Jen A. 2002. A crystal clear solution for insulin delivery. *Nat Biotechnol* 20(8):789-790.

- Meulenbroek A, Zeijlemaker W. 1996. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. Amsterdam, Netherlands: Sanquin. 56 p.
- Miller MA, Engstrom JD, Ludher BS, Johnston KP. 2010. Low viscosity highly concentrated injectable nonaqueous suspensions of lysozyme microparticles. *Langmuir* 26(2):1067-1074.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 385(1-2):113-142.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(21):6851-6855.
- Nascimento C, Leandro J, Lino PR, Ramos L, Almeida AJ, de Almeida IT, Leandro P. 2010. Polyol additives modulate the in vitro stability and activity of recombinant human phenylalanine hydroxylase. *Appl Biochem Biotechnol* 162(1):192-207.
- Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH. 1985. A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 314(6008):268-270.
- Nienow A. 1976. The effect of agitation and scale-up on crystal growth rates and on secondary nucleation. *Trans Inst Chem Eng* 54:205-207.
- Nienow AW. 1968. Suspension of solid particles in turbine agitated baffled vessels. *Chem Eng Sci* 23(12):1453-1459.
- Nobelprize.org. 25.08.2012. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1984/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/).
- Oldham RK, Dillman RO. 2008. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: 25 Years of Progress. *J Clin Oncol* 26(11):1774-1777.
- Pace CN, Grimsley GR, Scholtz JM. 2009. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J Biol Chem* 284(20):13285-13289.
- Parambil JV, Schaepertoens M, Williams DR, Heng JYY. 2011. Effects of Oscillatory Flow on the Nucleation and Crystallization of Insulin. *Cryst Growth Des* 11(10):4353-4359.
- Paul-Ehrlich-Institut. 25.08.2012. PEI Liste zugelassener monoklonaler Antikörper. [http://www.pei.de/cln\\_236/nn\\_158990/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/cln_236/nn_158990/DE/arzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html?__nnn=true).

- Pechenov S, Shenoy B, Yang MX, Basu SK, Margolin AL. 2004. Injectable controlled release formulations incorporating protein crystals. *J Control Release* 96(1):149-158.
- Peter CP, Suzuki Y, Buchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng* 93(6):1164-1176.
- Peters J, Minuth T, Schroder W. 2005. Implementation of a crystallization step into the purification process of a recombinant protein. *Protein Expr Purif* 39(1):43-53.
- Pfutzner A, Reimer T, Hohberg C, Frokjaer LP, Jorgensen C. 2008. Prefilled insulin device with reduced injection force: patient perception and accuracy. *Curr Med Res Opin* 24(9):2545-2549.
- Price CJ. 1997. Take some solid steps to improve crystallization. *Chem Eng Prog* 93(9):34-43.
- Przybycien TM. 1998. Protein-protein interactions as a means of purification. *Curr Opin Biotechnol* 9(2):164-170.
- Rathore AS, Green K, Hashimura Y, Nyberg G. 2008. Modeling of Biopharmaceutical Processes—Part 1: Microbial and Mammalian Unit Operations. *Biopharm Int* 21(6):56-65.
- Rey G, Wendeler MW. 2012. Full automation and validation of a flexible ELISA platform for host cell protein and protein A impurity detection in biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* DOI 10.1016/j.jpba.2012.05.027.
- Richards JP, Stickelmeyer MP, Frank BH, Pye S, Barbeau M, Radziuk J, Smith GD, DeFelippis MR. 1999. Preparation of a microcrystalline suspension formulation of Lys(B28)Pro(B29)-human insulin with ultralente properties. *J Pharm Sci* 88(9):861-867.
- Roque AC, Lowe CR, Taipa MA. 2004. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol Prog* 20(3):639-654.
- Rosa PA, Azevedo AM, Sommerfeld S, Mutter A, Aires-Barros MR, Backer W. 2009. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach. *J Biotechnol* 139(4):306-313.
- Rosenberger F, Howard SB, Sowers JW, Nyce TA. 1993. Temperature dependence of protein solubility — determination and application to crystallization in X-ray capillaries. *J Cryst Growth* 129(1–2):1-12.

