

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

# Untersuchungen zur Stabilisierung und Interaktion von Cetuximab mit nicht-ionischen Tensiden

Katharina Melanie Ziegler  
aus Offenbach a. M.

2013

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Frieß betreut.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 05.11.2013

---

(Katharina Ziegler)

Dissertation eingereicht am 05.11.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Frieß

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Winter

Mündliche Prüfung am 17.12.2013

MEINEM VATER

Curiosity is the essence of the scientific mind.

*Bill Watterson, Calvin and Hobbes*



---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Frieß am Department für Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität in München in Kooperation mit der Abteilung CMC-Development / BPD der Firma Merck Serono, Darmstadt, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Frieß möchte ich vor allem für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, seine fachliche Unterstützung, konstruktive Diskussionen sowie für seine Geduld und Motivation danken. Ich habe während der Arbeit sehr viel - sowohl fachlich als auch persönlich - gelernt.

Bei Herrn Prof. Dr. Winter bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit zur Promotion bei Merck Serono bedanken. Mein Dank gilt vor allem meinem Betreuer Dr. Daniel Schwartz, sowie Dr. Robert Schnepf für die Unterstützung während der Promotion.

Meinen Kollegen aus BPD während meiner Promotionszeit möchte ich ganz besonders danken für fachlichen Rat, gemeinsame Unternehmungen und die gute Zusammenarbeit im Labor. Ganz besonders sind hier Matthias Winzer, Tim Hoffmann, Cora Ebinger, Stefanie Herold zu nennen, mit denen der Laboralltag sehr viel Spaß gemacht hat.

Natürlich möchte ich mich bei Annette Eppler, Marc Hugo, Simon Geissler, Thomas Lange, Stefan Hindel, Cornelia Zumpe und Maria-Leonor Alvarenga für die tolle gemeinsame Doktorandenzeit bedanken. Ich erinnere mich gerne an unsere Zeit im gemeinsamen Büro, diverse Diskussionen, Bastelstunden und berufliche wie private Unternehmungen. Vor allem freue ich mich, daß einige gute Freundschaften daraus entstanden sind.

Meinen Pharmaziepraktikanten Annika Beinlich, Katharina Stank und Kerstin Höger möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei praktischen Arbeiten für meine Dissertation danken.

---

Herrn Dr. Ansgar Wegener und Herrn Dr. Jörg Bomke aus der Abteilung MInteractions Biophysics möchte ich mich sehr für die Einführung und Zurverfügungstellung von BIACORE<sup>®</sup> und ITC danken. Ihr fachlicher Rat und ihre motivierende Art machte die Arbeit in ihrem Labor außerordentlich interessant. Bei der Abteilung MedChem möchte ich mich bei Herrn Dr. Dieter Dorsch, sowie dem Labor von Herrn Dr. Jonczyk bedanken, die mich bei der Synthese von GlyPS80 fachlich unterstützten, sowie mir die Mittel zur Verfügung stellten. Weiterhin danke ich Herrn Dr. C. Saal und Herrn R. Waide aus der Abteilung ZDA für die Erlaubnis zur Nutzung des FTIR-Spektrometers und die Einführung in dessen Bedienung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meinen Freunden und Kollegen, die mich in der Zeit meiner Promotion tatkräftig unterstützt haben. Vor allem gilt mein Dank Matthias und Ina Neudörfl und meinem Vater fürs Korrekturlesen und allen anderen für ihren Rat, ihren Beistand, Süßigkeiten, Kaffee und alles andere was mich in dieser Zeit über Wasser gehalten hat. Meinem Freund Christian Fenzl möchte ich ganz besonders für die Hilfe beim Kampf mit der Formatierung danken, zum anderen für seine Geduld, seine Motivation in den Tiefs und einfach dafür, dass es ihn an meiner Seite gibt.

Ganz besonders gebührt mein Dank natürlich meiner Familie, meinem Vater Johannes und meiner Schwester Anna Ziegler, dafür dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauche und für alle Unterstützung die sie mir nicht nur während meiner Promotionszeit gegeben haben und immer geben werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Definition und Eigenschaften von Tensiden . . . . .	1
1.2	Pharmazeutischer Einsatz von Tensiden in parenteralen Formulierungen . . . . .	2
1.3	Stabilisierung von parenteralen Proteinformulierungen durch Tenside	6
1.3.1	Konkurrenz zwischen Proteinen und Tensiden um Grenzflächen . . . . .	7
1.3.2	Direkte Tensid - Protein Interaktionen . . . . .	10
1.4	Tenside als Stabilisatoren in hochkonzentrierten Antikörperformulierungen . . . . .	12
1.5	Destabilisierung von Proteinen durch Tenside . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Material . . . . .	19
3.1.1	Material, Hilfsstoffe, Reagenzien . . . . .	19
3.1.2	Modellproteine . . . . .	22
3.1.2.1	Cetuximab - Erbitux® . . . . .	22
3.1.2.2	Bovines Serum Albumin (BSA) . . . . .	23
3.2	Methoden . . . . .	24
3.2.1	Probenherstellung . . . . .	24
3.2.1.1	Tangentialflussfiltration . . . . .	24
3.2.1.2	ÄKTAcrossflow™ . . . . .	25
3.2.1.3	Probenherstellung und Probenabfüllung . . . . .	25
3.2.1.4	Lyophilisation . . . . .	26
3.2.1.5	Funktionalisierung von Polysorbat 80 . . . . .	27
3.2.2	Stressmethoden . . . . .	27

3.2.2.1	Schüttelstress . . . . .	27
3.2.2.2	Temperaturstress . . . . .	28
3.2.2.3	UV-Stress . . . . .	28
3.2.3	Analytische Methoden . . . . .	28
3.2.3.1	Größenausschlusschromatografie (SEC) . . . . .	28
3.2.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes . . . . .	29
3.2.3.3	Lichtblockademessungen . . . . .	29
3.2.3.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS) . . . . .	29
3.2.3.5	Visuelle Kontrolle . . . . .	30
3.2.3.6	Trübungsmessung . . . . .	30
3.2.3.7	SDS-PAGE . . . . .	30
3.2.3.8	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) . . . . .	31
3.2.3.9	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (RP-HPLC/MS) . . . . .	31
3.2.3.10	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) . . . . .	32
3.2.3.11	$\mu$ Differential Scanning Calorimetrie ( $\mu$ DSC) . . . . .	32
3.2.3.12	nDifferential Scanning Calorimetrie (nDSC) . . . . .	33
3.2.3.13	Bestimmung der Peroxidzahl . . . . .	33
3.2.3.14	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) . . . . .	33
3.2.3.15	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) . . . . .	34
3.2.3.16	Ultraschall Resonator Technologie (URT) . . . . .	35
3.2.3.17	Rheometrie . . . . .	35
3.2.3.18	Oberflächenspannungsmessungen . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>36</b>
4.1	Machbarkeitsstudie: Aufkonzentrierung von Cetuximab . . . . .	36
4.1.1	Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Ultrafiltration . . . . .	37
4.1.1.1	Optimierung des TFF Prozesses mit Hilfe der ÄKTA-crossflow <sup>™</sup> . . . . .	37
4.1.1.2	Optimierung der TFF-Bedingungen für Cetuximab mit Hilfe der ÄKTAcrossflow <sup>™</sup> . . . . .	39
4.1.1.3	Vergleichender Filtrationstest auf Millipore Lab-Scale <sup>™</sup> -Anlage und ÄKTAcrossflow <sup>™</sup> . . . . .	43



## *Inhaltsverzeichnis*

---

4.1.1.4	Einfluss von pH und NaCl Konzentration auf den TFF-Prozess . . . . .	48
4.1.1.5	Evaluierung der maximalen erreichbaren Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels TFF . . . . .	51
4.1.2	Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Lyophilisation . . . . .	55
4.1.2.1	Ermittlung der optimalen Saccharosekonzentration für die Gefriertrocknung . . . . .	56
4.1.2.2	Lyophilisation und anschließende Rekonstitution mit weniger Flüssigkeit . . . . .	63
4.1.3	Aufkonzentrierung durch partielle Lyophilisation . . . . .	66
4.1.3.1	Bestimmung der Sublimationsrate von Wasser aus Lyoguard® Containern . . . . .	68
4.1.3.2	Aufkonzentrierung von Cetuximab in Lyoguard® Containern . . . . .	69
4.1.4	Vergleich der drei untersuchten Aufkonzentrierungsmethoden	73
4.2	Einfluss von Tensiden auf die Stabilität von Cetuximab . . . . .	77
4.2.1	Stressstudien . . . . .	77
4.2.1.1	Einfluss von Cetuximab- und Tensidkonzentration auf die Proteinstabilität während Agitation . . . . .	78
4.2.1.2	Einfluss der Antikörper- und der Polysorbatkonzentration auf die Stabilität während Lagerung bei erhöhter Temperatur . . . . .	90
4.2.1.3	Untersuchung des Effektes unterschiedlicher Polysorbatqualitäten auf die Lagerstabilität des Antikörpers bei erhöhten Temperaturen . . . . .	99
4.2.1.4	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	104
4.2.2	Interaktionsstudien . . . . .	106
4.2.2.1	CMC-Bestimmung von Polysorbat 80 in Cetuximabformulierungen . . . . .	106
4.2.2.2	Isotherme Titrations Calorimetrie (ITC) zur Untersuchung von Protein-Tensid Interaktionen . . . . .	109
4.2.2.3	Oberflächenplasmonresonanz (SPR) als Tool für die Interaktionsdetektion zwischen Proteinen und Tensiden . . . . .	116

*Inhaltsverzeichnis*

---

4.2.2.4	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	133
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>138</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
DAD	Dioden-Array-Detektion
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DMAP	4-N,N-Dimethylaminopyridin
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eq	Equivalent
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallisable
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie
GCSF	Granulocyten Colony Stimulating Factor
Gly	Glycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös

## *Abkürzungsverzeichnis*

---

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITC	Isotherme Titrations Kalorimetrie
Mab	Monoklonaler Antikörper
MGDF	Megakaryocyten Growth and Development Factor
MHS15	Macrogolhydroxystearat
MS	Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OPG-Fc	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatpuffer
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
pI	Isoelektrischer Punkt
PO188	Poloxamer 188
POE	Polyoxyethylen
POP	Polyoxypropylen
PS	Polysorbat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r.h.	relative Feuchte (relative humidity)
rhGH	recombinant human Growth Hormone
rhuMab	rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RU	Resonance Unit
s.c.	subcutan
SDS-PAGE	Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie

## *Abkürzungsverzeichnis*

---

SPR	Oberflächeplasmonresonanzspektroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TFF	Tangentialflussfiltration
Tg	Glasübergangstemperatur
TMP	Transmembrandruck
Tris	Triethanolamin
URT	Ultraschall Resonator Technologie
UV	ultraviolett
WFI	Wasser für Injektionszwecke

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Definition und Eigenschaften von Tensiden

Tenside sind amphiphile, grenzflächenaktive Moleküle, die an Grenzflächen adsorbieren und die Grenzflächenspannung beeinflussen können. Die Bezeichnung Tensid (lat: tensio = Spannung) wurde 1964 durch E. Götte vorgeschlagen [Fabry, 1991]. Allen Tensiden ist ihr amphiphiler Charakter mit einem hydrophilen Teil, meist eine ionische oder stark polare Gruppe, und einem hydrophoben Teil, z.B. ein aliphatischer Kohlenwasserstoff, gemein. Die Klassifizierung erfolgt anhand ihrer hydrophilen Gruppe in kationisch, anionisch, nicht-ionisch und amphoter. In Lösung erfahren Tensidmoleküle aufgrund ihrer Bipolarität suboptimale Lösungsbedingungen da ein Part des Moleküls im entsprechenden Medium weniger löslich ist als der andere. Aufgrund dieser Eigenschaft orientieren sich Tenside in Wasser vornehmlich an Grenzflächen, so dass der Kontakt des hydrophoben Molekülteils mit Wasser minimiert ist [Randolph und Jones, 2002]. Die Triebkraft für die Oberflächenadsorption ist der hydrophobe Effekt. Beim Zusammentreffen von hydrophoben Medien und Wasser wird generell angenommen, dass sich die Wassermoleküle bei Raumtemperatur in einer käfigartigen Struktur an der hydrophoben Struktur anordnen und damit die Lösungsentropie des Systems verringert wird. Um diese wiederum zu erhöhen, tendieren die Wassermoleküle eher dazu, untereinander Wasserstoffbrücken auszubilden, als dass sich solche Strukturen um den hydrophoben Molekülteil des Tensids ausbilden. Ähnlich wie bei der Adsorption ist auch die Bildung von Mizellen und damit die Abschirmung des hydrophoben Teils des Tensids vom Wasser eine Folge des hydrophoben Effektes [Southall et al., 2001; Kerwin, 2008]. Tensidmoleküle, angereichert an Grenzflächen und in mizellaren Strukturen, stehen im Gleichgewicht mit monomolekular

gelösten Teilchen. Aufgrund dieses dynamischen Prozesses verändern sich Größe und Form solch mizellarer Systeme ständig. Eine Reihe von Faktoren hat hierbei Einfluss auf Größe, Form, Dispersität und Assoziationsgrad des kolloidalen Systems [Malmsten, 2002]:

- Chemische Struktur des Tensids (Kopfgruppe, apolarer Rest)
- Polarität des Dispergiermittels ("normal" vs. "inverse" Mizellen)
- Konzentration
- Elektrolytkonzentration
- Temperatur
- pH
- Anwesenheit von Kosolumenten

Nicht jedes Tensid ist geeignet, in pharmazeutischen Produkten eingesetzt zu werden. Oben genannte Punkte, sowie eine geringe Toxizität sind bei der Auswahl des Tensids zu beachten.

## **1.2 Pharmazeutischer Einsatz von Tensiden in parenteralen Formulierungen**

In Parenteralia werden Tenside als Netzmittel, Lösungsvermittler, Emulgatoren oder zur Proteinstabilisierung eingesetzt. Tenside sind dafür bekannt, dass sie lokal Haut-, Schleimhaut- und Augenirritationen verursachen können [Effendy und Maibach, 1995]. Die Schwierigkeiten der parenteralen Anwendung von Tensiden liegen in ihrer Unverträglichkeit mit Zellmembranen. In-vitro beobachtet man z.B. tensidkonzentrationsabhängige Änderungen der Ionenpermeabilität der Erythrozytenmembran bis hin zum Auftreten von Membranporen [Bauer, 1997]. Die Erhöhung der Membranpermeabilität und Desintegrierung von Membranbestandteilen bewirkt die Lyse der Membran, was im Blut zur Zerstörung der Erythrozyten, der Hämolyse führt [Jelinek, 2001]. Pharmazeutisch verwendbare Tenside dürfen hämolytische Eigenschaften nicht oder nur in sehr geringem Maße

aufweisen. Aus diesem Grund stehen für parenterale Formulierungen nur wenige zugelassene amphiphile Substanzen zur Verfügung. Es werden aufgrund ihrer geringen Toxizität und geringen Empfindlichkeit gegen Elektrolyte hauptsächlich nicht-ionische Tenside verwendet [Lee et al., 2011; Bauer, 1997; Kerwin, 2008]. Die Anwendung von Tensiden zur parenteralen Applikation ist auf wenige Vertreter beschränkt: Polysorbat 20 und 80 (Tweens<sup>®</sup>), Poloxamer 188 (=Lutrol<sup>®</sup> F68), Lecithin, Macrogolglycerolricinoleat (Cremophor<sup>®</sup> EL), Macrogolhydroxystearat (Solutol<sup>®</sup> HS15) und in einem Fall auch Natriumdodecylsulfat (SDS) [Bauer, 1997; Wiggenhorn et al., 2010]. Macrogolglycerolricinoleat und Macrogolhydroxystearat sind für eine sehr geringe hämolytische Aktivität bekannt. Sie werden jedoch auch als Auslöser für anaphylaktische Reaktionen angesehen [Reinhart und Bauer, 1995; van Zuylen et al., 2001]. Phospholipide werden meist aus Soja oder Ei gewonnen. Typische Vertreter sind Lecithin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol. Man verwendet sie zur Herstellung parenteral applizierbarer Emulsionen z.B. in der parenteralen Ernährung, sowie zur Herstellung liposomaler Zubereitungen [Strickley, 2004].

Tabelle 1.1 zeigt exemplarische, parenteral applizierbare Handelsprodukte, in welchen die genannten Tenside eingesetzt werden.

**Tabelle 1.1:** Beispiele zu Handelsprodukten mit Tensiden in der parenteralen Verwendung (Rote Liste<sup>®</sup>).

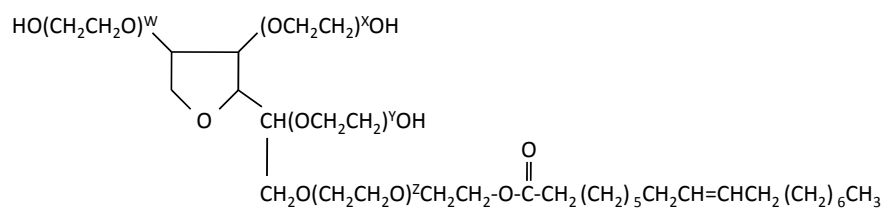
<b>Tensid</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Wirkstoff</b>
<b>Poloxamer 188</b>	Fasturtec <sup>®</sup>	Rasburicase
	Ovitrelle <sup>®</sup>	hCG alfa
	Gonal-f <sup>®</sup>	Follitropin alfa
	Norditropin <sup>®</sup>	Somatropin
<b>Polysorbat 20</b>	Herceptin <sup>®</sup>	Trastuzumab
	Apidra <sup>®</sup>	Insulin glulisin
	Lantus <sup>®</sup>	Insulin Glargin
	Neulasta <sup>®</sup>	Pegfilgrastim
<b>Polysorbat 80</b>	Erbitux <sup>®</sup>	Cetuximab
	Actilyse <sup>®</sup>	Alteplase
	Advate <sup>®</sup>	Octocog alfa



Tensid	Handelsname	Wirkstoff
	Aranesp <sup>®</sup>	Darbepoetin alfa
	Taxomedac <sup>®</sup>	Paclitaxel
	Trinitrosan <sup>®</sup>	Glyceroltrinitrat
Macrogol-40-glycerolricinoleat	Bendatax <sup>®</sup>	Paclitaxel
	Sandimmun <sup>®</sup>	Ciclosporin
	Prograf <sup>®</sup>	Tacrolimus
Macrogol-15-hydroxystearat	Sedalam <sup>®</sup>	Lormetazepam
Na-Dodecylsulfat	Proleukin <sup>®</sup> S	Aldesleukin
Phospholipide / Lecithin	AmBisome <sup>®</sup>	Amphotericin B
	Lipofundin <sup>®</sup>	Sojaöl
	Caelyx <sup>®</sup>	Doxorubicin

Im Rahmen der Dissertation verwendete Produkte:

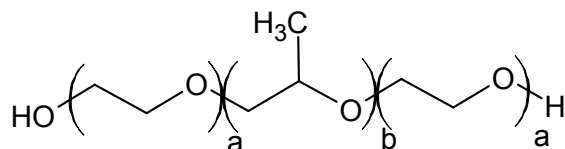
- Polysorbat 80 (Tween<sup>®</sup> 80) (MW: 1013 Da) ist eines der am häufigsten eingesetzten Tenside in parenteralen Arzneimitteln. Das nicht-ionische Tensid ist ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen Fettsäureestern des Polyoxyethylen-Sorbitans (Abb. 1.1). Es enthält einen Anteil von > 58 % Monooleat in der Fettsäurefraktion.



**Abbildung 1.1:** Struktur von Polysorbat 80 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monooleat); hierbei ist  $(w+x+y+z) = 20$  [Kerwin, 2008].

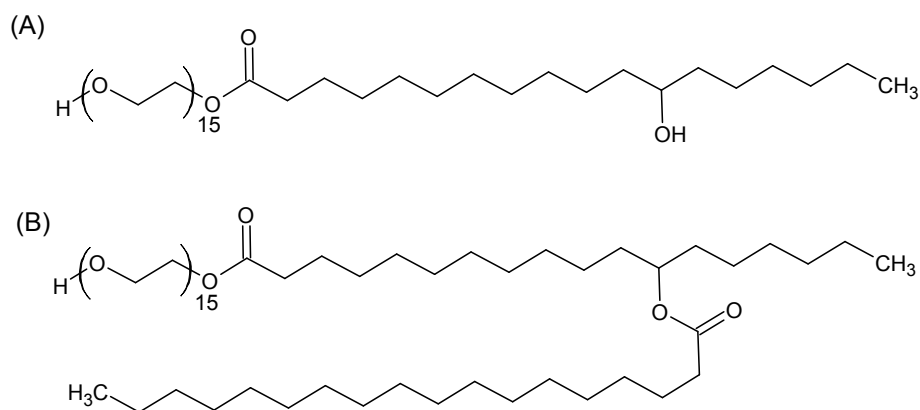
- Poloxamer 188 (Lutrol<sup>®</sup> F68) ist ein synthetisches, nicht-ionisches Tri-Block-Copolymer aus Polyoxyethylen- (POE) und Polyoxypropylen-Einheiten (POP) (MW: 7680 - 9510 Da) (Abb. 1.2). Alle Polyoxamere besitzen

diese Grundstruktur und unterscheiden sich nur in der Anzahl der hydrophilen und hydrophoben Polyoxyalkyl-Einheiten: Poloxamer 188 enthält 80 POE- (a) und 27 POP-Einheiten (b) [Mao et al., 2004].



**Abbildung 1.2:** Struktur von Poloxamer 188 (a) Polyoxyethylen-Einheit (b) Polyoxypropylen-Einheit [Mao et al., 2004].

- Macrogol-15-hydroxystearat (Solutol<sup>®</sup> HS 15), ein wasserlösliches, nicht-ionisches Gemisch aus Polyoxyethylenglycol-Mono- und -Diestern der 12-Hydroxystearinsäure und freiem Polyethylenglycol (PEG) (MW: 960 g/mol) (Abb. 1.3), wird hauptsächlich zur Solubilisierung schwer löslicher Wirkstoffe und Vitamine in parenteralen Formulierungen eingesetzt [Strickley, 2004].



**Abbildung 1.3:** Struktur von Macrogol-15-hydroxystearat: (A) Polyoxyethylenglycol-15-Monohydroxystearat; (B) Polyoxyethylenglycol-Di-12-Hydroxystearat [Murgia et al., 2013].

### 1.3 Stabilisierung von parenteralen Proteinformulierungen durch Tenside

Derzeit sind in Deutschland mehr als 150 gentechnisch hergestellte Arzneimittel zugelassen. Sie machen ca. 16 % des Arzneimittelumsatzes in Deutschland aus. Wichtige Indikationen für Biopharmazeutika sind beispielsweise Diabetes, Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis, Krebserkrankungen, bestimmte Stoffwechsel- und Gerinnungsstörungen sowie Schutzimpfungen [VfA e.v., 2012]. Eine Hauptproblematik in der Formulierung von Proteinen ist ihre hohe Empfindlichkeit gegen unterschiedliche Stressbedingungen. Während nahezu aller Fill-Finish-Operationen, wie z.B. Filtration, Abfüllung, Lyophilisation bis hin zur Applikation am Menschen erfahren Proteine mechanischen sowie thermischen Stress [Patro et al., 2002; Wang, 1999]. Dies können beispielsweise Scherstress, Grenzflächenstress durch Agitation [Patapoff und Esue, 2009; Kiese et al., 2008], Adsorption an Oberflächen während der Abfüllung [Bee et al., 2009; Tyagi et al., 2009], sowie thermische Einflüsse während der Lagerung [Wang, 1999] sein. Proteinfaltung an Oberflächen und -aggregation sind ein nicht zu unterschätzender Risikofaktor in Bezug auf die Aktivität und den Anteil des wirksamen Proteins in der Formulierung. Die Entropie getriebene Interaktion bzw. Adsorption an die Grenzfläche führt zu strukturellen Änderungen der Proteinstruktur. Proteindenaturierung und -aggregation erfolgen oft über Zwischenstufen von entfaltetem Protein. Dieser so genannte "molten globule state" ist besonders anfällig für Protein-Protein-Interaktionen und Aggregation [Cleland und Wang, 1990]. Weiterhin können gebildete Aggregate zu Immunreaktionen [Patten und H., 2003; Schellekens und Casadevall, 2004] bis hin zum anaphylaktischen Schock führen [Rosenberg, 2006]. Die Zugabe von Tensiden zur Proteinlösung ist, neben der optimalen Einstellung von beispielsweise pH und Ionenstärke [Fatouros et al., 1997; Wang et al., 2007; Callahan et al., 2001] eine bewährte Methode, um Proteine in der Formulierung gegen Oberflächen- und Scherstress zu stabilisieren. Insbesondere Polysorbat 80 und 20 (PS80, PS20) sind die Tenside der Wahl zur Stabilisierung in der Proteinformulierung [Kerwin, 2008]. Wie Tenside Proteine vor der Aggregation schützen, ist bis heute noch nicht vollkommen geklärt. Zwei Hauptmechanismen der Stabilisierung stehen zur Diskussion [Lee et al., 2011]:

- Stabilisierung durch Konkurrenz um Grenzflächen und damit die Verhinderung der Adsorption des Proteins an Grenzflächen wie Gas/Wasser, Wasser/Feststoff oder Wasser/Eis. (siehe Kap. 1.3.1)
- Stabilisierung durch direkte Interaktion zwischen Protein und Tensid (siehe Kap. 1.3.2)

### 1.3.1 Konkurrenz zwischen Proteinen und Tensiden um Grenzflächen

Adsorption des Wirkstoffes an Grenzflächen kann während Produktion, Lagerung und Applikation eines Biopharmazeutikums auftreten. Hierdurch kann es zur Entfaltung eines Proteins bis hin zur Bildung von Aggregaten kommen, welche nicht selten immunogen wirken [Rosenberg, 2006]. Beim Kontakt mit hydrophoben Grenzflächen entfalten sich Proteine partiell so, dass die hydrophoben Areale mit der Oberflächen interagieren können [Chang et al., 1996; Kiese et al., 2008]. Durch den Zusatz von Tensiden kann dieser Prozess verhindert werden, da die Proteine durch das Tensid - abhängig von dessen Bindungsstärke - von der Oberfläche verdrängt werden. Eine Desorption des Proteins kann stattfinden, wenn das Tensid die höhere Affinität bzw. Bindungsstärke zur Oberfläche aufweist als das Protein [Lee et al., 2011]. Eine der wichtigsten Grenzflächen ist die Luft-/Wassergrenzfläche [Maa und Hsu, 1997]. Durch Bewegung (z. B. Schütteln) ändert sich diese ständig. Adsorptions- und Desorptionsvorgänge beginnen stets von Neuem, was den Stress für das Protein erhöht. [Mahler et al., 2005; Eppler et al., 2010; Kiese et al., 2008].

Oft wird der schützende Effekt eines Tensids gegenüber agitationsinduzierter Proteinaggregation der Absättigung von Grenzflächen mit Tensidmolekülen zugeschrieben [Kreilgaard et al., 1998b], da diese, gegenüber Proteinen, thermodynamisch bevorzugt an hydrophobe Grenzflächen adsorbieren [Mahler et al., 2009b]. Somit kann das Protein von dort verdrängt werden. Die Verdrängung erfolgt laut Gunning nach einem "orogenen" Mechanismus. Hierbei bilden sich Tensid-Nuclei an der Grenzfläche, welche weiter expandieren und so das Protein-Netzwerk an der Oberfläche nach und nach zerstören [Gunning et al., 2004]. Der maximale Schutz des Proteins sollte also mit der CMC - und damit der Absättigung der Grenzfläche mit Tensid - einhergehen, wie beispielsweise für rekombinantes

human Growth Hormone (rhGH) mit verschiedenen Tensiden, Poloxamer 188, Macrogolmonostearylether (Brij<sup>®</sup>) und PS20 oberhalb der CMC beschrieben wurde [Randolph und Jones, 2002; Katakam et al., 1995; Katakam und Banga, 1997]. Verschiedene Antikörper konnten durch PS80 gegen Schüttelstress und auch Rührstress geschützt werden, wobei man in gerührten Proben dennoch einen leichten Anstieg an subvisuellen Partikeln beobachtete [Mahler et al., 2005; Kiese et al., 2008]. PS20 wurde zur Unterdrückung der Aggregation von humanem Faktor XIII und porcinem Wachstumshormon bei Agitationsstress nahe bzw. oberhalb seiner CMC eingesetzt [Charman et al., 1993; Kreilgaard et al., 1998b]. Eine andere Theorie besagt, dass Tenside das Protein durch kompletten Einschluss in Mizellen schützen. Dies wurde durch weitere Studien widerlegt [Villalobos et al., 2005]. Für verschiedene Poloxamere wurde ein stabilisierender Effekt gegen agitationsinduzierten und frier-tau-induzierten Stress festgestellt. Hierbei zeigten alle untersuchten Poloxamere einen schützenden Effekt gegen oberflächen-induzierte Proteindenaturierung oberhalb ihrer CMC. Einzig Poloxamer 407 konnte darüber hinaus auch unterhalb bzw. bei CMC stabilisieren [Katakam und Banga, 1997]. Poloxamer 188 zeigte des Weiteren einen schützenden Effekt gegen die Aggregation von Insulin bei Schüttelstress [Chawla et al., 1985]. Dagegen berichtete Vidanovic einen negativen Effekt von Polysorbat 80 und Macrogolglycerol-ricinoleat auf die Stabilität eines IgGs während Agitation. Erst nach Glycin-Zusatz konnte hier eine Stabilisierung erreicht werden [Vidanovic et al., 2003]. Während die Stabilisierung gegen Grenzflächenstress meist der Verdrängung des Proteins durch Tensid oberhalb seiner CMC zugeschrieben wird, konnten wenige Studien zeigen, dass eine Stabilisierung durch Tensid auch unterhalb der CMC möglich ist. Bereits 0,005 % PS20 konnten einen Modellantikörper gegen Schüttelstress in allen untersuchten Konzentrationen (10, 75, 150 mg/ml) schützen. Das Tensid verhinderte die Bildung unlöslicher Aggregate [Mahler et al., 2009b]. Auch Cetuximab konnte durch Polysorbat 80 unterhalb der CMC gegen Schüttelstress stabilisiert werden [Matheus, 2006c]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur Stabilisierung des Proteins nicht zwingend eine volle Besetzung des Proteins nötig ist.

Nicht nur die Interaktion des Proteins mit der Luft/Wasser-Grenzfläche stellt in der Proteinformulierung ein Problem dar. Die Adsorption eines Proteins an Feststoffoberflächen, wie zum Beispiel an Glasoberflächen von Vials, Infusionsbeuteln und -zubehör oder Spritzen, während der Applikation oder Lagerung, kann eine

signifikante Verringerung des Proteingehalts bewirken [Bull, 1956; Duncan et al., 1995; Mcleod et al., 2000]. Adsorption von Proteinen kann auch während der Sterilfiltration an Filtermaterialien auftreten. Für einen monoklonalen Antikörper und PS80 beschrieben Mahler et al. eine hohe Affinität zu bestimmten Filtermaterialien wie beispielsweise Nylon und PVDF. Polysorbat 80 war in der Lage die Adsorption des Antikörpers an die Membran zu reduzieren, da es selbst in hohem Maße an die Materialien adsorbierte und so das Protein von der Grenzfläche verdrängte [Mahler et al., 2010]. Auch Joshi und McGuire stellten in Untersuchungen mit Lysozym und PS80 fest, dass eine Lysozym-Adsorption an silanisiertes Silica durch ausreichend hohe Konzentrationen des Tensids signifikant reduziert werden konnte. Sie konnte sogar nahezu vollständig verhindert werden, wenn die Oberfläche vor Lysozymzusatz bereits mit Polysorbat abgesättigt war. Polysorbat hatte wiederum nahezu keinen Effekt auf die Adsorption an hydrophilem Silica, da dessen Affinität zu hydrophilen Flächen geringer ist als die des Proteins [Joshi und McGuire, 2009]. Dieser schützende Effekt wurde auch zur Adsorptionsverhinderung von IgG an Zellkulturflaschen genutzt - hier durch das Coating mit einem Polymer und den Zusatz von Pluronic F127 [Doran, 2006].

Darüber hinaus ist die Grenzfläche Eis/Wasser in der Proteinformulierung von großer Bedeutung. Während Einfriervorgängen zur Lagerung oder Gefriertrocknung können Proteine an den entstehenden Eiskristallen denaturieren und vornehmlich nicht-kovalent gebundene Aggregate ausbilden [Hawe et al., 2009]. Auch hier wurde ein positiver Einfluss von Tensiden auf die Formulierung beobachtet. Bereits geringe Konzentrationen an Tensid (unterhalb der CMC) haben einen protektiven Effekt auf die Proteinformulierungen [Carpenter et al., 1997]. Die Zugabe von PS80 verhinderte effektiv die gefrierinduzierte Denaturierung von IL1- $\alpha$  [Chang et al., 1996]. Ähnliches berichtete Kerwin für Hämoglobin mit einer Sucrose/ PS80-Kombination [Kerwin et al., 1998]. Die Aggregationstendenz von Proteinen steigt mit zunehmender Oberfläche der sich bildenden Kristalle, wie z.B. bei schnellerem Einfrieren [Sarciaux et al., 1999]. Hillgren et al. zeigten für Lactatdehydrogenase (LDH), dass bei einer höheren Einfrierrate und damit kleineren Eiskristallen mehr Tensid zur Stabilisierung des Proteins erforderlich ist [Hillgren et al., 2002b]. Neben dem Schutz während des Einfriervorgangs kann der Zusatz von Detergentien zur Rekonstitutionsflüssigkeit auch zur Erhaltung

der nativen Proteinstruktur während des Lösevorgangs beitragen [Webb et al., 2002b].

Der Effekt von Tensiden auf Proteine während Temperaturstress ist, im Gegensatz zum Agitationsstress, weniger klar [Chi et al., 2003]. Die Aggregation von Bovinem Serumalbumin (BSA) bei höherer Temperatur konnte durch Zugabe von Tween 80 [Arakawa und Kita, 2000] verhindert werden. Poloxamer 407 bzw. 188 verhinderte die thermische Aggregation von rhGH und methionyl pGH [Katakam und Banga, 1997]. Andererseits verhinderten Macrogolmonostearylether, Poloxamer 188 und Polysorbat 80 nur die agitationsinduzierte Aggregation von hGh, versagten aber bei thermischem Stress und führten vielmehr in höheren Konzentrationen sogar zu einer Destabilisierung des Proteins [Katakam et al., 1995]. Die Zugabe des Tensids kann hier zur Destabilisierung des Proteins insbesondere durch kovalente Modifizierungen führen [Bam et al., 1996, 1998]. Steigende Konzentrationen von PS20 und 80, sowie Triton X verursachten beispielsweise eine Erhöhung der Aggregationsrate von aFGF (acidic fibroblast growth factor) bei 50°C [Min Won et al., 1998].

### 1.3.2 Direkte Tensid - Protein Interaktionen

Für bestimmte Proteine wurde eine direkte Interaktion zwischen Protein und Tensid festgestellt, welche mit einem stabilisierenden Effekt in Zusammenhang stehen könnte. Das anionische Tensid Na-Dodecylsulfat (SDS) war in den Anfängen der Erforschung von Protein-Tensid-Interaktionen eines der am meisten untersuchten Tenside. Bereits 1968 wurde die Bindung von SDS an verschiedene Proteine demonstriert [Pitt-Rivers und Ambesi Impiombato, 1968]. BSA wird oft als hydrophobes Protein in der Untersuchung von Protein-Tensid-Wechselwirkungen verwendet. SDS bindet mit hoher Bindungsstärke an BSA [Giancola et al., 1997; Nielsen et al., 2000]. Gelamo et al. beschrieben die Interaktion zwischen den beiden Molekülen als "Perlenketten-Modell", da sich SDS unspezifisch an die Polypeptidkette von BSA anlagert [Gelamo et al., 2004]. Durch die sehr starke Interaktion des nicht-ionischen Tensids mit Proteinen, wird eine komplette Denaturierung der Proteine ausgelöst. Da nicht-ionische Detergentien weniger stark mit Proteinen interagieren, vermögen diese das Protein durch die Wechselwirkung

nicht zu denaturieren, aber möglicherweise vor bestimmten Stressparametern zu schützen. Verschiedene Autoren beschrieben für LDH eine sehr schwache Interaktion mit PS80. So konnte Polysorbat das Enzym durch Interaktion mit dessen hydrophoben Zonen vor Aggregation durch Schütteln schützen [Hillgren et al., 2002a; McAuley et al., 2009].

Durch schwache Interaktion mit dem Protein können Tenside als künstliches Chaperone fungieren und erleichtern dem Protein das Refolding in seinen nativen Zustand [Bam et al., 1996]. Brij 35 agierte für Rhodanese und Insulin als artifizielles Chaperon und stabilisierte beide Proteine gegen Aggregation [Bhattacharyya und Das, 1999].

Für rhGH wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) eine schwache Bindungsenthalpie bei der Interaktion mit Polysorbat 20 festgestellt. Der Schutz von rhGH durch das Tensid gegen Schüttelstress wurde durch eine Abschirmung der hydrophoben Bindungsstellen des Proteins begründet, was die Aggregation durch Protein-Protein-Interaktion verhindert [Bam et al., 1996, 1998]. Schiefelbein untersuchte in seiner Arbeit die Interaktion von nicht-ionischen Tensiden wie Polysorbaten und synthetisierten Zucker-Fettsäureestern mit Proteinen, stellte aber nur sehr geringe und unspezifische Interaktionen per ITC und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) fest [Schiefelbein, 2011]. Lactat Hydrogenase zeigte mit PS80 eine leichte hydrophobe Interaktion und auch für BSA mit Triton-X wurde eine hydrophobe Interaktion im stöchiometrischen Verhältnis 1:4 festgestellt [Sukow et al., 1980; Chou, 2005; Nagamune et al., 1982]. Chou et al. postulierten einen stabilisierenden Effekt durch Polysorbat 80 und 20 auf Albutropin durch Erhöhung der freien Entfaltungsenthalpie von Albutropin als Schutzmechanismus. Durch Fluoreszenz Quenching und ITC fanden sie ein molares Bindungsverhältnis von 10:1 (PS20 : Albutropin). In diesem Verhältnis vermochte PS20 die Aggregation während Schütteln komplett zu unterbinden. Zusätzlich zur Interaktionstheorie räumten die Forscher, ähnlich wie Lee et al., das Mitwirken von Grenzflächen-Abschirmung durch die Tenside ein [Chou, 2005; Lee et al., 2011]. Im Gegensatz hierzu zeigten Studien mit IgG Antikörpern und Polysorbat 80 und 20 nahezu keine Interaktion, die mittels ITC oder DSC messbar war [Garidel, 2009].



Direkte Interaktionen mit Tensiden scheinen von der Hydrophobie des Proteins abzuhängen, wobei die thermische Beständigkeit der Proteine durch diese nicht erhöht wird. Die unterschiedlichen Effekte von Tensiden auf das Protein hängen darüber hinaus von der Struktur der verwendeten Tenside und vom molekularen Verhältnis Tensid : Protein ab [Deechongkit et al., 2009].

## 1.4 Tenside als Stabilisatoren in hochkonzentrierten Antikörperformulierungen

Für eine bequeme subcutane Selbstapplikation von Biopharmazeutika durch den Patienten [Pavlou und Belsey, 2005] müssen bisweilen relativ hohe Dosen appliziert werden. Um das auf ca. 1,5 ml limitierte Injektionsvolumen nicht zu überschreiten, sind daher hohe Konzentrationen der Einzeldosis nötig. Physikalische Charakteristiken und Aggregationsverhalten von hochkonzentrierten Proteinformulierungen können deutlich von denen in niedriger Konzentration abweichen [Dani et al., 2007; Shire et al., 2004]. Obwohl der protektive Effekt von Tensiden bei niedrigen Proteinkonzentrationen sehr gut untersucht ist, ist über das Zusammenspiel zwischen Protein, Tensid und Grenzflächen in hochkonzentrierten Formulierungen noch sehr wenig bekannt. Laut Roter Liste befinden sich momentan 27 in Deutschland zugelassene monoklonale Antikörper auf dem Markt. Hierunter auch ein Fab-Fragment eines humanisierten Antikörpers konjugiert an PEG (Cimzia®) (Rote Liste®, Stand 05/2013). Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über auf dem Markt befindliche rekombinante Proteine, welche in Konzentrationen über 50 mg/ml formuliert sind.

In allen hochkonzentrierten Proteinformulierungen wird - wenn überhaupt - entweder Polysorbat 20 oder 80 eingesetzt. Die Polysorbatkonzentration in den hochkonzentrierten Formulierungen entspricht der auch in Formulierungen mit geringerer Wirkstoffkonzentration verwendeten Polysorbatkonzentration, typischerweise sind dies Konzentrationen um die CMC. Lediglich Synagis®, XGEVA® und Cimzia® (als Fab-Fragment) kommen als einzige der hochkonzentrierten Antikörper-Formulierungen sogar ohne Tensid zur Stabilisierung aus. Matheus stellte fest, dass Polysorbat in einer Konzentration von 0,001 - 0,01 % in einer 100 mg/ml Cetuximabformulierung einen destabilisierenden Effekt auf das

**Tabelle 1.2:** Übersicht über Marktprodukte monoklonaler Antikörper mit einer Konzentration von über 50 mg/ml an rekombinantem Protein und in der Formulierung verwendete Tenside.

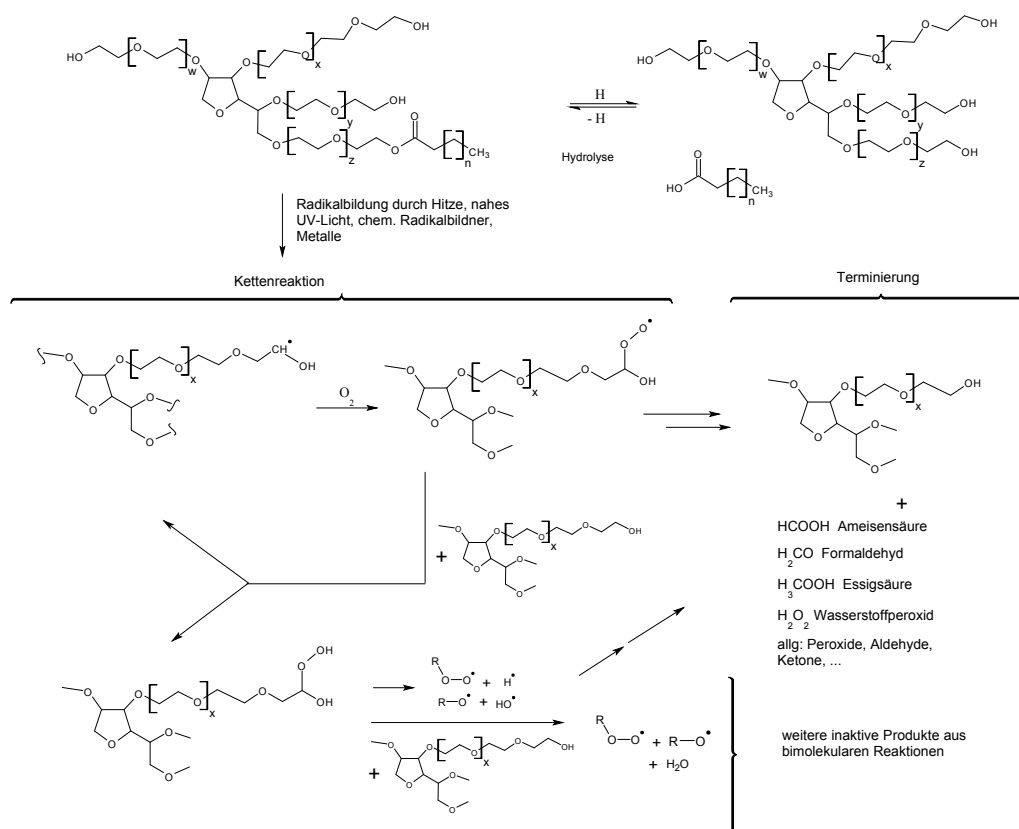
<b>Produkt</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Arzneiform</b>	<b>Konz.</b> [mg/ml]	<b>Tensid</b>	<b>Tensid</b> Konz. [%]
Humira®	Adalimumab	Lösung	50	PS80	0,1
Prolia®	Denosumab	Lösung	60	PS20	0,01
XGEVA®	Denosumab	Lösung	70	–	–
Benlysta®	Belimumab	Lyophilisat	80	PS80	0,04
STELARA®	Ustekinumab	Lösung	90	PS80	0,004
Raptiva®	Efalizumab	Lyophilisat	100	PS20	0,16
Synagis®	Palivizumab	Lyophilisat	100	–	–
Simponi®	Golimumab	Lösung	100	PS80	0,008
Xolair®	Omalizumab	Lyophilisat	125	PS80	0,03
Ilaris®	Canakinumab	Lyophilisat	150	PS80	k.A.
Cimzia®	Certolizumab Pegol	Lösung	200	–	–

Protein beim Schütteln besaß, während durch 0,025 % Polysorbat eine Stabilisierung des Antikörpers erreicht wurde [Matheus, 2006c]. Mahler et al. untersuchten das Stabilisierungsvermögen unterschiedlicher PS20-Konzentrationen auf einen monoklonalen Antikörper zwischen 10 - 150 mg/ml. Die Bildung visueller Partikel blieb beim Zusatz von 0,005 % PS20 aus. Dieser Zusatz reichte sowohl für die geringste als auch die höchste Antikörperkonzentration zur Verhinderung der Bildung visueller Partikel bei Schüttelstress aus. Die Autoren nahmen auch einen selbststabilisierenden Effekt der hochkonzentrierten Proteinformulierung aufgrund höherer Viskosität an [Mahler et al., 2009b]. Diese Autostabilisierung hochkonzentrierter Formulierungen wurde bereits für Insulin aber auch für monoklonale Antikörper in der Literatur diskutiert. [Mahler et al., 2009b; Saluja und Kalonia, 2008; Shire et al., 2004; Sluzky et al., 1991].

## 1.5 Destabilisierung von Proteinen durch Tenside

Zahlreiche Arbeiten belegen die physikalisch-chemische Stabilisierung von Proteinen durch Tenside. Tenside fungieren jedoch nicht immer als Stabilisatoren. Während sie gegen Agitationsstress im Allgemeinen sehr wirkungsvoll sind [Webb et al., 2002a; Kiese et al., 2008], bieten sie beispielsweise gegen erhöhte Temperaturen oft keinen Schutz [Katakam et al., 1995; Treuheit et al., 2002; Wang et al., 2008]. Viele Untersuchungen bezogen sich hier auf die am gebräuchlichsten in der Proteinformulierung verwendeten Tenside, die Polysorbate. Ihr hydrophiler Teil besteht aus Polyoxyethylenuntereinheiten, welche besonders anfällig für Oxidation bzw. Autoxidation sind [Jaeger et al., 1994]. Die chemische Instabilität von Polysorbat ist schon lange bekannt. Die Abbaureaktionen werden von Licht, erhöhter Temperatur, oxidativen Spezies oder z.B. Schwermetalle getriggert und lassen sich auch in dicht verschlossenen Originalgebinden feststellen [Donbrow et al., 1978; Ha et al., 2002]. Polysorbate gehen Abbaureaktionen wie Autoxidation, Abspaltungsreaktionen an der Ethylenoxid-Untereinheit und Hydrolyse der Fettsäurebindungen ein. Autoxidation führt zu Hydroperoxidbildung, Seitenkettenspaltung und der Bildung von kurzkettigen Fettsäuren, welche die Stabilität von Biopharmazeutika beeinflussen können [Ding, 1993; Kerwin, 2008]. Hydrolysereaktionen treten vorrangig bei Raumtemperatur auf, ein Abbau der Ethylenoxid-Einheiten erst bei höheren Temperaturen über 40°C, wobei gerade verdünnte Tensidlösungen gegen Hitze und Licht eine erhöhte Empfindlichkeit zeigen [Ding, 1993; Ha et al., 2002]. Der von Kishore analysierte Hauptabbauweg von Polysorbaten bei niedrigen Temperaturen ist die radikalische Autoxidation an der Polyoxyethyleneinheit [Kishore et al., 2011a]. Abbildung 1.4 fasst die postulierten Abbauwege von Polysorbaten nach Kerwin und Kishore et al. zusammen und verdeutlicht die Vielzahl der entstehenden Spaltprodukte, welche sich negativ auf die Stabilität von Biopharmazeutika auswirken können [Kerwin, 2008; Kishore et al., 2011b].

Der Einfluss von Polysorbat-Degradationsprodukten auf die Qualität von Biopharmazeutika ist erst seit kurzer Zeit Thema intensiverer Untersuchungen. In Spikingstudien mit freien Fettsäuren als Abbauprodukte von PS80 wurde eine physikalisch-chemische Destabilisierung von Antikörpern nach Schütteln festgestellt. Eine Schwellenkonzentration von intaktem Polysorbat konnte allerdings die



**Abbildung 1.4:** Reaktionsschema zur Hydrolyse und Autoxidation von Polysorbat (adaptiert nach Kerwin und Kishore [Kerwin, 2008; Kishore et al., 2011b]).

Aggregation verhindern [Kishore et al., 2011a]. Darüber hinaus führen Peroxide im Polysorbat zu Oxidation von Proteinen [Ha et al., 2002; Treuheit et al., 2002; Wang et al., 2008]. So wurde durch die Entfernung von Polysorbat 20 aus einer rhuMab HER-Antikörperformulierung der Anteil an oxidierten Antikörperspezies von 52 % auf < 10 % während Lagerung bei 40°C reduziert [Lam et al., 1997].

Zu geringe Konzentrationen an Tensid können sich wiederum auch negativ auf die physikalisch-chemische Stabilität einer Proteinformulierung auswirken. Bei Schüttelstresstudies von IgGs mit Polysorbat 80 und 20 wurde bei Konzentrationen von 0,0025 % PS 20 in einer 10 mg/ml [Kiese et al., 2008] bzw. 0,001 - 0,01 % PS 80 in einer 100 mg/ml Formulierung [Matheus, 2006c] eine deutliche Erhöhung der löslichen Aggregate, bzw. der subvisuellen Aggregate im Vergleich

zur tensidfreien Formulierung festgestellt. Mahler et al. beschrieben diesen Effekt auch für Rührstress [Mahler et al., 2005]. Weitere Untersuchungen zu einem genaueren Mechanismus oder einer Vorhersagbarkeit solcher Effekte existieren jedoch nicht.

Wie bereits beschrieben, haben Tenside unterschiedliche Effekte auf die Stabilität eines Proteins und besitzen selbst eine gewisse Anfälligkeit gegenüber bestimmten Stressparametern. Dem schützenden Effekt des Tensids gegen Schüttelstress steht somit oftmals die oxidative Schädigung des Proteins durch das Detergens gegenüber. Daher ist es wichtig, durch die richtige Auswahl des Tensids, sowie analytischer Methoden und Stresstests den Tensidgehalt in Proteinformulierungen zu optimieren. Die Konzentration des Tensids sollte ausreichend für eine physikalisch-chemische Stabilisierung der Proteinformulierung sein, jedoch aus genannten Gründen nicht unnötig weiter erhöht werden.

## Kapitel 2

### Zielsetzung

In der Literatur finden sich neben Berichten zur Stabilisierung auch Hinweise auf einen physikalisch-chemisch destabilisierenden Effekt von Polysorbaten auf IgG-Formulierungen. Ziel der Arbeit war es, diese Stabilisierung und Destabilisierung genauer zu untersuchen und dabei unterschiedliche Tenside und verschiedene Proteinkonzentrationen zu berücksichtigen.

Hierzu dienten folgende Fragestellungen:

- Reproduzierbarkeit des destabilisierenden Effektes von Polysorbat 80 durch Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Cetuximab 100 mg/ml bei Schüttelstress.
- Vergleich des Aggregationsverhaltens der 100 mg/ml Formulierung mit den Tensiden Polysorbat 80, Macroglydroxystearat und Poloxamer 188.
- Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentration auf den stabilisierenden/destabilisierenden Effekt von Polysorbat 80 bei Schüttelstress.
- Untersuchung des Polysorbat- und Proteinkonzentrationseffektes durch Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Cetuximab bei Temperaturstress.

Die Untersuchungen hatten neben der Analyse des Aggregationsverhaltens auch die Erforschung eventuell vorhandener direkter Interaktionen von Cetuximab und BSA mit den Tensiden zum Ziel. Dabei kamen folgende Analytikverfahren zum Einsatz:

- Isotherme Titrationscalorimetrie
- Oberflächenplasmonresonanz:

- mit den Modellproteinen als stationäre Phase
- mit Glycin-Polysorbat als stationäre Phase

Die Interaktionsbestimmung sollte der Untersuchung des stabilisierenden/destabilisierenden Effektes dienen, welcher mit den Stresstudien herausgearbeitet wurde.

Ein Teilaspekt der Arbeit bezog sich auf die Herstellung einer hochkonzentrierten Cetuximab-Formulierung, da diese für die Analyse des Konzentrationseinflusses auf das Aggregationsverhalten von Cetuximab mit Polysorbat benötigt wurde.

Im Rahmen der Arbeit sollten verschiedene Aufkonzentrationsmethoden evaluiert und bewertet werden:

- Tangentialflussfiltration mit einer ÄKTAcrossflow™-Anlage inclusive Methodenoptimierung.
- Lyophilisation und anschließende Rekonstitution in einer geringeren Menge Rekonstitutionsflüssigkeit.
- Partielle Gefriertrocknung - gezielter Stopp des Wasserentzugs auf Stufe der Primärtrocknung.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Material, Hilfsstoffe, Reagenzien

Folgende Hilfsstoffe (Tab.3.1), Reagenzien (Tab.3.2) und Materialien (Tab.3.3) fanden Verwendung:

**Tabelle 3.1:** Hilfsstoffe.

<b>Hilfsstoff</b>	<b>Hersteller</b>
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Deutschland
Lutrol® F68	BASF, Ludwigshafen
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Deutschland
Polysorbat 80	Merck KGaA, Deutschland
Polysorbat 80, hochrein	CRODA, Deutschland
Salzsäure 1N	Merck KGaA, Deutschland
Solutol® HS15	BASF, Deutschland
Sucrose	Merck KGaA, Deutschland
Gereinigtes Wasser	frisch hergestellt (Bidestillation)



**Tabelle 3.2:** Reagenzien und Chemikalien.

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Deutschland
Acetate 4,0	GE-Healthcare, USA
Acetate 4,5	GE-Healthcare, USA
Acetate 5,0	GE-Healthcare, USA
Acetate 5,5	GE-Healthcare, USA
Acetonitril	Merck KGaA, Deutschland
Amine Coupling Kit	GE-Healthcare, USA
Coomassie Blue Färbetabletten	Merck KGaA, Deutschland
Cyclohexan	Merck KGaA, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x)	PAA Laboratories, Österreich
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol 96 %	Merck KGaA, Deutschland
Gel-Filtrationsstandard	BIO-RAD, Canada
Glycine 1,5	GE-Healthcare, USA
Glycine 2,0	GE-Healthcare, USA
Glycine 2,5	GE-Healthcare, USA
Glycine 3,0	GE-Healthcare, USA
HBS-EP Puffer	GE-Healthcare, USA
HBS-N Puffer (10x)	GE-Healthcare, USA
Kaliumiodid	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Natrium-Dodecylsulfat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumthiosulfatlösung 0,01M	Merck KGaA, Deutschland
NuPage 10 % Bis Tris Gel	Invitrogen, USA

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Tris Glycine SDS Sample Buffer	Invitrogen, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck KGaA, Deutschland
Tris-Glycin-SDS-Running Buffer	Invitrogen, USA
Tris-Glycin-SDS-Sample Buffer	Invitrogen, USA
Trifluoressigsäure	J.T. Baker, USA
SeeBlue <sup>®</sup> Plus 2 Pre-stained (2x)	Invitrogen, USA
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen, USA
Guanidinhydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Natriumhydroxidlösung 2M	Merck KGaA, Deutschland
Fmoc-Gly-OH	Sigma Aldrich, USA
Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma Aldrich, USA
DMAP (Dimethylaminopyridin)	Sigma Aldrich, USA
Dichlormethan	Merck KGaA, Deutschland
MTB- Ether	Merck KGaA, Deutschland
Piperidin	Merck KGaA, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA, Deutschland
Petrolether	Merck KGaA, Deutschland

---

**Tabelle 3.3:** Materialien.

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Bördelkappen 10,3 mm	Helvoet Pharma, Deutschland
Bördelkappen 20,3 mm	Helvoet Pharma, Deutschland
Glas Vial 2R	Münnerstädter Glaswarenfabrik, Deutschland
Glas Vial 6R	Münnerstädter Glaswarenfabrik, Deutschland
GORE® LYOGUARD™ Freeze Drying Container	GORE, USA
Injektionsstopfen (Chlorobutyl) 10 mm	West Pharmaceutical Services, USA
Injektionsstopfen (Chlorobutyl) 20 mm	West Pharmaceutical Services, USA
KVICK START™, 50KD, 0,05m <sup>2</sup> Flat Sheet Membran Kassette	GE Healthcare, USA
Lyophilisationsstopfen (Chlorobutyl) 10 mm	West Pharmaceutical Services, USA
Lyophilisationsstopfen (Chlorobutyl) 20 mm	West Pharmaceutical Services, USA
Pellicon™ Biomax 50KD, 0,05m <sup>2</sup> , PES Membrankassette	Millipore, USA
Sartocon™ Slice 30kD, 0,1m <sup>2</sup> , PES-Membrankassette	Sartorius, Deutschland
Sensorchip C1	GE-Healthcare, Deutschland
Sensorchip CM5	GE-Healthcare, Deutschland

### 3.1.2 Modellproteine

#### 3.1.2.1 Cetuximab - Erbitux®

Cetuximab ist ein chimärer Maus/Mensch-Antikörper der IgG Subklasse mit einem molekularen Gewicht von 154kD, welcher am humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) angreift [Baselga, 2001]. Er besteht aus vier Poly-

peptid-Ketten, hiervon zwei identische schwere Ketten ( $\lambda$ ) bestehend aus 449 Aminosäuren und zwei identischen leichten Ketten ( $\kappa$ ) bestehend aus jeweils 214 Aminosäuren. Diese Ketten enthalten die funktionale Bindedomäne des murinen M225 Antikörpers zum humanen EGFR. Die vier Ketten werden durch eine Kombination von kovalenten Disulfidbrücken und nicht kovalenten Bindungen zusammengehalten. Der N-terminale Rest der schweren Kette ist cyclisiert als Pyroglutaminsäure [Fachinformation Erbitux<sup>®</sup>, 2009].

Für die Arbeit wurde eine Cetuximab-Formulierung mit 8,2 mg/ml Antikörper in PBS-Puffer, pH 7,2 als Ausgangslösung verwendet. Der PBS Puffer bestand aus 10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat und 145 mM Natriumchlorid.

Die Lösung wurde zur weiteren Verwendung umguppert und je nach Bedarf aufkonzentriert oder verdünnt. Die Pufferzusammensetzung des verwendeten Standardpuffers ist in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben.

### 3.1.2.2 Bovines Serum Albumin (BSA)

BSA (bezogen von Sigma Aldrich, USA) ist ein globuläres, unglycosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 66.000Da. Es besteht aus insgesamt 585 Aminosäuren und ist das am häufigsten vorkommende bovine Plasma-Protein. Es besitzt elf eindeutige Bindungsstellen für hydrophobe Moleküle. Im tierischen Körper dient es der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks, welcher essentiell für die Verteilung von Flüssigkeiten zwischen Gefäßen und extrazellulären Bereichen ist. Des Weiteren spielt es im Blut als unspezifisches Transportprotein z.B. von Steroidhormonen, Thyroidhormonen, Fettsäuren und Hemin eine Rolle. BSA ist ein häufig genutztes Protein in der Immundiagnostik, als Reagenz, Zellkultur-Medium und allgemein als Modellprotein für Untersuchungen, wo - wie auch hier - dessen unspezifische, hydrophobe Bindungsfähigkeit von Interesse ist.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Probenherstellung

#### 3.2.1.1 Tangentialflussfiltration

Zur Aufkonzentrierung und Umpufferung wurden folgende Filtrationssysteme verwendet:

- LabScale™ TFF System (Millipore Corp., USA) für kleine Ansätze bis zu 500 ml
- Sartocor® TFF System (Sartorius, Deutschland) für größere Ansätze ab 2l
- ÄKTAcrossflow™ (GE Healthcare, USA) zur Methodenevaluierung

Die Ultrafiltrations-/ Diafiltrationsansätze zur Probenerzeugung erfolgten bei Raumtemperatur mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Membrankassetten und in Tabelle 3.4 aufgeführten Standardparametern. Die verwendeten Membranen wurden zuvor auf Integrität getestet und die Anlage mit Puffer vorgespült.

**Tabelle 3.4:** Druckeinstellungen für Probenherstellungen auf Millipore LabScale™ und Sartocor® TFF System.

<b>Millipore LabScale™</b>				
<b>Filtrationsschritt</b>	<b><math>p_{in}</math> [psi]</b>	<b><math>p_{aus}</math> [psi]</b>	<b><math>\Delta P</math> [psi]</b>	<b>TMP [psi]</b>
Ultrafiltration	20	10	10	15
Diafiltration	30	15	15	22,5
<b>Sartocor® TFF System</b>				
<b>Filtrationsschritt</b>	<b><math>p_{in}</math> [psi]</b>	<b><math>p_{aus}</math> [psi]</b>	<b><math>\Delta P</math> [psi]</b>	<b>TMP [psi]</b>
Ultrafiltration	20	0	0	10
Diafiltration	20	0	20	10

### 3.2.1.2 ÄKTAcrossflow™

ÄKTAcrossflow™ (GE Healthcare, USA) wurde zur Optimierung von Ultrafiltrationsprozessen für Cetuximab eingesetzt. Die Steuerung des Systems erfolgte mit Hilfe der zugehörigen Unicorn Software (GE Healthcare, USA). Zur Filtration wurde eine KVICK START™ Flatsheet Kassette bzw. eine Pellicon™ Biomax Flatsheet Kassette einem Cut-off von 30KD und 0,05m<sup>2</sup> Membranfläche aus Polyethersulfon (PES) eingesetzt. Nach der Filtration wurden die Membranen mit 1M Natronlauge gereinigt und konserviert.

### 3.2.1.3 Probenherstellung und Probenabfüllung

Die Proben wurden unter aseptischen Bedingungen in 2 bzw. 6 ml Vials abgefüllt. Das Probenvolumen betrug 1 bzw. 2ml. Die jeweilige Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung der gesamten Lösung mit der errechneten Menge Diafiltrationspuffer eingestellt, die gewünschte Tensidkonzentration durch Zuspicken von sterilfiltrierten Tensid-Stammlösungen erreicht. Alle produktberührenden Packmaterialien wurden vor der Verwendung partikelfrei gespült und mit gesättigtem, gespanntem Wasserdampf bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert (Autoklav 3850 ELV, Systec GmbH, Wettenberg). Der in der Arbeit verwendete Standard-Formulierungspuffer ist in Tabelle 3.5 wiedergegeben. Abweichungen hiervon werden ausdrücklich in den jeweiligen Kapiteln erwähnt.

**Tabelle 3.5:** Rezeptur des Standard-Puffers für die verwendeten Cetuximab-Formulierungen.

<b>Hilfsstoff</b>	<b>Dosierung</b>
Natrium-Dihydrogenphosphat Dihydrat	0,40 mg/ml
Dinatrium-Hydrogenphosphat Dihydrat	1,32 mg/ml
Natriumchlorid	8,48 mg/ml
pH	6,0

### 3.2.1.4 Lyophilisation

Gefriertrocknungsläufe erfolgten mit dem Gefriertrockner COM6011 (Hof Sonderanlagenbau GmbH, Deutschland), unter Verwendung eines Standardprogramms für Proteine (s. Tabelle 3.6). Der Gefriertrockner wurde bei Raumtemperatur beladen und die Vials nach Trocknungsende bei 0,3 mbar direkt im Gefriertrockner durch Zusammenfahren der Stellplatten verschlossen und anschließend verbördelt.

**Tabelle 3.6:** Verwendetes Standard- Gefriertrocknungsprogramm für den Gefriertrockner COM6011.

Bezeichnung	Zeit [hh:mm]	Temp. [°C]	Druck [mbar]
Beladen	00:11	22	1.0E+3
Einfrieren	00:15	-50	1.0E+3
Einfrieren	01:00	-50	1.0E+3
Einfrieren	15:00	-40	1.0E+3
Haupttrocknung	00:15	-40	3.0E-1
Haupttrocknung	00:15	-30	3.0E-1
Haupttrocknung	k.A.*	-30	3.0E-1
Haupttrocknung	00:15	0	3.0E-1
Haupttrocknung	00:15	0	5.0E-2
Nachtrocknung	18:00	20/40	5.0E-2
Nachtrocknung	06:00	20/40	5.0E-2

\*Der Lyophilisationsprozess wurde mittels Temperatursonden in einzelnen Proben verfolgt und die Haupttrocknungszeit von der Probentemperatur abhängig gemacht: Nach Erreichen der Plattentemperatur von allen mit Messfühlern ausgestatteten Proben wurde nach einem Sicherheitsintervall von vier Stunden die Sekundärtrocknung eingeleitet.

### 3.2.1.5 Funktionalisierung von Polysorbat 80

Zur Erzeugung eines Gly-PS80 wurde DCC zuerst in Dichlormethan gelöst und in eine Mischung aus Polysorbat 80, Fmoc-Gly-OH im Überschuss und DMAP in Dichlormethan gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Entstandener Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert. Die Aufreinigung des Zwischenproduktes Fmoc-GlyPS80 erfolgte durch präparative RP-HPLC mit Hilfe einer Merck-Hitachi-Anlage auf einer präparativen Chromolith PrepRod RP 18e-Säule 100-25 mm (Merck, Darmstadt, Deutschland) und minütlicher Fraktionssammlung des Eluats. Die Gradientenelution wurde binnen 60 min von 1 % bis 100 % der unpolaren Fließmittelkomponente (0,1 % TFA in Acetonitril) bei einer Flussrate von 10 ml/min erreicht. Die polare Fließmittelkomponente bestand aus 0,1 % TFA in Wasser. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214 nm. Alle Fraktionen wurden mittels LC-MS auf das Vorliegen des Zwischenproduktes untersucht. Hierzu wurde eine Chromolith SpeedROD RP-18e 50-4,6 mm Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Bei einer Flussrate von 2 ml/min und einem Injektionsvolumen von 3  $\mu$ l wurde der Gradient in 2,6 min von 5 % Solvent B (Acetonitril + 0,1 % TFA) zu 100 % Solvent B gefahren. Nach Vereinigung der positiv analysierten Fraktionen und Entfernung des Lösemittels im Vakuum wurde das Zwischenprodukt Fmoc-GlyPS80 zur Abspaltung der Schutzgruppe Fmoc mit 25 % Piperidin in Dimethylformamid versetzt und über Nacht reagieren gelassen. Nach Abziehen des restlichen Lösemittels am Rotationsverdampfer und anschließender Gefriertrocknung wurde der verbliebene Rückstand zur Entfernung des hydrophoben Fluorens mit heißem Petrolether gewaschen und das Reaktionsprodukt nach kompletter Entfernung des Petrolethers per Lyophilisationsanlage, in Wasser/Acetonitril aufgenommen. Die weitere Aufreinigung erfolgte wieder mit Hilfe von präparativer RP-HPLC unter den oben genannten Bedingungen.

## 3.2.2 Stressmethoden

### 3.2.2.1 Schüttelstress

Die Proben (n=3) wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 2-8°C auf einem Laborschüttler IKA HS 501 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen) mit einer



Frequenz von 150 rpm horizontal geschüttelt. Die Schüttelzeit betrug 24 - 168 Stunden. Genaue Angaben hierzu finden sich in den einzelnen Kapiteln.

### **3.2.2.2 Temperaturstress**

Die Vials wurden bei 40°C/75 % r.h. bzw. 25°C/60 % r.h. in Klimakammern über einen vom Experiment abhängigen Zeitraum gelagert. Genaue Angaben hierzu finden sich an entsprechender Stelle im Ergebnisteil.

### **3.2.2.3 UV-Stress**

Zur UV-Stressung wurde Polysorbat 80 nach ICH Guideline [ICH, 2003] in einem Glasvial ohne Stopfen für 15 Stunden in einer Photostabilitätskammer Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology, USA) bei 750 W/m<sup>2</sup> und einer Wellenlänge von 317 - 800 nm bestrahlt.

## **3.2.3 Analytische Methoden**

### **3.2.3.1 Größenausschlusschromatografie (SEC)**

Monomergehaltes, lösliche Aggregate und Abbauprodukte wurden mittels SEC detektiert. Das System bestand aus einer HPLC-Pumpe (L 6250 Intelligent Pump, Merck Hitachi, Deutschland), einem kühlbaren Autosampler (AS 4000 Intelligent Autosampler), einem UV-Vis Detector (L-4250 UV-Vis-Detector) und einer SEC Säule mit Vorsäule (TSK-GelR G3000SWXL column mit TSKguardcol-umnR SWXL, Tosoh Biosep, Stuttgart, Germany). Als Laufmittel wurde Dulbecco's Phosphatgepuffered Saline, pH 7,2 verwendet (Verdünnung mit WFI 1:10). Die Flussrate wurde auf 0,5 ml/min eingestellt (UV-detektion bei einer Wellenlänge von 280 nm). Das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu$ l. Zur Auswertung wurde die D-7000 HPLC System Manager (HSM) Software (Merck Hitachi, Deutschland) verwendet. Der Gehalt an Aggregaten und Abbauprodukten wurde als prozentualer Anteil der Gesamtpeakfläche ermittelt.

### **3.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes**

Zur Ermittlung der Konzentration wurde die Lichtabsorption mittels UV-Vis Spektrometer Ultrospec1000 (Amersham Biosciences, New York, NY, USA) bestimmt. Die Proben wurden vor der Messung mit Phosphatpuffer soweit verdünnt, dass die Absorption im Bereich von 0,3 - 0,7 lag. Die Extinktion der Proben wurde bei 280 nm und einer Schichtdicke von 1,0 cm vermessen.

### **3.2.3.3 Lichtblockademessungen**

Lichtblockade-Messungen wurden mit dem Partikelmessgerät PAMAS SVSS-C (PAMAS Partikelmess- und Analysesystem GmbH, Rutesheim, Deutschland) und dazugehöriger Software ausgeführt. Die Probenvorbereitung sowie die Vermessung erfolgte unter Laminar Air Flow. Die Messungen wurden nach einer modifizierten Methode der Monographie 788 des USP [USP, 2009] und Kap. 2.9.19. des Ph. Eur. [Ph.Eur., 2008a] durchgeführt. Hierbei wurden je 0,2 ml von jeder Probe pro Messung analysiert. Das Vorlaufvolumen betrug 0,4 ml. Die Ergebnisse der Partikelzählung wurden als Mittelwert von je drei Messungen angegeben und auf ein Probenvolumen von 1 ml bezogen. Zwischen den Messungen wurde das Gerät mit sterilfiltriertem Wasser für Injektionszwecke gespült, solange bis die Partikelanzahl pro Volumen auf die Akzeptanzkriterien des Umgebungstests gesunken war. Füllrate der Spritze, Entleerungsrate und Spülrate wurden jeweils auf 10 ml/min festgesetzt.

### **3.2.3.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

DLS-Messungen wurden mit Hilfe eines Malvern Zetasizer nano (Malvern Instruments GmbH Herrenberg, Germany) durchgeführt. Die Vermessung der unverdünnten Proben (n=3) erfolgte nach einer Equilibrierung für 5 min bei 25°C. Die Datenauswertung erfolgte unter der Annahme einer polymodalen Verteilung.

### 3.2.3.5 Visuelle Kontrolle

Die visuelle Kontrolle wurde analog der Ph. Eur. Methode 2.9.20 [Ph.Eur., 2008b] mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Schott AG, Mainz, Deutschland) vor einem schwarzen Hintergrund durchgeführt. Die Vials wurden vorsichtig bewegt, um eventuell enthaltene Partikel aufzuwirbeln, ohne Luftblasen zu generieren.

### 3.2.3.6 Trübungsmessung

Die Trübung wurde als photometrische Absorption bei 350 nm gemessen. Die Messungen wurden mit einem UV-Vis Spektrophotometer (Ultrospec 1000; Amersham Biosciences, New York, USA) gegen den sterilfiltrierten Formulierungspuffer als Blank Wert durchgeführt.

### 3.2.3.7 SDS-PAGE

Die Bildung von Aggregaten und Proteinfragmenten wurde mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Elektrophorese wurde in einer XCell SureLock Mini-Cell Fokussierkammer (Invitrogen GmbH, Deutschland) mit einem PowerEase™ 500 NOVEX Power Supply durchgeführt. Die Proben enthielten jeweils 0,4 mg/ml Cetuximab (durch Verdünnung mit Formulierungspuffer), 50 % Tris Glycin SDS Sample Buffer und - unter reduzierenden Bedingungen - 10 % DTT Lösung 1 %. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 4 min auf 95°C erhitzt. Die Proteine wurden mit jeweils 10 µl in NuPage BisTris-Gel (Invitrogen, USA) aufgetragen, als Laufpuffer diente TRIS-Glycin SDS Laufpuffer. Als Molekulargewichtsstandard kam SeeBlue® Plus 2 (Invitrogen, USA) unverdünnt jeweils 2x pro Gel zum Einsatz. Die resultierenden Proteinbanden wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie Brilliantblau im Standard-Anfärbeverfahren sichtbar gemacht und mit Gel-Dry™ Lösung (Invitrogen, USA) konserviert.

### 3.2.3.8 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

RP-HPLC erfolgte auf einer ALLIANCE 2690 XE Anlage mit integriertem Säulenofen, UV-Detektor 2487 und dazugehöriger Steuerungs- und Auswertesoftware Empower2 (Waters Corporation, Milford, USA). Als stationäre Phase diente eine Jupiter C4 5  $\mu$  300Å Säule (Phenomenex Inc., Torrance, USA). Die Proben wurden vor der Analyse mit TRIS/Guanidin-Puffer (6M Guanidin-HCl, 200 mM TRIS, pH 8,5) und DTT-Lösung 0,1M versetzt und für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach Verdünnung der abgekühlten Proben mit 1%iger TFA-Lösung, wurden jeweils 50  $\mu$ l dieses Gemisches doppelt injiziert. Die Gradientenelution wurde durch Zumischen steigender Anteile der unpolaren Fließmittelkomponente (0,0425 % TFA in Acetonitril) zur wässrigen Phase (0,05 % TFA in Wasser) bis zu einem Verhältnis von 10:90 erreicht. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214 nm.

### 3.2.3.9 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (RP-HPLC/MS)

Die Massenspektren für die Gly-Tween-Synthese wurden durch RP-HPLC/MS auf einer Agilent System 1100 Series Anlage (Agilent Technologies, USA) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte hierbei auf einer Cromolith Speed ROD RP-18e Säule (Merck KGaA, Deutschland) bei einer Flussrate von 2,4 ml/min. Der verwendete Splitter reduzierte den Fluss nach der DAD auf eine Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min für die MS. Lösungsmittel A: Wasser / 0,05 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril / 0,04 % Ameisensäure. Gradient: In 2,8 min von 96 % A zu 100 % B, gefolgt von 0,5 min 100 % B. Die Ionisierung im angekoppelten Massenspektrometer wurde durch Elektrospray-Ionisierung (positive mode) erreicht. Der Scan erfolgte von 85 - 1000 m/z unter jeweiliger Aufzeichnung der MH<sup>+</sup> Spektren.

### 3.2.3.10 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

FT-IR Spektren der Proteinlösungen wurden mit einem Tensor 27 Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Deutschland) in einer BioATR-Zelle TM II (Harrick Scientific Corporation, USA) mit angeschlossenenem Thermostat (DC30-K20, Thermo Haake) aufgenommen ( $n=3$ ). Die Messungen erfolgten bei  $25^{\circ}\text{C}$  im Einstrahlmodus, wobei jeweils ein Interferogramm mit 128 Scans und einer spektralen Auflösung von  $4\text{cm}^{-1}$  aufgezeichnet wurde. Als Referenzlösung diente der dazugehörige Ultrafiltrationspuffer aus der Herstellung der Proteinlösung, um Schwankungen der Messungen durch geringe Unterschiede in der Pufferzusammensetzung zu vermeiden. Zur Aufnahme der Spektren von Proben- und Referenzlösung unter identischen Bedingungen wurden jeweils  $15\ \mu\text{l}$  Probenvolumen in die Messzelle eingefüllt und vor der eigentlichen Messung 120 Sekunden equilibriert.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ProteinDynamics-Software für Opus 4.2 (Bruker Optik GmbH, Deutschland) unter automatischer Subtraktion der Referenzspektren der Pufferlösung vom Probenspektrum. Die Auswertung erfolgte anhand des Spektrums im Bereich der Amid I Bande und wurde als zweite vektor-normalisierte Ableitung dargestellt.

### 3.2.3.11 $\mu$ Differential Scanning Calorimetrie ( $\mu$ DSC)

Die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) sowohl der flüssigen als auch der gefriergetrockneten Proben wurde mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetrie mit einem DSC821e (Mettler-Toledo, Deutschland) und dazugehörigem Kühlaggregat Intracooler EK 90/MT (Thermo Haake, Deutschland) ermittelt. Hierzu wurden die Proben jeweils in einen Standard Aluminium-Tiegel "Al-Crucible 100  $\mu\text{L}$ " mit Deckel (Mettler Toledo, Deutschland) gefüllt, leicht angedrückt und verbördelt. Die Ermittlung der Glasübergangstemperatur bei den gefriergetrockneten Proben erfolgte bei  $10^{\circ}\text{C}$  bis  $110^{\circ}\text{C}$  mit einer Kühl- und Heizrate von  $5\text{K}/\text{min}$ . Für die flüssigen Proben wurde eine Temperatur von  $-10$  -  $-60^{\circ}\text{C}$  gewählt bei einer Heiz-/Abkühlrate von  $5\text{K}/\text{min}$  und 4facher Wiederholung. Als Referenz für alle Proben diente ein leerer Tiegel. Die Auswertung erfolgte graphisch mit der dazugehörigen STARe Software. Die Glasübergangstemperatur wurde als "onset" des Glasüberganges angegeben.

### 3.2.3.12 nDifferential Scanning Calorimetrie (nDSC)

Kalorimetrische Messungen wurden mit einem DSC Model 6300 Nano III Differential Scanning Calorimeter (Calorimetry Sciences Corp, USA) und der zugehörigen DSCRun Software durchgeführt. Sowohl Heiz- als auch Abkühlrate bei den Scans betrug  $\Delta = 1^\circ\text{C}/\text{min}$  über einen Temperaturbereich  $25^\circ\text{C} - 110^\circ\text{C}$ . Für die Messungen wurden alle Proteinlösungen auf eine Konzentration von  $1\text{ mg/ml}$  mit entsprechendem Puffer eingestellt, da hohe Proteinkonzentrationen aufgrund der sehr dünnen Messkapillaren nicht verwendet werden können. Als Referenzlösung wurde der proteinfreie Diafiltrationspuffer verwendet. Alle Messungen wurden bei einem Druck von  $3\text{ atm}$  durchgeführt. Im Anschluss wurde jede Probe ein weiteres Mal unter den selben Bedingungen erhitzt und die resultierende Kurve als Basislinie vom ersten Lauf subtrahiert. Die resultierende Kurve gibt Auskunft über Schmelztemperatur  $T_m$ , sowie Enthalpie ( $\Delta H_m$ ) und Entropie ( $\Delta S_m$ ) des Entfaltungsprozesses, normalisiert auf die Proteinkonzentration.

### 3.2.3.13 Bestimmung der Peroxidzahl

Die Bestimmung der Peroxidzahl erfolgte nach Ph. Eur. 4.6. als potentiometrische Endpunkttitration mit Natriumthiosulfat auf einem Autosampler 730 mit Dosimat 721 und der Software TiNet 2.4 (Metrohm GmbH, Deutschland). Die Proben wurden in Eisessig gelöst. Nach Zugabe von Kaliumiodid und  $\text{CO}_2$  freiem Wasser wurde freigesetztes Iod aus der Redoxreaktion mit Thiosulfat zurücktitriert. Die Endpunktbestimmung erfolgte potentiometrisch mit einer Platinelektrode (Metrohm GmbH, Deutschland).

### 3.2.3.14 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Kalorimetrische Messungen wurden mit dem VP-ITC Kalorimeter (MicroCal, USA) und zugehöriger Software Origin durchgeführt. Vor der Messung wurden Proben- sowie Referenzlösung durch einen  $0,22\ \mu\text{m}$  Filter sterilfiltriert und anschließend für  $3\text{ min}$  mit Hilfe einer Vakuum-Apparatur mit Rührfunktion (MicroCal, USA) entgast. Die Referenzzelle wurde mit gereinigtem Wasser, die Probenzelle mit Proteinlösung gefüllt. Die Tensidlösungen wurden mit dem Diafiltra-

tionspuffer der Proteinlösung hergestellt, um Puffereffekte während der Messung zu vermeiden. Die Injektion der Tensidlösungen erfolgte bei 25°C, wobei jeweils 35 mal 8  $\mu\text{l}$  Tensidlösung über ein Intervall von 300 Sekunden injiziert wurden. Die Referenz-Energie betrug 10 bei allen Experimenten. Blank Titrations von Puffer mit Tensid-Lösung und von Protein-Lösung mit Puffer wurden zur anschließenden Herausrechnung von Verdünnungs- und Demizellisierungseffekten nach derselben Vorschrift vorgenommen. Alle gezeigten Isothermen sind nach Abzug von Demizellisierungseffekten und Verdünnungswärmeeffekten dargestellt.

### 3.2.3.15 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

Für die direkte Messung der Interaktionen zwischen Tensid und Protein wurde ein BIACORE® 3000 (GE Healthcare, USA) verwendet. Mit Hilfe des von der Firma angebotenen Amin-Kopplungskits (EDC/NHS) wurden die Testmoleküle kovalent bei einer maximalen Bindungskapazität von 10000 RU an die aktivierte Dextranmatrix des BIACORE® Sensorchip gekoppelt. Die Injektion erfolgte über 10 min bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Als Laufmittel diente HBS-N. Ethanolamin wurde anschließend zum Blockieren freier aktivierter Bindungsstellen mit gleicher Flussrate injiziert. Die Blockierung aktivierter Bindungsstellen wurde auch für die Referenzzellen ohne Beladung vorgenommen. Für die Proteine wurde eine Chipbeladung von ca. 10.000RU angestrebt, welche als Basislinie für die Messung der Sensorgramme diente.

Die Verdünnungsreihen der Analyten wurden durch serielle Verdünnung der Lösungen mit HBS-N Puffer (0,01M HEPES pH 7,4, 0,15M NaCl; GE Healthcare, USA) hergestellt.

Die Injektion erfolgte bei einer Flussrate von 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  für jeweils 3 min pro Tensid-Konzentration. Zur Regeneration wurde jeweils eine Einzelinjektion von Laufpuffer bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 30 Sekunden und einer Stabilisationszeit von 2 min nach Injektion verwendet. Zur Auswertung wurde die Software BIAevaluation verwendet. Alle Ergebnisse sind nach Subtraktion der Blankwerte dargestellt.

### 3.2.3.16 Ultraschall Resonator Technologie (URT)

Zur Bestimmung der CMC in wässriger und in proteinhaltiger Lösung mittels Ultraschall Resonator Technologie wurde ein ResoScan® (TF Instruments GmbH, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden Verdünnungsreihen von Polysorbat 80 in Wasser, PBS und Cetuximablösung direkt mit dem URT Gerät bei 20°C und einer Basisfrequenz von 7,5MHz vermessen (Probenvolumen 200  $\mu$ l, n=3).

### 3.2.3.17 Rheometrie

Fließkurven wurden mit dem Rheometer MCR 300 (Paar-Physika, Ostfildern, Deutschland) und einem Kegel-Platte System CP 50-2 (50 mm Durchmesser, 2° Kegelneigung, Kegelspitzenabnahme: 47,00  $\mu$ m) aufgenommen. Mit der Temperaturkontrolleinheit TEK 150 P wurde die Probentemperatur konstant auf 20°C gehalten. Für die Messung wurde jeweils 1 ml Probe auf die temperierte Platte gegeben, verteilt und anschließend die Viskositätswerte in Abhängigkeit von der Scherrate von 0 - 1000s<sup>-1</sup> bestimmt. Als charakteristischer Viskositätswert wurde der Wert bei einer Scherrate von 100s<sup>-1</sup> verwendet.

### 3.2.3.18 Oberflächenspannungsmessungen

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurde ein K100 MK2 Tensiometer (Krüss, Hamburg, Deutschland) mit einem F12 Thermostat (Julabo, Deutschland) und der Software LabDesk 3.1 (Krüss, Deutschland) benutzt. Aufgrund der teilweise nur geringen Volumina, die zur Messung zur Verfügung standen, wurde ein 5 ml-Platin-Iridium-Gefäß sowie ein Platin-Iridium-Stab (Krüss, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung der CMC wurden Verdünnungsreihen von Polysorbat 80 in Standard-Formulierungspuffer, sowie von Polysorbat 80 in der Cetuximab-Formulierung hergestellt. Als Referenzwert wurde zwischen jeder Verdünnungsreihe der Wasserwert ( $72,0 \pm 0,1$  mN/mm<sup>2</sup>) bestimmt. Die Dauer einer Messung betrug durchschnittlich 300s. Zur Bestimmung der CMC wurde die Oberflächenspannung der einzelnen Verdünnungen gegen den Logarithmus der Tensidkonzentration aufgetragen und der Schnittpunkt der beiden resultierenden Geraden ermittelt.



## Kapitel 4

### Ergebnisse und Diskussion

#### 4.1 Machbarkeitsstudie: Aufkonzentrierung von Cetuximab

Hochkonzentrierte Proteinformulierungen mit einem Gehalt über 100 mg/ml sind aktuell von großem Interesse in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere, um eine subkutane Applikation durch den Patienten selbst zu ermöglichen. Dabei sind die Proteinaggregation und Partikelbildung, sowie eine erhöhte Viskosität die größten Hürden. Die Aggregation stellt ein erhebliches Qualitätsproblem dar und kann Schwierigkeiten im Fill-/Finish bereiten, sowie Immunreaktionen hervorrufen [Schellekens und Casadevall, 2004]. Die hohe Viskosität hat einen großen Einfluss auf Prozessierbarkeit und Analysierbarkeit der Zubereitungen [Shire et al., 2004] und auch auf die anschließende Applizierbarkeit durch dünne Kanülen, wie sie für eine subkutane Applikation erforderlich sind.

Für die Aufkonzentrierung der Proteinarzneistofflösungen kommen unterschiedliche Prozesse, wie Ultrafiltration, Fällung/Trocknung und Wiederaufnehmen in weniger Lösungsmittel, Lösungsmittelentzug, Chromatographie- und Dialysetechniken in Frage [Andya et al., 2001; Bollag et al., 1996; Dani et al., 2007; Eppler et al., 2011; Harris et al., 2004; Pohl, 1990; Shire et al., 2004]. Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war die Aufkonzentrierung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab. Neben Etablierung und Optimierung der Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration als Standardverfahren wurde auch die Aufkonzentrierung mittels einer partiellen Gefriertrocknung als neue Alternative untersucht. Ziel der

Versuchsreihen war es, eine möglichst hochkonzentrierte Formulierung zu gewinnen und dabei die Praktikabilität der Konzentrierungsverfahren und die Protein-stabilität zu untersuchen.

#### 4.1.1 Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Ultrafiltration

Grundprinzip der Ultrafiltration ist Abtrennung bzw. Aufkonzentrierung von Lösungsbestandteilen im Größenbereich von ca. 1 bis 1000 kD. Bei modernen Tangentialflussfiltrations(TFF)anlagen hängt dabei die Filtrationsleistung und die Gutbelastung entscheidend von folgenden Parametern ab: Verwendete Membran (incl. Fläche, Material, Cut-Off), Transmembrandruck (TMP), Crossflow (CF), Diafiltrationsdesign [Rubin und Christy, 2002; Brose et al., 2002].

Um diese Parameter zu optimieren, stehen kommerzielle Systeme zur Verfügung. So ist die ÄKTAcrossflow™, welche im Rahmen dieser Studien zum Einsatz kam, eine vollautomatische Anlage, die zur Prozessoptimierung von Ultrafiltrationsvorgängen, Zellernten und auch Normalflussfiltrationen eingesetzt wird. Zusammen mit der zugehörigen Software ermöglicht die ÄKTAcrossflow™ eine schnelle und effektive Optimierung der Filtrationsparameter in wenigen Läufen. In vorangegangenen Untersuchungen wurde auf einer Millipore LabScale™-Anlage ein Standardprozess für die Aufkonzentrierung bis ca. 150 mg/ml entwickelt [Matheus, 2006a]. Mit Hilfe der ÄKTAcrossflow™ sollte der Prozess überprüft und optimiert werden. Gleichzeitig sollte die Frage geklärt werden, ob die maximal erreichbare Proteinkonzentration noch erhöht werden kann, da die ÄKTAcrossflow™ über stärkere Pumpen (Kolbenhub-Pumpen) und ein mechanisch stabileres Leitungssystem im Vergleich zur Milliporeanlage verfügt.

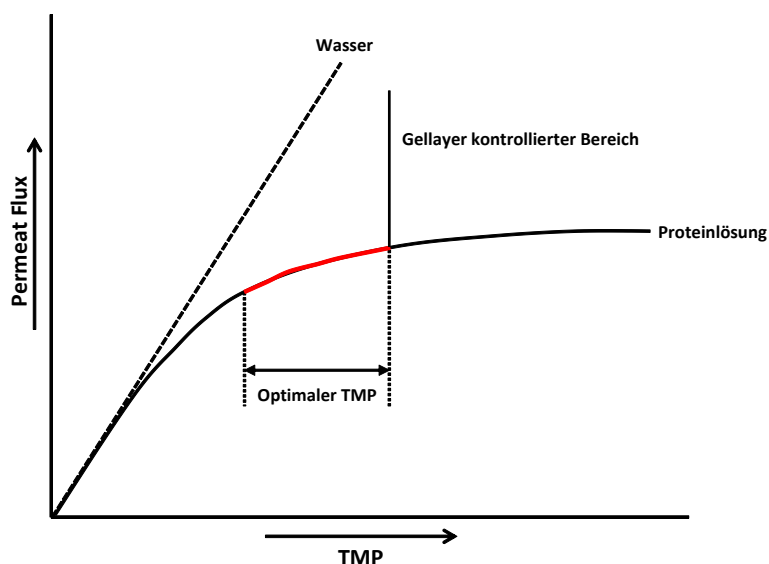
##### 4.1.1.1 Optimierung des TFF Prozesses mit Hilfe der ÄKTAcrossflow™

Die Optimierung des Filtrationsprozesses unterteilt sich in mehrere Teilschritte:

###### a) TMP-Scouting Lauf bei Startkonzentration

Das TMP-Scouting dient dazu, die effizientesten Parameter für eine Ultra-/Diafiltration zu ermitteln, ohne dabei allerdings Rücksicht auf die Stabilität des zu

prozessierenden Proteins zu nehmen. Bei unterschiedlichem Crossflow wird der Flux durch die Membran bei verschiedenen Sollwerten für den TMP bestimmt. Dabei wird die Abhängigkeit des Fluxes von den beiden Parametern erkennbar. Zu Beginn eines Filtrationslaufes nimmt er bei gegebenem CF linear mit dem TMP zu. Durch die Bildung einer Gelschicht auf der Membran wird der Permeatflux von dieser und nicht mehr durch den TMP bestimmt (Abb. 4.1). In der gellayerkontrollierten Region bleibt der Flux dann nahezu konstant bei weiterer Erhöhung des TMP. Der optimale TMP-Bereich befindet sich in dem Übergang zwischen druckabhängiger und druckunabhängiger Region. Um möglichst kurze Prozesszeiten zu erreichen, sollte außerdem der CF gewählt werden, der den höchsten Flux ergibt.



**Abbildung 4.1:** Schema der Abhängigkeit des Permeatflux vom Transmembrandruck bei konstantem Crossflow in der Tangentialflussfiltration (nach ÄKTAcrossflow™ Method Handbook).

#### b) Ultrafiltration bis zur Zielkonzentration und Ermittlung der optimalen Diafiltrationskonzentration aus dem Ultrafiltrationslauf (Diafiltration-Time-Optimization)

Mit der Diafiltration-Time-Optimization lässt sich der optimale Proteinkonzentrationsbereich für die kürzeste Diafiltrationsdauer ermitteln, so eine Diafiltration vorgesehen ist. Dazu wird der Zusammenhang zwischen Konzentrationsfaktor und Flux herangezogen. Es wird ein Lauf mit den zuvor ermittelten optimalen

Parametern für TMP und CF durchgeführt. Das Maximum der Auftragung des Produktes aus Konzentrationsfaktor und Flux gegen den Konzentrationsfaktor zeigt den Konzentrationsfaktor an, für welchen die kürzeste Diafiltrationsdauer resultiert.

#### **c) TMP- Scouting-Lauf bei Zielkonzentration**

Ein weiteres Scouting bei Zielkonzentration wird zur Einstellung der optimalen Prozessparameter für die schon höher konzentrierte Proteinlösung durchgeführt. Aufgrund möglicher Erhöhung der Viskosität und einer Membranverblockung durch aggregiertes Protein ändern sich die Filtrationsoptima im Verlauf der Filtration mit steigender Konzentration. Der Prozess wird dahingehend angepasst.

#### **d) Evaluierungslauf mit optimierten Prozessparametern**

Zur Überprüfung der ermittelten Prozessparameter wird abschließend ein Evaluierungslauf durchgeführt.

#### **4.1.1.2 Optimierung der TTF-Bedingungen für Cetuximab mit Hilfe der ÄKTAcrossflow™**

Mit Hilfe des ÄKTA Methoden Wizards wurde ein Ultrafiltrationslauf für die Aufkonzentrierung von Cetuximab bis auf eine Konzentration von 100 mg/ml entwickelt. Hierzu zählen die Optimierung von CF und TMP und die Evaluierung der Diafiltrationskonzentration. Die Formulierung von Cetuximab sowie die gewählten Scouting-Parameter sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 dargestellt. Die Scouting-Läufe wurden sowohl bei der Startkonzentration von 8,2 mg/ml Cetuximab als auch bei der Zielkonzentration von 100 mg/ml mit einer KVICK START™ Membran, 30kD, 50 cm<sup>2</sup> durchgeführt.

Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen das Ergebnis der Scouting-Läufe für die beiden getesteten Konzentrationen. Hierbei ist der resultierende Flux bei den jeweils eingestellten CF-Werten gegen den TMP aufgetragen. Die Membran zeigt bei einer Proteinkonzentration von 8,2 mg/ml sowohl mit zunehmendem CF als auch TMP einen Anstieg des Permeatfluxes. Für einen eingestellten CF von 2,0 bar steigt der

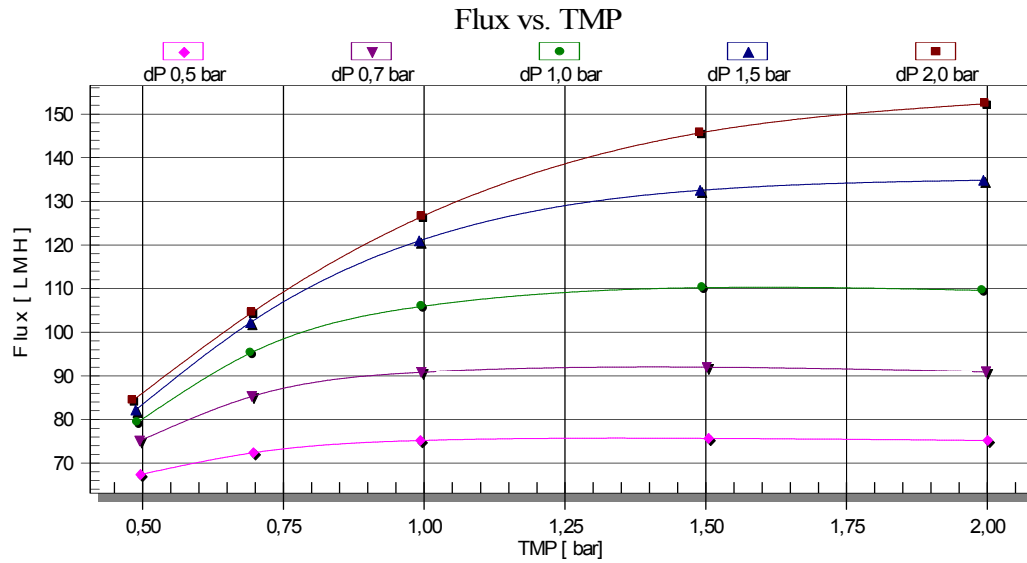
**Tabelle 4.1:** Cetuximabformulierung für das TMP Scouting mit einer 30kD KVICK START™ Membran auf der ÄKTAcrossflow™.

Wirkstoff / Hilfsstoff	Startkonzentration	Zielkonzentration
Cetuximab	8,2 mg/ml	100 mg/ml
Natrium-Dihydrogenphosphat * 2H <sub>2</sub> O	0,40 mg/ml	0,40 mg/ml
Dinatrium-Hydrogenphosphat * 2H <sub>2</sub> O	1,32 mg/ml	1,32 mg/ml
Natriumchlorid	8,48 mg/ml	8,48 mg/ml
pH	7,2	7,2

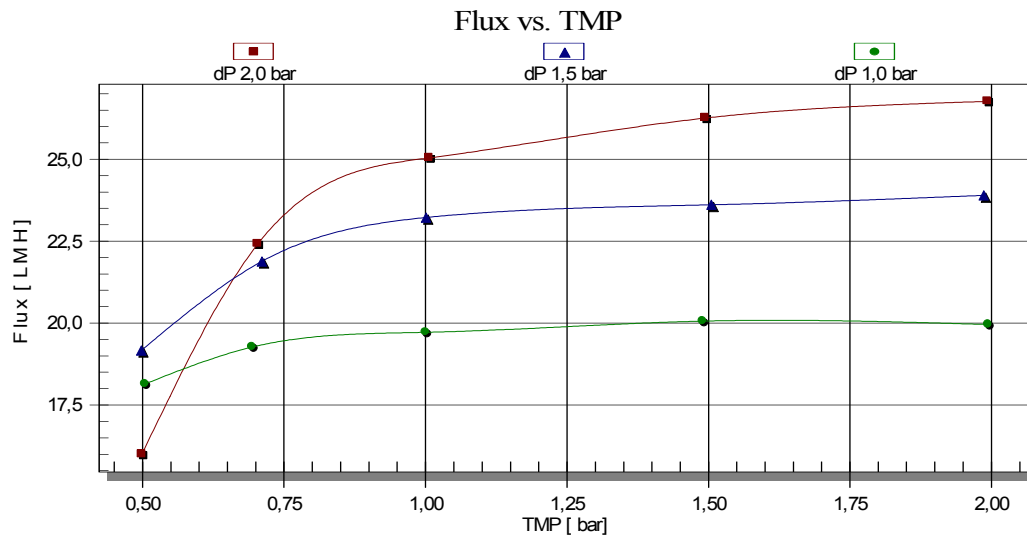
**Tabelle 4.2:** Parameter für die TMP Scouting-Läufe für Cetuximab bei 8,2 mg/ml und 100 mg/ml in PBS pH 7,2 mit ÄKTAcrossflow™ und einer 30kD KVICK START™ PES Membran.

Konzentration	CF $\Delta P$ [bar]	TMP Vorgabe [bar]
8.2 mg/ml (130 ml)	0,5	0,5 / 0,7 / 1,0 / 1,5 / 2,0
	0,7	
	1,0	
	1,5	
	2,0	
100 mg/ml (130 ml)	1,0	0,5 / 0,7 / 1,0 / 1,5 / 2,0
	1,5	
	2,0	

Flux beispielsweise von  $85 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  bei einem TMP von 0,5 bar, auf  $152 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  bei einem TMP von 2,0 bar. Alle Kurven flachen mit zunehmendem TMP ab und erreichen ein nahezu druckunabhängiges Plateau. Bei der Startkonzentration von 100 mg/ml ist der Flux mit  $14,5$  bis  $19 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  schon zu Beginn gegenüber der 8,2 mg/ml Formulierung deutlich reduziert. Auffällig ist der stark reduzierte Flux des Scouting-Laufs mit einem CF von 2,0 bar bei geringem TMP, welcher geringer ist, als der Flux bei 1,0 und 1,5 bar CF. Der Permeatflux bei 2,0 bar CF steigt mit zunehmendem TMP stärker an, so dass schon bei dem zweiten eingestellten TMP der Flux höher ist, als der der beiden anderen Scouting-Läufen mit geringerem CF. Aufgrund des anfangs sehr niedrigen TMP von 0,5 bar kann zusätzlich ein inverser Flux durch den starken Druckabfall über die Membran stattfinden, was in der Summe einen reduzierten Flux ergibt. Da der TMP nur



**Abbildung 4.2:** Permeatflux (LMH Liter pro Quadratmeter und Stunde ( $\text{lm}^{-2}\text{h}^{-1}$ )) für 8.2 mg/ml Cetuximab in PBS, pH 7,2, in Abhängigkeit vom TMP für 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 und 2,0 bar CF.

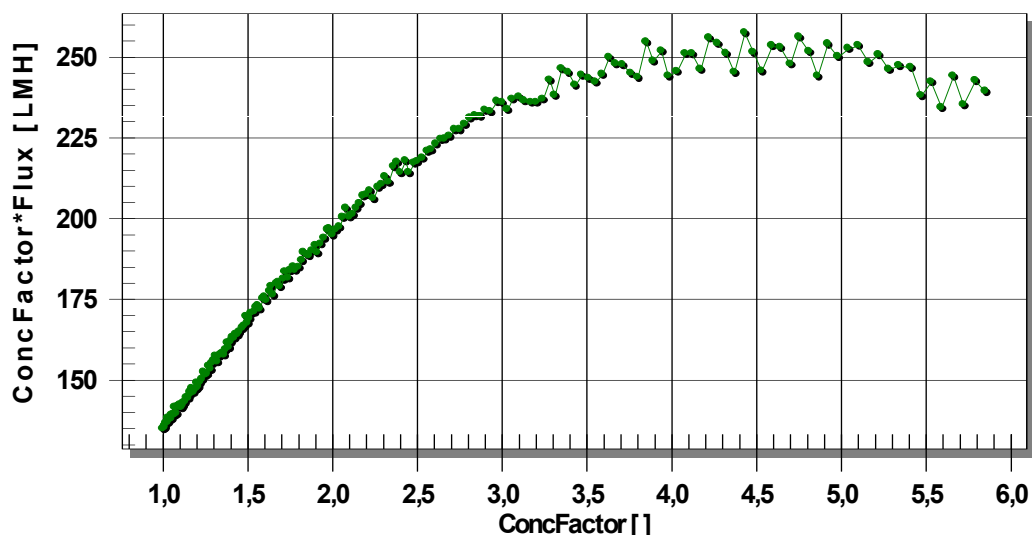


**Abbildung 4.3:** Permeatflux (LMH Liter pro Quadratmeter und Stunde ( $\text{lm}^{-2}\text{h}^{-1}$ )) für 100 mg/ml Cetuximab in PBS pH 7,2, in Abhängigkeit von TMP für 1,0, 1,5 und 2,0 bar CF.

den durchschnittlichen Druck, der an der Membran herrscht, widerspiegelt, bedeutet dies, dass z.B. am Einlass der Membran der Druck noch hoch genug ist, um eine entsprechende Menge an Filtrat retentatseitig abzapfen zu können. Am Ende der Membran ist der Druck allerdings schon so weit abgefallen, dass es einen

inversen Rückstrom des Permeats in das Retentat gibt, wenn der Permeatdruck höher ist, als der retentatseitige Druck auf die Membran. Die ermittelten Drücke für eine optimale Filtration sind somit ein TMP von 1,5 bar bei einem Crossflow von 2,0 bar ( $\Delta P$ ) für Ultrafiltration 1 und Diafiltration und ein TMP von 1,0 bar bei einem Crossflow von 2,0 bar für die Ultrafiltration 2. Diese Parameter liegen etwas über den ermittelten Parametern durch Rosenberg, welche ebenfalls eine Methodenoptimierung mit ÄKTAcrossflow™ durchführte [Rosenberg et al., 2009].

Das im Zuge der Aufkonzentrierung der Cetuximablösung auf die Zielkonzentration von 100 mg/ml resultierende Diagramm des Produktes aus Konzentrationsfaktor und Flux bei den optimierten Bedingungen gegen den Konzentrationsfaktor ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Nach einem linearen Ansteigen nimmt die Steigung der Kurve ab einem Konzentrationsfaktor von 2 langsam ab, bis sie bei einem Konzentrationsfaktor von 4,5 (entspricht 37 mg/ml Cetuximab) ein Plateau erreicht und anschließend wieder abfällt. Bei der Konzentration im Plateaubereich kann eine Diafiltration mit dem optimalen Verhältnis von Flux zu auszutauschender Puffermenge durchgeführt werden.



**Abbildung 4.4:** Diafiltrationszeitoptimierung zur Ermittlung der optimalen Diafiltrations-Konzentration bei einem TMP von 1,5 bar und einem CF von 2,0 bar: Konzentrationsfaktor\*Flux in Abhängigkeit vom Konzentrationsfaktor für die Aufkonzentrierung von Cetuximab von 8,2 mg/ml auf 100 mg/ml.