- Rousseaux JM, Muhr H, Plasari E. 2001. Mixing and micromixing times in the forced vortex region of unbaffled mixing devices. *Can J Chem Eng* 79(5):697-707.
- Sangwal K. 1993. Effect of impurities on the processes of crystal growth. *J Cryst Growth* 128(1-4, Part 2):1236-1244.
- Schmidt S, Havekost D, Kaiser K, Kauling J, Henzler HJ. 2004. Kristallisation für die Aufarbeitung von Proteinen. *Chem Ing Tech* 76(6):819-822.
- Schmidt S, Havekost D, Kaiser K, Kauling J, Henzler HK. 2005. Crystallization for the downstream processing of proteins. *Eng Life Sci* 5(3):273-276.
- Schroeder HW, Jr., Cavacini L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2):S41-S52.
- Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC. 1985. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. *Cancer Research* 45(2):879-885.
- Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. 1985. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol* 135(2):1530-1535.
- Shenoy B, Wang Y, Shan W, Margolin AL. 2001. Stability of crystalline proteins. *Biotechnol Bioeng* 73(5):358-369.
- Shire SJ. 2009. Formulation and manufacturability of biologics. *Curr Opin Biotechnol* 20(6):708-714.
- Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. 2004. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J Pharm Sci* 93(6):1390-1402.
- Shukla AA. 2007. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. Boca Raton, Fla. [u.a.]: Taylor & Francis. 575 S. p.
- Shukla AA, Etzel MR, Gadam S, ebrary Inc. 2007a. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry. *Biotechnology and bioprocessing series* 31. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
- Shukla AA, Hinckley PJ, Gupta P, Yigzaw Y, Hubbard B. 2005. Strategies To Address Aggregation During Protein A Chromatography. *BioProcess Int* 3(5):36-44.
- Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. 2007b. Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848(1):28-39.
- Shukla AA, Thömmes J. 2010. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol* 28(5):253-261.



- Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. 2012. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology* 22(1):3-13.
- Sofer G. 2003. Virus inactivation in the 1990s - and into the 21st century - Part 4, culture media, biotechnology products, and vaccines. *Biopharm Int* 16(1):50-57.
- St Clair N, Shenoy B, Jacob LD, Margolin AL. 1999. Cross-linked protein crystals for vaccine delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17):9469-9474.
- Statistisches Bundesamt. Lebenserwartung in Deutschland. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Sterbefaelle/Tabellen/LebenserwartungDeutschland.html>.
- Stieß M. 2009. *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*. Springer-Lehrbuch. 3., vollst. neu bearb. Aufl. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stockwin LH, Holmes S. 2003. Antibodies as therapeutic agents: vive la renaissance! *Expert Opin Biol Ther* 3(7):1133-1152.
- Stura EA, Satterthwait AC, Calvo JC, Stefanko RS, Langeveld JP, Kaslow DC. 1994. Crystallization of an intact monoclonal antibody (4B7) against *Plasmodium falciparum* malaria with peptides from the Pfs25 protein antigen. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4):556-562.
- Tait S, White ET, Litster JD. 2009. A Study on Nucleation for Protein Crystallization in Mixed Vessels. *Cryst Growth Des* 9(5):2198-2206.
- Tashiro M, Montelione GT. 1995. Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins. *Curr Opin Struct Biol* 5(4):471-481.
- Timasheff SN. 2002. Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* 41(46):13473-13482.
- van Reis R, Goodrich EM, Yson CL, Frautschy LN, Dzengeleski S, Lutz H. 1997. Linear scale ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng* 55(5):737-746.
- Vanneman M, Dranoff G. 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 12(4):237-251.
- Venkat RV, Chalmers JJ. 1996. Characterization of agitation environments in 250 ml spinner vessel, 3 L, and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. *Cytotechnology* 22(1-3):95-102.
- Veronese FM, Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10(21):1451-1458.
- Voit H, Mersmann A. 1985. Allgemeingültige Aussage zur Mindest-Rührerdrehzahl beim Suspendieren. *Chem Ing Tech* 57(8):692-693.

- Wang JM, Diehl T, Aguiar D, Dai X-P, Arunakumari A. 2009. Precipitation of Process-Derived Impurities in Non-Protein A Purification Schemes for Antibodies. *Biopharm Int* 22.
- Wang W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 203(1-2):1-60.
- Wang W. 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* 289(1-2):1-30.
- Weber M, Jones MJ, Ulrich J. 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization. *Food Bioprod Process* 86(1):43-52.
- Weuster-Botz D, Hekmat D, Puskeiler R, Franco-Lara E. 2007. Enabling technologies: fermentation and downstream processing. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 105:205-247.
- Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M. 2005. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng* 28(2):109-119.
- Wilde DD, Noack U, Kahlert W, Barbaroux M, Greller G. 2009. Bridging the gap from reusable to single-use manufacturing with stirred, single-use bioreactors. *BioProcess Int* 7(4):S36-S41.
- Woof JM, Mestecky J. 2005. Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 206:64-82.
- Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22(11):1393-1398.
- Yang MX, Shenoy B, Disttler M, Patel R, McGrath M, Pechenov S, Margolin AL. 2003. Crystalline monoclonal antibodies for subcutaneous delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12):6934-6939.
- Yaoi M, Adachi M, Takano K, Matsumura H, Inoue T, Mori Y, Sasaki T. 2004. Effect of stirring method on protein crystallization. *Jpn J Appl Phys* 43(10A):L1318-L1319.
- Zang Y, Kammerer B, Eisenkolb M, Lohr K, Kiefer H. 2011. Towards protein crystallization as a process step in downstream processing of therapeutic antibodies: screening and optimization at microbatch scale. *PLoS One* 6(9):e25282.
- Zlokarnik M. 1967. Eignung von Rührern zum Homogenisieren von Flüssigkeitsgemischen. *Chem Ing Tech* 39(9-10):539-548.
- Zwietering TN. 1958. Suspending of solid particles in liquid by agitators. *Chem Eng Sci* 8(3-4):244-253.

## Abkürzungsverzeichnis

<i>a</i>	Länge a der Einheitszelle, $112,9 \text{ \AA} = 1,129 \cdot 10^{-7} \text{ dm}$
<i>A</i>	Oberfläche des Kristalls, $\text{m}^2$
<i>AEC</i>	Anionen-Austausch-Chromatografie
<i>A<sub>λ</sub></i>	Absorption bei der Wellenlänge $\lambda$
<i>B</i>	geometrische Konstante, -
<i>b</i>	Länge b der Einheitszelle, $239,0 \text{ \AA} = 2,390 \cdot 10^{-7} \text{ dm}$
<i>c</i>	Konzentration
<i>CD</i>	Dissipationsbeiwert, -
<i>CDR</i>	engl. <i>Complementarity Determining Region</i>
<i>CEC</i>	Kationen-Austausch-Chromatografie
<i>CH1</i>	Erste konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
<i>CH2</i>	Zweite konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
<i>CH3</i>	Dritte konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
<i>CHO-Zellen</i>	Engl. <i>Chinese hamster ovary cells</i>
<i>CL</i>	Konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
<i>D</i>	Behälterinnendurchmesser, m
<i>d</i>	Rührerdurchmesser, m
<i>D50v</i>	mittlerer Volumendurchmesser, $\mu\text{m}$
<i>dp</i>	Partikeldurchmesser, m
<i>Fab</i>	Antigenbindendes Fragment
<i>Fc</i>	Kristallisierbares Fragment
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, $9,80665 \text{ m s}^{-2}$
<i>G</i>	Kanülengröße in Gauge
<i>H</i>	Füllhöhe, m
<i>h</i>	projizierte Rührerblatthöhe, m
<i>HCP</i>	Verunreinigung durch Proteine aus der Zellkultur, engl. <i>host cell protein</i>