#### 4.1.1.3 Vergleichender Filtrationstest auf Millipore LabScale™-Anlage und ÄKTAcrossflow™

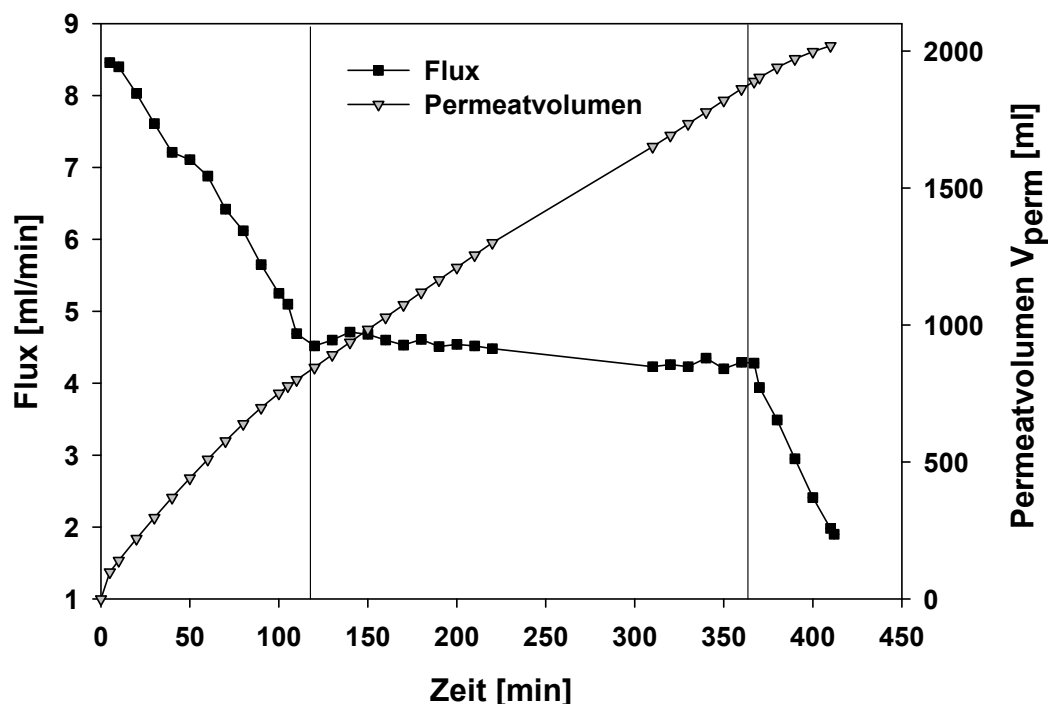
Um zu untersuchen, inwieweit die optimierten Parameter von der ÄKTAcrossflow™ auf andere TFF-Anlagen übertragbar sind, wurde ein Ultra-/Diafiltrationslauf von 11 Cetuximab 8,2 mg/ml in PBS pH 7,2 mit den optimierten Parametern sowohl auf einer Millipore LabScale™ Anlage als auch auf der ÄKTAcrossflow™ (Membran: KVICK START™ 30 kD) durchgeführt und in PBS, pH 6,0 und 145 mM NaCl umgepuffert. Als Vergleichsparameter dienten die Prozesszeiten und die Integrität des Proteins, analysiert mittels Trübung und Monomergehalt. Auf der manuell regulierbaren Millipore LabScale™ -Anlage wurden Ein- und Auslassdruck permanent nachgeregelt, sowie alle 10 Minuten der Permeatfluss bestimmt, so dass sich für den TMP und den CF, analog zur ÄKTAcrossflow™, konstante Werte ergeben. Die laufende Berechnung der Konzentration und des Filtrationsendpunktes sollte über die Bestimmung des Permeatvolumens vorgenommen werden, wie es bei ÄKTAcrossflow™ standardmäßig erfolgt. Die tatsächliche Konzentration wurde UV-metrisch an Proben vor Prozessbeginn, nach dem ersten Ultrafiltrationsschritt und nach Prozessende ermittelt und die Praktikabilität der volumetrischen Endpunktbestimmung beurteilt.

Die volumetrische Bestimmung durch Messung des Permeatvolumens, um eine Endkonzentration von 100 mg/ml zu erhalten, erwies sich als nicht praktikabel für Cetuximab. Die resultierende Endkonzentration war wesentlich niedriger als errechnet. Der Gesamtprozess dauerte auf der ÄKTAcrossflow™ und der Millipore LabScale™ -Anlage jeweils 400 Minuten bei Endkonzentrationen von 88,4 mg/ml bzw. 75,3 mg/ml. Um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten, sollte die Konzentration künftig weiterhin per In-Prozess-Kontrolle des Retentates ermittelt und der Prozess bei der gewünschten Konzentration gestoppt werden.

Erwartungsgemäß nimmt der Flux auf der Millipore LabScale™ -Anlage während der Ultrafiltration (0-120 min) über die Zeit ab (Abb. 4.5), da die Viskosität der eingesetzten Proteinlösung ansteigt. Während der Diafiltration (120-370 min) bleibt der Permeatfluss annähernd konstant. Im zweiten Ultrafiltrationsschritt nimmt der Permeatfluss mit steigender Proteinkonzentration und damit verbun-



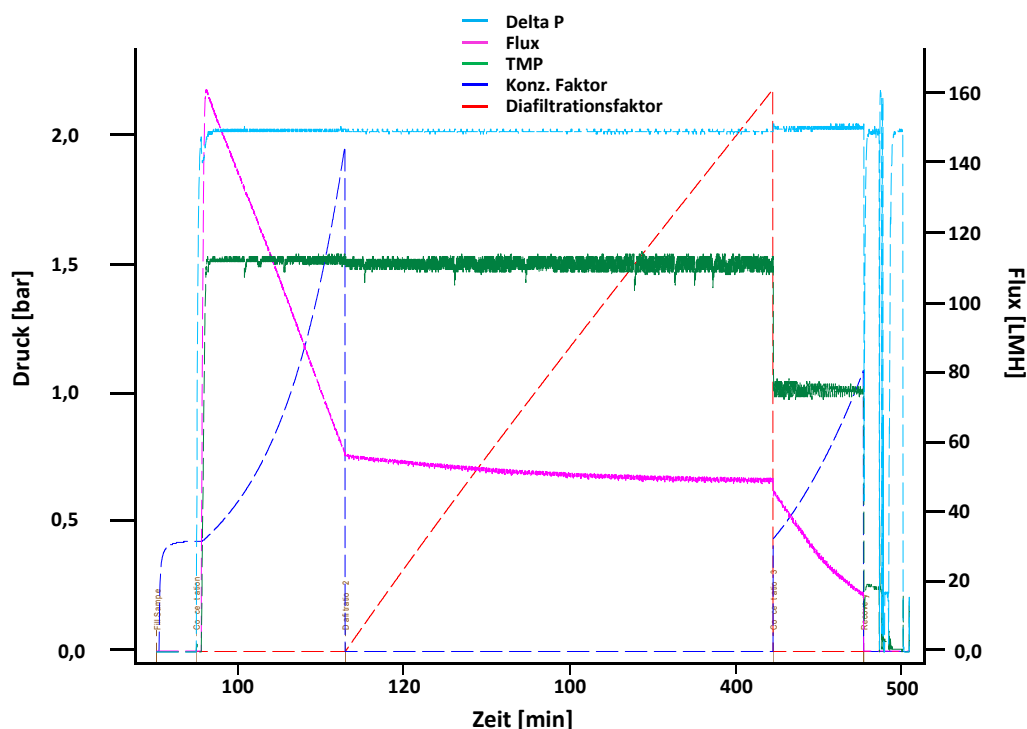
dener erhöhter Viskosität und Gelschichtbildung weiter ab und beträgt am Prozessende nur noch 2 ml/min.



**Abbildung 4.5:** TFF-Prozess der Aufkonzentrierung und Umpufferung von Cetuximab von 8,2 mg/ml, in PBS pH 7,2 (1000ml) auf 100 mg/ml in PBS, pH 6,0; Permeatvolumen und -flux über die Zeit auf der Millipore LabScale™ -Anlage.

Auch für ÄKTAcrossflow™ ist das Absinken des Flux mit steigender Proteinkonzentration bei gleichbleibendem TMP und CF sehr gut nachzuverfolgen (Abb. 4.6). Der leichte Fluxabfall während der Diafiltration kann sowohl für ÄKTAcrossflow™ als auch für die LabScale™ TFF mit der Änderung des pH-Wertes während der Diafiltration erklärt werden.

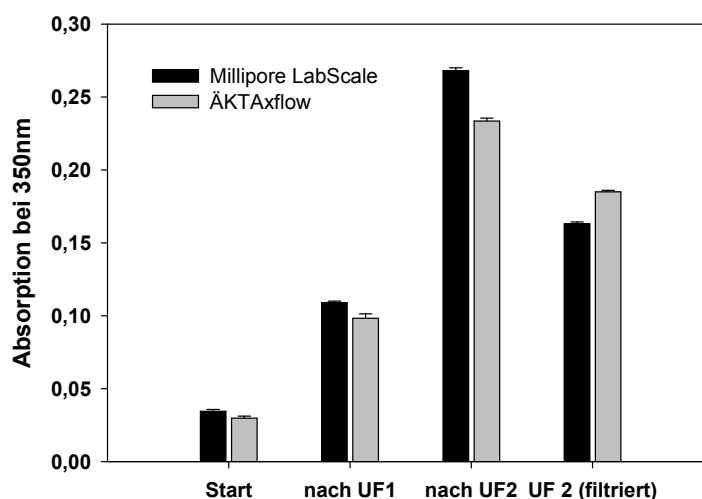
Die Änderung des Lösungs-pH-Wertes während der Diafiltration führt zur Veränderung der Ladung sowohl des Antikörpers als auch der verwendeten Membran. Mit sinkendem pH und damit Entfernung vom pI (für Cetuximab 8,3 [Matheis, 2010; Eppler, 2012]) steigt die Viskosität von Cetuximab an, wodurch sich der Permeatflux verringert. Die Viskositätserhöhung wird vor allem abstoßenden elektrostatischen Interaktionen zugesprochen [Matheis, 2006a]. Im Gegensatz zu Matheis beschreiben z.B. Liu und Huismann den gegenteiligen Fall, bei dem



**Abbildung 4.6:** TFF-Prozess der Aufkonzentrierung und Umpufferung von Cetuximab von 8,2 mg/ml, in PBS pH 7,2 (1000 ml) auf 100 mg/ml in PBS, pH 6,0; Permeatvolumen und -flux über die Zeit auf der ÄKTAcrossflow™.

die Viskosität einer Antikörperlösung bei einem pH nahe des pI und bei geringer Ionenstärke zunimmt. Hier wird die Viskositätszunahme mit anziehenden elektrostatischen Interaktionen erklärt, was auch zu einer konzentrationsabhängig erhöhten Selbstassoziation führte [Huisman et al., 2000; Liu et al., 2005]. Der Permeatflux bei der Cetuximabfiltration nimmt außerdem aufgrund des mit zunehmender Filtration steigenden Membranwiderstandes, verursacht durch Verblockung und Konzentrationspolarisation im Laufe der Filtration immer weiter ab. Durch die Konzentrationspolarisation bildet sich an der Membran ein Konzentrationsgefälle von nicht passierbaren Lösungsbestandteilen. Vor allem die Viskositäts-erhöhung durch Aufkonzentrierung des Proteins sowie die Gelpolarisation durch Überschreitung der Löslichkeit der Solute sind hauptverantwortlich für das Absinken des Permeatflux während der Ultrafiltration [Aimar und Field, 1992; Michaels und Matson, 1985]. Eine Verblockung der Membran durch Proteinaggregate kann zusätzlich zur Reduktion des Flux führen. Verblockung geschieht unabhängig von der Aufkonzentrierung der Solute und resultiert in irreversiblen

Modifikationen auf der Membran [Friess et al., 2010]. Anhand der Trübung war zu erkennen, dass sich während der Filtration Aggregate, die die Membran verblocken können, bildeten (Abb. 4.7). Die Trübung des unfiltrierten Retentats nach der Ultrafiltration ist für beide Filtrationsprozesse erhöht (0,24 bzw. 0,26), im Gegensatz zur sterilfiltrierten aufkonzentrierten Lösung (0,16 bzw. 0,18). Die Ionenstärke und der pH der Lösung verändern sowohl die Ladung von Protein als auch von der Membran. PES-Membranen sind im vorliegenden pH-Bereich negativ geladen [Salgin, 2007], während Cetuximab bei einem pH-Wert von 6,0 positiv geladen ist. Die resultierende elektrostatische Anziehung kann zusätzlich zu einer vermehrten Ablagerung des Proteins bzw. gebildeter Aggregate an der Membran und so zur Membranverblockung beitragen [Burns und van Reis, 1999]. Absorptionsmessungen bei 350 nm im Retentat zu Beginn bei 8,2 mg/ml, nach der ersten Ultrafiltration bei 37 mg/ml und am Ende des Prozesses belegen eine steigende Trübung der Proteinlösung mit steigender Prozessdauer und Aufkonzentrierung der Lösung (Abb. 4.7). Die Lichttransmission sinkt zum einen mit steigender Proteinkonzentration und zum anderen durch die steigende Anzahl an Partikeln, welche während des Filtrationsprozesses gebildet wurden [Carpenter et al., 1999; Persson und Gekas, 1994; Rosenberg et al., 2009; Sukumar et al., 2004].



**Abbildung 4.7:** Trübung von Cetuximab-Lösungen aus den Filtrationsläufen mit Millipore und ÄKTAcrossflow™ jeweils zu Beginn der TFF (8,2 mg/ml), nach Ultrafiltration 1 (37 mg/ml) und Ultrafiltration 2 (88,4 bzw. 75,3 mg/ml).

Die Bildung von Aggregatpartikeln kann auch an der Abnahme der Trübung nach Filtration des Retentates gesehen werden. Die Trübung der filtrierten prozessierten Lösungen beträgt bei beiden Formulierungen ca. 180 mAU und korreliert mit der gegenüber dem Ausgangswert um den Faktor 10 höheren Proteinkonzentration. Die Trübung des unfiltrierten Retentates in der LabScale™ TFF ist am Prozessende bei geringerer Proteinkonzentration (75 mg/ml) geringfügig höher als für die Lösung aus der ÄKTAcrossflow™ (88 mg/ml) und deutet auf eine vermehrte Entstehung unlöslicher Aggregaten in der LabScale™ TFF hin. Eventuell spielt hier der unterschiedliche Pumpentyp (Kolbenhubpumpen in der ÄKTAcrossflow™ im Vergleich zu Diaphragmapumpe in der Millipore LabScale™-Anlage) eine Rolle, da die Prozessbedingungen sonst gleich waren [Vandanjon et al., 1999]. Kolbenpumpen wird im Allgemeinen ein höherer Scherstress auf das Prozessmaterial zugesprochen. Beispielsweise beschrieben Cromwell et al. die Zunahme von Partikeln und Trübung in einer IgG Lösung durch eine Kolbenpumpe im Gegensatz zu einer Diaphragmapumpe während der Abfüllung [Cromwell et al., 2006]. Neben dem Scherstress führt die Entstehung von Luftblasen durch Kavitation beim Pumpen zu einer vergrößerten Luft/Wasser-Grenzfläche an der die Proteine aggregieren können [Gomme et al., 2006]. Rosenberg verglich speziell den Einfluss der Kolbenpumpen der ÄKTAcrossflow™ auf die Stabilität eines mAbs mit einer Diaphragmapumpe. Der nur geringfügige Anstieg der Trübung und das Ausbleiben der Bildung löslicher Aggregate bei Prozessierung mit den Kolbenpumpen [Rosenberg, 2010] unterstützen das mit Cetuximab gewonnene Ergebnis. Somit kann der optimierte Prozess für Cetuximab verwendet werden. Die angelegten Druckparameter, vor allem der CF, liegen weit über dem, was zuvor im Standardprozess verwendet wurde. Der Prozess läuft erheblich schneller ab. Für den Standardprozess wurde ein CF von 1 bar nicht überschritten, bei einem TMP von 1 bzw. 1,5 bar für Ultrafiltration bzw. Diafiltration (vgl. Kap. 3.2.1.1). Die mit dem Standardprozess generierten Lösungen mit Konzentrationen von bis zu 100 mg/ml zur Weiterverarbeitung in anderen Experimenten zeigten einen Monomergehalt von über 99 %. Laut Meireles spielen vor allem Crossflow, Zeit und die Temperatur eine große Rolle bei der Denaturierung von Proteinen in der Filtration [Meireles et al., 1991]. Obwohl der Crossflow des neuen Prozesses doppelt so hoch ist, scheint der dadurch entstehende erhöhte Scherstress unkritisch. Der Permeatflux konnte durch den erhöhten CF deutlich gesteigert werden, da

die Konzentrationspolarisation des Antikörpers an der Membran und die damit verbundene Ausbildung einer Gelschicht reduziert wird [Colton et al., 2002]. Dadurch verringert sich die Prozesszeit und das Protein ist dem Scherstress nur für kürzere Zeit ausgesetzt.

#### 4.1.1.4 Einfluss von pH und NaCl Konzentration auf den TFF-Prozess

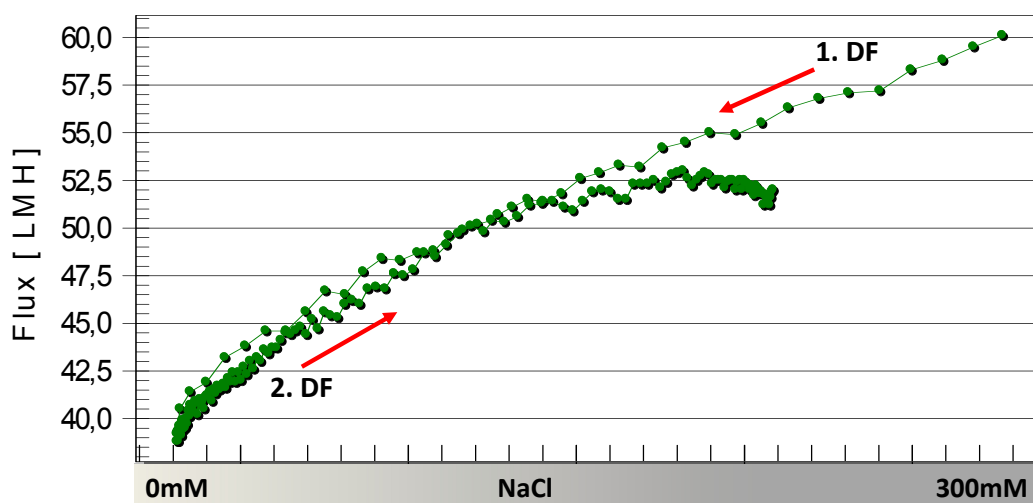
Wie in Kapitel 4.1.1.3 beschrieben beeinflussen Ionenstärke und pH-Wert die Filtrationsleistung. Daher wurde der Einfluss von NaCl und pH-Wert auf die Filtrierbarkeit von Cetuximab, auch vor dem Hintergrund der später angestrebten maximalen Aufkonzentrierung, untersucht. Ausgehend von einer 50 mg/ml Cetuximablösung sollte durch Diafiltration in Lösungen mit verändertem pH-Wert bzw. Ionenstärke der Einfluss auf den Permeatflux mit Hilfe der ÄKTAcrossflow™ direkt dargestellt werden. Hierzu wurde in zwei unterschiedlichen Diafiltrationsprozessen jeweils einmal die Salzkonzentration und einmal der pH bei sonst gleich bleibender Lösungszusammensetzung verändert (Tabelle 4.3). Im Experiment zur Untersuchung des Einfluss der Ionenstärke wurde ausgehend von einem PBS-Puffer mit 300 mM NaCl auf 0 mM NaCl diafiltriert. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration auf 145 mM eingestellt, da dies die Standardpufferkonzentration für die hier verwendeten Cetuximabformulierungen ist. Ausgehend von diesem Puffer (pH 7,2, NaCl 145 mM) wurde anschließend mit derselben Cetuximablösung das pH-Einfluss-Experiment durchgeführt. Hier wurde bei konstanter NaCl-Konzentration (145 mM) auf einen pH von 6,0 und anschließend wieder zurück auf einen pH von 7,2 diafiltriert. Der Diafiltrationsfaktor betrug jeweils 5.

Im Laufe des Diafiltrationsprozesses aus der 300 mM NaCl-Formulierung in die 0 mM NaCl Lösung fiel der Permeatflux durch die Membran von anfangs  $60 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  auf  $35 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  bei einer NaCl-Konzentration von 0 mM (Abb. 4.8). In entsprechender Weise stieg der Flux bei darauffolgender Diafiltration auf 145 mM NaCl wieder an und erreichte am Ende der Diafiltration  $51 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$ .

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen, nimmt der Flux bei einer Veränderung des pH-Wertes von 6,0 nach 7,2 von 53 auf  $58 \text{ lm}^{-2}\text{h}^{-1}$  zu.

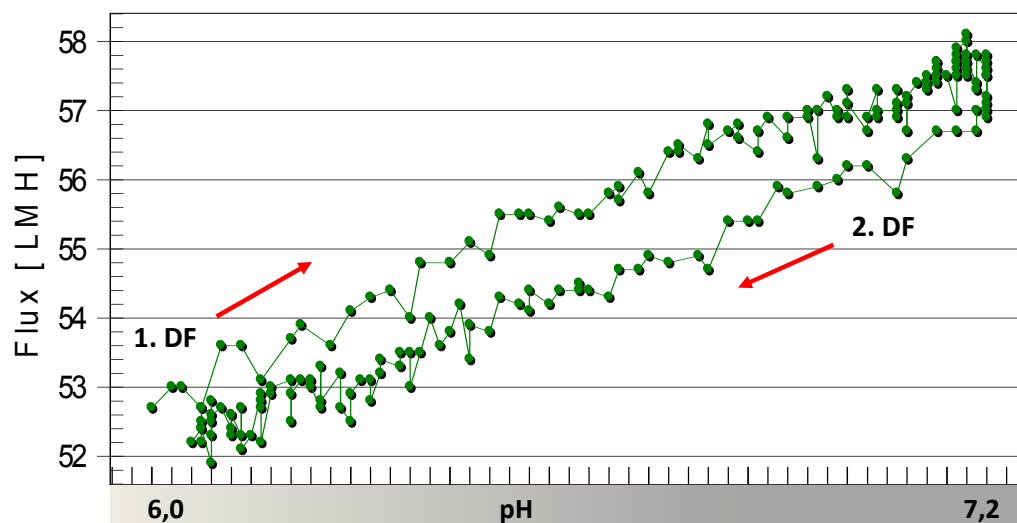
**Tabelle 4.3:** Pufferzusammensetzungen für das pH und NaCl Experiment mit Cetuximab 50 mg/ml in PBS auf der ÄKTAcrossflow™ und einer 30kDa KVICK START™ Membran.

Experiment	Startpuffer	Puffer für Diafiltration 1	Puffer für Diafiltration 2
NaCl	PBS, pH 7,2, NaCl 300 mM	PBS, pH 7,2, NaCl 0 mM	PBS, pH 7,2, NaCl 145 mM
pH	PBS, pH 7,2, NaCl 145 mM	PBS, pH 6,0, NaCl 145 mM	PBS, pH 7,2, NaCl 145 mM



**Abbildung 4.8:** Änderung des Permeatflux von Cetuximab 50 mg/ml mit der NaCl-Konzentration bei pH 6,0 bei einem TMP von 1,5 bar und einem CF von 2,0 bar.

Die pH- und Ionenstärkeabhängigkeit des Fluxes scheinen mit der Viskosität der Lösung während der Filtration zusammenzuhängen, da die Einflüsse reversibel sind. Mit steigender Viskosität kann sich die Ausbildung einer Proteingelschicht auf der Membran verstärken und so den Flux minimieren. Eine irreversible Verblockung der Membran scheint nicht aufzutreten. Die Erhöhung des Flux mit steigender Salzkonzentration kann einer Erniedrigung der Viskosität der Proteinlösung bei erhöhter Ionenstärke zugesprochen werden [Liu et al., 2005]. Messungen von Matheus ergaben eine Viskosität von 2 mPas für eine 50 mg/ml Cetuximab Lösung in PBS/ 145 mM NaCl/ pH 7,2. Eine Erniedrigung der Salzkonzentration



**Abbildung 4.9:** Änderung des Permeatflux von Cetuximab 50 mg/ml in PBS, 145 mM NaCl mit dem pH bei einem TMP von 1,5 bar und einem CF von 2,0 bar.

on bewirkt eine Viskositätserhöhung durch einen partiell abschirmenden Effekt des Chlorid-Anions auf die abstoßenden Kräfte der im untersuchten pH Bereich (pH 5,5 – 8,0) positiv geladenen Antikörpermoleküle zugeschrieben [Matheus, 2006c]. Durch Erhöhung der Ionenstärke wird in der Regel die Viskosität hochkonzentrierter Antikörperformulierungen reduziert [Liu et al., 2005; Shire et al., 2004]. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Viskosität ist protein-spezifisch unterschiedlich [Arvinte und Fauquex, 2002; Liu und Shire, 2002; Matheus, 2006c]. Bei pH-Werten nahe dem isoelektrischen Punkt ist die Viskosität von Cetuximab-Lösungen am Geringsten. Dies wurde den elektrostatischen Abstoßungskräften der Antikörpermoleküle untereinander bei einem pH-Wert unterhalb des pI zugeschrieben [Matheus, 2006c]. Dementsprechend war der gemessene Flux umso höher, je näher der pH-Wert dem pI von Cetuximab von 8,3 kam [Mathes, 2010; Eppler, 2012]. Der viskositätsbeeinflussende Effekt des pH-Wertes bei höherer Salzkonzentration ist relativ klein. Daher ist die Änderung des Fluxes bei pH-Verschiebungen weniger stark ausgeprägt, als bei der Änderung der Salzkonzentration [Aimar und Field, 1992; Liu et al., 2005]. Um Neben der Veränderung der Viskosität mit pH-Wert- und Ionenstärkeverschiebung spielt auch die Änderung bzw. Abschirmung der Ladung der Proteinmoleküle und auch der Membran eine Rolle für den Filtratflux. Die elektrostatische Interaktion der Proteinmoleküle mit

der Membran ist höher, wenn Protein und Membran einen größeren Ladungsunterschied besitzen, was bei pH 6,0 im vorliegenden Experiment der Fall ist. Eine stärkere Anlagerung des Proteins an die Membran kann den Flux reduzieren.

In den beiden Experimenten wurde gezeigt, dass der Flux bei einem NaCl-Gehalt von 300 mM und einem pH von 7,2 in PBS deutlich verbessert werden konnte. Die ermittelten Parameter und die Pufferzusammensetzung wurden nun in einem weiteren Filtrationslauf verwendet, um zu untersuchen, wie weit sich Cetuximab mit Hilfe der TFF-Methode aufkonzentrieren lässt.

#### 4.1.1.5 Evaluierung der maximalen erreichbaren Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels TFF

Nach der Auswahl der optimalen TMP- und CF-Parameter für die TFF von Cetuximab, wurde mit diesen in Tabelle 4.4 zusammengestellten Parametern drei Filtrationsläufe mit der ÄKTAcrossflow™ durchgeführt, um die maximale Aufkonzentrierbarkeit von Cetuximab zu evaluieren:

**Tabelle 4.4:** Übersicht über die gewählten Filtrationsparameter für die Testläufe zur Evaluierung der maximalen Aufkonzentrierbarkeit von Cetuximab mittels TFF auf der ÄKTAcrossflow™.

Schritt	TMP [bar]	Crossflow $\Delta P$ [bar]
Ultrafiltration 1	1,5	2,0
Diafiltration	1,5	2,0
Ultrafiltration 2	1,0	2,0
Material	Cetuximab in PBS, pH 7,2; 145 mM NaCl	
Diafiltrationspuffer	PBS, pH 7,2; NaCl 300 mM	
Membran	KVICK START, 30kDa, 50cm <sup>2</sup>	

**Lauf 1:** Aufkonzentrierung und Diafiltration mit der Standardzusammensetzung des Diafiltrationspuffers von PBS, pH 6,0, 145 mM NaCl

**Lauf 2:** Aufkonzentrierung und Diafiltration mit der für die Permeabilität durch die Membran der Lösung optimalen Zusammensetzung des Diafiltrationspuffers von PBS, pH 7,2, 300 mM NaCl



**Lauf 3:** Aufkonzentrierung und Diafiltration mit der für die Viskosität der Lösung optimalen Zusammensetzung des Diafiltrationspuffers von PBS, pH 7,2, 300 mM NaCl. Zur Optimierung des Flux durch die Membran, Zwischenreinigung der Membran nach der Diafiltration, um die Membran soweit wie möglich von blockierendem Protein zu befreien.

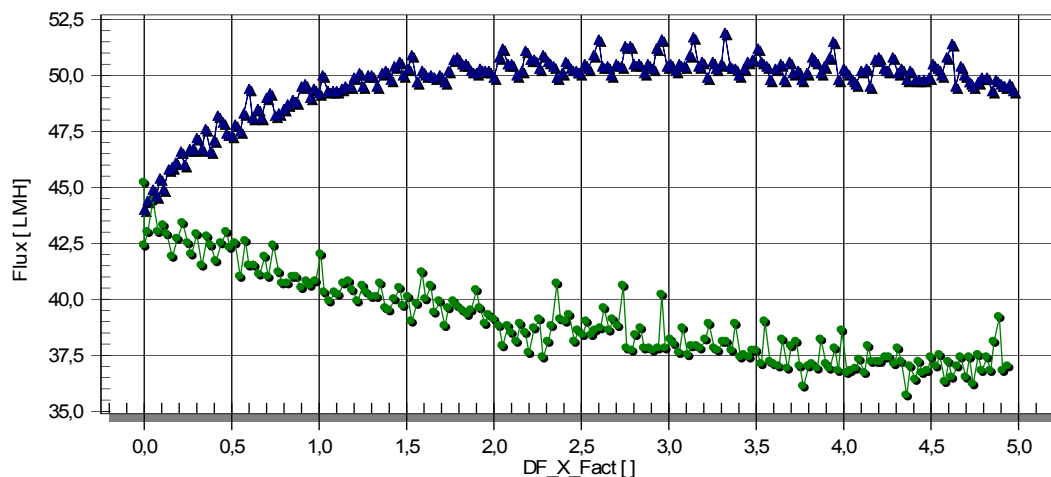
Bei allen drei Filtrationsläufen wurde der finale Ziel-Konzentrationsfaktor so hoch gesetzt, dass die Konzentration real nicht erreicht werden konnte, sondern dass der Prozess durch die geräteinterne Druckkontrolle bei Erreichen eines Maximaldruckes von 5 bar auf die Membran abgebrochen wurde. Die zum Zeitpunkt des automatischen Abbruches erreichte Konzentration stellt die maximal erreichbare Konzentration des jeweiligen Filtrationslaufes dar. Tabelle 4.5 fasst die Unterschiede zwischen den drei Filtrationsläufen zusammen.

**Tabelle 4.5:** Übersicht über die gemessenen Parameter der drei TFF Läufe zur maximalen Aufkonzentrierbarkeit von Cetuximab mit Hilfe der ÄKTAcrossflow™, startend von 8,2 mg/ml, in PBS 145 mM NaCl und pH 7,2.

Parameter	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3
Formulierung nach Diafiltration	145 mM NaCl, pH 6,0	300 mM NaCl, pH 7,2	300 mM NaCl, pH 7,2
Gesamtdauer	750 min	650 min	563 min
Ultrafiltration 1	200 min	230 min	135 min
Diafiltration	370 min	270 min	283 min
Ultrafiltration 2	180 min	150 min	145 min
<b>Erreichte Konzentration</b>	<b>167 mg/ml</b>	<b>179 mg/ml</b>	<b>183 mg/ml</b>
Viskosität nach Ende der Filtration	21,7 mPas	19,3 mPas	19,4 mPas
Monomergehalt	99,8 %	99,7 %	99,7 %
Trübung [A350]	0,998	1,078	1,083

Bei den Filtrationszeiten fällt auf, dass diese mit den optimierten Parametern um ein Vielfaches geringer werden und so Prozesszeit und damit Stress für das Protein reduziert werden kann. Die Diafiltrationszeit ließ sich hierbei um etwa 100 Minuten verkürzen. Obwohl bei Lauf 2 und 3 eine etwas höhere Cetuximab-

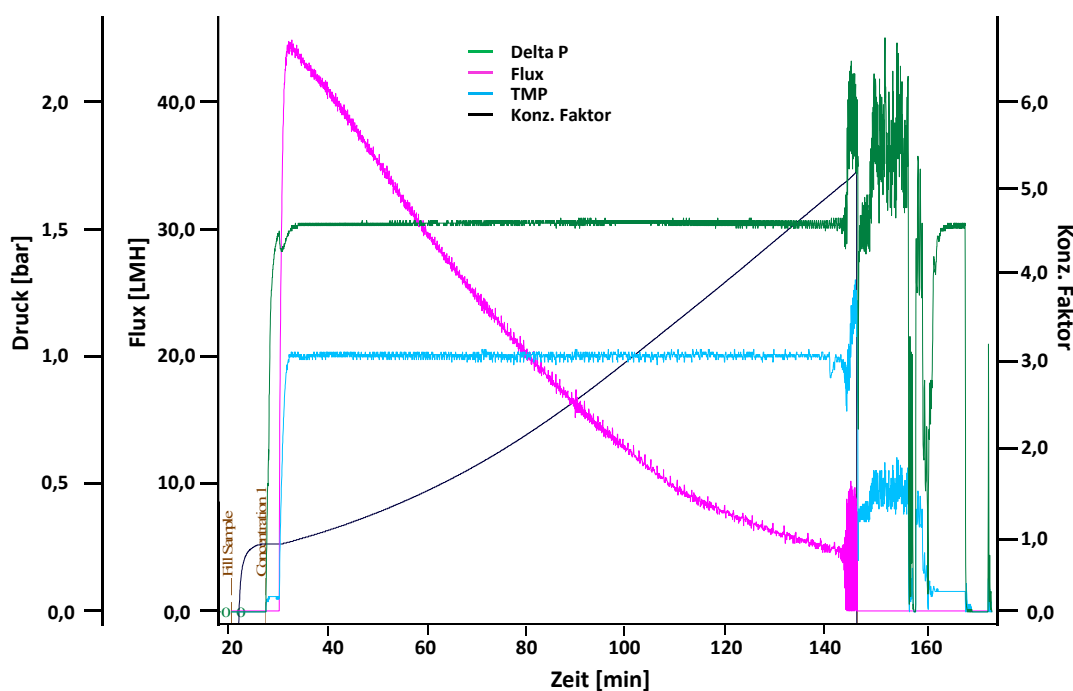
konzentration erreicht wurde, war die Zeit für die Ultrafiltration um mindestens 30 Minuten kürzer im Vergleich zur nicht optimierten Formulierung in Lauf 1.



**Abbildung 4.10:** Flux in Abhängigkeit vom Diafiltrationsfaktor während der Diafiltration von Cetuximab bei einem Konzentrationsfaktor von 4,5 (entspr. 37 mg/ml Cetuximab) auf ÄKTAcrossflow™; ● Lauf 1 (unten): nicht optimierte Pufferzusammensetzung für den Flux (NaCl 145 mM, pH 6,0); ▲ Lauf 2 (oben): optimierte Pufferzusammensetzung zur Erhöhung des Flux (PBS, pH 7,2, 300 mM NaCl).

Abbildung 4.10 zeigt, wie sich der Flux durch die Membran bei Lauf 1 und 2 während der Diafiltration verhält. Der unterschiedliche Kurvenverlauf ist auf die Pufferzusammensetzung der Diafiltrationspuffer zurückzuführen. Mit steigender Salzkonzentration und steigendem pH (Lauf 2) nimmt der Flux im Laufe der Diafiltration zu. Unterschiede bis zu 12,5 l/m<sup>2</sup>h sind gegen Ende der Diafiltration zwischen Lauf 1 und Lauf 2 erkennbar.

In Abbildung 4.11 ist exemplarisch der Verlauf der zweiten Ultrafiltrationsstufe von Lauf 3 der Untersuchungen zur maximalen Aufkonzentrierung von Cetuximab von 40 mg/ml auf die erreichbare Endkonzentration dargestellt. Kurz vor Erreichen von 150 min Filtrationszeit ist erkennbar, dass TMP und CF, ebenso wie der Membranflux, anfangen, stark zu schwanken. Der Abbruch der Filtrationen erfolgte, wie bei allen drei Läufen, automatisch durch die Anlage bei Erreichen dieses Zustandes. Die final erreichte Proteinkonzentration für Lauf 3 betrug nach automatischem Abbruch des Prozesses 183 mg/ml. Der Konzentrationsunterschied zwischen Lauf 2 und 3 ist mit 4 mg/ml Unterschied nur minimal, in Lauf 1 wurde



**Abbildung 4.11:** Ultrafiltrationsschritt 2 von Lauf 3: Ermittlung des Endes der Ultrafiltration von Cetuximab in PBS, pH 7,2 mit 300 mM NaCl zur Erreichung der Maximalkonzentration auf ÄKTAcrossflow™; das Ende ist erkennbar durch Entgleisen von TMP und  $\Delta P$  und dem Absinken des Flux auf 0. Die Anlage schaltete am Ende der aufgezeichneten Daten automatisch ab.

hingegen nur 167 mg/ml erreicht, was einen Unterschied von rund 16 mg/ml zu Lauf 3 ausmacht. Die höhere Viskosität der Lösung von Lauf 1 bei gleichzeitig geringerer Proteinkonzentration spiegelt den Einfluss der geringeren Ionenstärke und pH wieder. Durch die erhöhte Viskosität und dadurch resultierende Bildung einer Gelschicht auf der Membran bzw. deren Verblockung kann der "vorzeitige" Abbruch der Filtration schon bei 167 mg/ml durch Übersteigerung der Kapazität der Pumpen erklärt werden [Shire et al., 2004]. Die Viskositäten der resultierenden Lösungen von Lauf 2 und 3 sind wiederum gleich, da hier die gleiche Pufferzusammensetzung vorlag. Die Zwischenreinigung der Membran um adsorbiertes Proteinmaterial zu entfernen und so diesen Faktor der Fluxlimitierung zu entfernen zeigte keinen großen Vorteil in Bezug auf maximale Konzentration und Zeit. Ein Hauptgrund für die Grenze der Aufkonzentrierbarkeit mittels TFF scheint

also durch die Viskosität der Lösung und der damit einhergehenden Bildung eines Gellayers bedingt zu sein. Der Permeatflux hängt laut Brose antiproportional vom Widerstand der Filtrationsmembran ab. Dieser Widerstand schließt neben der Porengröße der Membran auch den des gebildeten Gellayers ein [Brose et al., 2002]. Die Verblockung der Membran durch Partikel während des Filtrationsprozesses, wie durch Maruyama und Huismann beschrieben, scheint somit nicht den limitierenden Faktor für die Aufkonzentrierung des Proteins darzustellen. Möglicherweise konnte durch den optimierten, erhöhten CF eine Verblockung der Membran und die Bildung einer Gelschicht aber deutlich reduziert werden [Huismann et al., 2000; Le und Howell, 1985; Maruyama et al., 2001]. Eine Überprüfung des Monomergehaltes mittels SE-HPLC für alle drei Filtrationsläufe ergab einen Anteil von mind. 99,7 % bei einer Trübung von 1,08. Mit 183 mg/ml wurde in einem schnellen Prozess eine um mehr als 10 mg/ml höhere Konzentration erreicht als in vorangegangenen Studien mit der Millipore LabScale™-Anlage [Matheus, 2006a] in TFF-Experimenten erreichte.

#### 4.1.2 Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Lyophilisation

Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war die Aufkonzentrierung von Cetuximab mittels Gefriertrocknung, zum Einen komplett mit nachfolgender Rekonstitution in einem geringeren Lösungsmittelvolumen und zum Anderen partiell direkt auf eine Zielkonzentration hin. Der erste Ansatz ist bereits etabliert und in der Literatur beschrieben [Shire et al., 2004]. Durch die Rekonstitution des Lyophilisates mit einer geringeren Menge an Lösungsmittel, lassen sich auf einfache Art sehr hohe Proteinkonzentrationen erzielen. Der Nachteil der Methode ist die gleichzeitige Aufkonzentration der Hilfsstoffe, was beispielsweise zu pH-Verschiebungen aufgrund Aufkonzentrierung der Puffersalze sowie Entstehung einer hypertonen Injektionslösung führen kann [Shire et al., 2004]. Die Methode der Aufkonzentrierung einer Proteinformulierung per Gefriertrocknung im Vial ist bereits patentrechtlich geschützt [Andya et al., 2001]. Daher sollte im zweiten Ansatz eine weitere Methode zur Aufkonzentrierung mit Hilfe der partiellen Gefriertrocknung untersucht werden. Mit der partiellen Gefriertrocknung würden in erheblichem Maße Zeit und Geld eingespart, da nicht vollständig getrocknet wird, sondern nur soviel Wasser wie nötig aus der Lösung entzogen wird. Nach

dem Auftauen sollte sich die entsprechende Zielkonzentration einstellen. Diese Methode wäre hauptsächlich für eine Aufkonzentrierung des Proteins im Bulk geeignet. Die Trocknungsrate in Vials während des Lyophilisationsprozesses kann mit deren Position im Trockner stark schwanken. In Abhängigkeit vom Design des Gefriertrockners können erhebliche Schwankungen in der Stellflächentemperatur über die Fläche vorherrschen, dies wiederum beeinflusst die Wärmestrahlung von den Kammerwänden sowie die benachbarten Vials die Sublimationsrate von Vial zu Vial [Chang und Patro, 2004; Overcashier et al., 1999]. Eine partielle Trocknung in Vials würde somit zu unterschiedlichen Konzentrationen von Vials zu Vial führen. Voraussetzung für beide Verfahren ist eine einfache, stabile Formulierung, welche mit wenigen Hilfsstoffen auskommt, um maximale Flexibilität im Rekonstitutions- bzw. Konzentrations- und Formulierungseinstellungsschritt im Rahmen einer Produktion zu haben.

#### **4.1.2.1 Ermittlung der optimalen Saccharosekonzentration für die Gefriertrocknung**

Ausgangspunkt der Formulierungsentwicklung für die Gefriertrocknung war eine Formulierung mit 40 mg/ml Cetuximab in PBS, pH 6,0 (siehe Tabelle 4.6). Saccharose ist ein häufig verwendeter Kryo- und Lyostabilisator [Cleland et al., 2001; Kerwin et al., 1998]. Cleland beschrieb ein molares Verhältnis von 360:1 Lyoprotektor zu Protein, welches in der Lage ist, das Protein während der Lyophilisation und anschließenden Lagerung zu stabilisieren. Stabilitätskriterium war dabei die Lagerstabilität bei 40°C / 75 % r.h. über 33 Monate. Im vorliegenden Falle ist eine kurzfristige Stabilisierung während des Lyophilisationsprozesses ausreichend. Daher wurde eine Gefriertrocknung in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Saccharose durchgeführt und Proben anschließend durch optische Kontrolle, SE-HPLC, Prüfung auf nicht-sichtbare Partikel, Trübungsmessung, und Restfeuchtebestimmung charakterisiert. Für die Trocknung wurden die in Tabelle 4.6 aufgeführten Formulierungen hergestellt und mit dem Standard Gefriertrocknungsprogramm getrocknet (vergl. Kap. 3.2.1.4). Hierbei wurden zwei verschiedene Sekundärtrocknungstemperaturen untersucht: 20°C und 40°C. Die Formulierungen wurden zum Einen direkt nach Trocknung untersucht sowie nach

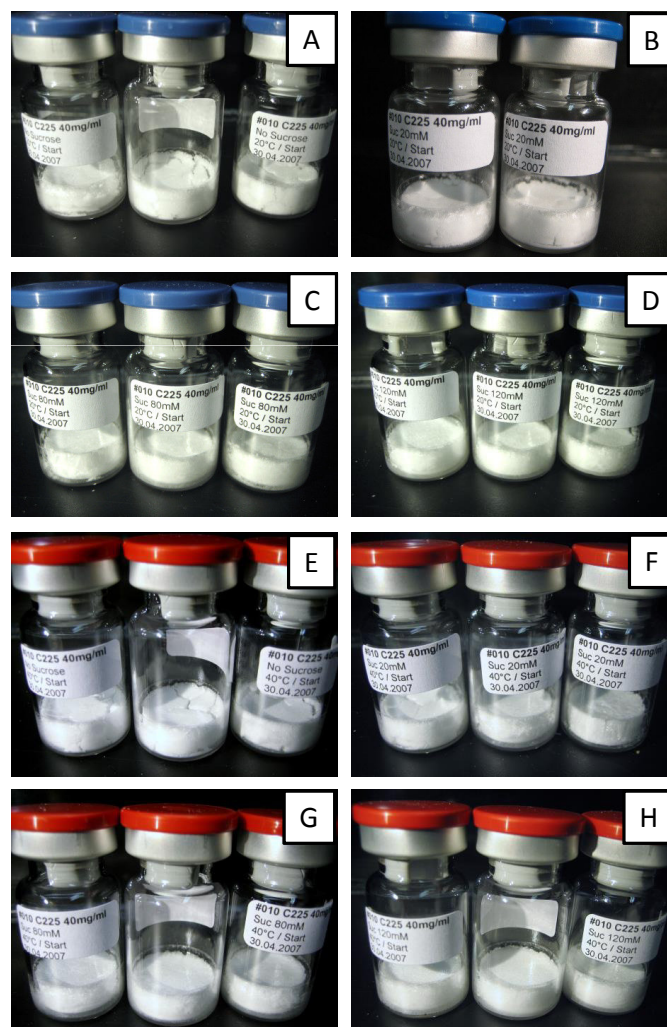
4 Wochen Lagerung bei 40°C/75 % r.h.. Die Rekonstitution erfolgte zur Analyse wieder auf die Startkonzentration von 40 mg/ml.

**Tabelle 4.6:** Zusammensetzung und Sekundärtrocknungstemperatur der Gefriertrocknungsformulierungen für Cetuximab 40 mg/ml für den Stabilitätstest im Rahmen der Saccharosekonzentrationsoptimierung.

Probe	Bezeichnung	Saccharose [mM]	Sekundärtrocknungstemperatur [°C]	Formulierung
A	S0 / 20	0	20	
B	S20 / 20	20	20	
C	S80 / 20	80	20	Cetuximab
D	S120 / 20	120	20	40 mg/ml,
E	S0 / 40	0	40	Phosphatpuffer
F	S20 / 40	20	40	10 mM, pH 6,0,
G	S80 / 40	80	40	0,01 %
H	S120 / 40	120	40	Polysorbat

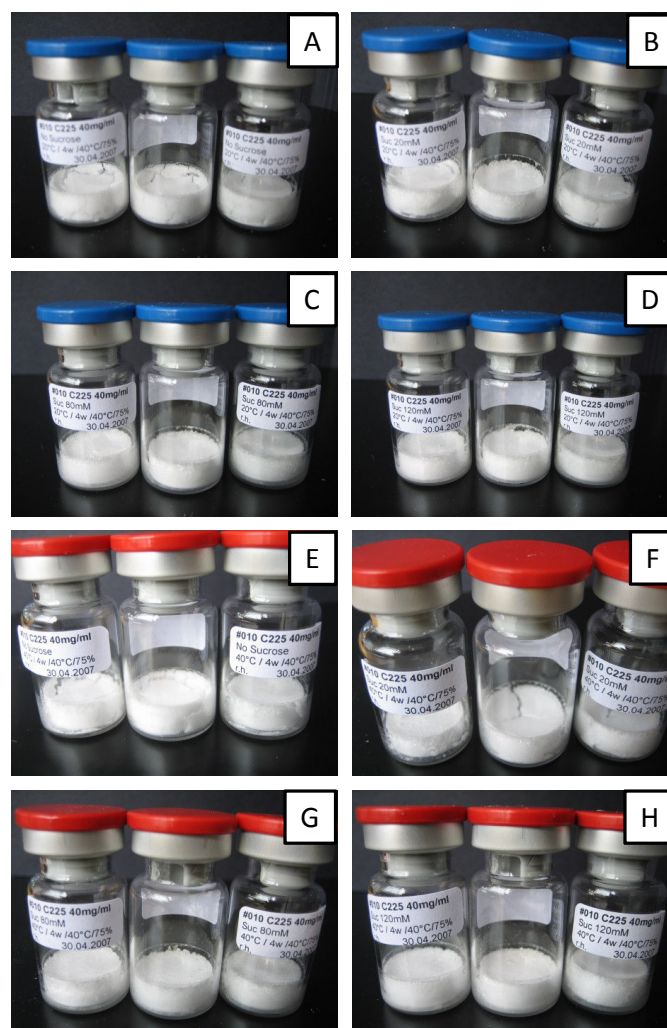
Alle Proben trockneten als kompakte Kuchen (Abb. 4.12). Proben ohne und mit nur 20 mM Saccharose wiesen deutliche Risse und Schrumpfung auf, nicht hingegen aber Lyophilisate mit 80 und 120 mM Saccharose. Dabei war kein signifikanter Einfluss der Sekundärtrocknungstemperatur erkennbar. Nach 4 Wochen Lagerung bei 40°C/75 % r.h. blieben die Proben optisch unverändert (Abb. 4.13). Alle Proben konnten binnen 3 Minuten rekonstituiert werden, wobei es bei allen Lyophilisaten zur Bildung von Schaum während der Rekonstitution kam, der wiederum nach einigen Minuten zerfallen war.

Der per SE-HPLC ermittelte Dimer-Startwert für die noch nicht getrockneten Proteinlösungen liegt einheitlich bei 0,2 % (Abb. 4.14). Nach der Trocknung erhöhte sich der Dimergehalt in den Formulierungen ohne und mit 20 mM Saccharose, während er bei höherem Zuckeranteil (80 und 120 mM) nicht anstieg. Die Unterschiede durch die Sekundärtrocknungstemperatur waren nicht signifikant, auch wenn der Eindruck eines leichten Trends zur stärkeren Schädigung bei höherer Sekundärtrocknungstemperatur besteht, der aber vor allem auf einem Unter-



**Abbildung 4.12:** Cetuximab-Lyophilisate (40 mg/ml Cetuximab in PBS, pH 6,0) mit unterschiedlichen Saccharoseanteilen und Sekundärtrocknungstemperaturen von 20°C bzw. 40°C direkt nach der Lyophilisation.: (A) 0S / 20; (B) 20S / 20 (C) 80S / 20 (D) 120S / 20 (E) 0S / 40 (F) 20S / 40 (G) 80S / 40 (H) 120S / 40.

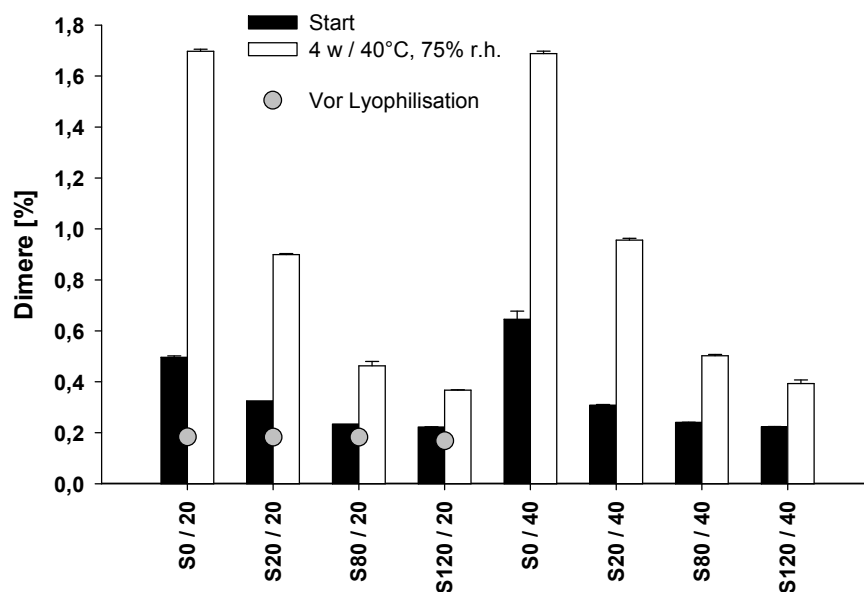
schied zwischen den saccharosefreien Formulierungen beruht. Bei diesen Proben ist auch am ehesten mit einem negativen Einfluss der Sekundärtrocknungstemperatur zu rechnen. Nach vier Wochen Lagerung bei 40°C/ 75% r.h. stieg der Dimergehalt in allen Proben an. Dabei wiesen die Proben mit höherem Saccharosegehalt jedoch eine höhere Stabilität auf. Der Unterschied im Dimergehalt nach Lagerung zwischen den Lyophilisaten mit 80 und 120 mM Saccharose war gering.