<i>HIC</i>	Hydrophobe-Interaktions-Chromatografie
<i>i</i>	Konstante
<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>J</i>	Keimbildungsrate, s <sup>-1</sup>
<i>k</i>	Boltzmann-Konstante, 1,3806488 J K <sup>-1</sup>
<i>K<sub>D</sub></i>	Dissoziationskonstante, M <sup>-1</sup>
<i>M</i>	Drehmoment, N m
<i>mAb</i>	monoklonaler Antikörper
<i>M<sub>IgG1</sub></i>	Molekülmasse eines IgG1-Antikörper, 146·10 <sup>3</sup> g mol <sup>-1</sup>
<i>m</i>	Masse, g
<i>N</i>	Anzahl an Molekülen im Kristall, -
<i>n</i>	Rührerdrehzahl, min <sup>-1</sup>
<i>N<sub>A</sub></i>	Avogadrokonstante, 6,02214129·10 <sup>23</sup> mol <sup>-1</sup>
<i>Ne</i>	Newton-Zahl, -
<i>n<sub>min</sub></i>	Minimale Rührerdrehzahl um Kristalle in Suspension zu halten, s <sup>-1</sup>
<i>P</i>	Leistung, W
<i>PEG</i>	Polyethylenglykol
<i>pI</i>	Isoelektrischer Punkt
<i>r</i>	Exponent
<i>R<sup>2</sup></i>	Bestimmtheitsmaß, -
<i>Re</i>	Reynolds-Zahl, -
<i>S</i>	Übersättigung, -
<i>T</i>	Temperatur, K
<i>u</i>	Rührerumfangsgeschwindigkeit, m s <sup>-1</sup>
<i>UF/DF</i>	Ultrafiltration / Diafiltration
<i>V<sub>H</sub></i>	Variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
<i>V<sub>L</sub></i>	Variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers

---

$V$	Volumen, L
$X$	Suspensionsdichte, $\text{kg kg}^{-1}$
$z$	Anzahl an Rührerblätter, -
$Z_{\text{Einheitszelle}}$	Anzahl der IgG1-Moleküle in der Einheitszelle, 4
$z_I$	Anzahl der Rührer auf einer Rührwelle, -
$\alpha$	Anstellwinkel der Rührerblätter, °
$\gamma$	spezifische Oberflächenenergie, $\text{J m}^{-2}$
$\Delta G$	Gibbssche freie Energie der Kristallisation, J
$\Delta G_A$	Oberflächenenergie, J
$\Delta G_V$	Volumenenergie, J
$\bar{\epsilon}$	mittlerer Leistungseintrag, $\text{W L}^{-1}$
$\epsilon_{\text{max}}$	maximale lokale Energiedissipation, $\text{W kg}^{-1}$
$\epsilon_\lambda$	spezifischer Absorptionskoeffizient
$\eta$	dynamische Viskosität, $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
$\lambda$	Wellenlänge, nm
$\mu_\alpha$	chemisches Potential eines Moleküls in Lösung, J
$\mu_\beta$	chemisches Potential eines Moleküls im Kristall, J
$\nu$	kinematische Viskosität, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$\rho$	Dichte, $\text{kg m}^{-3}$
$\rho_L$	Dichte der flüssigen Phase, $\text{kg m}^{-3}$
$\rho_S$	Dichte der festen Phase, $\text{kg m}^{-3}$

# Anhang

## A Chemikalien und Proteine

**Tabelle A.1:** Verwendete Chemikalien und Proteine

<b>Name</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Ammoniumsulfat	3746.3	Carl Roth
Canakinumab	-	Novartis Pharma
Dikaliumhydrogenphosphat	P749.2	Carl Roth
EDTA	80401	Carl Roth
Essigsäure	3738.1	Carl Roth
Ethanol	P076.1	Carl Roth
Glycerol	3783.1	Carl Roth
Guanidin-hydrochlorid	0037.2	Carl Roth
Immobilisiertes Papain	20341	Thermo Scientific
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.1	Carl Roth
L-Cystein-hydrochlorid	44889	Thermo Scientific
L-Histidin	3852.3	Carl Roth
Lissamingrün	199583	Sigma-Aldrich
Lysozym aus Hühnereiweiß	62971	Sigma-Aldrich
mAb01	-	Novartis Pharma
NaOH	6771.1	Carl Roth
Natriumacetat	6779.1	Carl Roth
Natriumazid	30175	Serva
Natriumchlorid	P029.3	Carl Roth
Natriumcitrat	3580.1	Carl Roth
Natriumhydroxid	6771.1	Carl Roth

---

Natriummalonat	M1875	Sigma-Aldrich
Natriumphosphat	71504	Sigma-Aldrich
ortho-Phosphorsäure	6366.1	Carl Roth
Paraffinöl	9190.1	Carl Roth
PEG 10000	6V40908	Clariant Produkte
PEG 3000	81227	Sigma-Aldrich
PEG 4000	95904	Sigma-Aldrich
PEG MME 5000	6V40639	Clariant Produkte
Salzsäure	4625.1	Carl Roth
Silikonfett (Bayer Silicone Grease)	CGR-101	Jena Bioscience
Silikonöl (Baysilone Öl PK 20)	3004-01	Kurt Obermeier
Sudan IV	327.1	Carl Roth
Trehalose-Dihydrat	970084	Novartis Pharma Stein
TRIS	154563	Sigma-Aldrich
Triton X 100	3051.3	Carl Roth

---

## B Verbrauchsmaterial

**Tabelle B.1:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Anionentauscher (Fractogel EMD TMAE (M))	116881	Merck
Dialyseschlauch (Visking)	1784.1	Carl Roth
Feindosierungsspritze (Omnifix-F)	9161406V	B. Braun Melsungen
Hängetropfenplatte (Crystalgen SuperClear)	CPL-130	Jena Bioscience
Injektionsnadel (Sterican 25 G)	4657853	B. Braun Melsungen
Injektionsnadel (Sterican 26 G)	4665457	B. Braun Melsungen
Injektionsnadel (Sterican 27 G)	4665406	B. Braun Melsungen
Injektionsnadel (Sterican 30 G)	4656300	B. Braun Melsungen
Membranfilter (0,22 µm)	A009.1	Carl Roth
Membrankassette (Sartocon Slice 200, 10 kDa)	3081463902E--SG	Sartorius
Membrankassette (Sartocon Slice 200, 30 kDa)	3051445902E--SW	Sartorius
Mikrosatzplatte (Terasaki)	654102	Greiner Bio-One
Nanofilter (Planova 20N)	20NZ-001	Asahi Kasei Medical
Objektträger	0656.1	Carl Roth
Petrischale (ø 55 mm)	N223.2	Carl Roth
Pipettenspitzen (Plastibrand)		Brand
Protein A-Säule (Bio-Scale Mini UNOsphere SUPrA)	732-4202	Bio-Rad Laboratories
Reaktionsgefäß 1,5 mL	10029065	Zefa Laborservice
Reaktionsgefäß 15 mL	188271	Greiner Bio-One



---

Reaktionsgefäß 2 mL	623201	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäß 50 mL	227261	Greiner Bio-One
Silikonisierte Deckgläser (22 mm)	CSL-106	Jena Bioscience
Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra-15, 10 kDa)	UFC901008	Millipore
Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra-15, 3 kDa)	UFC900308	Millipore
Zentrifugensäule (Pierce 10 mL)	89898	Thermo Scientific