**Abbildung 4.13:** Cetuximab-Lyophilisate (40 mg/ml Cetuximab in PBS, pH 6,0) mit unterschiedlichen Saccharoseanteilen und Sekundärtrocknungstemperaturen von 20°C bzw. 40°C nach 4-wöchiger Lagerung bei 40°C / 75 % r.h.: (A) 0S / 20; (B) 20S / 20 (C) 80S / 20 (D) 120S / 20 (E) 0S / 40 (F) 20S / 40 (G) 80S / 40 (H) 120S / 40.

Zur Analyse größerer unlöslicher Aggregate, die eine Trübung hervorrufen [Mahler et al., 2009a; Zölls et al., 2012], wurde die Absorption der Lösung bei 350 nm analysiert. Die Lösungen vor Lyophilisation wiesen eine Absorption von ca. 130 bis 160 mAU auf. Die Proben mit einem hohen Saccharosegehalt waren nach Lyophilisation unverändert. Hingegen zeigten Lyophilisate ohne und mit 20 mM Saccharose nach Rekonstitution leichte erhöhte Trübungswerte. Lagerung für vier Wochen bei 40°C / 75 % r.h. führte zu keinem Anstieg der Trübungswerte (Abb.



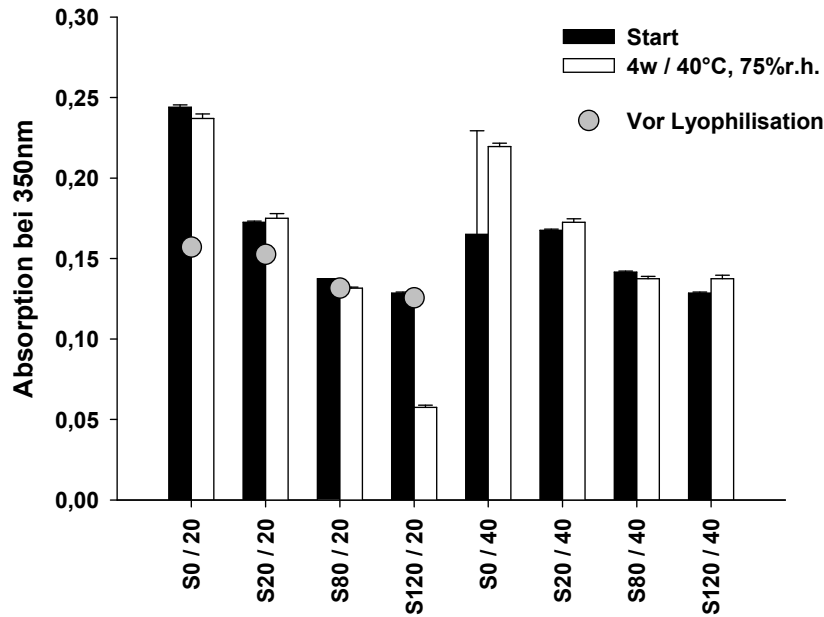


**Abbildung 4.14:** Dimergehalt für Cetuximalyophilisate nach Rekonstitution bei  $t = 0$  und nach 4 Wochen Lagerung bei  $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ r.h.}$

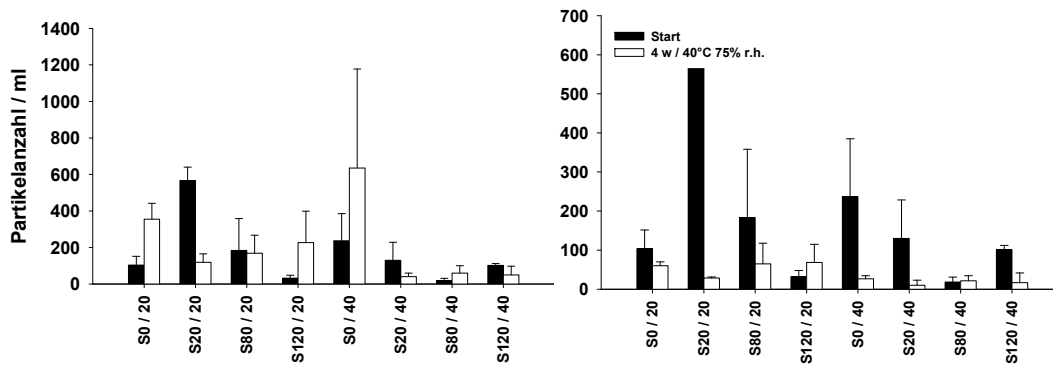
4.15). Somit korrelieren die Trübungswerte mit den Ergebnissen der SEC Messungen und belegen die Bildung von Aggregaten in Proben ohne und mit wenig Saccharose im Laufe der Lyophilisation, im Laufe der Lagerung nehmen offenbar die Dimere zu, während keine größeren Partikel entstehen.

Die Anzahl an nicht sichtbaren Partikeln  $\geq 10 \mu\text{m}$  sowie  $\geq 25 \mu\text{m}$  in den Formulierungen liegen innerhalb der Spezifikationen, die durch das Ph. Eur. gefordert werden ( $< 6000/\text{ml}$  für  $\geq 10 \mu\text{m}$  und  $< 600/\text{ml}$  für  $\geq 25 \mu\text{m}$ ) [Ph.Eur., 2008b]. Die Werte sind nicht deutlich erhöht und weisen Schwankungen auf, welche aber innerhalb der Spezifikation bleiben (Abb. 4.16).

Wie erwartet, besaßen die Proben, die bei niedrigerer Sekundärtrocknungstemperatur getrocknet wurden, auch einen höheren Restfeuchteanteil (Abb. 4.17). Bei Lyophilisaten mit 120 mM Saccharose, welche eine Sekundärtrocknung bei  $20^{\circ}\text{C}$  erfuhren, wird ein Maximalwert von ca. 1% erreicht, da durch den hohen Saccharoseanteil das Haftwasser schlechter entweichen konnte. Veränderungen der Restfeuchte in Folge der Lagerung waren nicht signifikant.

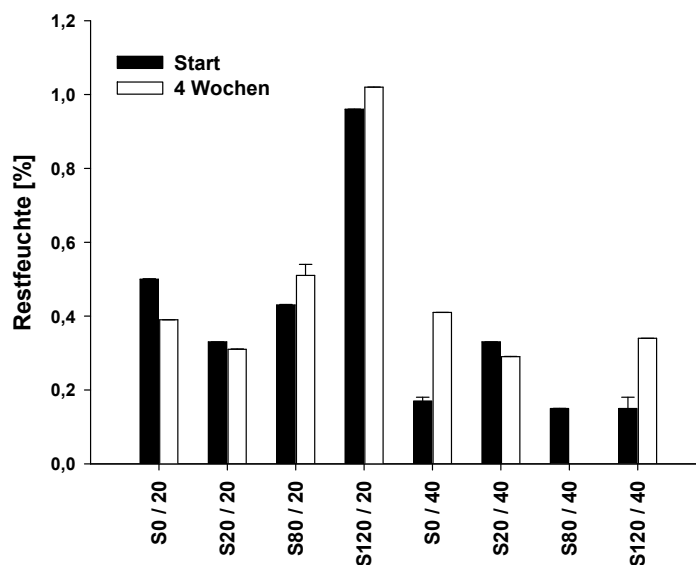


**Abbildung 4.15:** Trübung der rekonstituierten Lyophilisate bei  $t = 0$  und nach 4 Wochen Lagerung bei  $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ r.h.}$



**Abbildung 4.16:** Partikelanzahl der rekonstituierten Cetuximab Lyophilisate bei  $t = 0$  und nach 4 Wochen Lagerung bei  $40^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ r.h.}$  durch Lichtblockademessungen für Partikel  $\geq 10 \mu\text{m}$  (links) und  $\geq 25 \mu\text{m}$  (rechts).

Die Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) der 80 mM und 120 mM Saccharoseformulierungen nach  $20^{\circ}\text{C}$  Sekundärtrocknung ist mit  $74^{\circ}\text{C}$  und  $72^{\circ}\text{C}$  aufgrund des höheren Wassergehaltes um ca.  $10^{\circ}\text{C}$  niedriger, als nach Sekundärtrocknung bei  $40^{\circ}\text{C}$  ( $82^{\circ}\text{C}$ ). Im Falle der Proben ohne oder mit 20 mM Saccharose war die  $T_g$  nicht auswertbar. Grund hierfür könnte ein zu hoher Proteinanteil in Relation zum



**Abbildung 4.17:** Restfeuchtebestimmungen der Lyophilisate bei t 0 und nach 4 Wochen Lagerung bei 40°C / 75 % r.h. mit Hilfe der Karl-Fisher Titration.

Zucker sein [Breen et al., 2001]. Die gemessenen Werte sind mit der Literatur vergleichbar. Lückel bestimmte für eine saccharosehaltige IL-6-Formulierung eine Restfeuchte von 0,7 % vor Lagerung und eine Tg von 66,5°C [Lueckel et al., 1998]. Die Antikörperlyophilisate von Breen et al. wiesen eine Tg von 80°C bei Restfeuchten von 1 % auf [Breen et al., 2001]. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Experimente ein Saccharosegehalt von 120 mM gewählt, um eine gute Stabilität zu gewährleisten. Die für alle weiteren Experimente gewählte Formulierung der Lösung ist in Tabelle 4.7 aufgeführt.

**Tabelle 4.7:** Optimierte Cetuximabformulierung.

Wirkstoff / Hilfsstoff	Konzentration
Cetuximab	40 mg/ml
Saccharose	120 mM
Phosphatpuffer	10 mM
Polysorbat	0,01 %
pH	6,0

#### 4.1.2.2 Lyophilisation und anschließende Rekonstitution mit weniger Flüssigkeit

Die Rekonstitution der Lyophilisate (Formulierung s. Tab. 4.7), diente als Ausgangspunkt für die Herstellung höherkonzentrierter Formulierungen durch Rekonstitution mit weniger Flüssigkeit als durch Lyophilisation entfernt. Jeweils 1 ml Cetuximabformulierung wurde zuvor im Standard-Gefriertrocknungsprozess lyophilisiert. Ausgehend von 200  $\mu\text{l}$  wurde das Rekonstitutionsvolumen schrittweise verringert, bis sich die Probe nicht mehr vollständig auflösen ließ. Die Rekonstitution erfolgte mit drei unterschiedlichen Rekonstitutionsmedien, um zu untersuchen, ob deren Zusammensetzung eine Auswirkung auf die Lösungsgeschwindigkeit und die erreichbare Konzentration hat. Es wurde Wasser für Injektionszwecke, eine 0,3 %ige Polysorbat 80 Lösung und eine 150 mM NaCl-Lösung verwendet. Die Lösungen wurden auf vollständiges Auflösen, Aussehen und Viskosität hin untersucht. Für spätere Applikation mittels Spritze sollte eine applizierfähige Lösung eine Viskosität von ca. 200 mPaS bei durchschnittlicher Scherrate von 100 - 150  $\text{s}^{-1}$  nicht überschreiten [Al-Hammami und Richards, 1996; Hatefi und Amsden, 2002; Okumu, 2001].

Wie in Tabelle 4.8 zusammengefasst, lösten sich bis zu einem Rekonstitutionsvolumen von 80  $\mu\text{l}$  alle Proben zügig nach Flüssigkeitszugabe. Es konnten hierbei keine Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Rekonstitutionsmedien festgestellt werden. Erst ab einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  wurde die Rekonstitutionszeit deutlich länger, über 6 Stunden, bis sich bei einer Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  das Lyophilisat nicht mehr vollständig auflösen ließ. Die Beschaffenheit des Produktes bei 50  $\mu\text{l}$  Rekonstitutionsflüssigkeit war zäh und gelartig. Eine UV-metrische Konzentrationsanalyse der mit 80  $\mu\text{l}$  rekonstituierten Lyophilisate ergab einen Wert von 330 mg/ml Cetuximab. Mit der Methode der Rekonstitution des Lyophilisates in einem geringeren Volumen ließen sich im Vergleich zur TFF weitaus höhere Cetuximabkonzentrationen erreichen. Zusätzlich wurde für diese Probe die Viskosität mit und ohne NaCl-Zusatz der Rekonstitutionsflüssigkeit bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Viskositätserniedrigung der Proteinlösung bei NaCl-Zusatz (vgl. Abb. 4.18. Zudem zeigten beide Lösungen ein für höher konzentrierte Makromoleküllösungen typisches nicht-newton'sches Fließverhalten, mit einem Abfall der Viskosität bei steigender Scherrate. Die Viskosität kann vor allem durch elektro-

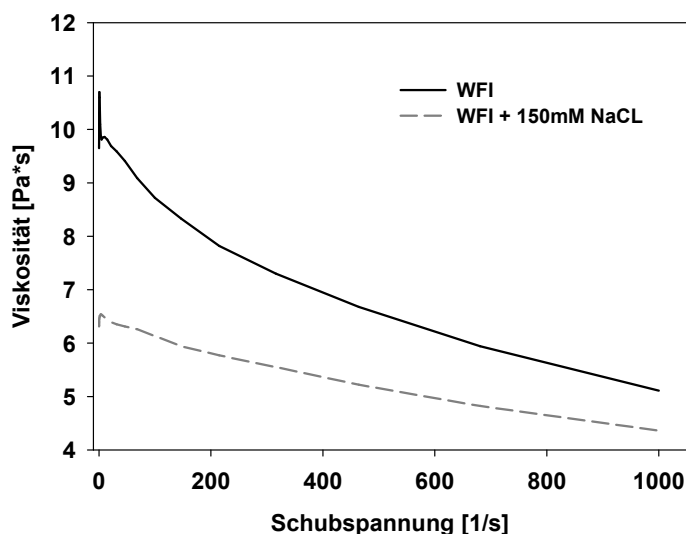
**Tabelle 4.8:** Rekonstitutionsverhalten der Lyophilisate in Wasser, 0,3%iger Polysorbitatlösung und 150 mM NaCl-Lösung: Es gab keinen Unterschied in der Lösungsgeschwindigkeit zwischen den unterschiedlichen Rekonstitutionsmedien, daher sind diese zusammengefasst dargestellt.

Rekonstitutionsvolumen	15 s	5 min	1 h	6 h	24 h
200 $\mu\text{l}$	++				
180 $\mu\text{l}$	++				
150 $\mu\text{l}$	-	+			
130 $\mu\text{l}$	-	+-	+		
100 $\mu\text{l}$	-	-	+		
90 $\mu\text{l}$	-	-	+		
80 $\mu\text{l}$	--	-	+		
50 $\mu\text{l}$	--	--	-	+-	+
30 $\mu\text{l}$	---	---	---	---	---

- ++ Sehr schnelle Rekonstitution binnen Sekunden
- + Schnelle Rekonstitution binnen Minuten
- +- Durch starke Schaumbildung Rekonstitution nicht erkennbar
- Wenig Feststoff noch vorhanden
- Feststoff vorhanden
- Keine Löslichkeit erkennbar

statische Wechselwirkungen der Proteine untereinander begründet werden [Liu et al., 2005; Saluja und Kalonia, 2008]. Durch die Erhöhung der Ionenstärke, wie hier durch den Zusatz von NaCl kann diese elektrostatische Wechselwirkung herabgesetzt und die Viskosität erniedrigt werden. Tabelle 4.9 zeigt die Proteinkonzentrationen und Viskositäten bei einer Schubspannung von  $100 \text{ s}^{-1}$  einiger mit 150 mM NaCl-Lösung rekonstituierter Zubereitungen.

Die Viskosität steigt mit zunehmender Proteinkonzentration exponentiell an. Bei 180 mg/ml Cetuximab korreliert sie mit 19,2 mPas sehr gut mit den Werten, die auch für die Lösungen aus der Aufkonzentrierung mittels TFF in Kapitel 4.1.1.5 gemessen wurden. Eppler bestimmte für eine 100 mg/ml Cetuximab-Formulierung, pH 7,2 eine Viskosität von 5 mPas, was etwas unterhalb des hier gemessenen Wertes liegt [Eppler, 2012], allerdings ist nicht bekannt, bei welcher



**Abbildung 4.18:** Viskosität von Cetuximab 330 mg/ml nach Rekonstitution mit Wasser für Injektionszwecke bzw. 150 mM NaCl-Lösung.

**Tabelle 4.9:** Viskosität von Cetuximab-Lösungen nach Rekonstitution mit 150 mM NaCl-Lösung für Injektionszwecke auf die entsprechenden Konzentrationen.

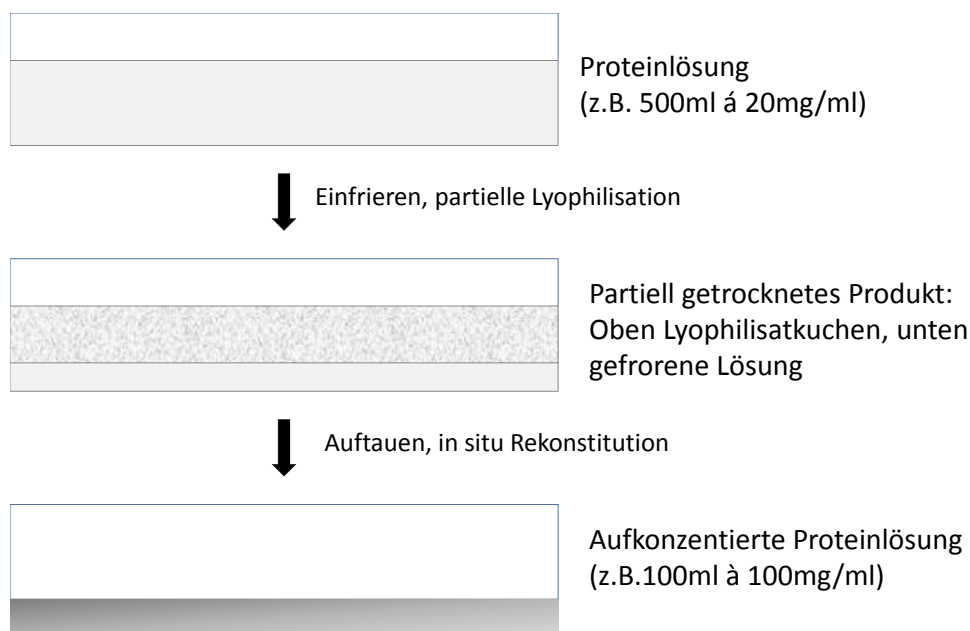
Cetuximabkonz.	Viskosität
1 mg/ml	1,1 mPas
10 mg/ml	1,2 mPas
100 mg/ml	9,5 mPas
180 mg/ml	19,2 mPas
330 mg/ml	6000 mPas

Scherrate der Wert gemessen wurde. Der Wert von Matheus von ca.  $8 \text{ mm}^2/\text{s}$  bei 100 mg/ml Cetuximabkonzentration kann aufgrund des Fehlens der exakten Dichte der Lösung nicht genau auf die dynamische Viskosität umgerechnet werden [Matheus, 2006a]. Liu et al. erhielten 25 mPas für eine 100 mg/ml Antikörperformulierung, 60 mPas bei 125 mg/ml und 500 mPas bei 200 mg/ml (Scherrate  $200 \text{ s}^{-1}$ ) [Liu et al., 2005]. Auch hier ist gut zu erkennen, dass die Viskosität ab 100 mg/ml nahezu exponentiell ansteigt. Im Gegensatz zu Liu wurde von Rosenberg eine Viskosität von nur 13,8 mPas bzw. 27,7 mPas für zwei Antikörper bei 200 mg/ml gemessen [Rosenberg, 2010]. Die Messungen wurden allerdings mit einem Vibro-Viskosimeter durchgeführt und können daher nicht direkt mit den an-

deren Werten verglichen werden. Bei dieser Methode wird die Energie gemessen, die notwendig ist, zwei Sensorplatten bei gleich bleibender Frequenz im viskosen Medium am Schwingen zu halten. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen stehen in Zusammenhang mit den Unterschieden zwischen den Proteinmolekülen, der Formulierung und auch der Messparameter [Shire, 2009].

Die Rekonstitution in weniger Lösungsmittel bietet eine schonende Methode, um eine hochkonzentrierte Cetuximab Lösung zu erhalten. Obwohl die Formulierung mit 120 mM Saccharose als Startkonzentration in der Lösung einen relativ hohen Zuckergehalt aufwies, wurden Konzentrationen bis zu 330 mg/ml Cetuximab (enthält ca. 36 % Saccharose) erreicht, welche mit der gemessenen sehr hohen Viskosität allerdings nicht mehr injizierbar waren. Evtl. könnte durch eine Optimierung der Formulierung, beispielsweise eine Optimierung von Zucker- oder Pufferkonzentration, die Viskosität reduziert werden.

#### 4.1.3 Aufkonzentrierung durch partielle Lyophilisation



**Abbildung 4.19:** Schema der partiellen Lyophilisation zur Aufkonzentrierung von Proteinen in Bulklösung.

Die Aufkonzentrierung durch Rekonstitution von Cetuximablyophilisaten zeigte, dass durch diese Technik sehr hohe Konzentrationen erreichbar sind. Allerdings ist das Verfahren der Lyophilisation und Rekonstitution mit weniger Flüssigkeit patentgeschützt [Andya et al., 2001]. Außerdem ist der zeitliche und damit finanzielle Aufwand durch den langen Gefriertrocknungsvorgang hoch. Gerade die Primärtrocknung nimmt dabei viel Zeit in Anspruch. Ziel war es daher, die Zeit der Sekundärtrocknung und eines Teils der Primärtrocknung einzusparen, indem die Lyophilisation nur partiell durchgeführt wird, bis zum Punkt der gewünschten Proteinkonzentration (Abb. 4.19).

Die Sublimationsrate des entweichenden Wassers wird im Falle des Lyophilisationsproduktes nicht linear sein, da dem ungehinderten Massentransfer des Wassers vor allem die Poren des Lyophilisatkuchens mit fortschreitender Trocknung entgegenstehen. Den Gesamtproduktwiderstand beschreibt Overcashier mit folgender Formel:

$$\frac{\dot{m}}{A_p} = \frac{1}{\hat{R}_p} \times (P_0 - P_v)$$

Dabei stellen  $\frac{\dot{m}}{A_p}$  die spezifische Sublimationsrate,  $\hat{R}_p$  den normalisierten Produktwiderstand und  $(P_0 - P_v)$  den Druckgradienten zwischen Dampfdruck des Eises an der Sublimationsfront und dem Druck in der Trocknungskammer dar. Die Sublimationsrate ergibt sich dabei aus der Antriebskraft, dem Druckgradienten und dem Sublimationswiderstand und verhält sich umgekehrt proportional zum Gesamtwiderstand des Produktes [Overcashier et al., 1999]. Neben den Widerständen von Stopfen und Trocknungskammer, stellt die bei der Trocknung entstehende poröse Produktschicht den größten Widerstand für das sublimierende Wasser dar. Dieser Widerstand wächst mit fortschreitender Trocknung, da das Wasser zuerst von der Oberfläche absublimiert. Der Sublimationswiderstand wird so mit fortschreitender Trocknung größer und die Sublimationsrate geringer [Chang und Patro, 2004].

Für die Durchführung der Versuchsreihe wurden Lyoguard® Container der Firma Gore® verwendet (Abb. 4.20). Boden und Wände dieser Container mit einem maximalen Volumen von 110 ml bestehen aus Polypropylen. Die semipermeable



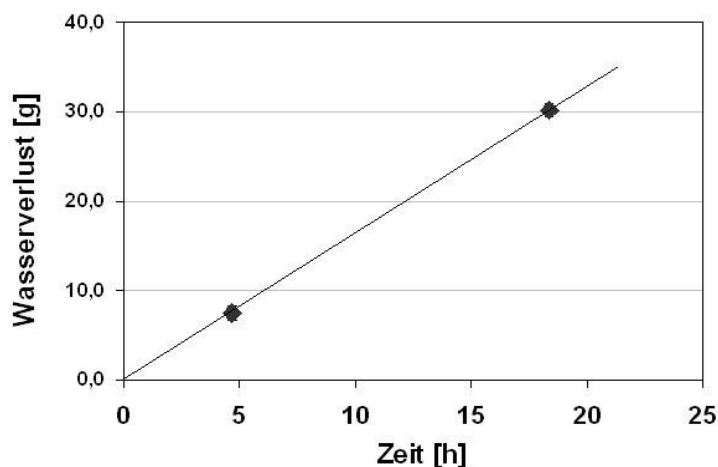
GORE TEX<sup>®</sup> -Membran (Polytetrafluoerethylen) im Deckel ermöglicht ein aseptisches Gefriertrocknen.



**Abbildung 4.20:** Verwendete Gore<sup>®</sup>Lyoguard<sup>®</sup> Container für die Aufkonzentrierung von Cetuximab durch partielle Gefriertrocknung (Bildquelle: [www.gore.com](http://www.gore.com)).

#### 4.1.3.1 Bestimmung der Sublimationsrate von Wasser aus Lyoguard<sup>®</sup> Containern

Die Abschätzung der Sublimationsrate aus den Lyocontainern beim verwendeten Primärtrockenverfahren bei  $-25^{\circ}\text{C}$  Stellflächentemperatur und 0,05 mbar erfolgte zunächst anhand von Wasserversuchen. Nach Befüllung der Container mit 50 ml Wasser wurde die Gesamtsublimationsdauer mit dem Standardgefriertrocknungs-  
lauf anhand des Zeitpunktes, an dem der Kammerdruck unter den temperaturspezifischen Wasserdampfdruck fällt, ermittelt. Die Masse an sublimiertem Wasser über die Zeit wurde durch Auswiegen von Containern zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten während des Prozesses bestimmt (Abb. 4.21). Die Sublimationsrate berechnete sich aus der sublimierten Wassermenge pro Zeit und Fläche und betrug für Wasser  $0,0486 \text{ g/h} \cdot \text{cm}^2$ .



**Abbildung 4.21:** Primärtrocknung und Sublimation von 50 ml Wasser über die Zeit bei  $-25^{\circ}\text{C}$  Stellflächentemperatur und 0,05 mbar aus Lyoguard<sup>®</sup> Container.

#### 4.1.3.2 Aufkonzentrierung von Cetuximab in Lyoguard<sup>®</sup> Containern

Die Wassersublimationsrate sollte als Ausgangspunkt für eine vereinfachte Abschätzung der Wassersublimation aus der Antikörperlösung dienen. Lässt man den Sublimationswiderstand außer Acht, so ergibt sich bei einer 45 ml Befüllung mit Cetuximab 40 mg/ml in PBS, pH 6,0 und 120 mM Saccharose und Zielkonzentration von 100 mg/ml Cetuximab eine Trocknungszeit von 16,8 h. Nach einer zusätzlich aufgeschlagenen Zeit von 3 h für die geringere Sublimationsrate aus der Lösung im Vergleich zu reinem Wasser, wurde der Prozess nach insgesamt 20,4 h beendet. Das erhaltene partiell getrocknete Produkt, bestehend aus einer noch nicht sublimierten gefrorenen Lösungsschicht und primärgetrocknetem Lyophilisat wurde bei Raumtemperatur zum Auftauen und Rekonstituieren equilibriert. Durch Wägung nach dem kompletten Auflösevorgang ergab sich eine Proteinkonzentration von 92 mg/ml, was nur gering von der Zielkonzentration abweicht. Um zu einer noch höheren Zielkonzentration von 150 mg/ml zu gelangen, errechnete sich somit bei einem Gesamtwasserentzug von 33 ml und einer neuen Sublimationsrate von ca.  $0,0343 \text{ g/h}\cdot\text{cm}^2$  eine Gesamttrocknungszeit von ca. 28 h. Eine Produktanalyse nach dieser Trocknungszeit lieferte sogar eine mit 180 mg/ml 20 % über dem Erwartungswert liegende Konzentration.

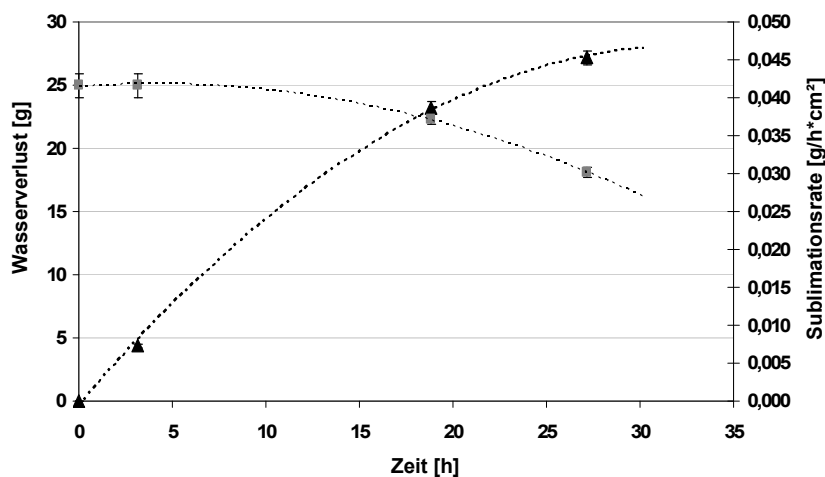
Das Aussehen der Proben nach der partiellen Gefriertrocknung und nach dem Auftauen bei Raumtemperatur gibt Abbildung 4.22 wieder. Auf den Produkten entsteht zunächst eine trockene, hautartige Schicht, welche den kollabierten Lyokuchen über der aufgetauten Lösung darstellt. Diese Schicht löste sich bei Lagerung über Nacht bei 2-8°C komplett auf. Der partielle Gefriertrocknungsprozess schadete dem Antikörper nicht und der Monomergehalt blieb nach beiden Prozesszeiten über 99,2%, wie im Ausgangsmaterial. Die visuelle Kontrolle ließ keine sichtbaren Partikel erkennen. Die A350-Trübungswerte stiegen von 135 mAU für die 8,2 mg/ml Protein-Startlösung auf 205 bzw. 211 mAU nach der Aufkonzentrierung auf 91 bzw. 180 mg/ml und liegen für diese Konzentrationen im normalen Bereich. Die übermäßige Bildung subvisueller Partikel kann also ausgeschlossen werden.



**Abbildung 4.22:** Lyocontainer mit 91 mg/mL nach 20,4 h Primärtrocknung (links) und Auftauen (rechts) (A) und 180 mg/mL nach 28 h Primärtrocknung (links) und nach Auftauen (rechts) (B). Bei beiden Proben ist der nach dem Auftauen noch nicht vollständig rekonstituierte "Lyophilisatkuchen" erkennbar.

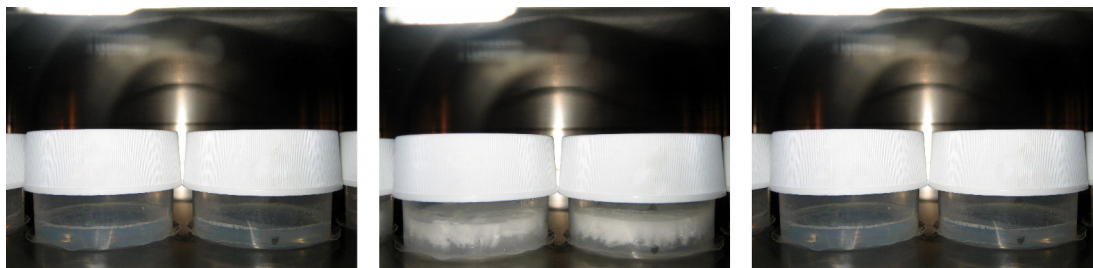
Basierend auf dieser ersten Evaluation wurden weitere partielle Gefriertrocknungsprozesse durchgeführt, um die gewonnenen Ergebnisse auszuweiten. Dabei

wurde die Stellflächentemperatur während der Trocknung auf  $-20$  oder  $-25^{\circ}\text{C}$  eingestellt und der Auftauprozess wurde direkt anschließend ebenfalls in der Gefrier-trocknungsanlage, unter kontrollierten Bedingungen, bei  $30$  oder  $40^{\circ}\text{C}$  Stellflächentemperatur durchgeführt. Dreimalige Wägung während der Trocknungsphase sollte die Berechnung eines definierten Wasserverlustes gewährleisten, um zielgerichtet eine Konzentration von ca.  $160\text{ mg/ml}$  Cetuximab zu erreichen. Die Zeit bis zum Trocknungsprozessende wurde, wie in Abbildung 4.23 exemplarisch für die Trocknung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gezeigt, aus dem polynomialen Fit der Wasserverlustkurve ermittelt. Der Auftauschritt wurde direkt an den finalen Trocknungsschritt angeschlossen, ohne nochmalige Kontrolle des Wasserverlustes. Das Auftauen wurde im  $15\text{ min}$ -Takt bis zur vollständigen Auflösung mittels Kamera festgehalten (s. Abb. 4.24 und 4.25). Dabei gingen die bei  $40^{\circ}\text{C}$  aufgetauten Proben ca.  $15\text{ min}$  früher komplett in Lösung, als die bei  $30^{\circ}\text{C}$  aufgetauten. Statt der erwünschten Konzentration von  $160\text{ mg/ml}$  wurde jedoch nur eine von ca.  $120\text{ mg/ml}$  erreicht (Abb. 4.26 A). Die Genauigkeit der Berechnung über einen polynomialen Fit ist demnach nicht ausreichend.

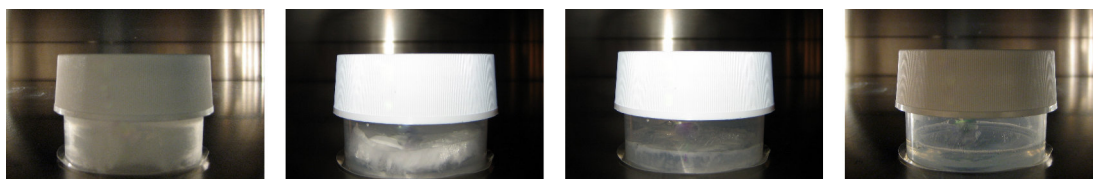


**Abbildung 4.23:** Wasserverlust und Sublimationsrate gegen die Zeit für die Aufkonzentrierung einer  $40\text{ mg/ml}$  Cetuximablösung in Lyoguard<sup>TM</sup> Containern bei einer Trocknungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Wasserverlust ■; Sublimationsrate ▲)

Stabilitätsuntersuchungen via SEC ergaben keine gegenüber der Ausgangslösung ( $0,4\%$ ) erhöhte Aggregatkonzentration (Abb. 4.26 D). Auch die A350-Werte wa-



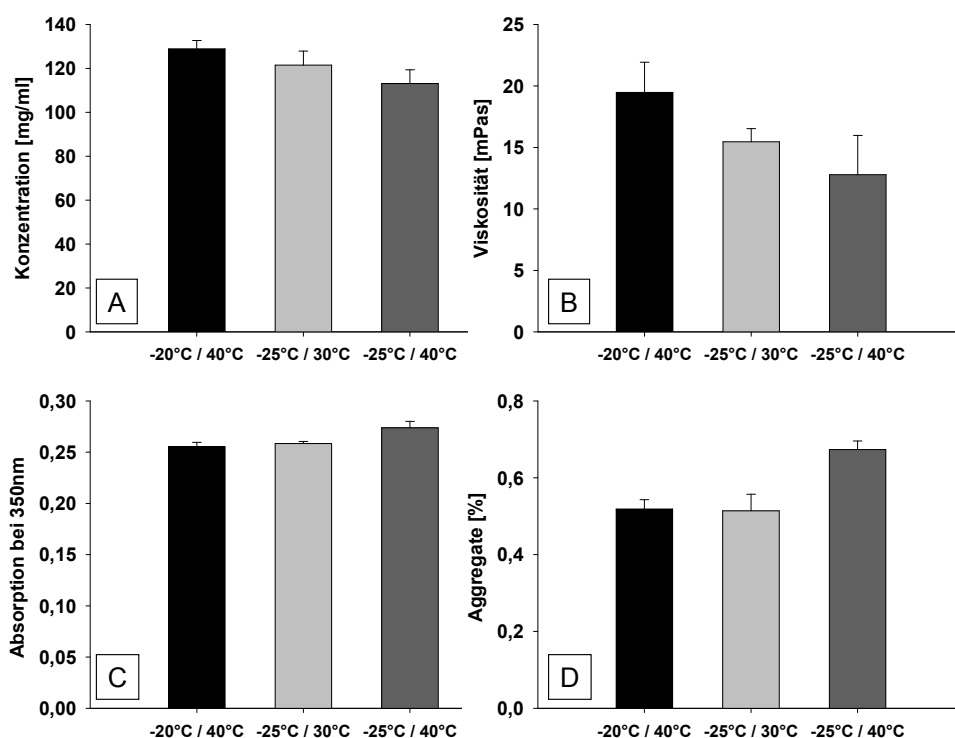
**Abbildung 4.24:** Auftauverhalten bei 30°C nach 15 min, 30 min, 45 min.



**Abbildung 4.25:** Auftauverhalten bei 25°C; nach 15 min, 30 min, 45 min und 60 min.

ren der Proteinkonzentration entsprechend und wiesen nicht auf die Bildung unlöslicher Aggregate hin (Abb. 4.26 C). Im Vergleich zu den Lyophilisaten, die mit der 150 mM NaCl-Lösung rekonstituiert wurden, ist die Viskosität durch die Abwesenheit von NaCl in der Formulierung und eine dadurch geringere Ionenstärke erhöht [Liu et al., 2005] (Abb. 4.26 B).

Die Experimente zur partiellen Gefriertrocknung konnten zeigen, dass das Verfahren grundsätzlich zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen im Bulk sehr gut geeignet ist. Durch den Wegfall der Sekundärtrocknung und eines Teils der Primärtrocknung lassen sich erheblich Zeit und damit verbundene Kosten sparen. Konzentrationen bis zu 180 mg/ml waren bei sehr guter Stabilität des Endproduktes leicht zu erreichen. Eine exakte Berechnung des Trocknungsendpunktes bedarf einer noch genaueren Vorgehensweise und könnte in weiterführenden Experimenten besser definiert werden.



**Abbildung 4.26:** Analytische Ergebnisse für Cetuximabproben nach Aufkonzentrierung durch partielle Lyophilisation mit unterschiedlichen Trocknungs- und Auftautemperaturen. (A) Konzentration (B) Viskosität bei einer Scherrate von 200/s (C) Trübung via Absorptionsmessung bei 350 nm, (D) Aggregate via SE-HPLC.

#### 4.1.4 Vergleich der drei untersuchten Aufkonzentrierungsmethoden

In der vorliegenden Studie wurden drei unterschiedliche Ansätze zur Aufkonzentrierung von Cetuximab betrachtet, nämlich TFF, Lyophilisation und anschließende Rekonstitution sowie partielle Lyophilisation. Der Fokus lag hierbei auf der maximal erreichbaren Konzentration an Cetuximab und der Machbarkeit der einzelnen Aufkonzentrierungsschritte.

Von den untersuchten Verfahren ist die TFF die bereits am besten etablierte Technik, welche sehr häufig zur Aufkonzentrierung, Entsalzung und zum Pufferaustausch von Proteinlösungen verwendet wird [Rubin und Christy, 2002; van Reis und Zydny, 2001]. Für Cetuximab wurde hier die maximale Aufkonzentrierbarkeit mit veränderter Pufferformulierung und verschärften Prozessparametern untersucht, die hauptsächlich der Verbesserung der Filtrationsrate dienen. Mit

erreichten 180 mg/ml war die Konzentration geringfügig höher, als die in früheren Versuchen erreichten 165 mg/ml in Citrat-Puffer, pH 5,5 und 172 mg/ml in Phosphat-Puffer, pH 8,0 [Matheus, 2006a]. Dort wurden Lösungen von 120 mg/ml nach TFF nochmals mit Zentrifugal-Ultrafiltrations-Einheiten auf die Endkonzentration gebracht. Mit der Erhöhung des pH-Wertes auf pH 7,2 stieg auch der Flux an. Matheus zeigte, dass der Flux bei pH 8,0 wieder leicht rückläufig war und bei pH 7,2 optimal [Matheus, 2006a]. Mit Hilfe einer Erhöhung der Ionenstärke durch NaCl konnte die erreichbare Konzentration der Cetuximab-Lösung durch Verringerung der Viskosität erhöht werden. Mit anderen Puffersystemen, vor allem basierend auf Histidin, könnte eine weitere Viskositätserniedrigung und Fluxerhöhung möglich sein [Liu et al., 2005; Yang et al., 2003]. Eine Erhöhung der Salzkonzentration verstärkt den Grad der elektrostatischen Abschirmung der Ladungen der Proteinmoleküle und der Membranoberfläche, reduziert Interaktionen und wirkt so einer Verblockung der Membran und einer damit verbundenen Erniedrigung des Flux entgegen [Saksena und Zydney, 1994]. TFF-Prozesse können gut auf größere Maßstäbe bzw. Anlagen hochgerechnet werden, so dass auch große Volumina problemlos und vergleichsweise kostengünstig aufkonzentriert werden können [Rosenberg et al., 2009]. Die Stabilität des Antikörpers ist hierbei mit zu berücksichtigen. Vor allem erhöhter Scherstress, die Temperatur und die Prozessdauer haben einen Einfluss und können zu Denaturierung und Aggregation des Proteins führen [Persson und Gekas, 1994]. Eine Konzentration über 200 mg/ml wäre wünschenswert, jedoch macht der deutliche Viskositätsanstieg der Cetuximablösung bei steigender Konzentration eine Aufkonzentrierung über 180 mg/ml mittels TFF unmöglich. Eine Grenze wurde für den Antikörper bei 20 mPas erreicht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei einer Lösungskonzentration von 180 mg/ml an der Membran durch Konzentrationspolarisation und Ausbildung einer Gelschicht deutlich höhere Konzentrationen vorherrschen. Steigende Viskositäten erschweren zusätzlich die Gewinnung des fertigen Produktes nach der TFF und führen so zu geringeren Ausbeuten [Shire et al., 2004]. Daher sollte zum Erreichen höherer Konzentrationen auf andere Aufkonzentrierungsmethoden zurückgegriffen werden.

Um höhere Konzentrationen zu erzielen, wurde die Lyophilisation getestet. Das Aufnehmen eines Lyophilisates in weniger Rekonstitutionsflüssigkeit ist eine sehr einfache Methode, um zu einer konzentrierten Lösung zu gelangen und führte für

Cetuximab zu sehr hohen Konzentrationen von bis zu 330 mg/ml bei gleichzeitiger Schonung des Proteins. Diese Formulierungen waren mit 6000 mPas (bzw. 8000 mPas ohne NaCl Zusatz in der Rekonstitutionsflüssigkeit) bereits so viskos, dass die Lösung, bzw. das Gel mit einer Spritze bereits nicht mehr applizierbar ist. Für Lösungen, die mittels 25 - 27G-Kanülen injiziert werden sollen, sollte die Viskosität im Bereich von ca. 60 mPas liegen. Hierbei sind in jedem Fall neben der Viskosität der Kanüldurchmesser und die Injektionskraft zu berücksichtigen, welche maßgeblich zur Injizierbarkeit beitragen [Burckbuchler et al., 2010; Cilurzo et al., 2011]. Generell lässt sich die Methode gut zur initialen Untersuchung der Aufkonzentrierbarkeit eines Proteins bei maximaler Ausbeute nutzen, bei gleichzeitiger Erzielung sehr hoher Konzentrationen. Belastung besteht dabei nicht durch Scherstress, jedoch durch den Einfrier- und Auftauprozess sowie den Wasserentzug. Die Methode ist grundsätzlich einfach für eine Bulkproduktion, aber auch für Einzeldosen einzusetzen. Der Nachteil ist, dass zur Gefriertrocknung Gerüstbildner wie Saccharose in größeren Mengen zugesetzt werden müssen, um das Protein im Lyophilisat zu stabilisieren. Hingegen könnten manch andere Hilfsstoffe mit hoher Neigung zur Kristallisation, wie z.B. Glycin oder Mannitol, evtl. durch Kristallisation nach dem Einfrieren im Zuge der Trocknung oder während der Lagerung, zu einer Proteinschädigung führen [Lueckel et al., 1998]. Ein zumindest teilamorph trocknendes Hilfsstoffsystem ist zur Stabilisierung vorzuziehen [Pikal et al., 1991]. Die Flexibilität in der Formulierung ist insofern diesbezüglich eingeschränkt. Darüber hinaus werden bei dieser Aufkonzentrierungsmethode sowohl das Protein als auch alle Hilfsstoffe aufkonzentriert. Dies kann beispielsweise zu pH-Verschiebungen, einer erhöhten Ionenstärke, sowie allgemein hypertonen Lösungen führen. Eine Möglichkeit wäre, das Lyophilisat mit möglichst wenig Hilfsstoffanteil herzustellen und gegebenenfalls weitere Hilfsstoffe erst mit der Rekonstitution zuzufügen. Overcashier et al. untersuchten beispielsweise die Lyophilisation von rekombinantem human-tissue type Plasminogen Aktivator mit Ammoniumhydrogencarbonat. Hierbei entweicht zuerst Wasser und anschließend das Ammoniumhydrogencarbonat als Ammoniak, CO<sub>2</sub> und Wasser. Das Ammoniumbicarbonat hatte dabei keinen negativen Einfluss auf das Protein und lieferte einen Ansatz zum Erhalt eines hilfsstofffreien Lyophilisates [Overcashier et al., 1997]. Daneben kann die Selbstpufferung von Proteinen genutzt werden, um auf Puffersalze zu verzichten [Gokarn et al., 2006, 2008].



Durch eine partielle Gefriertrocknung kann die Prozesszeit im Gegensatz zur konventionellen Gefriertrocknung erheblich verkürzt werden, indem die Trocknung auf der gewünschten Konzentrationsstufe angehalten wird. Die erreichte Konzentration ist hier ähnlich flexibel wie im Falle der Gefriertrocknung. In der Auftauphase löste sich der gebildete Trocknungskuchen bei 2-8°C erst langsam in der aufgetauten darunterliegenden Lösungsschicht. Eine Erhöhung der Plattentemperatur beschleunigte diesen Auftauprozess. Die exakte Voraussage des Prozesses und der erreichten Konzentration ist schwierig, da die Sublimationsrate in einem Lyophilisat von sehr vielen Faktoren abhängt [Tang et al., 2006a,b]. Für die genaue Ermittlung des Produktwiderstandes während der Trocknung und des Trocknungsverlaufes könnten beispielsweise manometrische Temperaturmessungen oder dreidimensionale Temperaturverlaufsaufzeichnungen herangezogen werden [Tang et al., 2006a]. Eine Herstellung in Einzeldosen ist so nicht möglich, da die Variabilität in der Endkonzentration zu hoch ist. Eine partielle Gefriertrocknung wäre aber für eine Bulkaukonzentrierung geeignet. Neben der Gefriertrocknung könnten zum Aufkonzentrieren von Antikörperlösungen auch andere Methoden wie z. B. der Wasserentzug durch einfache Vakuumtrocknung [Mattern et al., 1997; Willmann, 2003] herangezogen werden. Dieses Verfahren wurde im Rahmen der Arbeit jedoch nicht untersucht und könnte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Aufkonzentrierung von Cetuximab bis ca. 300 mg/ml zwar sehr gut möglich ist, aber die Nutzung der Formulierung zum einen in Bezug auf die Prozessierbarkeit z.B. durch Filtrationstechniken [Friess et al., 2010; Shire et al., 2004] und zum anderen im Hinblick auf die Spritzbarkeit durch die hohe Viskosität begrenzt ist. Mittels Gefriertrocknung und partieller Gefriertrocknung können höhere Konzentration als durch TFF erzielt werden. Jedoch weist die Gefriertrocknung hinsichtlich Kosten und Formulierungsflexibilität und die partielle Gefriertrocknung gegenüber der Gefriertrocknung hinsichtlich Steuerbarkeit Nachteile auf. Grundsätzliche Alternativen wären das Ausfällen von Cetuximab [Matheus, 2006b], die Kristallisation [Gottschalk, 2008] oder die Herstellung sogenannter PCMCs (Protein coated Microcrystals) [Berkenhoff, 2013].

## 4.2 Einfluss von Tensiden auf die Stabilität von Cetuximab

Proteinaggregation ist eines der Hauptprobleme während Herstellung und Applikation von Biopharmazeutika. Die Vermeidung von Aggregation in Proteinformulierungen ist von größter Bedeutung, da aggregiertes Protein oft Ursache immunologischer Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock ist [Rosenberg, 2006; Kiese et al., 2010; Schellekens, 2005]. Das Verständnis und die Untersuchung von Aggregationsmechanismen und vor allem deren Vermeidung ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Durch Stressstudien können Aggregationsverhalten und Stabilität von Proteinen unter verschiedensten Bedingungen, wie z.B. bei erhöhter Temperatur oder Agitation beleuchtet und mittels Partikelanalytik charakterisiert werden [Mahler et al., 2005; Kiese et al., 2008, 2010; Zölls et al., 2012; Eppler et al., 2010]. Analytische Techniken wie z.B. kalorimetrische Messungen, Fluoreszenzquenching, NMR oder SPR ermöglichen einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Stabilisierung bzw. Aggregatbildung und stellen so eine sinnvolle Ergänzung zu Stressstudien dar [Jones et al., 1997; Giancola et al., 1997]. In den folgenden Kapiteln sollte zum Einen das Verhalten von Cetuximabformulierungen unter verschiedenen Stressbedingungen getestet werden, zum Anderen wurde mit Isothermer Titrations Calorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) versucht, einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Antikörpers durch Tenside zu erlangen.

### 4.2.1 Stressstudien

Tenside, wie beispielsweise Polysorbat, werden vielfach zur Stabilisierung von Proteinformulierungen gegen Agitationsstress verwendet. Effektive Stabilisierung von IgGs durch Polysorbat wurde mit Konzentrationen von 0,0025% Polysorbat 20 in einer 10 mg/ml IgG-Formulierung [Kiese et al., 2008] und 0,025% Polysorbat 80 in einer 100 mg/ml Cetuximabformulierung [Matheus, 2006c] erlangt. Auch die Stabilisierung anderer Proteine, wie beispielsweise hGH [Bam et al., 1998; Katakam et al., 1995], Lactatdehydrogenase (LDH) [Hillgren et al., 2002b] und Albutropin bei Frier-Tau-Stress durch Polysorbat 20 und 80 [Chou, 2005] wurde

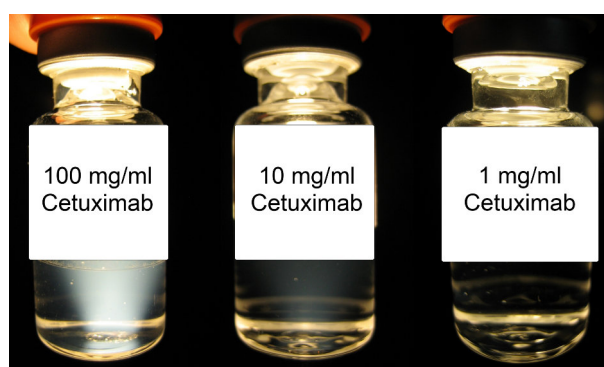
in der Literatur beschrieben. Poloxamer 188 (Lutrol<sup>®</sup> F68) wurde zur Stabilisierung von hGH gegen Grenzflächenstress durch Vortexen als wirksam identifiziert [Katakam et al., 1995]. Lediglich Macrogol-15-hydroxystearat (Solutol<sup>®</sup> HS 15), welches in der Arbeit untersucht wurde, ist bisher weitgehend unerforscht im Bereich der Proteinstabilisierung.

Der Einfluss von Tensiden auf die Stabilität von Cetuximabformulierungen sollte bei unterschiedlichen Stressbedingungen untersucht werden. Matheus zeigte bereits einen destabilisierenden Effekt von Polysorbat 80 auf Cetuximab in sehr geringen Konzentrationen von 0,001 und 0,005 % unter Schüttelstressbedingungen [Matheus, 2006c]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch durch Kiese für einen weiteren IgG beschrieben [Kiese et al., 2008]. Neben dem allgemeinen Stabilisierungsverhalten sollte dieser Effekt bestätigt und näher untersucht werden. Die Versuchsreihen wurden hierzu auf unterschiedliche Cetuximabkonzentrationen und weitere Tensidkonzentrationen im sehr niedrigen Bereich ausgeweitet. Neben mechanischem Stress in Form von Schüttelstress wurde Temperaturstress angewandt. Hierbei wurden sowohl unterschiedliche Polysorbatkonzentrationen, als auch unterschiedliche -qualitäten analysiert. Neben Polysorbat 80 wurden Poloxamer 188 (PO188) und Macrogol-15-Hydroxystearat (MHS15) auf ihre stabilisierenden Eigenschaften untersucht.

#### **4.2.1.1 Einfluss von Cetuximab- und Tensidkonzentration auf die Proteinstabilität während Agitation**

Zur Untersuchung des Stabilisierungsverhaltens von Polysorbat 80 (PS80) bei Agitationsstress wurde die Standard-Cetuximabformulierung (s. Kap. 3.2.1.3) in den Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml hergestellt und mit 0 % - 0,1 % (m/v) Tensid, bzw. für 10 und 1 mg/ml mit 0 % - 0,03 % Tensid versetzt. Dies entspricht Konzentrationen ober- und unterhalb der CMC der jeweiligen Tenside. Fokus wurde besonders auf sehr niedrige Tensidkonzentrationen gelegt, um den destabilisierenden Effekt genauer zu beleuchten [Matheus, 2006c]. Zu Beginn und nach 168 Stunden Schütteln bei 2-8°C wurden die Lösungen untersucht. Als Referenz wurden Vials ungestresst über den Schüttelzeitraum bei 2-8°C gelagert. Für zwei weitere Tenside, Macrogol-(15)-hydroxystearat (MHS15) und Poloxamer 188

(PO188), wurden Stabilitätsdaten ebenfalls bei 100 mg/ml Cetuximab erhoben, um zu untersuchen, ob der bei Polysorbat 80 beobachtete Stabilisierungs- und Destabilisierungseffekt auch bei anderen Tensiden beobachtet werden kann. Die maximale Konzentration wurde für PO188 bis auf 0,3 % angehoben, da dieses Tensid im Gegensatz zu Polysorbat und MHS15 in höheren Konzentrationen stabilisiert [Katakam et al., 1995]. Zur Beurteilung von Instabilitäten wurden alle Proben mittels Größenausschlusschromatographie, Lichtblockademessungen, DLS, SDS-PAGE, Trübung und visueller Kontrolle untersucht.



**Abbildung 4.27:** Visuelle Kontrolle vor dem Schütteln von Cetuximab 100 mg/ml, 10 mg/ml und 1 mg/ml in PBS, pH 6,0 ohne PS80.

Vor dem Schütteln zeigte die visuelle Kontrolle für alle Formulierungen in den Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml eine nahezu klare bis opaleszente Lösung, die frei von sichtbaren Partikeln war (Abb. 4.27). Die auftretende Opaleszenz ist auf die Anwesenheit des Proteins zurückzuführen und beruht auf Rayleigh-Streuung, die bei höherer Proteinkonzentration stärker wird [Eisenberg et al., 1977]. Bei 1 mg/ml war diese kaum, bei 100 mg/ml sehr ausgeprägt sichtbar. Die Polysorbatkonzentration hatte hierbei auf die Opaleszenz keinen Einfluss. Tabelle 4.10 gibt einen Überblick über die Beobachtungen der visuellen Kontrolle nach dem Schütteln. In Abhängigkeit von Cetuximab- und Polysorbatkonzentration bildeten sich unterschiedlich viele Partikel: Im Gegensatz zu den höher konzentrierten Mustern, enthielten die Proben mit 1 mg/ml Cetuximab bei niedrigen Polysorbatkonzentrationen durchweg sehr viele sehr kleine Partikel.

Die Trübungsmessungen spiegelten die Ergebnisse der visuellen Kontrolle wieder. Generell wurde ein Anstieg der Trübung mit steigender Proteinkonzentration von 1 nach 100 mg/ml beobachtet. Um diesen Effekt zur besseren Vergleichbarkeit der

**Tabelle 4.10:** Aussehen der Cetuximabformulierungen in Abhängigkeit von Cetuximab- und Polysorbatkonzentration nach 168 Stunden Schüttelstress.

PS80-Konz.	Cetuximabkonzentration		
	100 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml
0 %	4b	2a	4c
0,00001 %	3b	4b	4c
0,00003 %	n.a.	3b	4c
0,0001 %	n.a.	3a	4c
0,0003 %	3b	1	1
0,001 %	2b	1	1
0,003 %	2b	1	1
0,01 %	1	1	1
0,03 %	1	1	1
0,1 %	1	n.a.	n.a.

<sup>1</sup> frei von Partikeln

<sup>2</sup> wenige vereinzelte Partikel

<sup>3</sup> viele Partikel

<sup>4</sup> sehr viel Partikel

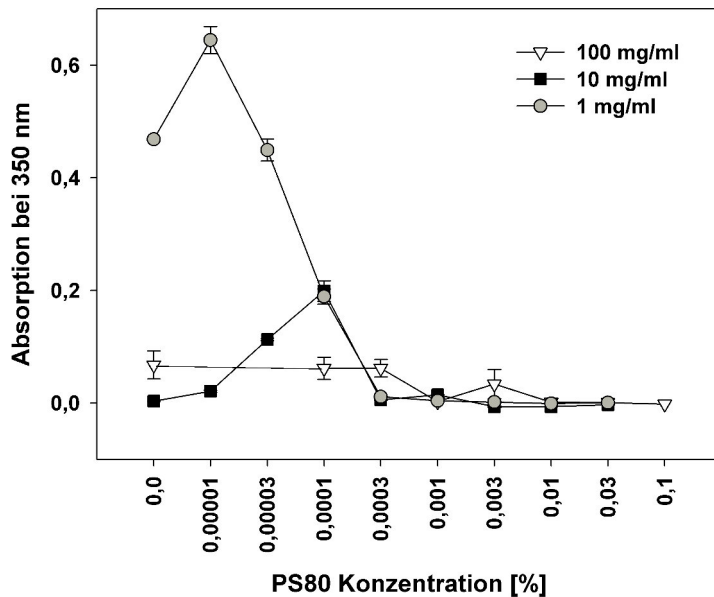
<sup>a</sup> mittlere bis große Partikel

<sup>b</sup> kleine Partikel

<sup>c</sup> sehr feine Partikel

Proben herauszurechnen und nur den Effekt der gebildeten Partikel und deren Einfluss auf die Trübung zu sehen, wurden die Trübungswerte der gestressten Proben um den Wert der Grundtrübung aus den Startwerten korrigiert (Abb. 4.28). Zu beobachten war ein bereits sehr hoher Trübungswert von 0,48 ohne Polysorbatzusatz für die 1 mg/ml Formulierung. Die Trübung erreichte die höchste Absorption von 0,65 mit der niedrigsten PS80 Konzentration von 0,00001 %. Ab einer Polysorbatkonzentration von 0,0003 % setzte Stabilisierung durch das Tensid gegen Schüttelstress ein, was erkennbar an Trübungswerten auf Niveau der Startwerte war. Eine wesentlich geringere Trübung ohne Polysorbat wurde nach Schüttelstress bei den Formulierungen mit 10 und 100 mg/ml detektiert. Die Absorptionen lagen hier bei 0 für 10 mg/ml und 0,07 für 100 mg/ml. Im Vergleich zur 100 mg/ml Formulierung ist bei 10 mg/ml allerdings ein anschließender Anstieg der Absorption zu erkennen, welcher sein Maximum bei 0,0001 % Polysorbatzusatz und einer Absorption von 0,2 besitzt. Ein Absinken der Absorption auf nahezu 0 deutet auf die Stabilisierung der Formulierung hinsichtlich der Bildung

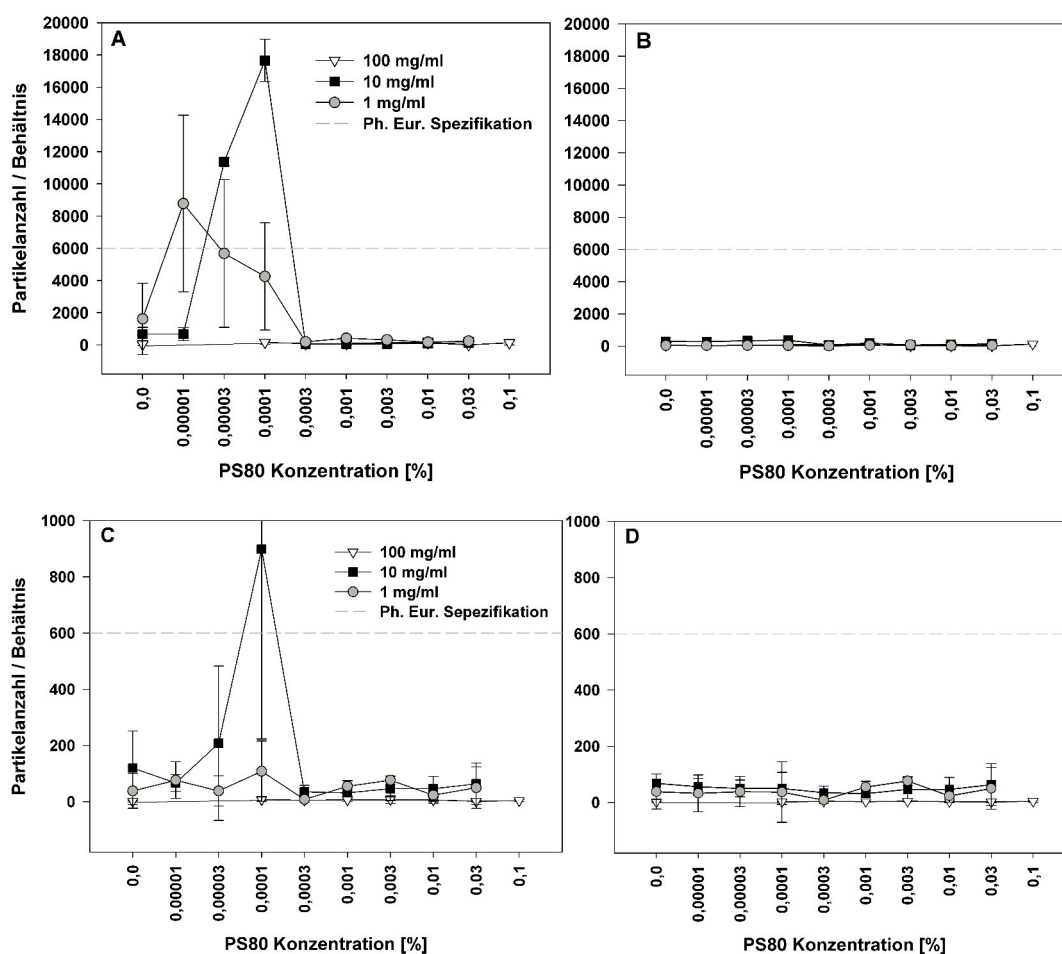
unlöslicher Aggregate ab einer Konzentration von 0,0003% hin. Die Absorption bei der 100 mg/ml Formulierung bleibt zuerst konstant bei leicht erhöhten Absorptionswerten von 0,007 und sinkt erst ab einer Polysorbatkonzentration von 0,0001% auf das Niveau der Startwerte ab.



**Abbildung 4.28:** Einfluss der PS 80 und Proteinkonzentration auf die Trübung nach Schüttelstess durch entstehende Aggregate, gemessen bei 350 nm.

Zur Untersuchung subvisueller Partikel [Kiese et al., 2008; Zölls et al., 2012] wurden zusätzlich zur Trübung Lichtblockademessungen durchgeführt.

Die Messungen bestätigten die vorherigen Ergebnisse und zeigten, dass eine Stabilisierung der Proben, sowohl für 1, 10 und 100 mg/ml erst ab einer Konzentration von mindestens 0,0003% Polysorbat startet. Die Startwerte waren für alle Proben auf konstant niedrigem Niveau und innerhalb der Spezifikationen des Arzneibuches (Abb. 4.29 B und D). Die 1 mg/ml Formulierung wies nach Schütteln bereits ohne Polysorbat eine sehr hohe Partikelanzahl auf, welche sich zu einem Maximum von >8000 Partikeln  $\geq 10 \mu\text{m}$  und >900 Partikeln  $\geq 25 \mu\text{m}$  bei der kleinsten Polysorbatkonzentration von 0,00001% steigerte (Abb. 4.29 A und C). Auch bei der 10 mg/ml Formulierung zeigte sich eine leichte Destabilisierung durch geringe Polysorbatkonzentrationen von 0,00003 und 0,0001%. Einzig die

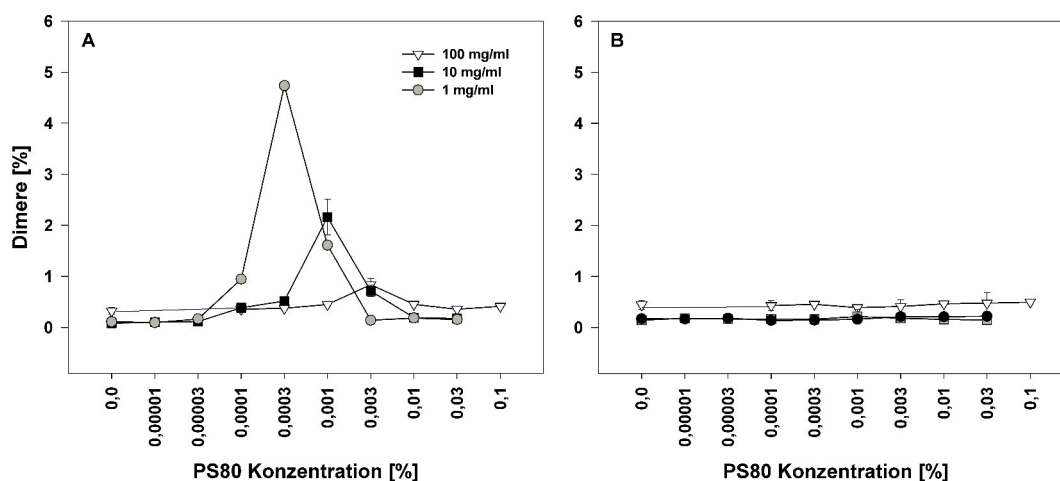


**Abbildung 4.29:** Einfluss von Protein- und Polysorbatkonzentration auf die Partikelanzahl in Cetuximab 100 mg/ml in PBS, pH 6,0 im Vergleich zu den Startwerten via Lichtblockademessung; A: Partikelzahl  $\geq 10 \mu\text{m}$  nach 168 h Schütteln; B: Partikelzahl  $\geq 10 \mu\text{m}$  vor Schütteln; C: Partikelzahl  $\geq 25 \mu\text{m}$  nach 168 h Schütteln; D: Partikelzahl  $\geq 25 \mu\text{m}$  vor Schütteln; Die gepunktete Linie entspricht den Vorgaben maximal erlaubter Partikel des Europäischen Arzneibuches pro Behältnis.

100 mg/ml Cetuximabformulierung wies eine konstant niedrige Partikelanzahl bei allen PS80-Konzentrationen auf.

Lösliche Aggregate wurden mittels SEC untersucht (Abb. 4.30). Nach 168 Stunden wurde für alle drei Cetuximabkonzentrationen ein deutlicher Anstieg der Aggregate im Gegensatz zu den Startwerten vor allem bei sehr niedrigen Polysorbatkonzentrationen festgestellt. Hierbei verschiebt sich das Maximum der Instabilität

für 1 mg/ml bei 0,00003 % PS80 mit einem Dimeranteil von 5 % über 0,001 % bei 10 mg/ml mit einem Dimeranteil von 2,3 % nach 0,003 % PS bei der 100 mg/ml Formulierung, welche einen Anteil von 1 % an löslichen Aggregaten aufweist. Interessanterweise zeigten die Formulierungen ohne Polysorbat keine schlechteren Ergebnisse als die Startwerte. Der destabilisierende Einfluss bei ca. 0,003 % Polysorbat 80 und die sehr geringen Dimeranteile ohne Polysorbat wurde von Matheus für die 100 mg/ml Formulierung ebenfalls gezeigt [Matheus, 2006c]. Allerdings war dort der prozentuale Anteil der Aggregate höher. Grund hierfür können die leicht unterschiedlichen Versuchsbedingungen sein. Matheus führte den Schüttelstress bei Raumtemperatur durch. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 2-8°C geschüttelt, was - wie gesehen - zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann [Kiese et al., 2008].

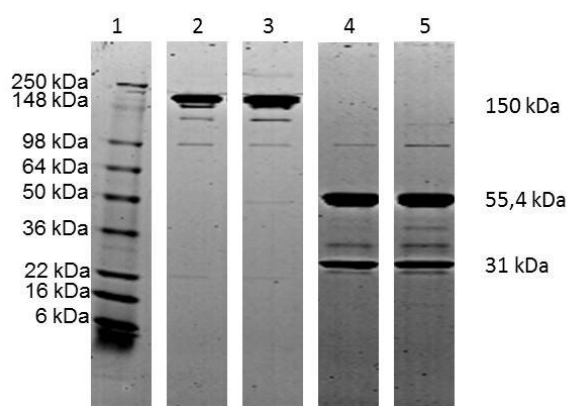


**Abbildung 4.30:** Lösliche Aggregate in Abhängigkeit von Cetuximab- und PS80 - Konzentration in PBS, pH 6,0, detektiert mittels SE-HPLC: A: nach 168 Stunden Schüttelstress; B: Startwerte vor dem Schütteln.

Um das Entstehen bzw. Vorhandensein kovalent verbundener Multimere und Abbauprodukte festzustellen wurden die Proben zusätzlich mit SDS-PAGE analysiert. Abbildung 4.31 zeigt Banden der nicht-reduzierenden SDS-PAGE (2 und 3) und Banden der reduzierenden SDS-PAGE (4 und 5) gegen den Molekulargewichtsmarker. Schwache Banden sowohl bei der reduzierten als auch bei der nicht-reduzierten SDS-PAGE bei 0,00003 % PS80 zeigen, dass ein geringer Anteil an Abbauprodukten entstanden sein muss: Im nicht reduzierten Gel ist eine



Bande bei ca. 55 kDa sichtbar, was auf die Abspaltung der schweren Kette oder des Fab-Fragmentes hindeutet [Cordoba et al., 2005]. Für das reduzierte Gel ist eine zusätzliche Bande bei ca. 40 kDa erkennbar, beispielsweise verursacht durch das Vorhandensein einer proteolysierten schweren Kette [Matheus, 2006c].



**Abbildung 4.31:** Beispiel der SDS-PAGE für die Proben der 100 mg/ml Cetuximabformulierung in PBS, pH 6,0: 1) Molekulargewichtsstandard 2) mit 0 % Polysorbat, nicht-reduziert 3) mit 0,00003 % Polysorbat, nicht-reduziert 4) mit 0 % Polysorbat, reduziert 5) mit 0,00003 % Polysorbat, reduziert.

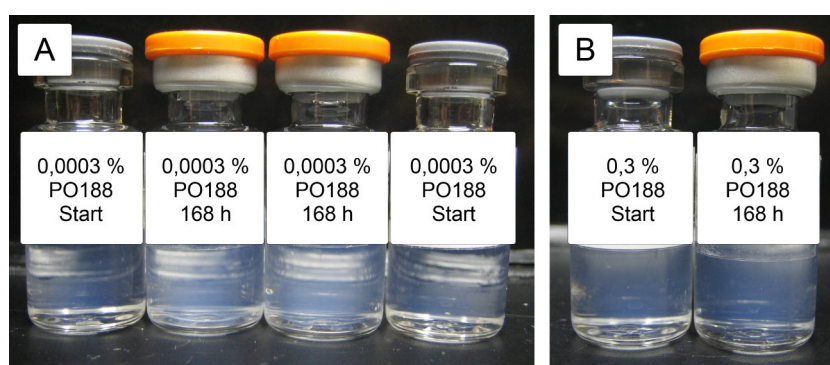
In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration werden für die drei Formulierungen unterschiedlich hohe Dosierungen an Polysorbat benötigt. Mit steigender IgG Konzentration steigt auch die Menge an benötigtem Polysorbat 80, wobei sich dies vor allem bei der 100 mg/ml Formulierung auswirkt. Eine Stabilisierung wurde für 1 mg/ml bei 0,01 %, für 10 mg/ml bei 0,01 % und für 100 mg/ml bei 0,03 % PS80 identifiziert. Auch wenn für die sichere Stabilisierung der 100 mg/ml Formulierung ein höherer Anteil an Polysorbat nötig war, so zeigt diese trotzdem den niedrigsten Anteil an löslichen Aggregaten im Vergleich zu 10 mg/ml und 1 mg/ml. Bei der 10 mg/ml Formulierung ließ sich der größte Anteil unlöslicher Partikel finden, wie bei der Lichtblockademessung gezeigt. Es wurde somit unterschiedliches Aggregationsverhalten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration gezeigt. Die gering konzentrierte Lösung von 1 mg/ml neigte eher zur Bildung sehr kleiner, sowie löslicher Aggregate, wohingegen die hochkonzentrierte Formulierung eher eine Tendenz zur Bildung größerer Aggregate bei Schüttelstress zeigte. Der Anteil gebildeter Aggregate steigt mit abnehmender Proteinkonzentration. Dies spricht für einen Autostabilisierungseffekt der hochkonzentrierten Formulierung gegenüber der angewandten Stressmethode, was bereits durch Treuheit

festgestellt wurde [Treuheit et al., 2002]. Der für die inverse Konzentrationsabhängigkeit der Aggregatbildung vorgeschlagene Mechanismus wird hier durch das kritische Verhältnis der Luft/Wasser Grenzfläche zum Protein begründet. Unter der Annahme, dass Aggregation vorwiegend an der Luft/Wasser-Grenzfläche stattfindet und damit das Vorhandensein dieser Grenzfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aggregation ist, wird das Verhältnis von Grenzfläche zu Protein größer, je geringer die Proteinkonzentration wird. Es wird ein steigender Anteil Aggregate mit sinkender Proteinkonzentration beobachtet. Die gezeigten Ergebnisse untermauern diese These. Des Weiteren kann die Viskosität zur Erklärung der Autostabilisierung bei höheren Proteinkonzentrationen herangezogen werden. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Viskosität der Lösung durch reversible Selbstassoziation der Fab-Fragmente zu, wodurch auftretende Scherbewegungen in Lösung reduziert werden könnten [Shire et al., 2004; Kanai et al., 2008].

Der Einfluss von Polysorbat 80 auf das mechanisch beanspruchte Protein ist zum Einen stabilisierend in höheren Konzentrationen, welche trotzdem noch unterhalb der CMC von PS80 liegen (s. Kap. 4.2.2.1), andererseits tritt eine Destabilisierung bei sehr niedrigen Konzentrationen auf, was sich durch vermehrte Entstehen von Aggregaten nach Schüttelstress zeigt. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Bildung löslicher und nicht löslicher Aggregate bei unterschiedlichen Polysorbatkonzentrationen verhindert oder getriggert wird. So wird beispielsweise die Bildung löslicher Aggregate in der 100 mg/ml Formulierung erst bei einer 10-fach höheren Polysorbatkonzentration unterdrückt als die Bildung visueller Partikel (0,0003 % vs. 0,003 %). Es empfiehlt sich in jedem Fall, für Stabilitätsuntersuchungen in der Proteinformulierung ein breites analytisches Methodenspektrum anzuwenden, um physikalische Instabilitäten adäquat detektieren und beurteilen zu können [Kiese et al., 2008]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten Studien von Kiese et al. eine Destabilisierung eines Antikörpers bei Agitation im Anstieg der löslichen Aggregate mittels SEC bei 0,0025 % Polysorbat 20 und in einem Anstieg der unlöslichen Aggregate, sowohl im visuellen als auch im subvisuellen Bereich. Im beschriebenen Fall, stellte 0,0025 % die kleinste verwendete Konzentration an Polysorbat dar. Die in der vorliegenden Versuchsreihe festgestellten Destabilisierungen durch Bildung unlöslicher Aggregate zeigten sich schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen von 0,00001 - 0,0003 % Polysorbat für

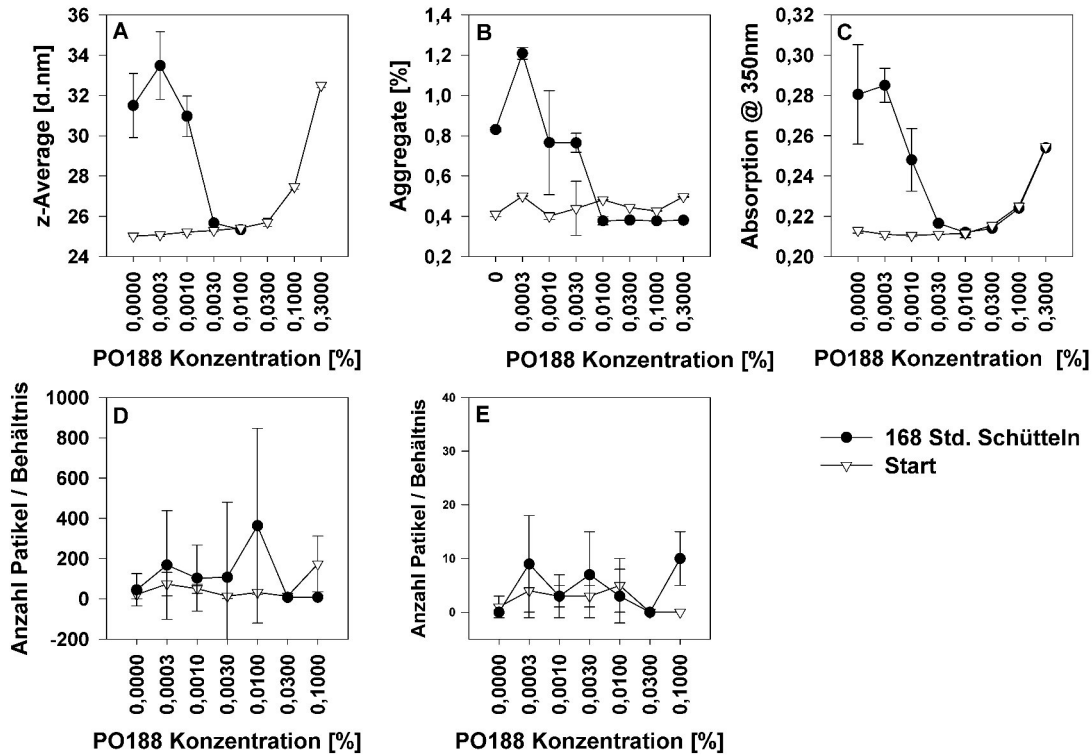
alle IgG-Konzentrationen. Dies wurde durch die Untersuchungen von Matheus ebenfalls gezeigt. Hier fanden sich subvisuelle Partikel bei PS80-Konzentrationen von 0,001 % und 0,005 % [Matheus, 2006c].

Mit 100 mg/ml Cetuximab wurden zusätzlich Stresstests mit MHS15 und PO188 durchgeführt. Für die beiden Tenside zeigten sich nach Stressung der hochkonzentrierten Formulierungen ebenfalls Effekte wie mit Polysorbat 80.



**Abbildung 4.32:** (A) Cetuximab 100 mg/ml in PBS, pH 6,0 mit 0,0003 % PO188; außen Startproben, innen nach 168 Stunden Schüttelstress; (B) Cetuximab 100 mg/ml mit 0,3 % PO188; links Startproben, rechts nach 168 Stunden Schüttelstress.

Im Vergleich zu den ungestressten Mustern wurde eine deutlich stärkere Trübung für die Proben mit 0,0003 und 0,001 % PO188 im Gegensatz zu den Startmustern gesehen. Hierbei zeigte die Probe mit der niedrigsten PO188-Konzentration keine sichtbaren Partikel sondern nur eine erkennbar höhere Opaleszenz. Nur bei 0,001 % ließen sich Partikel mit bloßem Auge erkennen. Mit zunehmender Tensidkonzentration verschwand die erhöhte Trübung und glich sich den Startwerten an (Abb. 4.32). Poloxamer 188 bewirkte eine Destabilisierung von Cetuximab bei niedriger Konzentration. Der Effekt trat weniger deutlich als bei PS80 auf. DLS Messungen, sowie die Absorption bei 350 nm zeigen ein vermehrtes Auftreten subvisueller Partikel im Konzentrationsbereich von 0,0003 % - 0,003 %, wobei das destabilisierende Maximum hier bei der geringsten getesteten Konzentration erreicht wurde (Abb. 4.33 A und C). Die Ergebnisse wurden durch Messung der löslichen Aggregate mittels SE-HPLC bestätigt. Auch hier wurde eine Destabilisierung im Bereich 0 - 0,003 % PO188 durch den Anstieg gebildeter Aggregate beobachtet (Abb. 4.33 B). Lichtblockademessungen zeigten für Partikel  $\geq 10 \mu\text{m}$  eine schwache Tendenz mit höheren Partikelzahlen im Bereich mittlerer Poloxa-

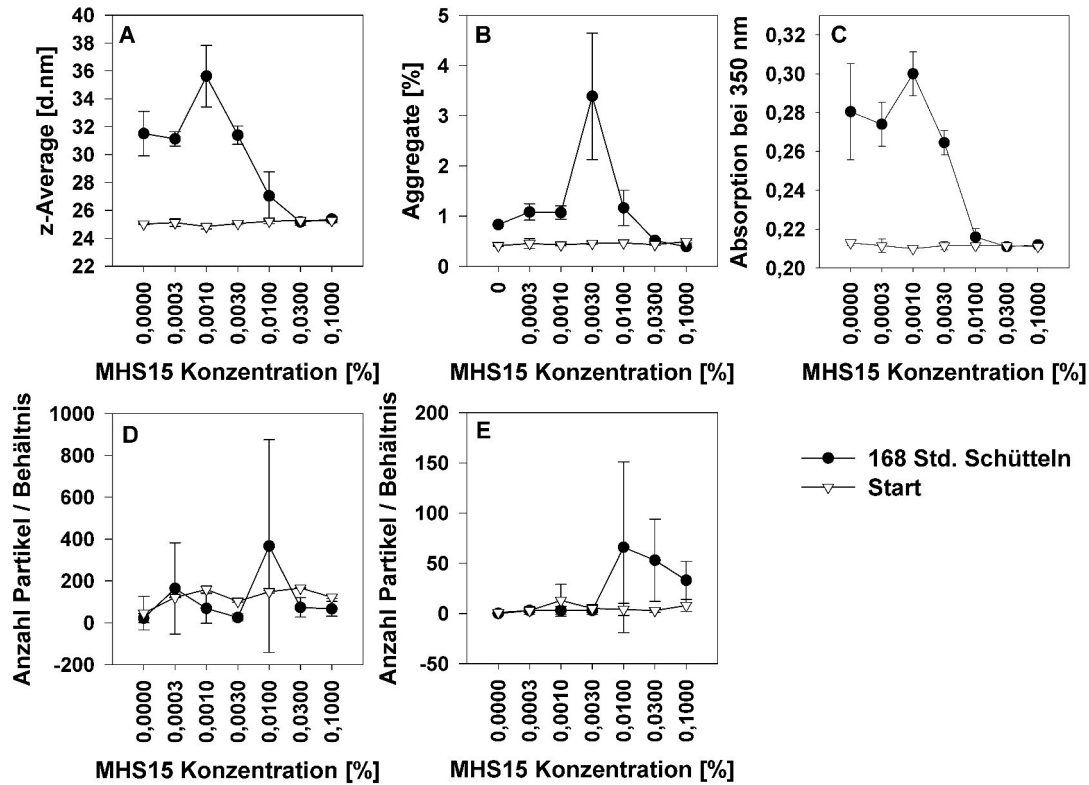


**Abbildung 4.33:** Aggregatbildung für Cetuximab 100 mg/ml in PBS, pH 6,0 in Abhängigkeit von der PO188-Konzentration zu Beginn und nach 168 Stunden Schüttelstress, analysiert mit: (A) DLS; (B) SE-HPLC; (C) Absorption bei 350 nm; (D) Lichtblockademessungen für Partikel  $\geq 10 \mu\text{m}$ ; (E) Lichtblockademessungen für Partikel  $\geq 25 \mu\text{m}$ .

merkonzentrationen von 0,01 - 0,03 % (Abb. 4.33 D und E). Die hohe Varianz der Messungen ließ keine klare Interpretation der Partikelzahlen zu. Eine Stabilisierung der Proben gegen agitationsbedingte Aggregation könnte mit einer Konzentration von mindestens 0,1 % PO188 erreicht werden.

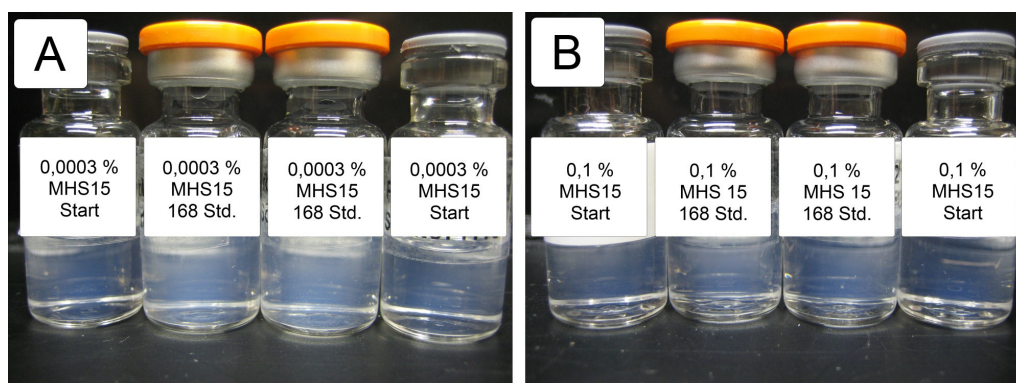
Macrogol-(15)-hydroxystearat (MHS15) zeigte in der Versuchsreihe ebenfalls den Effekt der Destabilisierung des Antikörpers gegen Schüttelstress bei geringen Konzentrationen. Die gemessenen Werte sind ähnlich den Ergebnissen, die mit Cetuximab und Polysorbat 80 erzielt wurden. Im mittleren Konzentrationsbereich bei 0,003 % MHS15 wurde mit der SEC für lösliche Aggregate ein Maximum von 3,5 % detektiert, welches bei 10-fach höherer Konzentration wieder verschwand (Abb. 4.34 B). Die Lichtblockademessungen waren aufgrund hoher Schwankun-

gen wenig aussagekräftig und wiesen keine eindeutige Tendenz auf (Abb. 4.34 D und E).



**Abbildung 4.34:** Aggregatbildung für Cetuximab 100 mg/ml in PBS, pH 6,0 in Abhängigkeit von der MHS15-Konzentration zu Beginn und nach 168 Stunden Schüttelstress, analysiert mit: (A) DLS; (B) SE-HPLC; (C) Absorption bei 350 nm; (D) Lichtblockademessungen für Partikel  $\geq 10 \mu\text{m}$ ; (E) Lichtblockademessungen für Partikel  $\geq 25 \mu\text{m}$ .

Die Graphen für DLS und Trübungswerte weisen für MHS15 eine gute Korrelation auf (Abb. 4.34 A und C). Der größte Partikeldurchmesser wurde mit 35,8 nm bei 0,001 % gemessen, bei welcher auch gleichzeitig der höchste Trübungswert von 0,3 mAU gemessen wurde. Trübungswerte, sowie z-Average sanken bis 0,03 % MHS15 wieder auf Startwerte. Lösliche Aggregate bildeten sich vermehrt bei einer MHS15-Konzentration von 0,003 und 0,01 %. In der visuellen Kontrolle war auch hier, wie schon bei PO188 beobachtet, für niedrige Konzentrationen eine erhöhte Opaleszenz sichtbar, sowie eine hohe Anzahl sichtbarer Partikel für die Proben mit 0,0003 und 0,001 % MHS15 (Abb. 4.35).



**Abbildung 4.35:** Ausgewählte Muster von Cetuximab 100 mg/ml in PBS, pH 6,0 mit MHS15 (A) Startproben (außen) und Proben nach 168 Stunden Schüttelstress (mitte) mit 0,0003 % MHS15; (B) Startproben (außen) und Proben nach 168 Stunden Schüttelstress (mitte) mit 0,1 % MHS15.

Die Tendenz der Destabilisierung durch Tenside in sehr niedrigen Konzentrationen bei Agitationsstress konnte mit MHS15 und PO188 in hochkonzentrierter Cetuximabformulierung ebenfalls bestätigt werden. Der Effekt beschränkte sich nicht auf Polysorbat sondern scheint ein generelles Phänomen - zumindest für den untersuchten Antikörper Cetuximab - zu sein. Weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Proteinen und Tensiden stellen ein interessantes Gebiet weiterer Forschungen dar, um diese These zu untermauern.

Der genaue Mechanismus dieser Destabilisierung ist bisher unklar und nicht aufgeklärt. Eine Rolle könnte ein bestimmtes Verhältnis von Tensid, Protein bzw. Protein/Tensid-Komplexen an der Luft/Wasser-Grenzfläche spielen. Zur Stabilisierung eines Proteins gegen Agitationsstress wird vor allem die Hinderung der Adsorption des Proteins an hydrophoben Grenzflächen diskutiert [Katakam et al., 1995; Maa und Hsu, 1997; Bam et al., 1998; Treuheit et al., 2002]. Beim Schütteln entstehen ständig neue Oberflächen und damit Grenzflächen zwischen Luft und Wasser. Cetuximab als Protein, welches amphiphile Eigenschaften besitzt, wird so ständig weiter die sich neu bildenden Oberflächen besetzen, da es in einem Diffusionsgleichgewicht zwischen der Bulklösung und der Grenzfläche steht. An der Grenzfläche erfolgt partielle Entfaltung und Reorientierung, indem hydrophobe Domänen des Antikörpers nach außen treten. Hydrophobe Interaktionen mit weiteren entfalteten Proteinen werden dadurch begünstigt und die Aggregatbildung erhöht [Wang et al., 2008]. Ursache der Entfaltung des Proteins ist die Ober-

flächenspannung der Grenzfläche. Um die Differenz der inneren Spannung des Proteins und der Oberflächenspannung zu verringern, entfaltet sich das Protein partiell. Hydrophobe Molekülteile werden somit nach außen gekehrt [Führling, 2004]. Durch die Besetzung der Grenzfläche Luft/Wasser mit Tensid kann dieses das Protein zum Einen teilweise von der Grenzfläche verdrängen, zum Anderen wird durch das Tensid auch die Oberflächenspannung verringert. Dies bewirkt einen geringeren Unterschied zwischen Oberflächenspannung und intramolekularer Spannung im Protein, wodurch dieses eine geringere Tendenz zur Entfaltung zeigt. Die Adsorption von Protein und Tensiden an der Luft/Wasser-Grenzfläche ist kompetitiv. Da das Tensid normalerweise stärker an der Grenzfläche adsorbiert, als das Protein, kann dieses fast vollständig von der Grenzfläche verdrängt und somit vor Entfaltung und Aggregation bewahrt werden [Randolph und Jones, 2002]. Ein weiterer protektiver Effekt ist eine direkte Interaktion des Tensids mit hydrophoben Bereichen, von Bam z.B. für HSA und rhGH beschrieben [Bam et al., 1998]. PS80 stabilisierte hierbei den "molten globule state" von rhGH durch hydrophobe Interaktion, und verhindert dadurch die intermolekulare Reaktion zwischen den entfaltenen Proteinmolekülen zum Aggregat. Der Schutz durch direkte Interaktion wurde vor allem für hydrophobe Proteine beschrieben. Interaktionsmessungen zwischen Cetuximab und Tensiden, wie PS80, könnten über diese Art der Stabilisierung Auskunft geben.

#### **4.2.1.2 Einfluss der Antikörper- und der Polysorbatkonzentration auf die Stabilität während Lagerung bei erhöhter Temperatur**

Während sich die Tenside bei ausreichender Konzentration in den vorangegangenen Versuchen gegen Agitationsstress als wirkungsvoll erwiesen haben, wird durch die Literatur ein destabilisierender Einfluss von Tensiden - insbesondere Polysorbat - auf Proteine bei Temperaturstress beschrieben [Katakam et al., 1995; Treuheit et al., 2002; Wang et al., 2008]. Ursache hierfür können beispielsweise oxidative Veränderungen bestimmter Molekülteile (Polyoxyethylen-Untereinheiten) im Tensid sein [Kerwin, 2008; Kishore et al., 2011a; Jaeger et al., 1994]. Neben dem Einfluss von Polysorbat spielt die Antikörperkonzentration unter erhöhten Temperaturen eine große Rolle für die Stabilität der Formulierung. Im Gegensatz zu Schüttelstress sind hochkonzentrierte Antikörperformulierungen anfälliger ge-

gen Temperaturstress als niedriger konzentrierte Lösungen [Treuheit et al., 2002]. Ziel war es den Einfluss von Antikörper- und PS80-Konzentration auf Cetuximab bei erhöhten Temperaturen herauszuarbeiten.

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Cetuximab-Standardformulierung (s. Kap. 3.2.1.3) in den Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml jeweils 0 % - 0,1 % Polysorbat 80 zugesetzt. Die Auswahl der Polysorbatkonzentration richtete sich nach den Ergebnissen der Stresstudien: Es wurden jeweils die zwei Polysorbat Konzentrationen, bei denen die größten Instabilitäten beobachtet wurden ausgewählt, 0,1 % als maximale Konzentration und jeweils 0 % PS als Referenz (Tab. 4.11). Die Vials wurden in Klimakammern bei 40°C/75 % r.h., 25°C/60 % r.h. und im Kühlschrank über einen Zeitraum 26 Wochen gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie, SDS-PAGE, Trübung, FT-IR und visueller Kontrolle.

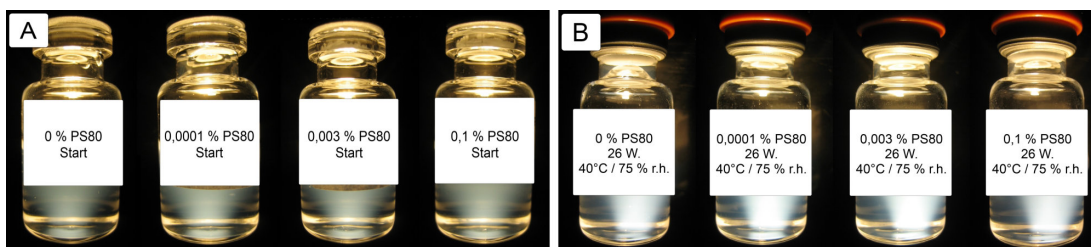
**Tabelle 4.11:** Verwendete Konzentrationen an Polysorbat 80 in Formulierungen mit 1, 10 und 100 mg/ml Cetuximab.

Cetuximabkonz.	Polysorbatkonzentration [%]			
	Probe A	Probe B	Probe C	Probe D
1 mg/ml	0	0,00001	0,0003	0,1
10 mg/ml	0	0,0001	0,001	0,1
100 mg/ml	0	0,0001	0,003	0,1

Alle Proben, die bei 2-8°C gelagert wurden zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Startwerten und blieben stabil über den gesamten Lagerzeitraum. Lagerung bei 25°C / 60 % r.h. zeigten nur geringe Veränderungen der Stabilität von Cetuximab (Daten nicht gezeigt). Erst bei Lagerung > 40°C / 75 % r.h. waren signifikante Veränderungen der Stabilität von Cetuximab erkennbar:

In der visuellen Kontrolle zeigten vor allem die Proben der 100 mg/ml Formulierung nach Lagerung bei 40°C eine mit bloßem Auge wahrnehmbare Opaleszenzerhöhung im Vergleich zu den Startwerten (Abb. 4.36). In den Proben mit geringen Polysorbatkonzentrationen wurden jeweils wenige proteinogene Partikel beobachtet. Dies galt sowohl für 1, 10 und 100 mg/ml. Im Vergleich zu den geschüttelten Proben war die Anzahl der visuellen Partikel um ein Vielfaches geringer.

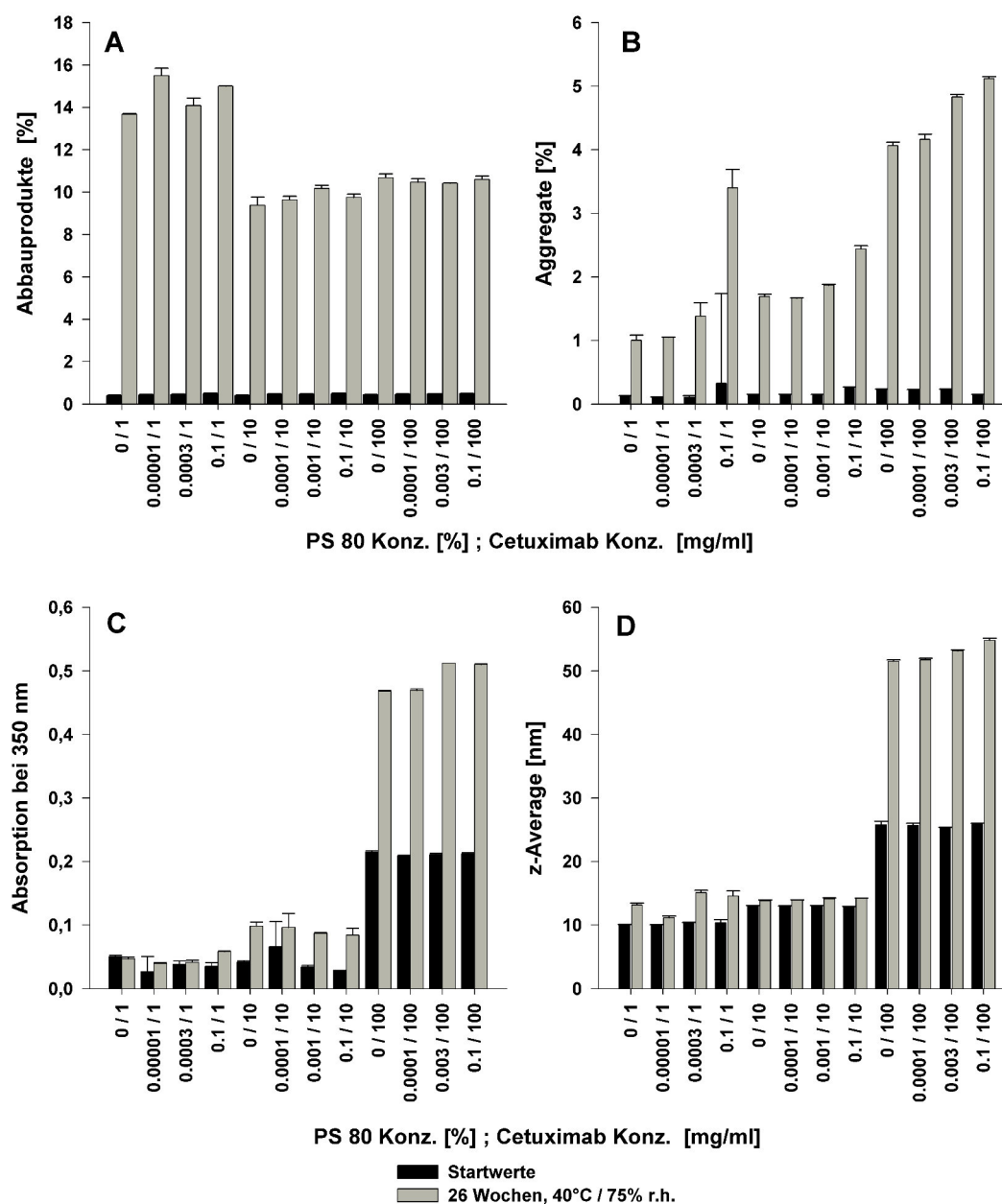




**Abbildung 4.36:** Proben mit 100 mg/ml Cetuximab in PBS, pH 6,0 und (v.l.n.r.) 0, 0,0001, 0,003 und 0,1 % Polysorbat 80. A: Startwerte; B: nach 26 Wochen Lagerung bei 40°C / 75 % r.h.

Trübungswerte und DLS-Ergebnisse (Abb. 4.37 C und D) bestätigten die Beobachtungen der optischen Kontrolle: Es wurde jeweils ein allgemeiner Anstieg der Trübung über die Zeit innerhalb der Probenreihen gemessen. Dieser Effekt wurde vor allem für die Proben mit 100 mg/ml nach 26 Wochen Lagerung deutlich. Innerhalb der einzelnen Cetuximab-Konzentrationsreihen kam es nur zu minimalen Trübungsunterschieden zwischen den einzelnen Polysorbatkonzentrationen. In der hochkonzentrierten Formulierung ließ sich zusätzlich zur allgemeinen Erhöhung der Trübung nach Lagerung für die beiden hohen PS80-Konzentrationen (0,003 % und 0,1 %) ein leichter Anstieg um 0,04 auf eine Absorption von 0,5 erkennen.

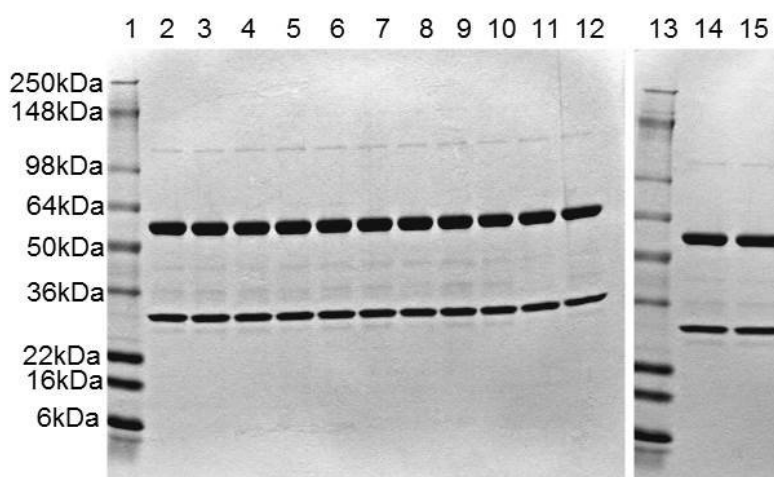
DLS-Messungen korrelierten mit den Trübungsmessungen und zeigten nach 26 Wochen einen sehr geringen Anstieg des z-Average für 1 und 10 mg/ml und eine Verdoppelung von 25 nm auf > 50 nm nach Lagerung für die 100 mg/ml Formulierung. Innerhalb der 100 mg/ml Formulierungen ist ein sehr leichter Anstieg um 3 nm von der 0 %igen Polysorbatformulierung zur 0,1 %igen festzustellen, was vergleichbar mit den Trübungsmessungen ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PS80 die Bildung unlöslicher Aggregate bei Temperaturstress nicht wesentlich beeinflusst. In der SE-HPLC hingegen wurde nach der Lagerung bei 40°C / 75 % r.h. ein polysorbatabhängiger Anstieg der löslichen Aggregate für alle drei Cetuximabkonzentrationen festgestellt (Abb. 4.37 A und B), wobei der signifikanteste Anstieg für die 1 mg/ml Formulierung bei der höchsten PS80-Konzentration beobachtet wurde. Die Ergebnisse stehen im Kontrast zu den von Matheus ermittelten Werten, die für PS80 nur einen sehr geringen Anstieg löslicher Aggregate beobachtete, bei gleichzeitigem Anstieg der Trübung mit der Polysorbatkonzentration [Matheus, 2006c]. Neben der Bildung von Aggregaten



**Abbildung 4.37:** Analytik der Cetuximabproben mit PS80 zu Beginn und nach 26 Wochen Lagerung bei 40°C / 75% r.h.: (A) Abbauprodukte gemessen via SE-HPLC; (B) lösliche Aggregate gemessen via SE-HPLC; (C) Trübung bei 350 nm; (D) Partikel im nm-Bereich, gemessen mittels DLS.

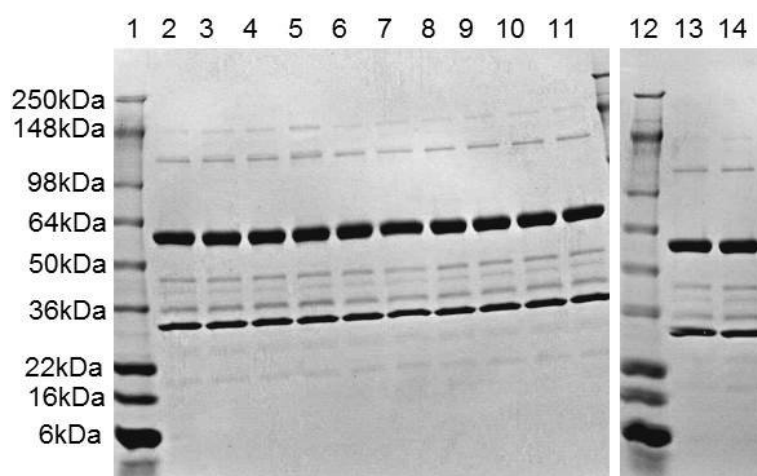
wurde nach 26 Wochen Lagerung auch ein signifikanter Anstieg an Cetuximab-Spaltprodukten festgestellt. Über 15% Fragmente wurde bei der 1 mg/ml Formu-

lierungen gemessen. Die Werte sind damit um ca. 3% höher als die der 10 und 100 mg/ml Formulierungen. Die Ergebnisse der SDS-PAGE bestätigen zwar den Zuwachs an Degradationsprodukten, der Unterschied zwischen 1 und 100 mg/ml lässt sich rein visuell hier allerdings nicht feststellen. In der reduzierenden SDS-PAGE wurden Abbauprodukte zwischen den Banden der schweren und der leichten Kette nach 26 Wochen Lagerung verstärkt sichtbar und bestätigen die Ergebnisse der SEC (Abb. 4.38 und 4.39). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Spaltprodukte der schweren Kette. Die intensivere Bande bei ca. 120 kDa könnte vom kompletten Antikörper mit einer abgespaltenen leichten Kette herrühren [Matheus, 2006c].