---

## C Geräte

**Tabelle C.1:**      Verwendete Geräte

<b>Name</b>	<b>Artikelnummer / Typ</b>	<b>Hersteller</b>
10-fach Objektiv CFI PLANFLUOR 10X	MRH00101	Nikon
10-fach Objektiv Plan- Neofluor 10x/0.30	Plan-Neofluor 10x/0.30	Carl-Zeiss
2,5-fach Objektiv Plan- Neofluor 2,5x/0.075	Plan-Neofluor 2,5x/0.075	Carl-Zeiss
3/2 Wegeventil	LQX12-3W12FF48-000	Parker Hannifin
4-fach Objektiv CFI PLANACHROMAT 4X	MRL00042	Nikon
6-Port-3-Kanal-Ventil	A1370	Knauer
Datenerfassungsmodul (NI USB-6008)	779051-01	National Instruments
Degaser	Degas	Shodex
Drehmomentsensor	DRFL-I-0,05-A	ETH-messtechnik
Dreiblättriger Segmentimpeller (Liter- Reaktor)	Z81314RC07	IUL Instruments
Durchfluss-Küvette 170-QS	170-700-QS	Hellma Analytics
Durchfluss-Küvette 178.010- QS	178-010-10-40	Hellma Analytics
Glasgefäß (100 mL-Reaktor)	216013605	Gebr. Rettberg
Glasgefäß (6 mL-Reaktor)	216011407	Gebr. Rettberg
Glasgefäß (Liter-Reaktor)	107036314	Gebr. Rettberg
Kältethermostat (1157P)	462-7024	VWR International
Kamera (AxioCam ICc 3)	426551-9901-000	Carl-Zeiss

---

Kamera (DS-2Mv)	MQA12000	Nikon
Kamera EOS 10D	8363A014AA	Canon
Kapazitiver Füllstandssensor	KQ6004	ifm electronic
Kraftaufnehmer (X-Force P 0,5 kN)	057993	Zwick Roell
Kühlinkubator (KB 115)	KB 115	Binder
Kühlinkubator (KB 53)	KB 53	Binder
Kühlzentrifuge 5415 R	5426000018	Eppendorf
Membran-Dosierpumpe Stepdos 03 (PP)	FEM 03 KT.18RC	KNF Neuberger
Membran-Dosierpumpe Stepdos 03 (PTFE)	FEM 03 FT.18RC	KNF Neuberger
Mikroskop Nikon Eclipse 50 i	MBA85020	Nikon
Mikroskop Zeiss Axioplan	Axioplan	Carl-Zeiss
Peristaltikpumpe Reglo Digital	ISM596D	Ismatec
Peristaltikpumpe Reglo Quick	ISM897A	Ismatec
pH-/Leitfähigkeitsmessgerät	S47-K	Mettler-Toledo
Photometer (GENESYS 10S UV-Vis)	10148006	Thermo Scientific
Pipetten (TransferpetteS)		Brand
Prüfmaschine (zwicki-Line Z2.5 TN)	058203	Zwick Roell
Pumpe (S1110 Solvent Delivery System)	S1110	Sykam
Quarzküvette 104-QS	104-10-40	Hellma Analytics
Queerstromfiltrationseinheit Start AXM (CFP-2-E-2U)	11-0005-52	GE Healthcare

---

---

Rührerachse (Liter-Reaktor)	Z81314RC07	IUL Instruments
Schrittmotor (100 mL-Reaktor)	ST2818L1006	Nanotec Electronic
Schrittmotor (6 mL-Reaktor)	ST2018S0604	Nanotec Electronic
Schrittmotor (Liter-Reaktor)	AS4118L1804	Nanotec Electronic
Spannungsverteilungsgerät	NETIO-230A	Koukaam
Standzentrifuge (Rotixa 50RS)	4910	Hettich
Superdex 200 10/300 GL	17-5175-01	GE Healthcare
Wasserstrahlpumpe	7366.1	Carl Roth

---

## D Software

**Tabelle D.1:** Verwendete Software

<b>Name</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
AxioVision LE	4.2.8.0	Carl Zeiss Microscopy
CrystalControl	1.0.3944.22143	Dirk Hebel
dhGenesysLoggerMitVentil	1.0.4136.23996	Dirk Hebel
Excel	14	Microsoft
GIMP	2.8.0	GIMP Project
Inkscape	0.48	Inkscape Project
LabVIEW	9	National Instruments
NIS Elements	3.22	Nikon
SigmaPlot	12.3	Systat Software
testXpert	12.3	Zwick Roell