**Abbildung 4.38:** Reduzierende SDS-PAGE der Startmuster von Cetuximab; die Gele sind wie folgt beladen: [mg/ml Cetuximab / % Polysorbat]: (A) 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 1/ 0; 3 1/ 0,00001; 4 1/ 0,0003; 5 1/ 0,1; 6 10/0; 7 10/ 0,0001; 8 10/ 0,001; 9 10/ 0,1; 10 100/ 0; 11 100/ 0,0001; (B) 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 100/ 0,003; 3 100/ 0,1.

Als Ursache für das vermehrte Auftreten löslicher Aggregate wurde in der Literatur der Mechanismus der oxidativen Schädigung des Proteins durch Polysorbat vorgeschlagen. Danach werden durch Polysorbat-Autoxidation Hydroperoxide, Formaldehyd, Ameisensäure und höhermolekulare Spaltprodukte gebildet, welche das Protein durch Interaktion schädigen können [Kerwin, 2008; Wang et al., 2008]. In Untersuchungen mit IL2-Mutein wurde eine durch PS80 verursachte oxidative Schädigung des Proteins nachgewiesen. Da die Autoren einen katalytischen Effekt ausschlossen, wird die Bildung von Aggregaten (sowohl kovalenter als auch nicht-kovalenter Natur) auf die Interaktion von Polysorbat 80 mit dem

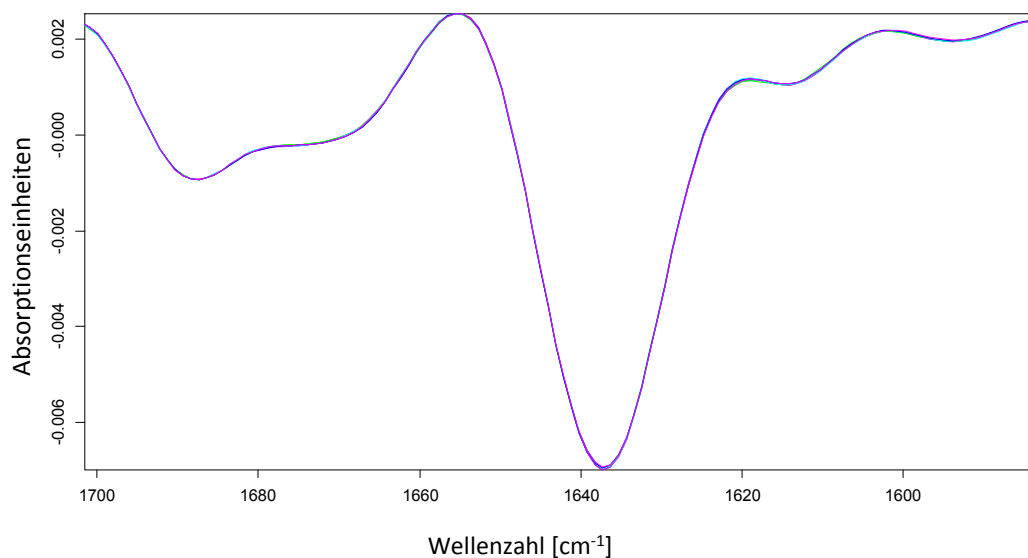


**Abbildung 4.39:** Reduzierende SDS-PAGE nach 26 Wochen Lagerung bei 40°C/75 % r.h.; die Gele sind wie folgt beladen[mg/ml Cetuximab/ % Polysorbat]: (A) 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 1/ 0; 3 1/ 0,00001; 4 1/ 0,0003; 5 1/ 0,1; 6 10/0; 7 10/ 0,0001; 8 10/ 0,001; 9 10/ 0,1; 10 100/ 0; 11 100/ 0,0001; (B) 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 100/ 0,003; 3 100/ 0,1.

Protein zurückgeführt, woraufhin zuvor geschützte Gruppen zum Vorschein und zur Reaktion kommen können. Der Anstieg löslicher Aggregate mit steigender Polysorbatkonzentration wird in der Literatur auch auf den Reaktionsmechanismus der Bildung dieser Aggregate und deren Beeinflussung durch Polysorbat zurückgeführt: Bei Temperaturstress ist die Hauptursache der Aggregation die proportional erhöhte Rate an Molekülkollisionen, welche zur Aggregation führt und nicht der Kontakt mit der Luft/Wasser-Grenzfläche. Die Reaktion ist aufgrund der fehlenden Agitation rein diffusionskontrolliert. Für solche Reaktionen führt die erhöhte Temperatur zu größeren Diffusionsraten der reagierenden Spezies, wodurch die Reaktionsrate zunimmt. [Treuheit et al., 2002; Chi et al., 2003]. Laut Literatur kommt es schon vor der Schmelztemperatur eines Proteins zur partiellen Entfaltung des Proteins [Carpenter et al., 1999], welches die eigentliche reaktive Spezies darstellt. Treuheit stellte die Hypothese auf, dass Polysorbat die Entfaltungenergie von PEG-GCSF herabsetzt und somit zu einer erhöhten Aggregatbildung führt.

Untersuchungen mit FT-IR bestätigten, dass Cetuximab in allen Proben nach 26 Wochen Einlagerung weiterhin im nativen Zustand vorlag (Abb. 4.40). Gestresste und ungestresste Proben zeigten jeweils ein einheitliches Profil der zweiten

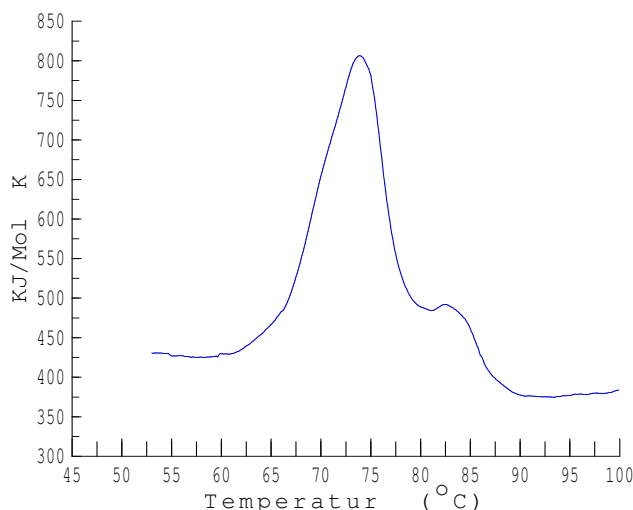
Ableitung der Amidbande I, was darauf schließen lässt, dass keine Veränderungen in der Sekundärstruktur des Proteins vorkamen. Da die Lagerungstemperatur die Schmelztemperatur des Antikörpers ( $73 \pm 1^\circ\text{C}$ ) [Vermeer et al., 1998; Garidel, 2009; Kiese et al., 2008] nicht überschritt, kann das Protein wieder in den nativen Zustand zurückkehren. Die vorliegenden Aggregate in den gestressten Mustern sind somit nicht denaturiert. Auch Polysorbat hatte auf die Sekundärstruktur des Antikörpers keinen Einfluss, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist [Bam et al., 1996, 1998]. Die reaktive Spezies sollte somit im Gleichgewicht mit der nativen Struktur vorliegen. Eine vermehrte Reaktion mit partiell entfaltetem Protein bei erhöhter Temperatur könnte dadurch ermöglicht werden, und die Entstehung nativer Aggregate begünstigt werden.



**Abbildung 4.40:** Exemplarische Darstellung der vektor- normalisierten zweiten Ableitung der Amid-I-Bande für Start und nach 26 Wochen für die Proben mit 100 mg/ml Cetuximab und steigendem Polysorbat- Anteil.

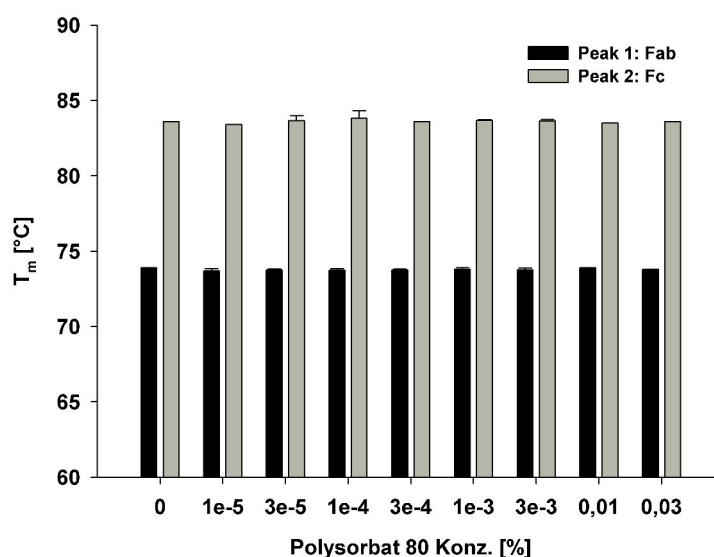
Neben dem polysorbatabhängigen Aggregatanstieg in den unterschiedlich konzentrierten Formulierungen ist zusätzlich auch ein von der Antikörperkonzentration abhängiger Effekt der Aggregatbildung zu beobachten. Mit steigender Proteinkonzentration (bei 0 % Polysorbat) erhöhte sich auch der gebildete Anteil löslicher Aggregate in der Formulierung (Abb. 4.37 B). Dieser Effekt wurde bereits von Treuheit beobachtet [Treuheit et al., 2002]. Mit steigender Proteinkonzentration nahm auch hier das Ausmaß der Bildung löslicher Aggregate, welche mit SE-

HPLC detektiert wurden zu. Dies wurde wie bereits erwähnt auf die erhöhte Kollisionsrate der Moleküle bei erhöhter Konzentration zurückgeführt. Die Bildung unlöslicher Aggregate ist hierbei nicht zwingend notwendig und hängt auch von der Natur des gebildeten Aggregates sowie von den Solubilisierungseigenschaften des umgebenden Mediums ab [Charman et al., 1993].



**Abbildung 4.41:** Exemplarisches Thermogramm für Cetuximab 1 mg/ml in PBS, pH 6,0; Scan von 40 - 110°C bei einer Scanrate von 1 K/min.

In der Literatur ist der Einfluss von Polysorbat auf die thermische Stabilität von rhGH beschrieben. PS bewirkte dort einen Abfall von 2°C [Bam et al., 1998]. Ziel der nDSC-Untersuchungen war es, den Einfluss von PS80 auf die  $T_m$  von Cetuximab zu untersuchen, und damit eine weitere Begründung für die Bildung von Aggregaten in Abhängigkeit von der Polysorbatkonzentration zu erhalten. Für bestimmte Hilfsstoffe, wie z.B. für NaCl und Sucrose, wurde ein positiver Einfluss auf die  $T_m$  von Proteinen beschrieben [Remmele et al., 1998; Cueto et al., 2003]. Durch eine direkte Interaktion von PS80 mit dem Protein könnte eine Verschiebung der Schmelztemperatur induziert werden [Bam et al., 1996]. Auch wenn die  $T_m$  von Antikörpern bei rund  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  [Vermeer et al., 1998; Garidel, 2009] liegt, kommt es auch bei geringeren Temperaturen schon zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von nativem zu partiell entfaltetem Protein, was die Bildung von Aggregaten begünstigen kann.



**Abbildung 4.42:** Schmelztemperaturen für Fc- und Fab-Fragment in Cetuximabformulierungen 1 mg/ml in PBS, pH 6,0 mit unterschiedlichem Polysorbatanteil (0 - 0,03 %).

Zur untersuchung dieses Effektes wurde die 1 mg/ml Formulierung mit steigenden Polysorbatkonzentrationen gespiked und vermessen. Abbildung 4.41 zeigt exemplarisch das Thermogramm von 1 mg/ml Cetuximab in PBS, bei dem der Schmelzpeak des Fab-Fragmentes bei 73°C und der des Fc-Fragmentes bei 83°C mit geringerer Hitzekapazität zu erkennen sind [Welfle et al., 1999; Garidel, 2009]. Keiner der Scans zeigte mit steigender Polysorbatkonzentration eine Veränderung der Schmelztemperatur für Fab- und Fc-Fragment (Abb. 4.42). PS80 hatte somit keinen direkten Einfluss auf die  $T_m$  des Antikörpers, was mit den Messungen von Matheus übereinstimmt [Matheus, 2006c].

Polysorbat bietet aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine Vorteile für die Stabilisierung gegen Temperaturstress, sondern zeigte mit steigender Konzentration sogar einen schädigenden Einfluss auf den Antikörper, was durch die Literatur bestätigt wird [Treuheit et al., 2002; Bush et al., 1998; Matheus, 2006c]. Die Formulierungen ohne Polysorbat 80 waren geringfügig stabiler (in SE-HPLC und SDS-PAGE) als mit Polysorbatzusatz. Die beobachteten Effekte scheinen Langzeiteffekte zu sein, und sind nicht auf Veränderungen der Temperaturbeständigkeit des Antikörpers durch Polysorbat zurückzuführen, wie DSC-Daten belegten.

Mit steigender Konzentration von Cetuximab nimmt dessen Anfälligkeit gegen Temperaturstress ebenfalls zu. Grenzflächenphänomene spielen beim Temperaturstress eher keine Rolle. Polysorbat scheint diese Kollisionsfrequenz weiter zu erhöhen und zu vermehrter Aggregation zu führen [Treuheit et al., 2002]. Eine signifikante Veränderung hydrophober Interaktionen von Tensid mit dem Protein bei erhöhten Temperaturen wurde auch durch Bam vorgeschlagen [Bam et al., 1998].

#### **4.2.1.3 Untersuchung des Effektes unterschiedlicher Polysorbatqualitäten auf die Lagerstabilität des Antikörpers bei erhöhten Temperaturen**

Im vorhergehenden Versuch wurde festgestellt, dass Polysorbat 80 nach Lagerung bei erhöhter Temperatur einen tendenziell schädigenden Einfluss auf Cetuximab (sichtbar in löslichen Aggregaten in SEC) ausübt. PS80 kann wie bereits beschrieben durch Autoxidation und Säurespaltungen [Kerwin, 2008] Spezies enthalten, die bei Lagerung das Protein potentiell schädigen könnten [Ha et al., 2002]. Daher wurde untersucht, ob auch der Oxidationsgrad von PS80 einen Einfluss auf die Stabilität von Cetuximab während der Lagerung hat.

Hierzu wurde die 1 mg/ml Standardformulierung verwendet, welche mit jeweils 0,1 % von drei verschiedenen Polysorbat 80 Chargen unterschiedlicher Qualität versetzt wurde. Zuvor wurde die Peroxidzahl (POZ) der Polysorbate bestimmt. Ziel war es, ein PS80 mit einer sehr geringen POZ, eines mit einer mittleren POZ und eines mit einer hohen POZ für die Stabilitätsstudien zu verwenden. In den Analysenzertifikaten der Hersteller ist die Grenze von Peroxiden im Polysorbat mit einer POZ von maximal 5,0 angegeben. Da UV-Licht die Bildung von Peroxiden in Polysorbat begünstigt [Donbrow et al., 1978], wurde zur Erzeugung einer gestressten Polysorbat-Charge UV-Licht verwendet. Eine bereits lange in Verwendung befindliche PS80 -Charge wurde hierzu zusätzlich mit UV-Stress behandelt, bis dessen Peroxidzahl (POZ) über 5,0 lag. Eine neue Laborcharge wurde mit mittlerer POZ zur Herstellung der Proben identifiziert. Für sehr geringen Peroxidgehalt wurde eine Charge hochreines PS80 verwendet. Tabelle 4.12 listet die gemessenen POZ der verwendeten Polysorbatches. Die Formulierungen enthielten nach Herstellung jeweils 0 oder 0,1 % Polysorbat 80 in den

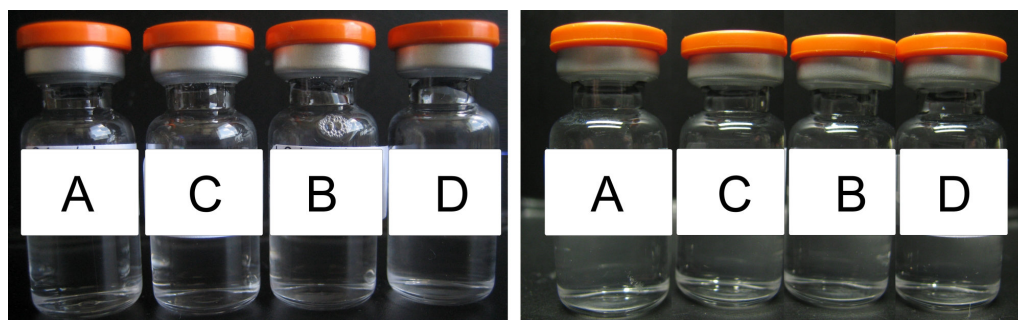


unterschiedlichen Qualitäten. Die Lagerung der Proben erfolgte in einer Klimakammer bei 40°C/75 % r.h. über einen Zeitraum von 26 Wochen. Als Referenz wurden Muster im Kühlschrank gelagert. Zur Untersuchung von Instabilitäten wurden die Proben mittels SEC, RP-HPLC, Trübung, visueller Kontrolle und SDS-PAGE analysiert.

**Tabelle 4.12:** Peroxidzahlen der eingesetzten Polysorbatches.

Polysorbat 80 Charge (Qualität)	Peroxidzahl	Probenbez.
0 % PS80	n.a.	A
0,1 %PS80 CRODA (hochrein)	0.65	B
0,1 %PS80 Merck (Standard Labor Charge)	2.9	C
0,1 %PS80 Merck (gestresst mit UV Licht)	5.1	D

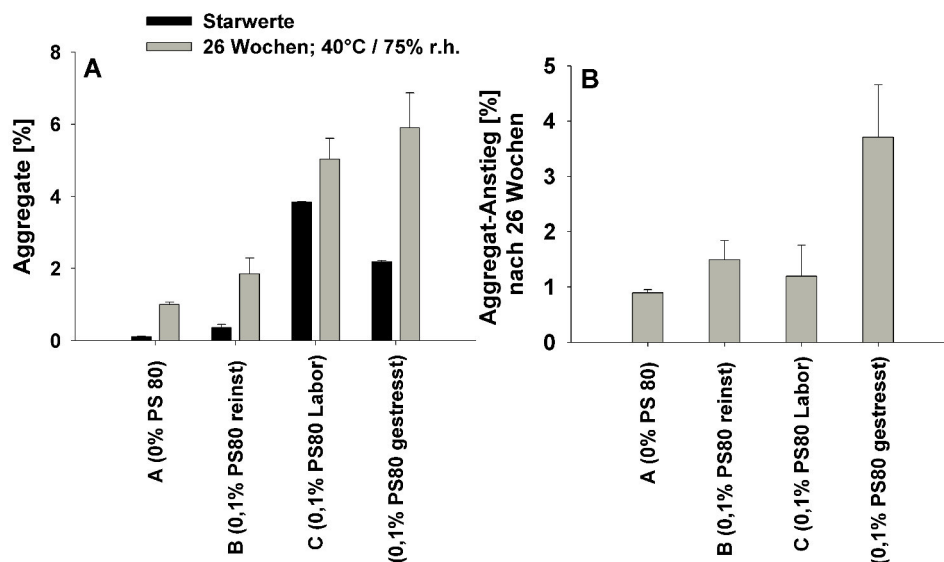
Die optische Kontrolle der Proben ergab keine Unterschiede in der Trübung bei Start und nach 26 Wochen (Abb. 4.43). Lediglich die Formulierung ohne Polysorbat zeigte vereinzelte proteinogene Partikel.



**Abbildung 4.43:** Visuelle Kontrolle von Cetuximab 1 mg/ml in PBS, pH 6,0 mit unterschiedlichen Polysorbatqualitäten; links: Startmuster; rechts: Muster nach 26 Wochen Lagerung bei 40°C/ 75 % r.h.

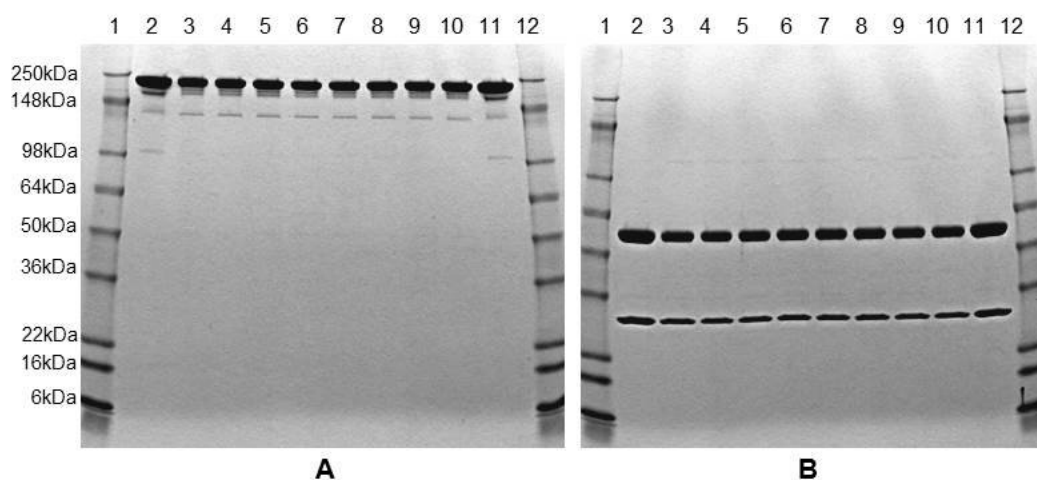
In der SEC zeigten bereits die Startmuster der Proben vor allem für die Proben C und D erhöhte Aggregatanteile (Abb. 4.44 (A)), welche nach Evaluierung der Placebochromatogramme durch die Coelution des Polysorbates mit dem Cetuximab-Dimerpeak stammen [Villalobos et al., 2005]. Zur Ermittlung der Stabilität der Proben wurde daher rechnerisch der relative Anstieg der Aggregate in der Formulierung nach Lagerung bestimmt. Hierzu wurde der Aggregatpeak der Startmuster vom Aggregatpeak der Stressmuster subtrahiert (Abb. 4.44 B): Proben A, B und C zeigten jeweils einen mäßigen Zuwachs an Aggregaten von ca. 1 - 1,5 %.

Entgegen der Erwartungen hatte das hochreine Polysorbat 80 in Probe B keinen positiveren Einfluss auf die Aggregatbildung als die verwendete Laborcharge in Probe C oder die PS80-freie Formulierung A.

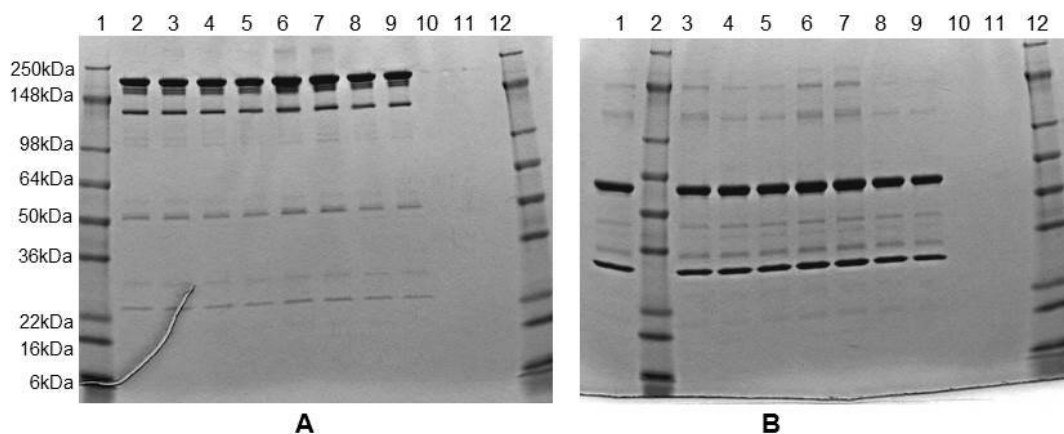


**Abbildung 4.44:** (A) Aggregate, detektiert via SE-HPLC zu Beginn und nach 26 Wochen Lagerung von Cetuximab 1 mg/ml in PBS mit unterschiedlichen Polysorbatqualitäten; (B) rechnerisch ermittelter relativer Anstieg der Aggregate nach 26 Wochen Lagerung.

Mittels SDS-PAGE wurde generell ein Anstieg kovalenter Aggregate und Abbauprodukte nach Lagerung festgestellt (Abb. 4.45 und 4.46). Für die nicht-reduzierten Gele lag im Vergleich zu den Startmustern eine Intensivierung der Banden im Bereich von 120 kDa für alle Proben vor. Zusätzliche intensive Banden traten bei 50 und 25 kDa auf. Zudem deuten sehr viele, weniger intensive Banden im Bereich 98 - 130 kDa auf das Entstehen vielfältiger Abbauprodukte hin. Zusätzlich zur Monomerbande tritt bei der Formulierung mit der gestressten Polysorbcharge eine weitere Bande von > 250 kDa auf, welche auf die Entstehung löslicher Aggregate hindeutet. Dies bestätigt die Ergebnisse der SE-HPLC, wo die gestresste Charge den höchsten Aggregatanstieg verzeichnete. In den reduzierten Gelen lagen zusätzliche hochmolekulare Banden bei ca. 140 sowie 120 kDa vor. Diese treten wieder besonders deutlich für die gestresste Charge zum Vorschein.

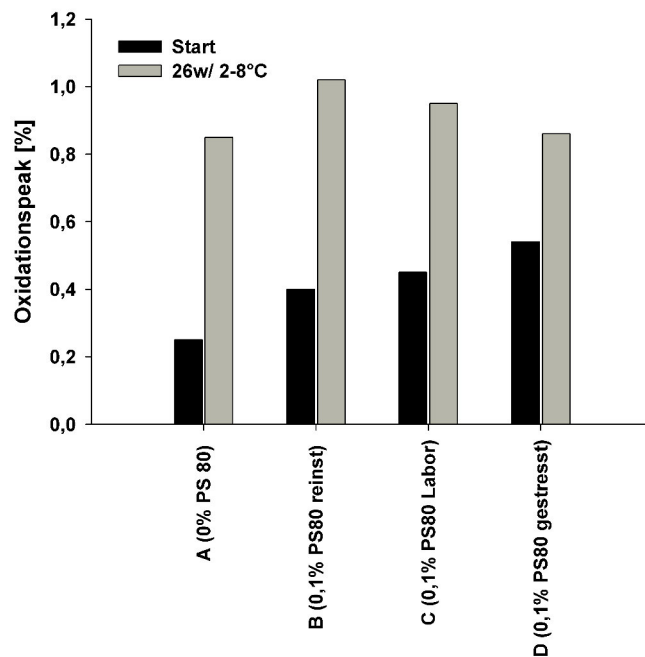


**Abbildung 4.45:** Startmuster der nicht-reduzierten SDS-PAGE von Cetuximab 1 mg/ml mit unterschiedlichen Polysorbatqualitäten (A), sowie reduzierte SDS-PAGE von Cetuximab 1 mg/ml mit unterschiedlichen Polysorbatqualitäten (B); beide Gele sind wie folgt beladen: 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 Cetuximab-Standard; 3 Probe A; 4 Probe A; 80; 5 Probe C; 6 Probe C; 7 Probe B; 8 Probe B; 9 Probe D; 10 Probe D; 11 Cetuximab-Standard; 12 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus2.



**Abbildung 4.46:** Nicht- reduzierte SDS-PAGE (A), sowie reduzierte SDS-PAGE (B) der Cetuximab-Proben nach Lagerung für 26 Wochen bei 40°C/75 % r.h.; die Gele wurden wie folgt beladen: 1 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus 2; 2 Probe C; 3 Probe C; 4 Probe B; 5 Probe B 8; 6 Probe D; 7 Probe D; 8 Probe A; 9 Probe A; 10 -; 11 -; 12 Molekulargewichtsmarker SeeBlue<sup>®</sup> plus2; für Gel B sind Platz 1 und 2 vertauscht.

Das Vorkommen dieser Banden lässt auf das Vorhandensein kovalent verlinkter Aggregate schließen, welche während der Lagerung entstanden. Banden im Bereich von 30 und 60 kDa sind allgemein in den reduzierten Gelen aufgrund des Vorhandenseins von Abbauprodukten zu finden, wobei auch hier die Formulierung mit der gestressten Polysorbatcharge die intensivsten Banden aufweist.



**Abbildung 4.47:** Oxidationsprodukte von Cetuximab 1 mg/ml mit unterschiedlichen Polysorbatqualitäten mittels RP-HPLC zu Beginn und nach 26 Wochen Lagerung bei 40°C / 75 % r.h.

Oxidationsprodukte wurden mit RP-HPLC für alle vier Formulierungen untersucht (Abb. 4.47). Hierbei wurde ein Anstieg des Oxidationspeaks in der Reihenfolge A < B < C < D von 0,25% auf 0,54% für die Startwerte festgestellt. Nach der Lagerung betrug der Anteil des Oxidationspeaks zwischen 0,8% und 1%. Der höchste Peak wurde für die hochreine Probe B detektiert, gefolgt von Laborcharge C und gestresster Charge D. Die geringste Zunahme des Oxidationspeaks wurde für die PS80-freie Formulierung A gemessen. Oxidative Schädigungen, welche nach Lagerung bei erhöhter Temperatur auftreten, scheinen nach den beobachteten Ergebnissen nicht zwangsläufig mit dem Oxidationsstatus des Polysorbates zusammenzuhängen. Allerdings weisen die Messungen nur einen sehr kleinen Unterschied von 0,2% in der Peakfläche auf, somit ist die Si-

gnifikanz, welche durchaus in den Bereich der Messschwankungen fällt, kritisch zu beurteilen. Der nur geringe Anstieg von Oxidationspeak und löslichen Aggregaten lässt darauf schließen, dass sich die komplette Abwesenheit oxidierender Spezies positiv auf den Oxidationsgrad des Antikörpers auswirkt [Lam et al., 1997]. In der SDS-PAGE konnte wiederum gezeigt werden, dass die Schädigung des Polysorbates durchaus auch einen Effekt auf Cetuximab während der Lagerung hatte, da hier bei der gestressten Charge eine wesentlich größere Menge an Aggregaten (kovalent, nicht-kovalent) und Abbauprodukten erkennbar war. Das Fehlen der Trübung in dieser Charge deutet zudem darauf hin, dass die gebildeten Aggregate hauptsächlich löslicher Natur sind.

Die erwartete Überlegenheit der hochreinen Polysorbatchesarge in Bezug auf die Stabilität bei Lagerung konnte in der Versuchsreihe nicht befriedigend bestätigt werden. Die Untersuchungen legen nahe, dass die Schädigung des Proteins nicht nur vom Oxidationsgrad des Polysorbates abhängen, sondern wahrscheinlich auch auf anderen Abbauprodukten von Polysorbat, die beispielsweise bei Hydrolyse des Moleküls entstehen, wie z.B. Formaldehyd, Ameisensäure, Essigsäure [Kerwin, 2008; Kishore et al., 2011b,a].

#### **4.2.1.4 Zusammenfassende Diskussion**

In den beschriebenen Versuchsreihen wurde der Effekt von Polysorbat 80 (und bedingt auch von MHS15 und PO188) und der Proteinkonzentration auf die Stabilität von drei verschiedenen konzentrierten Cetuximabformulierungen, sowohl bei Agitation als auch bei thermischem Stress, analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Polysorbatqualität auf die Stabilität der Formulierung bei Temperaturstress untersucht. In den Agitationsstudien zeigte PS80 sehr gute Eigenschaften bei der Stabilisierung des Antikörpers gegen Aggregation. Die Stabilität wurde mit unterschiedlichen Techniken untersucht, um verschiedenste Aggregat-Typen, die während des Stressens entstehen, zu erfassen [Kiese et al., 2008; Zölls et al., 2012]. Der stabilisierende Effekt von Polysorbat auf die Entstehung löslicher und unlöslicher Aggregate kam hierbei bei unterschiedlichen Polysorbatkonzentrationen zum tragen. In Bezug auf unlösliche Aggregate wurde generell eine Stabilisierung mit geringeren Polysorbatkonzentrationen erreicht als für lösliche.

Mit steigender Cetuximabkonzentration wurde mehr PS80 zur Stabilisierung der Formulierung gegen agitationsbedingte Aggregation benötigt. Die Tenside Macrogolhydroxystearat und Poloxamer 188 hatten ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf den Antikörper in den Schüttelstresstudien. In sehr niedrigen Konzentrationen führte die Anwesenheit der drei Tenside jeweils zu einer Destabilisierung der Cetuximabformulierung, was darauf schließen lässt, dass der Effekt generell für Tenside erwartet werden kann. Bisher wurde dies nur durch Kiese und Matheus für Polysorbat beschrieben [Matheus, 2006c; Kiese et al., 2008]. Eine Aufklärung des Destabilisierungsmechanismus steht bisher noch aus. Neben dem Polysorbateffekt wurde eine zunehmende Stabilität des Antikörpers gegen Schüttelstress mit steigender Antikörperkonzentration beobachtet und kann zum Einen mit der erhöhten Viskosität der Lösung [Shire et al., 2004; Saluja und Kalonia, 2008], zum Anderen mit einem veränderten Verhältnis von adsorbiertem Antikörper zu Luft/Wasser Grenzfläche erklärt werden [Treuheit et al., 2002]. Bei erhöhter Lagertemperatur wurde für Cetuximab eine stärkere Neigung zur Aggregation mit steigender Proteinkonzentration beobachtet, ein Effekt, welcher auch durch Treuheit für PEGylierte Modellproteine beschrieben wurde [Treuheit et al., 2002]. Die Forscher begründeten dies mit einer erhöhten Interaktion zwischen den Protein-Molekülen, die dann zu einer vermehrten Aggregatbildung führt. Da nur mit Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes von Cetuximab gearbeitet wurde, blieben irreversible Strukturveränderungen des Antikörpers aus. Im Gegensatz zur sehr effektiven Stabilisierung gegen Agitationsstress stellte sich Polysorbat als weniger vorteilhaft bei der Stabilisierung gegen Langzeittemperaturstress heraus. Hier bewirkte PS80 einen leichten Anstieg der löslichen Aggregate, wobei kaum ein Einfluss auf die Bildung visueller und subvisueller unlöslicher Partikel gefunden wurde. Die erwartete Überlegenheit hochreinen Polysorbates konnte in den Versuchen nicht belegt werden. Die oxidative Schädigung durch gestresstes PS80 Cetuximab war nur gering im Gegensatz zu Literaturberichten [Ha et al., 2002; Wang et al., 2008]. Neben Oxidationsprodukten kann die Schädigung auch von anderen PS80-Abbauprodukten, wie z.B. freien Fettsäuren stammen, wie durch Kishore gezeigt. Bei der Entstehung dieser Produkte sind neben UV-Einfluss vor allem Hydrolyseeffekte zu nennen. Eine Schwellenkonzentration intakten PS80 verhinderte wiederum die Schädigung [Kishore et al., 2011a]. Die Konzentration der freien Fettsäuren wurde für die verwendeten PS80-Chargen nicht untersucht.

Weitere Untersuchungen könnten hierüber Aufschluss geben. Die Lagerung von Polysorbat sollte in jedem Fall unter Ausschluss von Licht und Luftsauerstoff erfolgen, um das Tensid so rein wie möglich in der Formulierung einzusetzen [Ha et al., 2002]. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse sollt die Dosierung des Tensides jeweils der Konzentration des Proteins angepasst werden. Aufgrund potentiell schädigender Einflüsse durch Oxidations- oder Hydrolyseprodukte sollte die Menge in der Formulierung dennoch so gering wie möglich gehalten werden.

#### **4.2.2 Interaktionsstudien**

In den vorangegangenen Stresstests (Kap. 4.2.1) wurde indirekt der Einfluss des Tensids auf die Stabilität von Cetuximab betrachtet. Anhand der Untersuchungen ließ sich bisher nicht feststellen, ob bzw. welche Art der Interaktion für die stabilisierende oder destabilisierende Wirkung verantwortlich ist. Neben Grenzflächeneffekten [Chang et al., 1996; Kreilgaard et al., 1998b], werden direkte Interaktionen zwischen Proteinen und Tensiden in der Literatur diskutiert, die zur Stabilisierung des Proteins gegen Stressbedingungen beitragen können [Jones et al., 1997; Bam et al., 1998] (s. auch Kap. 1.3.2). Die Stabilisierung durch Interaktion von Protein mit Tensid wurde beispielsweise durch die Erhöhung der CMC bei Vorliegen von Protein in der Lösung beschrieben [Jones et al., 1997]. Eine direkte Messung der Interaktion zwischen HSA und Polysorbat 80 wurde durch Chou mittels ITC beschrieben [Chou, 2005]. Interaktionsstudien sollten das Stabilisierungsverhalten der nicht-ionischen Surfactants auf Cetuximab näher beleuchten, und einen Hinweis auf den zugrunde liegenden Stabilisierungsmechanismus geben. Zusätzlich wurde BSA als etabliertes Modellprotein mit lipophilen Bindungstaschen gewählt. Als monoklonaler Antikörper besitzt Cetuximab keine lipophilen Bindungsdomänen wie BSA.

##### **4.2.2.1 CMC-Bestimmung von Polysorbat 80 in Cetuximabformulierungen**

Der stabilisierende Effekt von Tensiden auf Proteine wird in der Literatur sowohl durch die Inkorporierung des zu stabilisierenden Proteins in Mizellen als auch durch Adsorption an das Protein selbst beschrieben (s.auch Kap. 1.3.1).

Der Protein-Protein-Kontakt wird damit reduziert, die Interaktionsmöglichkeit gesenkt. Unter der Annahme, dass eine Protein-Tensid-Interaktion dazu führt, dass weniger Tensid zur Bildung von micellaren Strukturen zur Verfügung steht, müsste die Anwesenheit von Protein bei der Bestimmung der CMC dazu führen, dass eine höhere Konzentration an Tensid zum Erreichen der CMC benötigt wird, als ohne Protein. Durch die Ermittlung der CMC in unterschiedlichen Cetuximabformulierungen sollten erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem Antikörper und Polysorbat gesammelt werden.

Die CMC von PS80 wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden, Oberflächenspannungsmessungen und Ultraschall Resonator Technologie (URT), bestimmt und die Werte mit denen der Literatur verglichen. Hierzu wurde für Cetuximab bei 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml sowie für PBS jeweils eine Konzentrationsreihe von PS80 hergestellt, welche dann mit Hilfe der Oberflächenspannungsmessung mittels Stabmethode vermessen wurde. Die CMC wurde jeweils durch Berechnung des Schnittpunktes der Geraden, welche sich aus der Trendlinie der abfallenden Oberflächenspannung vor CMC und der Trendlinie der nahezu konstanten Oberflächenspannungswerte nach Erreichen der CMC ergeben, ermittelt. Für die CMC Bestimmungen mit URT wurde die Polysorbatkonzentrationsreihe in Wasser, PBS-Puffer und 5 mg/ml Cetuximab gemessen.

Tabelle 4.13 stellt die CMC-Werte von PS80 mit Hilfe von Oberflächenspannungsmessungen und URT dar und zeigt einen Vergleich mit Daten aus der Literatur.

**Tabelle 4.13:** CMC von Polysorbat 80 in Cetuximablösungen unterschiedlicher Konzentration in PBS, pH 6,0 im Vergleich mit Literaturwerten.

Medium Messmethode	CMC [%] Tensiometrie	CMC [%] URT	CMC [%] Literatur
PBS	0,00139	0,0014	0,0013 <sup>(1)</sup>
1 mg/ml Cetuximab	0,00248	n.a.	n.a.
5 mg/ml Cetuximab	n.a.	0,012	0,028 <sup>(2)</sup>
10 mg/ml Cetuximab	0,00436	n.a.	n.a.
100 mg/ml Cetuximab	0,0432	n.a.	0,1 <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> [Helenius et al., 1979]

<sup>(2)</sup> [Matheus, 2006c]



Die gemessenen CMC Werte für Polysorbat in Puffer stimmen gut mit den Werten der Literatur überein. Die mit der Stabmethode ermittelten CMC-Werte für PS80 in 100 mg/ml Cetuximab differierten zu der von Mattheus ermittelten CMC um mehr als das Doppelte. Die mit URT gemessenen CMC-Werte wichen von bereits ermittelten Werten ab und waren niedriger als der Literaturwert. Abgesehen vom Abweichen von in der Literatur beschriebenen Werten, ergab die CMC-Ermittlung in unterschiedlich hoch konzentrierten Cetuximabformulierungen einen Anstieg der CMC mit steigender Antikörperkonzentration. Jones diskutierte für dieses Phänomen, welches auch bei der CMC-Bestimmung von Polysorbat mit rhGH beobachtet wurde, eine Interaktion des Tensids mit den hydrophoben Bindungsstellen des Proteins. Durch diese Interaktion steht ein Teil des Tensids nicht mehr zur Bildung von Mizellen bereit, wodurch mehr zur Erreichung der CMC benötigt werden würde [Jones et al., 1997]. Im Gegensatz zu Ergebnissen von Kreilgaard [Kreilgaard et al., 1998b], welche Untersuchungen mit Lysozym durchführten, fand eine Stabilisierung des Antikörpers Cetuximab bereits weit unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration statt. Auch berichtete Vidanovich von einer Destabilisierung eines IgG durch PS80, welches in CMC-Konzentrationen eingesetzt wurde [Vidanovic et al., 2003]. Der vorliegende Versuch zeigt eine leichte Erhöhung der CMC in Anwesenheit von Protein, welche auf Adsorptionsvorgänge des Tensids am Antikörper beruhen könnten. Alternativ kann die CMC-Erhöhung auch mit der Konkurrenz um die Grenzflächenadsorption zwischen Antikörper und PS80-Molekülen erklärt werden. Die hohe Konzentration des Antikörpers an der Grenzfläche benötigt dann eine signifikant höhere Dosis an Polysorbat, um vollständig verdrängt zu werden im Vergleich zu einer Cetuximabfreien Lösung [Mahler et al., 2009b]. Der Versuch gab einen Hinweis darauf, dass Protein-Tensid-Interaktionen und Adsorptionsvorgänge bei der Stabilisierung von Cetuximab eine Rolle spielen könnten, da ein Teil des PS80 durch die Anwesenheit des Antikörpers nicht mehr zur Grenzflächenbelegung zur Verfügung stand.

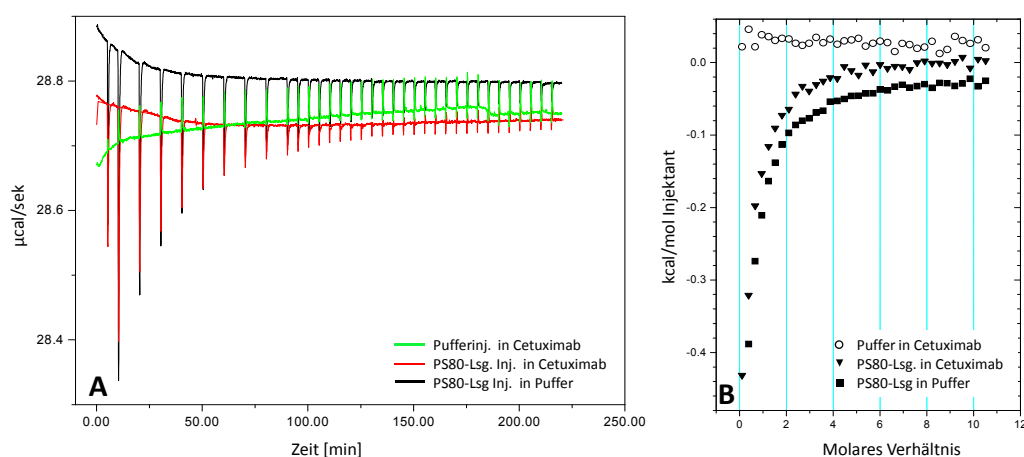
#### 4.2.2.2 Isotherme Titrations Calorimetrie (ITC) zur Untersuchung von Protein-Tensid Interaktionen

Kalorimetrie ist ein klassisches Verfahren, um chemische Reaktionen quantitativ zu untersuchen und sie thermodynamisch zu beschreiben. Jede Reaktion ist mit einer Enthalpie-Änderung ( $\Delta H$ ) verbunden, das heißt, Wärme wird an die Umgebung abgegeben (exotherme Reaktion) oder von ihr aufgenommen (endotherme Reaktion). Diese universelle Eigenschaft ist unabhängig von der Größe der Moleküle, sodass alle chemischen und biochemischen Reaktionen untersucht werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass weder Immobilisierung noch Markierung der Reaktionspartner erforderlich ist [Praefcke und Herrmann, 2005], da das Auftreten von Bindungswärme ein natürlich auftretendes Phänomen ist [Liang, 2006]. ITC wird zur Untersuchung zahlreicher Interaktionsarten verwendet, wie zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen [Ye, 2000; Yokota et al., 2003] sowie von Proteinen mit "Small-Molecules" [Zhang, 2003]. Gerade die Untersuchung von Small-Molecule/Protein-Wechselwirkungen ist von hohem Interesse in der Entwicklung neuer Arzneistoffe, da hier die Untersuchung der Affinität eines Moleküls zum potentiellen Rezeptor Auskunft über die Wirksamkeit des Arzneistoffes geben kann [Liang, 2006]. Mit ITC wurden bereits Interaktionen zwischen Tensid und Protein untersucht, wie beispielsweise die Interaktion von Albutropin mit PS80 [Chou, 2005], humanem Serumalbumin und Immunglobulinen [Garidel, 2009], sowie von BSA mit SDS [Nielsen et al., 2000].

Zur Detektion von Protein-Tensid-Interaktionen wurden Cetuximab und BSA vor der Titration in tensidfreien PBS-Puffer eingebracht. BSA wurde hierzu in einer Konzentration von 16 mM in PBS, pH 6,0 gelöst. Cetuximab wurde per Diafiltration und anschließender Einstellung auf 10 mM in den Puffer überführt. Der Diafiltrationspuffer bzw. der proteinfreie Puffer stand jeweils als Referenzlösung für Blanktitrationen zur Verfügung. Die Lösung der Tenside erfolgte ebenfalls in den verwendeten Puffern in einer Konzentration von 5 mM. Details sind im Material und Methoden Teil zu finden (Kap. 3.2.3.14).

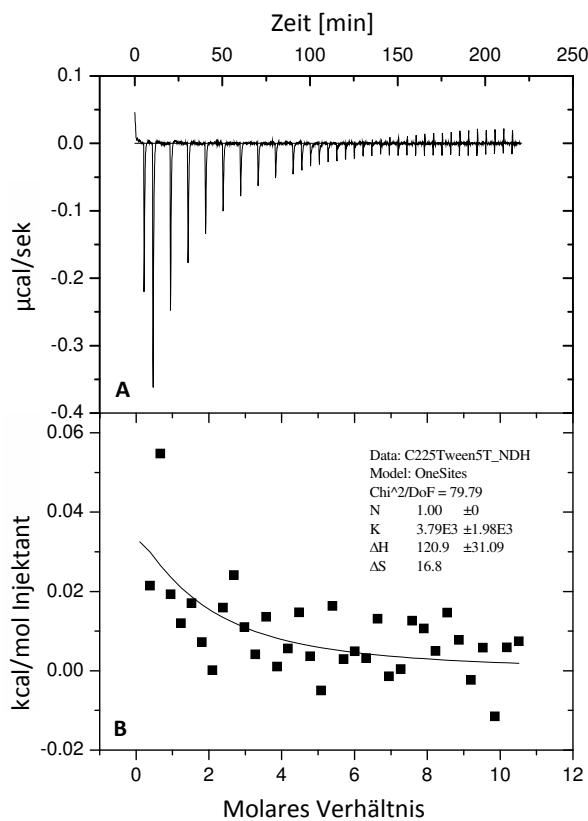
Das Messsignal der ITC ist der Heizstrom zum Erwärmen der Messzelle, angegeben in  $\mu\text{cal/s}$ , aufgetragen gegen die Zeit. Abbildung 4.48 (A) zeigt die übereinander gelegten Rohdaten der einzelnen Titrations: Bei der Titration von PS80

in Puffer verursacht jede Injektion einen hier negativen Peak aufgrund freiwerdender Reaktionswärme. Die auftretenden Signale stellen die Demizellierungsenergie des Tensids im Puffer dar, die durch die Verdünnung der Lösung in der Messzelle verursacht wird. Die Signale der Titration von Puffer in Cetuximab werden benötigt, um später die Verdünnungswärme aus der Reaktion herausrechnen zu können. Die eigentliche Titration ist die von Cetuximab mit Polysorbatlösung. Um Demizellierungs- und Verdünnungseffekte herauszurechnen, werden die Kurven voneinander subtrahiert. Die resultierende Kurve ist in Abbildung 4.49 für die Rohdaten und für das Integral dargestellt.



**Abbildung 4.48:** Rohdaten der Titration von Cetuximab 1 mg/ml in PBS, pH 6,0 mit Polysorbat 80; links: Rohdaten der Titrations Cetuximab mit PS80, Puffer und von Puffer mit PS80; rechts: Integrale der einzelnen Kurven.

Es fällt auf, dass das Signal des Thermogramms mit  $-0,35 \mu\text{cal}/\text{sec}$  bereits bei der zweiten Injektion sehr gering ist (Abb. 4.49). Mit weiteren Injektionen nimmt die Reaktionswärme zunehmend ab, bis gegen Ende der Titration ab einem molaren Verhältnis von ca. 8 keine weiteren Änderungen mehr zu erkennen sind. Hier sind die Reaktionswärmen weitgehend auf Verdünnungswärmen und Demizellierungseffekte zurückzuführen. Die endothermen Signale stammen von Verdünnungseffekten von Cetuximab während der Titration, auch deutlich zu erkennen in Abbildung 4.48 (A).



**Abbildung 4.49:** Titration von 0,1 mM Cetuximab in PBS, pH 6,0 mit PS80 5 mM in PBS, pH 6,0 bei 25°C; (A) Rohdaten der Titration nach Blanksubtraktion; (B) Bindungsisotherme der Reaktionsenthalpie, ermittelt durch Integration der Peaks aus (A) aufgetragen gegen das molare Verhältnis der Reaktionspartner; Kurvenfit: One Site Modell.

Die resultierende Reaktionswärme nach Integration der bereinigten Kurve zeigt, dass die Bindungsreaktion zwischen den beiden Molekülen extrem gering, bzw. vernachlässigbar ist. Die Reaktionsenthalpie liegt nahezu bei 0 kJ/mol (Abb. 4.49). Die Kurve wurde nach einem One-Site-Modell gefittet (Algorithmus für Molekül mit einer Bindungsstelle). Hierbei wurde  $n$  (= Anzahl bindender Moleküle) nach vorherigen Ermittlungen in Fittingversuchen = 1 gesetzt. Die resultierende Affinitätskonstante  $K_a$  ist mit  $\sim 4000 \text{ M}^{-1}$  relativ klein, was für eine sehr geringe Affinität von Polysorbat zu Cetuximab spricht. Im Vergleich hierzu weisen Interaktionen eines IgG1 mit Protein A in ITC Experimenten  $K_a(25^\circ\text{C})$ -Werte in der Größenordnung von  $\sim 3,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  auf [Arouri et al., 2007]. Die Enthalpie  $\Delta H$  zeigt nach Abzug aller Blanktitrationen geringe endotherme Werte um

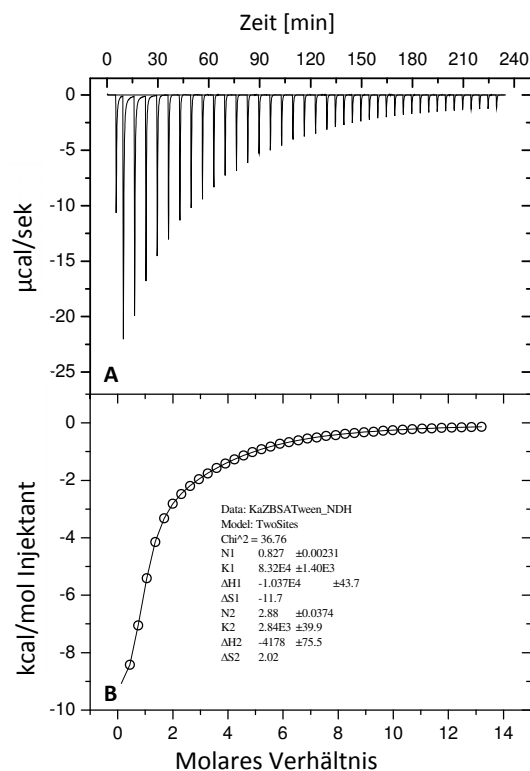
120 kJ/mol, im Gegensatz hierzu steht der positive entropische Beitrag  $\Delta S^\circ$  mit  $16,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Aus den gewonnenen Daten lässt sich die Gibbs Energie  $\Delta G^\circ$  der Reaktion berechnen:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K_a$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur in Kelvin ist. Für  $\Delta G^\circ$  ergibt sich damit ein Wert von  $-4,9\cdot 10^3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Anhand der Werte können sich grobe Aussagen über die Art der Interaktion treffen lassen: Insgesamt läuft die Reaktion aufgrund des exergonischen  $\Delta G^\circ$  Terms von alleine ab. Hierbei ist die Reaktion entropiegetrieben. Dazu trägt der negative Entropie-Term  $-T\Delta S^\circ$  bei, welcher der sehr schwach positiven Enthalpie  $\Delta H^\circ$  entgegensteht (siehe hierzu Abbildung 4.51 rechts). Die gewonnenen Ergebnisse stimmen gut mit den von Garidel erhobenen Daten für IgGs mit PS80 und PS20 überein. Im Vergleich zur Bindung von IgGs zu Protein A sind die Affinitäten von Polysorbaten zu IgGs vernachlässigbar gering. Konkrete Affinitätskonstanten wurden in der Literatur nicht benannt. Der Bereich von  $10^2 \text{ M}^{-1}$  -  $10^3 \text{ M}^{-1}$  liegt jedoch nahe an den gemessenen Werten im vorliegenden Versuch [Garidel, 2009].

Auch die Interaktion von BSA mit PS80 bei  $25^\circ\text{C}$  wurde mittels ITC untersucht. Abbildung 4.50 zeigt die bereinigten Rohdaten (A) sowie die für zwei Bindungsstellen gefittete Isotherme (B). Bereits die Rohdaten zeigten einen deutlich höheren Wärmefluss von anfänglich  $-22 \mu\text{cal}/\text{sec}$  im Gegensatz zur Titration von Cetuximab mit Polysorbat 80. Auch hier ist  $K_a$  mit  $\sim 8\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  noch relativ klein, aber dennoch größer als  $K_a$  der Cetuximab/Polysorbat-Titration und deutet auf eine schwache Bindung hin. Aus diesem Grund ist der Verlauf der Kurve auch nicht wie für höhere Bindungsaffinitäten sigmoidal, sondern weist nur einen leicht gekrümmten, eher logarithmischen Verlauf auf [Thomson und Ladbury, 2004]. Das steil ansteigende Kurvensegment repräsentiert hierbei die Interaktion mit der ersten Bindungsstelle, welche nach dem Fitting mit einem Molekül Polysorbat interagiert. Die Interaktion mit dieser Bindungsstelle ist stärker ausgeprägt, als mit der zweiten Bindungsstelle, wo für  $K_a$  ein Wert von  $\sim 3\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  gemessen wurde. Dies wird vom zweiten Kurventeil beschrieben, welcher aufgrund der geringeren Interaktion noch deutlich flacher ausfällt. Für die zweite Bindungs-

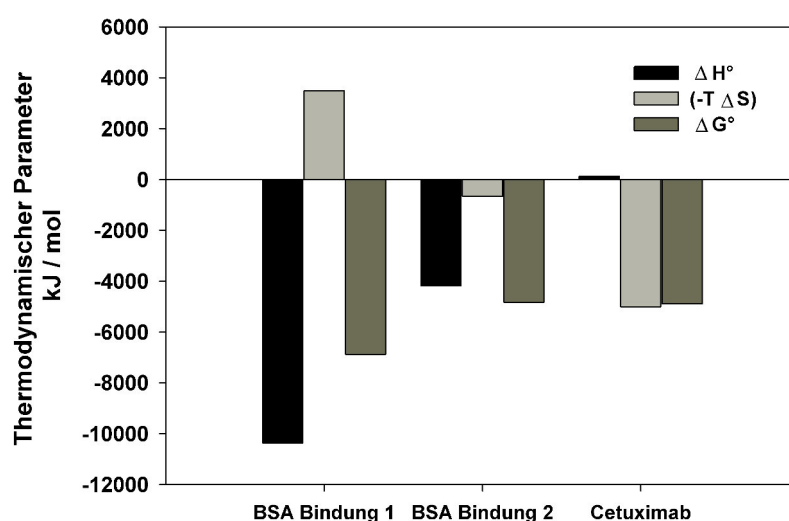
stelle wurde die Besetzung mit drei Molekülen Polysorbat errechnet. Das molare Verhältnis der vorliegenden Interaktion von PS80 : BSA beträgt somit 4 : 1.



**Abbildung 4.50:** Titration von 16 mM BSA in PBS, pH 6,0 mit PS80 5 mM in PBS bei 25°C; (A) Rohdaten der Titration; (B) Bindungsisotherme der Reaktionsenthalpie, ermittelt durch Integration der Peaks aus (A) aufgetragen gegen das molare Verhältnis der Reaktionspartner.

Im Vergleich fanden Garidel ein molares Verhältnis für PS 20 zu BSA von 1-2 : 1 mit  $K_a$  (25°C)  $\sim 1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  [Garidel, 2009]. Der Fit wurde hier allerdings mit einem "One-Site-Modell" durchgeführt, was zu leicht veränderten Verhältnissen führen könnte. Ähnliche Bindungsverhältnisse, wie in der vorliegenden Titration für BSA mit Polysorbat 80 ermittelt wurden, konnten für das anionische Tensid Triton X-100 mit BSA ermittelt werden. Hier interagiert das Tensid-Molekül mit BSA in einem molaren Verhältnis von 4 : 1 [Nagamune et al., 1982]. Chou et al untersuchten die Interaktionen zwischen HSA und Polysorbat 80 mit Hilfe von

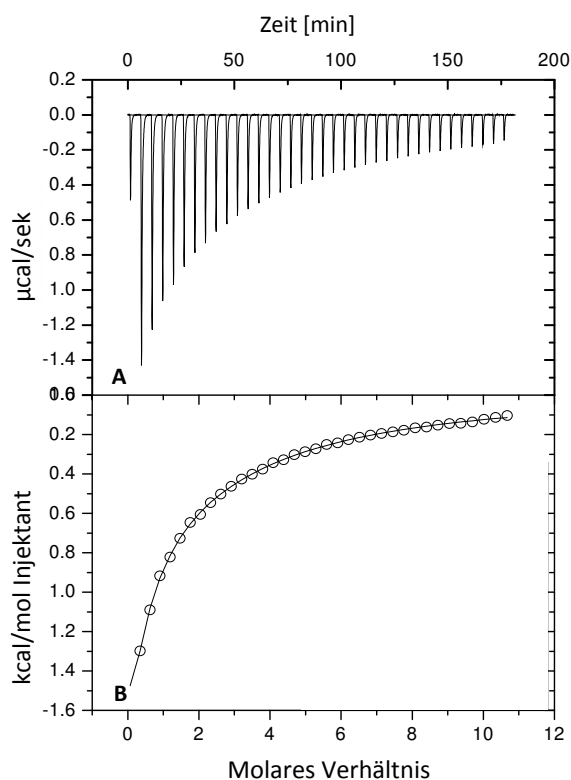
ITC und Fluoreszenztitrationsstudien. Hier wurde das molare Bindungsverhältnis mit einem One-Site-Modell auf 5-6:1 gefittet und eine  $K_a$  (25°C) von  $\sim 1,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  berechnet [Chou, 2005]. Die Bindungskonstante für die HSA/PS80-Interaktion ist geringfügig niedriger als die Konstanten im vorliegenden Versuch. Allerdings berichtet Garidel von einer höheren Bindungsaffinität von BSA zu Polysorbat 20 als von HSA zu Polysorbat 20. So kann die höhere Bindungskonstante auf die höhere Affinität von BSA im Vergleich zu HSA zurückgeführt werden. Abbildung 4.51 fasst die Bindungsparameter für beide Bindungsseiten von BSA zusammen.



**Abbildung 4.51:** Thermodynamische Signatur der Interaktion von BSA mit Polysorbat bei 25°C an zwei Bindungsseiten ( $K_{a1}$ :  $8,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  und  $K_{a2}$ :  $2,84 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), sowie von Cetuximab bei 25°C ( $K_a$ :  $3,79 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ).

Für Bindungsstelle 1 ist erkennbar dass die Reaktion insgesamt exotherm verläuft, da  $\Delta G^\circ$  negative Werte aufweist. Der relativ große enthalpische Beitrag von  $-1,037 \cdot 10^4 \text{ kJ mol}^{-1}$  zur freien Energie wird durch einen positiven entropischen Term verkleinert. Für die zweite Bindungsstelle tragen ein negativer entropischer Term sowie negative  $\Delta H^\circ$  insgesamt zu einer Gibbs'schen Energie von  $-4833 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei, was für eine sowohl enthalpisch als auch schwach entropisch getriebene exotherme Reaktion spricht. Die für beide Bindungsstellen vorliegenden negativen  $\Delta H^\circ$  Werte deuten zudem auf vorherrschende Interaktion über van der Waals-Kräfte hin [Garidel, 2009]. Für BSA konnte erwartungsgemäß eine direkte Interaktion nachgewiesen werden.

Im Gegensatz hierzu sind die Affinitäten von PS80 zu Cetuximab anhand der erhobenen Daten vernachlässigbar, was darauf schließen lässt, dass der vorherrschende protektive Mechanismus von Polysorbat 80 zur Stabilisierung von Cetuximab nicht durch eine direkte Interaktion zustande kommt, sondern doch eher auf Verdrängungseffekte wie bereits in Kapitel 4.2.1 diskutiert, oder z.B. durch Kreilgaard und Randolph beschrieben [Kreilgaard et al., 1998b; Randolph und Jones, 2002]. Auch die destabilisierende Wirkung der Tenside kann nicht mit einer direkten Interaktion erklärt werden. Geringe adsorptive Effekte könnten trotzdem einen Einfluss haben.



**Abbildung 4.52:** Titration von 0,1 mM Cetuximab in PBS, pH 6,0 mit MHS15 5 mM in PBS, pH 6,0 bei 25°; (A) Rohdaten der Titration; (B) Bindungsisotherme der Reaktionsenthalpie, ermittelt durch Integration der Peaks aus (A) aufgetragen gegen das molare Verhältnis der Reaktionspartner.

Weitere Tenside wurden auf eine Interaktion mit Cetuximab untersucht. Für MHS15 ließ sich eine ähnliche Isotherme - allerdings mit deutlich niedrigerer Energie - wie für BSA mit PS80 erzeugen (Abb. 4.52). Der negative  $\Delta H^\circ$ -Wert



sowie ein positiver  $\Delta S^\circ$ -Wert tragen zu einer insgesamt exothermen Reaktion mit einer Bindungskonstante von  $K_a$   $1,47 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  bei. Die Interaktion ist somit etwas stärker als die von Cetuximab mit PS80, aber geringer als für BSA mit PS80. Der Grund für die ausgeprägtere Interaktion könnte in der geringeren Größe des Moleküls im Vergleich zu Polysorbat 80 liegen. Mit einem Molekulargewicht von  $344,529 \text{ g/mol}$  ist es ca. nur  $1/3$  so groß wie Polysorbat, wodurch es z.B. aus sterischen Gesichtspunkten besser mit dem Molekül reagieren könnte.

Die Titration von Cetuximab mit PO188 brachte im Gegensatz zu MHS15 und PS80 keine auswertbaren Ergebnisse. Eine Interaktion scheint hier nicht stattzufinden, was darauf schließen lässt, dass PO188, wie auch die anderen Tenside, eher durch reine Oberflächenaktivität einen protektiven Effekt auf Cetuximab während Agitation ausübte. Befriedigend messbare Interaktionen ließen sich somit nur zwischen BSA als hydrophobes Transportprotein und PS80 messen. Interaktionen von Cetuximab mit den untersuchten Tensiden sind vernachlässigbar gering.

#### **4.2.2.3 Oberflächenplasmonresonanz (SPR) als Tool für die Interaktionsdetektion zwischen Proteinen und Tensiden**

Die SPR Technologie ist eine häufig genutzte Technologie zur Charakterisierung von Interaktionsmechanismen [Rich und Myszka, 2005]. Der Vorteil label-freier Detektion, Real-Time-Datenaufzeichnung, ein hoher Automatisierungsgrad und hierdurch auch die Möglichkeit zur High-Troughput-Analytik sowie die relativ leichte Handhabung macht die SPR-Technologie zu einem wertvollen Werkzeug im Drug Discovery und weiten Gebieten der Biotechnologie. Mit Hilfe dieser Technik kann eine hohe Zahl unterschiedlichster Moleküle analysiert werden, wie beispielsweise DNA, Peptide, Proteine, Virus Partikel bis hin zu ganzen Zellen und deren Membranen [Rich und Myszka, 2004]. Verglichen mit klassischen End-Punkt Assays, welche hauptsächlich kompetitive Reaktionen oder Inhibitionen darstellen können, bieten SPR Sensoren weitaus mehr Information mit größeren mechanistischen Details in einem Experiment. Tabelle 4.14 fasst diese Parameter zusammen.

**Tabelle 4.14:** Messbare Parameter mit Hilfe von SPR.

<b>Eigenschaft</b>	<b>Parameter</b>
Thermodynamik	$K_a, K_D, \Delta H, \Delta S$
Kinetik	$k_{on}, k_{off}, t_{1/2}$
Kompetition / Inhibition	$IC_{50}, K_i$
Konzentration	[C]
Funktion / Aktivität	(ja/nein-Entscheidungen)

#### 4.2.2.3.1 Verwendung der Modellproteine Cetuximab und BSA als Liganden

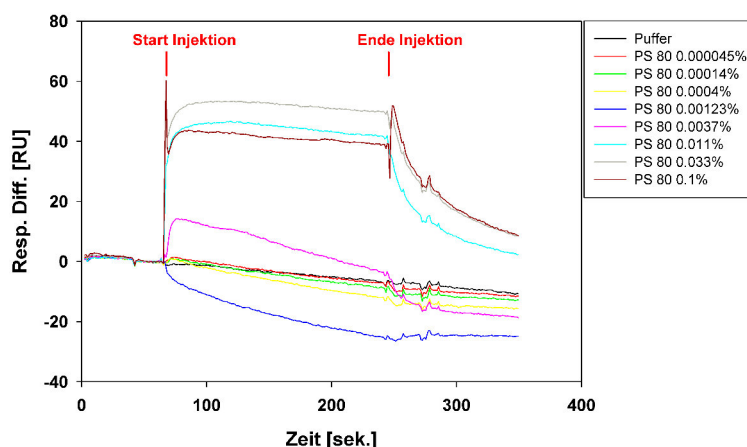
Zur Messung von Interaktionen der Modellproteine Cetuximab und BSA wurde ein BIACORE<sup>®</sup> 3000 verwendet. Hier wurde zunächst mit dem Standard-Sensor-Chip, einem CM5-Chip gearbeitet. Seine Oberfläche besteht aus einer carboxymethylierten Dextranmatrix, welche kovalent an den Goldfilm gebunden ist. Beide Proteine wurden bei einer Bindungskapazität von 10000 RU an die aktivierte Dextranmatrix gebunden. Hierfür wurde BSA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 10 mM Natriumacetat, pH 5.0) und Cetuximab (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 10 mM Natriumacetat pH 5.5) für jeweils 10 min bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  injiziert. Im Anschluss wurden entsprechende Verdünnungen der Analyten in HBS-N mit einer Injektionsrate von 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  für je 3 min über die präparierten Chip-Oberflächen injiziert (Tab. 4.15).

**Tabelle 4.15:** Konzentration der Analyten in HBS-N Puffer pro Zyklus für BIACORE<sup>®</sup>-Analytik von Cetuximab und BSA als Ligand.

<b>Zyklus-Nr.</b>	<b>Analyt</b>		
	PS80	MHS15	PO188
1	Puffer	Puffer	Puffer
2	0,000045 %	0,000045 %	0,000045 %
3	0,00014 %	0,00014 %	0,00014 %
4	0,0004 %	0,0004 %	0,0004 %
5	0,00123 %	0,00123 %	0,00123 %
6	0,0037 %	0,0037 %	0,0037 %
7	0,011 %	0,011 %	0,011 %
8	0,033 %	0,033 %	0,033 %
9	0,1 %	0,1 %	0,1 %

Die gezeigten Sensorgramme stellen die Daten nach Abzug der Bulksignale, die sowohl in der Probenzelle als auch in der Referenzzelle auftreten dar. Bulksignale stammen von der Änderung des Brechungsindex der Lösung sobald eine Injektion vorgenommen wird und stellen jegliche Art von Bindung dar [Gronewold, 2007].

BSA stellt als unspezifisches lipophiles Transportprotein die Positivkontrolle für die Interaktionsuntersuchung dar. Mit diesem Molekül wurden schon unter verschiedenen experimentellen Bedingungen lipophile Wechselwirkungen mit Tensidmolekülen nachgewiesen [Gelamo et al., 2004], sowie auch mittels ITC in Kapitel 4.2.2.2 gezeigt. Da die Kurven keinen Steady-State-Zustand erreichen, waren ein Kurvenfit und damit eine Aussage über eine mögliche Reaktionskinetik nicht möglich. Die Kurven wurden daher nur qualitativ ausgewertet.



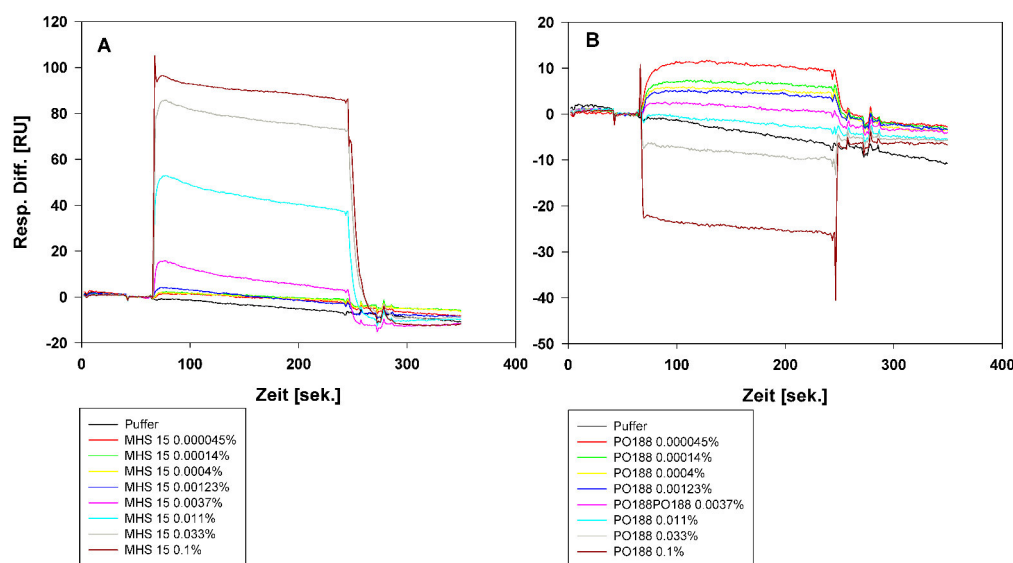
**Abbildung 4.53:** Sensorgramme der Interaktion von immobilisiertem BSA und Polysorbat 80 in HBS-N, pH 7,4 mit steigenden Konzentrationen. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 min.

Die Sensorgramme der Wechselwirkung zwischen BSA und PS80 zeigen einen steilen Anstieg der Kurven direkt nach der Injektion, die im positiven RU Bereich liegen (Abb. 4.53). Dies deutet auf eine rasche Akkumulation des Tensids an der Sensor-Oberfläche hin. Bei niedrigen Polysorbatkonzentrationen bilden sich negative Response Differenzen. Erst ab 0,0037% PS80, was die erste Konzentration darstellt, die oberhalb der CMC liegt, ist ein positiver Verlauf der Kurven zu detektieren. Die erwartete Response von ca. 180 RU bei Zugrundelegung einer 1:1

Stöchiometrie wurde mit den untersuchten PS80-Konzentrationen nicht erreicht. Diese wurde wie folgt berechnet [Karlsson et al., 1997]:

$$\frac{RU_{LIGAND}}{MW_{LIGAND}} MW_{ANALYT} = RU_{ERWARTET}$$

Nach Ende der Injektionen ist ein langsames Abflachen dieser Kurven zurück zur Basislinie erkennbar, was auf eine langsame Abdissoziation des Analyten (hier PS80) schließen lässt. Über die gesamte Injektionsdauer wird kein Steady-State-Zustand der Analyt-Konzentration an der Chipoberfläche erreicht, sondern es ist im Verlauf der Injektion eine langsame Abdiffusion von PS80 anhand des Absinkens der Response Differenz detektierbar. Die Stagnation der Response-Erhöhung mit steigenden PS80-Konzentrationen lässt auf eine Sättigung der Oberfläche schließen. Die Messungen bestätigten die mit ITC generierten Ergebnisse, der Interaktion zwischen BSA und PS80 (s. Kap 4.2.2.2).

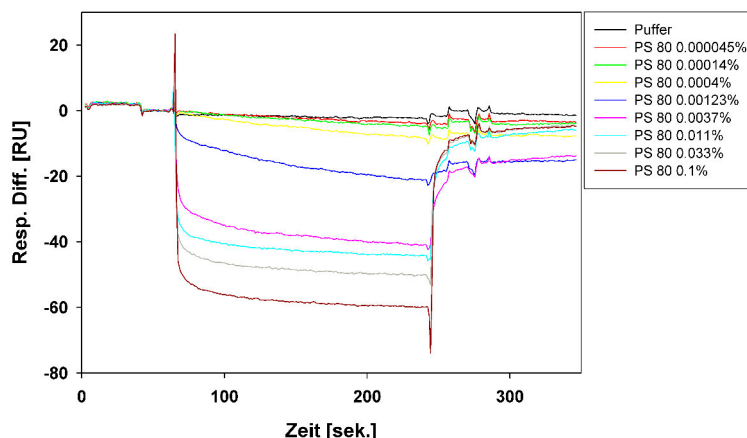


**Abbildung 4.54:** Sensorgramme der Interaktionen von (A) BSA mit MHS15 in HBS-N, pH 7,4 mit steigenden Konzentrationen und (B) BSA mit PO188 in HBS-N, pH 7,4 in steigenden Konzentrationen. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von 15 µl/min über 3 min.

Auch für MHS15 und PO188 ist eine Interaktion mit BSA sichtbar, anhand der positiven Sensorgramme bis 90 RU für MHS15 und 11 RU für PO188 (Abb. 4.54). Ein nahezu senkrechter Anstieg zu Beginn, gefolgt von einem leichten Abfall der

Kurven über den Injektionsverlauf, zeichnen die Interaktion mit MHS15 aus. Die Kurven ähneln denen der Interaktion von BSA mit PS80, im positiven Response Bereich. Der schnelle Kurvenabfall nach Injektionsende deutet auf ein schnelles Abdifundieren von MHS15 von der Chipoberfläche hin, was für PS80 nicht der Fall war. Mit steigenden Konzentrationen ist auch hier ein Sättigungseffekt erkennbar, der sich am kleiner werdenden Abstand der Kurven zueinander mit steigender Konzentration äußert. Eine schwache Interaktion scheint hier zu existieren. Bei PO188 kommt es zu einem langsameren Anfluten des Moleküls und zum Erreichen eines nahezu konstanten Steady-States. Die erwarteten RU von 1300 wurden hier nicht erreicht, sondern die gemessene Bindung war deutlich schwächer. Interessanterweise kommt es bei PO188 zu den größten Signalen bei der geringsten Konzentration. Das Signal der 0,000045 %igen Lösung weist hier eine Größe von durchschnittlich 10 RU auf. Mit zunehmender Konzentration verringert sich dieses zunehmend bis es für 0,1 % und 0,033 % sogar negative Werte bis ca. -25 RU annimmt. Die negativen Kurvenausschläge können durch eine höhere Interaktion des Tensides mit der reinen Dextranmatrix in der Referenzzelle als mit der mit BSA besetzten Oberfläche begründet werden. Bei ansteigender Tensidkonzentration scheint sich hier die Affinität vom Protein zur reinen Dextranmatrix hin zu verschieben. Die rohen Bulksensogramme der PO188-Titrations über BSA weisen nahezu alle den gleichen Wert von ca. 25 RU auf (Daten nicht gezeigt), erst bei den beiden letzten Injektionen von 0,033 % und 0,1 % PO188-Lösung wird ein signifikanter Anstieg des Responses sowohl in der Blank-Zelle als auch für die mit BSA beladene Zelle beobachtet. Der deutlich negative Wert von -20 RU liegt bei einer PO188-Konzentration von 0,1 %, was wiederum auch die CMC von PO188 in Wasser darstellt [Youan, 2004]. Die Bildung mizellarer bzw. laminarer Strukturen durch PO188 scheint dessen Affinität gegenüber der nicht beladenen Dextranmatrix zu erhöhen und somit für BSA negative RU Werte zu erzeugen. Ein weiterer Grund könnte eine sterische Hinderung der Interaktion der mizellar angeordneten PO188-Moleküle mit BSA sein. BSA könnte durch seine Immobilisierung an der Dextranmatrix ein tieferes Eindringen der Mizellen verhindern und somit das Gleichgewicht zugunsten der unbeladenen Matrix verschieben.

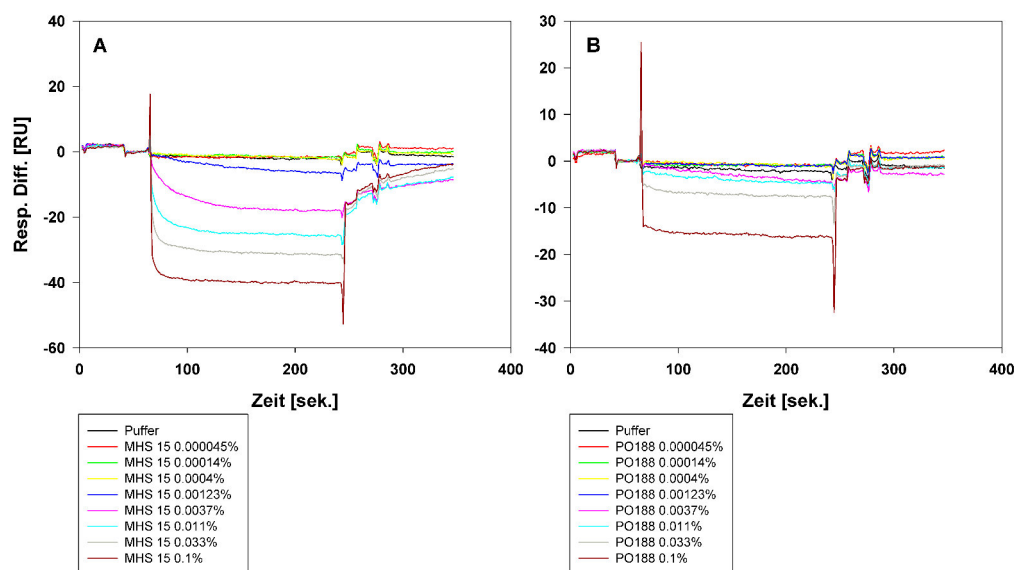
Im Gegensatz zu BSA zeigten die Sensorgramme der Untersuchungen von Cetuximab mit den drei Tensiden keine mit dem BIACORE® messbaren Interaktionen.



**Abbildung 4.55:** Sensorgramme für die Titration von PS80 über Cetuximab auf einem CM5 Chip in HBS-N, pH 7,4. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 min.

Die Sensorgramme weisen für alle gemessenen Konzentrationen eine negative Response Difference auf (Abb. 4.55). Im negativen Bereich scheinen sich jedoch auch hier Sättigungseffekte zu ergeben, die mit steigender Konzentration bei einem Minimum von  $-60 \text{ RU}$  liegen. Die Immobilisierung der Antikörpermoleküle könnte eine sterische Hinderung des Eindringens der Tensidmoleküle in die Dextranmatrix bewirkt haben, und so einen Teil der Interaktionen tiefer in der Matrix verhindert haben. Gerade beim Erreichen der CMC könnte dies einen Grund für das weitere Absinken der Response Difference durch stärkere Interaktion mit der unbelegten Matrix darstellen, da die größeren Mizellen noch weniger in die Matrix eindringen können. In Abbildung 4.56 sind die gleichen Effekte auch für MHS15 und PO188 dargestellt.

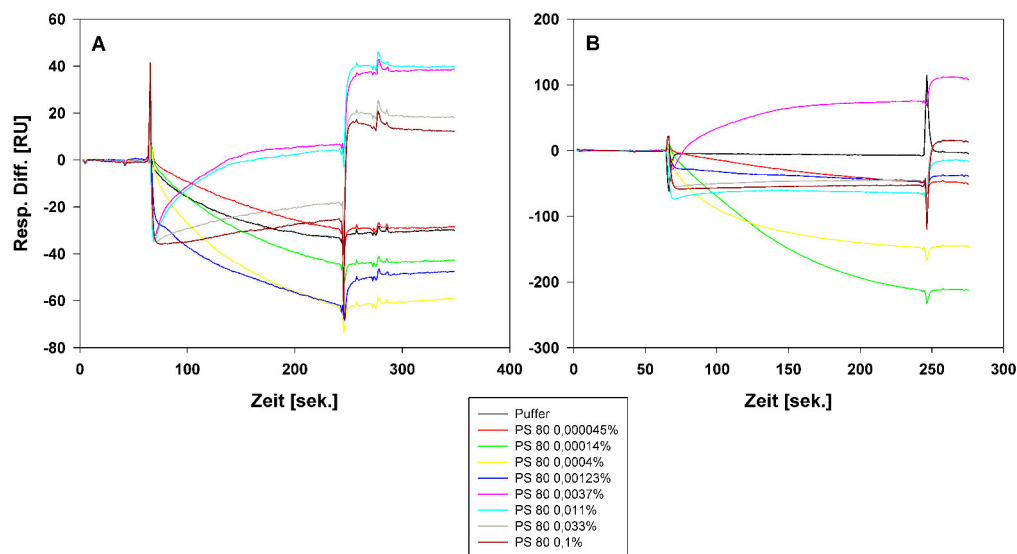
Im nächsten Schritt wurde versucht, die Interaktion der Tensidmoleküle mit der Dextranmatrix so weit wie möglich zu reduzieren, um so die reine Interaktion von Protein mit den Tensidmolekülen untersuchen zu können. Für diese Versuchsreihen wurde ein C1-Chip verwendet. Dieser Chip zeichnet sich durch eine flache Goldoberfläche ohne Matrixmoleküle aus. Die Carboxylgruppen, welche zur Im-



**Abbildung 4.56:** Sensorgramme der Interaktion von Cetuximab mit (A) MHS15 und (B) PO188 in HBS-N, pH 7,4. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 min.

mobilisierung des Liganden auf dem Chip benötigt werden, sind hier direkt an der Goldoberfläche gebunden. Die Modellproteine wurden zur Immobilisierung, wie zuvor, für jeweils 10 min bei einer Flussrate von  $10 \mu\text{l}/\text{min}$  injiziert (BSA:  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $10 \text{ mM}$  Natriumacetat, pH 5.0; Cetuximab:  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  in  $10 \text{ mM}$  Natriumacetat pH 5.5). Im Anschluss wurden entsprechende Verdünnungen der Analyten (siehe Tabelle 4.15) über die präparierten Chip-Oberflächen injiziert. Die maximale Bindungskapazität des Chips liegt bei diesen Versuchsreihen bei ca.  $1500 \text{ RU}$  - was einer Beladung von  $1500 \text{ pg}/\text{mm}^2$  entspricht - im Gegensatz zu  $10000 \text{ RU}$  für den CM5 Chip. Dieser wesentlich kleinere Wert ist auf das Fehlen der Dextranmatrix zurückzuführen, da durch deren vergrößerte Oberfläche wesentlich mehr Ligandenmoleküle gebunden werden können.

Die Titration der Tenside über die beiden Modellproteine ist exemplarisch in Abbildung 4.57 für BSA und Cetuximab mit Polysorbat 80 dargestellt. Auch hier konnten Kurvenfits und eine Berechnung der Reaktionskinetik nicht durchgeführt werden, da ein Steady-State-Zustand nicht erreicht wurde und es blieb bei einer qualitativen Auswertung. Beide Graphen zeigten einen initialen Abfall der RU nach Injektionsstart bei Polysorbatkonzentrationen ab  $0,00123\%$  -  $0,1\%$ .



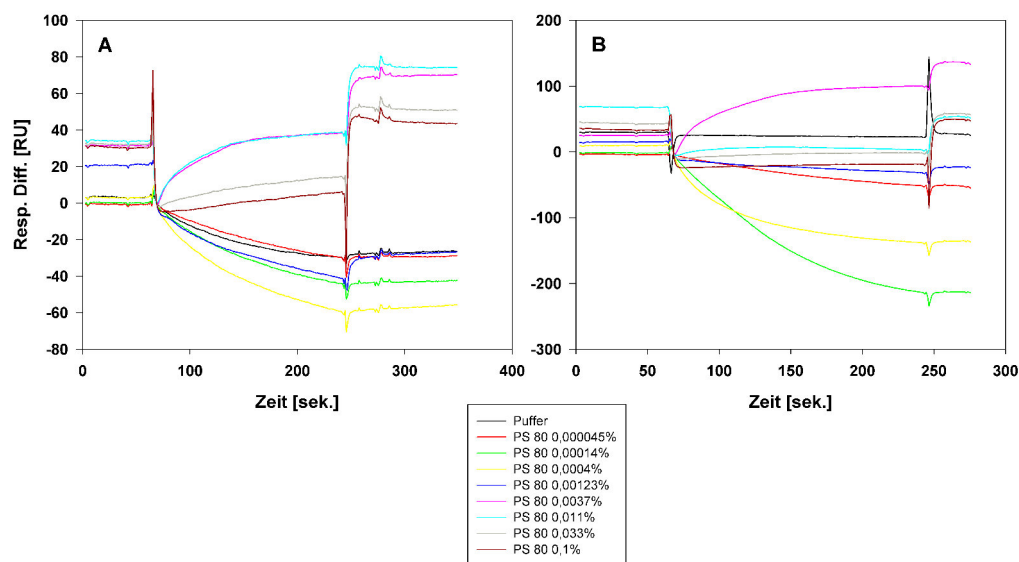
**Abbildung 4.57:** Sensorgramme der Interaktion von immobilisiertem (A) BSA und (B) Cetuximab mit PS80 in HBS-N, pH 7,4 auf einem C1-Chip. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 min.

Sowohl bei BSA als auch bei Cetuximab wurde dieser initiale Abfall für die drei niedrigsten injizierten Konzentrationen von 0,000045 %, 0,00014 % und 0,0004 % nicht beobachtet. Im Vergleich zum CM5-Chip tritt bei der Interaktion von BSA mit Polysorbat 80 nur eine sehr geringe positive Response Difference von 2-5 RU für die Konzentrationen 0,0037 % und 0,011 % auf. Würde man den initialen Abfall des Responses bei Injektion allerdings herausrechnen, ergeben sich für beide Proteine Sensorgramme mit positiven Responses für Polysorbatkonzentrationen von 0,0037 % - 0,1 % bei BSA und 0,0037 % und 0,011 % für Cetuximab (Abb. 4.58). Interessant ist hierbei, dass die RU mit steigender Tensidkonzentration abnehmen, anstatt bei steigender Tensidkonzentration eine Sättigung im positiven RU Bereich anzustreben. Eine schwache Interaktion könnte unter zu Hilfenahme dieser Interpretation also für beide Proteine mit PS 80 vorliegen.

Die Sensorgramme für MHS15 ergaben für BSA und Cetuximab nahezu keine Interaktion. Alle Sensorgramme befanden sich im negativen Responsebereich und wiesen auf keine direkte Interaktion hin. (Daten nicht gezeigt). Genauso für PO188, hier befanden sich alle Sensorgramme fast übereinstimmend auf dem Response Level 0 (Daten nicht gezeigt). Gerade für MHS15 hätte man auch mit dem C1-Chip eine Interaktion wenigstens mit BSA erwarten können, da sich hier bei



Verwendung des CM5-Chips die deutlichsten Interaktionen detektieren ließen. Dies ließ sich mit den durchgeführten Versuchsreihen mit dem C1 Chip nicht bestätigen (s. auch Abb. 4.58).



**Abbildung 4.58:** Modifizierte Sensorgramme der Interaktion von immobilisiertem BSA (A) und Cetuximab (B) mit PS80 in HBS-N, pH 7,4 auf einem C1-Chip. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l}/\text{min}$  über 3 min. Per y-Transformation wurde der Nullpunkt auf den Zeitraum kurz nach Injektionsstart gesetzt.

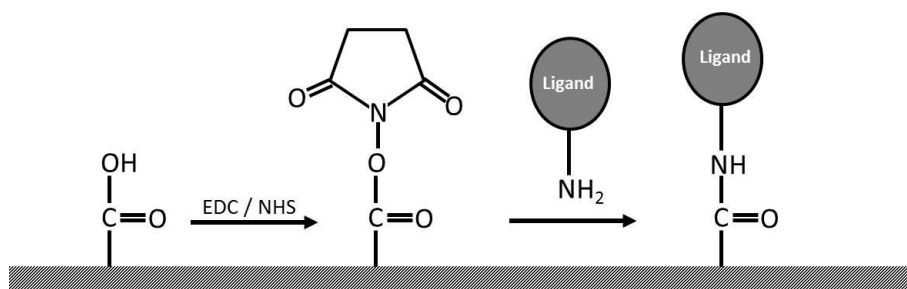
Das Immobilisierungslevel im Falle des C1-Chips ist sehr klein. Der Massenzuwachs, der durch die Interaktion des Tensids mit dem Liganden stattfinden sollte, ist vermutlich zu gering, so dass aus diesem Grund kein Signalanstieg zu erkennen war. Zu erwartende Responsewerte rangierten im Bereich 5 - 100 RU, was im Vergleich zu den erwarteten RU mit dem CM5-Chip sehr wenig ist. In den meisten Sensorgrammen waren keine Signale erkennbar oder durch Artefakte überlagert (Daten nicht gezeigt). Die amphiphile Natur der Tenside und die daraus resultierende Tendenz Mizellen zu bilden, können hierzu beigetragen haben. Die hydrophobe Beschaffenheit der Chipoberfläche könnte zusätzlich bewirkt haben, dass Artefakte sowie nicht reproduzierbare Signale während der Messungen auftraten. Durch hydrophobe unspezifische Interaktion der Tenside mit dem Chip können hier wiederum verfälschte Ergebnisse aufgetreten sein. Zusammenfassend ließ sich aus den Daten mit dem C1 Chip keine zusätzliche Aussage über die Interaktion zwischen Protein als Ligandenmolekül mit einem der verwendeten Tenside zie-

hen. Maximal die Interaktion zwischen PS80 und den beiden Modellproteinen ist unter zu Hilfenahme der modifizierten Y-Transformation mit dem C1 Chip nachzuweisen.

#### 4.2.2.3.2 Funktionalisierung von Polysorbat 80 an der alkoholischen Gruppe

Die Detektion von Interaktionen mit dem BIACORE® 3000 war mit den vorangegangenen Versuchen nur mit Tensid als Analyt und dem Protein als immobilisierten Liganden durchführbar. Die Adsorption des Polysorbates schien vor allem konzentrationsabhängig zu sein, so dass eine eindeutige Aussage über eine direkte Interaktion auch aufgrund der geringen Molekülmasse des PS nicht eindeutig möglich war. Die Immobilisierung von Polysorbat sollte daher herangezogen werden, um die Interaktionsuntersuchungen nun mit den Proteinen als Liganden durchzuführen. Hierdurch könnten Mizellisierungseffekte vermieden werden, welche unter Umständen einen Einfluss auf die Art der Interaktion haben. Des Weiteren bietet die Immobilisierung des Tensids den Vorteil eines höheren Massenzuwachses bei der Interaktion, da die Molekülmasse der Proteine im Vergleich zu Tensid um ca. das 10 - 20- fache höher ist. Durch das wesentlich höhere Molekulargewicht der beiden Modellproteine könnte es möglich sein, wesentlich geringere Interaktionen zu detektieren, da ein einzelnes Molekül welches an die Oberfläche adsorbiert schon eine wesentlich größere Massenänderung und damit Response Difference hervorruft. Da das Polysorbatmolekül unter den gegebenen Umständen mit normalen Kopplungsreagentien nicht an den Chip gebunden werden konnte, sollten funktionelle primäre Amingruppen in das Polysorbat eingeführt werden. Durch diese Funktionalisierung konnte die routinemäßig verwendete Amin-Kopplungsreaktion mit EDC/NHS zur Immobilisierung des Moleküls auf dem Chip angewendet werden (Abb. 4.59). Als Kopplungskomponente für die Funktionalisierung wurde Glycin gewählt.

Die Kopplung des Glycins an die alkoholischen Endgruppen der PEG-Ketten des Polysorbates wurde mit Hilfe der Veresterung nach Steglich durchgeführt [Neises und Steglich, 1978] (Abb. 4.60). DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) und die Fmoc-geschützte Carbonsäure Glycin reagieren hierbei zu einem O-Acylisoharnstoff,



**Abbildung 4.59:** Schematische Darstellung der Aminkopplungsreaktion auf dem Sensor-Chip.

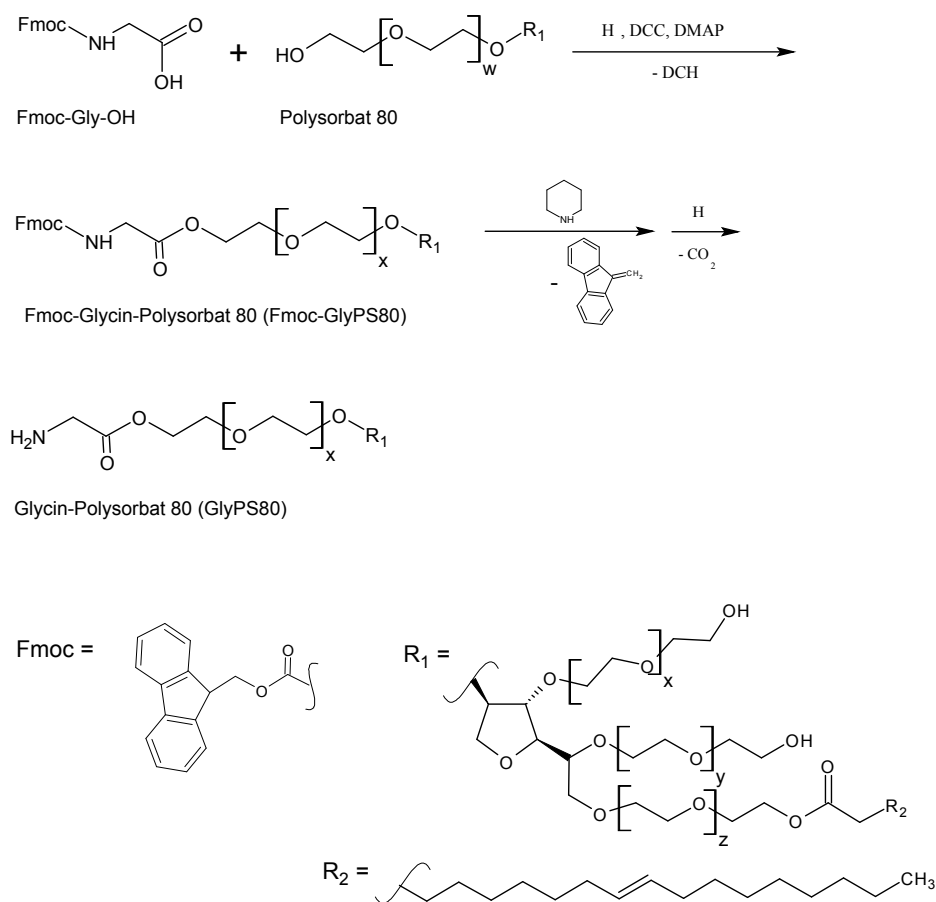
dessen Reaktivität mit dem entsprechenden Anhydrid der Säure vergleichbar ist. Durch die weitere Reaktion mit einer alkoholischen Gruppe von Polysorbat 80 bildet sich der sehr stabile Dicyclohexylharnstoff und ein Ester. Um die Amidbildung aus Carbonsäure, DCC und Amin zu erleichtern wurde der Reaktion DMAP als Katalysator zugesetzt [Organische-chemie.ch, 2013].

Die Durchführung der Synthese ist im Kapitel 3.2.1.5 näher beschrieben.

**Tabelle 4.16:** Eingesetzte Molekulare Verhältnisse für die Funktionalisierung von Polysorbat 80 mit Glycin.

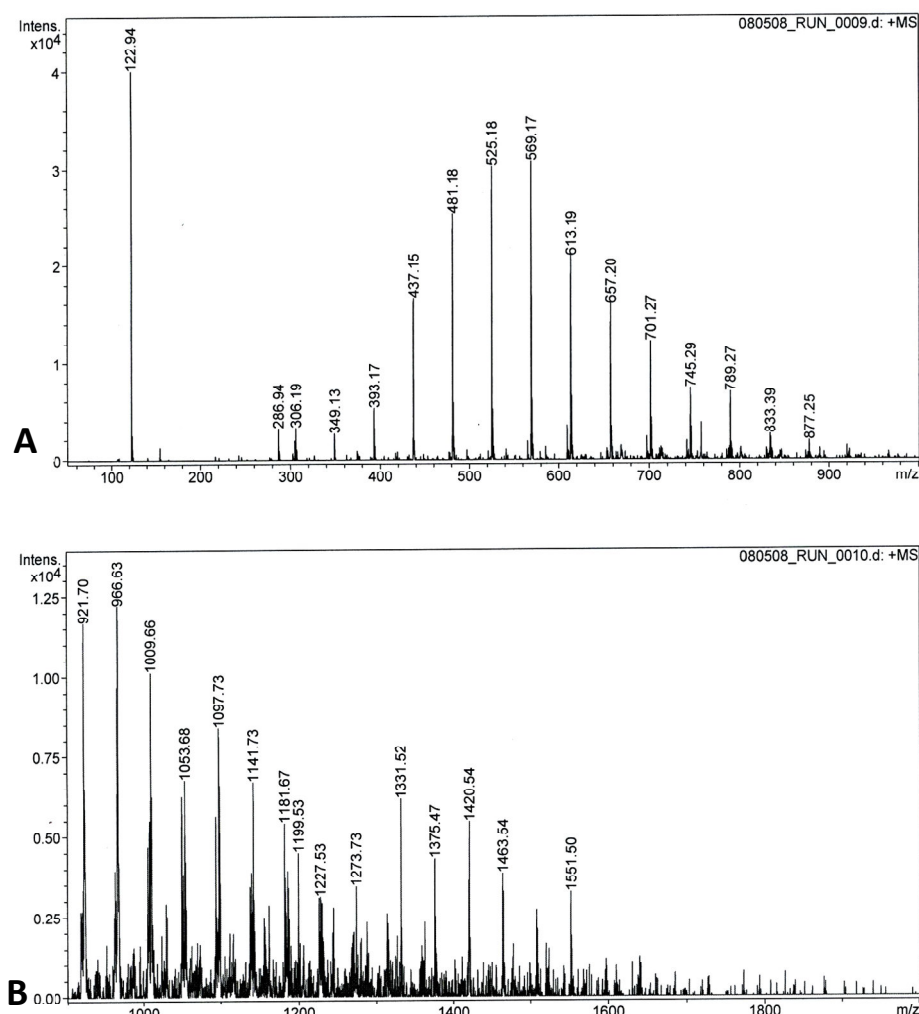
Reagenz	Molekulargewicht	Einges. Menge
Polysorbat 80	1310 g/mol	1/3 eq
Fmoc-Gly-OH	297,3 g/mol	2 eq
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	206,33 g/mol	2 eq
Dimethylaminopyridin (DMAP)	122,17 g/mol	0,1 eq

Im ersten Schritt der Kopplung wurde durch die Veresterung ein „Fmoc-GlyPS80“ gebildet. Die funktionelle Gruppe incl. Schutzgruppe könnte an drei Bindungsstellen des Polysorbats gebunden sein, was bedeutet, dass unterschiedlich substituierte Produkte entstehen können: einfach, doppelt und dreifach substituiertes PS80. Ausgehend von der Masse von PS80 in der HPLC-MS sollten sich somit Massen wieder finden die jeweils 280, 560 oder 840 m/z zusätzlich zur ursprünglichen PS80-Masse besitzen. Das Massenspektrum in Abb. 4.61 weist das für Polysorbat typische Fragmentierungsmuster auf (interne Daten), wobei die intensivsten Peaks jeweils dem Verlust einer Polyoxyethyleneinheit (m/z = 44) entsprechen. Die Signale reichen von 400 bis 1400 m/z, wobei sich die stärksten



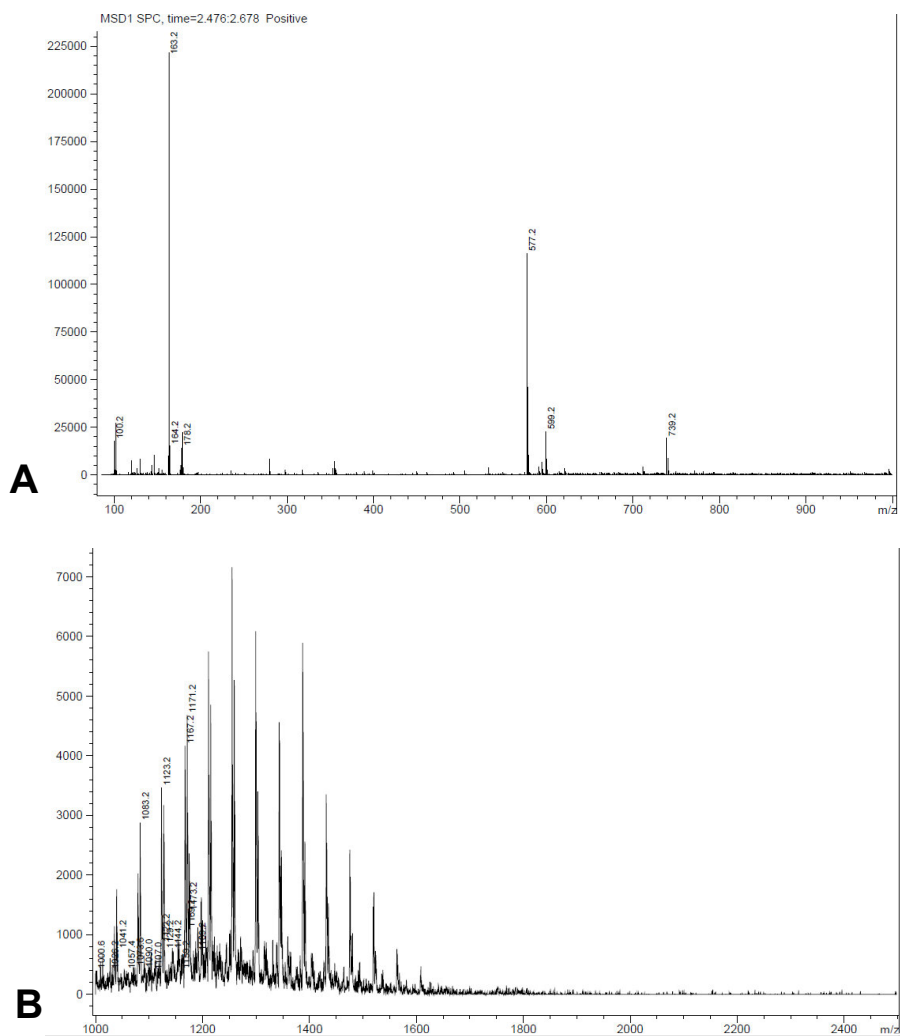
**Abbildung 4.60:** Schema der Funktionalisierung von Polysorbat 80 mit Glycin mittels Steglich Veresterung am Beispiel der Substitution einer der drei alkoholischen Gruppen.

Signale bei 569,17 m/z befinden und jeweils mit zunehmenden bzw. abnehmenden POE-Einheiten schwächer werden. Die charakteristische PS80-Gruppierung befindet sich bei 400 bis 880 m/z.



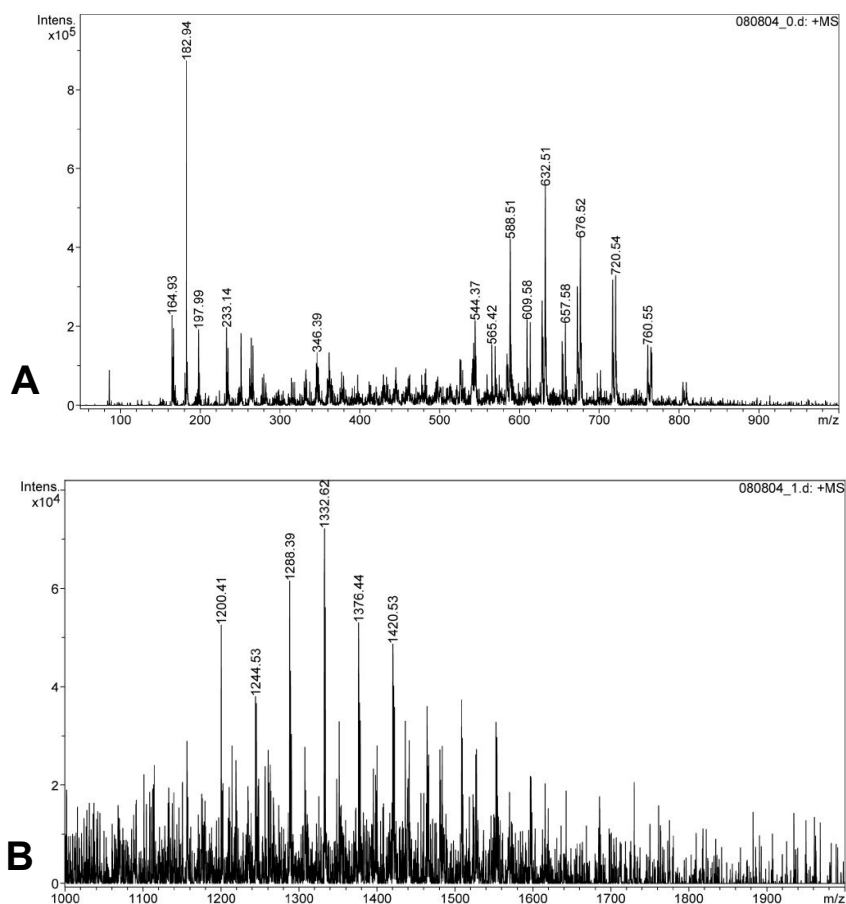
**Abbildung 4.61:** Massenspektrum von Polysorbat 80 gesplittet in zwei Scans von (A) 0 - 1000 m/z und (B) 900 - 2000 m/z.

Nach Kopplung des Fmoc-Gly an PS80 verschob sich das Spektrum des funktionalisierten Polysorbats zu höheren Masseneinheiten mit gleichem Fragmentierungsmuster. Der intensivste Peak verschob sich von 569,17 m/z nach 1266 m/z, was für die Kopplung mindestens zweier Fmoc-Gly-Gruppen spricht (Abb. 4.62).



**Abbildung 4.62:** Massenspektrum von Fmoc-GlyPS80 gesplittet in zwei Scans von (A) 0 - 1000 m/z und (B) 900 - 2000 m/z.

Das Spektrum nach Abspaltung von Fmoc weist eine Verschiebung der Polysorbitatgruppierung auf, was der Bindung von zwei Glycinmolekülen (2·58 m/z) entspricht (Abb. 4.63).



**Abbildung 4.63:** Massenspektrum von GlyPS80 gesplittet in zwei Scans von (A) 0 - 1000 m/z und (B) 900 - 2000 m/z.

Das Produkt wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt und erst unmittelbar vor der Verwendung in Wasser gelöst.

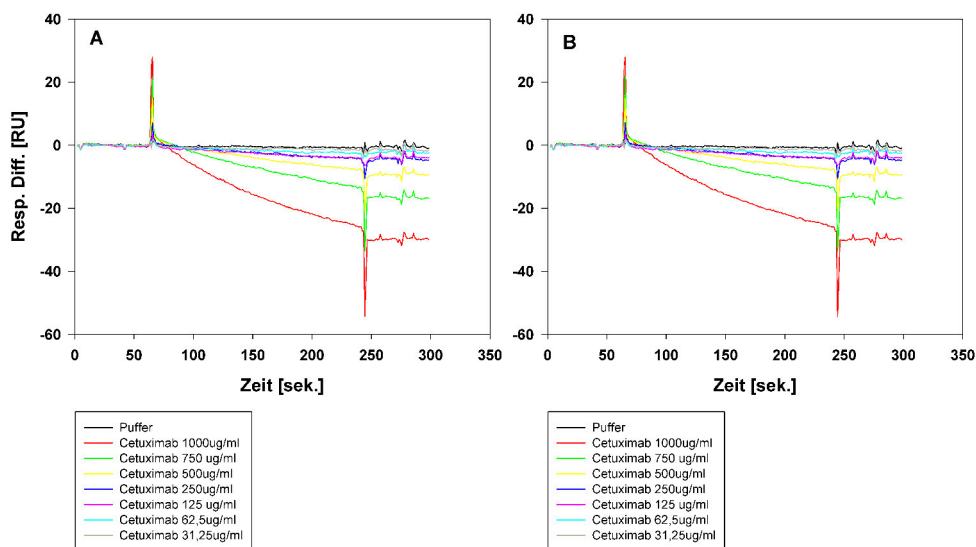
#### 4.2.2.3.3 Verwendung von GlyPS80 als Ligand

Das synthetisierte GlyPS80 wurde in den folgenden Versuchsreihen als Ligand verwendet, um die Modellproteine BSA und Cetuximab zur Interaktionsdetektion darüber zu injizieren (Tab. 4.17). Das Molekül wurde hierzu in drei verschiedenen Konzentrationen zuerst mit Hilfe des Aminkopplungskits auf einem CM5-Chip

immobilisiert. Die anschließende Blockierung erfolgte mit Hilfe von Ethanolamin. In gleicher Weise wurde bei dem C1-Chip verfahren.

**Tabelle 4.17:** Konzentration der Analyten in HBS-N Puffer pro Zyklus für BIACORE®-Analytik von Cetuximab und BSA als Ligand.

Zyklus-Nr.	Analyt	
	Cetuximab	BSA
1	Puffer	Puffer
2	1000 $\mu\text{g/ml}$	1000 $\mu\text{g/ml}$
3	500 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
4	250 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
5	125 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$
6	62,5 $\mu\text{g/ml}$	62,5 $\mu\text{g/ml}$
7	31,25 $\mu\text{g/ml}$	31,25 $\mu\text{g/ml}$
8	15,625 $\mu\text{g/ml}$	15,625 $\mu\text{g/ml}$

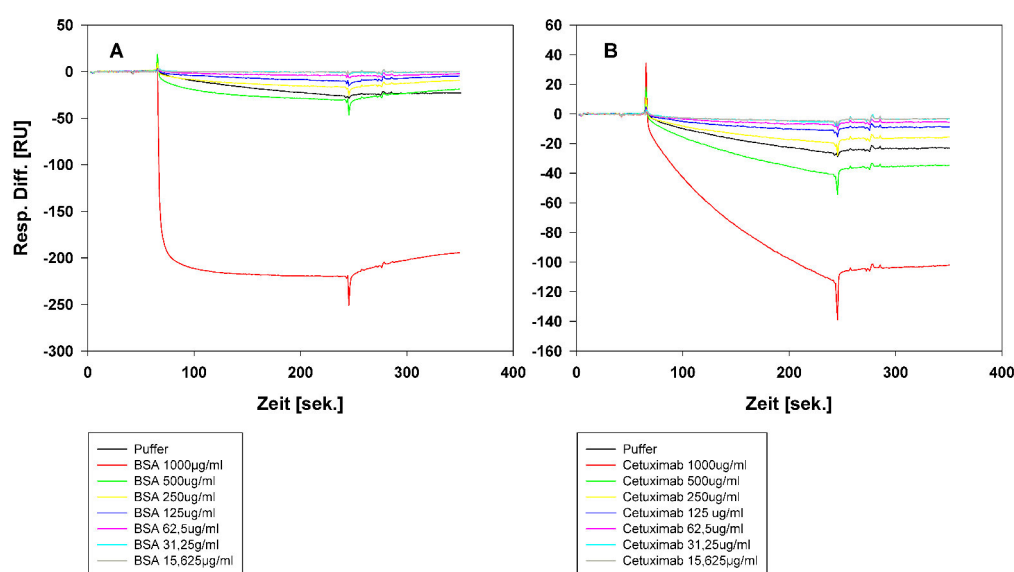


**Abbildung 4.64:** Sensorgramme der Interaktion von immobilisiertem GlyPS80 mit (A) BSA und (B) Cetuximab in HBS-N, pH 7,4 auf dem CM5-Chip. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von 15  $\mu\text{l/min}$  über 3 min. GlyPS80 wurde hier in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  in Natriumacetatpuffer, pH 4,5 und einer Flussrate von 10  $\mu\text{l/min}$  immobilisiert.

Die Sensorgramme für GlyPS80 mit den beiden Proteinen zeigten weder für Reaktionen auf dem CM5-Chip (Abb 4.64 A und B) noch auf dem C1-Chip (Abb



4.65 A und B) die erwarteten Effekte. In keiner Versuchsreihe wurde ein positives Sensorgramm erhalten. Experimente mit weiteren GlyPS80-Konzentrationen ( $15 \mu\text{g/ml}$  und  $500 \mu\text{g/ml}$ ) fielen in gleicher Weise aus (Daten nicht gezeigt). Eine direkte Interaktion zwischen dem funktionalisierten PS80 und den getesteten Proteinen konnte nicht ermittelt werden. Grund hierfür könnte auch die durchgeführte Funktionalisierung des PS80 für die Immobilisierung darstellen. Eine Änderung der Amphiphilie könnte zu einem veränderten Affinitätsverhalten des Tensids mit dem Protein geführt haben.



**Abbildung 4.65:** Sensorgramme der Interaktion von immobilisiertem GlyPS80 mit (A) BSA und (B) Cetuximab in HBS-N, pH 7,4 auf dem C1-Chip. Die Injektion erfolgte mit einer Flussrate von  $15 \mu\text{l/min}$  über 3 min. GlyPS80 wurde hier in einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  in Natriumacetatpuffer, pH 4,5 und einer Flussrate von  $10 \mu\text{l/min}$  immobilisiert.

Durch das Einführen mehrerer primärer Amingruppen in das Molekül könnte dieses an Hydrophilie zugenommen haben. Die Amingruppen könnten zugleich als sterische Schutzgruppen für die hydrophoben Reste fungieren, welche speziell für die Interaktion zwischen Albumin und PS80 eine Rolle spielen [Garidel, 2009]. Durch die Immobilisierung könnte auch die Molekülflexibilität abgenommen, und so eine Interaktion verhindert haben. Der Effekt einer besseren Interaktionsdetektion blieb aus. Die Eignung des modifizierten Tensides ist ebenfalls kritisch zu sehen. Weitere Untersuchungen zu dessen Eigenschaften z.B. in Bezug auf die Oberflächenaktivität, Stabilität und Struktur könnten hier weiterhelfen.

#### **4.2.2.4 Zusammenfassende Diskussion**

Die vorliegenden Interaktionsexperimente befassten sich mit der Untersuchung von potentiellen Interaktionen von BSA und Cetuximab mit verschiedenen Tensiden, wobei vorwiegend Polysorbat 80 im Fokus stand. Die Studien sollten einen besseren Einblick in evtl. vorhandene Interaktionen geben und wenn möglich Aufschluss über die in den Stresstests gewonnenen Ergebnissen geben. Für BSA konnte sowohl mit ITC als auch mit BIACORE® eine leichte hydrophobe Interaktion mit Polysorbat und per BIACORE® auch für die anderen beiden Tenside MHS15 und PO188 nachgewiesen werden. Eine Stabilisierung durch direkte Interaktion mit dem Protein ist hier vorhanden und unterstützt die Thesen der Literatur [Bam et al., 1998; Chou, 2005]. Für Cetuximab konnte nahezu keine Interaktionen mit den Tensiden nachgewiesen werden. Die Ergebnisse decken sich mit den durch Garidel et al. erhobenen Daten mittels ITC [Garidel, 2009]. Auch hier wurde nahezu keine Interaktion von PS80 mit einem Antikörper detektiert. Interessanterweise stellten die Forscher eine leichte, wenn auch vernachlässigbare Interaktion des Antikörpers mit Polysorbat 20 fest. Chou beschreibt die höhere Affinität von Polysorbat 20 zu Albutropin durch die geringere Kettenlänge des hydrophoben Restes. PS80 besitzt somit eine größere sterische Hinderung an der Bindungsstelle [Chou, 2005]. Dies könnte auch im Falle des Antikörpers der Grund gewesen sein. Eine kolloidale Stabilisierung von Antikörperformulierungen durch Polysorbat durch hydrophobe Interaktionen schlossen die Forscher aufgrund der gefundenen Ergebnisse aus. Die in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse stützen diese These. Eine wirkliche Interaktion ließ sich nur mit dem hydrophoben Transportprotein BSA nachweisen. Interaktionsmessungen sind demnach nur dann eine sinnvolle Analyseverfahren, wenn es sich bei den untersuchten Proteinen um hydrophobe Spezies handelt, welche eine Interaktion mit dem Tensid eingehen können. Für hydrophile Moleküle, wie Antikörper, sind die auftretenden Interaktionen zu gering oder nicht vorhanden, um von den Techniken erfasst zu werden. Liegt ein hydrophobes Protein vor, könnte v.a. die Untersuchung mit ITC einen Aufschluss darüber geben, in welchem Verhältnis die beiden Moleküle miteinander reagieren. Inwieweit diese Information eine Hilfe bei der Voraussage einer Proteinstabilisierung in pharmazeutischen Formulierungen bietet, könnte Gegenstand weiterer Versuche sein.

Der Ausschluss der Interaktion von Polysorbat mit Cetuximab durch die vorliegenden Experimente stärkt die gängigen Theorien der Stabilisierung des Proteins oder seiner löslicher Aggregate durch Kompetition um Grenzflächen (Luft/Wasser) während Agitation [Chang et al., 1996; Kreilgaard et al., 1998a]. Die Frage, wie dies in den Kontext mit der sehr geringen instabilisierenden Polysorbatkonzentration gebracht werden kann, bleibt weiter offen. Wie in der Arbeit und auch durch Kiese für Polysorbat 20 und Mahler für Polysorbat 80 mit verschiedenen Antikörpern beobachtet [Mahler et al., 2005; Kiese et al., 2008], wurde bei bestimmten Polysorbatkonzentrationen ein Anstieg an Aggregaten beobachtet, der bei höheren Konzentrationen an Polysorbat wieder verschwand. Eine umfassende Erklärung konnte bislang für dieses Phänomen nicht geliefert werden, es existieren jedoch mehrere Erklärungsansätze. Wang et al. beschrieb, dass Proteine bei Kontakt mit der Luft/Wasser Grenzfläche partiell entfaltet werden und sich reorientieren, so dass die dabei freigelegten hydrophoben Areale des Proteins eine erhöhte Chance zur intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkung haben. [Wang et al., 2008]. Geht man von einer Interaktion des Proteins mit Polysorbat aus, wie es beispielsweise durch Bam für rhGh gefunden wurde [Bam et al., 1996], so könnten Spuren von Polysorbat zu einer Stabilisierung des entfalteten Proteins führen und die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens zweier entfalteter Proteine erhöhen. Weitere Zugabe von Polysorbat würde wiederum zur Absättigung der Grenzfläche mit Tensid führen und zur Verdrängung des Proteins führen. Dadurch würde dann wieder der schützende Effekt des Polysorbates zu Tage treten. Ist von einer Interaktion Polysorbat/Protein nicht auszugehen, müssen andere Effekte mit einspielen. Eine Möglichkeit könnte die Störung der Hydrathülle des Proteins durch Spuren von Tensid sein. Das Tensid würde in diesem Fall als eine Art chaotropes Agens fungieren und durch entropische Effekte zur Aggregation von bereits entfalteten Proteinen beitragen. Auch könnte ein bestimmtes Verhältnis der Oberflächenspannung der Formulierung und des Proteins zur bevorzugten Aggregation führen. Die Adsorption von Protein und Tensid an der hydrophoben Grenzfläche reduziert zum Einen die Grenzflächenenergie, gleichzeitig werden Wassermoleküle von ihr verdrängt, und durch adsorbierte Moleküle ersetzt [Vogler, 1998]. Untersuchungen dieser Art stellen ein interessantes Thema weiterer Forschungen dar.

## Kapitel 5

### Zusammenfassung

Tenside werden sehr häufig als Hilfsstoffe zur Stabilisierung von Proteinformulierungen eingesetzt, um Entfaltung, Aggregation aber auch Adsorption des Proteins und damit einhergehend Wirkstoffverlust, Qualitätseinbußen oder Immunogenitätserhöhung entgegenzuwirken. Grundsätzlich wird dieser protektive Effekt auf die Verdrängung der Proteinmoleküle von der Grenzfläche durch Tensidmoleküle zurückgeführt. Wesentlich seltener sind Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Protein- und Tensidmolekülen, welche sowohl stabilisierend als auch destabilisierend sein können. Nur wenig ist über das Tensidverhalten in hochkonzentrierten Antikörperlösungen bekannt. Es wurden auch hier stabilisierende und destabilisierende Effekte in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration nachgewiesen. Neben den Tensideffekten spielen aber zusätzlich die selbststabilisierenden Eigenschaften der Proteinlösung aufgrund erhöhter Viskosität oder Destabilisierung durch "molecular crowding" eine Rolle.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Protein-Tensid-Interaktionen anhand von Stressstudien mit niedrig- und hochkonzentrierter Cetuximabformulierung und der Analyse direkter Interaktionen mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR). Teilaspekte der Dissertation waren die Optimierung der Aufkonzentrierungsparameter von Cetuximab mittels Tangentialflussfiltration (TFF) sowie die Untersuchung der partiellen Gefriertrocknung als innovative Aufkonzentrierungstechnik.

Mit Hilfe einer ÄKTAcrossflow™ - Anlage konnte der Prozess der Aufkonzentrierung von Cetuximab hinsichtlich Dauer und Endkonzentration optimiert werden. Die maximal erreichbare Konzentration betrug hierbei 183 mg/ml. Der TFF sind

hinsichtlich der Maximalkonzentration durch die zunehmende Viskosität bei Konzentrationserhöhung Grenzen gesetzt.

Alternative Prozesse zur Erzielung solch hoher bzw. noch höherer Konzentrationen stellen Trocknungsverfahren dar. Mit Hilfe der Gefriertrocknung wurde versucht, die Konzentration von Cetuximab in Lösung noch weiter zu erhöhen. Durch das patentgeschützte Verfahren der Gefriertrocknung mit anschließender Rekonstitution in geringerem Volumen konnte eine Konzentration von ca. 330 mg/ml erzielt werden. Aufgrund der hohen Viskosität war diese Lösung jedoch nicht mehr spritzbar. Im Konzentrationsbereich bis 200 mg/ml kann die Formulierung hingegen problemlos subcutan appliziert werden. Das Verfahren ist daher grundsätzlich sehr gut für die initiale Testung der Aufkonzentrierbarkeit im Rahmen der Entwicklung hochkonzentrierter Formulierungen geeignet. Ein Nachteil ist jedoch die mit der Proteinkonzentrierung einhergehende Aufkonzentrierung der Hilfsstoffe. Um den langen Prozess der kompletten Gefriertrocknung und das bestehende Patent dafür zu umgehen, wurde ein weiteres Verfahren zur Aufkonzentrierung untersucht: Cetuximab wurde mittels partieller Gefriertrocknung im Bulk aufkonzentriert. Hierbei wurde der Trocknungsprozess auf Stufe der Primärtrocknung nach Entfernen der gewünschten Wassermenge angehalten und eine In-Situ-Rekonstitution des teilweise getrockneten Produktes beim Auftauen durchgeführt. Durch diese Technik konnte die Prozesszeit im Gegensatz zur konventionellen Gefriertrocknung erheblich verkürzt werden. Die erreichte Konzentration ist hier ähnlich flexibel wie im Falle der kompletten Gefriertrocknung, und Cetuximab-Konzentrationen über 180 mg/ml waren einfach zu erreichen. Die Stabilität des Antikörpers wurde durch den Prozess nicht nachteilig beeinflusst. Eine exakte Voraussage des Prozessendes und der erreichten Konzentration ist allerdings durch die Variabilität der Sublimationsrate im Lyophilisationsprozess eher schwierig und sollte zur Optimierung des Verfahrens noch genauer untersucht werden.

Stabilisierungs- und Destabilisierungseffekte von Polysorbat 80, Macrogol-15-hydroxystearat und Poloxamer 188 auf Cetuximab wurden mittels Stresstests und Standardanalytik zur Aggregatdetektion untersucht. Bei einer 100 mg/ml Cetuximab-Formulierung wurde mit allen drei Tensiden bei Schüttelstress ein deutlich destabilisierender Effekt bei sehr geringen Tensidkonzentrationen detektiert. Die

Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass dies ein generelles Phänomen für Tenside sein könnte. Um eine finale Aussage hierzu treffen zu können, müssten Untersuchungen mit weiteren Detergentien und auch weiteren Antikörpern bzw. weiteren Proteinen vorgenommen werden.

Die stabilisierenden Konzentrationen lagen jeweils oberhalb der CMC der drei Tenside. Für Polysorbat 80 wurden die Versuche ausgeweitet und Schüttelstress-tests auch mit einer 10 und einer 1 mg/ml Formulierung durchgeführt. Der destabilisierende Effekt wurde auch hier beobachtet. Als Mindestmenge an Polysorbat 80 für eine Stabilisierung der Formulierungen wurde für 1 und 10 mg/ml 0,01 % und für 100 mg/ml 0,03 % identifiziert. Polysorbat 80 vermochte Cetuximab jedoch nicht gegen Temperaturstress zu stabilisieren. Eine Studie mit gestresstem Polysorbat zeigte weiterhin, dass Abbauprodukte und Peroxide im Polysorbat die Bildung löslicher Aggregate begünstigen. Um zu prüfen, ob direkte Wechselwirkungen zwischen Protein- und Tensidmolekülen bestehen, wurden Studien mit ITC und SPR durchgeführt. Neben Cetuximab wurde auch BSA als Prototyp eines Proteins mit hydrophober Bindungstasche zur Interaktionsuntersuchung herangezogen. Mit keiner der beiden Techniken konnte für Cetuximab eine messbare Interaktion festgestellt werden. Für das BSA konnte mittels ITC eine schwache Interaktion mit Polysorbat 80 nachgewiesen werden. Somit sind die Interaktionen zwischen Protein und Tensid normalerweise entweder nicht vorhanden oder so schwach, dass sie mit den Methoden nicht messbar sind.

Zusammenfassend wurden mit den untersuchten Aufkonzentrierungsmethoden Cetuximabkonzentrationen bis 330 mg/ml bei sehr guter Stabilität erreicht. Interaktions- und Aggregationsstudien lieferten umfangreiche Informationen zum Stabilisierungsverhalten von Tensiden in gering- und hochkonzentrierten Cetuximabformulierungen. Eine direkte Interaktion zwischen Protein und Tensid konnte nicht nachgewiesen werden. Aufbauend auf den Ergebnissen zur Interaktionsbestimmung könnten weitere Studien eine breitere Auswahl von Proteinen, Tensiden und Analyse-Techniken betrachten.

## Literaturverzeichnis

- Aimar, P. und Field, R. (1992). Limiting flux in membrane separations: A model based on the viscosity dependency of the mass transfer coefficient. *Chemical Engineering Science*, 47(3):579–586.
- Al-Hammami, O. M. und Richards, J. H. (1996). Effects of excipients on the bioavailability of sodium salicylate from orally administered, oily suspensions. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71(4):297–303.
- Andya, J., Cleland, J., Hsu, C., Lam, X., Overcashier, D., Shire, S., Yang, J. und Wu, S.-Y. (2001). Protein formulation. (US 6,267,958).
- Arakawa, T. und Kita, Y. (2000). Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(5):646–651.
- Arouri, A., Garidel, P., Kliche, W. und Blume, A. (2007). Hydrophobic Interactions are the Driving Force for the Binding of Peptide Mimotopes and staphylococcal Protein A to Recombinant Human IgG1. *European Biophysics Journal*, 36:647–660.
- Arvinte, T. und Fauquex, P. (2002). Stable liquid formulations of antibodies. (WO/2002/096457).
- Bam, N., Cleland, J. und Randolph, T. (1996). Molten Globule Intermediate of Recombinant Human Growth Hormone: Stabilization with Surfactants. *Biotechnology Progress*, 12(6):801–809.
- Bam, N., Cleland, J., Yang, J., Manning, M., Carpenter, J., Kelley, R. und Randolph, T. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12):1554–1559.
- Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab. *European Journal of Cancer*, 37:16–22.
- Bauer, K. H. (1997). Pharmaceutical Formulations. (EP0591204).

- Bee, J. S., Chiu, D., Sawicki, S., Stevenson, J. L., Chatterjee, K., Freund, E., Carpenter, J. F. und Randolph, T. W. (2009). Monoclonal antibody interactions with micro- and nanoparticles: Adsorption, aggregation, and accelerated stress studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9):3218–3238.
- Berkenhoff, K. (2013). *Subcutaneous suspensions of therapeutic proteins formulated as protein-coated microcrystals*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Bhattacharyya, J. und Das, K. (1999). Effect of surfactants on the prevention of protein aggregation during unfolding and refolding processes-comparison with molecular chaperone alpha -crystallin. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20(4):1163–1178.
- Bollag, D., Rozycki, M. und Edelstein, S. (1996). Concentrating Protein Solutions. In Bollag, D., Rozycki, M. und Edelstein, S., *Protein Methods*, volume 2, 83–106. Wiley-Liss, New York.
- Breen, E., Curley, J., Overcashier, D., Hsu, C. und Shire, S. (2001). Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. *Pharmaceutical Research*, 18:1345–1353.
- Brose, D., Dosmar, M. und Jornitz, M. (2002). Membrane Filtration. In Nail, S. und Akers, M., *Pharmaceutical Biotechnology*, 213–279. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Bull, H. B. (1956). Adsorption of bovine serum albumin on glass. *Biochimica et Biophysica Acta*, 19(0):464–471.
- Burckbuchler, V., Mekhloufi, G., Paillard Giteau, A., Grossiord, J., Huille, S. und Agnely, F. (2010). Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76:351–356.
- Burns, D. und van Reis, R. (1999). Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(1):27–37.
- Bush, L., Webb, C., Bartlett, L. und Burnett, B. (1998). The formulation of recombinant factor IX: stability, robustness, and convenience. *Seminars in Hematology*, 35(2):18–21.
- Callahan, W., Narhi, L., Kosky, A. und Treuheit, M. (2001). Sodium Chloride Enhances the Storage and Conformational Stability of BDNF and PEG-BDNF. *Pharmaceutical Research*, 18(3):261–266.



- Carpenter, J., Kendrick, B., Chang, B., Manning, M. und Randolph, T. (1999). Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics. *Methods in Enzymology*, 309(Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates):236–255.
- Carpenter, J., Pikal, M., Chang, B. und Randolph, T. (1997). Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advice. *Pharmaceutical Research*, 14(8):969–974.
- Chang, B., Kendrick, B. und Carpenter, J. (1996). Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12):1325–1330.
- Chang, B. und Patro, S. (2004). Freeze-drying Process Development for Protein Pharmaceuticals. In Pikal, M. und Costantino, H., *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, number 2.4., 113–138. AAPS Press.
- Charman, S., Mason, K. und Charman, W. (1993). Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone. *Pharmaceutical Research*, 10(7):954–962.
- Chawla, A., Hinberg, I., Blais, P. und Johnson, D. (1985). Aggregation of insulin, containing surfactants, in contact with different materials. *Diabetes*, 34:420–424.
- Chi, E., Krishnan, S., Randolph, T. und Carpenter, J. (2003). Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20(9):1325–1336.
- Chou, D. (2005). Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of albutropin during Agitation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6):1368–1381.
- Cilurzo, F., Selmin, F., Minghetti, P., Adami, M., Bertoni, E., Lauria, S. und Montanari, L. (2011). Injectability Evaluation: An Open Issue. *AAPS PharmSciTech.*, 12(2):604–609.
- Cleland, J., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T., Overcashier, D., Brooks, D., Hsu, C. und Carpenter, J. (2001). A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(3):310–321.
- Cleland, J. und Wang, D. (1990). Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase B: quasi-elastic light scattering analysis. *Biochemistry*, 29(50):11072–11078.
- Colton, R., Pahl, I., Ottaviano, L., Bodeutsch, T. und Meyeroltmanns, F. (2002). Study of protein adsorption effects on crossflow filtration using BSA and milk protein. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 56(1):20–30.

- Cordoba, A. J., Shyong, B. J., Breen, D. und Harris, R. J. (2005). Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *Journal of Chromatography B*, 818(2):115–121.
- Cromwell, M., Hilario, E. und Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS Journal*, 8(3):E572–E579.
- Cueto, M., Dorta, M., Munguia, O. und Llabr,s, M. (2003). New approach to stability assessment of protein solution formulations by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1-2):159–166.
- Dani, B., Platz, R. und Tzannis, S. T. (2007). High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(6):1504–1517.
- Deechongkit, S., Wen, J., Narhi, L. O., Jiang, Y., Park, S. S., Kim, J. und Kerwin, B. A. (2009). Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9):3200–3217.
- Ding, S. (1993). Quantitation of hydroperoxides in the aqueous solutions of non-ionic surfactants using polysorbate 80 as the model surfactant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11(2):95–101.
- Donbrow, M., Azaz, E. und Pillersdorf, A. (1978). Autoxidation of polysorbates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67:1676–1681.
- Doran, P. M. (2006). Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *Journal of Biotechnology*, 122(1):39–54.
- Duncan, M. R., Lee, J. M. und Warchol, M. P. (1995). Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *International Journal of Pharmaceutics*, 120(2):179–188.
- Effendy, I. und Maibach, H. I. (1995). Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 33(4):217–225.
- Eisenberg, H., Josephs, R. und Reisler, E. (1977). Scattering correction to the absorbance, wavelength dependence of the refractive index increment, and molecular weight of the bovine liver glutamate dehydrogenase oligomer and subunits. *Biopolymers*, 16(12):2773–2783.
- Eppler, A. (2012). *Die Auswirkungen physikalischen Stresses auf monoklonale Antikörper in der Formulierungsentwicklung; Kap. 3: Material und Methoden*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 27–51.

- Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A. und Bunjes, H. (2010). Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2):139–147.
- Eppler, A., Weigandt, M., Schulze, S., Hanefeld, A. und Bunjes, H. (2011). Comparison of different protein concentration techniques within preformulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1):120–129.
- Fabry, B. (1991). Tenside. : Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie in unserer Zeit*, 25(4):214–222.
- Fatouros, A., Österberg, T. und Mikkaelsson, M. (1997). Recombinant factor VIII SQ-Influence of oxygen, metal ions, pH and ionic strength on its stability in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 155(1):121–131.
- Führling, C. (2004). *Interactions between Proteins, Sugars and Surfactants – Dynamic Studies on Adsorption at Interfaces*. Dissertation, Friedrich – Alexander Universität, Erlangen – Nürnberg.
- Friess, W., Mahler, H. und Jörg, S. (2010). Highly Concentrated Protein Formulations. In Mahler, H., Borchard, G. und Luessen, H., *Protein Pharmaceuticals: Formulation, Analytics and Delivery*, 192–220. Editio Cantor Verlag, Aulendorf.
- Garidel, P. (2009). A thermodynamic analysis of the binding between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilisation. *Biophysical Chemistry*, 143:70–78.
- Gelamo, E. L., Itri, R., Alonso, A., da Silva, J. V. und Tabak, M. (2004). Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277(2):471–482.
- Giancola, C., De Sena, C., Fessas, D., Graziano, G. und Barone, G. (1997). DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(3):193–204.
- Gokarn, Y., Kras, E., Nodgaard, C., Dharmavaram, V., Fesinmeyer, R., Hultgen, H., Brych, S., Remmele, R., Brems, D. und Hershenson, S. (2008). Self-buffering antibody formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8):3051–3066.
- Gokarn, Y. R., Kras, E., Remmele, R., Brems, D. und Hershenson, S. (2006). Self-Buffering Protein Formulations. (WO2006/138181).

- Gomme, P. T., Prakash, M., Hunt, B., Stokes, N., Cleary, P., Tatford, O. C. und Bertolini, J. (2006). Effect of lobe pumping on human albumin: development of a lobe pump simulator using smoothed particle hydrodynamics1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(2):113–120.
- Gottschalk, S. (2008). *Crystalline Monoclonal Antibodies: Process Development for Large Scale Production, Stability and Pharmaceutical Applications*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Gronewold, T. M. (2007). Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: Recent trends and challenges. *Analytica Chimica Acta*, 603(2):119–128.
- Gunning, P., Mackie, A., Gunning, A., Wilde, P., Woodward, N. und Morris, V. (2004). The effect of surfactant type on protein displacement from the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 18(3):509–515.
- Ha, E., Wang, W. und Wang, J. (2002). Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(10):2252–2264.
- Harris, R., Shire, S. und Winter, C. (2004). Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies. *Drug Development Research*, 61(3):137–154.
- Hatefi, A. und Amsden, B. (2002). Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 80(1/3):9–28.
- Hawe, A., Kasper, J. C., Friess, W. und Jiskoot, W. (2009). Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze/thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(2):79–87.
- Helenius, A., McCaslin, D., Fries, E. und Tanford, C. (1979). Properties of detergents. *Methods Enzymol.*, 56:734–749.
- Hillgren, A., Evertsson, H. und Aldén, M. (2002a). Interaction Between Lactate Dehydrogenase and Tween 80 in Aqueous Solution. *Pharmaceutical Research*, 19(4):504–510.
- Hillgren, A., Lindgren, J. und Aldén, M., M. (2002b). Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH. *International Journal of Pharmaceutics*, 237:57–69.
- Huisman, I., Pradanos, P. und Hernandez, A. (2000). The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 179(1-2):79–90.

- ICH (2003). Photostability testing of new drug substances and products. In *Guideline Q1B*, chapter ICH Guideline Q1B. International Conference on Harmonisation.
- Jaeger, J., Sorensen, K. und Wolff, S. (1994). Peroxide accumulation in detergents. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 29(1):77–81.
- Jelinek, A. (2001). *In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Jones, L., Bam, N. und Randolph, T. (1997). Surfactant-stabilized protein formulations: a review of protein-surfactant interactions and novel analytical methodologies. *ACS Symp. Ser.*, 675(Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery):206–222.
- Joshi, O. und McGuire, J. (2009). Adsorption Behavior of Lysozyme and Tween 80 at Hydrophilic and Hydrophobic Silica-Water Interfaces. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2):235–248.
- Kanai, S., Liu, J., Patapoff, T. und Shire, S. (2008). Reversible self-association of a concentrated monoclonal antibody solution mediated by Fab-Fab interaction that impacts solution viscosity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10):4219–4227.
- Karlsson, R., Roos, H., Bruno, J. und Stolz, L. (1997). Practical aspects concerning direct detection of low molecular weight analytes using BIACORE 2000. *BIAjournal*, special issue:18–21.
- Katakam, M. und Banga, A. (1997). Use of poloxamer polymers to stabilize recombinant human growth hormone against various processing stresses. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2:143–149.
- Katakam, M., Bell, L. und Banga, A. (1995). Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(6):713–716.
- Kerwin, B. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8):2924–2935.
- Kerwin, B., Heller, M., Levin, S. und Randolph, T. (1998). Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20 degrees C of a recombinant hemoglobin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(9):1062–1068.

- Kiese, S., Pappenberger, A., Friess, W. und Mahler, H. C. (2010). Equilibrium studies of protein aggregates and homogeneous nucleation in protein formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2):632 644.
- Kiese, S., Pappenberger, A., Friess, W. und Mahler, H. (2008). Shaken, not stirred: Mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Kishore, R., Kiese, S., Fischer, S., Pappenberger, A., Grauschopf, U. und Mahler, H. C. (2011a). The Degradation of Polysorbates 20 and 80 and its Potential Impact on the Stability of Biotherapeutics. *Pharmaceutical Research*, 28(5):1194 1210.
- Kishore, R. S., Pappenberger, A., Dauphin, I. B., Ross, A., Buergi, B., Staempfli, A. und Mahler, H. C. (2011b). Degradation of polysorbates 20 and 80: Studies on thermal autoxidation and hydrolysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2):721 731.
- Kreilgaard, L., Frokjaer, S., Flink, J., Randolph, T. und Carpenter, J. (1998a). Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid. *Arch.Biochem.Biophys.*, 360:121 134.
- Kreilgaard, L., Jones, L., Randolph, T., Frokjaer, S., Flink, J., Manning, M. und Carpenter, J. (1998b). Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12):1597 1603.
- Lam, X., Yang, J. und Cleland, J. (1997). Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(11):1250 1255.
- Le, M. und Howell, J. (1985). Ultrafiltration. In Cooney, C. und Humphrey, A., *Comprehensive Biotechnology*, number 25, 383 409. Pergamon Press.
- Lee, H. J., McAuley, A., Schilke, K. F. und McGuire, J. (2011). Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of protein drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(13):1160 1171.
- Liang, Y. (2006). Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Protein Folding and Molecular Recognition. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3(3):209 219.
- Liu, J., Nguyen, M., Andya, J. und Shire, S. (2005). Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(9):1928 1940.

- Liu, J. und Shire, S. (2002). Reduced-viscosity concentrated protein formulations. (US2002045571).
- Lueckel, B., Helk, B., Bodmer, D. und Leuenberger, H. (1998). Effects of Formulation and Process Variables on the Aggregation of Freeze-Dried Interleukin-6 (IL-6) After Lyophilization and on Storage. *Pharmaceutical Development and Technology*, 3(3):337 346.
- Maa, Y.-F. und Hsu, C. (1997). Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnol.Bioeng.*, 54(6):503 512.
- Mahler, H., Muller, R., Friess, W., Delille, A. und Matheus, S. (2005). Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *European Journal of Phamaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3):407 417.
- Mahler, H. C., Friess, W., Grauschopf, U. und Kiese, S. (2009a). Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9):2909 2934.
- Mahler, H. C., Huber, F., Kishore, R. S., Reindl, J. and Rückert, P. und Müller, R. (2010). Adsorption behavior of a surfactant and a monoclonal antibody to sterilizing-grade filters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(6):2620 2627.
- Mahler, H. C., Senner, F., Maeder, K. und Mueller, R. (2009b). Surface activity of a monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12):4525 4533.
- Malmsten, M. (2002). *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, volume Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Marcel Dekker, New York.
- Mao, Y., Thompson, M., Wang, Q. und Tsai, E. (2004). Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(5):1127 1142.
- Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M. und Nabetani, H. (2001). Mechanism of bovine serum albumin aggregation during ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2):233 238.
- Mathes, J. (2010). *Protein Adsorption to Vial Surfaces - Quantification, Structural and Mechanistic Studies, Chapter 4: Influence of the Protein Formulation on IgG Adsorption to Vials*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 84 120.
- Matheus, S. (2006a). *Development of High Concentration cetuximab Formulations using Ultrafiltration and Precipitation Techniques; Kap. IV: Preparation of High Concentration cetuximab Formulations by Ultrafiltration Techniques*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 77 98.

- Matheus, S. (2006b). *Development of High Concentration cetuximab Formulations using Ultrafiltration and Precipitation Techniques Kap V: Preparation of High Concentration cetuximab Formulations by Precipitation Techniques*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 99–125.
- Matheus, S. (2006c). *Development of High Concentration cetuximab Formulations using Ultrafiltration and Precipitation Techniques Kap VI: Formulation of a stable liquid high concentration cetuximab formulation*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 127–198.
- Mattern, M., Winter, G., Rudolph, R. und Lee, G. (1997). Formulation of proteins in vacuum-dried glasses. I: Improved vacuum-drying of sugars using crystallising amino acids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44(2):177–185.
- McAuley, W. J., Jones, D. S. und Kett, V. L. (2009). Characterisation of the interaction of lactate dehydrogenase with tween-20 using isothermal titration calorimetry, interfacial rheometry and surface tension measurements. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(8):2659–2669.
- McLeod, Walker, Zheng und Hayward (2000). Loss of factor VIII activity during storage in PVC containers due to adsorption. *Haemophilia*, 6(2):89–92.
- Meireles, M., Aimar, P. und Sanchez, V. (1991). Albumin denaturation during ultrafiltration: Effects of operating conditions and consequences on membrane fouling. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(5):528–534.
- Michaels, A. und Matson, S. (1985). Membranes in biotechnology: State of the art. *Desalination*, 53:231–258.
- Min Won, C., Molnar, T. E., McKean, R. E. und Spenlehauer, G. A. (1998). Stabilizers against heat-induced aggregation of RPR 114849, an acidic fibroblast growth factor (aFGF). *International Journal of Pharmaceutics*, 167(1/2):25–36.
- Murgia, S., Fadda, P., Colafemmina, G., Angelico, R., Corrado, L., Lazzari, P., Monduzzi, M. und Palazzo, G. (2013). Characterization of the Solutol HS15/water phase diagram and the impact of the 9-tetrahydrocannabinol solubilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 390(1):129–136.
- Nagamune, N., Tomoyuki, T., Hideki, K. und Mitsuru, T. (1982). Interaction between hydrophilic proteins and non-ionic detergents studies by surface tension measurements. *Bulletin of the Chemical Society Japan*, 55:3085–3088.
- Neises, B. und Steglich, W. (1978). Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, 17(7):522–524.



- Nielsen, A. D., Borch, K. und Westh, P. (2000). Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1479(1-2):321-331.
- Okumu, F. (2001). Sustained Release Formulations of Growth Hormone. (WO2001/078683).
- Organische-chemie.ch (Stand: 11. August 2013). <http://www.organische-chemie.ch/OC/Namen/steglich-veresterung.htm>. Internetquelle.
- Overcashier, D., Patapoff, T. und Hsu, C. (1999). Lyophilization of protein formulations in vials: Investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(7):688-695.
- Overcashier, D. E., Brooks, D. A., Costantino, H. R. und Hsu, C. C. (1997). Preparation of excipient-free recombinant human tissue-type plasminogen activator by lyophilization from ammonium bicarbonate solution: An investigation of the two-stage sublimation phenomenon. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(4):455-459.
- Patapoff, T. W. und Esue, O. (2009). Polysorbate 20 prevents the precipitation of a monoclonal antibody during shear. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(6):659-664.
- Patro, S., Freund, E. und Chang, B. (2002). Protein formulation and fill-finish operations. *Biotechnology Annual Review*, 8:55-84.
- Patten, P. und H., S. (2003). The immunogenicity of biopharmaceuticals. Lessons learned and consequences for protein drug development. *Development in Biologicals*, 112:81-97.
- Pavlou, A. und Belsey, M. (2005). The therapeutic antibodies market to 2008. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3):389-396.
- Persson, K. M. und Gekas, V. (1994). Factors influencing aggregation of macromolecules in solution. *Process Biochemistry*, 29(2):89-98.
- Ph.Eur. (2008a). 2.9.19: Nichtsichtbare Partikel. In *Europäisches Arzneibuch 6.0*. Brüssel: European Directorate for the Quality of Medicine.
- Ph.Eur. (2008b). 2.9.20: Sichtbare Partikel. In *Europäisches Arzneibuch 6.0*. Brüssel: European Directorate for the Quality of Medicine.
- Pikal, M., Dellerman, K., Roy, M. und Riggan, R. (1991). The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. *Pharmaceutical Research*, 8(4):427-436.

- Pitt-Rivers, R. und Ambesi Impiombato, F. (1968). The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochemical Journal*, 109(5):825-830.
- Pohl, T. (1990). Concentration of proteins and removal of solutes. In Murray, P., *Methods in Enzymology Guide to Protein Purification*, volume Volume 182, 68-83. Academic Press.
- Praefcke, G. und Herrmann, C. (2005). Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum*, 1/05:44-47.
- Randolph, T. und Jones, L. S. (2002). Chapter 7: Surfactant-protein interactions. In Carpenter, J. und Manning, M., *Rational Design of Stable Protein Formulations - Theory and Practice*, 159-175. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Reinhart, T. und Bauer, K. (1995). Untersuchungen zum Hämolyse- und Solubilitätsverhalten einiger nichtionischer Tensidklassen. *Pharmazie*, 50(6):403-407.
- Remmele, R.L., J., Nightlinger, N., Srinivasan, S. und Gombotz, W. (1998). Interleukin-1 receptor (IL-1R) liquid formulation development using differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Research*, 15(2):200-208.
- Rich, R. L. und Myszka, D. G. (2004). Why you should be using more SPR biosensor technology. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(3):301-308.
- Rich, R. L. und Myszka, D. G. (2005). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, 18(6):431-478.
- Rosenberg, A. (2006). Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *The AAPS Journal*, 8(3):E501-E507.
- Rosenberg, E. (2010). *Aggregation of Therapeutic Antibodies in the Course of Downstream Processing; Kap. III: Highly concentrated mAb solutions: Optimized operational parameters in UF*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 47-79.
- Rosenberg, E., Hepbildikler, S., Kuhne, W. und Winter, G. (2009). Ultrafiltration concentration of monoclonal antibody solutions: Development of an optimized method minimizing aggregation. *Journal of Membrane Science*, 342:50-59.
- Rubin, D. und Christy, C. (2002). Selecting the Right Ultrafiltration Membrane for Biopharmaceutical Applications. *Pharmaceutical Development and Technology*, (12):41-45.

- Saksena, S. und Zydney, A. (1994). Effect of Solution pH and Ionic Strength on the Separation of Albumin from Immunoglobulins (IgG) by Selective Filtration. *Biotechnology and Bioengineering*, 43:960-968.
- Salgin, S. (2007). Effects of Ionic Environments on Bovine Serum Albumin Fouling in a Cross-Flow Ultrafiltration System. *Chemical Engineering & Technology*, 30(2):255-260.
- Saluja, A. und Kalonia, D. S. (2008). Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1-2):1-15.
- Sarciaux, J.-M., Mansour, S., Hagemann, M. und Nail, S. (1999). Effects of Buffer Composition and Processing Conditions on Aggregation of Bovine IgG during Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(12):1354-1361.
- Schellekens, H. (2005). Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 20 Suppl 6:vi 3-vi 9.
- Schellekens, H. und Casadevall, N. (2004). Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *Journal of Neurology*, 251(Suppl. 2):4-9.
- Schiefelbein, L. (2011). *Sugar-Based Surfactants for Pharmaceutical Protein Formulations; Chapter 5: Studies on the Binding Interactions between Nonionic Surfactants and Proteins in Liquid Formulations*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 123-141.
- Shire, S. (2009). Formulation and manufacturability of biologics. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:708-714.
- Shire, S., Shakrokh, Z. und Liu, J. (2004). Challenges in the development of high protein concentration formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6):1390-1402.
- Sluzky, V., Tamada, J., Klibanov, A. und Langer, R. (1991). Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. *PNAS*, 88(21):9377-9381.
- Southall, N. T., Dill, K. A. und Haymet, A. (2001). A View of the Hydrophobic Effect. *Journal of Physical Chemistry*, 106(3):521-533.
- Strickley, R. (2004). Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research*, 21(2):201-230.
- Sukow, W. W., Sandberg, H. E., Lewis, E. A., Eatough, D. J. und Hansen, L. D. (1980). Binding of the triton X series of nonionic surfactants to bovine serum albumin. *Biochemistry*, 19(5):912-917.

- Sukumar, M., Doyle, B., Combs, J. und Pekar, A. (2004). Opalescent Appearance of an IgG1 Antibody at High Concentrations and Its Relationship to Noncovalent Association. *Pharmaceutical Research*, 21(7):1087–1093.
- Tang, X., Nail, S. und Pikal, M. (2006a). Evaluation of manometric temperature measurement, a process analytical technology tool for freeze-drying: Part I, product temperature measurement. *AAPS PharmSciTech*, 7(1):E95–E103.
- Tang, X., Nail, S. und Pikal, M. (2006b). Evaluation of manometric temperature measurement, a process analytical technology tool for freeze-drying: Part II measurement of dry-layer resistance. *AAPS PharmSciTech*, 7(4):E77–E84.
- Thomson, J. A. und Ladbury, J. E. (2004). Isothermal Titration Calorimetry: A Tutorial. In Ladbury, J. E. und Doyle, M. L., *Biocalorimetry II - Applications of Calorimetry in the Biological Science*, 37–57. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Treuheit, M., Kosky, A. und Brems, D. (2002). Inverse relationship of protein concentration and aggregation. *Pharmaceutical Research*, 19(4):511–516.
- Tyagi, A. K., Randolph, T. W., Dong, A., Maloney, K. M., Hitscherich, C. und Carpenter, J. F. (2009). IgG particle formation during filling pump operation: A case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(1):94–104.
- USP (2009). Particulate Matter in Injections. In *USP/NF General Chapter <788>*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville.
- van Reis, R. und Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2):208–211.
- van Zuylen, L., Verweij, J. und Sparreboom, A. (2001). Role of Formulation Vehicles in Taxane Pharmacology. *Investigational New Drugs*, 19(2):125–141.
- Vandanjon, L., Rossignol, N. und Jaouen, P. (1999). Effects of shear on two microalgae species. Contribution of pumps and valves in tangential flow filtration systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(1):1–9.
- Vermeer, A., Bremer, M. und Norde, W. (1998). Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1425(1):1–12.
- VfA e.v. (Stand: 12. August 2012). Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel [www.vfa.de/gentech](http://www.vfa.de/gentech). Internetquelle.

- Vidanovic, D., Askrabic, J., Stankovic, M. und Poprzen, V. (2003). Effects of nonionic surfactants on the physical stability of immunoglobulin G in aqueous solution during mechanical agitation. *Pharmazie*, 58(6):399 404.
- Villalobos, A., Gunturi, S. und Heavner, G. (2005). Interaction of Polysorbate 80 with Erythropoietin: A Case Study in Protein-Surfactant Interactions. *Pharmaceutical Research*, 22(7):1186 1194.
- Vogler, E. A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advanced Colloidal and Interface Sciences*, 74(1/3):69 117.
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 185(2):129 188.
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K. und Nema, S. (2007). Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(1):1 26.
- Wang, W., Wang, Y. und Wang, D. (2008). Dual effects of Tween 80 on protein stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1-2):31 38.
- Webb, S., Cleland, J., Carpenter, J. und Randolph, T. (2002a). A New Mechanism for Decreasing Aggregation of Recombinant Human Interferon-gamma by a Surfactant: Slowed Dissolution of Lyophilized Formulations in a Solution Containing 0,03 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(2):543 58.
- Webb, S., Golledge, S., Cleland, J., Carpenter, J. und Randolph, T. (2002b). Surface adsorption of recombinant human interferon-gamma in lyophilized and spray-lyophilized formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91:1474 1487.
- Welfle, K., Misselwitz, R., Hausdorf, G., Hohne, W. und Welfle, H. (1999). Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1431(1):120 131.
- Wiggenhorn, M., Presser, I. und Winter, G. (2010). Drying Methods for Protein Formulations. In Mahler, H., Borchard, G. und Luessen, H., *Protein Pharmaceuticals - Formulation, Analytics and Delivery*, 162 191. Edition Cantor Verlag.
- Willmann, M. (2003). *Stabilisierung von Pharmazeutischen Proteinlösungen durch Vakuumtrocknung: Verfahrenstechnische Optimierung verschiedener Vakuumtrocknungsverfahren, Untersuchung von Aggregations-Phänomenen und*

- Evaluierung von Hilfsstoffen.* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Yang, T., Bacica, M. und Labarre, M. (2003). Buffered formulations for concentrating antibodies and methods of use thereof. (WO2004001007).
- Ye, H.; Wu, H. (2000). Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16):8961–8966.
- Yokota, A., Tsumoto, K., Shiroishi, M., Kondo, H. und Kumagai, I. (2003). The role of hydrogen bonding via interfacial water molecules in antigen-antibody complexation. The HyHEL-10-HEL interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7):5410–5418.
- Youan, B.-B. (2004). Chronopharmaceutics: gimmick or clinically relevant approach to drug delivery? *Journal of Controlled Release*, 98(3):337–353.
- Zhang, T.; Johansson, J. (2003). An isothermal titration calorimetry study on the binding of four volatile general anesthetics to the hydrophobic core of a four-alpha-helix bundle protein. *Biophysical Journal*, 85(5):3279–3285.
- Zöls, S., Tantipolphan, R., Wiggenhorn, M., Winter, G., Jiskoot, W., Friess, W. und Hawe, A. (2012). Particles in therapeutic protein formulations, Part 1: Overview of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(3):914–935.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name: Katharina Melanie Ziegler  
Geburtsdatum: 08.09.1977  
Geburtsort: Offenbach am Main

## Ausbildung und Beruf

---

seit 01/2013	<b>PHAST GmbH</b> , Homburg Clinical Trial Supply Manager
08/2009 – 12/2012	<b>PHAST GmbH</b> , Homburg Clinical Trial Supply Manager im Einsatz bei Merck Serono, Darmstadt
07/2009	<b>Klosterapotheke</b> , Lorsch Apothekerin
07/2006 - 06/2009	<b>Merck Serono</b> , Darmstadt Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin Department Pharmazie der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München in Kooperation mit Merck Serono, CMC-Development / BPD, Darmstadt
07/2006	Approbation als Apotheker
11/2005 - 04/2006	<b>Merck KGaA</b> , Darmstadt Praktikant im praktischen Jahr gemäß Approbationsordnung
05/2005 - 10/2005	<b>Stadtapotheke</b> , Heppenheim Praktikant im praktischen Jahr gemäß Approbationsordnung
03/2001 - 04/2005	<b>Ruprecht-Karls-Universität</b> , Heidelberg Studium der Pharmazie
08/2000 - 01/2001	<b>Stadtapotheke</b> , Heppenheim Praktikant im Rahmen der Ausbildung zur pharmazeutisch- technischen Assistentin
08/1998 - 06/2000	<b>Martin-Behaim-Schule</b> , Darmstadt Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin
07/1988 - 06/1997	<b>Goethe-Gymnasium</b> , Bensheim Abitur

## **Präsentationen und Puplicationen im Zusammenhang mit der Dissertation**

### **Posterbeitrag**

Ziegler, K., Schwartz, D., Frieß, W.: Agitation-induced Aggregation Behaviour of an IgG Antibody: Effect of Protein and Surfactant Concentration.  
6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spanien, 7. - 10. April 2008